



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Dottorato di Ricerca
in Scienze Ambientali
ciclo 30°

Tesi di Ricerca

**Ulvaceae e Rhodophyceae: crescita,
composizione, polisaccaridi solforati e
fitopigmenti per applicazioni
biotecnologiche**

SSD: BIO/07 ECOLOGIA, BIO/11 BIOLOGIA
MOLECOLARE

anno accademico 2017-2018

Coordinatore del Dottorato

ch. Prof. Bruno Pavoni

Supervisore

ch. Prof. Franco Baldi

Dottorando

Andrea Sfriso

Matricola 816877

Ringraziamenti

Ci sono molte persone che devo ringraziare che con piccoli o grandi aiuti e suggerimenti hanno saputo rendere il mio lavoro o la mia persona migliore.

Ringrazio soprattutto Michele Gallo per il sostegno, i consigli e l'allegria che porta in laboratorio ogni giorno e i miei genitori che hanno appoggiato e permesso il compimento di questi studi. Seguono, non in ordine di importanza: il prof. Baldi e il prof. Argese, la prof.ssa Canton, il prof. Rampazzo e la Flavia, Paganelli, Angelini, Stefania, Abd, Gregorio, Alessandro, Mauch, tutta la ciurma dell'officina (anche Giovanni e Sbrizzi) e della portineria, delle segreterie e del ristoro Alfa e Zeta, e tutti coloro che non mi vengono a mente ma che batteranno alla mia porta per ricordarmelo. Grazie a voi ho potuto spendere il mio tempo nel modo più proficuo e piacevole senza rimpiangere di non aver potuto dare di più... non era davvero possibile, ma di cose da sperimentare me ne vengono in mente ancora tante.

INDICE

1. ABSTRACT	9
2. PREMESSE	11
3. OBIETTIVI	13
4. INTRODUZIONE GENERALE	15
4.1 Le lagune costiere	15
4.2 La Laguna di Venezia: inquadramento storico	16
4.3 Sfruttamento delle alghe.....	18
<i>Implicazioni economiche: il confronto con la vongola</i>	18
<i>Altri possibili benefici</i>	20
5. SPECIE OGGETTO DI STUDIO.....	23
5.1 <i>Agardhiella subulata</i> (C. Agardh) Kraft et Wynne, 1979.	23
5.2 <i>Gracilaria gracilis</i> (Stackhouse) Steentoft, Irvine et Farham, 1995.	25
5.3 <i>Gracilaria vermiculophylla</i> (Ohmi) Papenfuss, 1967.	27
5.4 <i>Gracilariopsis longissima</i> (S.G.Gmelin) Steentoft, L. M. Irvine & Farnham, 1995.	29
5.5 <i>Polysiphonia morrowii</i> Harvey, 1857.....	31
5.6 <i>Pyropia elongata</i> (Kyllin) Neefus et J. Brodie, 2011.	33
5.7 <i>Ulva rigida</i> C. Agardh, 1822.	35
6. CRESCITA ALGALE	39
6.1 Introduzione	39
6.2 Materiali e Metodi.....	40
6.3 Risultati	43
<i>Parametri ambientali</i>	43
<i>Produzione e tassi di crescita</i>	49
<i>Analisi Statistica</i>	52
6.4 Discussione.....	54
6.5 Conclusioni.....	55
7. FRAZIONI BIOCHIMICHE PRINCIPALI	58
7.1 Introduzione	58
<i>Carboidrati e polisaccaridi idrosolubili</i>	58
<i>Proteine</i>	61
<i>Ceneri</i>	62
7.2 Materiali e metodi.....	63
7.3 Risultati	64

<i>Percentuali biochimiche</i>	64
<i>Produzione di agar e ulvano</i>	65
<i>Analisi Statistica</i>	67
7.4 <i>Discussione</i>	68
7.5 <i>Conclusioni</i>	71
8. FICOBILIPROTEINE: ESTRAZIONE, QUANTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE	73
8.1 <i>Introduzione</i>	73
8.2 <i>Materiali e metodi</i>	75
<i>Estrazione</i>	75
<i>Quantificazione</i>	75
<i>Purificazione</i>	76
8.3 <i>Risultati</i>	77
<i>Estrazione</i>	77
<i>Purificazione della PE</i>	80
<i>Spettroscopia EEM 3D</i>	81
<i>Ficobiliprotine nelle alghe rosse</i>	83
8.4 <i>Discussione</i>	84
8.5 <i>Conclusioni</i>	86
9. DATI PRELIMINARI DI RICERCHE IN CORSO	90
9.1 <i>Idrolisi e fermentazione delle biomasse</i>	90
<i>Introduzione</i>	90
<i>Materiali e Metodi</i>	91
<i>Risultati preliminari e Discussione</i>	92
9.2 <i>Resine ad affinità per "Polyhistidina-tag"</i>	98
<i>Introduzione</i>	98
<i>Materiali e metodi</i>	98
<i>Risultati preliminari e Discussione</i>	99
9.3 <i>Ficoeritrina e Argento</i>	100
<i>Introduzione</i>	100
<i>Materiali e metodi</i>	100
<i>Risultati preliminari e Discussione</i>	100
10. COLLABORAZIONI	104
10.1 <i>Effetto di nano particelle d'argento su <i>Ulva rigida</i></i>	104
<i>Introduzione</i>	104
<i>Materiali e metodi</i>	105

<i>Risultati preliminari</i>	106
<i>Discussione</i>	108
<i>Conclusioni preliminari</i>	110
11. PRODOTTI DELLA RICERCA.....	112
11.1 Produzione pregressa al dottorato.....	112
<i>Elenco delle pubblicazioni</i>	112
<i>Partecipazioni e presentazioni (*) a congressi</i>	112
11.2 Produzione durante il triennio del dottorato	114
<i>Elenco delle pubblicazioni</i>	114
<i>Articoli “sottomessi”</i>	115
<i>Partecipazioni e presentazioni (*) a congressi</i>	115
<i>Riconoscimenti e premi:</i>	116
12. BIBLIOGRAFIA	118
13. TABELLE	139



Abstract

1. ABSTRACT

Questo studio approfondisce le dinamiche di crescita e la produzione in campo di quattro specie algali a rapido accrescimento: *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima*, *Gracilaria vermiculophylla* e *Ulva rigida*. Inoltre, indaga quelle che sono le principali frazioni biochimiche nelle stesse alghe quanto a contenuto di: carboidrati totali, polisaccaridi solforati idrosolubili, proteine e ceneri durante l'arco di un anno. L'uso congiunto di queste informazioni svela i periodi e le condizioni più idonee per la coltivazione di tali specie e per la produzione di diversi composti. La valorizzazione delle biomasse algali è stata ulteriormente qualificata dallo studio e messa a punto di metodiche innovative, per l'estrazione e la quantificazione delle ficobiliproteine e per la purificazione della ficoeritrina sulle specie di alghe rosse già citate e su altre tre: *Agardhiella subulata*, *Polysiphonia morrowii* e *Pyropia elongata*. Lo studio si completa descrivendo ricerche e metodiche innovative nella loro fase intermedia o preliminare di sviluppo, queste sono: l'idrolisi e la fermentazione delle biomasse ad opera di ceppi batterici lagunari; lo sviluppo di resine ad alta affinità per la purificazione delle proteine "polyhistidina-tag" e la quantificazione dei rilasci d'argento da diverse matrici per mezzo del "quenching" della ficoeritrina.

This study explores the growth dynamics and the field production of four common fast growing macroalgal species: *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima*, *Gracilaria vermiculophylla* e *Ulva rigida*. Moreover, their biochemical fractions were evaluated along one year: i.e. carbohydrates, sulfated polysaccharides, total proteins and ashes. The data collected for both production and composition were evaluated together, to assess the best period and conditions to harvest seaweeds, aiming to maximize the production of specific compounds.

Moreover a new method was developed to extract, measure and purify phycobiliproteins, also from three other species of red seaweeds: *Agardhiella subulata*, *Polysiphonia morrowii* e *Pyropia elongata*. Eventually the last advancements on some incomplete researches and possible future developments were described: the hydrolysis and fermentation of macroalgal biomasses by wild bacterial strains; the production of high affinity resins for polyhistidina-tag protein purification; the quantification of silver released from different matrices by phycoerythrin quenching.



Premesse



2. PREMESSE

Un utilizzo sostenibile delle risorse marine presuppone necessariamente lo studio pregresso ed approfondito delle risorse stesse e dell'ambiente che le ospita, al fine di comprendere quali sono le specie presenti, nonché le modalità, i tempi e gli sforzi necessari per poterle utilizzare senza compromettere la loro capacità di rigenerazione. A tal proposito, la scelta delle macroalghe per questo lavoro di tesi è stata guidata dall'osservazione della loro incredibile abbondanza e del loro diffuso inutilizzo. Infatti, mentre l'interesse è alto per lo sfruttamento delle risorse ittiche e delle piante comuni, le alghe rimangono dimenticate sui fondali, malgrado siano così abbondanti in Laguna di Venezia, come sul resto delle coste italiane. Anzi, la loro presenza può addirittura creare seri problemi ambientali in tarda primavera-inizio estate, quando ampie distese algali, cresciute rapidamente e spesso stratificate nella colonna d'acqua, cominciano a deperire e collassare intaccando le altre e più "note" risorse marine e provocando disagi ed esalazioni maleodoranti per i residenti. Tuttavia, benché la cultura sull'utilizzo delle macroalghe in Italia sia pressoché inesistente, molte di queste all'estero sono considerate pregiate materie prime e vengono coltivate. Tuttavia è necessario sottolineare che la coltivazione, soprattutto nella Laguna, non implica necessariamente né l'introduzione di nutrimento addizionale, quali i fertilizzanti comunemente utilizzati nelle pratiche agricole (attività tra l'altro vietata dal decreto Ronchi-Costa del 1999), né complesse pratiche di confinamento e gestione, come è necessario per l'allevamento del pesce, poiché anche quando le alghe non crescono adese a substrati duri sono comunque stanziali. L'essenziale è scegliere quanto e quando raccoglierle al fine di mantenere una biomassa stanziale stabile sempre al massimo della crescita. A questo scopo sono state scelte come oggetto di studio specie algali comuni e a rapido accrescimento. La crescita delle alghe e i parametri ambientali sono stati monitorati per un periodo annuale, analizzando, contemporaneamente, l'andamento delle principali frazioni biochimiche. Infine, una volta note le velocità di accrescimento e la resa delle specie più comuni ed interessanti ai fini di un loro sfruttamento, sono state approntate diverse metodiche di purificazione, trasformazione ed utilizzo di composti ad alto valore aggiunto. Pertanto, il fine ultimo di questo studio è quello di fornire una solida base conoscitiva e pragmatica per un possibile sfruttamento sostenibile e redditizio delle alghe nella Laguna di Venezia e più in generale negli ambienti di transizione italiani.



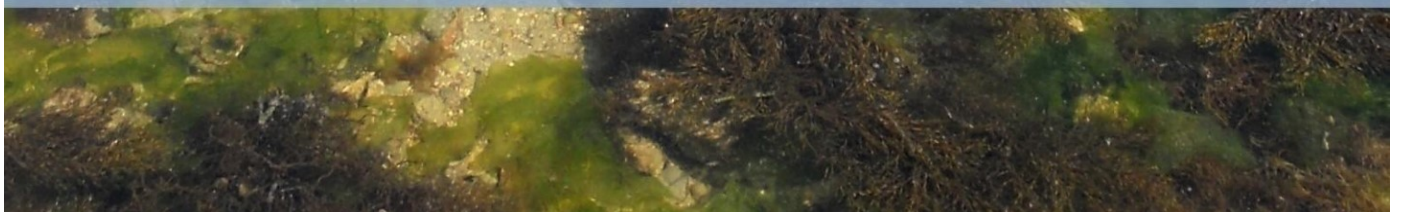
Obiettivi

3. OBIETTIVI

L'obiettivo principale di questo studio è quello di trovare possibili soluzioni per valorizzare al meglio le biomasse algali a rapido accrescimento presenti in Laguna di Venezia e negli ecosistemi di transizione Italiani. Questo tema sarà sviluppato mediante lo studio della crescita delle biomasse di quattro specie macroalgali a rapido accrescimento (tre Gracilariaceae ed *Ulva rigida*); delle principali frazioni biochimiche e nutrizionali e attraverso la quantificazione e purificazione di composti di interesse commerciale e farmaceutico, come i polisaccaridi solforati idrosolubili e le ficobiliproteine.



Introduzione Generale



4. INTRODUZIONE GENERALE

4.1 Le lagune costiere

Le lagune costiere occupano ca. il 13% delle coste del globo e questi ambienti peculiari, sono tra gli habitat marini con la più alta produttività biologica (Alongi, 1998). Questa è ampiamente diversificata, poiché questi ambienti di transizione in continua evoluzione sono sede di un'alta biodiversità: sono presenti più di 621 specie di macrofite e 199 specie di pesci nelle lagune costiere atlantico-mediterranee (Ruzafa *et al.*, 2010). Inoltre, questi ambienti producono numerosi servizi ecosistemici utili all'uomo e l'alta produttività, sebbene con la dovuta accortezza, può essere utilizzata per l'acquacoltura estensiva (Ruzafa *et al.*, 2011). Il Mar Mediterraneo ospita più di 200 lagune di cui il 70% si trovano in Italia (Barnes, 1980). Tra queste 79 bacini hanno una superficie superiore ai 0,5 km² e occupano un area di 1400 km². Nel solo alto Adriatico 21 lagune coprono il 76% della superficie degli ambienti di transizione italiani (Sfriso *et al.*, 2016) e quelle più significative per estensione sono rispettivamente: la laguna di Venezia, la laguna di Marano-Grado, le lagune del delta del Po e le Valli di Comacchio (Viaroli *et Basset*, 2009). Queste lagune del Nord Adriatico coprono un ampio intervallo di condizioni, con ambienti che spaziano da aree incontaminate ad aree severamente impattate. La laguna di Venezia con i suoi 550 km² (di cui 432 km² di superficie acquea) è la più estesa laguna italiana e si estende lungo 50 km di costa tra le foci del fiume Sile a Nord e del Brenta a Sud. La batimetria media è di ca. 1 m ad eccezione dei canali la cui profondità è variabile dai 2 ai 20 m. La morfologia è comprensiva di 117 Km² di isole (corrispondenti al 20% della superficie lagunare), barene, velme e canali. La Laguna scambia acqua con il mare a mezzo di tre bocche di porto, rispettivamente di Lido, di Malamocco e di Chioggia, che permettono un ricambio di ca. il 60% delle acque totali ad ogni ciclo mareale (12 ore) (Brambati *et al.* 2003). Le bocche di Lido e di Malamocco suddividono sommariamente la laguna in tre bacini distinti con proprietà fisico-chimiche ed ecosistemi differenti (**Fig.1**). Le aree equidistanti da queste bocche, note come "partiacque", non risentono del riflusso della marea, e il ristagno dei nutrienti favorisce localmente le fioriture algali. A tal proposito, la laguna di Venezia contiene al proprio interno la maggioranza delle specie macrofittiche presenti nelle altre lagune dell'alto Adriatico (Falace *et al.*, 2009; Sfriso *et al.*, 2009a; Sfriso *et al.*, 2017a).

4.2 La Laguna di Venezia: inquadramento storico

Le alghe sono una risorsa inutilizzata ed abbondante che si riproduce rapidamente negli ecosistemi costieri Italiani. Tra questi ambienti la Laguna di Venezia è il bacino costiero più ampio e conosciuto, sede di una città storica e della sua corte di isole che ne hanno determinato evoluzione e fama. Il bacino della Laguna ha subito storicamente numerose modifiche e trasformazioni ad opera dell'uomo, con la deviazione dei principali fiumi tributari: Brenta, Piave e Sile (1400 – 1600 d.C.) e con il consolidamento dei lidi ad opera della Serenissima Repubblica. Successivamente, sono stati realizzati: la reclamazione di aree agricole, il confinamento delle valli da pesca e l'industrializzazione, con la costruzione del porto industriale di Marghera, negli anni '20 e '30 del secolo scorso e con l'escavazione di grandi canali, quali il canale Malamocco-Marghera e il canale Vittorio Emanuele II (**Fig.1**).

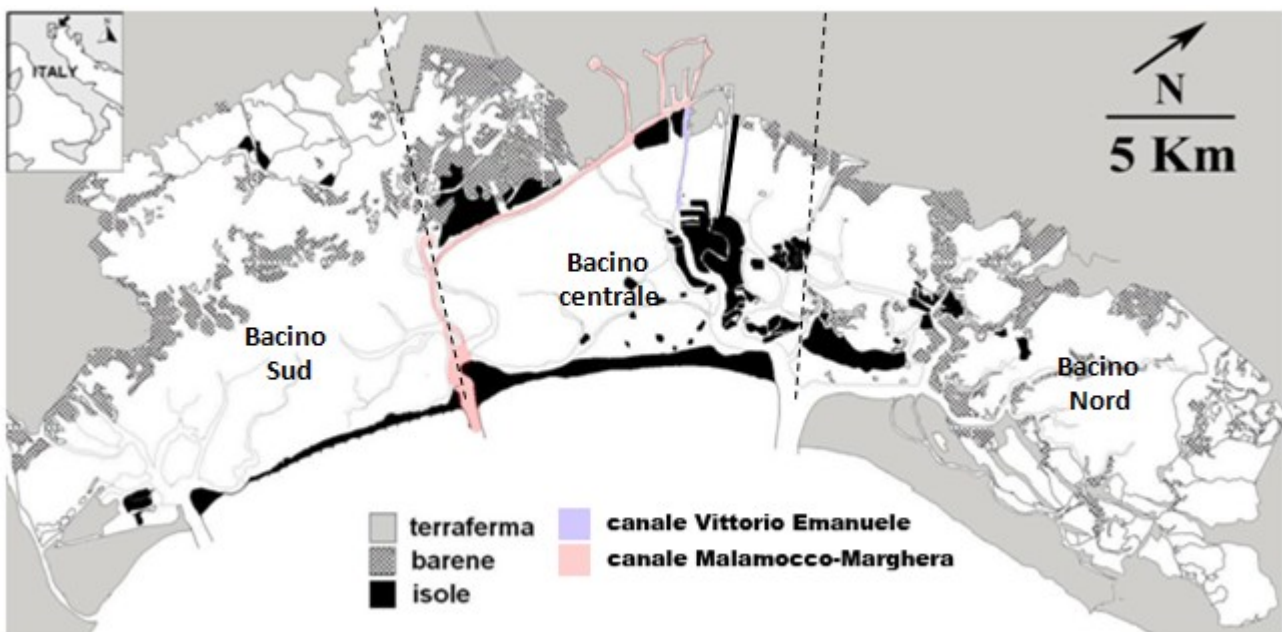


Fig. 1: La Laguna di Venezia.

L'apporto di nutrienti e inquinanti, tra gli anni '60 e '80 (pari a 8200 t anno⁻¹ per l'azoto e 1100 t anno⁻¹ per il fosforo; [Marcomini et al., 1995](#)) dall'area industriale e dalle aree agricole ed urbane di Mestre, Marghera e del Miranese, dotate all'epoca di un sistema fognario incompleto ([Pavoni et al., 1990](#)), ha portato all'alterazione delle popolazioni bentoniche tipiche dell'ambiente lagunare. Negli anni '70 ed '80, le praterie di fanerogame, che caratterizzavano questi ambienti, sono state sostituite da specie di macroalghe tionitrofile e opportuniste, soprattutto Ulvaceae e Gracilariaceae ([Sfriso et Marcomini, 1997](#)). In questo periodo, la produzione lorda delle macroalghe, rappresentate

prevalentemente da *Ulva rigida*, ha raggiunto al suo culmine 18 Mln di tonnellate con biomasse stanziali fino a 20 kg m⁻² e una produzione netta tra 15 e 25 kg m⁻² anno⁻¹ (Sfriso *et al.*, 1993, Sfriso *et Facca*, 2007), mentre le Gracilariales hanno raggiunto nel 1980 una produzione netta di 130 kt anno⁻¹ (Sfriso *et al.*, 1994a, b).

La degradazione di queste specie, che avveniva sistematicamente ogni anno con temperature superiori a 26-27°C, e l'instaurarsi di estesi fenomeni anossici hanno alterato i cicli dei nutrienti e provocato diffuse morie della macrofauna bentonica e ittica stanziale. Contemporaneamente, le concentrazioni di azoto e fosforo nei sedimenti sono aumentate da 2 a 30 volte (Giordani-Soika *et Perin*, 1974; Perin, 1975; Facca *et al.*, 2011). Questo fenomeno è avvenuto a causa del trasferimento dei nutrienti dalle macroalghe in decomposizione al sedimento (Sfriso *et al.*, 1988).

Negli anni '90, il controllo degli sversamenti di nutrienti, avvenuto anche a seguito dell'emanazione del decreto Ronchi-Costa (23 Aprile 1998) ed ad un insieme di concause, tra cui: a) cambiamenti climatici con una progressiva scomparsa delle normali condizioni primaverili, b) aumento della risospensione dei sedimenti (non più ricoperti dalla biomassa algale in forte riduzione), c) incremento del pascolo (grazing) degli organismi erbivori, d) raccolta delle macroalghe da parte degli enti pubblici ed e) declino delle attività del porto industriale di Marghera con la riduzione degli sversamenti di nutrienti dall'entroterra e dalla città di Venezia (dovuta alla costruzione degli impianti di trattamento delle acque di Fusina e Campalto), hanno portato a una riduzione sia delle biomasse algali, che hanno raggiunto un decimo di quella presente negli anni '80, sia della trofia lagunare (Sfriso *et Marcomini*, 1996), determinando la quasi completa scomparsa dei fenomeni distrofici (Marcomini *et al.* 1995; Sfriso *et Marcomini*, 1996). Successivamente, a seguito della riduzione del ricambio idrico dovuto al completo interrimento dei fondali sotto il ponte translagunare che collega Venezia alla terraferma e alla costruzione di barriere morfologiche lungo il canale Malamocco-Marghera negli anni 2013 e 2015, si sono verificati eventi ipo/anossici localizzati nel bacino centrale, dovuti alla decomposizione delle biomasse algali, che, sebbene di entità inferiore rispetto al passato, hanno richiamato l'attenzione generale per le vistose morie di pesci e per la produzione di esalazioni maleodoranti (Bastianini, *et al.* 2013; Sfriso A.A., 2015).

A metà degli anni '90, in parallelo al declino delle biomasse macroalgali e delle attività del porto industriale, si è verificato il rapido sviluppo di una nuova economia basata sulla raccolta della vongola filippina *Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, una specie aliena introdotta nel 1983 per scopi commerciali (Cesari *et Pellizzato*, 1985). Questa specie a rapida diffusione ed accrescimento, che resiste ad ampie variazioni dei parametri ambientali, alle anossie e all'inquinamento, ha in breve tempo soppiantato le specie

autoctone, colonizzando le lagune dell'alto Adriatico. Il notevole valore economico di questa risorsa e la sua abbondanza hanno portato all'utilizzo massivo di "rasche" meccaniche ed idrauliche (ampi rastrelli meccanizzati) per la raccolta, che hanno causato l'aumento della risospensione di materiale particolato, il cambiamento della tessitura dei sedimenti e la riduzione delle concentrazioni di nutrienti e di inquinanti nei sedimenti superficiali, che erano state prodotte dalle attività dei decenni precedenti (Sfriso *et al.*, 2005a, b; Facca *et al.*, 2011). Il pescato di vongole ha mostrato un iniziale trend crescente, culminando nel periodo 1996-2000 con 40000 t anno⁻¹, ma nel corso del decennio successivo si è ridotto linearmente, raggiungendo meno di 2000 t anno⁻¹ nel 2012 e scomparendo da gran parte del bacino lagunare, fatto salvo per le zone limitrofe al Bacino Scolante, l'area di drenaggio delle acque dolci interne che fluiscono in Laguna (www.venetoagricoltura.it; Sfriso A.A., 2013). Pertanto una gestione, mediante raccolta ed utilizzo misurato delle biomasse algali, potrebbe non solo impedire un sovrasviluppo delle loro popolazioni, e i conseguenti effetti deleteri localizzati in laguna, ma essere una fonte di reddito sostitutiva alle vongole per la popolazione locale.

4.3 Sfruttamento delle alghe

Implicazioni economiche: il confronto con la vongola

Per una valutazione economica della risorsa "macroalghe", il cui carattere qui descritto è meramente ipotetico, è imprescindibile il paragone con la filiera della vongola filippina, un'economia che, come detto precedentemente, ha dominato il comparto della pesca in Laguna dagli anni '90 fino alla data odierna.

A tal proposito, parallelamente all'incremento produttivo iniziale dei molluschi, si è evidenziato un trend lineare in aumento nel costo di vendita da 2,1 € kg⁻¹fw nel 1995 a 5,0 € kg⁻¹ fw del 2002, crollato a 2,6 € kg⁻¹ fw nel 2004 e a 1,6 € kg⁻¹ fw nel 2007, legato a produzioni nettamente inferiori rispetto a quelle del 1995 (Boatto *et al.*, 2005). Considerando: che la taglia minima legale per la commercializzazione delle vongole filippine, corrispondente ai 25 mm (4-4,5 g), viene raggiunta dopo un anno dall'insediamento del seme selvatico; che la crescita del seme fino ai 5 mm necessari per la semina richiede almeno 9 mesi; che le concentrazioni ottimali di plancton quale nutrimento per la crescita del seme, stimate per mezzo della concentrazione di Clorofilla-*a* (Chl-*a*) nella colonna d'acqua, sono comprese tra 2 e 11 µg L⁻¹ (Pellizzato *et al.* 2005; Pellizzato *et Penzo*, 2011) e che due campagne di campionamento, comprensive di 120 stazioni nell'anno 2011, hanno riportato concentrazioni medie di Chl- *a* inferiori al limite di

2 $\mu\text{g L}^{-1}$ in gran parte del bacino lagunare (Sfriso, 2011); si può giustificare la quasi totale scomparsa di questa risorsa e di quell'attività di pesca intensiva che si basava su di essa. Invece, le macroalghe in Laguna rappresentano tuttora una risorsa importante e inutilizzata. Una stima della loro biomassa, basata sui valori misurati tra maggio e giugno 2014, rivela la presenza di 480 kt, corrispondenti in media a 1,1 kg m^{-2} fw (Sfriso *et al.*, submitted). Inoltre, in molte aree del bacino centrale, nei partiacque e nelle aree a ridosso del bacino scolante le biomasse raggiungono i 2-3 kg m^{-2} fw; con picchi di 8-12 kg m^{-2} fw (Sfriso *et al.*, submitted). Nel 2011, la produzione totale di macroalghe in 35 paesi è stata stimata in 21 Mln di tonnellate per 7,4 Mld US\$ corrispondenti a 0,35 US\$ kg^{-1} fw (0,30 € kg^{-1} fw; FAO 2012). Inoltre, un'indagine sul valore di mercato delle specie più comuni di alghe essiccate è stata effettuata mediante il motore di ricerca "Alibabà" (<https://italian.alibaba.com/>), un sito di "e-commerce" cinese per mezzo di portale web, che è tra i più importanti siti di vendita a livello mondiale. Ciò ha permesso di comprendere quali siano i prezzi dei più grossi fornitori sul mercato estero per la sola biomassa macroalgale grezza essiccata. La ricerca, con una media di 50 fornitori, per "*Ulva*" ha restituito un costo medio-massimo di 3,6 - 6,0 US\$ kg^{-1} dw (0,6-1,0 € kg^{-1} fw), mentre per "*Gracilaria*" il prezzo è risultato aggirarsi tra 1,1 e 1,5 US\$ kg^{-1} dw (0,1-0,2 € kg^{-1} fw). "*Ulva*", più comune, presenta curiosamente un costo più alto, rispetto a "*Gracilaria*" (il cui costo è più simile a quello riportato dalla FAO). Ciò, probabilmente, è legato all'uso anche alimentare della prima (che è anche nota come Ao-nori – nori azzurra) rispetto alla seconda, che ha invece un unico ruolo come materia prima grezza nella produzione industriale di agar.

Il confronto economico per unità di peso grezzo pescato tra le due risorse, ovvero vongola filippina e macroalghe, ravvisa la vongola come la risorsa più vantaggiosa. Tuttavia, il valore economico per unità di chilo non tiene conto della velocità con cui la risorsa cresce ed è disponibile per unità di superficie. La vongola per raggiungere una taglia commercialmente soddisfacente di 35 mm richiede da 22 a 24 mesi, inoltre la produzione media in Laguna di Venezia (stimata come numero di individui m^{-2} e per peso medio di 4,0 g) si aggirava nel 1999 tra 0,04 e 0,4 kg m^{-2} in gran parte dei bacini Centrale e Nord della Laguna con aree di picco in prossimità di Venezia da 0,4 a 4 kg m^{-2} (Casale *et al.*, 2001; Brusà *et al.*, 2011). Per quanto concerne invece la crescita delle macroalghe sono riportati valori medi di produzione fino 21 kg m^{-2} anno^{-1} (Sfriso *et al.*, 1993; Sfriso *et al.*, 1994) che sono notevolmente superiori ai valori riportati per la vongola (c.a. 10 volte). Tale constatazione non è così sorprendente considerando che le alghe sono produttori primari, a differenza delle vongole che, come filtratori, sono ad un livello secondario della catena

trofica. Benché il valore delle alghe allo stato grezzo sia inferiore rispetto a quello della vongola, le alghe presentano una crescita nettamente superiore.

In base a queste considerazioni le macroalghe posso presentarsi come una valida alternativa alla pesca delle vongole in Laguna. Eventi anossici come quelli avvenuti nell'anno 2013 ([Bastianini et al. 2013](#)), quando una biomassa algale di ca. 10000 t di *Ulva*, localizzata a Nord del ponte translagunare Venezia-Mestre, si è decomposta rapidamente in concomitanza con la locale festa del Redentore, avrebbero potuto essere evitati. Queste biomasse accuratamente gestite, avrebbero potuto produrre introiti tra 1 e 6 Mln € invece che disagio per la città.

Altri possibili benefici

L'aumento degli impatti antropici ha portato a un progressivo degrado degli ambienti di transizione italiani, e purtroppo le condizioni ambientali in alcuni di questi ambienti confinati sono difficili da ripristinare. Ad esempio, come già detto, nella Laguna di Venezia, negli anni '60-'70, si è verificata la progressiva sostituzione della vegetazione locale a fanerogame acquatiche con specie macroalgali a rapido accrescimento. Tuttavia, come si evince dalla vasta bibliografia esistente, la gestione e la coltivazione delle macroalghe potrebbe essere non solo una fonte ingente di materie prime, ma anche uno strumento per il recupero ambientale, esportabile anche in altre aree ecologicamente degradate. Numerosi benefici possono risultare da questa attività:

1. Riduzione dell'apporto di nutrienti delle acque versanti in Laguna con recupero delle aree lagunari ad alta trofia, non idonee, attualmente, alla piantumazione di fanerogame marine.
2. Mitigazione e riduzione della CO₂ prodotta dalle combustioni convenzionali e speciali in linea con le richieste internazionali conseguenti all'accordo di Kyoto;
3. Riduzione degli effetti "serra" e del riscaldamento globale;
4. Produzione di concime agricolo da usarsi tal quale o con processi di compostaggio naturale;
5. Produzione di materiali cellulósici eco-compatibili quali carta, o basi per tessuti come la viscosa e il rayon;

6. Produzione di materiali e composti destinati all'alimentazione umana e alla mangimistica;
7. Produzione di materiali e composti per l'industria farmaceutica e cosmetica;
8. Limitazione ed eliminazione (a regime) delle anossie nella Laguna, conseguenti al degrado delle macroalghe nel periodo tardo primaverile - estivo;
9. Miglioramento della percezione della città da parte dei turisti;
10. Modifica strutturale delle condizioni di lavoro e creazione di nuove tipologie di occupazione sostituendo attività, oggi a reddito basso o nullo, con nuovi input processuali.



Specie oggetto di studio



5. SPECIE OGGETTO DI STUDIO

5.1 *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft et Wynne, 1979.

Famiglia Solieriaceae.

Caratteri distintivi

- Talli cilindrici di 0,5-3 (4) mm di diametro attaccati al substrato mediante piccoli dischi basali;
- Apici acuminati o tronchi con proliferazioni;
- Filamenti interni spessi 8-12-(18) μm ma non avvolti da una spessa membrana ialina.

Descrizione

I talli hanno una struttura simile a quelli del genere *Gracilaria*, ma internamente presentano cellule filamentose e rizoidali. Mediamente misurano 15-20 (35) cm in altezza e 0,5-3 (4) mm in diametro. La ramificazione è irregolarmente alterna e i rami presentano forti costrizioni al loro punto di inserzione. Gli apici sono acuminati, a volte tronchi con piccole proliferazioni. In superficie, le cellule corticali sono sferico-ovoidali, spesso appaiate, e mediamente hanno un diametro di 6-8 (12) μm .

In sezione trasversale, si osservano 3-4 strati di cellule corticali interne ialine di diametro crescente verso l'interno, con misure massime di 100-125 (150) μm . Più all'interno ci sono rade cellule midollari filamentose con diametro di 8-12 (18) μm .

I cistocarpi maturi, visibili come rigonfiamenti arrotondati, misurano 650-750 (800) μm e sono affossati nella parte midollare del tallo.

Nei tetrasporofiti, sono presenti tetrasporangi zonati distinguibili solo in sezione trasversale, poiché le spore sono disposte in senso radiale. Questi misurano 17-25 x 35-40 (50) μm .

È una specie aliena, segnalata per la prima volta nel Mediterraneo, nella Laguna di Thau e nel Mar Piccolo di Taranto nel 1987, è stata rinvenuta solo recentemente nella Laguna di Venezia, dove ora è presente ovunque, ed è diffusa nelle lagune del Po in Emilia Romagna.

Fig.2. riporta una scheda fotografica che evidenzia le principali caratteristiche della specie.

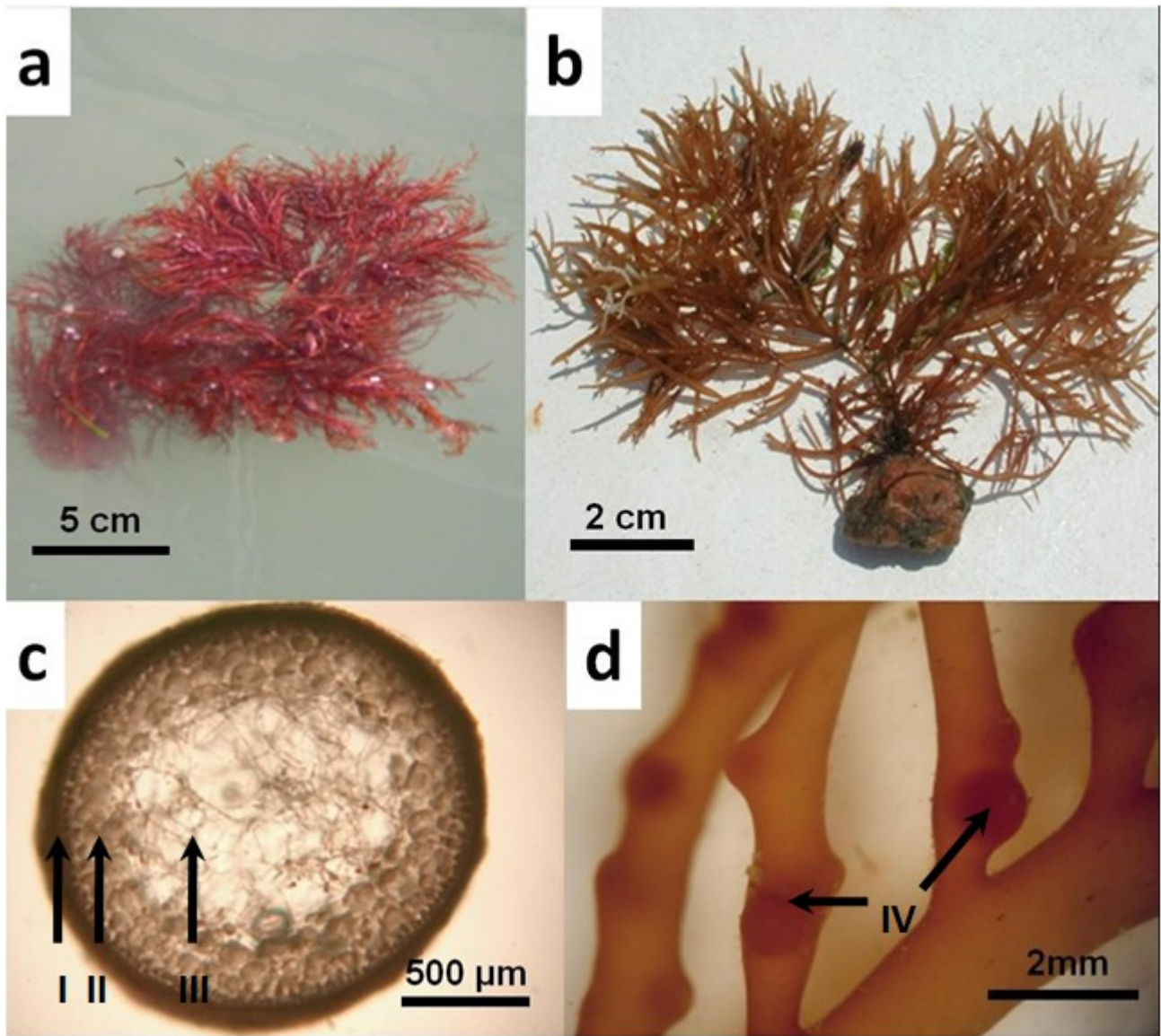


Fig. 2: *Agardhiella subulata* -a) tallo flottante; b) tallo adeso a un substrato; c) sezione di un asse con evidenza delle cellule corticali scure (I), midollari intermedie (II) e delle rizine filamentose centrali (III); d) gametofito femminile con cistocarpi (IV).

Bibliografia di riferimento:

[Gabrielson et Hommersand \(1982\)](#); [Perrone et Cecere \(1994\)](#); [Curiel et al. \(2005\)](#); [Sfriso et Curiel \(2007\)](#); [Cecere et al. \(2009\)](#); [Sfriso et al. \(2009, 2012\)](#); [Guiry et Guiry \(2017\)](#).

5.2 *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft, Irvine et Farham, 1995.

Famiglia Gracilariaceae.

Caratteri distintivi

- Talli cilindrici, cespugliosi, di 0,8-1,2 mm di diametro;
- Ramificazioni abbondanti e ristrette alla base;
- Concettacoli dei gametofiti maschili di tipo “*verrucosa-type*”;
- Presenza di cellule nutritive tubulose tra il gonimoblasto e il pericarpo.

Descrizione

I filamenti sono cilindrici e di ca. 0,8-1,2 mm di diametro. Più filamenti gregari sorgono da uno stesso disco basale. La ramificazione è del tutto irregolare e sui filamenti possono essere presenti numerosi corti rametti esili ristretti alla base o rametti abortiti.

Le cellule corticali sono piccole, sferico-poliedriche, e mediamente misurano (6)-8-10-(12) μm .

In sezione trasversale, si vedono 1-2 strati di piccole cellule corticali scure di 6-12 x 15-20 μm leggermente allungate in senso radiale. Al di sotto di queste, vi sono 1-2 strati di cellule subcorticali di 20-60 μm che circondano grosse cellule midollari depigmentate di 100-150-(200) μm di diametro. I rodoplasti sono globosi ed occupano tutta la cellula o gran parte di questa.

I gametofiti maschili sono poco comuni. Nella corteccia di tutto il tallo formano concettacoli del tipo “*verrucosa-type*”, con cavità di 20-25 x 30-40 μm .

I cistocarpi (ca. 500-700 μm) si formano in tutto il tallo e presentano cellule nutritive tubulose ed allungate di 5-10 x 50-80-100 μm che connettono il gonimoblasto, la parte più interna dove si differenziano le carospore, col pericarpo esterno.

I tetrasporofiti presentano tetrasporangi che mediamente misurano 25-30 x 30-40 μm .

Questa specie fa parte del complesso ex *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss da cui sono state distinte *G. gracilis*, *G. longa* Gargiulo, De Masi, et Tripodi e *Gracilariopsis longissima*.

Fig.3. riporta una scheda fotografica che evidenzia le principali caratteristiche della specie.

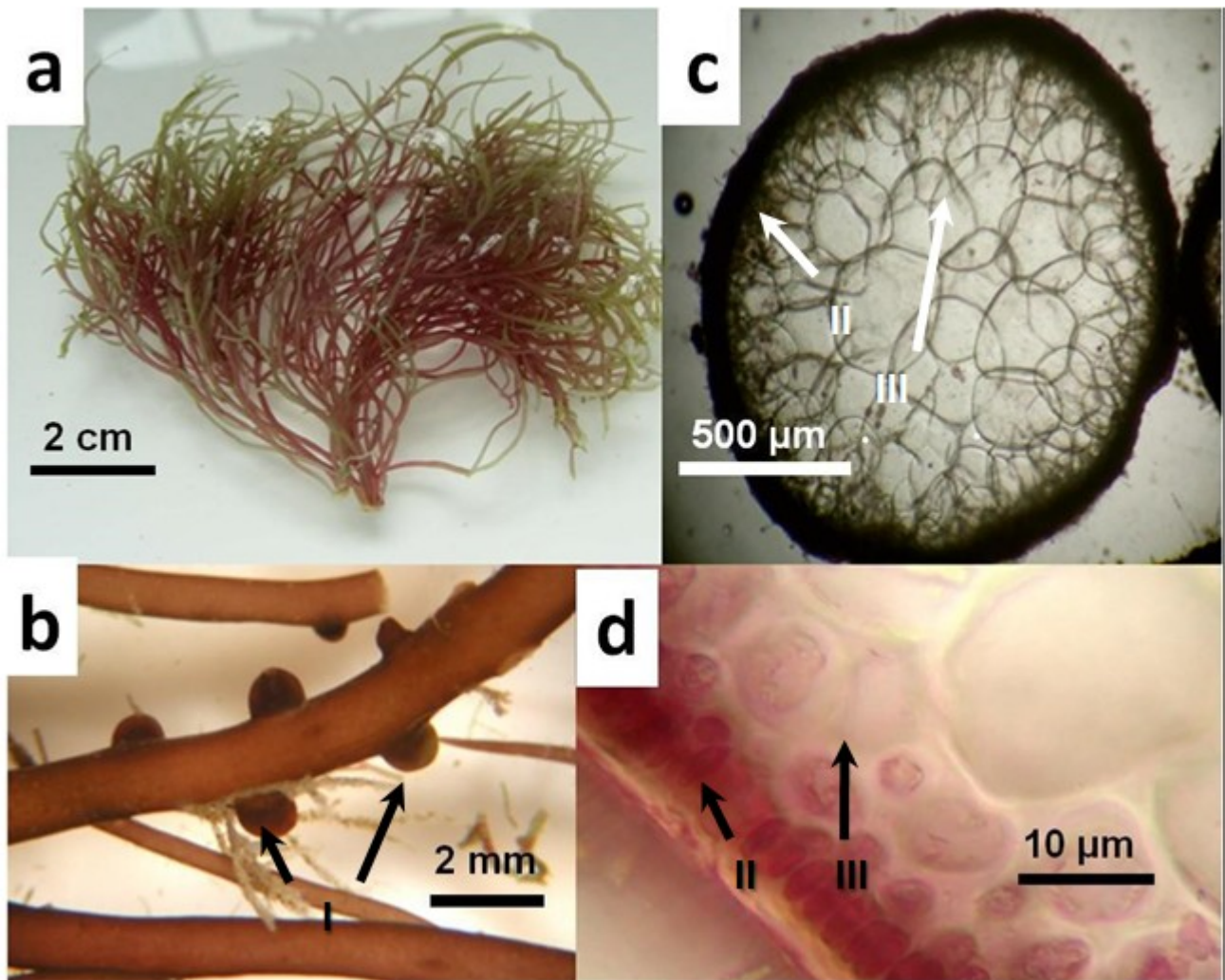


Fig. 3: *Gracilaria gracilis* - a) tallo; b) gametofito femminile con cistocarpi (I); c) sezione di un asse con evidenza delle cellule corticali pigmentate (II) e midollari (III) a diametro crescente che occupano tutta la sezione; d) sezione di un asse a maggior dettaglio con evidenza delle cellule corticali (II) e midollari (III).

Bibliografia di riferimento:

Preda (1908); Bird *et Mclachlan* (1984); Gargiulo *et al.*(1992); Gallardo *et al.* (1993); Steentoft *et al.* (1995); Sfriso *et Curiel* (2007); Cecere *et al.* (2009); Sfriso *et al.* (2009); Guiry *et Guiry* (2017).

5.3 *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss, 1967.

Famiglia Gracilariaceae.

Caratteri distintivi

- Talli cilindrici, vermiformi, di 1,5-3-(4) mm di diametro e cavi;
- Cistocarpi piccoli, non ristretti alla base e senza cellule fusiformi;
- Concettacoli dei gametofiti maschili di tipo “*verrucosa-type*”;
- Cellule midollari con spessa parete ialina ed evidenti ponti citoplasmatici.

Descrizione

I talli sono cilindrici, vermiformi e lunghi fino a 1-2 m. Sono costituiti da assi di 1,5-3-(4) mm di diametro, spesso più grossi nella parte centrale, che sorgono da un piccolo disco basale. La ramificazione può essere abbondante e fortemente irregolare.

In sezione trasversale, eccetto agli apici, i talli sono cavi e questo conferisce una consistenza estremamente elastica. Esternamente, uno strato di cellule corticali pigmentate ed allungate radialmente copre 1-2 strati irregolari di cellule pigmentate arrotondate, di diametro crescente verso l'interno. Seguono alcuni strati di grosse cellule midollari circondate da una spessa parete ialina di 10-20 μm . Tra le membrane di cellule vicine sono distinguibili numerosi ponti intracellulari di 20-25 μm di lunghezza. I rodoplasti sono piccoli (2-3 μm di diametro) e sferici.

I concettacoli (cavità) dei gametofiti maschili sono di tipo “*verrucosa-type*”, immersi nella corteccia in tutto il tallo e misurano 60-75 x 100-135 μm . In visione superficiale le cavità sono visibili anche ad occhio nudo come macchiette ellittiche chiare sullo sfondo rosso-nerastro dei filamenti.

I cistocarpi di forma emisferica sono disposti in dense catene irregolari lungo tutto il tallo. Mediamente misurano 0,8-1,3 x 0,7-0,9 mm. Mancano le cellule nutritive fusiformi tra il gonimoblasto e il pericarpo.

I tetrasporangi sono crociati, misurano 20-30 x 20-40-(50) μm e sono presenti nello strato corticale di tutto il tallo.

Questa è una specie aliena recentemente segnalata nel Nord-Europa (Danimarca, Germania e Svezia), ritrovata per la prima volta nel Mediterraneo, nel delta del Po, nel

2008 e poi in Pialassa della Baiona in Emilia-Romagna e nella Laguna di Venezia, dove ora è abbondantemente diffusa.

Fig.4.riporta una scheda fotografica che evidenzia le principali caratteristiche della specie.

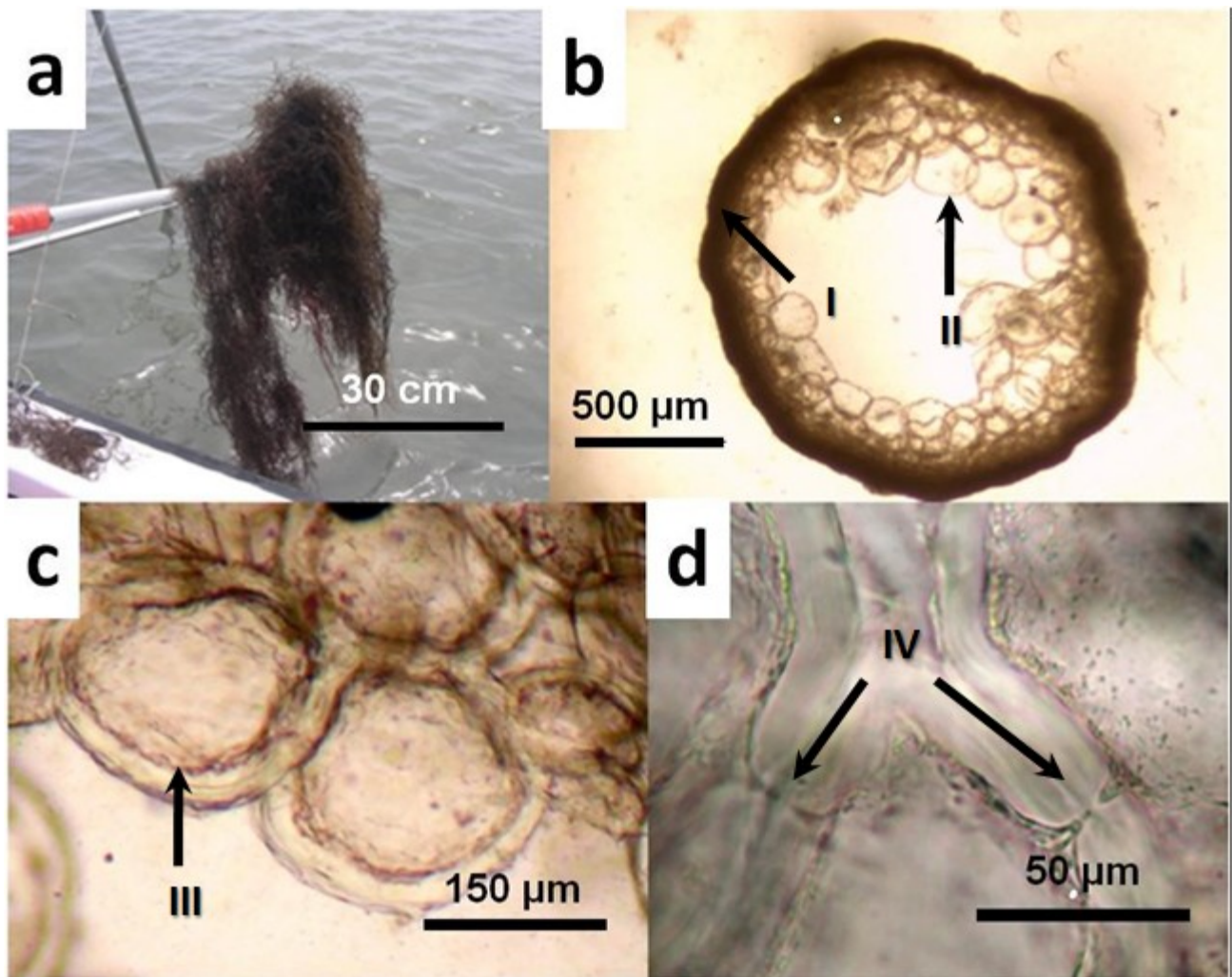


Fig. 4: *Gracilaria vermiculophylla* - a) talli flottanti; b) sezione di un asse con evidenza delle cellule corticali (I) e midollari (II) e della cavità centrale; c) cellule midollari con evidenza delle spesse pareti incolori (III); d) ponti cellulari tra cellule midollari (IV).

Bibliografia di riferimento:

Rueness (2005); Thomsen *et al.* (2007); Sfriso *et al.* (2010); Wolf *et al.* (2011); Sfriso *et al.* (2012); Guiry *et Guiry* (2017); Sfriso A.A. *et Sfriso* (2017); Sfriso A.A. *et al.* (2017).

5.4 *Gracilariopsis longissima* (S.G.Gmelin) Steentoft, L. M. Irvine & Farnham, 1995.

Famiglia Gracilariaceae.

Caratteri distintivi

- Talli lunghi e filamentosi di 1-1,5-(2) mm di diametro;
- Carposporangi privi di cellule nutritive tubulose;
- Spermatangi superficiali e discontinui: “*simmetrica-type*”.

Descrizione

Talli filamentosi, lunghi da qualche decimetro a qualche metro e con diametro di 0,5-1-2 mm. I rami sono lunghi, sottili e ristretti alla base. Le cellule corticali, viste superficialmente, sono piuttosto piccole, hanno forma arrotondata e hanno un diametro di 6-8-(12) μm .

In sezione trasversale, si osservano 1-2 strati di cellule corticali pigmentate ed allungate radialmente di 6-8-12 x 8-15-(20) μm . Sotto vi sono 1-3 strati di cellule depigmentate scure che presentano dimensioni crescenti radialmente. Al di sotto di queste vi sono 3-4-(5) strati di grosse cellule midollari poliedriche chiare di 100-200 x 100-300-(500) μm .

I gametangi maschili sono superficiali e discontinui (*simmetrica-type*).

I gametofiti femminili presentano grossi cistocarpi sessili, emisferici o conici di 1-1,5 mm di diametro. In sezione trasversale, si nota che questi sono privi di cellule nutritive tubulose tra il gonimoblasto e il pericarpo esterno.

I tetrasporangi sono piccoli e disposti superficialmente tra le cellule corticali. Mediamente hanno un diametro di 20-30 x 25-35-(40) μm .

Fig.5. riporta una scheda fotografica che evidenzia le principali caratteristiche della specie

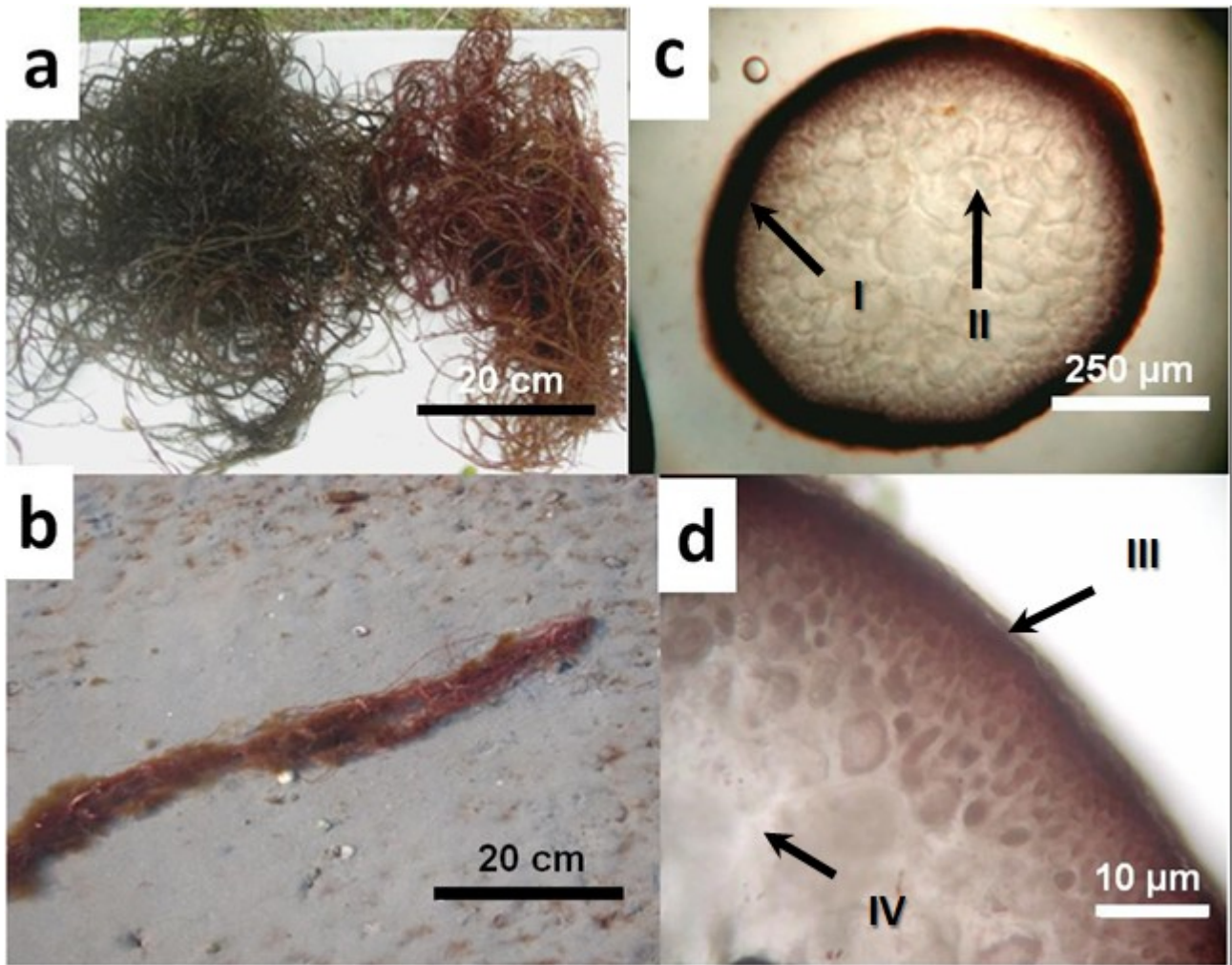


Fig. 5: *Gracilariopsis longissima* - a) Confronto tra *Gracilaria vermiculophylla* (nera) e *Gracilariopsis longissima* (rossa); b) lunghi talli adesi ad un'ostrica su sedimento sabbioso; c) sezione trasversale con lo spesso strato corticale (I) e le cellule midollari (II) in evidenza; d) stratificazione di più serie di cellule corticali pigmentate (III) e delle cellule midollari incolori (IV).

Bibliografia di riferimento:

Gargiulo *et al.*,(1992); Bird (1995); Steentoft *et al.* (1995); Gargiulo (2000); Sfriso *et Curiel* (2007); Cecere *et al.* (2009); Sfriso *et al.*(2009); Guiry *et Guiry* (2017);

5.5 *Polysiphonia morrowii* Harvey, 1857.

Famiglia Rhodomelaceae.

Caratteri distintivi

- Talli oltre 50 cm di lunghezza;
- Presenza di 4 cellule pericentrali,
- Corticizzazione assente;
- Cellule pericentrali mediane lunghe da 1 a 5 mm (ca. 10-20 volte il loro diametro) e spesso spiralate;
- Cellule apicali dei rametti fortemente appuntite;
- Cistocarpi urceolati;
- Presenza di 6-8 rametti tetrasporangiferi.

Descrizione

Questa specie presenta 4 cellule pericentrali e talli non corticati che raggiungono dimensioni fino a 50 cm di lunghezza e un diametro basale di 260-550 μm . Ogni tallo presenta un asse principale e numerosi assi secondari che si ramificano più volte in modo caratteristico. I rami terminano con numerosi rametti di 500-1000 μm di lunghezza e ca. 50 μm di diametro, fortemente rastremati e che terminano con una cellula appuntita di 15-25 μm di lunghezza.

Le cellule della regione mediana del tallo possono essere allungate fino a 5 mm e spiralate. Sono presenti rizoidi avventizi non settati, che nascono dalle cellule pericentrali ed aderiscono ad altri rami o talli. I rodoplasti sono granulosi con granuli di 4-8-(10) μm . In sezione trasversale sono visibili le 4 grosse cellule pericentrali avvolte da una sottile parete ialina che circondano una piccola cellula assiale.

Gli spermatangi si formano in rami spermatangiali e terminano con un pelo multicellulare. Le loro dimensioni sono di 25-30 x 300-500 μm . Spesso sono curvati.

I cistocarpi sono urceolati con un ostiolo di 200-250 μm di diametro. A maturità misurano 350-450 di larghezza x 500-600 μm di lunghezza.

I tetrasporofiti presentano serie di 3-6-8 grossi tetrasporangi di 80-100 μm di diametro.

Questa si presenta come un'alga di grosse dimensioni, piuttosto diffusa sia nelle aree interne della Laguna che nei litorali marini. È facilmente rinvenibile soprattutto in inverno e primavera, poi viene soppiantata da altre specie. Questa specie è aliena, vive nel

mesolitorale inferiore e nell'infralitorale, ed è stata riportata per la prima volta nel Mediterraneo nella Laguna di Thau, in Francia nel 1997. Nella laguna di Venezia, è stata segnalata attorno alla metà degli anni '90, presso i mercati ittici di Venezia e di Chioggia, È presente anche nel Mar Piccolo di Taranto.

Fig.6. riporta una scheda fotografica che evidenzia le principali caratteristiche della specie

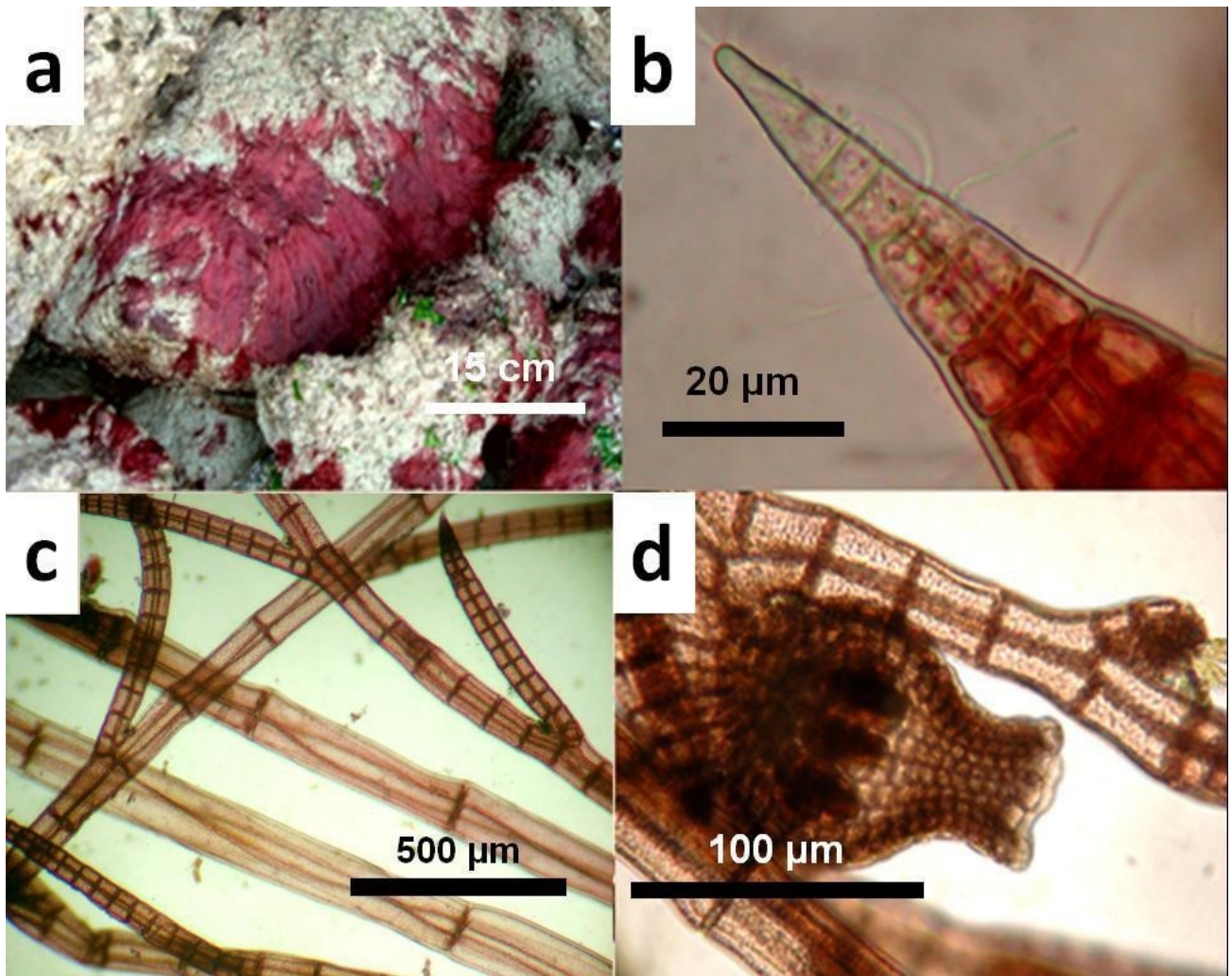


Fig. 6: *Polysiphonia morrowii* - a) talli adesi ad un substrato roccioso; b) particolare della parte apicale spiniforme di un ramo; c) particolare delle lunghe cellule spiralate della regione mediana che spesso superano il mm di lunghezza; d) particolare di un cistocarpo.

Bibliografia di riferimento:

Kudo et Masuda (1992); Hori (1993); Verlaque (2001); Curiel *et al.* (2002); Furnari *et al.* (2003); Sfriso et Curiel (2007); Sfriso *et al.* (2009); Petrocelli *et al.* (2013); Guiry et Guiry (2017).

5.6 *Pyropia elongata* (Kyllin) Neefus et J. Brodie, 2011.

Famiglia Bangiaceae.

Caratteri distintivi

- Specie epilittica;
- Tallo laminare, mono-distromatico;
- Forma ovato-suborbicolare, laciniata;
- Spermatocisti disposte in strie radiali allungate nel terzo distale della lamina.

Descrizione

Specie invernale tipica del mesolitorale con talli fino a 20-30-(40) cm, di color rossoviolaceo, con bordi biancastri negli esemplari maturi, sorgenti da un minuto callo radicale, con struttura fogliacea e contorno molto variabile, spesso laciniato. La struttura è mono-distromatica.

Nei talli maturi gli anteridi (organi maschili) sono riuniti in sori a forma di macchie bianco-verdastre, allungate e disposte in strie più o meno parallele in senso radiale, soprattutto ai margini della fronda. In queste aree le cellule vegetative si trasformano in spermatocisti che producono 4-16-64 spermazi. Questi vengono liberati all'esterno, perdono la parete gelatinosa e si attaccano passivamente ai carpogoni femminili.

Le gametocisti femminili sono praticamente indistinguibili dalle altre cellule vegetative, eccetto che per una protrusione papillare dove aderiscono gli spermazi iniettando i loro nuclei all'interno. Dopo la fecondazione, si formano numerose zigospore diploidi che sono distinguibili come agglomerati di 4 o più cellule pigmentate e per lo spessore del tallo, che in questa regione diviene di/tetra-stromatico. Le zigospore sviluppano dei filamenti, per lungo tempo identificati come una specie differente: *Conchocelis rosea*, che si attaccano alle conchiglie dei molluschi. In realtà, si tratta dello sporofito o *Conchocelis*-phase. Gli sporofiti, per meiosi producono concospore aploidi che a loro volta liberate nell'ambiente generano i nuovi gametofiti aploidi. Gli individui sono monoici.

Recentemente, questa specie è stata oggetto di numerose revisioni che su basi geneticali l'hanno distinta da *Porphyra leucosticta* Thuret in Le Jolis, ora *Pyropia leucosticta* (Thuret) Neefus et J. Brodie, con cui prima era confusa, la quale potrebbe non essere presente nel Mediterraneo.

Fig.7. riporta una scheda fotografica che evidenzia le principali caratteristiche della specie

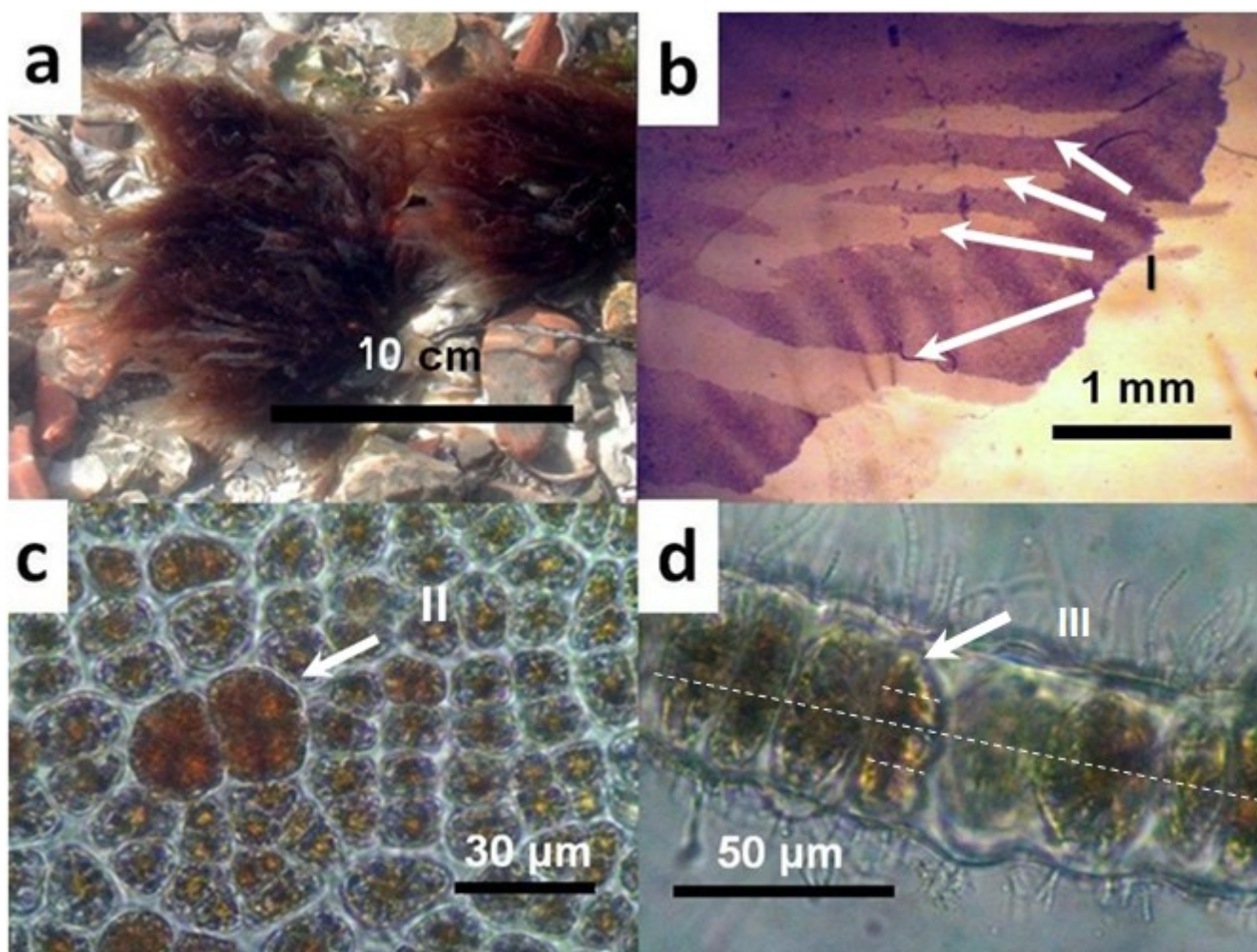


Fig. 7: *Porphyra elongata* - a) Talli adesi a substrato ciottoloso; b) particolare della regione apicale di una fronda con evidenza delle strie chiare degli anteridi (I); c) zigospore (II); d) 2-4 zigospore in sezione trasversale con evidenza dei piani di divisione (III) .

Bibliografia di riferimento:

Preda (1908); Giaccone (1973); Brodie et Irvine (2003); Brodie *et al.* (2007); Sfriso *et Curiel* (2007); Sfriso *et al.* (2009); Sutherland *et al.* (2011), Guiry *et Guiry* (2017).

5.7 *Ulva rigida* C. Agardh, 1822.

Famiglia Ulvaceae.

Caratteri distintivi

- Sezione basale molto spessa, fino a 300 µm;
- Margini spesso digitati e dentati;
- In sezione trasversale, cellule dello stipite basale di forma rettangolare o ad apice appiattito;
- In sezione trasversale, cloroplasti spesso a cappuccio.

Descrizione

I talli di questa specie se attaccati al substrato, variano da pochi cm di altezza nel sopralitorale di zone battute, ad oltre 50 cm in profondità. Se in forma pleustofitica, possono superare sia il metro in lunghezza che il m² in superficie. In sezione trasversale nella regione basale, i talli sono molto spessi potendo arrivare a 300 µm. All'apice, invece, la sezione si riduce a 60-100 µm, soprattutto nei talli flottanti. Sul margine della parte basale del tallo sono presenti evidenti protuberanze dentate o addirittura digitate. Le cellule si presentano per lo più disordinate ma localmente possono essere arrangiate in file. Viste superficialmente presentano una forma quadrangolare-arrotondata o poligonale con un diametro che varia da 10 a 24-(28) µm. Mediamente sono presenti (1)-2-(3) pirenoidi. In sezione trasversale sono presenti due foglietti di cellule più o meno allungate, cilindroidi nella parte apicale e mediana del tallo. Queste divengono rettangolari o con apici esterni appiattiti presso lo stipite basale. Nello stipite di forma allargata ed appiattita, le cellule sono distanziate dai processi rizoidali emessi verso il basso e verso l'interno. Questi presentano cloroplasti granulosi e di colorazione verde scura, di forma a volte molto allungata. Nella parte mediana ed apicale del tallo, i rizoidi sono assenti e i due foglietti cellulari sono strettamente aderenti. In queste regioni del tallo, usualmente le cellule sono 1-2-(3) volte più lunghe che larghe e misurano 15-20 x 20-40 µm. I cloroplasti hanno forma molto variabile, ma di solito formano delle bande lobate od occupano tutta la cellula. In sezione trasversale spesso presentano la caratteristica forma a cappuccio.

La riproduzione per lo più avviene vegetativamente per frammentazione del tallo. Praticamente ogni frammento del tallo si sviluppa rapidamente in una nuova pianta che

vive benissimo anche in forma pleustofitica. La riproduzione sessuata avviene per alternanza di generazioni aploidi (gametofiti) e diploidi (sporofiti). Durante la gametogenesi si ha emissione di gameti biflagellati. I gameti femminili sono un po' più grossi (6-7.5 x 34.5 μm) di quelli maschili (5-6 x 2.5-3 μm). Le zoospore diploidi sono quadriflagellate ed ancora più grosse (4-6 x 9-11 μm). Le zoospore spesso si formano ai bordi del tallo, imbiancati dall'intensa insolazione o dal gelo. Questa specie assieme a *U. laetevirens* Areschoug, da cui si distingue per la forma delle cellule che nello stipite basale sono cilindriche, è la più comune ed abbondante macroalga della laguna veneziana.

Fig.8. riporta una scheda fotografica che evidenzia le principali caratteristiche della specie.

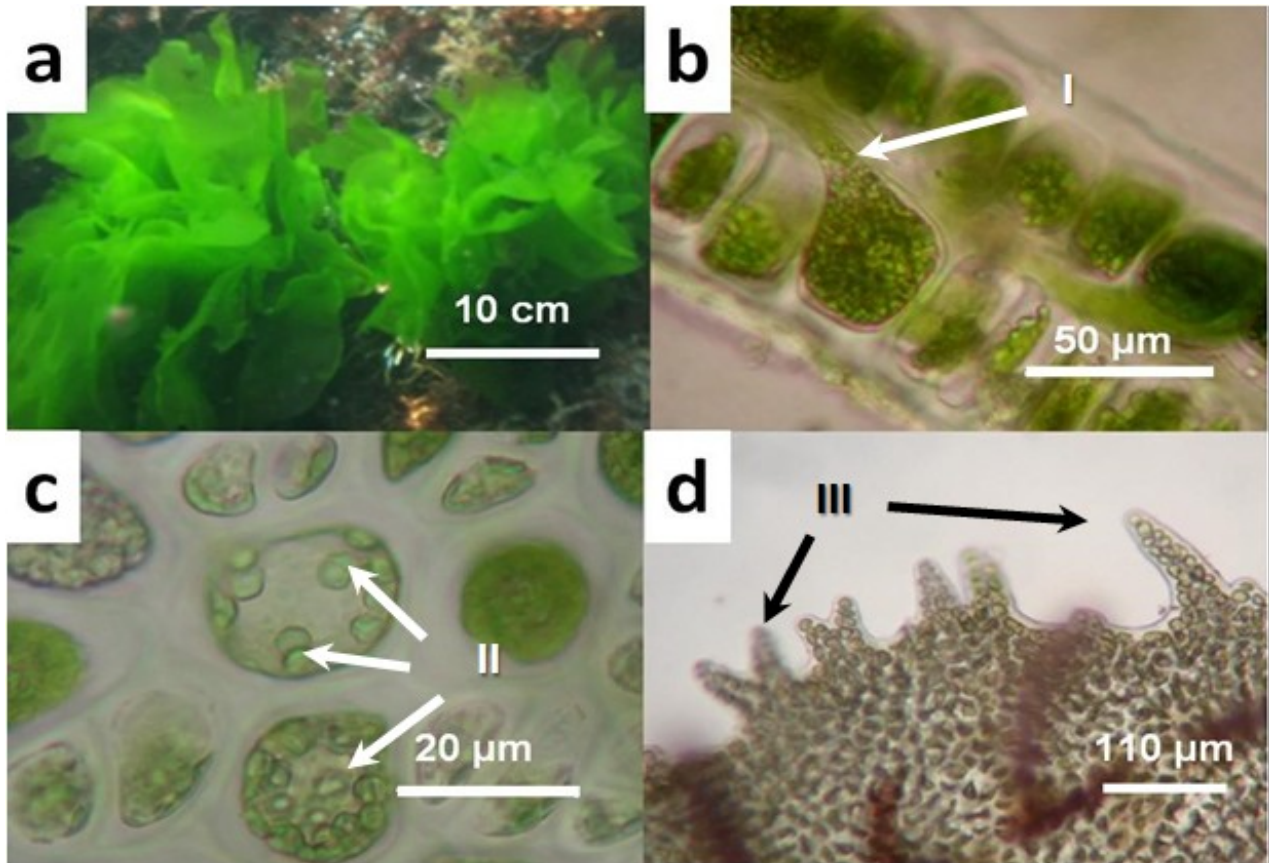


Fig. 8: *Ulva rigida* - a) talli adesi a un substrato roccioso; b) sezione trasversale della parte basale con evidenza dei due strati corticali e di alcune estroflessioni rizoidali (I); c) visione superficiale delle cellule con evidenza dei pirenoidi (II); d) protuberanze dentate alla base del tallo (III).

Bibliografia di riferimento:

Bliding (1968); Phillips (1988); Sfriso *et al.* (1992), Noalles *et al.* (1993); Sfriso *et al.* (2003); Sfriso (2009); Guiry *et Guiry* (2017).



Crescita algale

6. CRESCITA ALGALE

6.1 Introduzione

Le alghe, come l'onda ricorrente di una moda che ritorna, sono nuovamente sul fronte della ricerca, che con nuove tecnologie ne esplora la ricchezza. Queste sono un prodotto versatile utilizzato come materia prima per la produzione di alimenti, cosmetici, mangimi e fertilizzanti, con un valore di mercato che raggiunge i 5,5-6 Mld di US\$ ogni anno per 8 Mln di tonnellate. La produzione a scopo alimentare contribuisce da sola per 5 Mld, e vede Cina, Corea del Sud, Giappone, Filippine e Malesia come i fronti di questa produzione. Con l'aumento della domanda negli ultimi 50 anni, è stata superata la naturale capacità di produzione che poteva essere sostenuta dalla semplice raccolta. La ricerca sul ciclo vitale di questi organismi ha portato, nei paesi asiatici, allo sviluppo di coltivazioni che soddisfano oggi il 90% della domanda sul mercato (Hugh, 2003). L'Europa presenta tuttavia un notevole deficit culturale in materia di macroalghe (fatto salvo per l'Irlanda e l'Islanda che ne consumano tradizionalmente alcuni tipi nell'alimentazione) e solo da pochi anni la normativa in materia ha cominciato a spaziare per favorire lo sviluppo di un loro mercato, che però è tuttora pressoché assente. L'emanazione del [decreto legislativo 152/2006](#), che integra e aggiorna precedenti norme ambientali, e delle direttive [EU 2015/2283](#) sui "novel foods", hanno portato alla trasformazione normativa delle macroalghe da rifiuto speciale a risorsa, incentivandone la raccolta, la vendita e la commercializzazione invece che lo smaltimento.

Considerando che, all'estero 1Mln t di alghe sono raccolte per l'estrazione e la produzione di polisaccaridi solubili e fico-colloidi gelificanti (quali l'agar, la carragenina e gli alginati) per un mercato globale di 580 Mln US\$, e che questa produzione è la più importante dopo la coltivazione a scopo alimentare, sono state scelte tra le alghe della Laguna di Venezia le specie che producono queste sostanze allo scopo di valutare la potenzialità di questo bacino locale per la produzione di idrocolloidi. Nella scelta sono state inoltre privilegiate le specie algali pleustofitiche (flottanti), più facili da raccogliere, poiché gli ambienti lagunari e costieri Veneti scarseggiano di substrati rocciosi e ne è stata misurata la crescita durante l'anno nell'arco di 12 mesi.

6.2 Materiali e Metodi

Le specie oggetto di studio sono state: *Gracilaria gracilis*, *Gracilaria vermiculophylla*, *Gracilariopsis longissima* e *Ulva rigida*.

La loro crescita è stata monitorata nell'arco di un anno, in due aree della Laguna di Venezia, rispettivamente a Sud-Ovest e a Nord-Est del ponte translagunare Venezia-Mestre (**Fig. 9**).

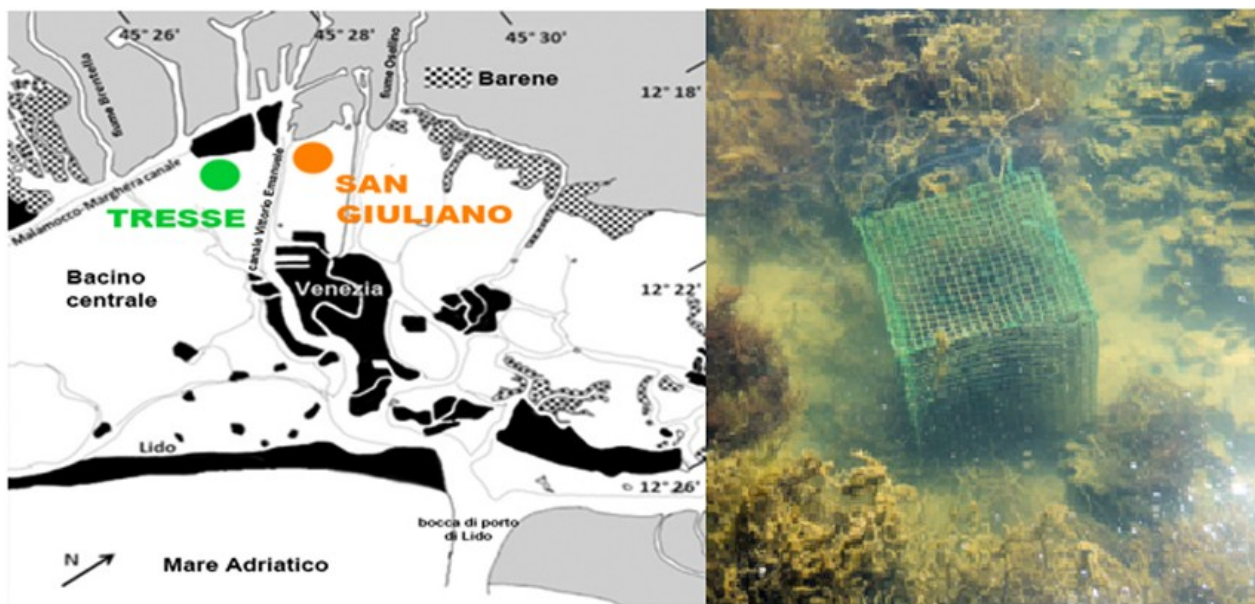


Fig. 9: Mappa con le stazioni di campionamento e foto della cesta per gli accrescimenti algali.

Le stazioni di monitoraggio, chiamate rispettivamente **Tresse** (TR: 45°26'09.18"N; 12°16'17.76"E) e **San Giuliano** (SG: 45°27'48.30"N; 12°17'33.04"E), che fronteggiano le aree omonime, sono state scelte con differenti livelli di trofia e di torbidità dell'acqua. La stazione TR che fronteggia l'omonima isola, si trova nei pressi del tratto terminale del Canale dei Petroli a ridosso del Bacino Scolante e presenta spesso fioriture di Ulvaceae (**Fig. 10**). La stazione SG si trova a nord-est del ponte Marghera-Mestre e fronteggia la foce del fiume Marzenego, risente dei venti dominati di Bora da Nord-Est e presenta spesso acque torbide colonizzate da Gracilariaceae (**Fig. 11**).

Per le misure di crescita di ogni singola specie algale, sono state predisposte quattro ceste cubiche di rete metallica (2 stazioni x 2 repliche) di 25 cm di lato, a maglia di 1 cm, in cui sono stati introdotti 200 g fw di biomassa (**Fig. 9**). Ad intervalli di 7-11 giorni le ceste sono state svuotate e le alghe sono state sgocciolate dall'acqua in eccesso con una centrifuga manuale, contemporaneamente sono stati prelevati i campioni per le analisi fisico-chimiche. Incrementi e riduzioni di biomassa sono stati misurati in campo con una bilancia tecnica e una biomassa di 200 g è sempre stata ripristinata all'interno delle ceste. Questa biomassa algale equivale a ca. 3 kg m⁻² e corrisponde all'intervallo ottimale per la

produzione di *Gracilaria* (Friedlander et Levy, 1995). I tassi di crescita relativa (RGR) sono stati calcolati usando la formula di Lignell et al. (1987): $\%RGR=100 \times [(B_t/B_0)^{1/t}-1]$.

Parallelamente è stata misurata la biomassa presente in campo mediante 3 campionamenti con "box" da 0,5 m² di lato e registrata in intervalli :<0,1; 0,1-1;1-3; 3-5; 7-7,5; 7,5-10 kg fw m⁻² come descritto in Sfriso et al. (1991). Tutti i parametri fisico-chimici dell'acqua e del sedimento sono stati monitorati insieme alla crescita algale. Per quanto concerne invece i parametri fisico-chimici dell'acqua, sono stati effettuati sei campionamenti dell'intera colonna acqua con un tubo verticale (h= 150 cm; Ø= 4cm) e sono stati miscelati. Questi sono poi stati filtrati con filtro GF/F Whatman (porosità 0,7 µm) per la determinazione di ammonio, nitriti, nitrati (espressi anche come somma, ovvero azoto inorganico totale, DIN), fosforo reattivo (RP), silicati (Si) in acqua, e di clorofilla-*a* (Chl-*a*), feofitine e particolato sospeso (FPM) nel filtrato, secondo le procedure descritte da Strickland et Parsons (1954). Salinità e Chl-*a* sono state determinate per titolazione argentometrica (Oxner, 1962) e spettrofotometrica (Lorenzen, 1967), rispettivamente. Contemporaneamente sono stati misurati: temperatura dell'acqua, pH, potenziale red-ox (Eh) con un pH-metro portatile (PH 25 - Crison Instruments s.a., Barcelona, Spain) e l'ossigeno disciolto (OD) con un oximetro (Oxi 3310 SET1 - WTW Weilheim, Germania). La trasparenza dell'acqua è stata misurata con un disco Secchi e con un luminometro (Li-cor Model Li-250° Lincoln, Nebraska, USA) a differenti profondità (in aria e in acqua alla profondità di 5, 30, 60, 90, 120 cm e sul fondo). Campioni mensili del sedimento infine sono stati prelevati con un carotatore di Plexiglass (Ø=10cm), tre repliche per campionamento omogeneizzate, per la determinazione della densità, della frazione fine e del fosforo totale e inorganico (Sfriso et al., 2003). Trappole da sedimentazione, di forma tronco-piramidale a quattro lati, con rete a maglia di 1 cm all'imboccatura, sono state lasciate sul fondale nelle due stazioni e svuotate mensilmente per la determinazione dei tassi di sedimentazione (Sfriso et al., 2005) (Fig. 11). Tutti i campioni sono stati congelati sino all'analisi in laboratorio.



Fig. 10: Stazione delle TR durante una fioritura di *U. rigida*.



Fig. 11: Stazione di SG, visibili le ceste per la misurazione degli accrescimenti e la trappola da sedimentazione.

6.3 Risultati

Parametri ambientali

Le due aree di studio hanno mostrato notevoli differenze (Friedman ANOVA $p < 0.05$) per taluni parametri della colonna d'acqua e per quasi tutti i parametri del sedimento (**Tabb.1a,1b**).

La temperatura è oscillata tra i 5°C e 29°C (**Fig.12**) indifferentemente nelle due stazioni e l'OD ha mostrato variazioni cicliche tra 4,5 e 22 mg L⁻¹(**Fig.13**). La salinità è risultata mediamente inferiore a SG con 22,3 psu in confronto ai 25,1 psu delle TR, tuttavia sporadici picchi stagionali dovuti all'apporto di acque dolci dal Marzenego a SG hanno prodotto differenze tra le due stazioni fino a 10 psu (**Fig. 14**).

Le TR sono risultate caratterizzate da acque limpide con tassi di sedimentazione relativamente bassi (130 kg dw m⁻² anno⁻¹) in confronto alla stazione di SG che ha raggiunto valori quasi doppi (240 kg dw m⁻² anno⁻¹). A SG, inoltre, picchi di torbidità in primavera e autunno sono stati rilevati con il disco Secchi (**Fig. 15**) e col particolato sospeso (**Fig. 16**). In questa stazione, le fioriture del plancton misurate come clorofilla-*a* totale (clorofilla-*a*+feofitina-*a*), hanno mostrato concentrazioni più elevate in luglio e ottobre con valori autunnali doppi rispetto a quelli presenti alle TR (**Fig. 17**). Inoltre, gli andamenti stagionali e i valori medi annuali del DIN nelle due stazioni (ca. 17µM, **Fig.18**) risultavano pressoché sovrapponibili, mentre i valori dell'RP a SG erano marcatamente più elevati, con picchi estivi fino a 5,7µM e valori medi di 1,2µM (**Fig.19**) contro i 0,5 µM rilevati alle TR. Similmente, il fosforo organico nel sedimento superficiale era fino a 2,4 volte più alto (137±32 µg g⁻¹) (**Tab 1b**). I silicati hanno mostrato ugualmente valori mediamente più alti a SG con 19,8 µM e valori di picco fino a 48µM mentre alle TR la media è stata di 14,3µM con un valore massimo di 39,4 µM (**Fig. 20, Tab. 1**)

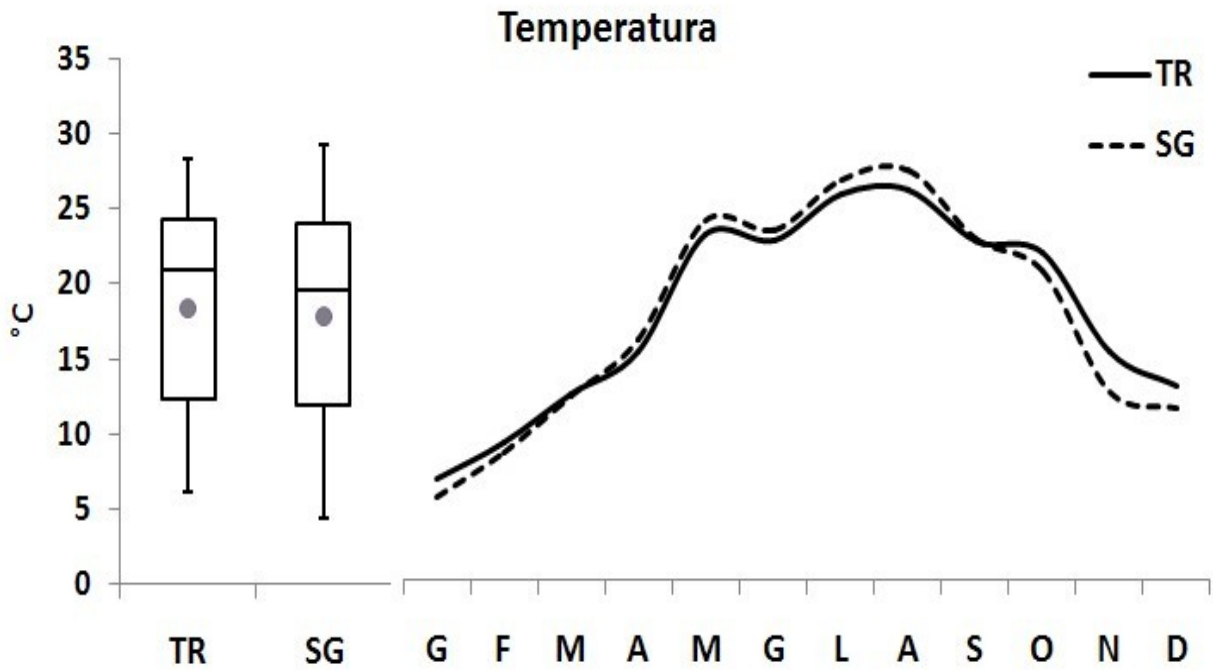


Fig. 12: Boxplot con quartili e media (•) annuali alle TR e a SG e andamento delle medie mensili della temperatura.

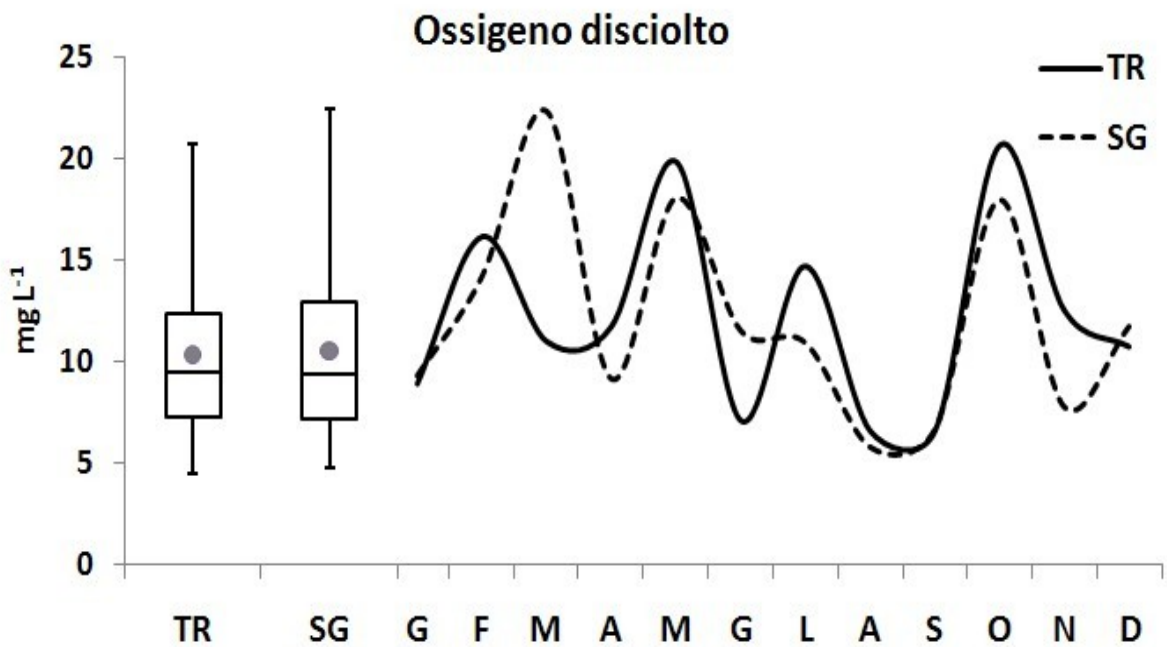


Fig. 13: Boxplot con quartili e media (•) annuali alle TR e a SG e andamento delle medie mensili dell'ossigeno disciolto.

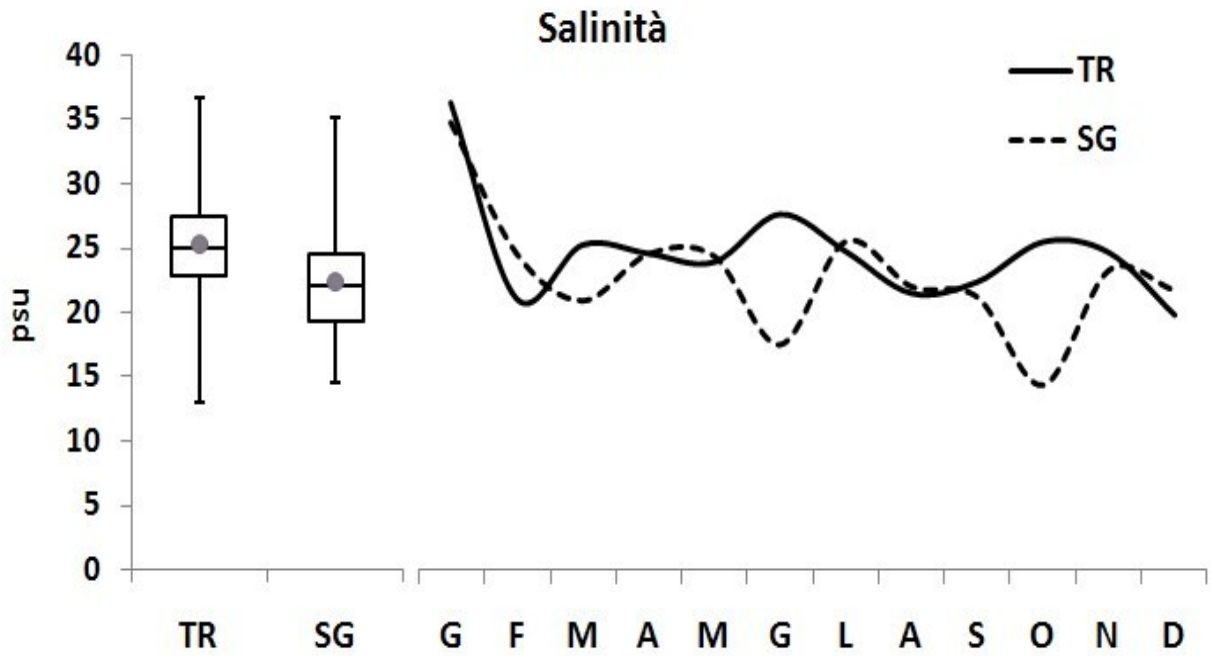


Fig. 14: Boxplot con quartili e media (•) annuali alle TR e a SG e andamento delle medie mensili della salinità

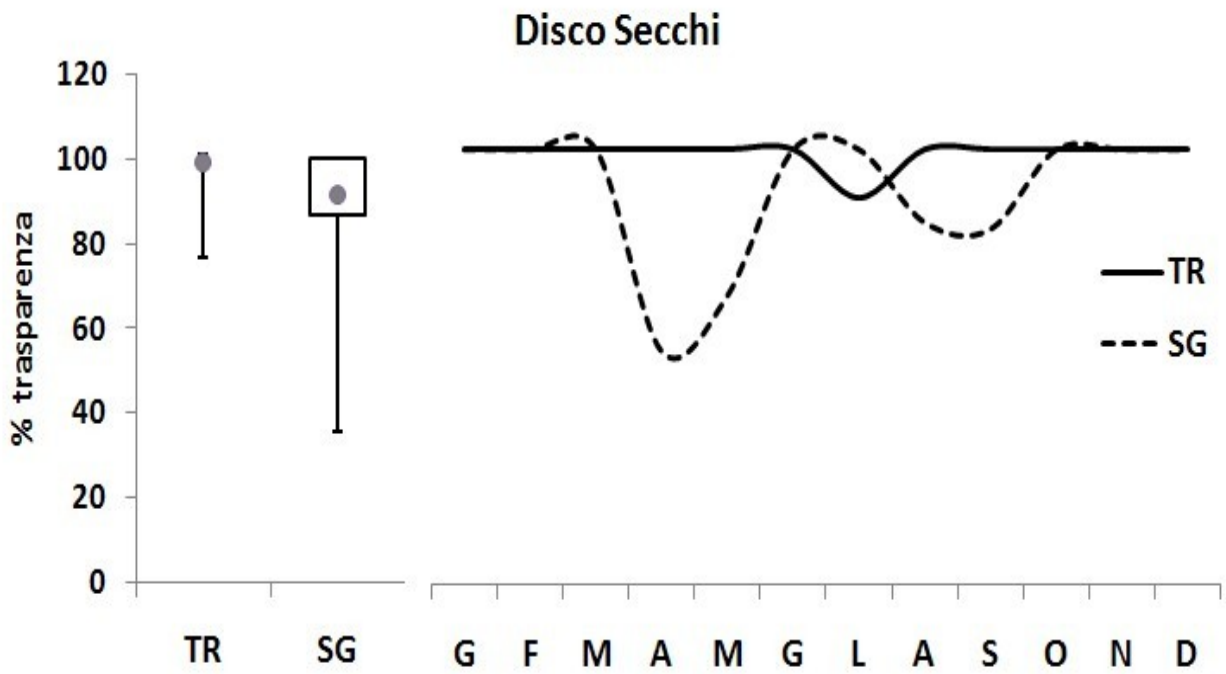


Fig. 15: Boxplot con quartili e media (•) annuali alle TR e a SG e andamento delle medie mensili del disco Secchi.

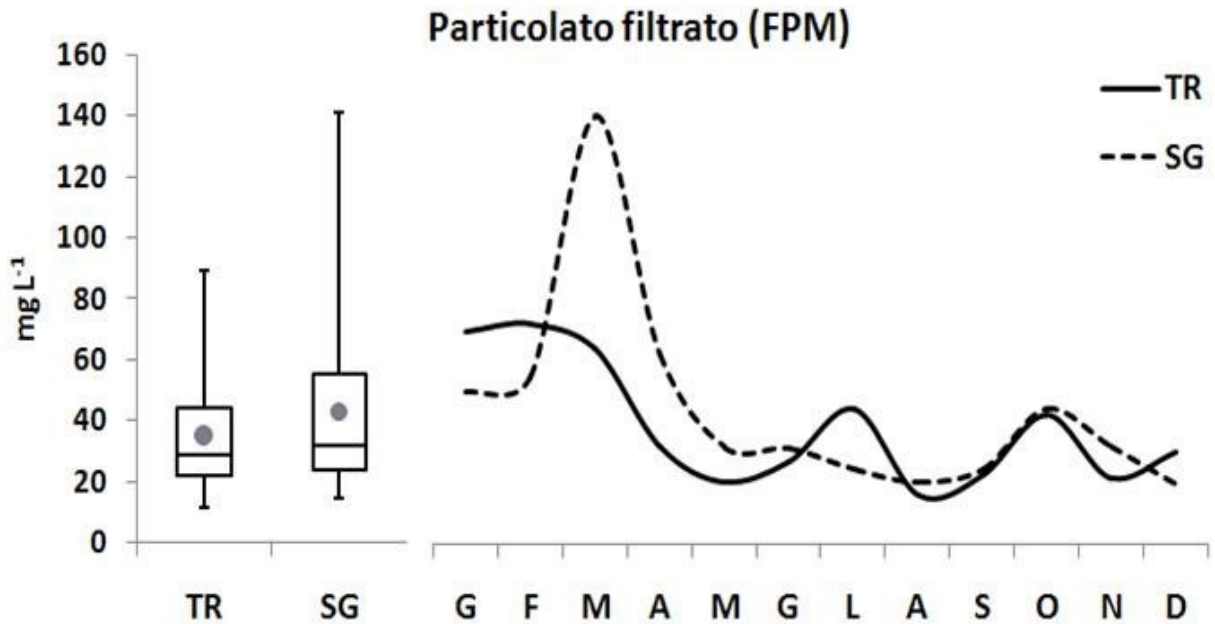


Fig. 16: Boxplot con quartili e media (•) annuali alle TR e a SG e andamento delle medie mensili del particolato sospeso filtrato.

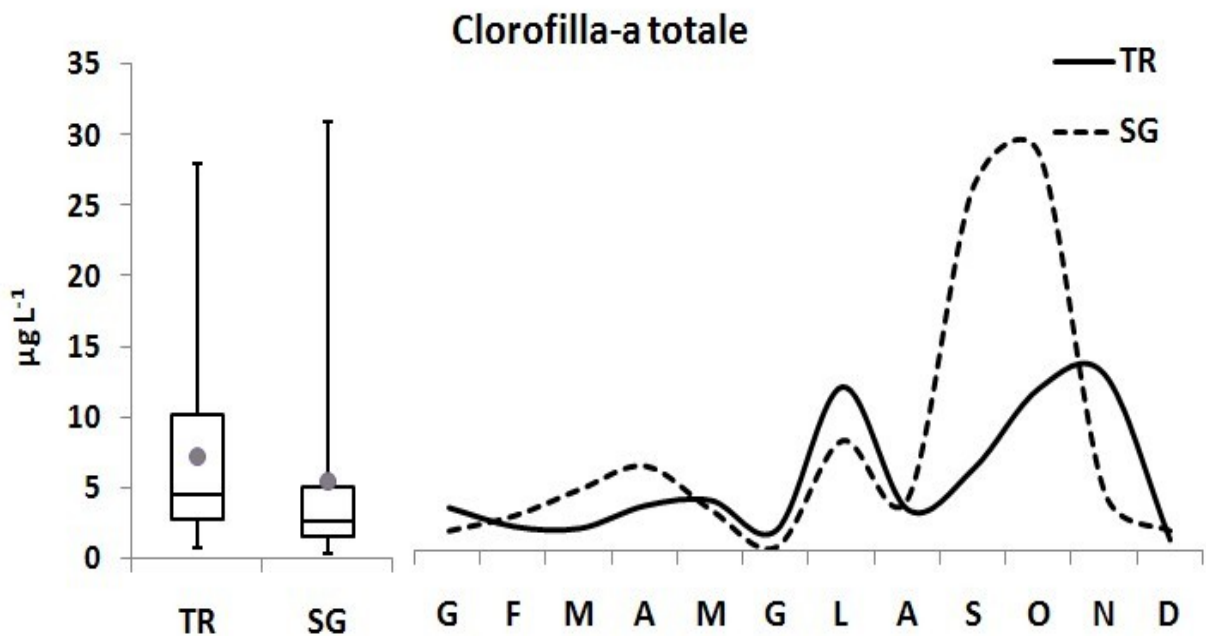


Fig. 17: Boxplot con quartili e media (•) annuali alle TR e a SG e andamento delle medie mensili della Clorofilla-a totale

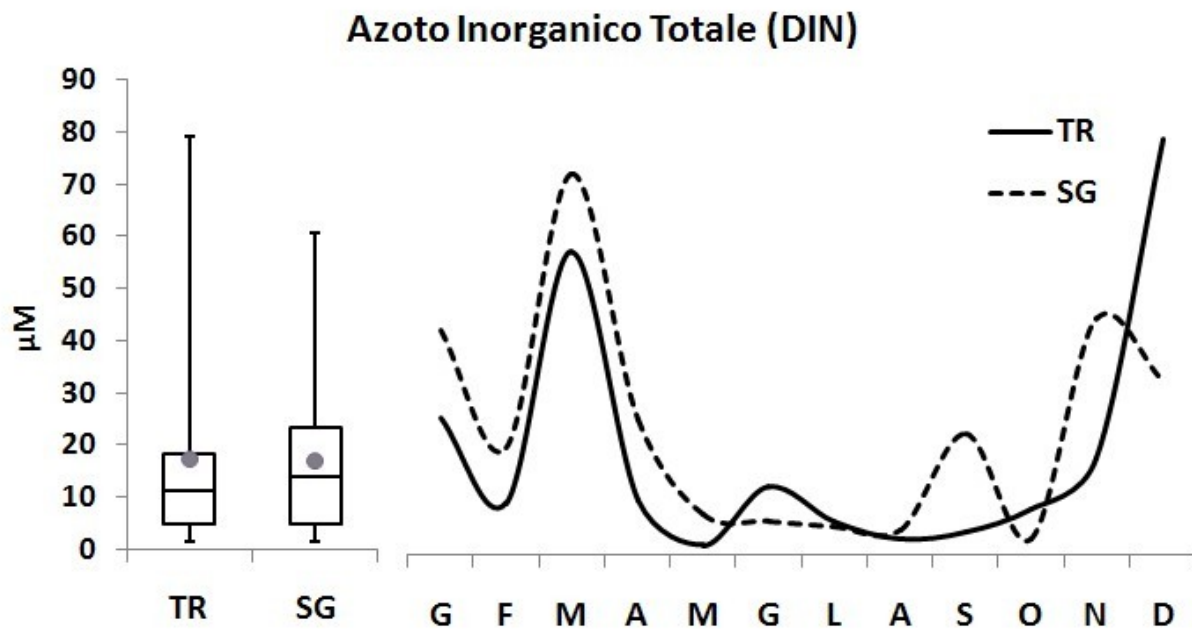


Fig. 18: Boxplot con quartili e media (•) annuali alle TR e a SG e andamento delle medie mensili dell'azoto inorganico totale.

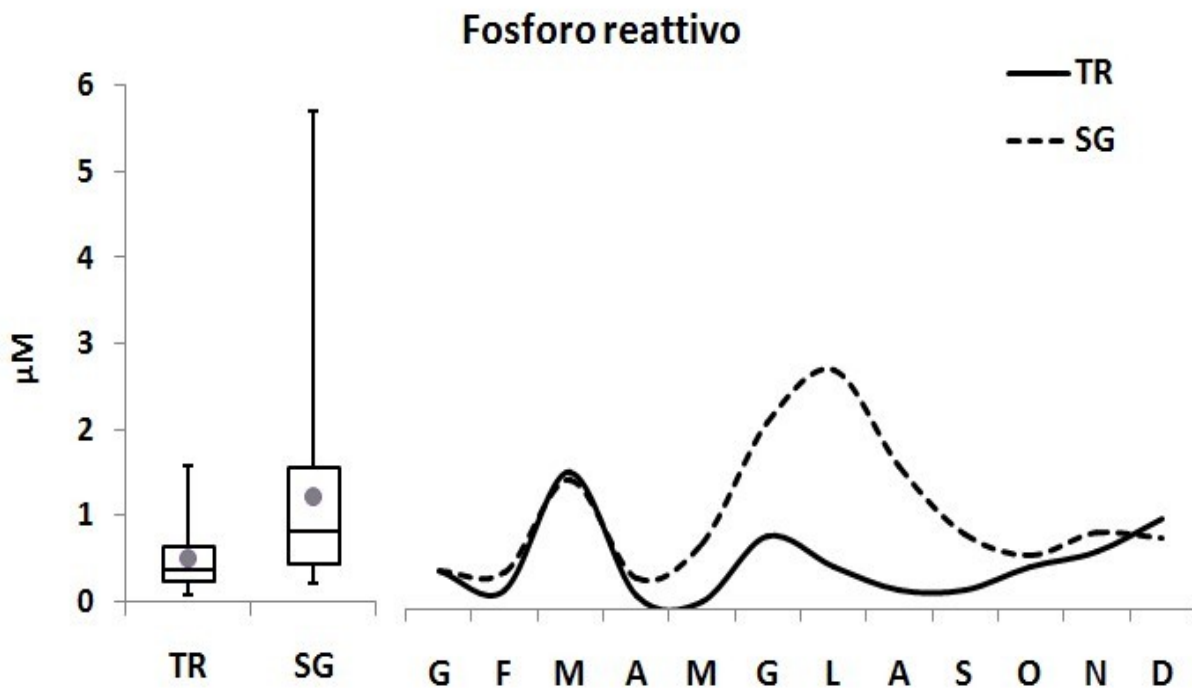


Fig. 19: Boxplot con quartili e media (•) annuali alle TR e a SG e andamento delle medie mensili del fosforo reattivo.

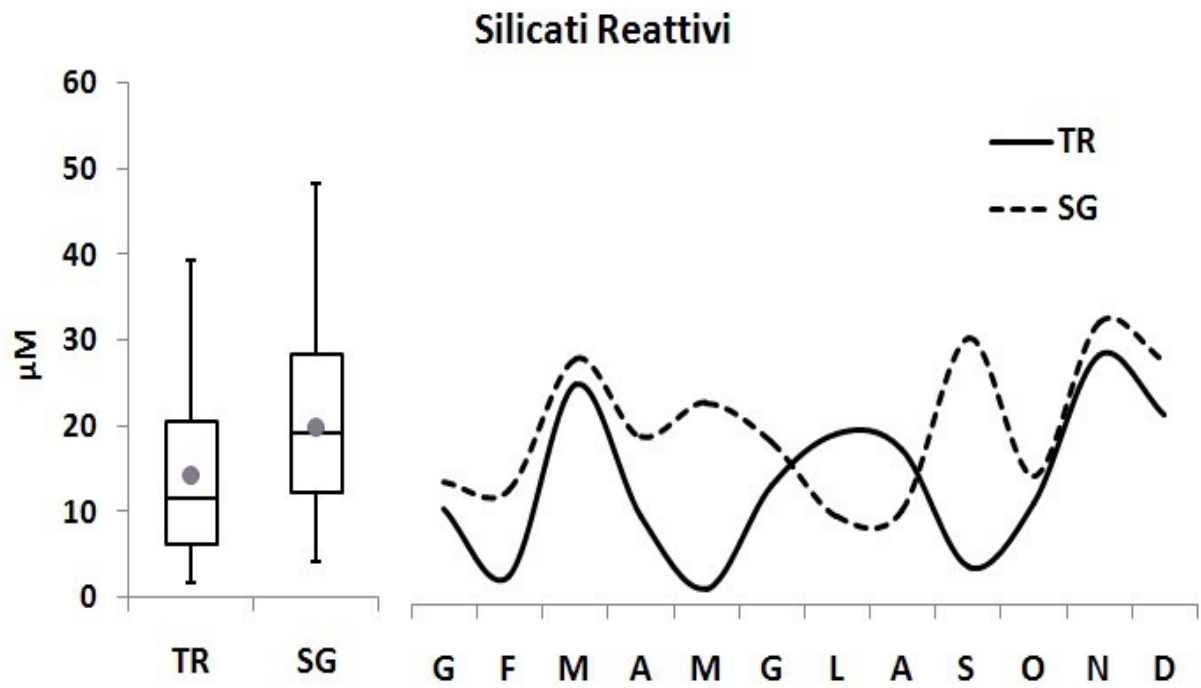


Fig. 20: Boxplot con quartili e media (\bullet) annuali alle TR e a SG e andamento delle medie mensili dei silicati reattivi.

Produzione e tassi di crescita

La crescita algale ha mostrato valori notevolmente diversi tra le stazioni. Alle TR (**Fig. 21**), *G. longissima* presentava gli RGR più alti raggiungendo, sebbene in momenti diversi, l'8,17% giorno⁻¹ seguita da *U. rigida* con il 7,62% giorno⁻¹, *G. vermiculophylla* con il 6,42% giorno⁻¹ e *G. gracilis* con il 5,55% giorno⁻¹. A SG (**Fig. 22**), i valori sono stati lievemente inferiori, tuttavia le stazioni si sono distinte soprattutto nella lunghezza dei periodi a resa positiva di biomassa. Alle TR le rese positive sono durate per una totalità di 314 giorni per *G. longissima*, 294 giorni per *G. gracilis*, 244 giorni per *G. vermiculophylla* e 195 giorni per *U. rigida*; mentre a SG le giornate produttive erano inferiori e andavano dai 177 giorni di *U. rigida* fino ai 270 giorni di *G. gracilis*.

Globalmente, la produzione per le alghe rosse si è concentrata in primavera ed estate producendo tra marzo e maggio il 51% della biomassa annuale in entrambe le stazioni, e tra luglio e agosto un ulteriore 20% per *G. gracilis* e *G. longissima* alle TR (**Figg. 23, 24**). La produzione di *U. rigida* invece mostra un picco di produzione in tarda primavera-estate, tra maggio e settembre, con massimo in giugno a temperature superiori ai 23 °C. La produzione netta annuale ha raggiunto alle TR: 28,2 kg fw m⁻² per *G. longissima*; 24,8 kg fw m⁻² per *U. rigida*; 22,0 kg fw m⁻² per *G. vermiculophylla* e 21,9 kg fw m⁻² per *G. gracilis* (**Fig. 23**), mentre a SG le produzioni erano appena la metà di quelle rilevate alle TR (**Fig.24**).

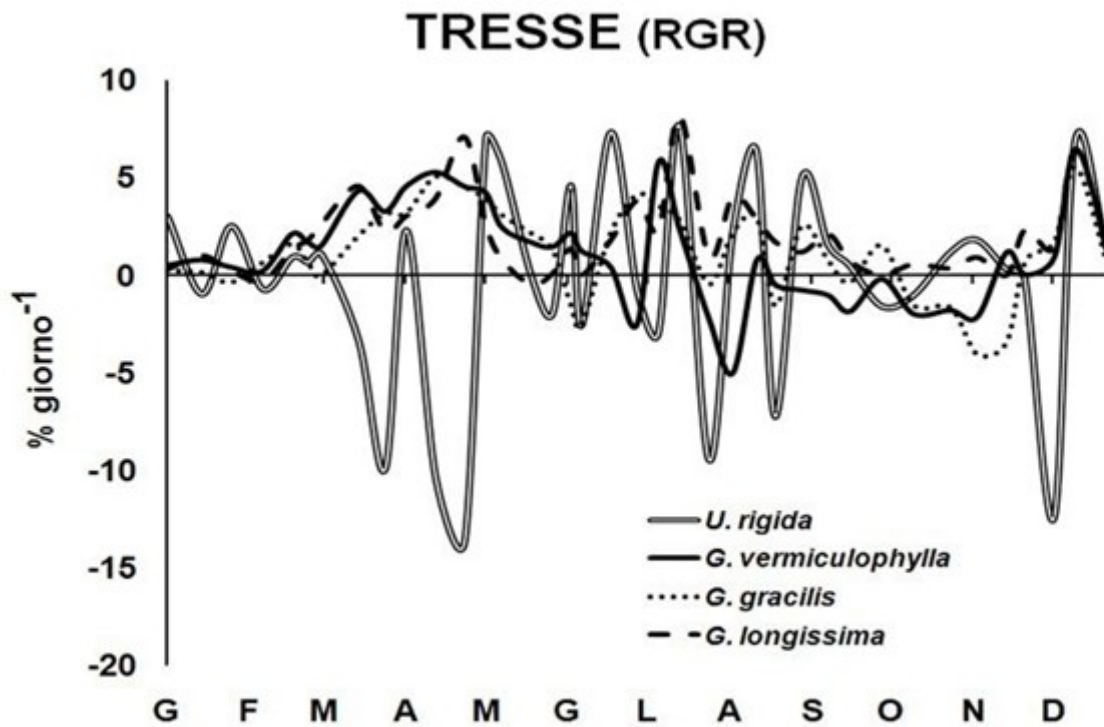


Fig. 21: Tassi di crescita relativi (% giorno⁻¹) alle TR.

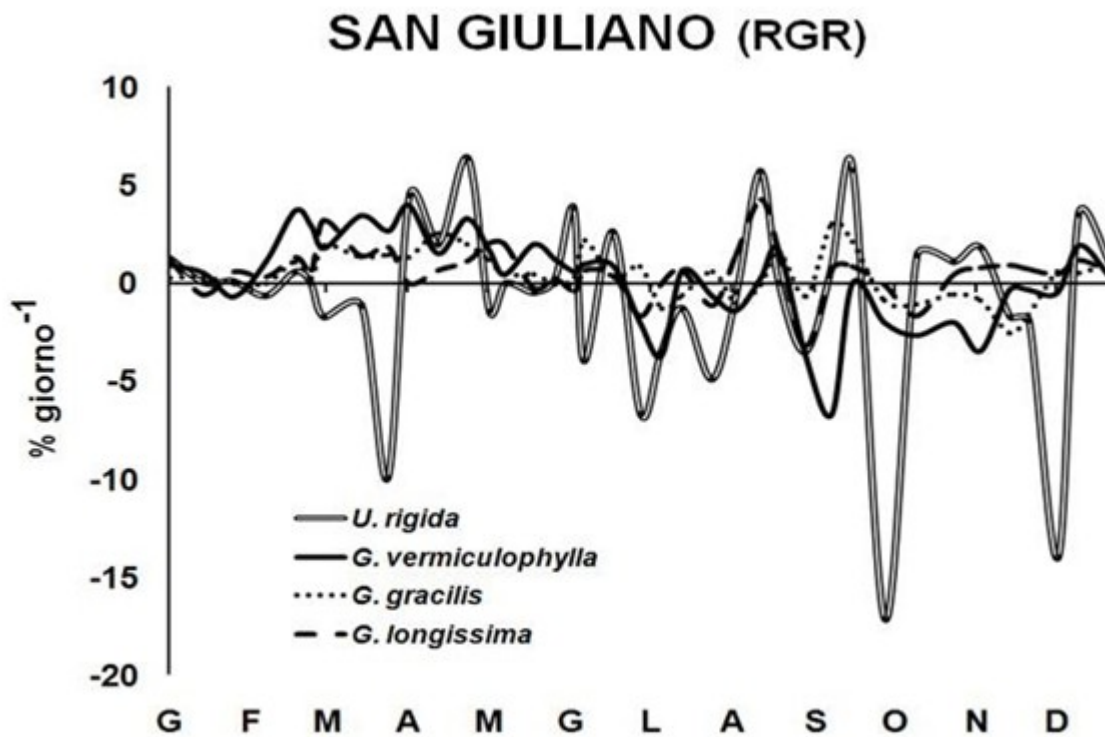


Fig. 22: Tassi di crescita relativi (% giorno⁻¹) a SG.

TRESSE

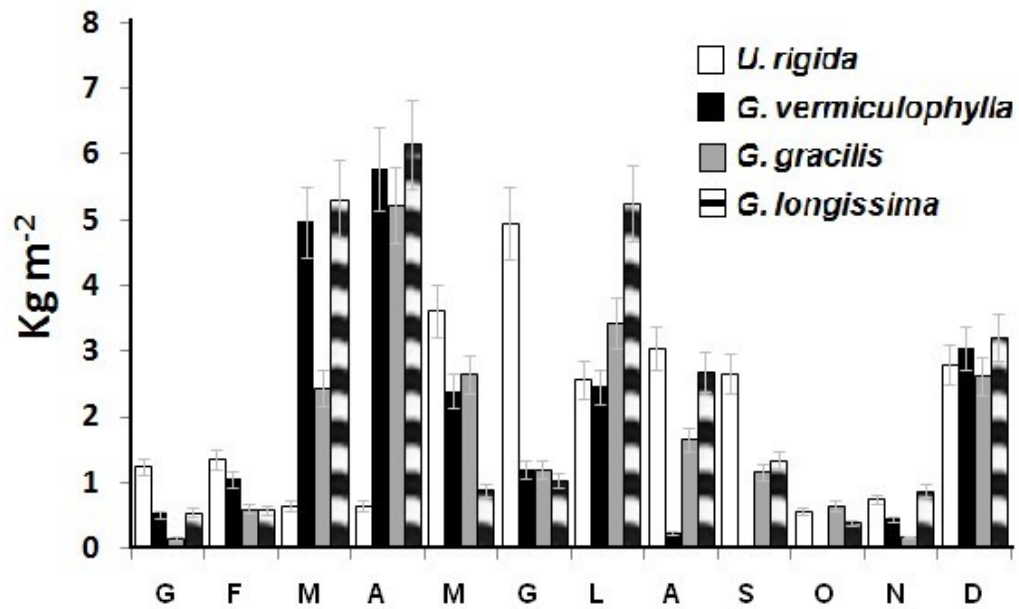


Fig.23: Produzione algale alle TR durante l'anno in kg fw m⁻².

S. GIULIANO

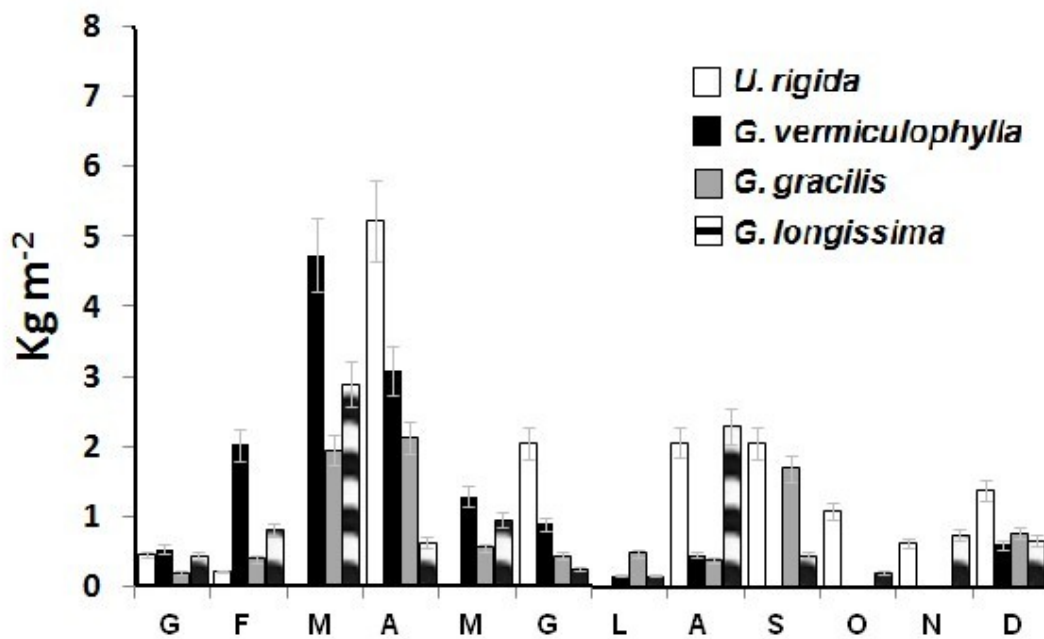


Fig. 24: Produzione algale a SG durante l'anno in kg fw m⁻²

Analisi Statistica

I coefficienti dell'analisi di correlazione non-parametrica di Spearman mostrano che i valori di RGR, in entrambe le stazioni, erano inversamente correlati con la profondità, le concentrazioni di clorofilla-*a*, i nutrienti in colonna d'acqua (specialmente il fosforo e i silicati), i tassi di sedimentazione, l'abbondanza e la copertura algale. I parametri direttamente correlati all'aumento degli RGR erano invece la trasparenza dell'acqua, il pH e soprattutto l'Eh nella colonna d'acqua. Se invece si considera la sola stazione delle TR sono state inaspettatamente rilevate correlazioni inverse degli RGR con tutti i nutrienti specialmente per *U. rigida*. A SG le correlazioni più significative sono state trovate per la profondità, l'ossigeno disciolto e il particolato sospeso (**Tabb. 2a, 2b**).

L'analisi delle componenti principali (PCA) ha rivelato che il 37% della varianza era spiegato da due sole componenti. I pesi fattoriali dei primi due fattori calcolati con i dati delle due stazioni prese insieme sono stati riportati in **Fig.25**. Le concentrazioni dei composti azotati (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) hanno mostrato pesi fattoriali significativi ($>0,7$) in entrambe le stazioni, inversamente correlati con la crescita di tutte le alghe. I risultati delle PCA evidenziano come gli accrescimenti delle tre Gracilariaceae fossero fortemente correlati con la trasparenza dell'acqua, l'Eh e il pH dei sedimenti superficiali, la salinità e il particolato sospeso (1° quadrante). Viceversa gli accrescimenti erano inversamente correlati alla clorofilla-*a* e alla feofitina-*a* (fitoplancton), alla biomassa, alla copertura macroalgale in campo e alla concentrazione di fosforo nelle acque .

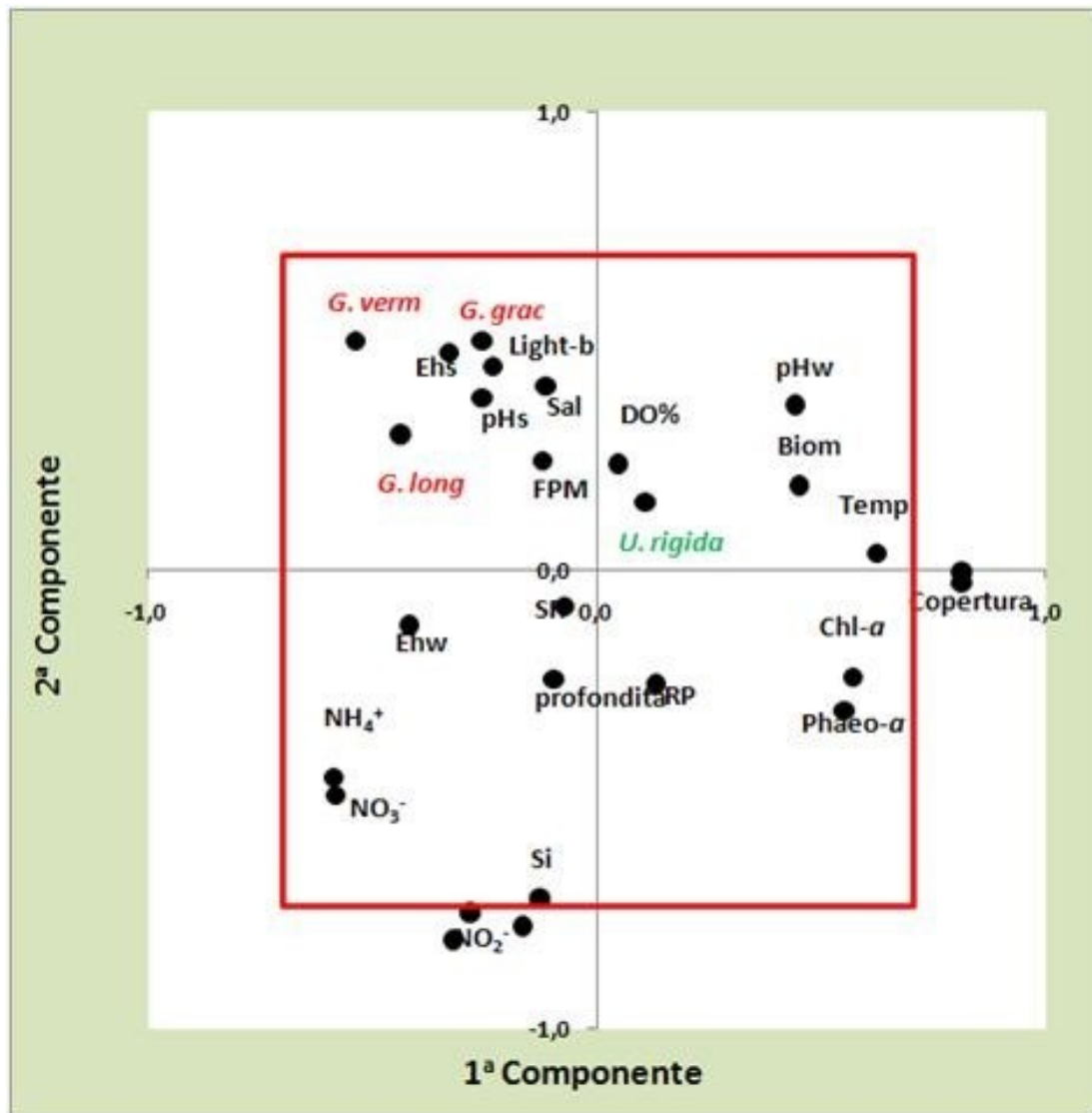


Fig. 25: Analisi PCA sui dati congiunti di entrambe le stazioni.

Legenda: Temp, temperatura; Light-b, luce sul fondale; DO, ossigeno disciolto; FPM, particolato sospeso; w, acqua; s, sedimento; tot, totale; RP, fosforo reattivo; NH₄⁺, ammonio; NO₂⁻, nitriti; NO₃⁻, nitrati; Si, silicati; SR, tassi di sedimentazione; Biom, biomassa naturale; Cover, copertura della biomassa naturale; *G. verm.*, *Gracilaria vermiculophylla*; *G. grac.*, *Gracilaria gracilis*; *G. long.*, *Gracilariopsis longissima*; *U. rigida*, *Ulva rigida*.

6.4 Discussione

La letteratura abbonda di libri e articoli sullo sfruttamento delle macroalghe come fonte alimentare e per la produzione di energia, cosmetici e prodotti farmaceutici. Gracilariaceae, Solieriaceae, Ulvaceae, Fucales e Laminariales, abbondano nelle lagune e sulle coste italiane e rappresentano spesso un guadagno importante all'estero per molte compagnie commerciali. La produzione mondiale di *Gracilaria* nel 2001 ha portato alla raccolta di 37kt dw, di cui 25kt nelle Americhe (Cile e Argentina), 11,5kt in Asia e nel Pacifico (Cina, Indonesia, Namibia, Vietnam e India) e solo 300 e 200 t in Africa e in Europa, rispettivamente. Per Spagna e Portogallo, sono riportate modeste produzioni di *Gelidium* (Hugh, 2003). D'altronde, l'Italia e l'Europa hanno solo recentemente integrato nelle loro normative gli strumenti utili ad incentivare l'utilizzo delle macroalghe come risorsa, e l'Italia, benché circondata da ca. 8000 Km di costa con numerose lagune, ancora fatica ad assimilare nel suo patrimonio culturale ed economico il loro sfruttamento. In laguna di Venezia, le Gracilariaceae hanno mostrato basse fluttuazioni di biomassa e una crescita e/o degradazione più graduale tra un campionamento e l'altro. Invece, per quanto concerne *U. rigida*, la crescita è stata molto variabile con uno sviluppo oscillante, confermando la rapida risposta di *U. rigida* ai cambiamenti ambientali e la sua capacità di innescare rapidamente collassi di biomassa e crisi ipo-anossiche. Le Gracilariaceae, hanno dimostrato di poter competere efficacemente con le Ulvaceae nell'ambiente lagunare, soprattutto nelle aree ad elevata torbidità.

Tutti i parametri misurati concordano nel descrivere SG come una stazione con condizioni ambientali variabili, influenzata dagli apporti di acque dolci e di nutrienti, con elevata torbidità e alti tassi di sedimentazione. La stazione delle TR, sebbene con condizioni meno variabili rispetto a SG è comunque caratterizzata da una trofia moderatamente alta e da acque relativamente limpide con moderate concentrazioni di plancton per la maggior parte dell'anno.

Dagli esperimenti condotti, è risultato che la resa di Gracilariaceae e Ulvaceae varia da 9,0 a 28 kg fw m⁻² anno⁻¹, corrispondente a 15-45 t dw ha⁻¹ anno⁻¹. Queste rese sono simili a quelle registrate da Haglund et Pedersen (1993) in Svezia con 20-25 t ha⁻¹ anno⁻¹, ma sono inferiori ai valori riportati da Hanisak et Ryther (1986) in Florida, con 127t dw ha⁻¹ anno⁻¹ e da Friedlander et Levy (1995) in Israele, con 60 t dw ha⁻¹ anno⁻¹ per la coltivazione in vasche e cisterne. Tenendo conto delle produzioni per la Laguna di Venezia, e del valore economico più basso riportato dalla FAO di 0,35 US\$ kg⁻¹ fw (equivalente a 0,30 € kg⁻¹fw) sarebbe possibile ricavare introiti tra i 31500 e i 98000 US\$ ha⁻¹ anno⁻¹. Al fine di ridurre i costi superflui di produzione e raccolta, e di rendere il

processo più sostenibile, i periodi individuati di maggior produzione sono anche quelli più indicati per la raccolta della biomassa. In media, la resa nell'arco di 8 mesi, da febbraio a settembre, restituisce tra il 77% e il 92% della resa annuale per le diverse specie e stazioni.

Per quanto concerne le condizioni di crescita delle macroalghe e la disponibilità di nutrienti, l'analisi statistica ha evidenziato come un eccesso di azoto e fosforo nelle acque favorisca la crescita del fitoplancton, con conseguente sottrazione di luce e risorse alle biomasse macroalgali posizionate sul fondale, che vengono inibite nella crescita (Viaroli *et al.*, 2008). L'area di sfruttamento deve quindi essere ricercata in zone con acque limpide, con alto ricambio e modeste quantità di RP (0,2-2 μM), elemento chiave per l'accrescimento. Tuttavia, qualora la coltivazione delle alghe in acque torbide sia una scelta obbligata, *G. vermiculophylla* si presenta come la candidata più promettente. Questa specie, sebbene con rese minori, è in grado di crescere anche con bassa luminosità e alti tassi di sedimentazione, tollera il seppellimento e prolifera dove la crescita di *Ulva* spp. e di altre Gracilariaceae è inibita (Thomsen *et al.* 2007).

6.5 Conclusioni

La coltivazione di macroalghe nelle aree costiere, specialmente Gracilariaceae e Ulvaceae, può integrare i redditi risultanti dall'attività di pesca in lento declino nell'alto Adriatico e sostituire la raccolta della vongola filippina nella Laguna di Venezia. Benché i fenomeni di eutrofizzazione possano essere una seria minaccia per gli allevamenti del pesce in aree confinate e a basso ricambio, si presentano invece come un'opportunità per la produzione e la raccolta di macroalghe. Una biomassa costante di 3 kg fw m^{-2} in acque limpide e arricchite di nutrienti può produrre fino a 22-28 kg fw $\text{m}^{-2} \text{anno}^{-1}$, corrispondenti a c.a. 220-280 t fw $\text{ha}^{-1} \text{anno}^{-1}$, per un valore economico dai 31500 ai 98000 US\$ $\text{ha}^{-1} \text{anno}^{-1}$. La raccolta concentrata nel periodo più produttivo, da Febbraio a Settembre (8 mesi) permetterebbe inoltre di ridurre gli sforzi e i costi della raccolta rendendo il processo più sostenibile.



The image shows a laboratory setup for biochemistry. A large glass funnel is mounted on a stand and is partially filled with a clear liquid. Below the funnel is a large glass bottle. To the right, a graduated cylinder is visible, marked in milliliters (ml) from 0 to 1000. In the background, a white box with a blue arrow pointing upwards contains the text: "Dispense Paraffin Through This Opening When Empty - Residue Free For Laboratory Use", "4 IN. X 125 FT.", and "For Use In Your Dispenser Simply Pinch Through Perforation At Center Below PINCH HERE". The setup is on a light-colored surface, possibly a lab bench.

Frazioni biochimiche principali

7. FRAZIONI BIOCHIMICHE PRINCIPALI

7.1 Introduzione

Una sommaria valutazione del valore nutrizionale delle macroalghe e del loro contenuto energetico passa inevitabilmente dallo studio della composizione dei principali composti biochimici che le caratterizzano: carboidrati totali e polisaccaridi idrosolubili (frazione dei carboidrati totali), proteine e ceneri.

Carboidrati e polisaccaridi idrosolubili

I carboidrati svolgono numerosi ruoli a livello cellulare nelle macroalghe. I carboidrati totali sono spesso la frazione organica più significativa e possono raggiungere il 70% del peso secco oscillando solitamente tra il 26 e il 50% dw (Sfriso *et al.*, 1994b). I monosaccaridi sono la principale fonte di energia per il metabolismo, mentre i polisaccaridi hanno sia ruolo strutturale che di riserva energetica. Di questi, una parte sono cellulose ed emicellulose insolubili, mentre la parte rimanente sono polisaccaridi idrosolubili e gelificanti, noti anche come idrocolloidi.

Molte alghe brune e rosse vengono coltivate per la produzione di tre principali idrocolloidi: alginati, agar, e carragenina. Dalla loro scoperta in Giappone nel XVII sec., la produzione di questi polisaccaridi ha subito una crescita esponenziale, data la loro straordinaria versatilità che li rende oggi i principali additivi industriali per scopi alimentari nel mondo. Attualmente, 1Mln di tonnellate di alghe viene raccolto ogni anno per l'estrazione dei succitati polisaccaridi, con una produzione che raggiunge le 55 kt anno⁻¹ e un valore di mercato di 585 Mln US\$, di cui: 213Mln US\$ per la produzione di alginati, estratti dalle alghe brune, 132 Mln US\$ per la produzione di agar dalle alghe rosse, soprattutto da specie del genere *Gelidium*, *Gracilaria* e *Pterocladia* e 240 Mln US\$ per la carragenina, originariamente estratta da *Chondrus crispus* Stackhouse, 1797 (detto anche Carrageen) (Hugh, 2003).

Nella Laguna di Venezia, è già avvenuta in passato la raccolta di macroalghe per la produzione di agar. Attività sperimentali in questo senso sono state portate avanti nel dopoguerra da Minio, Spada, Polli e Zolezzii tra il 1941 e il 1952 (Ceregato *et al.* 2016) su esemplari di *Gracilaria confervoides* (Linnaeus) Greville (successivamente distinta in *G. gracilis*, *G. longissima* e *G. longa*). La raccolta di macroalghe per la produzione di idrocolloidi è aumentata nel corso di 40 anni, dal 1940 (con la raccolta di 12 t dw anno⁻¹) fino alla fine degli anni '80 con ca. 1,7kt dw nel 1985 e 7kt dw qualche anno dopo (Orlandini *et Favaretto*, 1987; Comune di Venezia, 1991; Consorzio Venezia Nuova, 1994). Un rapido declino di biomassa dall'inizio degli anni '90 sembra aver determinato la

cessazione della produzione di idrocolloidi. La biomassa macroalgale totale si è ridotta da 18Mln di tonnellate fw negli anni '80 a 2,3Mln di tonnellate fw nel 2000. Curiosamente queste quantità erano comunque di gran lunga superiori a quelle raccolte per la produzione di agar nel 1990 e a quelle presenti attualmente (Sfriso et Facca, 2007) e la riduzione delle biomasse può solo parzialmente giustificare la cessazione della produzione di idrocolloidi. A tali considerazioni è necessario aggiungere la recente comparsa e diffusione di numerose specie aliene, molte delle quali utilizzabili per la produzione di idrocolloidi (Kaliaperumal et Kalimuthu, 1993). Una campagna di campionamento (non trattata su questa tesi) tra maggio e giugno 2014 ha rivelato la presenza, in Laguna di Venezia, di 150kt di alghe aliene, corrispondenti a ca. un terzo della biomassa globale delle macroalghe presenti. Tra queste *G. vermiculophylla* è la specie più invasiva con 66kt seguita da *Agardhiella subulata*, *Hypnea flexicaulis* Yamagishi et Masuda e *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt con 38kt, 28kt e 7,7kt, rispettivamente (Sfriso A. et al., submitted).

I due idrocolloidi investigati in questa sede sono l'agar e l'ulvano, che corrispondono rispettivamente ai polisaccaridi idrosolubili delle Gracilariaceae e dell'*Ulva*, la cui crescita e produzione è già stata investigata e descritta.

L'agar è un polisaccaride estratto dalle Rhodophyceae, insolubile in acqua fredda, ma solubile in acqua a temperature superiori agli 85°C, che è in grado di incorporare fino al 99% di acqua. Una soluzione tra l'1 e l'1,5% solidifica tra 34 e 43°C formando dei gel che microscopicamente appaiono come strutture spugnose (Armisen et al., 2000). Questo è composto principalmente da due frazioni: l'agarosio e le agaropectine. L'agarosio, che è il principale costituente oltre che il principale gelificante, è composto da una catena di dimeri di agarobiosio, composti da D-galattopiranosio e 3,6-anidro-L-galattosio legati tra loro da un legame 1,4- β , a loro volta congiunti da legami 1,3- α . (Fig. 26)

I legami tra i monomeri che risultano così alternati lungo la catena hanno diversa resistenza agli attacchi chimici ed enzimatici, i legami 1,3- α sono più facilmente idrolizzabili dagli enzimi producendo dimeri di neoagarobiosio, mentre i legami 1,4- β sono più facilmente idrolizzabili con attacco acido risultando in dimeri di agarobiosio (benché esistano enzimi in grado di idrolizzare entrambi i legami: le α e le β agarasi (Flament et al., 2007)). I dimeri di agarobiosio possono presentare numerose varianti come evidenziato da Lahaye et Rochas (1991) e numerosi gruppi funzionali "accessori" spesso caratteristici della specie da cui l'agar viene estratto, della regione dove viene prodotto e del periodo dell'anno in cui l'alga viene raccolta. I gruppi funzionali che vanno a sostituire i gruppi idrossilici corrispondono ad esteri solfati, esteri metilici e piruvato. Le agaropectine, invece, sono una miscela complessa di polisaccaridi con lievi proprietà gelificanti, tuttora poco

caratterizzata, a base di D-galattosio ed L-galattosio, molto ricca di acidi uronici, gruppi piruvati e solfati (tra l'1 e il 12% contro appena lo 0,7 - 1,9% dell'agarosio; Fuse *et Goto*, 1971; Akahane *et Izumi*, 1976).

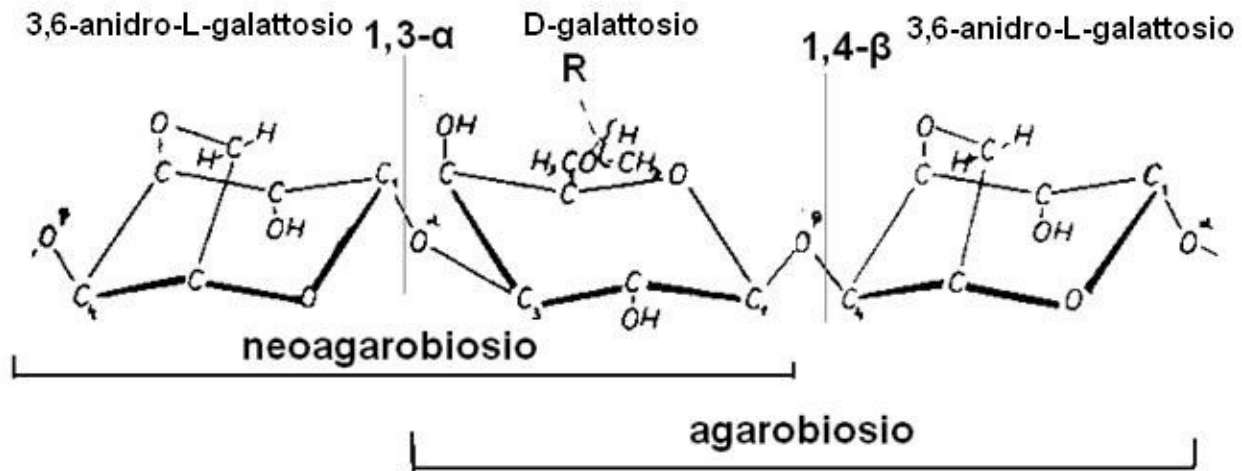


Fig. 26: Struttura del polimero di agarosio. Tratto da [Armisen *et al.* \(2000\)](#).

L'agar estratto dalle Gracilariaceae allo stato nativo presenta una bassa durezza rispetto a quello di *Gelidium* e all'agarosio purificato, a causa della presenza di numerosi sostituenti sulla catena di dimeri di agarobiosio che lo costituiscono: metil etere, acido piruvico, estere solfato, acetale e zuccheri combinati in fogge differenti a seconda delle condizioni ambientali e della specie ([Armisen *et al.*, 2000](#); [Praiboon *et al.*, 2006](#), [Sousa *et al.*, 2012](#)). La conversione in un agar commercialmente valido, tuttavia, è possibile attraverso un pretrattamento dei talli (prima della fase di estrazione) con soluzioni concentrate di NaOH o con acido acetico diluito, che portano alla desolforazione dei polisaccaridi ([FreilePelegri *et Robledo*, 1997](#); [Roleda *et al.*, 1997](#); [Meena *et al.*, 2008](#)). Le rese di estrazione e le sue proprietà fisico-chimiche ne hanno finora determinato il valore sul mercato.

Anche le Ulvaceae, benché con rese inferiori, sono una fonte di idrocolloidi chiamati sommariamente "ulvano": una miscela complessa a base di polisaccaridi di ramnosio, acidi uronici e xylosio ricchi di gruppi carbossilici e solforati ([Robic *et al.*, 2009](#), [Shefer *et al.*, 2017](#)) che forma gel aggregandosi in strutture particellari sferiche in presenza di cationi divalenti a pH basico. L'ulvano rappresenta una classe di polisaccaridi solforati estratti dalle pareti cellulari delle alghe verdi appartenenti al genere *Ulva*. Questo polisaccaride solitamente estratto a caldo con acqua mostra una composizione variabile a base di ramnosio, xilosio, acido glucuronico e iuduronico, ricco di gruppi solfati (**Fig. 27**), che inducono la formazione di complessi con i cationi divalenti portandolo a solidificare sotto forma di sfere ([Robic *et al.*, 2009](#)).

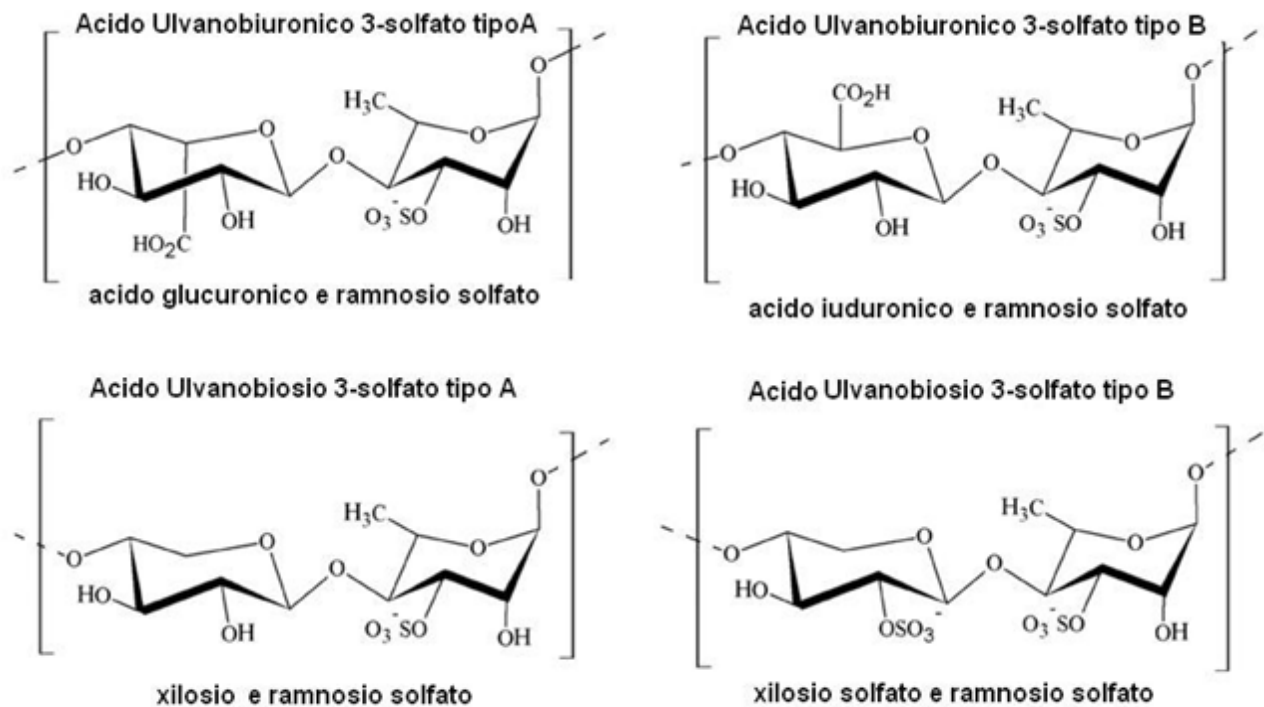


Fig. 27: Struttura dei principali disaccaridi che compongono il polimero dell'ulvano.
Tratto da [Cunha et Grenha \(2016\)](#).

Questo polisaccaride per via della sua natura idrofila è solubile in acqua, in cui porta alla formazione di soluzioni torbide, dovute a microaggregati dispersi. Evidentemente, l'acqua, benché sia il migliore solvente noto, non è ancora sufficiente a dissolvere completamente l'ulvano, a causa della ricchezza di gruppi metilici (idrofobici) presenti sul ramnosio ([Robic et al., 2009](#)). La caratteristica che contraddistingue l'ulvano è la ricchezza di zuccheri poco comuni, come il ramnosio solfato e l'acido iudurónico, che lo rendono simile ai glicosaminoglicani dei mammiferi (mucopolisaccaridi come l'acido ialuronico, l'eparina e la condroitina solfato) comunemente usati per applicazioni biomediche ([Chiellini et Morelli, 2011](#); [Alban et al., 2002](#)). La possibilità inoltre di poterne modificare le proprietà fisicochimiche cambiando il pH lo rende un candidato promettente per future applicazioni biotecnologiche.

Proteine

La questione della fame nel mondo è un dibattito antico quanto moderno e benché ragioni politiche, sociali ed economiche siano le radici di questo problema, l'aumento esponenziale della popolazione mondiale ci pone inevitabilmente a fronteggiare la prospettiva di 9 Mld di persone da sfamare adeguatamente per il 2040. L'ottimizzazione

delle comuni colture vegetali incrementerà certamente le derrate alimentari a disposizione e le macroalghe potranno contribuire in larga parte in questo processo.

Nel 2014, una coalizione di “partner” internazionali di industrie zootecniche, vegetali e ONG (tra cui WWF e GAIN) ha sviluppato la “Protein Challenge 2040”, un’associazione volta a individuare soluzioni innovative e sostenibili per affrontare la sfida ambientale e alimentare dell’incremento della produzione di proteine che attende l’umanità nei prossimi decenni (<https://www.forumforthefuture.org>). Le macroalghe nei paesi asiatici sono spesso consumate come vegetali marini e in Giappone si arriva a consumarne 1,6 kg dw anno⁻¹ *per capita*, ma in Europa gli unici utilizzi sono per la produzione di additivi alimentari (idrocolloidi gelificanti) e talvolta come integratori di minerali e fibre nelle diete animali.

Raramente, invece, le alghe sono considerate per il loro contenuto di proteine ([Indergaard et Minsaas, 1991](#)). Questo è variabile con la specie e con la stagione, e può oscillare dal 3 al 45% dw, con una composizione di amminoacidi simile a quella riportata per le proteine delle uova e dei legumi ([Fleurence, 1999](#)) e una digeribilità stimata, ad esempio per *Gracilaria*, del 42% rispetto alle proteine del latte ([Marrion et al. 2005](#)). Queste proprietà, combinate con le straordinarie capacità di crescita algali ne fanno una promessa accattivante per la produzione futura di proteine per uso alimentare umano e animale.

Ceneri

Le ceneri rappresentano la frazione minerale residua derivante dalla combustione della frazione organica e sono una porzione importante della massa algale in un intervallo solitamente compreso tra l’8 il 40% dw ([Calvo et al., 1993](#); [Mabeau et Fleurence, 1993](#)). Questa frazione minerale è ricca di fosforo e azoto. Ad esempio, prendendo in considerazione le percentuali di ceneri e il contenuto di azoto e fosforo in *Gracilaria*, riportati in [Sfriso et al. \(1994\)](#), si stima un intervallo in peso per il fosforo da 2 a 10 g kg⁻¹ mentre per l’azoto i quantitativi sono 10 volte superiori con concentrazioni nelle ceneri che variano da 22 a 120 g kg⁻¹. Queste premesse giustificano l’utilizzo delle macroalghe per la produzione di salnitro da polvere da sparo durante la prima guerra mondiale ([Armisen, 1995](#)) e il millenario utilizzo come fertilizzanti del terreno. In questa frazione, si accumulano anche elevati livelli di K, Ca, Na e Fe, superiori a quelli riportati per le piante vascolarizzate ([Tabarsa et al. 2011](#)).

Le ceneri inoltre rappresentano un indicatore importante nel bilancio energetico cellulare, poiché un aumento della frazione inorganica corrisponde a una riduzione globale della frazione organica e dell’energia chimica stoccata al suo interno.

7.2 Materiali e metodi

Campioni mensili di *G. gracilis*, *G. longissima*, *G. vermiculophylla* e *U. rigida* sono stati campionati da marzo 2014 a marzo 2015 nelle due stazioni oggetto di studio, sgocciolati con una centrifuga manuale e seccati prima al sole per 24h poi a 50°C per 72h, registrando le variazioni di peso per la determinazione del rapporto dw/fw. Le alghe sono state quindi tritate e conservate al buio a temperatura ambiente. Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato e ripetute fino a ottenere un coefficiente di variazione inferiore al 5%, salvo che per i carboidrati totali che raggiungono il 7%. I valori sono espressi come percentuale del peso secco.

Le proteine totali (PRT) sono state estratte con NaOH 0,5 M per 15 min a 100°C e determinate con il metodo spettrofotometrico di [Bradford \(1976\)](#) mediante l'aggiunta di "Coomassie Brilliant Blue G250" e lettura a 595nm. La retta di calibrazione è stata effettuata con "Bovine Serum Albumin".

I carboidrati totali (CHO) sono stati estratti con 72% H₂SO₄ a 30°C per 1h e sono stati determinati con il metodo dell'acido solforico - fenolo ([Dubois et al., 1956](#)) a 490 nm per confronto con una retta di calibrazione a base di glucosio per *Ulva* e di galattosio per le Gracilariaceae.

I polisaccaridi solforati idrosolubili (PS: agar e ulvano in forma nativa) sono stati estratti con acqua bidistillata a 100°C per 2h, la soluzione è stata "vortexata" per alcuni secondi ogni 15 minuti per 1h e 30 min. Gli estratti chiarificati sono stati analizzati con il metodo colorimetrico di [Soedjak \(1994\)](#) in cui gli idrocolloidi anionici si combinano con il blu di metilene spostandone il picco di assorbanza a 559 nm in proporzione al grado di solforazione. Le curve di calibrazione sono state ottenute dai rispettivi polisaccaridi algali purificati per precipitazione sequenziale in etanolo mediante il metodo di [Leija et al. \(2009\)](#); la purezza degli estratti inoltre è stata verificata con il metodo dell'acido solforico - fenolo e il confronto con curve di calibrazione di ramnosio per l'ulvano e di agarosio per l'agar.

Le ceneri sono state determinate gravimetricamente su crogioli di porcellana in seguito a incenerimento a 550° per 2 h.

7.3 Risultati

Percentuali biochimiche

Prendendo in considerazione l'intero "dataset" annuale di entrambe le stazioni, si evidenziano le frazioni biochimiche più importanti da attribuirsi a carboidrati e ceneri (**Tabb. 3a, 3b; 4a; 4b**). In *U. rigida*, queste contribuiscono mediamente per il 46% e il 32% della biomassa secca. Analogamente, per le Gracilariaceae, valori medi del 57-58% sono dovuti ai carboidrati totali mentre il 29-32% è rappresentato dalle ceneri. I PS, invece, presentano valori diversificati tra le Ulvaceae e le Gracilariaceae. *Ulva rigida* presenta un contenuto di ulvano medio appena del 6,3% con picchi stagionali dell'11%. Tra le Gracilariaceae, il contenuto medio di agar più elevato è quello di *G. longissima* (31%) mentre *G. gracilis* e *G. vermiculophylla* presentano valori simili intorno al 25%. Le concentrazioni dell'agar solforato hanno mostrato notevoli differenze tra le due stazioni, con valori mediamente fino al 10% superiori alle TR rispetto a SG. Le più alte concentrazioni di PS per le alghe rosse sono state rinvenute in inverno, tra dicembre e marzo (19-59%), mentre i valori mediamente più bassi sono stati rilevati tra maggio e agosto (9,3-37%). Anche *Ulva rigida* ha presentato percentuali di ulvano altamente variabili con andamenti opposti nelle due stazioni. Il rapporto medio PS/CHO permette di comprendere quando viene privilegiata la produzione di polisaccaridi strutturali e quando quella di sostanze di riserva (polisaccaridi idrosolubili). Un picco di questo rapporto era presente in tutte le specie di Gracilariaceae tra febbraio e marzo, seguito da una decrescita in aprile e maggio, quando i polisaccaridi insolubili (cellulosa ed emicellulosa) corrispondevano al 70% dei carboidrati totali e l'agar era al minimo. Questo rapporto per *G. gracilis* si è mantenuto costante intorno a 0,39 per il resto dell'anno, mentre è incrementato nuovamente in *G. longissima* e *G. vermiculophylla* in agosto e luglio, raggiungendo un valore di 0,59. Il contenuto di ulvano, invece, corrispondeva mediamente al 12% dei carboidrati totali, con picchi in aprile e settembre e un minimo in piena estate. Per quanto concerne il contenuto di proteine nelle alghe, queste presentavano valori medi del 7,4% in *U. rigida* oscillando tra il 10% e il 15% nelle Gracilariaceae. Malgrado l'alta variabilità stagionale è possibile discernere un andamento facendo una media di tutte le alghe e stazioni per lo stesso mese. Questa operazione rivela un andamento a campana rovesciata con i valori massimi in gennaio e dicembre e due minimi in marzo e agosto. Il tenore proteico dei residui di estrazione dell'agar ha rivelato un aumento percentuale nel contenuto di proteine che poteva arrivare fino al 20% dopo l'estrazione degli idrocolloidi, aumento dovuto in parte alla rimozione dei polisaccaridi solubili e in parte alla rimozione della frazione minerale delle ceneri.

Nelle alghe il contenuto di ceneri era mediamente del 29-32%. La frazione delle ceneri, il cui andamento era altamente variabile, mostrava i valori più bassi tra il 9,1% e il 26% in gennaio, incrementando rapidamente in febbraio e raggiungendo valori compresi tra il 21 e il 51% per il resto dell'anno.

La somma delle percentuali di proteine, carboidrati e ceneri restituisce in media tra il 98 e il 100% della biomassa totale nelle Gracilariaceae, ma solo l'85% della biomassa totale di *Ulva*, evidenziando in questa specie la presenza di un più alto contenuto di fibre.

Produzione di agar e ulvano

Nell'ottica di una produzione estensiva di idrocolloidi dalle alghe oggetto di studio, è stata investigata la loro produzione per unità di area moltiplicando il contenuto di polisaccaridi solforati solubili per la produzione mensile algale. I valori così ottenuti evidenziano il periodo più favorevole per la raccolta delle alghe ai fini della produzione di agar e ulvano.

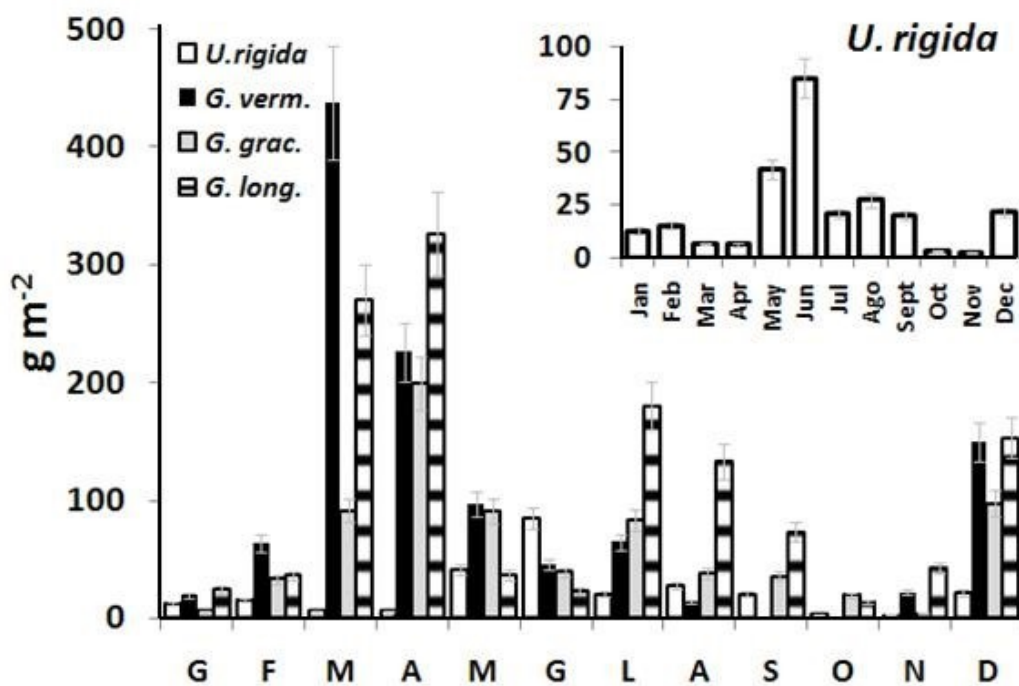


Fig. 28: Produzione di agar nelle Gracilariaceae e ulvano (dettaglio) in *U. rigida* per unità di area alle TR.

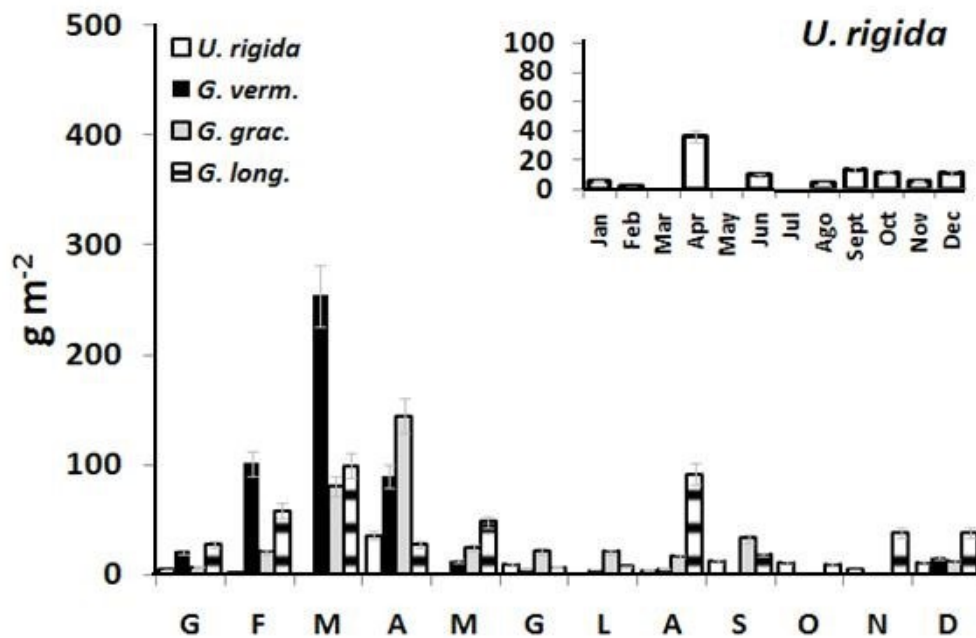


Fig. 29: Produzione di agar nelle Gracilariaceae e ulvano (dettaglio) in *U. rigida* per unità di area alle SG.

La produzione di polisaccaridi solforati ha mostrato valori molto differenti tra le stazioni. In (Fig. 28-29) sono riportate le produzioni per unità di area nelle due stazioni e si evidenzia come a SG i valori di produzione siano nettamente più bassi del 36-53% rispetto alle TR. L'influenza della produzione algale sull'andamento della produzione di polisaccaridi solubili è notevole, tuttavia confrontando (Fig. 28) e (Fig. 23) si evidenzia un picco di produzione di polisaccaridi più marcato in primavera. Le alghe rosse mostrano picchi di produzione tra Marzo e Aprile raggiungendo i 438 $g\ m^{-2}$ per *G. vermiculophylla* e 327 $g\ m^{-2}$ per *G. longissima*. Nello stesso periodo *G. vermiculophylla* ha prodotto il 68% dell'intera produzione annuale, mentre *G. gracilis* e *G. longissima* hanno prodotto rispettivamente il 58% e il 43% con una seconda produzione più ridotta tra luglio e agosto e in dicembre. Sommando questa seconda produzione estiva si raggiungono in *G. gracilis* e *G. longissima* il 71% e il 65% della produzione annuale. Per quanto concerne invece la produzione di ulvano questa segue in modo abbastanza costante la crescita di *U. rigida*, raggiungendo un picco di produzione in giugno alle TR di 85,0 $g\ m^{-2}$. La produzione di ulvano a SG era molto più bassa e praticamente inesistente a marzo, maggio e luglio. La relazione tra la produzione di polisaccaridi solubili e la temperatura è riportata in Fig.30.

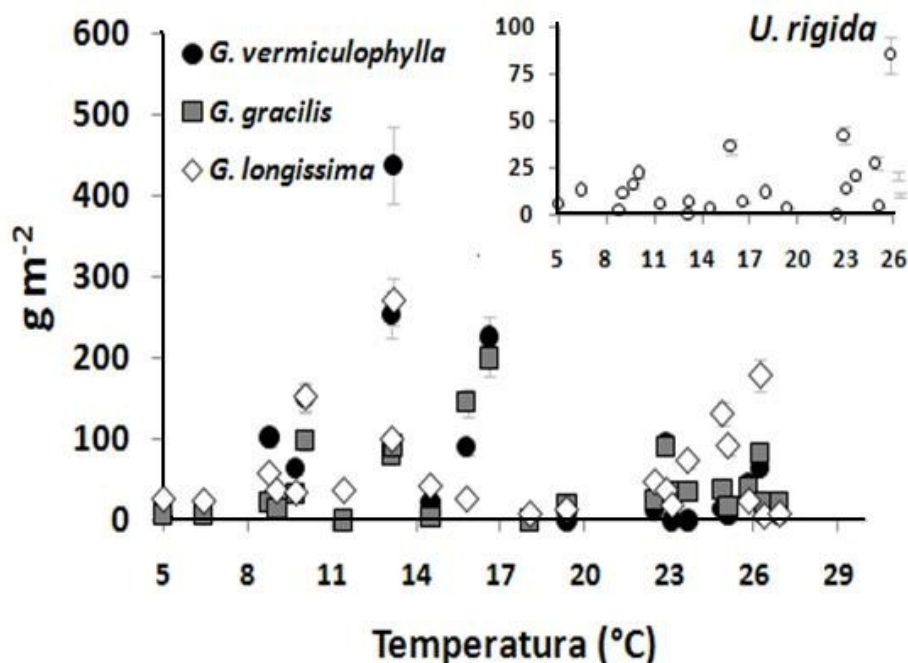


Fig. 30: Grafico della produzione di polisaccaridi solforati solubili in funzione della temperatura (dettaglio per *U. rigida*).

Si evidenzia come tutte le alghe rosse producano significative quantità di agar solo a temperature superiori ai 9°C e inferiori a 26°C. *Gracilaria vermiculophylla* ha mostrato un massimo di produzione a 13°C, mentre *G. longissima* e *G. gracilis* a 17°C. Produzioni più basse sono state osservate invece anche sopra i 22°C per tutte le Gracilariaceae, viceversa *U. rigida* ha mostrato una temperatura ottimale nella produzione di ulvano corrispondente a 26°C.

Globalmente, la produzione di agar da *G. longissima* ha raggiunto i valori più alti con 13,2 t ha⁻¹ anno⁻¹. *Gracilaria vermiculophylla* e *G. gracilis* hanno raggiunto 11,4 e 7,4 t ha⁻¹ anno⁻¹ e infine la produzione di ulvano in *U. rigida* ha raggiunto appena 2,7 t ha⁻¹ anno⁻¹, dovuta alla presenza di un basso tenore medio di ulvano.

Analisi Statistica

L'analisi di correlazione non-parametrica di Spearman è stata effettuata tra le percentuali di carboidrati, proteine, polisaccaridi solubili e ceneri e i parametri ambientali, per determinare come varia la composizione biochimica al variare delle condizioni fisico-chimiche (**Tab. 5**). L'analisi evidenzia che le condizioni ambientali che provocano un aumento delle ceneri sono generalmente inversamente correlate rispetto alle altre frazioni organiche. L'aumento dei carboidrati totali è correlato positivamente con l'FPM, la salinità,

il pH del sedimento oltre che alla luce sul fondale, mentre i PS oltre ai già citati parametri sono positivamente correlati anche con l'Eh in colonna d'acqua e l'OD. Viceversa, i parametri che sono inversamente correlati con i PS sono il pH dell'acqua, la temperatura, la Chl-*a*. Le proteine mostrano correlazioni positive con l'OD, l' FPM, la salinità, il pH e l'Eh del sedimento e correlazioni negative con la temperatura, il pH dell'acqua e la Chl-*a*.

7.4 Discussione

Un contrasto di quantomeno dubbia origine tra alghe e fanerogame è da ricondursi all'etimologia "piante superiori" attribuito a queste ultime, in quanto forse lo sono per organizzazione strutturale non certo per crescita. La produttività algale è stata confrontata con le principali piante foraggere e da agricoltura industriale in **Tab.6**. Le produzioni algali (da 1,4 a 5,0 kg dw m⁻²) sono da 1,4 a 50 volte superiori a quelle delle piante vascolarizzate che producono da 0,1 a 1 kg dw m⁻² (media di più di 31 paesi nel mondo secondo le informazioni fornite dalla banca dati della FAO, [FAOSTAT, 2014](#)). I rapporti tra le componenti biochimiche algali mostrano un contenuto di sali decisamente più alto, con una quantità di ceneri che è compresa in media tra il 29 e il 32% a raffronto dell'1-5% delle principali colture vegetali. In queste ultime, i carboidrati totali, ad eccezione della soia, oscillano tra l'83% e il 94%, mentre nelle alghe il contenuto di carboidrati varia tra il 46% e il 58%. Il contenuto di proteine nelle alghe infine è paragonabile a quello del grano e del mais, ma è da 3 a 5 volte inferiore a quello della soia. Tuttavia la crescita algale è più di un ordine di grandezza superiore, perciò si può arrivare a produrre nel complesso, per unità di area, molte più proteine e carboidrati. Pertanto, nell'ottica futura di un'incrementata produzione di proteine, secondo quanto previsto dalla Challenge 2040, le macroalghe hanno dimostrato di essere una risorsa da non poter essere assolutamente trascurata.

Da quanto sin qui detto, il valore delle biomasse macroalgali potrebbe essere ulteriormente qualificato dall'estrazione di agar e ulvano. La biomassa delle Gracilariaceae potrebbe fornire da 7,4 a 13,2 t ha⁻¹ anno⁻¹ di agar allo stato nativo. Qualora questo venisse commercializzato ad uso industriale, nella forma desolforata, subirebbe una riduzione del 55% in peso in seguito al trattamento con soda ([Wakibia et al. 2001](#)), producendo per unità di area da 4,07 a 7,26 t ha⁻¹ anno⁻¹ di agar di qualità commerciale. Un'indagine mediante il motore di ricerca "Alibabà" per "agar", con una media di 50 fornitori, restituisce un costo medio di 15-19 US\$ kg⁻¹ (13-16 € kg⁻¹) benché i valori riportati dalla FAO siano di 11 US\$ kg⁻¹ (8,9 € kg⁻¹) per una vendita al dettaglio che può raggiungere i 50 US\$ kg⁻¹ ([McHugh, 2003](#)). La coltivazione di un ettaro acqueo a *Gracilaria*, finalizzato alla produzione di agar, tenendo conto del prezzo dell'agar indicato

dalla FAO, può quindi fruttare in un anno da 44000 a 80000 US\$ (37000 - 67000€). I redditi quindi derivanti dall'estrazione e purificazione degli idrocolloidi gelificanti sono pressoché sovrapponibili con quelli derivanti dalla semplice raccolta delle macroalghe, e la richiesta sul mercato "locale" europeo diviene il discriminante nella scelta in caso di produzione e vendita.

Le percentuali di polisaccaridi solforati solubili rinvenuti nei campioni sono comparabili con quelli rinvenuti in letteratura, specialmente per le Gracilariaceae come si può vedere in **Tab. 7**. Per quanto concerne l'ulvano le percentuali trovate da 1,5 all'11% dw sono sovrapponibili con i valori più bassi dell'intervallo riportato da [Lahaye et Robic \(2007\)](#) compreso tra l'8% e il 29% per diverse specie e tecniche di estrazione.

Le produzioni di agar da *Gracilaria* in vasche all'aperto, come riportato in [Edding et al. \(1987\)](#), variavano da 5,5 a 7,2 g dw m⁻² anno, con biomasse stanziali di 1 e 2 kg fw m⁻² (e tenori di agar desolfurato del 25%), equivalenti a una produttività di agar nativo di 500-660 g dw m⁻² anno⁻¹. La produzione di agar invece stimata da [Mclachlan et Bird \(1986\)](#) per *G. verrucosa* in campo variava da 2 a 6,6 g dw m⁻² giorno⁻¹ con percentuali comprese tra il 21 e il 24%, corrispondenti a una produzione di 150-580 g dw m⁻² anno⁻¹.

Questi valori si collocano entrambi nella parte inferiore dell'intervallo di produzione di agar nativo ottenuto dalle differenti Gracilariaceae nel presente studio, variabili tra 390 e 1300 g dw m⁻² anno⁻¹. Queste elevate produzioni di agar sono state raggiunte grazie alle alte produzioni in biomassa di *G. longissima* e *G. vermiculophylla* nella stazione delle TR.

I carboidrati totali hanno rivelato una notevole variabilità stagionale con tenori medi di carboidrati del 58% (in un intervallo tra il 36% e l'83%) nelle Gracilariaceae e del 46% (in un intervallo tra il 27% e il 76%) in *U. rigida*. Il contenuto di carboidrati riportato in letteratura ([Sfriso et al., 1994](#); [Jayasankar et Kulandaivelu, 1999](#); [Chakraborty et Santra, 2008](#)) varia tra il 35% e il 50% nelle alghe rosse e tra il 27% e il 39% in *U. rigida*. Questi valori sono confrontabili per media, benché in questa indagine siano stati rinvenuti durante l'anno anche valori estremi molto più alti.

Per quanto riguarda il contenuto in proteine, [Sfriso et al. \(1994\)](#) riportano concentrazioni del 16-25% nelle Gracilariaceae e del 10-22% in *Ulva*. Nel nostro caso, i valori percentuali ritrovati nelle Gracilariaceae, variabili tra l'1 e il 30%, comprendono il range precedente, mentre quelli ottenuti per *Ulva*, con un tenore di proteine di 1,3-15%, sono risultati inferiori. La differenza riscontrata in *Ulva* è, molto probabilmente, da attribuire alla differenza dei campioni analizzati da [Sfriso et al. \(1994\)](#) che hanno distinto i talli giovani (di pochi giorni, massimo una settimana) sottili, di color verde chiaro a rapido accrescimento con un basso tenore proteico tra il 10 e il 15% (paragonabile a quello misurato in campo in questo

studio) dai talli più vecchi (20-30 giorni) grossi, di color verde scuro a crescita molto bassa o nulla con un tenore proteico più alto (16-22%).

L'integrazione delle macroalghe nella dieta umana ed animale ha già mostrato riscontri positivi per l'alto contenuto di proteine e la ricchezza di amminoacidi essenziali, che, ad esempio in alcune Gracilariaceae, è paragonabile a quello delle uova di gallina (Norziah et Ching, 2000; Makkar et al., 2016). L'utilizzo delle alghe come foraggio è già stato oggetto di studio e ha dato riscontri positivi sui ruminanti (Hansen et al., 2003), mentre un recente report della FAO sottolinea come le "performance" dei pesci allevati/nutriti con diete a base del 10 - 20% di alghe abbiano dato gli stessi risultati dei mangimi commerciali. Un buon mangime commerciale provvede per un apporto proteico solitamente intorno al 40%, ma poiché si è visto che l'utilizzo delle alghe in percentuale tra il 10 e il 20% apporterebbe appena tra lo 0,7% e il 3% di proteine, presumibilmente i risultati riportati non sono legati all'apporto di proteine, quanto forse a quello dei sali minerali e delle fibre. Tuttavia, la frazione delle fibre e dei polisaccaridi solubili presenti nelle biomasse algali sembra comprometterne l'assimilabilità. Si è visto anche che incrementi superiori al 20% di biomassa algale nei mangimi per pesci portano a una progressiva diminuzione della crescita del pesce, a causa dell'alto numero di carboidrati complessi non digeribili presenti (Hasan et Chakrabarti, 2009). A tal fine, l'utilizzo di enzimi per l'idrolisi della cellulosa delle pareti cellulari e soprattutto degli idrocolloidi è già stato sperimentato con successo, incrementando di 3 volte in *G. verrucosa* l'estrazione delle proteine in condizioni non denaturanti (senza trattamento con NaOH a caldo) e favorendone quindi la digeribilità e l'assimilabilità (Fleurence et al., 1995; Marrion et al., 2005). Nel caso dell'utilizzo del residuo di estrazione dell'agar/ulvano la frazione proteica incrementa fino al 20-40% dw dopo l'estrazione dei polisaccaridi, a discapito degli idrocolloidi, che ne avrebbero ridotto la digeribilità. Anche la cellulosa incrementa percentualmente nel residuo, ma a seguito della bollitura per l'estrazione degli idrocolloidi, non si presenta più come un ostacolo per l'accesso alla frazione proteica degli enzimi digestivi. Ulteriori sperimentazioni in questo senso devono ancora essere sviluppate ma sarebbero un notevole passo avanti dal punto di vista della sostenibilità, dal momento che le alternative sono farine animali e soia, che hanno rese di crescita nettamente inferiori e richiedono un notevole utilizzo di acqua dolce e di suolo.

Di recente, la ricerca ha svelato numerose applicazioni per l'utilizzo di ulvano e agar solforato allo stato nativo. Questi prodotti presentano implicazioni commerciali e biotecnologiche che solo recentemente cominciano ad essere riconosciute, anche se il loro valore aggiunto non è facilmente quantificabile. I polisaccaridi solforati possiedono numerose attività farmacologiche; per l'ulvano sono riportate attività: antiossidanti (Qi et

al., 2005), anticoagulanti (Radhouani et al., 2014; Govindan et al., 2012), antiinfiammatorie, immunostimolatorie (Patel, 2012), antiperlipidemiche (Chiellini et Morelli, 2011), immunomodulanti, oltre che la capacità di abbassamento del colesterolo HDL nei topi (Lahaye et Robic, 2007). Per quanto riguarda l'agar solforato, sono riportate attività antiossidanti, antivirali (Patel, 2012; Francavilla, 2013), antitumorali (Fan et al., 2012) e antiinfiammatorie (Co et al, 2012). L'interesse e l'utilizzo di polisaccaridi solforati per la cosmetica, sotto le spoglie di mucopolisaccaridi, e in farmacopea come additivo e per la "drug delivery" (Dragar et al., 2013; Cunha et Grenha, 2016) è in costante aumento. La produzione quindi, non solo di polisaccaridi per uso alimentare-industriale come gelificanti, ma anche allo stato nativo come prodotto farmaceutico e cosmetico, potrebbe ulteriormente qualificare i processi di raccolta e di conversione delle biomasse algali.

7.5 Conclusioni

Nell'ottica di una produzione di polisaccaridi da macroalghe, è necessario identificare il periodo più idoneo alla raccolta, un fattore che condiziona sia il contenuto in polisaccaride sia la produzione algale. Sebbene la composizione biochimica delle macroalghe sia un parametro importante per comprenderne i possibili utilizzi, questa non è da sola un parametro affidabile per la determinazione del periodo migliore per la raccolta della biomassa. Produzione e composizione devono essere valutate assieme. In Laguna di Venezia, marzo e aprile si rivelano essere i mesi ottimali per la raccolta delle Gracilariaceae, con temperature comprese tra 13°C e 18°C. *Gracilariopsis longissima* mostra anche un secondo picco di produzione estivo, tra 25 e 26°C in corrispondenza con le produzioni di *U. rigida*. Benché *G. longissima* sia risultata la specie più produttiva, *G. vermiculophylla* ha dimostrato eccellenti capacità di crescita anche in acque torbide, malgrado i tenori inferiori di agar.

Per quanto riguarda i composti biochimici, le proteine presentano il loro picco in tutte le specie in pieno inverno, tra dicembre e gennaio, raggiungendo percentuali del 30% in *G. gracilis*. L'estrazione di idrocolloidi nei mesi immediatamente successivi, che sono i più produttivi per le alghe, può portare ad un incremento della frazione proteica che può arricchirsi fino al 20-40% divenendo un'ottima candidata per la produzione di mangimi, incrementando la sostenibilità dell'intero processo.



Ficobiliproteine: estrazione, quantificazione e caratterizzazione

8. FICOBILIPROTEINE: ESTRAZIONE, QUANTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE

8.1 Introduzione

Nelle Rhodophyceae, tra le proteine totali, sono comprese anche le ficobiliproteine. Queste sono proteine fotosensibili, toroidali, coinvolte in un'efficiente catena di trasferimento di energia nel sistema antenna di piante, alghe e cianobatteri convogliano l'energia della radiazione luminosa verso il foto-sistema dove risiede la clorofilla- α . Questa famiglia di fluorofori è suddivisa in tre gruppi (**Fig. 31**) con differenti spettri di assorbimento e pesi molecolari (*Kao et al.*, 1971; *Glazer et Fang*, 1973; *Kawsar et al.*, 2011): ficoeritrina (PE, λ_{\max} = 565, M.W.= 240kD), ficocianina (PC, λ_{\max} = 620, M.W.= 30kD) e alloficocianina (APC, λ_{\max} = 650, M.W.= 105kD).

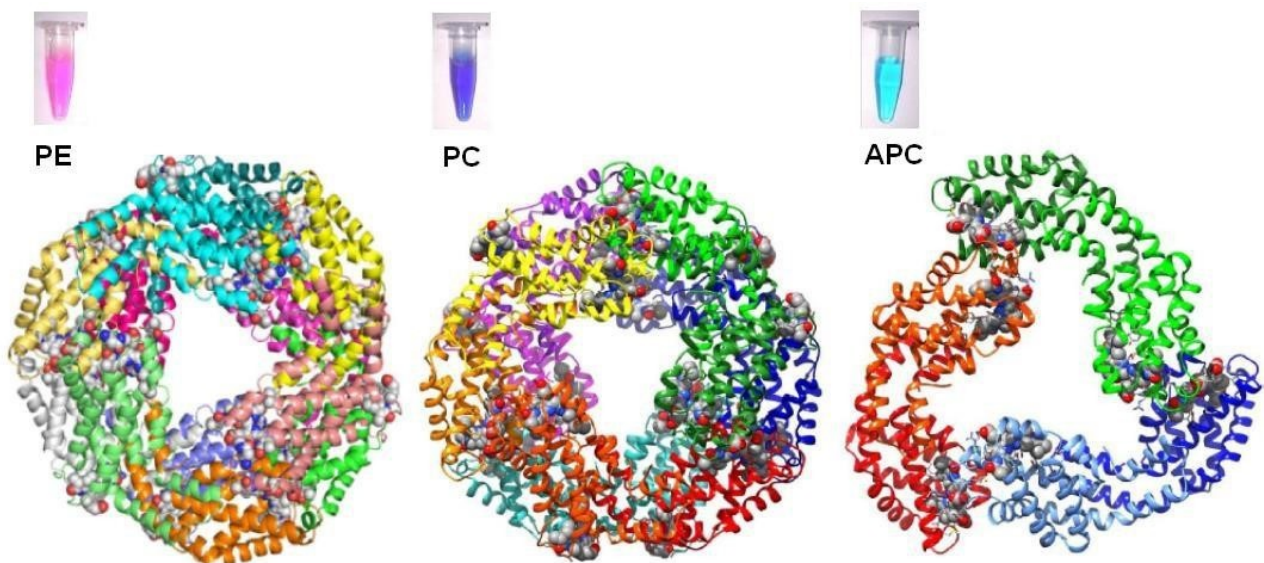


Fig. 31: Struttura tridimensionale e colorazione delle tre proteine (PE, PC e APC) alla luce visibile. Tratto da *Sonani et al.* (2016)

L'interesse scientifico per i fitopigmenti è così ampio che un'indagine sul motore di ricerca Europeo per i brevetti "Espacenet" (<https://worldwide.espacenet.com>) per "phycoerythrin*; phycocyanin*; allophycocyanin*" ha rivelato un incremento esponenziale negli ultimi anni nel rilascio di brevetti concernenti le ficobiliproteine: in totale, 215 brevetti sono stati rilasciati tra il 1980 e il 2016, la maggior parte dei quali (più del 70%) sono stati rilasciati negli ultimi 10 anni. Di questi il 40% circa riguarda l'estrazione e la purificazione di queste proteine dalle alghe e dai cianobatteri, mentre il rimanente 60% è inerente ad applicazioni per la cosmetica e la cura personale. La PE specialmente è ampiamente utilizzata per

applicazioni biotecnologiche, come colorante non tossico negli alimenti, in cosmetica e in numerose tecniche fluorimetriche di microscopia, “cell sorting” e citometria a flusso (Sonani *et al.*, 2014). Questa ficobiliproteina svolge, inoltre, un importante ruolo in tecniche immunostologiche e di “crosslink” con altre proteine, formando complessi fluorescenti (Oi *et al.*, 1982). La PE e la PC sono utilizzate nella terapia fotodinamica del tumore, come sostanze fotosensibilizzanti per il trattamento di tumori solidi (Pan *et al.*, 2013;).

L'estrazione e la purificazione delle ficobiliproteine da macroalghe è un'operazione complessa a causa degli abbondanti polisaccaridi algali che trattengono queste proteine fotosensibili. Le macroalghe sono solitamente resistenti ai trattamenti chimico-fisici e le ficobiliproteine risentono fortemente dell'effetto di numerose sostanze, solventi, variazioni di pH e di temperatura, che portano a una loro rapida degradazione con conseguente perdita di fluorescenza (Liu *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2014). Numerose tecniche innovative sono state sviluppate per l'estrazione di queste proteine, prima della successiva quantificazione e purificazione o della quantificazione, mediante: digestioni enzimatiche (Dumay *et al.*, 2013), estrazione con ultrasuoni (Benavides *et Palomares*, 2006) o tecniche di cavitazione con azoto, con efficienze di estrazione che raggiungono l'85% (Viskari *et al.*, 2003). La quantificazione può essere effettuata direttamente sugli estratti per via spettrofotometrica o fluorimetrica. Le tecniche spettrofotometriche per la stima di ficobiliproteine fanno uso di equazioni che comprendono letture a lunghezze d'onda multiple e numerosi coefficienti di estinzione molare (Rowan, 1989). Questi coefficienti possono essere specie specifici e talvolta sottostimano il reale contenuto di ficoeritrina. L'analisi spettrofluorimetrica invece si dimostra una tecnica molto più sensibile e affidabile in grado di separare efficacemente i segnali dei tre fluorofori (Sasim *et al.* 2014). La purificazione richiede l'utilizzo di complesse procedure come la precipitazione in ammonio solfato, la cromatografia a scambio ionico, membrane da dialisi e filtrazione su gel per ottenere composti di grado chimico-farmaceutico (Bermejo *et al.*, 2003).

Gran parte della letteratura presente sull'estrazione e purificazione delle ficobiliproteine riguarda microalghe, cianobatteri e talune specie di macroalghe sessili; tuttavia, poche ricerche riguardano il contenuto in ficobiliproteine in alghe flottanti, che sono anche quelle a più rapida crescita (Francavilla *et al.*, 2013). L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di estrarre il maggior quantitativo di ficoeritrina nel modo più rapido e selettivo possibile e di caratterizzarne i diversi tipi, per vedere se ci sono differenze qualitative tra diverse specie di Rhodophyceae.

8.2 Materiali e metodi

Estrazione

Le alghe sono state campionate in laguna di Venezia in inverno (gennaio 2016) durante il picco di più alta produzione di ficobiliproteine (Francavilla *et al.*, 2013; Ismail *et Osman*, 2016). Le alghe raccolte sono state le seguenti: *Agardhiella subulata*, *Gracilariopsis longissima*, *Gracilaria vermiculophylla*, *Polysiphonia morrowii* e *Pyropia elongata*. I talli algali sono stati acclimatati per 24h a 17°C. Successivamente, sono stati asciugati delicatamente con carta assorbente e sminuzzati, quindi omogeneizzati con un vetrino da orologio su una piastra Petri. Un'aliquota di 50 mg è stata omogeneizzata ulteriormente con 30 mg di "silica beads" (microsfere di silicio del diametro 0,1mm) su un mortaio di agata come riportato in Wiley *et Neefus* (2007). L'estrazione di questa aliquota omogeneizzata è avvenuta con diverse soluzioni a differenti intervalli di pH, nell'intervallo da pH5 a pH9, in seguito a un ciclo di congelamento-disgelo seguito da estrazione per una notte a 4°C. Le soluzioni testate per l'estrazione di PE, PC e APC sono: acqua bidistillata (Milli-Q), tampone fosfato (PB) a differenti concentrazioni (0,1; 1; 10 e 100 mM pH7,0) e sodio etilendiamminotetraacetato (EDTA) a differenti concentrazioni (0,1; 1; 10 e 100 mM).

Quantificazione

Le tre ficobiliproteine PE, PC e APC sono state fornite da Sigma-Aldrich per la quantificazione e la caratterizzazione molecolare. Gli spettri di fluorescenza per PE, PC e APC sono stati acquisiti con uno spettrofluorimetro (Luminescent Spectrometer Perkin Elmer LS55). Il picco scelto per la determinazione di PE (come suggerito dalla ditta fornitrice) era ad eccitazione/emissione (E_{ex}/E_{em}) di 542/575 nm; a E_{ex}/E_{em} 609/635 nm per la determinazione della PC e a E_{ex}/E_{em} di 650/660 nm per la determinazione di APC. Tutte le analisi chimiche sono state effettuate almeno in triplicato e ripetute fino al contenimento del coefficiente di variazione entro il 5%. L'efficienza di estrazione, quivi stimata per la sola PE è stata misurata come rapporto di fluorescenza tra la polpa algale omogeneizzata e i rispettivi "pellet" residuali al termine dell'estrazione, oltre che per visualizzazione dei tessuti al microscopio ottico.

Le matrici tridimensionali eccitazione/emissione (EEM) sono state utilizzate per caratterizzare fluorimetricamente i pigmenti e distinguere le differenze a livello molecolare tra le PE estratte dalle macroalghe. Questa tecnica è sensibile anche a piccole modifiche a livello strutturale ed è già stata utilizzata per caratterizzare e distinguere pigmenti organici di colorazione simile (Soltzberg *et al.*, 2012).

Gli spettri sono stati processati con il programma Spekwin 32 (F. Menges “Spekwin32 – optical spectroscopy software”). L’analisi dei dati è stata effettuata con Statistica 10 ed Office Excel 2007. Un dendrogramma a legame singolo è stato calcolato per i profili di eccitazione delle diverse PE estratte da specie diverse nell’intervallo 430-600 nm.

Purificazione

La purificazione della sola PE, che è il pigmento predominante, è stata effettuata in due fasi, a partire dall’estratto “crudo”, mediante: precipitazioni sequenziali in ammonio solfato e cromatografia a scambio ionico. La prima fase è stata eseguita secondo il protocollo di [Cai et al. \(2014\)](#) mediante precipitazione in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 20% per la rimozione della PC, seguita da precipitazione della PE con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%. La PE è stata disciolta in tampone fosfato pH7 (100mM) e sono seguite altre due precipitazioni, una al 10% per la rimozione di proteine contaminanti e una al 40% per la precipitazione della PE purificata. La PE così ottenuta è stata diluita 50 volte e caricata (1,5 ml/min) in una colonna contenente resine a scambio ionico “DEAE Sepharose Fast Flow” (GE Healthcare). Le diverse frazioni proteiche sono state eluite dalla colonna con tamponi in gradiente di pH decrescente e di salinità crescente ([Liu et al., 2005](#); [Sun et al., 2009](#)). La migrazione di PE è stata verificata con una lampada UV. La purezza è stata misurata spettrofotometricamente misurando il rapporto di assorbanza a 565/280 nm che se superiore $A_{565}/A_{280} \geq 2$ indica il grado di purezza farmaceutico [Cai et al. \(2014\)](#). Una verifica del grado di purezza è stata effettuata anche mediante SDS-PAGE secondo [Laemmli \(1970\)](#).

8.3 Risultati

Estrazione

Le ficobiliproteine sono state estratte da *A. subulata* con differenti soluzioni per determinare le condizioni migliori per un'estrazione completa della ficoeritrina, che è il pigmento più abbondante, da applicare successivamente a tutti i campioni. L'efficienza di estrazione è incrementata per molarità decrescenti delle soluzioni estraenti. Una soluzione di 1mM EDTA permette in 24 h di estrarre le concentrazioni di PE più alte ($2,26 \text{ mg L}^{-1}$) come si può vedere in **Fig. 32**. Tempi di estrazione maggiori con questa soluzione non portano ad ulteriori incrementi di PE.

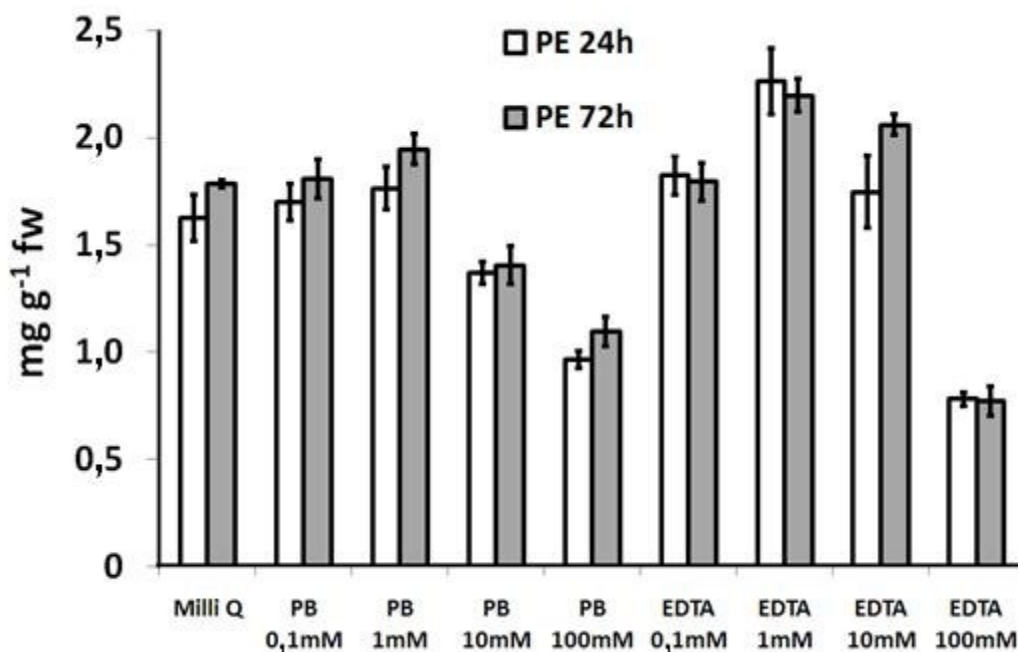


Fig. 32: Estrazione di PE da *A. subulata* dopo 24 ore e 72 h con PB a pH 7 ed EDTA (non tamponato) a differenti concentrazioni (0,1; 1; 10 e 100 mM).

L'efficienza di estrazione è stata valutata anche come smorzamento (quenching) di fluorescenza misurando la fluorescenza prima e dopo l'estrazione della PE, sulla polpa algale e sul pellet residuo rispettivamente. L'emissione di fluorescenza, dopo l'estrazione con l'EDTA e con il PB a pH7, è passata da 1940 ± 95 RFU (Relative Fluorescence Unit) a $39 \pm 1,9$ RFU e $79.8 \pm 3,5$ RFU, rispettivamente, corrispondenti ad un'efficienza del 95% e del 98%. Questo è stato verificato anche al microscopio ottico su campioni di *P. elongata* le cui foto sono riportate in **Figg. 33a, 33b**.

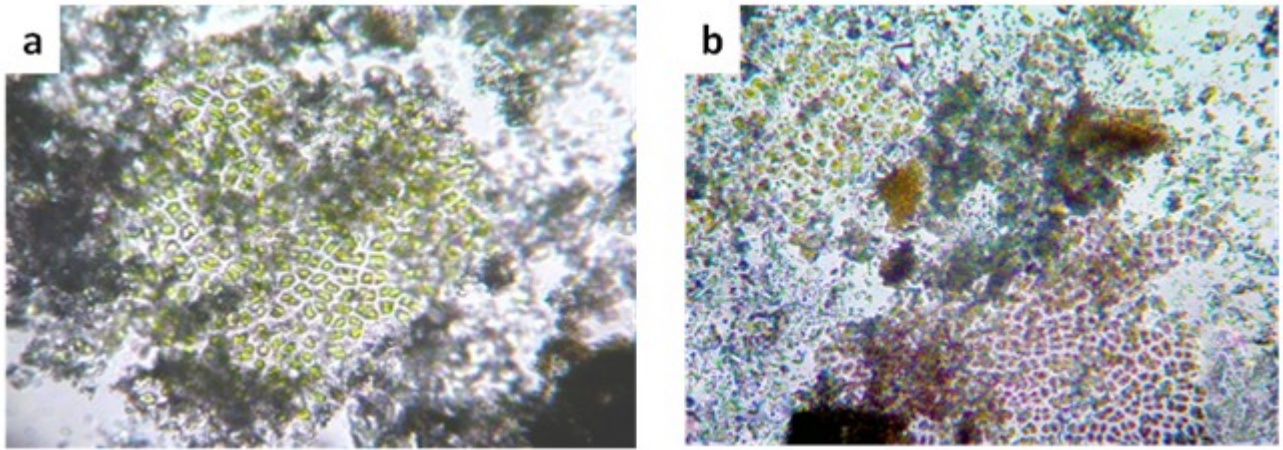


Fig. 33: Tallo di *P. elongata* estratto con a)EDTA 1mM e con b)PB pH7 a 200x e 100x rispettivamente

L'efficacia nell'estrazione di PE, PC e APC dalle specie testate è stata valutata con differenti valori di pH. La soluzione di EDTA non tamponata (originariamente misurata essere a pH7) è stata misurata nuovamente durante la fase di estrazione rivelando un aumento di pH in tutte le alghe fino a $\text{pH } 9 \pm 0,2$ a causa dei buffer fisiologici algali rilasciati in soluzione. Il boxplot di **Fig.33**, che comprende i valori di PE, PC e APC ottenuti da tutte le specie testate a diversi pH, rivela per mezzo di un T-test (T-test:d.f.=8, $p=0,33$) che non ci sono differenze significative tra l'estrazione con tampone PB a pH9 (media: $1,23 \text{ mg g}^{-1} \text{ fw}$, $\text{SD}=0,55 \text{ mg g}^{-1} \text{ fw}$) ed EDTA a pH9 per la PE. Tuttavia ci sono differenze nel contenuto di PC e APC tra tutte le soluzioni utilizzate. La soluzione di EDTA 1mM (a pH 9) permette di estrarre selettivamente solo la PE. Per quanto riguarda PC e APC queste ficobiliproteine sono meglio estratte da PB a pH 6-7. Un test di smorzamento della fluorescenza a 5 minuti è stato effettuato diluendo e misurando gli standard con le soluzioni estraenti, per verificare se le differenze nelle concentrazioni delle diverse ficobiliproteine non fossero dovute a uno smorzamento selettivo della fluorescenza delle proteine, tuttavia non sono stati misurati significativi abbattimenti della fluorescenza per PE, PC e APC nell'intervallo da pH 5 a pH 9 né a causa delle soluzioni di EDTA.

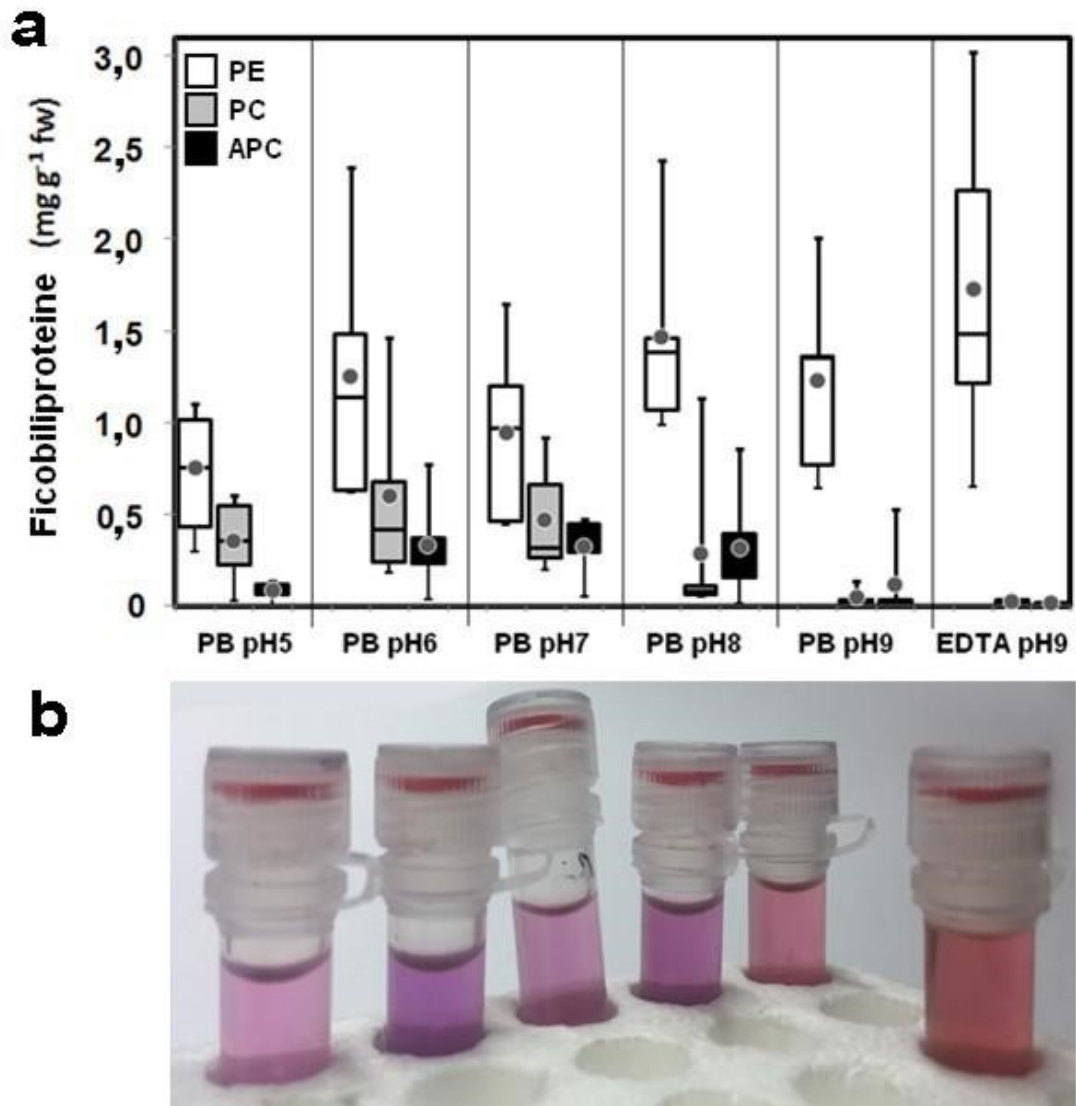


Fig. 34: a) Boxplot che rappresenta, PE(box bianchi), PC (box grigi), e APC (box neri) da tutte le specie estratte con pH e soluzioni differenti. Il diagramma mostra i quartili e le medie (punto grigio). b) eppendorf con gli estratti a pH crescente.

Purificazione della PE

Gli estratti algali grezzi, filtrati e centrifugati, mostravano un grado di purezza $A_{565}/A_{280} \approx 0,5$. In seguito ai passaggi di precipitazione in ammonio solfato il grado di purezza A_{565}/A_{280} oscillava tra 0,7 e 1 ancora distante dal grado di purezza farmaceutico.

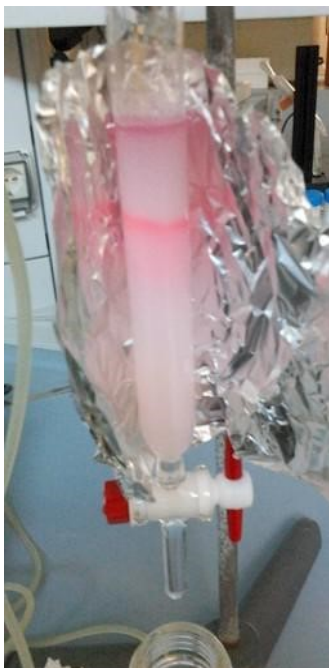


Fig. 35: Separazione della PE in colonna

Per ottenere un grado di purezza più elevato la ficoeritrina è stata caricata e purificata su una colonna "DEAE Sepharose Fast Flow" eluendo varie frazioni proteiche contaminanti e recuperando la PE alla fine con una soluzione salina (200mM NaCl) che saturasse la colonna (**Fig. 35**). Le purezze così ottenute oscillavano nell'intervallo $3,1 \leq A_{565}/A_{280} \leq 4,0$. Il grado di purezza ottenuto è paragonabile a quello dello standard di Sigma-Aldrich $A_{565}/A_{280} > 4,6$ come è possibile vedere anche dall' SDS-PAGE di **Fig. 36** che confronta la PE purificata in colonna, quella solo precipitata in ammonio solfato e lo standard commerciale di Sigma-Aldrich. Le due PE più pure mostrano una chiara banda intorno ai 21 kDa, caratteristica della ficoeritrina e una bassa contaminazione dovuta alla presenza di altre proteine.

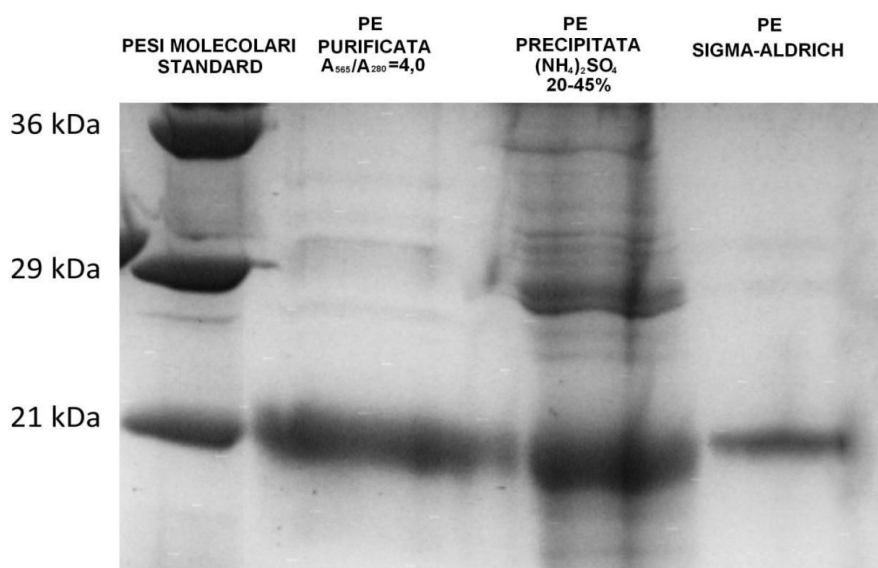


Fig. 36: SDS-PAGE in cui sono visibili: lo standard molecolare, la PE purificata in colonna, la PE solo precipitata in (NH₄)₂SO₄ e la PE commerciale della Sigma-Aldrich.

Spettroscopia EEM 3D

Gli spettri tridimensionali (3D) spettro fluorimetrici di emissione ed eccitazione (EEM) di PE, PC e APC mostrano i profili come impronte caratteristiche della molecola e sono stati usati per differenziare i diversi tipi di PE.

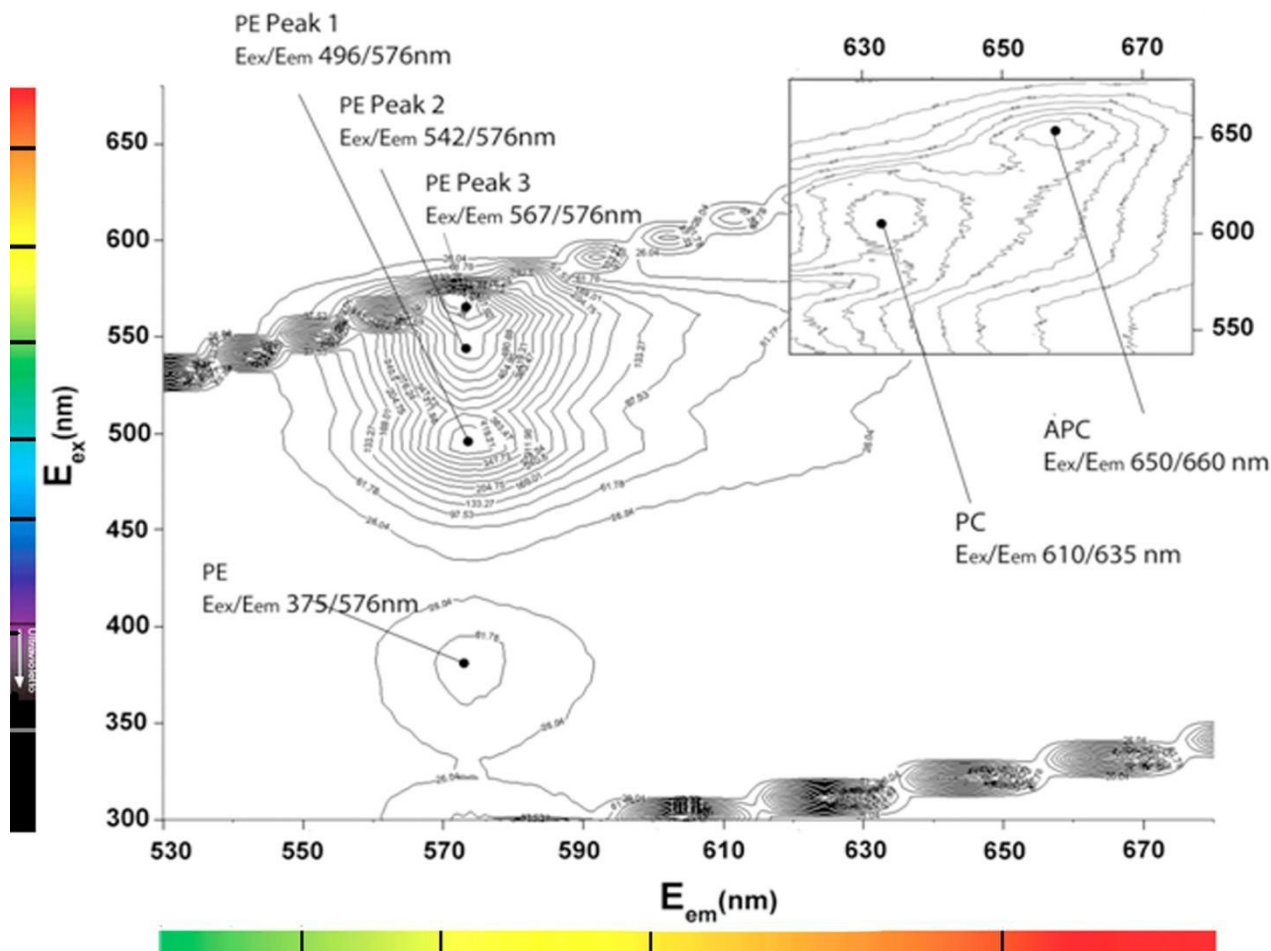


Fig. 37: Spettri EEM delle ficobiliproteine da *P. elongata*; mappa 3-D della PE con “cut-off” a 700 RFU. Nel dettaglio: mappa 3-D di PC e APC con “cut-off” a 250 RFU. La PE è stata estratta con 1 mM EDTA a pH 9 e la PC e APC con 1 mM PB a pH 7.

In **Fig.37** lo spettro 3D della PE è rappresentato per mezzo di una mappa di gradiente (con linee di isofluorescenza). Questa impronta fluorimetrica appartiene a *P. elongata* (più nota con il nome comune di Nori) che è anche la specie da cui il fornitore dello standard di PE dichiara di aver estratto il pigmento. Questa impronta fluorimetrica (corrispondente a una concentrazione di $4 \mu\text{g mL}^{-1}$) ha un emissione fissa a $E_{em}=575$ nm, ma con con diversi picchi di eccitazione. Un primo picco di eccitazione poco pronunciato è a $E_{ex}=375$ nm e altri

tre picchi di eccitazione nel visibile: il primo a $E_{ex}=496\text{nm}$, il secondo a $E_{ex}=542\text{ nm}$ (utilizzato per la quantificazione della PE) e un terzo a $E_{ex}=567\text{ nm}$ in prossimità delle linee di “scattering” di Rayleigh-Tyndall’s e quindi meno affidabile.

La maggior parte dell’impronta fluorimetrica di fluorescenza della PE è compresa tra E_{ex} 450-550 nm ed E_{em} 550-650nm mentre PC mostra un picco a $E_{ex}/E_{em}=609-635\text{ nm}$ e APC a E_{ex}/E_{em} 650/660nm. La fluorescenza specifica molare della ficoeritrina è superiore a quella della PC e dell’APC. I profili di eccitazione della PE commerciale, fornita da Sigma-Aldrich, e delle PE estratte dalle specie raccolte in Laguna di Venezia, sono stati raffigurati per un confronto in **Fig.38**. Tra i profili spicca per diversità quello di *P. morrowii* che mostra uno slittamento verso il blu del primo picco del visibile. Come atteso invece, *P. elongata* ha mostrato il più alto grado di similarità con la PE commerciale, come può essere visto anche dal dendrogramma a legame singolo calcolato con i dati dei profili di eccitazione (**Fig.39**). *Gracilaria vermiculophylla* e *G. longissima* sono appaiate, mentre *A. subulata* e *P. morrowii* mostrano la distanza euclidea maggiore dalla PE commerciale.

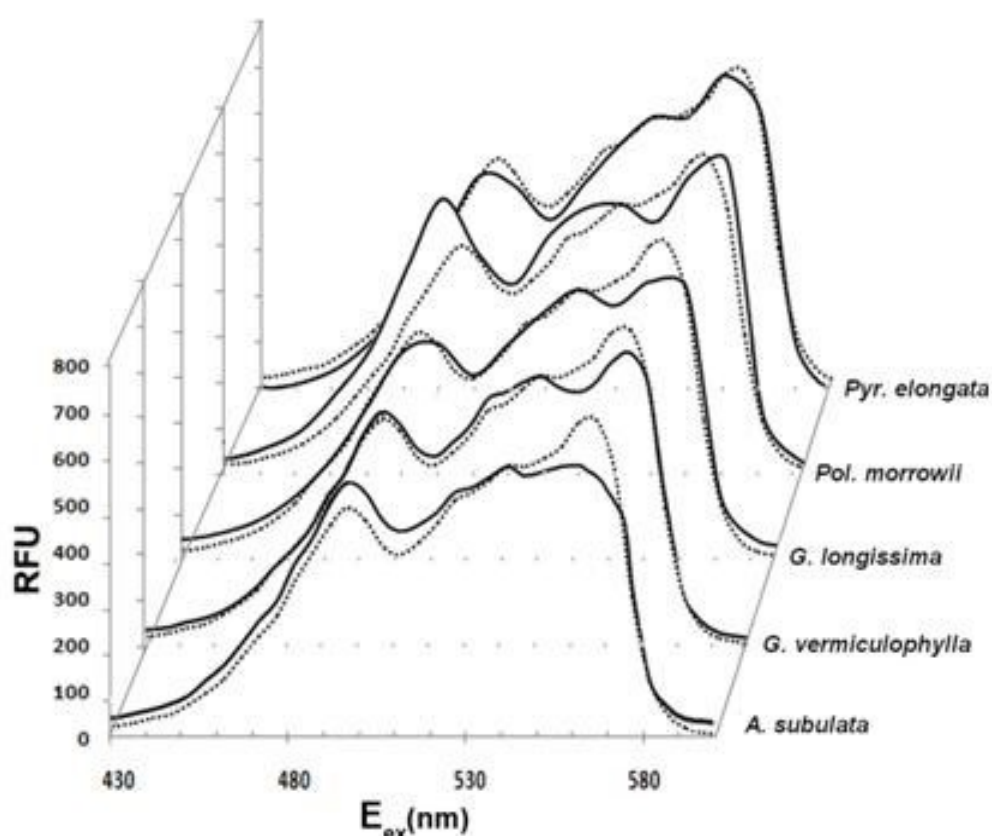


Fig. 39: Profili di eccitazione della PE (4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) estratti dalle cinque specie raccolte in Laguna di Venezia (linea continua) a confronto con la PE commerciale (linea punteggiata).

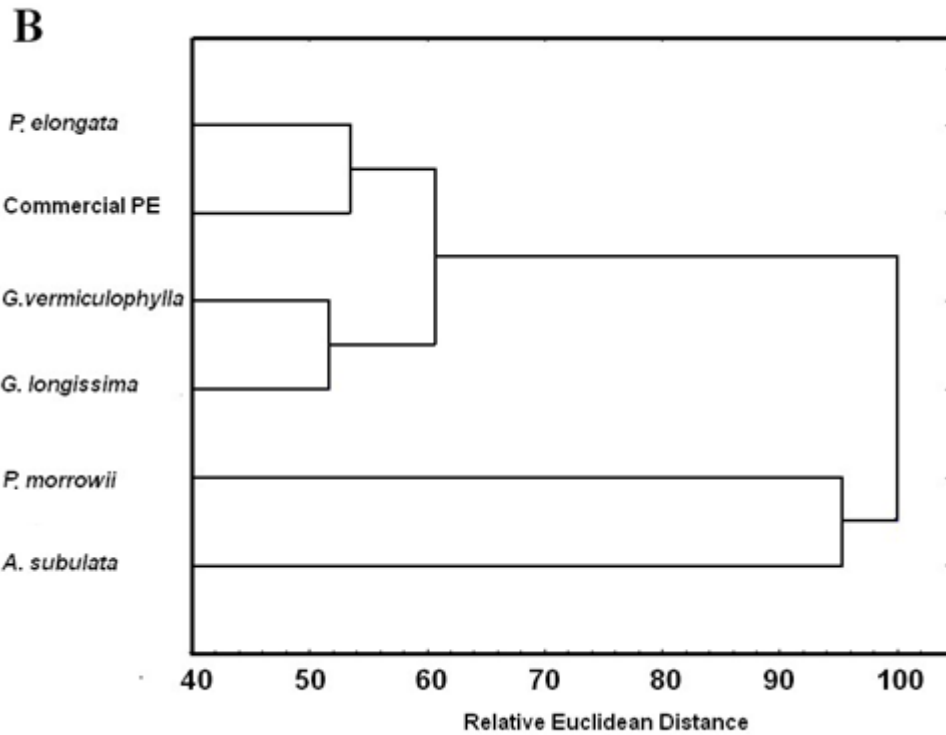


Fig. 39: Dendrogramma a legame singolo degli spettri di eccitazione della PE nell'intervallo 430-600nm.

Ficobiliprotine nelle alghe rosse

Le concentrazioni di PE, PC, APC, trovate con le migliori soluzioni estraenti sono riportate in **Fig. 40**. La maggior quantità di ficobiliproteine è stata trovata in *P. elongata*. Il confronto con *P. morrowii* mostra che quest'ultima non raggiunge nemmeno il 20% della PE e il 12% della PC di *P. elongata*. *Agardhiella subulata* ha mostrato il secondo più alto contenuto di PE ma con bassi valori di PC e APC, simile per proporzione tra i pigmenti a *G. longissima*. *Gracilaria vermiculophylla*, ha mostrato concentrazioni simili di APC, benché presentasse valori di PE e di PC del 43% più bassi rispetto a *P. elongata*.

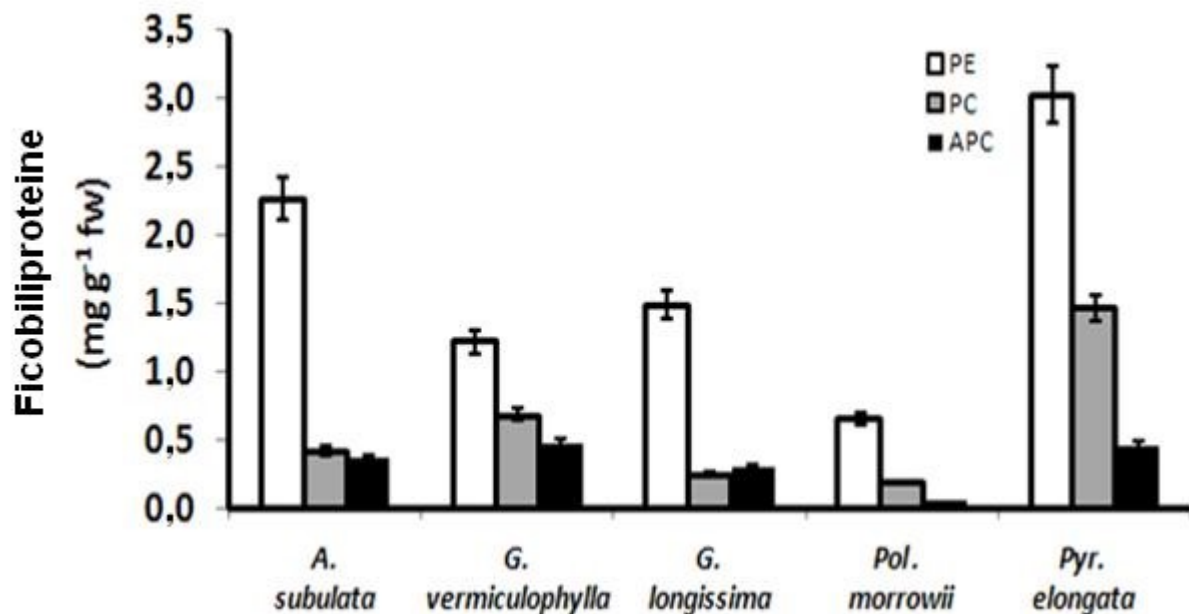


Fig. 40: Contenuto algale di ficobiliproteine nelle cinque specie di alghe rosse raccolte in Laguna di Venezia.

8.4 Discussione

Gli ambienti di transizione dell'alto Adriatico, tra cui lagune ed estuari, sono solitamente caratterizzati da alti carichi di nutrienti e alte torbidità (Sfriso *et al.*, 2017b), inoltre in questi ambienti è già stata registrata e calcolata una notevole crescita di alghe rosse flottanti (Sfriso *et al.*, 1994a; Sfriso *et al.*, 2017a). Le specie sessili come *P. morrowii* e *P. elongata*, benché presenti, rappresentano una minoranza in termini di produzione di biomassa (Sfriso *et al.*, 1994b). Le specie flottanti invece, come le Gracilariaceae finora descritte ed *A. subulata*, sono tra le specie più comuni e a rapido accrescimento. Queste potrebbero essere non solo una pregiata materia prima per l'estrazione di idrocolloidi, ma anche una fonte importante di ficobiliproteine. Il recente interesse sul mercato mondiale per questi pigmenti algali richiede, però, procedure selettive ed efficaci per la loro estrazione e successiva purificazione. Queste tecniche, solitamente, sono procedure complesse che richiedono tempo ed attrezzature non sempre disponibili in laboratorio, tra queste: la "French press", i contenitori per la cavitazione ad azoto, l'azoto liquido o gli enzimi idrolitici (Tab.8). In questo contesto, è stato messo a punto un metodo efficace per l'estrazione selettiva e la quantificazione della PE, la principale ficobiliproteina nelle alghe rosse. Uno dei principali problemi in fase di estrazione e purificazione in ammonio solfato a freddo è la separazione dei pigmenti (solitamente della PE da PC e APC) senza

alterarne le qualità e la fluorescenza. Questo passaggio, che precede e influenza la cromatografia su colonna, può essere evitato utilizzando l'estrazione della PE in EDTA 1mM. Questa soluzione a pH 9 estrae solo la PE e nessun'altra ficobiliproteina in soluzione. Viceversa, volendo estrarre con maggior efficacia PC e APC, è conveniente usare 1mM PB a pH6 e 1mM PB a pH7, rispettivamente.

L'influenza del pH su questa estrazione sembra essere un elemento cruciale, che tuttavia non spiega la scomparsa di PC e APC. La fluorescenza, infatti, non ha mostrato variazioni nei tre pigmenti tra pH 5 e pH 9, indicando che non c'è stata una diminuzione nell'emissione della fluorescenza, né alcuna alterazione visibile in alcuna ficobiliproteina, né l'EDTA sembra aver sortito tali effetti. La spiegazione di questa differenza di estrazione potrebbe risiedere nel diverso punto isoelettrico delle tre proteine. Una cromatografia a cambio ionico su colonna sfrutta, così come descritto da [Liu et al. \(2005\)](#), la differenza dei punti isoelettrici delle proteine per separarle, usando soluzioni eluenti in gradiente di pH. Quando il pH diviene più basso del punto isoelettrico della proteina, questa cambia carica slegandosi dalla fase stazionaria della colonna. Tanto più è distante il valore di pH dell'estraente rispetto al valore di pH del punto isoelettrico, tanto più solubile sarà la proteina. Assumendo che il campione algale si comporti analogamente, come una fase solida, la differenza dei punti isoelettrici di PE, PC e APC, potrebbe facilitare l'estrazione della PE rispetto alle altre due proteine. Il punto isoelettrico della APC estratta dall'alga *Porphyridium cruentum* (S.F. Gray) Nägeli è a pH 5,1 ([Ley et Butler, 1977](#)), per PC si trova nell'intervallo di pH tra 5,2 e 5,6 ([Bryant, 1982](#)) mentre per PE corrisponde a pH 4,7 (notevolmente più basso degli altri due). In una soluzione estraente a pH 9, quindi, il punto isoelettrico della PE è più lontano rispetto a quello di PC e APC e quindi PE risulta essere il pigmento più solubile dei tre. ([Wang et al., 2014](#)). Inoltre [Agarra et al. \(1990\)](#) avevano già suggerito che la PE fosse legata meno fortemente al ficobilosoma, rendendo ulteriormente più facile l'estrazione della PE.

Il metodo di estrazione con 1mM EDTA, per un'estrazione selettiva della PE, è stato verificato per mezzo della microscopia e della fluorimetria solida prima e dopo l'estrazione, mostrando un'efficienza del 95-98%, superiore a quella riportata finora in letteratura: >73% in [Zimba \(2012\)](#) e >85% in [Viskari et al. \(2003\)](#). Lo studio degli spettri di eccitazione della PE da specie differenti ha rivelato delle differenze significative. Il profilo di eccitazione della PE da *P. elongata* era il più simile a quello ottenuto con lo standard commerciale, anche perché appartenenti allo stesso genere. Analogamente le PE delle due Gracilariaceae sono risultate simili. Invece, *A. subulata* e *P. morrowii* hanno mostrato le differenze maggiori. Per *Polysiphonia urceolata* (Lightfoot ex Dillwin) Greville, (stesso genere di *P. morrowii*) sono già state riportate differenze strutturali in letteratura.

Solitamente, la PE è composta da due trimeri con subunità $(\alpha\beta)_3$ unite da un'unità γ ; tuttavia, in *P. urceolata* è presente un gruppo γ addizionale (Wang *et al.*, 2015) che può giustificare delle differenze a livello di fluorescenza. Per la PE di *A. subulata* non vi sono invece studi conformazionali; tuttavia, discostandosi a livello di fluorescenza dalle altre PE, potrebbe essere un'ottima candidata per studi di proteomica.

Benché le differenze qualitative siano importanti, è necessario evidenziare anche come la produzione di questi pigmenti giochi un ruolo fondamentale nella scelta della specie da cui estrarli. Il mercato globale delle ficobiloproteine è stato stimato essere di 50 Mln US\$, con prezzi che variano dai 3US\$ ai 50US\$ al milligrammo (Spolaore *et al.*, 2006; Francavilla *et al.*, 2013). In **Tab. 9** sono riassunte le principali produzioni algali per le specie investigate, presenti in letteratura. Moltiplicando la produzione algale riportata dagli autori citati per il contenuto di PE determinato in questo studio si ottiene la produttività per metro quadro. La maggior parte della ricerca sulle ficobiliproteine è stata finora concentrata su specie sessili come *Polysiphonia* spp. e *Pyropia* spp. Queste però presentano negli ambienti di transizione dell'alto Adriatico basse produzioni di biomassa a confronto con le Gracilariaceae. Tra le specie investigate in questo studio, *Agardhiella subulata* si è rivelata quella con la più alta produzione di biomassa e uno dei più alti contenuti di PE, risultando in una produzione areale di PE superiore a tutte le altre specie. Malgrado ciò, qualora dovesse essere coltivata, non è comunque la specie più indicata perché si distacca dai fondali in estate, abbandonando le aree di coltivazione se queste non sono confinate. Le Gracilariacee, invece, pur raggiungendo produzioni di PE più basse, con tassi di crescita comparabili a quelli di *A. subulata*, sono specie più stazionarie e meglio si prestano alla coltivazione in vasche e aree confinate.

Infine, è importante sottolineare che l'estrazione dei fitopigmenti così descritta non interferisce con la successiva estrazione di polisaccaridi solubili, quali agar e carragenina (Toffanin *et al.*, 1997), e che il materiale residuale può essere utilizzato come mangime in acquacoltura, per il recupero dei suoli contaminati o per la produzione di carburanti in seguito a pirolisi (Vilar *et al.* 2005; Sfriso *et al.*, 2016; Vilar *et al.*, 2005; Vilar *et al.* 2006; Francavilla *et al.*, 2015).

8.5 Conclusioni

Questa indagine ha portato allo sviluppo di un metodo innovativo per l'estrazione selettiva della ficoeritrina dalle alghe rosse mediante l'utilizzo di EDTA 1mM. E' stato inoltre evidenziato il ruolo del pH sull'estrazione di PC e APC, con maggiori efficienze a pH6 e pH7. A pH9, l'efficienza di estrazione della PC e dell'APC sono drasticamente ridotte, viceversa è un pH ottimale per l'estrazione della PE.

Il confronto tra i profili di fluorescenza ha evidenziato differenze qualitative tra le PE di specie diverse, più marcate in *A. subulata* e *P. morrowii*, a confronto con la PE commerciale.

Il contenuto di PE nelle specie flottanti (Gracilariaceae e *A. subulata*) è risultato comparabile con quello delle specie sessili (*P. morrowii* e *P. elongata*) ma con produzioni di biomassa molto diverse. La produzione di biomassa nelle specie flottanti è da 10 a 100 volte maggiore, risultando in una produttività più alta di PE, la cui estrazione potrebbe essere economicamente rilevante.



**Dati preliminari
di ricerche in corso**



9. DATI PRELIMINARI DI RICERCHE IN CORSO

9.1 Idrolisi e fermentazione delle biomasse

Introduzione

I carboidrati totali in *U. rigida* e nelle già citate Gracilariaceae costituiscono mediamente il 46-58% della biomassa e sono prevalentemente polisaccaridi complessi: agarocolloidi, ulvano, carragenina, cellulosa ed emicellulosa. Non sempre, però, la qualità delle biomasse algali è tale da poter permettere la produzione di idrocolloidi, ficobiliproteine o mangimi, in tal caso è da tenere in considerazione la conversione delle biomasse macroalgali in composti ad uso energetico e industriale come etanolo e 2,3-butandiolo (2,3diolo), biocarburanti di terza generazione, e in altri composti di interesse commerciale e farmaceutico, ad opera di microorganismi (Goh et Lee, 2010). A tal fine, le biomasse possono essere idrolizzate enzimaticamente o chimicamente, e la successiva fermentazione può avvenire ad opera di batteri o lieviti. Per la produzione di etanolo, sono riportate efficienze di saccharificazione da 0,19 a 0,68 g di zucchero per g di biomassa secca e produzioni di etanolo tra 0,08 e 0,41 g EtOH per g di zucchero, a seconda delle specie e delle metodiche utilizzate. Queste quantità corrispondono a un'efficienza media di saccharificazione della biomassa secca del 41% e a una resa della conversione di zuccheri semplici in EtOH del 31%, con una resa media di 12 g di EtOH ogni 100g di biomassa algale secca (Kumar et al., 2013; Kim et al., 2011). Analogamente, in seguito alla saccharificazione, sono state riportate rese medie di 0,38-0,43 g di 2,3diolo+acetoino (precursore del 2,3diolo) per grammo di zucchero, corrispondenti a una resa globale di 17g di 2,3diolo per g di biomassa algale secca (Mazumdar et al., 2013). Come coltura ad uso energetico, le macroalghe sono sicuramente concorrenziali con una delle colture più sfruttate al mondo, la canna da zucchero. Infatti, in questo studio si è visto che la produttività algale è da 1,6 a 5 volte più alta della canna da zucchero, con valori da 1,4 a 5 kg m⁻² dw, anche se le alghe hanno mostrato un contenuto in carboidrati fino al 58% rispetto al 94% della canna (di cui però solo c.a. il 20% sono zuccheri semplici fermentabili) (Tab.6). Al fine di convertire queste biomasse algali in sostanze di pregio, sono stati selezionati dei batteri idrolitici e/o fermentanti dai fondali della Laguna di Venezia.

Materiali e Metodi

Nella fase di selezione dei batteri, sono stati formulati due brodi colturali a base di un "Mineral Medium" + fonte di carbonio. La fonte di carbonio è stata scelta sulla base del processo che si intendeva favorire: l'agar solforato, che è uno dei principali costituenti delle alghe rosse è stato utilizzato per selezionare ceppi che fossero contemporaneamente in grado di idrolizzare gli idrocolloidi algali e di convertirli in "biofuel"; l'idrolizzato acido algale è stato scelto per la selezione di ceppi con caratteristiche fenotipiche tali da resistere alla tossicità del furani, e che fossero in grado di fermentare il marciume delle alghe in putrefazione nel periodo estivo. Infatti, l'idrolizzato acido è derivante dalla conversione chimica dei polisaccaridi in zuccheri semplici mediante digestione acida a caldo, e quindi è presumibile che i ceppi crescano meglio su zuccheri già idrolizzati, poiché non è richiesto consumo di energia per l'idrolisi dei polisaccaridi. Tuttavia, da tale reazione si sviluppano composti furanici tossici, che inibiscono la fermentazione (soprattutto nei lieviti): l'idrossimetilfurfurale (HMF), il furano, la furanaldeide e l'acido levulinico ([Hargreaves, 2013](#)).

Campioni di alghe putrescenti sono stati raccolti dall'interfaccia acqua sedimento in Laguna di Venezia, nel mese di luglio, e sono stati coltivati in terreni liquidi addizionati di sali minerali, in condizioni di anaerobiosi, all'interno di flaconi di vetro da 100ml. La selezione dei ceppi è avvenuta in questi flaconi per mezzo di tre passaggi, trasferendo un'aliquota del terreno colonizzato in nuovi flaconi a distanza di 7 giorni tra un passaggio e il successivo. La selezione delle colonie batteriche è seguita su fiaschette con terreno agarizzato (medium+1,5% agar) sotto flusso di azoto per mezzo di tre passaggi di selezione a distanza di 24h. Una volta accertato al microscopio il grado di purezza delle colonie queste sono state coltivate su terreno liquido, centrifugate e congelate/conservate a -80 per ulteriori sperimentazioni.

L'agar solforato è stato estratto e purificato da *G. vermiculophylla* secondo [Leija et al. \(2009\)](#) mediante precipitazioni sequenziali in etanolo assoluto a freddo. L'idrolizzato algale è stato preparato per digestione acida di 50 g dw di *G. vermiculophylla* su 1 L di H₂SO₄ 1% per 1 h a 120°C, seguita da neutralizzazione con soda fino a pH 7,5 e filtraggio. Gli zuccheri riducenti sono stati determinati mediante il test di [Benedict \(1908\)](#) adattato per l'analisi spettrofotometrica con lettura della perdita di assorbanza a 735 nm, contro una retta di taratura a base di glucosio. Il furano è stato determinato con il metodo spettrofotometrico di [Martinez et al. \(2000\)](#) e l'etanolo secondo la titolazione di [Friedemann et Klaas \(1936\)](#). Gli acidi grassi volatili sono stati analizzati usando un gascromatografo (Carlo Erba instruments, Wigan, UK) con idrogeno come "gas carrier"

equipaggiato con una colonna di silice fusa capillare (“fused silica capillary column”; Supelco NUKOL_{TM}) e rilevatore a ionizzazione di fiamma a 200°C (Cavinato *et al.*, 2017). I terreni di coltura utilizzati per la selezione dei batteri, sono stati **M1** e **MHy**. Il terreno **M1** è stato realizzato a base di un “mineral medium” + agar solforato come fonte di carbonio con la seguente composizione su Litro:

MgSO₄·7H₂O 1,5g; NH₄Cl 0,8g; NaH₂PO₄·12H₂O 1,68g; KCl 0,10 g; NaCl 15g; NaHCO₃ 2,5g; agar solforato da *Gracilaria* 1g; pH finale 7,5.

Il terreno **MHy** è stato preparato a base di un “mineral medium” + idrolizzato algale come fonte di carbonio con la seguente composizione per Litro:

MgSO₄·7H₂O 1,5g; NH₄Cl 0,8g; NaH₂PO₄·12H₂O 1,68g; KCl 0,10 g; NaHCO₃ 2,5g; idrolizzato algale equivalente a 7g di glucosio; pH finale 7,5.

Risultati preliminari e Discussione

Il primo ceppo selezionato *Ve1* (**Fig. 41**) si è sviluppato in ambiente aerobico come contaminante su terreni colturali ASNIII per cianobatteri (Sfriso *et al.* 2014). La sua straordinaria capacità di idrolizzare l’agar delle piastre Petri lo rendeva il ceppo ideale per la produzione di enzimi idrolitici e per la digestione dei polisaccaridi algali prima della fermentazione.

I ceppi *Ve25* (**Fig. 42**) e *Ve40* (**Fig. 43**) sono due ceppi agarofagi fermentanti, selezionati con terreno colturale M1 con agar solforato come fonte di carbonio a media clorinità (15‰). Benché entrambi i ceppi si prestassero bene alla crescita su solido, solo il *Ve25* ha dimostrato di poter crescere bene anche su terreno liquido.

Il processo di idrolisi e degradazione dell’agar già noto per numerosi ceppi aerobici è tuttora poco studiato in anaerobiosi. L’utilizzo delle agarasi batteriche, gli enzimi che idrolizzano il polisaccaride di agarosio, è al centro dell’attenzione in ambito cosmetico per la produzione di neoagarobiosio (Kobayashi *et al.*, 1997), un disaccaride che ha provato di possedere proprietà paragonabili al glicerolo e all’acido ialuronico nel trattamento della pelle con effetti idratanti e sbiancanti, che potrebbe costituire una frontiera di indagine più redditizia della semplice produzione di alcoli.

Il contenuto di zuccheri riducenti trovato nell’idrolizzato algale è stato di 13 g L⁻¹. Considerando che sono stati idrolizzati 50g di alga, di cui solo il 57% erano carboidrati, si è giunti ad un’efficienza di conversione dei carboidrati in zuccheri del 46%, paragonabile a quella rinvenuta in letteratura. Il contenuto di furani invece è stato misurato essere di 2,1 g L⁻¹. Durante le prime fasi di crescita su terreno liquido si sono sviluppate ingenti quantità di

gas con il caratteristico odore pungente da acido solfidrico, ma in seguito alla selezione su terreno agarizzato è stato isolato solo un ceppo fermentante denominato *VeHyB* (**Fig. 44**) a discapito dei solfato riduttori. Questo ceppo selvatico ha sviluppato ingenti quantità di “gas”, pertanto, la crescita è proseguita in beute con gorgogliatori per favorirne la fuoriuscita.

In **Tab. 10** sono riassunte le informazioni finora raccolte sui ceppi selezionati.

Tra i ceppi selezionati rispettivamente il *VeHyB* e il *Ve25* si prestano entrambi alla crescita su terreni liquidi con quantità moderatamente alte di furani (tra 1 e 2 g L⁻¹) mentre il *Ve1* e il *Ve40* prediligono per la crescita supporti solidi e non tollerano la presenza di furani. La caratterizzazione molecolare dei brodi fermentati è incompleta, tuttavia dati preliminari escludono la produzione di etanolo da questi ceppi, benché gli enzimi coinvolti nell'idrolisi dell'agar e la produzione di altri composti a corta catena debbano ancora essere valutati.

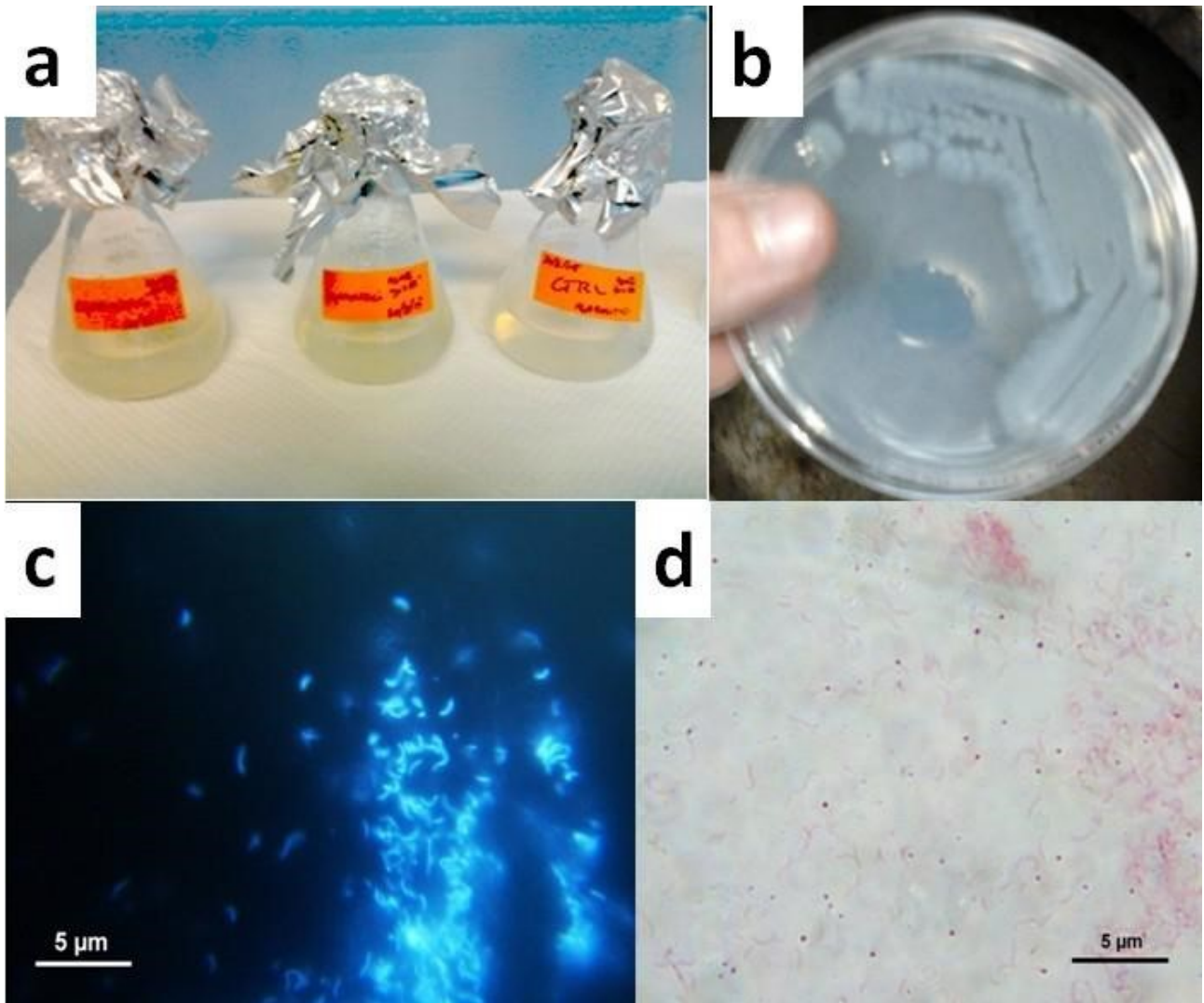


Fig. 41: Ve1 - a) due inoculati e il controllo; b) crescita del ceppo su piastre Petri agarizzate; c) foto con DAPI $5\mu\text{g mL}^{-1}$ in epifluorescenza; d) colorazione di Gram.

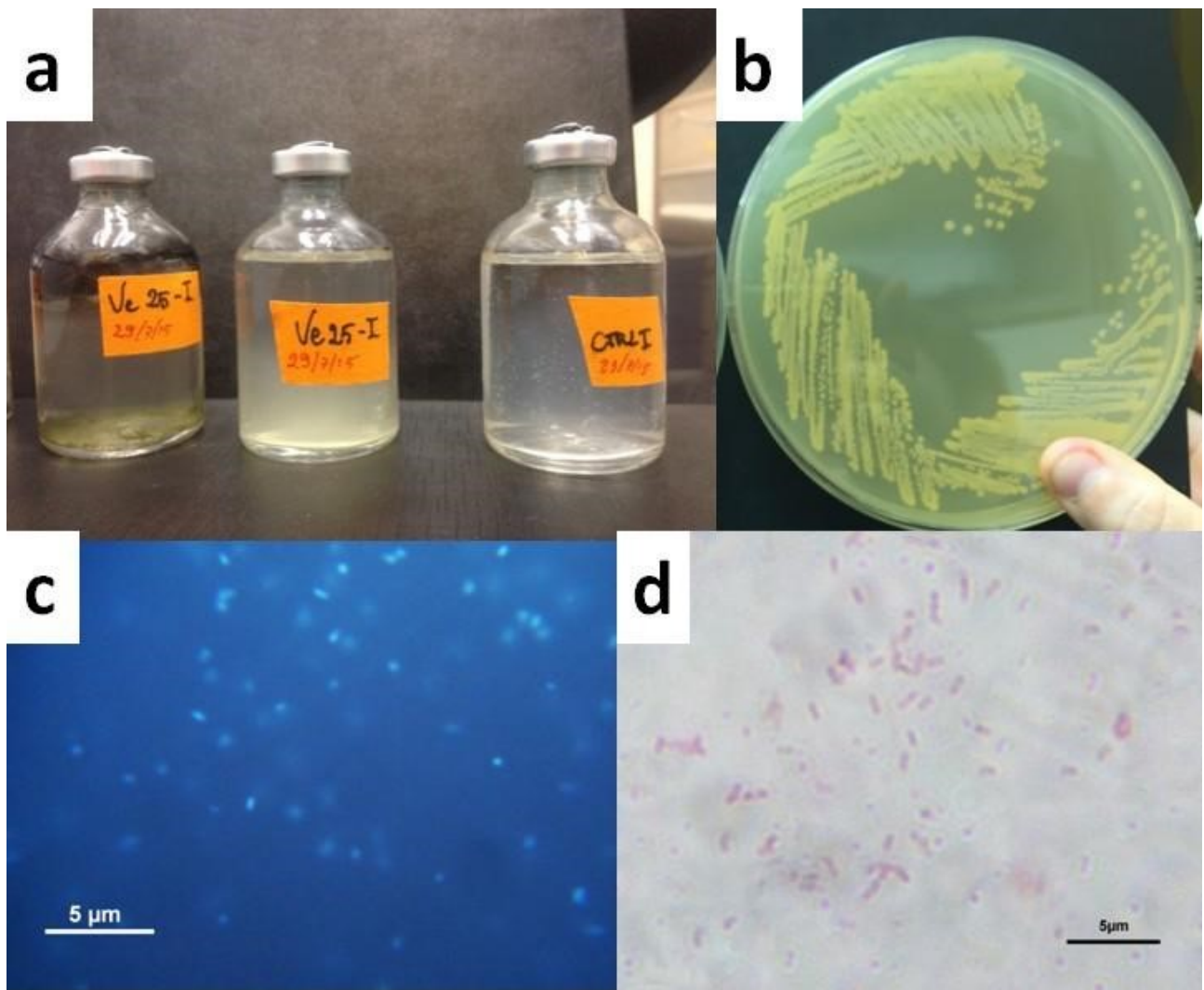


Fig. 42: Ve25 - a) due inoculati e il controllo; b) crescita del ceppo su piastre Petri agarizzate in condizioni di anaerobiosi; c) foto con DAPI $5\mu\text{g mL}^{-1}$ in epifluorescenza; d) colorazione di Gram.

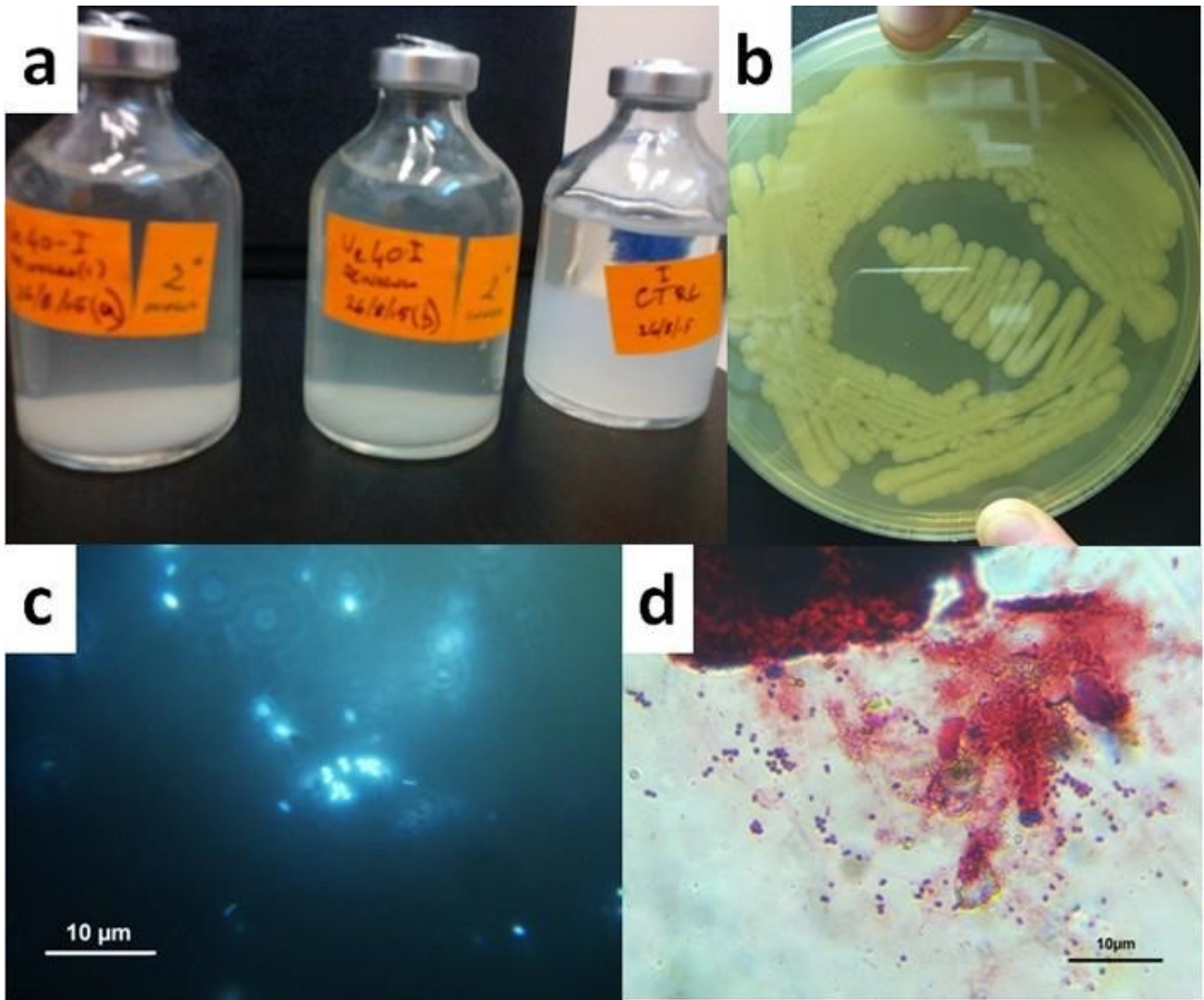


Fig. 43: Ve40 - a) due inoculati e il controllo; b) crescita del ceppo su piastre Petri agarizzate in condizioni di anaerobiosi; c) foto con DAPI $5\mu\text{g mL}^{-1}$ in epifluorescenza; d) colorazione di Gram.

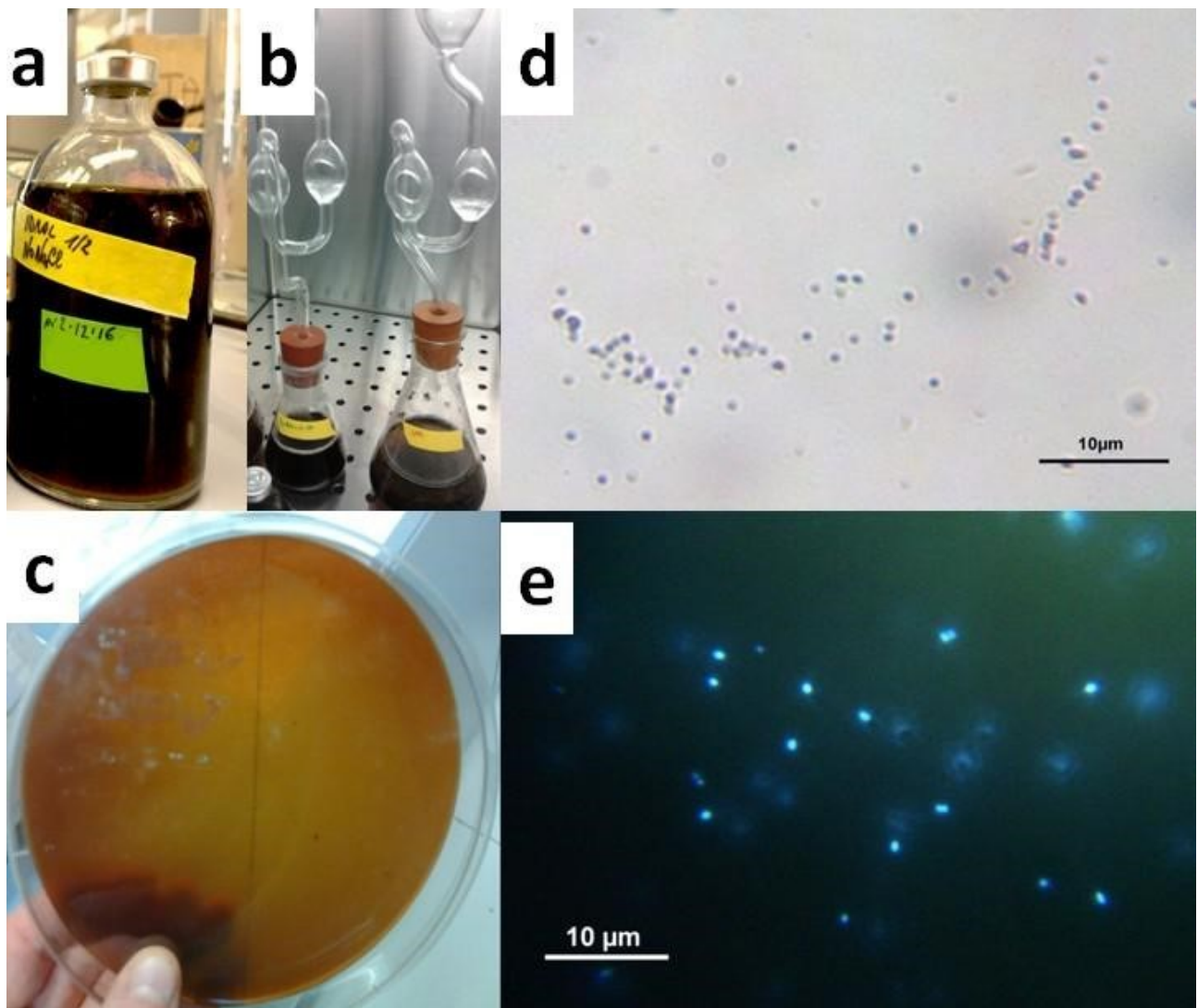


Fig. 44: *VeHyB* - a) inoculato in flacone; b) inoculato e controllo con gorgogliatori; c) crescita del ceppo su piastre Petri agarizzate in condizioni di anaerobiosi; d) colorazione di Gram; e) foto con DAPI $5\mu\text{g mL}^{-1}$ in epifluorescenza.

9.2 Resine ad affinità per “Polyhistidina-tag”

Introduzione

Le “polyhistidina-tags” o code di istidina consistono in almeno sei residui di istidina sull’azoto o sul carbonio terminale di una proteina “sintetica”. L’aggiunta di questa coda di istidina viene solitamente indotta in alcune proteine che vengono sintetizzate da organismi geneticamente modificati per facilitarne la purificazione nella cromatografia ad affinità per i metalli (l’Immobilized metal affinity chromatography - IMAC; Garcia et Davies, 2006). Questa tecnica di purificazione utilizza delle resine contenenti cationi divalenti, che legano con maggiore affinità le proteine ingegnerizzate prodotte dagli organismi contenenti le code di istidina. La sintesi delle resine per l’IMAC coinvolge solitamente l’uso di un supporto come l’agarosio che viene coniugato con un chelante come l’acido nitrilotriacetico (NTA) o l’acido iminodiacetico (IDA). Queste resine così modificate legano cationi divalenti come: rame, nichel, cobalto e ferro. Questi metalli hanno a loro volta un’alta affinità per le code di istidina e se utilizzate in colonna cromatografica come fase solida permettono la purificazione delle proteine ingegnerizzate con un arricchimento di 100 volte per singolo passaggio (<https://www.thermofisher.com>; Hochuli et al., 1988). Data l’alta affinità dell’ulvano e dell’agar solforato per i cationi divalenti, legata alla loro ricchezza di cariche negative sulla catena polisaccaridica, questi sono stati scelti come base per la formulazione di resine ad affinità per le “polyhistidina-tags”.

Materiali e metodi

Un’analisi elementare preliminare del contenuto di carbonio e zolfo è stata effettuata preventivamente sui polisaccaridi solforati di agar da *G. vermiculophylla* e ulvano mediante un analizzatore CHNS (Elementar).

Su 50 ml di acqua sono stati disciolti a caldo 500 mg di PS portando la soluzione a pH 2 con H₂SO₄ diluito. Parallelamente, 500 mg di Ni(NO₃)₂ (equivalenti a 100 mg Ni²⁺) sono stati disciolti in 50 ml di acqua. Le due soluzioni sono state unite a freddo e il pH è stato alzato fino a pH 7. A questo punto, il polisaccaride coniugato con il nickel è stato precipitato in etanolo 75% a freddo per una notte. Il precipitato è stato lavato e centrifugato per tre volte con acqua milli-Q per rimuovere l’eccesso di nickel (non complessato dal polisaccaride) ed è stato nuovamente riprecipitato in etanolo e conservato in frigo a 4°C. Tre aliquote sono state essiccate per ricavare il peso secco e la densità. L’analisi del nickel legato è stata effettuata per digestione di un’aliquota (1 ml equivalente a 30 mg dw)

del polisaccaride in acqua regia overnight. Gli estratti sono stati portati a un volume finale di 50 ml e l'analisi è stata effettuata in triplicato mediante un Perkin Elmer ICP-OES 5300DV.

Risultati preliminari e Discussione

I risultati riguardanti l'analisi elementare hanno rivelato un contenuto di zolfo nell'ulvano che raggiunge il 6,7%, mentre nell'agar solforato raggiungeva "appena" il 2,5%. Viceversa, il contenuto di carbonio per l'ulvano era del 27%, contro il 34% dell'agar solforato. Lo zolfo in questi polisaccaridi è sotto forma di estere solfato, con carica netta negativa a pH 7, corrispondente indicativamente al numero "minimo" di siti carichi negativamente, mentre il carbonio costituisce lo scheletro del polisaccaride. In questa ottica è stato scelto l'ulvano come polisaccaride base per la formulazione delle resine dato il suo più alto grado di solforazione. Il nickel, legato effettivamente all'ulvano, corrisponde al 4,7% in massa del polisaccaride stesso ($47 \text{ mg Ni}^{2+} \text{ g}^{-1} \text{ dw ulvano}$). La quantità di nickel legata non è affatto trascurabile considerando che per ogni ione di nichel esposto c'è l'interazione con almeno una "polyhistidina-tag" e che potenzialmente ne può rallentare l'eluizione attraverso la colonna. Tuttavia, il numero di siti accessibili con nickel legato può essere diminuito dall'avvolgimento della catena polisaccaridica dell'ulvano in microsfele a $\text{pH} > 7$. La sperimentazione dovrebbe proseguire oltre la caratterizzazione chimica, per verificare l'efficacia di queste resine in campioni di proteine con "polyhistidina-tags".

9.3 Ficoeritrina e Argento

Introduzione

Studi già condotti sulla riduzione dell'argento nitrato con la PE hanno rivelato la formazione di nanoparticelle d'argento con peculiari proprietà di stabilità e fluorescenza (Bekasova, 2008; Bekasova, 2010; Bekasova *et al.*, 2016). Il lavoro condotto inoltre da Saraswat *et al.* (2011) conferma il trasferimento di energia di eccitazione dalla PE all'Ag⁰ nanoparticellato con conseguente perdita di fluorescenza. In base a queste premesse è stata valutata la possibilità di misurare l'argento e il suo rilascio nel tempo da diverse matrici, utilizzando la perdita di fluorescenza della ficoeritrina come sonda.

Materiali e metodi

Un fluorimetro VICTOR™ X (multiplate reader Perkin-Elmer) è stato utilizzato per misurare la fluorescenza della PE (a concentrazione fissa di 4 µg ML⁻¹) a intervalli di tempo prestabiliti su concentrazioni variabili di argento (tra 1 e 500ppb) di diversa natura. I tipi di argento investigati sono l'AgNO₃, nanoparticelle d'argento sintetizzate con il metodo del citrato (AgNP_{cit}), nanoparticelle Ag-EPS e Fe-Ag-EPS sintetizzate con il ceppo batterico *Klebsiella oxytoca*, in presenza di solo argento e di ferro e argento rispettivamente, secondo il protocollo descritto in Baldi *et al.* (2016). La ficoeritrina utilizzata per questo studio è quella fornita da Sigma-Aldrich a pH 7.

Risultati preliminari e Discussione

Un decadimento esponenziale della fluorescenza, dovuto all'aggiunta di argento, è stato trovato in tutte le matrici analizzate, già a 5 minuti. Le curve di fluorescenza a diverse concentrazioni possono essere linearizzate positivamente secondo l'espressione:

$$-\ln(T_n/T_0) = K*[Ag]$$

dove il logaritmo negativo del rapporto tra la fluorescenza al tempo ennesimo (T_n) rispetto al tempo zero (T_0) equivale al prodotto tra una costante e la concentrazione di argento. Le curve così linearizzate sono rappresentate in **Fig. 45**. Ognuna di queste corrisponde a una retta di calibrazione che permette la determinazione dell'argento tra 10 e 500ppb.

L'inclinazione delle singole rette indica la disponibilità dell'argento per l'interazione con la ficoeritrina, considerata massima nel nitrato d'argento, cosicché tanto più il coefficiente angolare della retta tende allo zero tanto meno l'argento sarà rilasciato interagendo con la PE e "spegnendola".

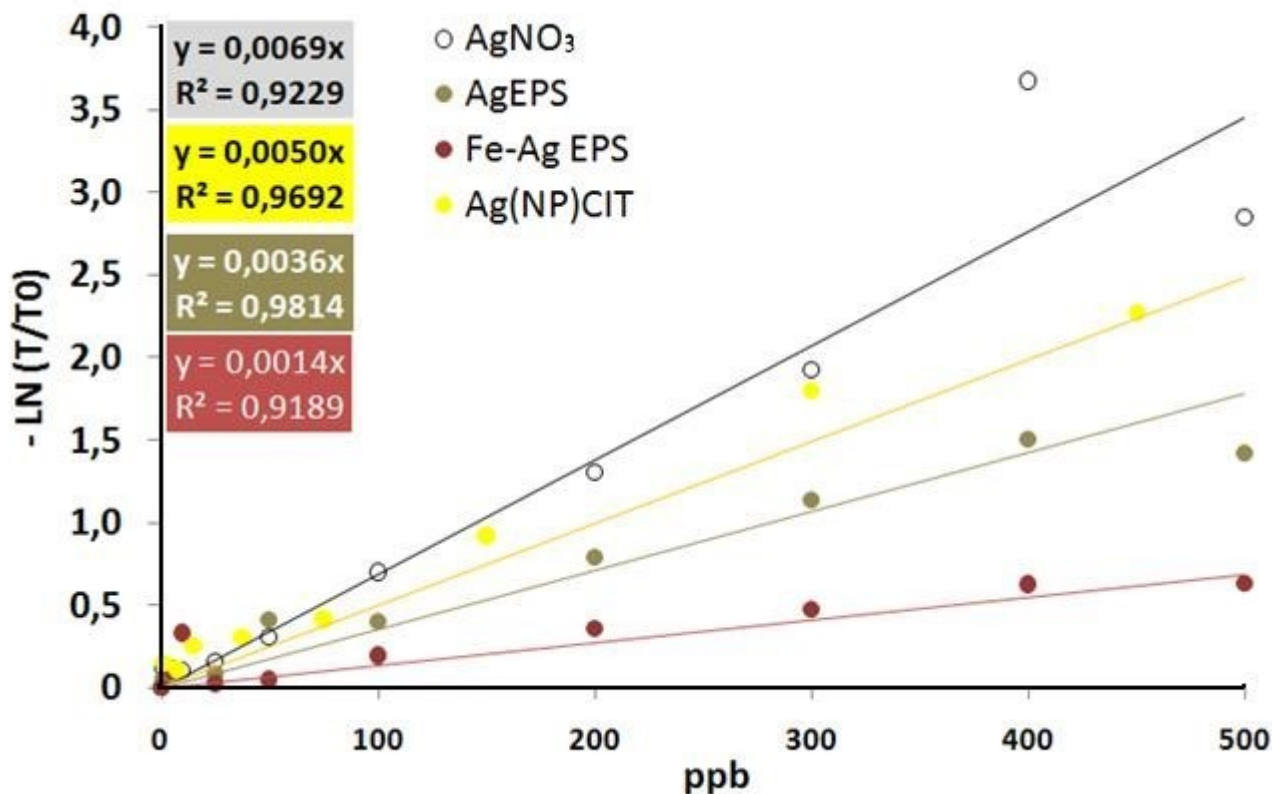


Fig. 45: Curve di decadimento della fluorescenza linearizzate positivamente per concentrazioni crescenti dopo 5 minuti dal tempo zero.

Rapportando i coefficienti angolari delle rette di calibrazione per le diverse nanoparticelle a quello dell'AgNO₃ è possibile "stimare" relativamente all'AgNO₃ il rilascio di argento. Se per l'AgNO₃ il rilascio è massimo ed equivale al 100%, allora le AgNP_{cit} rilasciano l'83%, le AgEPS il 60% e le Fe-Ag-EPS appena il 23% di argento in 5 minuti.

Questo studio preliminare rivela che è possibile determinare velocemente con la ficoeritrina concentrazioni anche molto basse di argento tra 10 e 500 ppb su molti campioni. L'analisi nel tempo permetterebbe inoltre di trovare i tassi di perdita di fluorescenza e quindi di rilascio dell'argento da parte di diverse matrici.



Collaborazioni

10. COLLABORAZIONI

Illustro qui di seguito una collaborazione effettuata con il dottorando Abdul-Salam Fayiz Ahmed Juhmani nel corso della quale abbiamo determinato l'effetto di nanoparticelle d'argento su *U. rigida* per mezzo di perossidazione lipidica e produzione primaria. I risultati qui solo sommariamente riassunti, hanno portato alla redazione di un articolo che sarà presto inviato per la pubblicazione.

10.1 Effetto di nano particelle d'argento su *Ulva rigida*

Introduzione

Lo sviluppo delle nanotecnologie ha portato ad un incremento nell'utilizzo di nano particelle e nanomateriali in molti ambiti e prodotti di uso anche quotidiano. Tra queste le nanoparticelle d'argento sono tra le più diffuse per le loro proprietà antimicrobiche e biocide (Fabrega *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2009).

Il loro utilizzo ha visto un deciso incremento negli ultimi anni e un'indagine sul motore di ricerca "Espacenet" (<https://worldwide.espacenet.com>) per "silver nano*" rivela un incremento esponenziale nel rilascio di brevetti, con più di 5000 brevetti rilasciati dall'anno 2000, di cui più del 44% rilasciati solo negli ultimi 3 anni. Parallelamente, si è sviluppata una crescita esplosiva nel numero di articoli su riviste scientifiche tra il 2000 e il 2015 (McGillicuddy *et al.*, 2017). Questo incremento nel lancio di prodotti contenenti nanoparticelle d'argento sul mercato incrementa potenzialmente il rilascio e la diffusione dell'argento nell'ambiente. Esempi di prodotti contenenti argento sono: cosmetici, prodotti per la cura personale, vestiario, contenitori alimentari, pitture, additivi per la lavatrice e dispositivi medici.

Le proprietà fisico-chimiche, che si aggiungono già alla naturale proprietà antimicrobica dei sali d'argento e che contribuiscono alla loro azione bioacida, sono: l'alta area specifica e mobilità e la capacità di penetrare nelle cellule (poiché di piccolissime dimensioni, poche decine di nanometri). Queste nanoparticelle possono potenzialmente produrre effetti deleteri sulla salute umana e sull'ambiente (Kandlikar *et al.*, 2006). Le perplessità riguardo alla salute umana sono tuttora dibattute e sono riportati: compromissione dell'attività mitocondriale, citotossicità, genotossicità e neuro degenerazione su cellule umane e di topo da esperimenti *in vitro* (Teodoro *et al.*, 2011; AshaRani *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015). Tuttavia, alle dosi riportate essere tossiche per microbi e parassiti, è stata riportata solo una bassa tossicità sistemica *in vivo* negli esseri umani e nei mammiferi in generale, e non

è riportata, né epatotossicità né immunotossicità, a seguito dell'esposizione orale (Ouay et Stellacci, 2015; Zande et al., 2012; Hadrup et Lam, 2013). Questa bassa tossicità per l'uomo e per i mammiferi probabilmente giustifica il largo uso delle nanoparticelle d'argento, tuttavia molti organismi acquatici hanno dimostrato di essere estremamente sensibili alla contaminazione da nanoparticelle (Navarro et al., 2008; Oukarroum et al., 2012; Asharani et al., 2008; Griffit et al., 2008) e l'acqua rappresenta il principale veicolo di mobilitazione e dispersione di queste ultime. La maggioranza degli articoli scientifici inerenti la tossicità di nanoparticelle d'argento è incentrata sugli organismi acquatici delle acque dolci e poca attenzione è stata rivolta agli organismi degli ambienti marini e di transizione. Le alghe come produttori primari, influenzano i livelli successivi della catena trofica e spesso decretano la qualità di un ambiente costiero. La macroalga *U. rigida* è riconosciuta come un indicatore biologico della contaminazione e dell'accumulo di metalli (Favero et al., 1996). Pertanto, al fine di determinare il grado di tossicità delle nanoparticelle d'argento per i produttori primari in un ambiente marino, è stata scelta come organismo modello per valutarne la tossicità sulle alghe verdi in condizioni semi-naturali.

Materiali e metodi

Piccoli talli di *U. rigida* (max. 5 cm in lunghezza) sono stati raccolti in primavera dalle rive artificiali del Lido di Venezia e sono stati tenuti a riposo per 3 ore prima dell'impiego nella sperimentazione. Per valutare gli effetti dell'AgNO₃ e delle nanoparticelle d'argento sulla produzione primaria e sulla perossidazione lipidica algale, sono state testate diverse concentrazioni da 0,01 ppm a 120 ppm in acqua marina standard (ASW) in triplicato su beute da 100ml con 500mg di alga. Gli esperimenti sono stati eseguiti a 22°C dopo un'esposizione di 24 h.

La vetreria è stata lavata con: un detergente "Contrad"; in bagno acido HNO₃ 1% per una notte per rimuovere i metalli in tracce; con acqua Milli-Q e con una soluzione "tamponante" di bicarbonato all'1%. L'ASW è stata preparata sciogliendo su litro: NaCl 24,6 g; KCl 0,67g; CaCl₂ 1,36g; MgSO₄x7H₂O 6,29g; MgCl₂ 4,66g; HNaCO₃ 0,18g.

Le nanoparticelle d'argento sono state sintetizzate con il metodo di riduzione del citrato di Ratyakshi et Chauhan (2009). Il picco di risonanza plasmonica delle nanoparticelle è stato misurato con uno spettrofotometro e la distribuzione e il grado di aggregazione sono stati caratterizzati per mezzo della microscopia SEM (FE-SEM Zeiss, SIGMA VP) le cui immagini sono state processate per mezzo del software ImageJ.

La tossicità è stata monitorata: per mezzo della perossidazione lipidica, che viene misurata come malondialdeide (MDA - il principale sottoprodotto dell'ossidazione e della degradazione dei lipidi in condizioni di stress ossidativo) già largamente utilizzata per animali e piante (Washa *et al.*, 2012; Buege *et Aust*, 1987) e per mezzo della produzione primaria, un parametro fisiologico di crescita che integra numerose risposte a livello cellulare (Odum, 1956). La determinazione dell'MDA in *U. rigida* è stata eseguita con il metodo spettrofotometrico dell'acido tiobarbiturico come descritto in Washa *et al.*, (2012). La produzione primaria è stata misurata come sviluppo di ossigeno in 100 minuti per mezzo di un oximetro (Oxi 196 GmbH, Weilheim, Germany). A tal fine, tre repliche sono state predisposte in doppio, una parte da tenere al buio dove avviene la sola respirazione e una parte da esporre alla luce dove avviene la fotosintesi. La somma di fotosintesi e respirazione restituisce il valore di produzione primaria lorda che è stato espresso come $\text{mg C g}^{-1} \text{ dw}$ fissato durante il processo (Odum, 1956).

L'analisi dell'argento bioaccumulato è stata effettuata per mezzo di un Perkin-Elmer ICPOES 5300DV. Le alghe sono state seccate a 50°C per 48 ore, omogeneizzate in un mortaio e 100 mg sono stati digeriti in bombe di teflon (pretrattate con acido) con 3ml di HNO_3 , 3ml di HClO_4 e 4ml di Milli-Q per 2 h a 130°C . Gli estratti sono stati centrifugati e conservati a -4°C fino all'analisi (Rigollet *et al.*, 2004).

Risultati preliminari

Le nanoparticelle "cappate" con il citrato hanno mostrato un picco di risonanza plasmonica nel "range" tra 414 e 416nm. La distribuzione e la taglia delle nanoparticelle, mostra un diametro di Feret medio di $12\pm 9\text{nm}$ (Fig.46a) e la distribuzione dimensionale riportata in Fig.46b mostra che più del 70% delle nanoparticelle erano entro i 15 nm.

Le nanoparticelle d'argento hanno dimostrato di essere accumulate in *U.rigida* dalla soluzione. L'analisi dei metalli rivela che questo accumulo segue l'equazione isoterma di Langmuir (Fig. 47) con un punto di saturazione di $11,3 \mu\text{g g}^{-1}$ di argento nell'alga da una soluzione di 5 ppm di nanoparticelle d'argento.

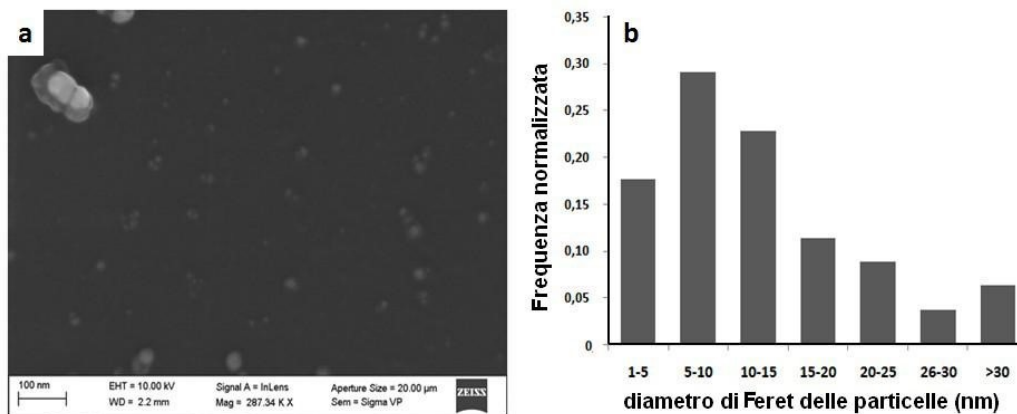


Fig. 46: a) Fotografia delle nanoparticelle d'argento con microscopia SEM; b) Distribuzione dimensionale delle nanoparticelle.

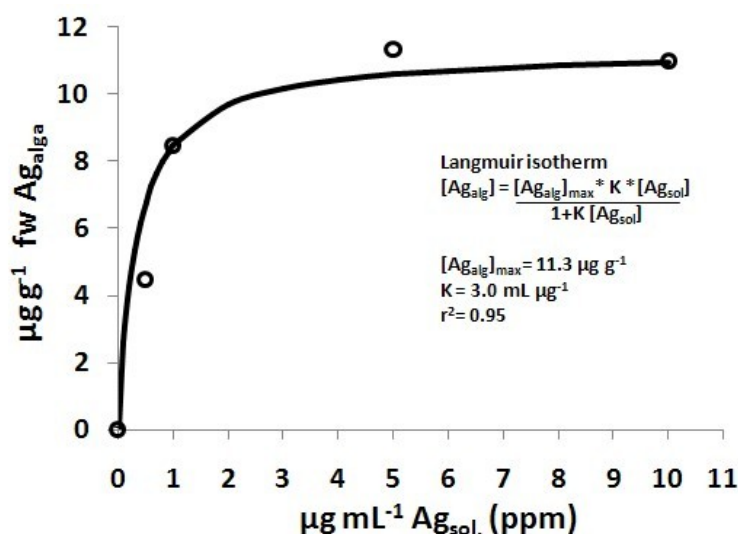


Fig. 47: Accumulo di argento in *U. rigida* da soluzioni di nanoparticelle d'argento.

I valori di MDA riportati in Fig. 48a in accordo con il bioaccumulo, mostrano che per le nanoparticelle la minima concentrazione di effetto (LOAEL) corrisponde a 1 ppm, la prima concentrazione significativamente diversa dal controllo (Test U Mann-Whitney: $P=0,01$). Lo stress ossidativo riportato dall'MDA aumenta fino a 30 ppm per poi decrescere in combinazione con la morte cellulare verificata al microscopio. Per raffronto, è stato misurato lo stress ossidativo generato dall' AgNO_3 che tuttavia, sebbene con qualche fluttuazione, non ha mostrato di divergere dal controllo. Questo potrebbe indurre ad assumere che non ci sono stati effetti avversi dovuti all' AgNO_3 e alle sue forme coniugate con i cloruri in acqua di mare, tuttavia la produzione primaria sembra differire da tale

ipotesi. I sali d'argento, infatti, hanno provocato un riduzione del 57% della produzione primaria già a 0,01ppm (appena 10 parti per miliardo) come visibile in **Fig. 48b**.

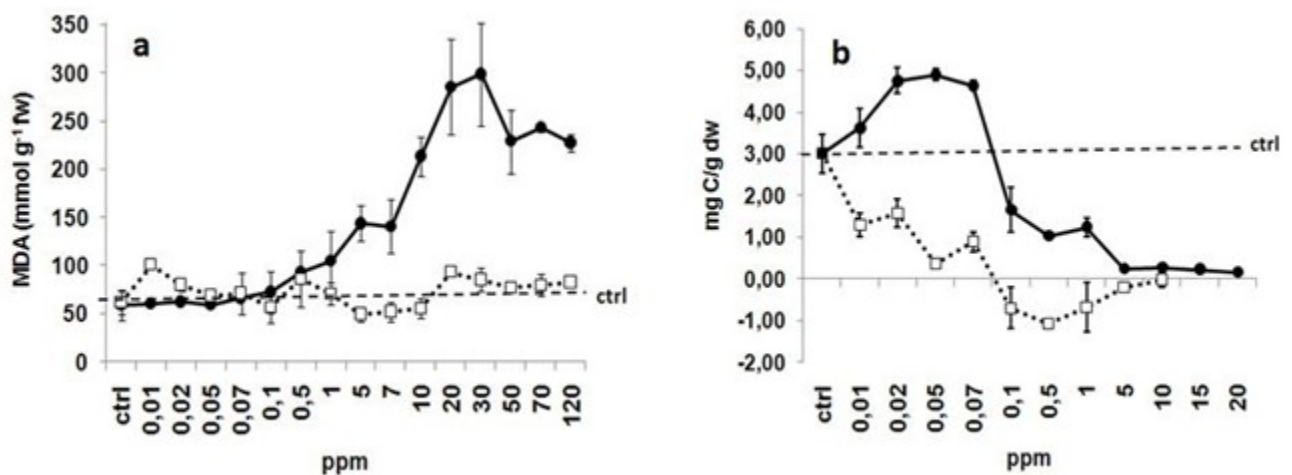


Fig. 48: a) concentrazioni di MDA e b) Produzione primaria in *U. rigida* a differenti concentrazioni di nanoparticelle d'argento (• - linea continua) e AgNO₃ (□ - linea punteggiata).

Valori negativi nella produzione primaria sono stati misurati tra 0,1 e 1 ppm, (corrispondenti al consumo di carbonio organico e ossigeno dovuti alle respirazione) probabilmente per compensare l'effetto tossico. Questo evidenzia come la respirazione fosse ancora attiva fino a 1 ppm. Le nanoparticelle d'argento invece hanno prodotto un'eutrofizzazione tra 0,01 e 0,07 ppm con effetti avversi solo oltre 0,1 ppm e la completa inibizione della produzione primaria a 5 ppm. Lo stress ossidativo quindi sembra cominciare a rispondere solo quando la produzione primaria è già inibita.

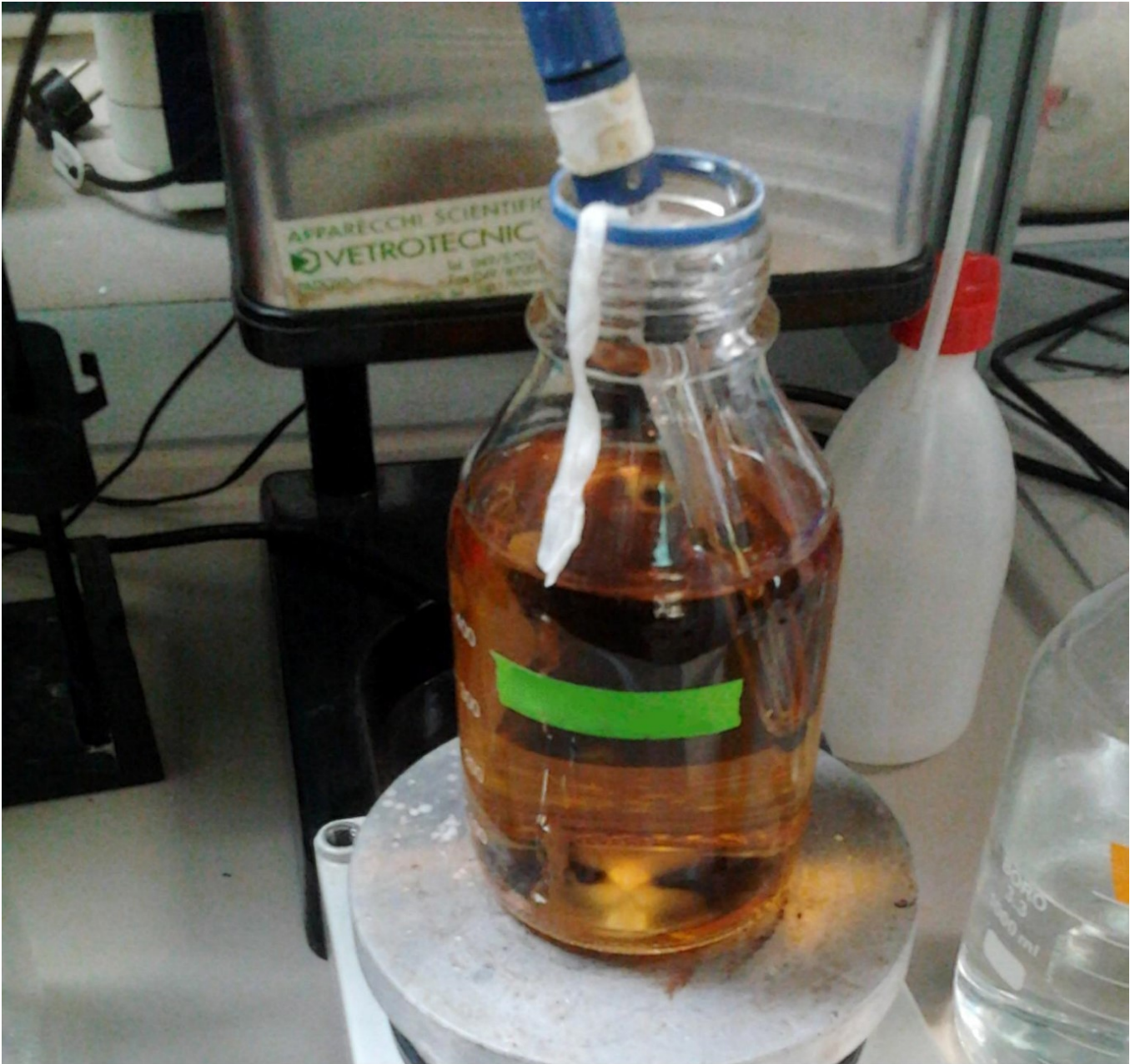
Discussione

L'incremento nell'uso e nel rilascio di nanoparticelle ci ha portato a studiare le loro interazioni con un organismo modello, comune negli ambienti di transizione, l'alga *U. rigida*. I risultati di questo studio confermano l'alta citotossicità delle nanoparticelle d'argento anche in ambienti marini. Solitamente, la tossicità dell'AgNO₃ è 10 volte superiore in confronto con le nanoparticelle d'argento (Boenigk *et al.*, 2014) e la soluzione di AgNO₃ ha prodotto una severa inibizione nella produzione primaria già a 0,010ppm in accordo con le concentrazioni LOAEL nel "range" da 0,001 a 0,020 ppm trovate per organismi marini (Bianchini *et al.*, 2005; Oukarroum *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2012; Ward

et al., 2006). In questo intervallo di concentrazione, le nanoparticelle d'argento non hanno prodotto stress ossidativo né hanno compromesso la produzione primaria, benché un effetto di eutrofizzazione si sia sviluppato entro 0,07 ppm e l'inibizione sia cominciata solo oltre 0,1 ppm. *Ulva rigida* ha mostrato valori negativi di produzione primaria, dovuti alla respirazione in assenza di fotosintesi, tra 0,1 e 1ppm di AgNO₃, suggerendo che l'attività mitocondriale potesse funzionare fino a concentrazioni di 1ppm, mentre il fotosistema era già compromesso tra 0,045 e 0,075ppm come riportato in [Turner *et al.* \(2012\)](#). La completa inibizione della fotosintesi e della respirazione è avvenuta solo a concentrazioni di 5 ppm, come hanno trovato [Teodoro *et al.* \(2011\)](#), che hanno riportato la compromissione della funzionalità mitocondriale tra 2 e 5ppm. Le nanoparticelle e i sali d'argento hanno prodotto la completa inibizione della produzione primaria a 5ppm, ma solo per le nanoparticelle d'argento è seguita la produzione di stress ossidativo, viceversa l'AgNO₃ ha indotto la morte cellulare e la lisi ma nessun incremento dell'MDA. Questi test di tossicità acuta confermano la grande sensibilità di *U. rigida* all'inquinamento da argento, tuttavia è necessario considerare quelle che sono le quantità plausibili di argento presenti in ambiente. [Kaegi *et al.* \(2010\)](#) riportano che più dell'80% dell'argento depositato con pitture da esterni viene rilasciato nel corso di 8 eventi piovosi e [Benn *et al.* \(2010\)](#) stimano un rilascio di 470 µg Ag per capita giorno⁻¹. Malgrado questo, in seguito a fenomeni di diluizione, vengono previste concentrazioni negli ambienti acquatici con il modello di [Gottschalk *et al.* \(2009\)](#) tra 0,7 e 0,11 ppt e negli effluenti degli impianti di depurazione tra 21 e 42ppt. Valori simili sono stati riportati da [Wen *et al.* \(2002\)](#) nelle acque superficiali del Colorado e negli effluenti degli impianti di depurazione (1,8-537 ppt). Analogamente, per una stima del rischio, [Blaser *et al.* \(2008\)](#) hanno considerato valori tra 40 e 320 ppt. Le concentrazioni stimate per le acque superficiali ricadono nell'intervallo dei ppt, valori molto inferiori rispetto ai ppb/ppm necessari per produrre effetti deleteri negli organismi acquatici. Tuttavia non è da escludere la possibilità che, in lagune ed estuari con alti tempi di residenza (>15-30 giorni), le nanoparticelle possano accumularsi negli organismi producendo effetti tossici. I pochi dati a disposizione in letteratura sulla contaminazione da argento descrivono valori molto bassi per le acque, talvolta al limite della determinazione analitica, nell'intervallo dei ppt. Tuttavia, in Laguna di Venezia, sono riportate concentrazioni di argento nei sedimenti e nei bivalvi filtratori di talune aree tra 3,5 e 10,3 mg kg⁻¹ dw (ppm)([Giusti *et Zhang*, 2002](#)). Sono stati inoltre segnalati fattori di bioaccumulo per l'argento nelle alghe che possono andare da 10⁴ a 10⁵ ([Ratte, 1999](#)) allertando sulla presenza di questo contaminante bioaccumulabile che raggiunge concentrazioni non trascurabili e che potrebbe produrre effetti deleteri sul lungo periodo.

Conclusioni preliminari

Le nanoparticelle d'argento e l'AgNO₃ hanno dimostrato di poter compromettere gravemente già a 24 ore la funzionalità cellulare in *U. rigida* a poche decine di ppb e di portare alla completa inibizione della produzione primaria a 5ppm. Lo stress ossidativo generato dalle nanoparticelle manifesta i suoi effetti da 0,1 ppm culminando a 30 ppm cui segue la morte cellulare. Malgrado l'alta tossicità dell'argento per questi organismi, le concentrazioni ambientali stimate sembrano ricadere in un intervallo di concentrazione inferiore a quello necessario per produrre effetti deleteri sugli organismi acquatici, tuttavia la tendenza al bioaccumulo di questo metallo nelle alghe potrebbe comprometterne la funzionalità sul lungo periodo anche a concentrazioni molto basse.



Prodotti della Ricerca



11. PRODOTTI DELLA RICERCA

11.1 Produzione pregressa al dottorato

Elenco delle pubblicazioni

Sfriso, A., Campolin, M., **Sfriso, A.A.**, Buosi, A., Facca, C. (2012). Cambio della flora e della vegetazione acquatica in gradienti ecologici dalle bocche di porto ad alcune valli da pesca della laguna veneta. *Biologia Marina Mediterranea*, 19 (1): 53-56.

Sfriso, A., Buosi, A., Campolin, M., **Sfriso, A.A.** (2012). New macroalgae and rare species in the fishing ponds of the Venice Lagoon and ecological assessment. *Biologia Marina Mediterranea*, 20: 152-153.

Sfriso, A.A., Marchetto, D., Gallo, M., Baldi, F. (2014). Biochemical characterization of some cyanobacterial strains from salt marshes of the Venice Lagoon. *Journal of Applied Phycology*, 26: 273-278.

Sfriso, A., Buosi, A., **Sfriso, A.A.** (2014). First record and distribution of *Uronema marinum* (Chaetophorales, Chlorophyta) in the north-western lagoons of the Adriatic Sea, Mediterranean Sea (Italy). *Mediterranean Marine Science*, 15/1: 101-105.

Sfriso A.A.*, Argese, E. (2014). Effects of clam seed harvesting on *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) populations in the Lagoon of Venice. *Biologia Marina Mediterranea*, 21: 224-225.

Partecipazioni e presentazioni () a congressi*

Sfriso, A., Campolin, M., **Sfriso, A.A.**, Buosi, A., Facca, C. (2012). Cambio della flora e della vegetazione acquatica in gradienti ecologici dalle Bocche di porto ad alcune valli da pesca della laguna veneta. ATTI 43° Congresso SIBM, Marina di Camerota, 4-8 Giugno, pp. 55-59.

Campolin, M., **Sfriso, A.A.**, Buosi, A., Facca, C., Sfriso, A. (2012). Stato ecologico di aree confinate in valli da pesca e in laguna aperta. Annual Meeting of Algologia, Ischia. 8-9 November, p. 8.

Sfriso, A., Buosi, A., Campolin, M., **Sfriso, A.A.** (2013). New macroalgae and rare species in the fishing ponds of the Venice Lagoon and ecological assessment. ATTI 44° Congresso SIBM, Roma, 14-16 Maggio, pp. 109-110.

Sfriso, A., Buosi, A., **Sfriso, A.A.** (2013). On the occurrence of *Uronema marinum* (Chaetophorales, Chlorophyta) in the north-western lagoons of the northern Adriatic Sea, Mediterranean Sea (Italy). Gruppo di Algologia, Riunione Scientifica Annuale, Venezia, 18-19 Ottobre. p. 26.

Sfriso, A.A., Minello, F., Gobbo, L., Chiesa, S., Freitas, R., Figueira, E., Breda, S., Bettiol, C., Argese, E. (2014). Comparison of trace elements bioavailability and their bioaccumulation in Manila clam *Venerupis philippinarum* from Atlantic and Mediterranean estuarine environments. Congresso SETAC Europe, Basilea, 11-15 maggio.

Sfriso, A.A.*, Argese, E. (2014). Effects of clam seed harvesting on *Ruditapes philippinarum* populations in the lagoon of Venice. ATTI 45° Congresso SIBM, Venezia, 19-23 Maggio, pp. 193-194.

VINCITORE DEL PREMIO COME MIGLIOR POSTER PER IL COMITATO ACQUACOLTURA.

Sfriso A., **Sfriso A.A.**, Marchini A., Occhipinti-Ambrogi A. (2014). Spreading and production of invasive alien macrophytes in the Venice Lagoon. ATTI 24° Congresso della Società Italiana di Ecologia S.It.E., pp. 150-150, 15-17 Settembre.

Sfriso A., **Sfriso A.A.**, Buosi A. (2014). Macrophytes of the soft substrata of the Venice Lagoon, abundance and distribution. Annual Meeting of Algologia, Padova, 14-15 November, pp. 33-33.

Sfriso A., **Sfriso A.A.**, Marchini A., Occhipinti-Ambrogi A. (2014). Updating of alien macroalgae in the Venice Lagoon, new introductions and cryptogenic species. Annual Meeting of Algologia, Padova, 14-15 November, pp. 21-21.

Sfriso A.A.*, M. Gallo (2014). Growth rates of dominant macroalgae in areas potentially affected by anoxic crises: the Venice lagoon as a study case. Annual Meeting of Algologia, Padova, 14-15 November, pp. 36-36.

11.2 Produzione durante il triennio del dottorato

Elenco delle pubblicazioni

- Sfriso, A.A.** (2015). Macroalgae growth rates and biomass production in eutrophic areas of the Venice Lagoon. *Biologia Marina Mediterranea*, **22**: 66-67.
- Sfriso, A., Buosi, A., Facca, C., Franzoi, P., **Sfriso, A.A.** (2016). Macrofite e stato ecologico dell'area individuata per il passaggio delle grandi navi nella Laguna di Venezia. *Biologia Marina Mediterranea*, **23**: 70-73.
- Sfriso, A.A.**, Gallo, M., Baldi, F. (2016). Carbohydrate and agar yield: preliminary insights on seasonal variations in *Ulva* and three Gracilariaceae. *Biologia Marina Mediterranea*, **23**: 162-166.
- Sfriso, A.A.**, Sfriso, A. (2017). *In situ* biomass production of Gracilariaceae and *Ulva rigida*: the Venice Lagoon as a study case. *Botanica Marina*, **60(3)**: 271–283.
- Sfriso, A.A.**, Gallo, M., Baldi, F. (2017). Seasonal variation and yield of sulfated polysaccharides in seaweeds from the Venice Lagoon. *Botanica Marina*, **60(3)**: 339–349.
- Sfriso, A., Buosi, A., Facca, C., **Sfriso, A.A.** (2017). Role of environmental factors in affecting macrophyte dominance in transitional environments: The Italian Lagoons as a study case. *Marine Ecology*, **38(2)**: e12414.
- Wahsha M., Juhmani, A.S., Buosi A., **Sfriso A.A.**, Sfriso A. (2017). Assess the environmental health status of macrophyte ecosystems using an oxidative stress biomarker. Case studies: The Gulf of Aqaba and the Lagoon of Venice. *Energy Procedia*, **125**:19-26.

Articoli “sottomessi”

- Sfriso, A.A.**, Gallo, M., Baldi, F. (----). Phycoerythrin productivity and diversity from five red macroalgae. *Submitted to Journal of Applied Phycology*.
- Sfriso A., Buosi, A., Wolf, M.A., **Sfriso, A.A.** (----) Invasion of alien macroalgae in the Venice Lagoon, the Italian hotspot of NIS: *Gracilaria vermiculophylla* an emblematic case. *Submitted to Ecology and Evolution*.
- Sfriso, A.A.**, Chiesa, S., Sfriso, A., Buosi, A., Gobbo, L., Gnolo, A. B., Argese, E. (----) Spatial distribution, bioaccumulation profiles and risk for consumption of edible bivalves: a comparison among Manila clams, razor clams and cockles in the Venice Lagoon. *Submitted to Science of the Total Environment (STOTEN) special issue “Wetlands in a changing world: fragile transitional ecosystems under pressure of human activities”*.

Partecipazioni e presentazioni (*) a congressi

- Sfriso A., Buosi A., Facca C., **Sfriso A.A.** (2015). Impact of driving factors on macrophyte dominance in the Italian transitional environments. Annual Meeting of Algologia, Venezia, 6-7 November, p. 6.
- Sfriso A., Buosi A., **Sfriso A.A.** (2015). Macrophytes and ecological status in the northern basin of the lagoon of Venice. Annual Meeting of Algologia, Venezia, 6-7 November, p.7.
- Sfriso A.A.***, Gallo M., Baldi F. (2015). Seasonal variations of native agar from three different Gracilariaceae. Annual Meeting of Algologia, Venezia, 6-7 November, p. 11.
- Sfriso A.A.*** (2015). Macroalgae growth rates and biomass production in eutrophic areas of the Venice Lagoon. ATTI 46° Congresso SIBM, Roma, 10-12 Giugno, pp. 66-67.
- Sfriso A., Buosi A., Facca C., Franzoi P., **Sfriso A.A.** (2016). Macrofite e stato ecologico dell'area individuata per il passaggio delle grandi navi nella laguna di Venezia. ATTI 47° Congresso SIBM, Torino, 13-17 Giugno, pp.61-61

Sfriso A.A.*, Gallo M., Baldi F. (2016). An efficient and selective phycoerythrin extraction method from macroalgae. Annual Meeting of Algologia, Ravenna, 18-19 Novembre, pp. 34-34.

Wahsha M., Juhmani A.S., Buosi A., **Sfriso A.A.**, Sfriso A. (2017). Assess the environmental health status of macrophyte ecosystems using an oxidative stress biomarker. Case studies: The Gulf of Aqaba and the Lagoon of Venice. EGU General Assembly 2017, Vienna, 23-28 Aprile, Geophysical Research Abstracts, (19):14041.

Sfriso A.A.*, Gallo M., Baldi F. (2017). Seaweed protein production in the Venice Lagoon: seasonal variations in *Ulva rigida* and three Gracilariaceae. ATTI 48° Congresso SIBM, Roma, 7-9 giugno, pp.67-68.

Sfriso A., Buosi, A., **Sfriso A.A.** (2017). Macroalghe o Fanerogame Acquatiche, una scelta ambientale per lo sviluppo sostenibile degli ambienti di transizione Italiani. ATTI 48° Congresso SIBM, Roma, 7-9 giugno, pp.52-53.

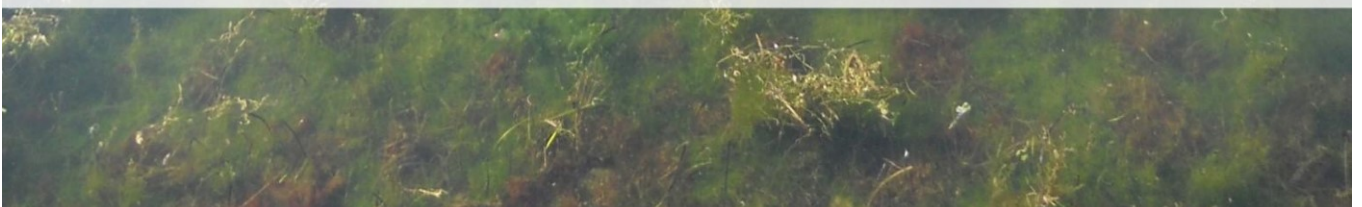
Sfriso, A., Buosi, A., Wolf, M., **Sfriso, A.A.** (2017). Inventory of the distribution and abundance of alien macroalgae in the Venice Lagoon: *Gracilaria vermiculophylla* an emblematic case. ATTI 112° Congresso della Società Botanica Italiana, IV INTERNATIONAL PLANT SCIENCE CONFERENCE (IPSC), Parma, 20-23 September.

Riconoscimenti e premi:

SFRISO A.A., GALLO M., BALDI F. (2016) – Carbohydrate and agar yield: preliminary insights on seasonal variations in *Ulva* and three Gracilariaceae. Premio come miglior poster per il Tema “Innovazioni in acquacoltura: produzioni e tecnologie” presso il congresso della Società Italiana di Biologia Marina Mediterranea.



Bibliografia



12. BIBLIOGRAFIA

- AKAHANE, T., IZUMI, S. (1976). Sulfate groups of the mucilage of red seaweeds. *Agric Biol Chem*, 40(2):285-289.
- ALBAN, S., SCHAUERTE, A., FRANZA, G. (2002). Anticoagulant sulphated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulphates. *Carbohydr Polym*, 47(3): 267-276.
- ALGARRA, P., THOMAS, J.C., MOUSSEAU, A. (1990). Phycobilisome Heterogeneity in the Red Alga *Porphyra umbilicalis*. *Plant Physiol*, 92:570-576.
- ALONGI, D. M. (1998). Coastal ecosystem processes. Boca Raton, CRC Press.
- ARMISEN, R. (1995). World-wide use and importance of Gracilaria. *J Appl Phycol*, 7(3):231.
- ARMISEN, R., GALATAS, F., HISPANAGAR S.A. (2000). Agar. In: (G.O. and P.A. Williams, eds.) Handbook of hydrocolloids. Woodhead Publishing, Madrid. pp. 21–40.
- ASHARANI, P.V., MUN, G.L.K., HANDE, M.P., VALIYAVEETIL, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *Acsnano*, 3(2):279-290.
- ASHARANI, P.V., WU, Y.L., GONG, Z., VALIYAVEETIL, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19:1-8.
- BALDI F., DANIELE S., GALLO M., PAGANELLI S., BATTISTEL D., PICCOLO O., FALERI C., PUGLIA A.M., GALLO G. (2016). Polysaccharide-based silver nanoparticles synthesized by *Klebsiella oxytoca* DSM 29614 cause DNA fragmentation in E. coli cells. *Biometals*, 29: 321-331.
- BARNES, R. S. K. (1980). Coastal lagoons. Cambridge, Cambridge University Press.
- BASTIANINI, M., BERNARDI-AUBRY, F., ACRI, F., BRAGA, F., FACCA, C., SFRISO, A., FINOTTO, S. (2013). The Redentore fish die-off in the Lagoon of Venice: an integrated view. Gruppo di Algologia, Riunione Scientifica Annuale, Venezia, 18-19 Ottobre. p. 32.
- BEKASOVA, O. D., BREKHOVSKIKH, A. A., REVINA, A. A., DUBINCHUK, V. T. (2008). Preparation and Optical Properties of Silver Nanoparticles in R- phycoerythrin, a Protein Matrix. *Inorganic Materials*, 44(8): 835–841.

- BEKASOVA, O.D. (2010). Optical Properties of Silver Nanoparticles in R-Phycoerythrin Nanochannels in Aqueous Solutions and Films. *Inorganic Materials*, 46(11): 1201–1205.
- BEKASOVA, O. D., BORZOVA, V. A., SHUBIN, V. V., KOVALYOV, L. I., STEIN-MARGOLINA, V. A., KURGANOV B. I. (2016). An Increase in the Resistance of R-Phycoerythrin to Thermal Aggregation by Silver Nanoparticles Synthesized in Nanochannels of the Pigment . *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52(1):98–104.
- BENAVIDES, J., PALOMARES, M.R. (2006). Simplified two-stage method to B phycoerythrin recovery from *Porphyridium cruentum*. *J Chromatogr B*, 844(1): 39-44.
- BENEDICT, S. R. (1908). A Reagent For the Detection of Reducing Sugars. *J Biol Chem*, 5(6):485–487.
- BENN, T., CAVANAGH, B., HRISTOVSKI, K., POSNER, J.D., WESTERHOFF, P. (2010). The release of nanosilver from consumer products used in the home. *J Environ Qual*, 39:1875-1882.
- BERMEJO, R., ACIÉN, F.G., IBANEZ, M.J., FERNANDEZ, J.M., MOLINA, E., ALVAREZPEZ, J.M. (2003). Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *J Chromatogr B*, 790:317-325.
- BIRD, C.J. AND J. MCLACHLAN, J. (1984). Taxonomy of *Gracilaria*: Evaluation of some aspects of reproductive structure. *Hydrobiologia*. 116/117: 41-62.
- BIRD, J.B. (1995). A review of recent taxonomic concepts and developments in the Gracilariaceae (Rhodophyta). *J Appl Phycol*, 7: 255-267
- BLASER, S.A., SCHERINGER, M., MACLEOD, M., HUNGERBUHLER, K. (2008). Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nanofunctionalized plastics and Textiles. *Sci Total Environ*, 390:396-409.
- BOATTO, V., SILVESTRI, S., ROSSETTO, L. (2005). Analisi Economica della filiera di *Tapes philippinarum*. In: Angeli F.(Ed.) La filiera della vongola, *Tapes philippinarum* in Italia. Franco Angeli s.r.l., Milano, Italy.
- BOENIGK, J., BEISSER, D., ZIMMERMANN, S., BOCK, C., JAKOBI, J., GRABNER, D., GROßMANN, L., RAHMANN, S., BARCIKOWSKI, S., SURES, B. (2014). Effects of Silver

Nitrate and Silver Nanoparticles on a Planktonic Community: General Trends after ShortTerm Exposure. *PLoS One*, 9(4): e95340.

BRAMBATI, A., CARBOGNIN, L., QUAIA, T., TEATINI, P., TOSI, L. (2003). The Lagoon of Venice: geological setting, evolution and land subsidence. *Episodes*, 26(3), 264-268.

BRODIE, A. J, IRVINE, L. M. (2003). Seaweeds of the British Isles. Volume I Rhodophyta. Part 3B Bangiophycidae. HMSO, London, pp. 167.

BRODIE, J., BARTSCH, I., NEEFUS, C., ORFANIDIS, S., BRAY, T., MATHIENSON, A. C. (2007). New insights into the cryptic diversity of the North Atlantic-Mediterranean “*Porphyra leucosticta*” complex: *P. olivii* sp. nov. and *P. rosengurttii* (Bangiales, Rhodophyta). *Eur J Phycol*, 42(1): 3-28.

BRUSÀ, R. B., PONIS, E., CACCIATORE, F. (2011). Dalla pesca all’allevamento della vongola filippina in Laguna di Venezia: “il Preingrasso”. ISPRA, Quaderni, 10207 quad ric marina2.

BRYANT, D.A. (1982). Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: Properties and Occurrence in Cyanobacteria. *Microbiology*, 128: 835-844.

BUEGE, J.A., AUST, D.S. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol*, 52:302310.

CALVO, O.J.J., MAZUELOS, C., HERMOSYN, B ., JIMENEZ, S.C. (1993). Chemical composition of *Spirulina* and eukaryotic algae food products marketed in Spain. *J Appl Phycol*, 5:425–435.

CASALE, M., GIOVANARDI, O., GRIMM, F., OREL, G., PESSA, G. (2001). Distribuzione ed abbondanza delle principali specie di molluschi bivalvi nella laguna di Venezia nell’estate 1999, con particolare riguardo per *Tapes philippinarum* (Adams & Reve, 1850). *Biol Mar Medit*, 8 (1): 413-423.

CAVINATO C., DA ROS, C., PAVAN, P., BOLZONELLA, D. (2017). Influence of temperature and hydraulic retention on the production of volatile fatty acids during anaerobic fermentation of cow manure and maize silage. *Bioresour Technol*, 223: 59-64.

CECERE, E., PETROCELLI, A., IZZO, G., SFRISO A. (2009). Flora and vegetation of the Italian transitional water systems. Venezia, CORILA: pp. 278.

CEREGATO, A., MINICANTE, S.A., MINUZZO, T., BIRELLO, G., PERIN, A. (2016).

Algarium veneticum. Da una collezione storica alla creazione di un archivio digitale multi tematico. Conferenza GARR, Firenze, 30 novembre - 2 dicembre 2016.

CESARI, P., PELLIZZATO, M. (1985). Mollusk spreading in Venice Lagoon for voluntary or random anthropogenic introduction. *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughely, 1933) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) acclimatization (In Italian). *Boll Malacologico*, 21(10-12): 237-274.

CHAKRABORTY, S., SANTRA S.C. (2008). Biochemical composition of eight benthic algae collected from Sunderban. *Indian J Mar Sci*, 37: 329–332.

CHIELLINI, F., MORELLI, A. (2011). Ulvan: a versatile platform of biomaterials from renewable resources. In Biomaterials-Physics and Chemistry. In: Pignatello, R. ed., "Biomaterials - Physics and Chemistry". InTech. <https://www.intechopen.com>.

CO, C., ARAUJO, I.W., VANDERLEI, E.S., RODRIGUES, J.A. , QUINDERE, A.L., FONTES, B.P., QUEIROZ, I.N., MENEZES, D.B., BEZERA, M.M., SILVA, A.A., CHAVES, H.V., JORGE, R.J., EVANGELISTA, J.S., BENEVIDES, N.M. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 110: 335–341.

COMUNE DI VENEZIA (1991). Seaweeds of the Venice Lagoon. Arsenale Editrice, Venezia. pp. 119.

CONSORZIO VENEZIA NUOVA (1994). Macroalgae harvesting in the lagoon of Venice (in Italian). *Quaderni Trimestrali*, 2–3: 50.

CUNHA, L., GREHA, A. (2016). Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery Applications. *Mar Drugs*, 14(3):1-42.

CURIEL, D., BELLEMO, G., LA ROCCA, B., SCATTOLIN, M., MARZOCCHI, M. (2002). First report of *Polysiphonia morrowii* Harvey (Ceramiales, Rhodophyta) in the Mediterranean Sea. *Bot Mar*, 45: 66-70.

CURIEL, D., BELLEMO, G., CHECCHIN, E., DRI, C., MIOTTI, C., MARZOCCHI, M. (2005). Segnalazione di nuove macroalghie per la laguna di Venezia. *Lavori Soc. Ven. Sc. Nat.*, 30: 41-44.

- DRAGAR, C., FITTON J. H., GARDINER. V.A., STRINGER. D., KARPINIEC S., INVENTORI; Marinova Pty Ltd., assegnatario brevetto. Topical composition comprising bioactive sulfated oligosaccharides and cosmetic uses. WO 2013144909A2. 28 Marzo 2013.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, **28**: 350–356.
- DUKE, J.A., ATCHLEY, A.A. (1984). Proximate analysis. In: Christie, B.R. (ed.), *The handbook of plant science in agriculture*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- DUMAY, J., CLÉMENT, N., MORANÇAIS, M., FLEURENCE, J. (2013). Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction. *Bioresource Technol*, **131**: 21-27.
- EDDING, M., MACCHIAVELLO, J., BLACK, H. (1987). Culture of *Gracilaria* sp. in outdoor tanks: productivity. *Hydrobiologia*, **151/152**: 369–373.
- FABREGA, J., LUOMA, S.N., TYLER, C.R., GALLOWAY, T.S., LEAD, J.R. (2011). Silver nanoparticles: behavior and effects in the aquatic environment. *Environ Int*, **37**:512-531.
- FACCA, C., PELLEGRINO, N., CEOLDO, S., TIBALDO, M., SFRISO, A. (2011). Trophic conditions in the waters of the Venice Lagoon (Northern Adriatic sea, Italy). *The Open Oceanography Journal*, **5**:1-13
- FALACE, A., CURIEL, D., SFRISO, A. (2009). Study of the macrophyte assemblages and application of phytobenthic indices to assess the ecological status of the MaranoGrado Lagoon (Italy). *Marine Ecology*, **30**: 480–494.
- FAN, Y., WANG, W., SONG, W., CHEN, H., TENG, H., TENG, A., LIU A. (2012). Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. *Carbohydr Polym*, **88**: 1313–1318.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) FISHERIES AND AQUACULTURE DEPARTMENT (2012). The state of the world's fisheries and aquaculture. FAO. Rome. <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e01.pdf>.

- FAVERO, N., CATTALINI, F., BERTAGGIA, D., ALBERGONI, V. (1996). Metal accumulation in a biological indicator (*Ulva rigida*) from the Lagoon of Venice (Italy). *Arch Environ Contam Toxicol*, **31**:9-18.
- FLAMENT, D., BARBEYRON, T., JAM, M., POTIN, P., CZJZEK, M., KLOAREG, B., MICHE, G. (2007). Alpha-Agarases Define a New Family of Glycoside Hydrolases, distinct from Beta-Agarase Families. *Appl Environ Microbiol*, **73**(14): 4691–4694.
- FLEURENCE, J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci Technol*, **10**: 25-28.
- FLEURENCE, J., MASSIANI, L., GUYADER, O., MABEAU, S. (1995). Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*. *J Appl Phycol*, **7**: 393-397.
- FRANCAVILLA, M., FRANCHI, M., MONTELEONE, M., CAROPPO, C. (2013). The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source. *Mar Drugs*, **11**:3754-3776.
- FRANCAVILLA, M., MANARA, P., KAMATEROU, P., MONTELEONE, M., ZABANIOTOU, A. (2015). Cascade approach of red macroalgae *Gracilaria gracilis* sustainable valorization by extraction of phycobiliproteins and pyrolysis of residue. *Bioresour Technol*, **184**: 305313.
- FREILE-PELEGRIN, Y., ROBLEDO, D. (1997). Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatan, Mexico. *J Appl Phycol*, **9**: 533–539.
- FRIEDEMANN, T.E., KLAAS, R. (1936). The determination of ethyl alcohol. *J Biol Chem*, **115**:47-61.
- FRIEDLANDER, M., LEVI, I. (1995). Cultivation of *Gracilaria* in outdoor tanks and ponds. *J Appl Phycol*, **7**:315-324.
- FURNARI, G., GIACCONE, G., CORMACI, M., ALONGI, G., SERIO, D. (2003). Biodiversità marina delle coste italiane: catalogo del macrofitobenthos. *Biol Mar Med*, **10**: 1-484.
- FUSE, T., GOTO, F. (2014). Studies on utilization of Agar. *Agric Biol Chem*, **35**(6): 799804.

- GABRIELSON, P. W., HOMMERSAND, M. H. (1982). The morphology of *Agardhiella subulata* representing the Agardhielleae. A new tribe in the Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta). *J Phycol*, **18**: 46-58.
- GALLARDO, T., GÓMEZ GARRITA, A., RIBERA, M. A. CORMACI, M., FURNARI, G., GIACCONE, G., BOUDOURESQUE CH. F. (1993). Check-list of Mediterranean seaweeds. II Chlorophyceae Wille s.l. *Bot Mar*, **36**: 399-421.
- GARCIA, V.M.B., DAVIES, O.R. (2006). Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilized metal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*, **1760** : 1304 – 1313.
- GARGIULO, G.M., DE MASI, F., TRIPODI, G. (1992). Morphology, reproduction and taxonomy of the Mediterranean species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycologia*, **31 (1)**: 53-80.
- GARGIULO, M.G., DE MASI, F., TRIPODI, G. (2000). Problemi nomenclaturali, tassonomici e ambientali relativi alle macroalghe della laguna di Venezia. *In*: (Ist. Ven. Sci. Lett. Arti, ed) *La Ricerca Scientifica per Venezia. Il progetto Sistema Lagunare Veneziano*. La Garangola, Padova. Vol. II, pp. 1116-1135.
- GIACCONE, G. (1973). Elementi di Botanica Marina. Parte II, chiave di determinazione per le alghe e le angiosperme marine del Mediterraneo. Pubblicazioni Istituto Botanico, Università di Trieste. serie didattica. pp. 358.
- GIORDANI-SOIKA, A., PERIN, G. (1974). L'inquinamento della laguna di Venezia: studio delle modificazioni chimiche e del popolamento sottobasale dei sedimenti lagunari degli ultimi vent'anni. *Boll Mus Civ Stor Nat Venezia*, **26(1,2)**: 25-68.
- GIUSTI, L., ZHANG, H. (2002). Heavy metals and arsenic in sediments, mussels and marine water from Murano (Venice, Italy). *Environ Geochem Hlth*, **24**: 47–65.
- GLAZER, A.N., FANG, S. (1973). Chromophore Content of Blue-Green Algal Phycobiliproteins. *J Biol Chem*, **248(2)**: 659-662.
- GLAZER, A.N., HIXON, C.S. (1975). Characterization of R-phycocyanin. Chromophore content of R-phycocyanin and C-phycoerythrin. *J Biol Chem*, **250(14)**: 5487-5495.

GOH, C.S., LEE, K.T. (2010). A visionary and conceptual macroalgae-based third generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renew Sust Energy Rev*, **14**(2):42–848.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, E., ANDÚJAR-SÁNCHEZ, M., ORTIZ-SALMERÓN, E., BACARIZO, J., CUADRI, C., MAZZUCA-SOBCZUK, T., IBÁÑEZ, M.J., CÁMARA-ARTIGAS, A., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S. (2014). Thermal and pH Stability of the BPhycocerythrin from the Red Algae *Porphyridium cruentum*. *Food Biophys*, **9**(2): 184-192.

GOTTSCHALK, F., SONDERER, T., SCHOLZ, R.W., NOWACK, B. (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environ Sci Technol*, **43**:9216-9222.

GOVINDAN, M.S., THOMAS, J. , PRATHEESH, P.T., KURUP, G.M. (2012). *Ex vivo* anticoagulant activity of the polysaccharide isolated from *Ulva fasciata*. *Int J LifeSc Bt & Pharm Res*, **1**(3): 193-197.

GRIFFITT, R.J., LUO, J., GAO, J., BONZONGO, J.C., BARBER, D.S. (2008). Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem*, **27**:1972-1978.

GUIRY, M. D., GUIRY, G. M. (2017). AlgaeBase version 4.2. World-wide electronic publication, National University of Ireland. www.algaebase.org.

HADRUP, N., LAM, H.R. (2014). Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver – A review. *Regul Toxicol Pharmacol*, **68**:1-7.

HAGLUND, K. , PEDERSEN M. (1993). Outdoor pond cultivation of subtropical marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* in brackish water in Sweden. Growth, nutrient uptake, cocultivation with rainbow trout and epiphyte control. *J Appl Phycol*, **5**: 271–284.

HANISAK, M.D., RYTHER, J.H. (1986). The experimental cultivation of the red seaweed *Gracilaria tikvahiae* as an „energy crop“: An overview. *Nova Hedwigia*, **83**: 212–217.

HANSEN, H. R., HECTOR, B.L., FELDMAN, J. (2003). A qualitative and quantitative evaluation of the seaweed diet of North Ronaldsay sheep. *Anim Feed Sci Technol*, **105**: 21-28.

HARGREAVES, P. I., BARCELOS, C.A., AUGUSTO DA COSTA, A.C., PEREIRA, N.JR. (2013). Production of ethanol 3G from *Kappaphycus alvarezii*: Evaluation of different process strategies. *Bioresour Technol*, **134** : 257–263.

HASAN, M.R., CHAKRABARTI, R. (2009). Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture A review. FAO Fisheries Technical Paper No 531 . FAO, Roma, p. 135 .

HOCHULI, E., BANNWARTH, W., DOBELI, H., GENTZ, R., STUBER, D. (1988). Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Nat Biotechnol*, **6**: 1321 – 1325.

HORI, T. (1993). An Illustrated Atlas of the Life History of Algae. Brown and Red Algae. Tokyo, Uchida Rokakuho Publishing Co., Ltd. Vol. 2. pp. 345-51.

HUANG, Y.M., RORRER, G.L. (2002). Dynamics of Oxygen Evolution and Biomass Production during Cultivation of *Agardhiella subulata* Microplantlets in a Bubble-Column Photobioreactor under Medium Perfusion. *Biotechnol Prog*, 18(1):62-71.

HUGH, D.J. M. (2003). A guide to seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper, **441**: pp. 1-7.

<https://italian.alibaba.com/>

<https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-biologylearning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/his-taggedproteins-production-purification.html>

<https://worldwide.espacenet.com>

INDEGAARD, M., MINSAAS, J. (1991). In: Animal and Human Nutrition. Seaweed Resources in Europe. Uses and Potential (Guiry, M.D. and Blunden, G., eds). pp. 21-64, John Wiley & Sons.

ISMAIL, M.M., OSMAN, M.E.H. (2016). Seasonal fluctuation of photosynthetic pigments of most common red seaweeds species collected from Abu Qir, Alexandria, Egypt. *Rev Biol Mar Oceanogr*, 51(3):515-525.

- JAYASANKAR, R., KULANDAIVELU G. (1999). Seasonal variation in the biochemical constituents of *Gracilaria spp.* with reference to growth. *Indian J Mar Sci*, **28**: 464–466.
- KAEGI, R., SINNET, B., ZULEEG, S., HAGENDORFER, H., MUELLER, E., VONBANK, R., BOLLER, M., BURKHARDT, M. (2010). Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environ Pollut*, **158**: 2900-2905.
- KALIAPERUMAL, N. , KALIMUTHU S. (1993). Need for conservation of economically important seaweeds of Tamil Nadu coast and time-table for their commercial exploitation. ICAR, Marine Fisheries information service: 119. pp. 5-12.
- KANDLIKAR, M., RAMACHANDRAN, G., MAYNARD, A., MURDOCK, B., TOSCANO, W. A. (2006). Health risk assessment for nanoparticles: A case for using expert judgment. *Nanotechnology and Occupational Health*,**9**:137-156.
- KAO, O., BERNS, D.S., MACCOLL, R. (1971). C-Phycocyanin Monomer Molecular Weight. *Eur J Biochem*, **19**: 595-599.
- KAWASAR, S., FUJII, Y., MATSUMOTO, R., YASUMITSU, H., OZEKI, Y. (2011). Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: extraction, purification and characterization. *Phytol Balcan*, **17(3)**: 347-354.
- KIM, N.J., LI, H., JUNG, K., CHANG, H.N., LEE, P.C. (2011). Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresour Technol*,**102**:7466–7469.
- KOBAYASHI, R., TAKISADA, M., SUZUKI,T., KIRIMURA, K., USAMI, S. (1997). Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci Biotechnol Biochem*, **61(1)**:162-163.
- KUDO, T., MASUDA, M. (1992). Taxonomic features of *Polysiphoniamorrowii* Harvey (Ceramiales, Rhodophyta). *Korean J Phycol*, **7**: 13-26.
- KUMAR, S., GUPTA, R., KUMAR, G., SAHOO, D., KUHAD, R.C. (2013). Bioethanol production from *Gracilaria verrucosa*, a red alga, in a biorefinery approach. *Bioresour Technol*, **135**:150-156.

- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.
- LAHAYE, M., ROCHAS, C. (1991). Chemical structure and physico-chemical properties of agar. *Hydrobiologia*, **126**:137-148.
- LAHAYE, M., ROBIC, A. (2007). Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, **8**: 1765–1774.
- LEIJA, G.J.A., GARIBAY, H.E., RUIZ, P.I., PUENTES, G.J., AVALOS, E.J., VIVAS, L.J.M., ALCANTAR, J.B. (2009). Optimization of the yield and quality of agar from *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilariales) from the Gulf of California using an alkaline treatment. *J Appl Phycol*, **21**: 321–326.
- LEY, A.C., BUTLER, W.L. (1977). Isolation and Function of Allophycocyanin B of *Porphyridium cruentum*. *Plant Physiol*, **59**: 974-980.
- LIGNELL, A., EKMAN, P., PEDERSEN, M. (1987). Cultivation technique for marine seaweeds allowing controlled and optimized conditions in the laboratory and on a pilotscale. *Bot Mar*, **30**:417–424.
- LIU, L.N., CHEN, X.L., ZHANG, X.Y., ZHANG, Y.Z., ZHOU, B.C. (2005). One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *J Biotechnol*, **116**: 91–100.
- LIU, L.N., SU, H.N., YAN, S.G., SHAO, S.M., XIE, B.B., CHEN, X.L., ZHANG, X.Y., ZHOU, B.C., ZHANG, Y.Z. (2009) Probing the pH sensitivity of R-phycoerythrin: Investigations of active conformational and functional variation. *Biochim Biophys Acta – Bioenergetics*, **1787(7)**:939–946.
- LIU, F., MAHMOOD, M., XU Y., WATANABE, F., BIRIS, A.S., HANSEN, D.K., INSELMAN, A., CASCIANO, D., PATTERSON, T.A., PAULE, M.G., SLIKKER, W. JR., WANG, C. (2015). Effects of silver nanoparticles on human and rat embryonic neural stem cells. *Front Neurosci*, **9**: 1-9.
- LORENZEN, C.J. (1967). Determination of chlorophyll in sea water. UNESCO Technical Paper on Marine Sciences. pp. 35–120.

- MABEAU, S., FLEURENCE, J. (1993). Seaweed in food products: Biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci Technol*, **4**:103–107.
- MAKKAR, H.P.S., TRAN, G., HEUZÉ, V., REVERDIN, S.G., LESIRE, M., LEBAS, F., ANKERS, P. (2016). Seaweeds for livestock diets: A review. *Anim Feed Sci Technol*, **212**: 1–17.
- MARCOMINI, A., SFRISO, A., PAVONI, B., ORIO, A.A. (1995). Eutrophication of the Lagoon of Venice: Nutrient Loads and Exchanges. In: Mc Comb, A.J. (Ed.). *Eutrophic Shallow Estuaries and Lagoons*. CRC Press, Boca Raton, pp. 59-80.
- MARINHO-SORIANO, E. (2001). Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). *J Biotechnol*, **89**: 81–84.
- MARINHO-SORIANO, E., BOURRET, E. (2003). Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresour Technol*, **90**: 329– 333.
- MARRION, O., FLEURENCE, J., SCHWERTZ, A., GUEANT, J.L., MAMELOUK, L., KSOURI, J., VILLAUME, C. (2005). Evaluation of protein in vitro digestibility of *Palmaria palmata* and *Gracilaria verrucosa*. *J Appl Phycol*, **17**: 99–102.
- MARTINEZ, A., RODRIGUEZ, M.E., YORK, S.W., PRESTON, J.F., INGRAM, L.O. (2000). Use of UV Absorbance To Monitor Furans in Dilute Acid Hydrolysates of Biomass. *Biotechnol Prog*, **16**: 637-641.
- MAZUMDAR, S., LEE, J., OH, M.K. (2013). Microbial production of 2,3 butanediol from seaweed hydrolysate using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, **136**:329-336.
- MCGILLICUDDY, E., KAVANAGH, S., MORRISON, L., FOGARTY, A., CORMICAN, M., DOCKERY, P., PRENDERGAST, M., ROWAN, N., MORRIS, D. (2017). Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Sci Tot Environ*, **575(1)**:231-246.
- MCHUGH, D.J. (2003). A guide to seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper No 441. FAO, Roma, p. 105.
- MCLACHLAN, J., BIRD, C.J. (1986). *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta) and productivity. *Aquat Bot*, **26**: 27–49.

- MEENA, R., PRASAD, K., GANESAN, M., SIDDHANTA, A.K. (2008). Superior quality agar from *Gracilaria* species (Gracilariales, Rhodophyta) collected from the Gulf of Mannar, India. *J Appl Phycol*, **20**: 397–402.
- MENGES, F. (2016). "SPEKWIN32 – OPTICAL SPECTROSCOPY SOFTWARE", versione 1.72.0, <http://www.ffmpeg2.de/spekwin/>
- MOLLET, J.C., RAHAOUI, A., LEMOINE, Y. (1998). 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*, **10**: 59–66.
- MORETH, C.M., YENTSCH, C.S. (1970). A sensitive method for the determination of open ocean phytoplankton phycoerythrin pigments by fluorescence. *Limnol Oceanogr*, **15**(2):313-317.
- NAVARRO, E., PICCAPIETRA, F., WAGNER, B., MARCONI, F., KAEGI, R., ODZAK, N., SIGG, L., BEHRA, R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reihardtii*. *Environ Sci Technol*, **42**: 8959-8964.
- NIU, J.F., WANG, G.C., TSENG, C.K. (2006). Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev. *Protein Expr Purif*, **46**:23-31.
- NODA, H., AMANO, H., ARASHIMA, K. , NISIZAWA, K. (1990). Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologia*, **204/205**: 577-584.
- NORZIAH, M.H., CHING, C.Y. (2000). Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. *Food Chem*, **68** : 69-76.
- ODUM, H.T. (1956). Primary Production in Flowing Waters. *Limnol Oceanogr*, **1**(2): 102–117.
- OI, V.T., GLAZER, A.N., STRYER, L. (1982). Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analysis of cells and molecules. *J Cell Biol*, **93**:981-986.
- ORLANDINI, M. FAVRETTO, L. (1987). Utilization of macroalgae in Italy for pollution abatement and as source of energy and chemicals. In: P. Morand and E.H. Schultze (Eds.). Aquatic Primary Biomass (marine macroalgae): Biomass Conservation, removal

and use of nutrients. I. Proceedings of the first workshop of the COST-48, Symposium of Sub-Group III, Crema-L'Homeau, CNRS-IFREMER, France. Consortium of the European Communities, DG XII/F Biotechnology. pp. 25–28.

OUAY, B., STELLACCI, F. (2015). Antibacterial activity of silver nanoparticles: a surface science insight. *Nano today*, **10**:339-354.

OUKARROUM, A., BRAS, S., PERREAULT, F., POPOVIC, R. (2012). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol Environ Saf*, **78**:80-85.

OXNER, M. (1962). The Determination of chlorinity by the Knudsen method and hydrographical tables. G. M. Manufacturing Co., New York. pp. 63.

PAN, Q., CHEN, M., LI, J., WU, Y., ZHEN, C., LIANG, B. (2013). Antitumor function and mechanism of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*. *Biol Res*, **46**: 87-95.

PATEL, S. (2012). Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. *3 Biotech.*, **2**(3): 171–185.

PAVONI, B., SFRISO, A., DONAZZOLO, R., ORIO, A. (1990). Influence of waste waters from the city of Venice and the hinterland on the eutrophication of the Lagoon. *Sci Tot Environ*, **96**:235-252.

PELLIZZATO, M., PENZO, P., GALVAN, T., BRESSAN, M. (2005). Insediamento e reclutamento di *Tapes philippinarum*. In: Angeli F.(Ed.). La filiera della vongola, *Tapes philippinarum* in Italia. Franco Angeli s.r.l., Milano, Italy.

PELLIZZATO, M., PENZO, P. (2011). Vongole in alto Adriatico: aspetti biologici e Gestionali. In: Trevisan G. (Ed.). Le vongole dell'alto Adriatico tra ambiente e mercato. Franco Angeli s.r.l., Milano, Italy.

PERIN, G. (1975). L'inquinamento chimico della laguna di Venezia. Sintesi di sette anni di ricerche. Consorzio per la Depurazione delle Acque della Zona 77 Industriale di Porto Marghera, Tavola Rotonda su "Problemi dell'inquinamento lagunare", Venezia. pp. 47-90.

PERRONE, C., CECERE, E. (1994). Two solieriacean algae new to the Mediterranean: *Agardhiella subulata* and *Solieria filiformis* (Rhodophyta, Gigartinales). *J. Phycol.*, **30**: 98108.

- PETROCELLI, A., CECERE, E., VERLAQUE, M. (2013). Alien marine macrophytes in transitional water systems: new entries and reappearances in a Mediterranean coastal basin. *Bioinvasions Rec.*, **2**:177-184.
- PRAIBOON, J., CHIRAPART, A., AKAKABE, Y. , BHUMIBHAMON, O., KAJIWARA, T. (2006). Physical and chemical characterization of agar polysaccharides extracted from the Thai and Japanese species of *Gracilaria*. *Sci Asia*, **32**: 11–17.
- PREDA, A. (1908). Flora Italica Cryptogama. Pars: Algae. Florideae. Società Botanica Italiana. Rocca S. Casciano. Stabilimento Tipografico Cappelli, Vol. I. Fasc. 2. pp. 462.
- QI, H., ZHAO, T., ZHANG, Q., LI, Z., XING, R. (2005). Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *J Appl Phycol*, **17**(6): 527–534.
- RADHOUANI, H., GONÇALVES, C., BACELAR, A.H., GERTRUDES, A., CORREIA, C., OLIVEIRA, J.M., SOUSA, R.A., LEARMONTH, D., REIS, R. L. (2014). Ulvan, a marineinspired biomaterial with superior therapeutic properties? TermStem meeting, Porto, 24 Ottobre 2014.
- RAI, M., YADAV, A., GADE, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *BiotechnolAdvan*,**27**(1): 76-83.
- RAMIREZ, A.O., MERRILL, J.E., SMITH, D.M. (2000). pH Affects the thermal inactivation parameters of R-Phycoerythrin from *Porphyra yezoensis*. *J Food Sci*, **65**(6):1046-1050.
- RATYAKSHI, CHAUHAN, R.P. (2009). Colloidal synthesis of silver nano particles. *Asian J Chem*, **21**(10): 113-116.
- RATTE, H.T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environ Toxicol Chem*, **18**(1): 89–108.
- REBELLO, J., OHNO, M., UKEDA, H., SAWAMURA, M. (1997). Agar quality of commercial agarophytes from different geographical origins: 1. Physical and rheological properties. *J Appl Phycol*, **8**: 517–521.
- RIGOLLET, V., SFRISO, A., MARCOMINI, A., DECASABIANCA, M.L. (2004). Seasonal evolution of heavy metal concentrations in the surface sediments of two Mediterranean

- Zostera marina* L. beds at Thau lagoon (France) and Venice lagoon (Italy). *Bioresour Technol*, **95**: 159–167.
- ROBIC, A., GAILLARD, C. , SASSI, J.F. , LERAT ,Y., LAHAYE M. (2009). Ultrastructure of Ulvan: a polysaccharide from green seaweeds. *Biopolymers*, **98**: 652–664.
- RODARTE, M.A., CARMONA, H.G., MONTESINOS, R.Y.E., HIGUERA A.D.L.,
- RODRIGUEZ, R.R., ALVAREZ, M.J.I. (2010). Seasonal variation of agar from *Gracilaria vermiculophylla*, effect of alkali treatment time, and stability of its Colagar. *J Appl Phycol*, **22**: 753–759.
- ROLEDA, M.Y., MONTANO, N.E., GANZON-FORTES, E.T., VILLANUEVA, R.D. (1997). Acetic acid pretreatment in Agar extraction of Philippine *Gelidiella acerosa* (Forsskaal) Feldmann et Hamel (Rodophyta, Gelidiales). *Bot Mar*, **40**: 63–69.
- ROWAN, K.S. (1989). Photosynthetic Pigments of Algae. CUP Archive, Melbourne.
- RUENESS, J. (2005). Life history and molecular sequences of *Gracilariavermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta), a new introduction to European waters. *Phycologia*, **44**: 120128.
- RUZAFKA, A.P., MARCOS, C., RUZAFKA, P.I.M., MARCOS, P.M. (2010). Coastal lagoons: transitional ecosystems between transitional and coastal waters. *J Coast Conserv*, **15**(3): 369-392.
- RUZAFKA, A.P., MARCOS, C., RUZAFKA, P.I.M. (2011). Mediterranean coastal lagoons in an ecosystem and aquatic resources management context. *Phys Chem Earth*, **36**: 160– 166.
- SARASWAT, S., DESIREDDY, A., ZHENG, D. , GUO, L., LU, H. P., BIGIONI, T.P., ISAILOVIC, D. (2011). Energy Transfer from Fluorescent Proteins to Metal Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, **115** (35):17587–17593.
- SASIM, S.M., EGIERT, J.S., KOSAKOWSKA, A. (2014). Quantitative analysis of extracted phycobilin pigments in cyanobacteria - an assessment of spectrophotometric and spectrofluorometric methods. *J Appl Phycol*, **26**: 2065-2074.
- SFRISO, A., PAVONI, B., MARCOMINI, A., ORIO, A.A. (1988). Annual variation of nutrients in the lagoon of Venice. *Marine Pollution Bulletin*, **19**: 54-60.

- SFRISO, A., RACCANELLI, S., PAVONI, B., MARCOMINI, A. (1991) Sampling strategies for measuring macroalgal biomass in the shallow waters of the Venice Lagoon. *Environ Technol*, **12**: 263–269.
- SFRISO, A., MARCOMINI, A., PAVONI, B., ORIO, A.A. (1993). Species composition, biomass and net primary production in shallow coastal waters: the Venice Lagoon. *Bioresour Technol*, **44**: 235-250.
- SFRISO, A., MARCOMINI, A., PAVONI, B. (1994a). *Gracilaria* distribution, production and composition in the lagoon of Venice. *Bioresour Technol*, **50**:165-173.
- SFRISO, A., MARCOMINI, A., PAVONI, B. (1994b) Distribution, production and composition of *Gracilaria* in the central lagoon of Venice. COST-48 Symposium of Sub Group III, Trieste, pp.1-17.
- SFRISO, A., MARCOMINI, A. (1996). Decline of *Ulva* growth in the lagoon of Venice. *Bioresour Technol*, **58** (3): 299-307.
- SFRISO, A., MARCOMINI, A. (1997). Macrophyte Production in a Shallow Coastal Lagoon. Part I: Coupling with Chemico-Physical Parameters and Nutrient Concentrations in Waters. *Mar Environ Res*, **44**(4): 351 -375.
- SFRISO, A., FACCA, C., CEOLDO, S., SILVESTRI, S., GHETTI, P.F. (2003). Role of macroalgal biomass and clam fishing on spatial and temporal changes in N and P sedimentary pools in the central part of the Venice Lagoon. *Oceanol Acta*, **26**(1):3-13.
- SFRISO, A., FACCA, C., CEOLDO, S., MARCOMINI, A. (2005a). Recording the occurrence of trophic level changes in the lagoon of Venice over the „90s. *Environ Int*, **31**: 993-1001.
- SFRISO, A., FACCA, C., CEOLDO, S., PESSA, G. (2005b). Sedimentation rates, erosive processes, grain-size, and sediment density changes in the Lagoon of Venice. In: Campostrini, P. (Ed.). Scientific Research and safeguarding of Venice. CORILA Research Program 2003 Results, IVSLA, La Garangola, pp. 2003-2013.
- SFRISO, A., CURIEL, D. (2007). Check-list of marine seaweeds recorded in the last 20 years in Venice lagoon and comparison with the previous records. *Bot Mar*, **50**: 22-58.

- SFRISO, A., FACCA, C. (2007). Distribution and production of macrophytes in the lagoon of Venice. Comparison of actual and past abundance. *Hydrobiologia*, **577**: 71–85.
- SFRISO, A., FACCA, C. , GHETTI, P.F. (2007). Rapid Quality Index (R-MaQI), based mainly on macrophyte associations, to assess the ecological status of Mediterranean transitional environments. *Chem Ecol*, **23**: 1–11.
- SFRISO, A., FACCA, C., GHETTI, P. F. (2009a). Validation of the Macrophyte Quality Index (MaQI) set up to assess the ecological status of Italian marine transitional environments. *Hydrobiologia*, **617**:117–141.
- SFRISO, A., CURIEL, D., RISMONDO, A. (2009b). The Venice Lagoon. In: Cecere, E., Petrocelli, A., Izzo, G., Sfriso, A. (Eds). *Flora and Vegetation of the Italian Transitional Water Systems*. CoRiLa, Multigraf, Spinea, pp. 17-80.
- SFRISO, A., MAISTRO, S., ANDREOLI, C., MORO, I. (2010). First record of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta) in the Po Delta lagoons, Mediterranean Sea (Italy). *J Phycol*, **46**: 1024-1027.
- SFRISO, A. (2011). Progetto VE.LA. – Rapporto trofico-biologico. Venezia, CORILA: pp. 14-44.
- SFRISO, A., WOLF, M. A., MAISTRO, S., SCIUTO, K., MORO, I. (2012). Spreading and autoecology of the invasive species *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta) in the lagoons of the north-western Adriatic Sea (Mediterranean Sea, Italy). *Estuar Coast Shelf Sci*, **114**:192-198.
- SFRISO, A., FACCA, C., BON, D., BUOSI, A. (2016). Macrophytes and ecological status assessment in the Po delta transitional systems, Adriatic Sea (Italy). Application of Macrophyte Quality Index (MaQI). *ACTA ADRIAT*, **57(2)**: 209 – 226.
- SFRISO, A., BUOSI, A., FACCA, C., SFRISO, A.A. (2017a). Role of environmental factors in affecting macrophyte dominance in transitional environments: The Italian Lagoons as a study case. *Mar Ecol*, **38(2)**: e12414.
- SFRISO, A., BUOSI, A., MARION, A.W., SFRISO, A.A. (2017b). Invasion of alien macroalgae in the Venice Lagoon, the Italian hotspot of NIS: *Gracilaria vermiculophylla* an emblematic case. *Submitted*.

SFRISO, A.A. (2013). Biochimica e fisiologia, stato trofico e contaminazione da metalli nella vongola filippina e nell'ambiente del bacino centrale della laguna di Venezia. Tesi Magistrale, Università Cà Foscari Venezia, Archivio istituzionale ad accesso aperto.

SFRISO, A.A., MARCHETTO, D., GALLO, M., BALDI, F. (2014). Biochemical characterization of some cyanobacterial strains from salt mariche of the Venice Lagoon. *J Appl Phycol*, 26(1):273-278.

SFRISO, A.A. (2015). Macroalgae growth rates and biomass production in eutrophic areas of the Venice Lagoon. *Biol Mar Mediterr*, 22 (1): 66-67

SFRISO, A.A., GALLO, M., BALDI, F. (2016). Carbohydrate and agar yield: preliminary insights on seasonal variations in *Ulva* and three Gracilariaceae. *Biol Mar Mediterr*, 23 (1): 162-166.

SFRISO, A.A., GALLO, M., BALDI, F. (2017a). Seasonal variation and yield of sulfated polysaccharides in seaweeds from the Venice Lagoon. *Bot Mar*, 60(3): 339–349.

SFRISO, A.A., SFRISO, A. (2017b). In situ biomass production of Gracilariaceae and *Ulva rigida*: The Venice Lagoon as a study case. *Bot Mar*, 60(3): 271-283.

SHEFER, S., ISRAEL, A., GOLBERG, A., CHUDNOVSKY, A. (2017). Carbohydrate-based phenotyping of the green macroalga *Ulva fasciata* using near-infrared spectrometry: potential implications for marine biorefinery. *Bot Mar*, 60: 219–228.

SOEDJAK, H.S. (1994). Colorimetric determination of carragenans and other anionic hydrocolloids with methylene blue. *Anal Chem*, 66: 4514–4518.

SOLTZBERG, L.J., LOR, S., OKEY-IGWE, N.; NEWMAN, R. (2012). 3D Fluorescence characterization of synthetic organic dyes. *Am J Anal Chem*, 3:622-631.

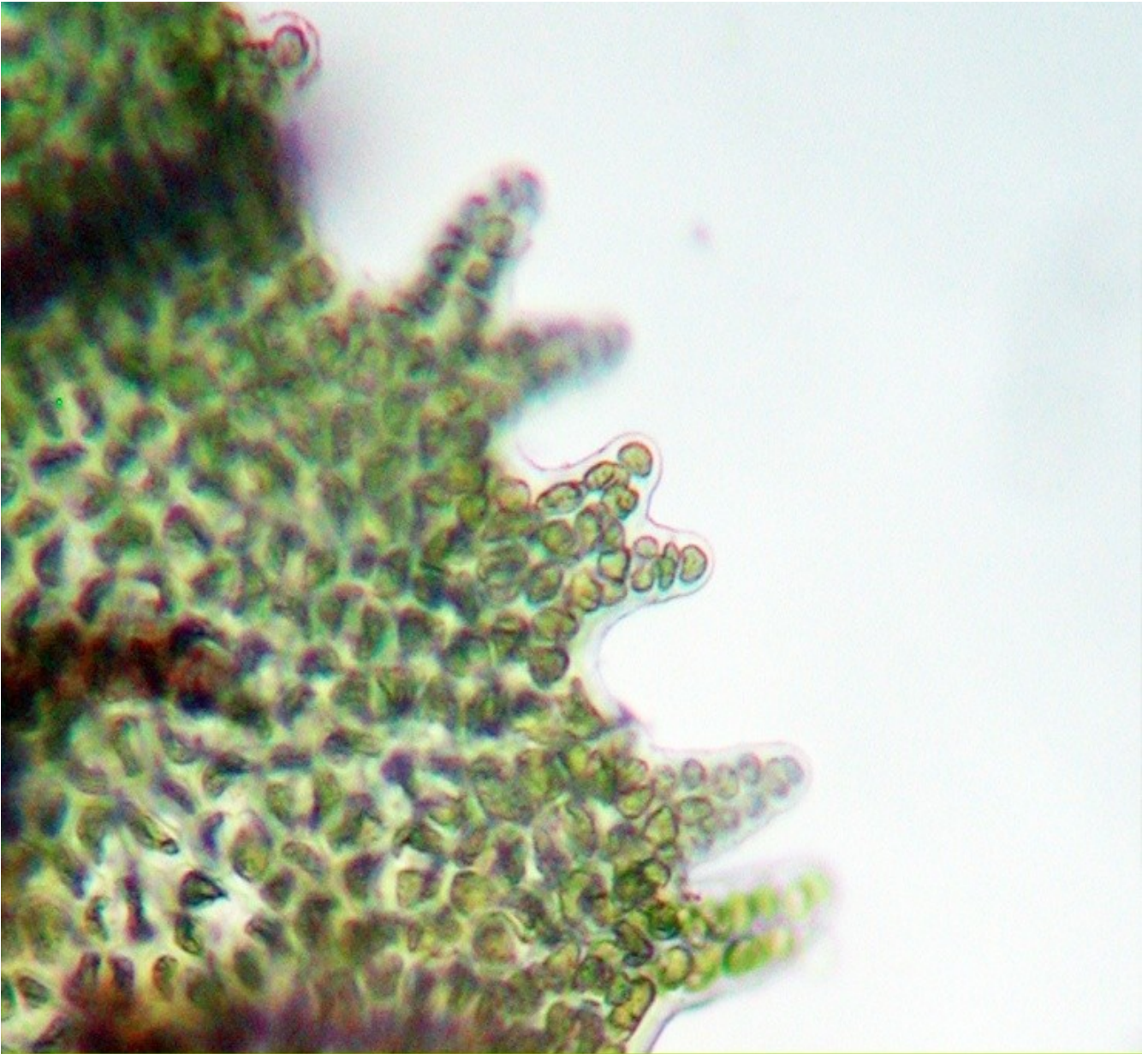
SONANI, R.R., RASTOGI, R.P., PATEL, R., MADAMWAR, D. (2016). Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World J Biol Chem*, 7(1): 100-109.

SONANIA, R.R., SINGHB, N.K., KUMARC, J., THAKARA, D., MADAMWARA, D. (2014). Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. *Process Biochem*, 49 (10):1757-1766.

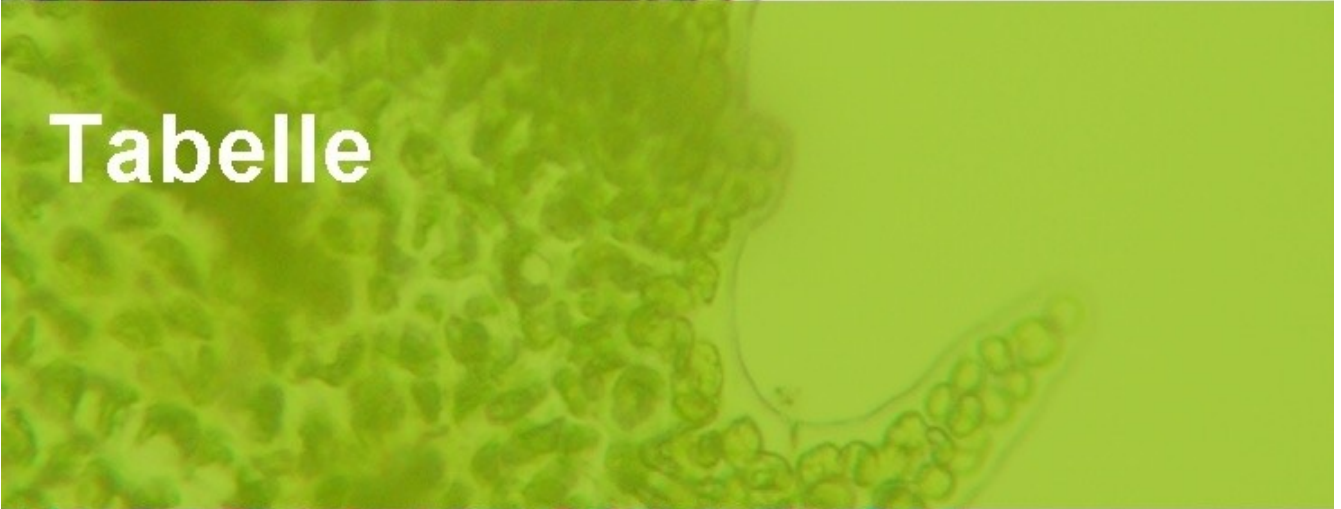
- SOUSA, A.M.M., MORAIS, S., ABREU, M.H., PEREIRA, R., PINTO, I.S., CABRITA, E.J., MATOS, C.D., GONCALVES, M.P. (2012). Structural, physical and chemical modifications induced by microwave heating on native agar-like galactans. *J Agric Food Chem*, **60**: 4977–4985.
- SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*, 101(2):87-96.
- STEENTOFT, M., IRVINE, L.M., FARNHAM, W.F. (1995). Two terete species of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) in Britain. *Phycologia*, 34 (2): 113-127.
- STRICKLAND, D., PARSONS, T.R. (1984) Practical handbook of seawater analysis. 2nd edition. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Canada. pp. 310.
- SUN, L., WANG, S., GONG, X., ZHAO, M., FU, X., WANG, L. (2009). Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. *Protein Expression and Purification*, **64**:146-154.
- SUTHERLAND, J.E., LINDSTROM, S.C., NELSON, W.A., BRODIE, J., LYNCH, M. D., HWANG, M. S., CHOI, H.-G., MIYATA, M., KIKUCHI, N., OLIVEIRA, M.C., FARR, T., NEEFUS, C., MOLS-MORTENSEN, A., MILSTEIN, D., MÜLLER, K. M. (2011). A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta). *J Phycol*, **47** (5): 1131-1151.
- TEODORO, J.S., SIMOES, A.M., DUARTE, F.V., ROLO, A.P., MURDOCH, R.C., HUSSAIN, S.M., PALMEIRA, C.M. (2011). Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: a mitochondrial perspective. *Toxicol In Vitro*, 25(3):664-670.
- THOMSEN, M.S., STAEHR, P.A., NYBERG, C.D., SCHWAERTER, S., KRAUSE-JENSEN, D. , SILLIMAN B.R. (2007). *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss, 1967 (Rhodophyta, Gracilariaceae) in northern Europe, with emphasis on Danish conditions, and what to expect in the future. *Aquat Inv*, **2**: 83–94.
- TOFFANIN, R., CECERE, E., RIZZO, R., KNUTSEN, S.H. (1997). Investigation of the carrageenans extracted from *Solieria filiformis* and *Agardhiella subulata* from Mar Piccolo, Taranto. *Mar Chem*, 58(3–4):319-325.

- TURNER, A, BRICE, D, MURRAY, TB. (2012). Interactions of silver nanoparticles with the marine macroalga *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology*, 21(1):148-54.
- VERLAQUE, M. (2001). Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanol. Acta*, 24: 29-49.
- VIAROLI, P., BARTOLI, M., GIORDANI, G., NALDI, M., ORFANIDIS S., ZALDIVAR, J.M. (2008). Community shifts, alternative stable states, biogeochemical controls and feedbacks in eutrophic coastal lagoons: a brief overview. *Aquat Conserv*, 18: 105–117.
- VIAROLI, P., BASSET, A. (2009). Introduction. In: Cecere, E., Petrocelli, A., Izzo, G., Sfriso, A. (Eds). *Flora and Vegetation of the Italian Transitional Water Systems*. CoRiLa, Multigraf, Spinea, pag. 278.
- VILAR, V.J.P., BOTELHO, C.M.S., BOAVENTURA, R.A.R. (2005). Influence of pH, ionic strength and temperature on lead biosorption by *Gelidium* and agar extraction algal waste. *Process Biochem*, 40(10): 3267-3275.
- VILAR, V.J.P., BOTELHO, C.M.S., BOAVENTURA, R.A.R. (2006). Equilibrium and kinetic modelling of Cd(II) biosorption by algae *Gelidium* and agar extraction algal waste. *Water Res*, 40(2):291-302.
- VISKARI, P.J., COLYER, C.L. (2003). Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Anal Biochem*, 319:263-271.
- ZANDE, M.V.D., VANDEBRIEL, R.J., DOREN, E.V., KRAMER, E., RIVERA, Z.H., SERRANO-ROJERO, C.S., GREMMER, E.R., MAST, J., PETERS, R.J.B., HOLLMAN, P.C.H., HENDRIKSEN, P.J.M., MARVIN, H.J.P., PEIJNEHNBURG, A.C.M.,
- BOUWMEESTER, H. (2012). Distribution, elimination and toxicity of silver nanoparticles and Silver Ions in rats after 28-day oral exposure. *Acsnano*, 8:7427-7442
- ZIMBA, P.V. (2012). An improved phycobilin extraction method. *Harmful Algae*, 17:35–39.
- WAKIBIA, J. G., ANDRESON, R.J., KEATS, D.W. (2001). Growth rates and agar properties of three Gracilarioids in suspended open-water cultivation in St. Helena Bay, South Africa. *J Appl Phycol*, 13:195-207.

- WANG, L., QU, Y., FU, X., ZHAO, M., WANG, S., SUN, L. (2014). Isolation, Purification and Properties of an R-Phycocyanin from the Phycobilisomes of a Marine Red Macroalga *Polysiphonia urceolata*. *PLoS One*, 9(2):e87833.
- WANG, L., WANG, S., FU, X., SUN, L. (2015). Characteristics of an R-Phycoerythrin with two Y subunits prepared from red macroalga *Polysiphonia urceolata*. *PLoS One*, 10(3):e0120333.
- WASHA, M., BINI, C., FONTANA, S., WASHA, A., ZILIOLI, D. (2012). Toxicity assessment of contaminated soils from a mining area in Northeast Italy by using lipid peroxidation assay. *J Geochem Explor*, 113:112–117.
- WARD, T.J., KRAMER, J.R., BOERI, R.L., GORSUCH, J.W. (2006). Chronic toxicity of silver to sea urchin (*Arbacia punctulata*). *Environ Toxicol Chem*, 25(6):1568-1573.
- WEN, L.S., SANTOSCHI, P.H., GILL, G.A., TANG, D.G. (2002). Silver concentrations in Colorado, USA, watersheds using improved methodology. *Environ Toxicol Chem*, 21:2040-2051.
- WILEY, P.S., NEEFUS, C.D. (2007). An improved method for estimating R-phycoerythrin and R-phycocyanin contents from crude aqueous extracts of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J Appl Phycol*, 19:123-129.
- WOLF, M.A., MAISTRO, S., SCIUTO, K., SFRISO, A., ANDREOLI, C., MORO, I. (2011). Morphology and systematics of a new species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from the Mediterranean Sea. *Eur J Phycology*, 46:180-181.



Tabelle



13. TABELLE

Tab. 1a: parametri fisico-chimici dell'acqua

Stazioni		Acqua												
		Temp	prof	DO	FPM	pH	Eh	salinità	[RP]	[Si]	[NH4+]	[NO2-]	[NO3-]	[DIN]
		°C	cm		mg L ⁻¹		mV	psu	μmol L ⁻¹	μmol L ⁻¹	μmol L ⁻¹	μmol L ⁻¹	μmol L ⁻¹	μmol L ⁻¹
TR	min	6,1	70	4,5	11,8	7,9	244	12,9	0,08	1,78	0,28	0,08	0,25	1,43
	media	18,2	103	10,3	35,8	8,3	284	25,1	0,51	14,3	6,51	1,12	9,84	17,5
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	6,9	24	3,8	19,1	0,2	0	5,2	0,40	9,3	9,76	0,83	10,50	18,7
	max	28,3	155	20,8	89,4	8,9	355	36,6	1,48	39,4	49,9	3,90	35,4	78,9
SG	min	4,4	35	4,8	14,6	7,8	209	14,5	0,21	4,21	0,71	0,14	0,5	1,37
	media	17,6	83	10,5	44,6	8,3	279	22,3	1,20	19,8	5,09	1,28	10,7	17,1
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	7,5	25	4,3	29,5	0,3	31	5,4	1,23	10,3	4,53	1,15	11,0	15,0
	max	29,3	135	22,5	115	8,8	332	25,8	5,71	48,2	21,5	5,16	32,4	51,6
SG/TR		0,97	0,81	1,02	1,25	1,00	0,98	0,89	2,37	1,39	0,78	1,15	1,09	0,98

Tab. 1b: parametri fisico-chimici del sedimento e del plancton in colonna d'acqua

Stazioni		Sedimento									Plancton			
		pH	Eh	densità	pelite	sabbia	cappe	Ptot	Pinorg	Porg	tasso di sedim.	Chl-a	Pheo-a	Chl-a tot
			mV	g dw cm ⁻³	%	%	%	µg dw g ⁻¹	µg dw g ⁻¹	µg dw g ⁻¹	g dw m ⁻² giorno ⁻¹	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹	µg L ⁻¹
TR	min	7,2	-201,0	1,05	59%	16%	0,6%	272	223	48,7	83,0	0,10	0,00	0,10
	media	7,6	-116,0	1,10	75%	24%	1,0%	309	253	56,2	371	1,88	2,05	3,93
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	0,2	87,0	0,06	2,2%	13%	14%	52	41,1	10,5	355	1,80	2,38	3,60
	max	7,7	81,0	1,17	83%	40%	1,4%	345	282	63,6	951	8,61	10,2	14,5
SG	min	7,3	-228,0	0,73	73%	8,8%	0,3%	458	343	106	147	0,00	0,03	0,30
	media	7,7	-195,0	0,77	82%	17%	1,2%	492	355	137	667	3,10	2,26	5,36
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	0,2	25,0	0,04	2,3%	7,7%	1,3%	29	13,1	32,0	442	4,12	3,72	7,16
	max	8,0	-137,0	0,81	90%	24%	2,7%	514	369	171	1580	17,9	19,1	30,9
SG/TR		1,02	1,68	0,70	1,10	0,69	1,29	1,59	1,40	2,44	1,80	1,65	1,10	1,36

Tab. 1c: parametri fisico-chimici dell'aria, dell'acqua e parametri di biomassa algale stanziale

Stazioni		Aria		Acqua				Macroalghe		
		luce incidente	luce totale	luce a -5 cm	luce sul fondo		biomassa	copertura		
		μM	μM	μM	% della superficie		kg fw m^{-2}	%		
TR	min	83	210	90	23,7%		41	15,0%	0,05	5
	media	881	1749	1090	58,7%		642	34,0%	1,20	57
		±	±	±	±		±	±	±	±
	SD	537	828	656	15,7%		407	10,6%	1,15	31
	max	1760	3080	2456	113%		1346	52,9%	3,00	100
SG	min	32	96	39,0	25,2%		12	11,2%	0,30	30
	media	930	1820	1140	60,1%		558	28,8%	2,99	82
		±	±	±	±		±	±	±	±
	SD	561	809	620	14,2%		387	12,9%	2,22	24
	max	1930	2950	2140	87,0%		1402	57,5%	8,30	100
SG/TR		1,06	1,04	1,05	1,02		0,87	0,85	2,49	1,45

Tab. 2a : Matrice di correlazione non-parametrica di Spearman tra gli RGR e i parametri ambientali

Stazione	Specie	Temp	Prof	Secchi	DO	FPM	pHw	Ehw	salinità	Chl-a	Pheo-a	Chl-a Tot	[RP]	[Si]	[NH4+]
TR	<i>U. rigida</i>	-0,03	-0,13	0,13	0,00	0,18	0,07	-0,10	0,10	0,09	0,05	0,11	-0,27	-0,04	-0,15
	<i>G. verm.</i>	-0,19	-0,34	0,02	0,20	0,17	0,02	0,11	0,10	-0,34	-0,32	-0,34	-0,24	-0,24	0,01
	<i>G. grac.</i>	0,07	-0,04	-0,10	0,09	-0,01	0,11	0,09	0,11	-0,04	-0,14	-0,11	-0,32	-0,25	-0,10
	<i>G. long.</i>	0,01	0,09	0,04	0,07	-0,21	0,06	0,08	0,04	-0,07	-0,23	-0,16	-0,33	0,01	0,02
SG	<i>U. rigida</i>	-0,11	-0,37	0,14	0,05	0,24	0,04	-0,03	0,05	0,07	0,02	0,09	-0,22	0,14	0,00
	<i>G. verm.</i>	-0,20	-0,54	-0,14	0,40	0,45	0,15	0,08	-0,06	-0,30	-0,26	-0,26	-0,14	-0,05	0,00
	<i>G. grac.</i>	0,03	-0,38	-0,19	0,28	0,27	0,18	0,01	-0,02	0,02	-0,08	-0,02	-0,18	-0,13	-0,05
	<i>G. long.</i>	-0,14	-0,19	-0,04	0,31	0,06	0,18	0,05	-0,16	-0,05	-0,30	-0,14	-0,25	0,09	0,08
TR+SG	<i>U. rigida</i>	0,05	0,01	-0,02	-0,05	0,17	0,13	-0,20	0,08	0,14	0,07	0,12	-0,33	-0,17	-0,29
	<i>G. verm.</i>	-0,19	-0,32	0,05	-0,03	-0,03	-0,10	0,12	0,11	-0,39	-0,39	-0,42	-0,25	-0,38	0,03
	<i>G. grac.</i>	0,09	-0,01	-0,30	-0,03	-0,19	0,13	0,14	-0,04	-0,03	-0,22	-0,15	-0,35	-0,24	-0,17
	<i>G. long.</i>	0,11	0,04	-0,19	-0,11	-0,34	0,03	0,10	-0,13	-0,07	-0,26	-0,19	-0,20	0,15	0,01

Legenda: valori significativi in rosso per $p < 0,05$; abbreviazioni vedi legenda Fig. 5 pag. 151.

Tab. 2b: Matrice di correlazione non-parametrica di Spearman tra gli RGR e i parametri ambientali in *U. rigida*, *G. longissima* (*G.long*), *G. gracilis* (*G.grac.*) e *G. vermiculophylla* (*G.verm.*)

Stazione	Specie	[NO ₂ ⁻]	[NO ₃ ⁻]	DIN	pHs	Eh	Light-s	Light-b	SPM	Biom	Cover	RGR			
												<i>Ulva</i>	<i>G. verm.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. long.</i>
TR	<i>U. rigida</i>	0,03	-0,08	-0,07	0,02	0,05	-0,01	-0,06	-0,18	0,09	0,07	1,00			
	<i>G. verm.</i>	-0,18	0,06	0,02	0,50	0,43	0,27	0,35	0,08	-0,27	-0,36	0,10	1,00		
	<i>G. grac.</i>	-0,13	-0,11	-0,10	0,10	0,38	0,15	0,10	-0,22	-0,19	-0,21	0,13	0,50	1,00	
	<i>G. long.</i>	0,11	0,12	0,10	-0,06	0,32	0,19	0,19	-0,26	-0,39	-0,49	0,15	0,39	0,49	1,00
SG	<i>U. rigida</i>	0,17	0,11	0,11	0,07	0,01	0,14	0,01	-0,15	0,12	-0,05	1,00			
	<i>G. verm.</i>	-0,15	0,07	0,05	0,72	0,68	0,37	0,35	0,15	0,06	-0,29	0,20	1,00		
	<i>G. grac.</i>	-0,04	-0,02	-0,03	0,46	0,47	0,33	0,08	-0,12	0,05	-0,12	0,14	0,51	1,00	
	<i>G. long.</i>	0,16	0,21	0,22	0,21	0,15	0,20	0,08	-0,15	-0,15	-0,42	0,15	0,39	0,28	1,00
TR+SG	<i>U. rigida</i>	-0,16	-0,26	-0,25	0,00	-0,11	-0,09	-0,18	-0,15	0,22	0,28	1,00			
	<i>G. verm.</i>	-0,22	0,04	0,01	0,37	0,19	0,22	0,33	0,31	-0,49	-0,37	0,00	1,00		
	<i>G. grac.</i>	-0,20	-0,17	-0,17	-0,01	0,22	0,10	0,02	-0,12	-0,26	-0,17	0,09	0,54	1,00	
	<i>G. long.</i>	0,08	0,08	0,08	-0,14	0,15	0,23	0,12	-0,12	-0,45	-0,43	0,10	0,37	0,64	1,00

Legenda: valori significativi in rosso per $p < 0,05$; abbreviazioni vedi legenda Fig. 5 pag. 151.

Tab. 3a: Valori medi, massimi e minimi delle principali frazioni biochimiche in *U. rigida*, *G. longissima* (*G.long*), *G. gracilis* (*G. grac.*) e *G. vermiculophylla* (*G. verm.*) su peso secco.

		CARBOIDRATI				POLISACCARIDI SOLFORATI SOLUBILI			
		<i>U. rigida</i>	<i>G.long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>	<i>U. rigida</i>	<i>G.long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>
TR	min	27%	43%	36%	42%	3%	16%	16%	10%
	media	46%	56%	55%	58%	6,3%	31%	23%	30%
		±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	13%	9,7%	9,6%	11%	2,2%	6,9%	6,0%	12,8%
	max	76%	83%	71%	79%	11%	42%	37%	59%
SG	min	32%	49%	46%	44%	1%	19%	12%	5%
	media	45%	60%	61%	55%	5%	32%	27%	19%
		±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	8%	10%	9%	8%	2%	8%	10%	10%
	max	55%	78%	77%	70%	8%	48%	45%	36%
TR+SG	min	27%	43%	36%	42%	1%	16%	12%	5%
	media	46%	58%	58%	57%	6%	31%	25%	25%
		±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	10%	10%	10%	9,4%	2,2%	7,3%	8,0%	13%
	max	76%	83%	77%	79%	11%	48%	45%	59%

Tab. 3b: Valori medi, massimi e minimi delle principali frazioni biochimiche in *U. rigida*, *G. longissima* (*G.long*), *G.gracilis* (*G. grac.*) e *G. vermiculophylla* (*G.verm.*) su peso secco.

		PROTEINE				CENERI			
		<i>U. rigida</i>	<i>G.long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>	<i>U. rigida</i>	<i>G.long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>
TR	min	2,2%	1,2%	1,0%	3,7%	24%	12%	14%	9%
	media	7,3%	12%	11%	11%	32%	33%	31%	32%
		±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	3,2%	5,8%	6,2%	5,6%	7,8%	7,9%	6,3%	9,7%
	max	13%	25%	25%	21%	51%	44%	38%	46%
SG	min	1,3%	1%	6%	6%	23%	15%	14%	12%
	media	7,6%	10%	15%	11%	33%	29%	28%	32%
		±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	3,8%	4%	6%	3%	6,6%	6,7%	7,2%	8,8%
	max	15%	16%	30%	16%	44%	38%	39%	47%
TR+SG	min	1,3%	1,2%	1,0%	3,7%	23%	12%	14%	9,1%
	media	7,4%	11%	13%	11%	32%	31%	29%	32%
		±	±	±	±	±	±	±	±
	SD	3,4%	4,9%	6,4%	4,3%	7,1%	7,4%	6,7%	9,0%
	max	15%	25%	30%	21%	51%	44%	39%	47%

Tab. 4a: Percentuali mensili su peso secco di carboidrati totali, polisaccaridi solforati solubili, proteine totali e ceneri alle Tresse in *U. rigida*, *G. longissima* (*G.long*), *G.gracilis* (*G. grac.*) e *G. vermiculophylla* (*G.verm.*).

STZ.	MESE	CARBOIDRATI				POLISACCARIDI SOLFORATI SOLUBILI				PROTEINE				CENERI			
		<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>	<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>	<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>	<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>
TR	Gen	57	83	71	74	7,7	42	37	41	13	13	25	21	26	12	14	9,1
	Feb	48	58	57	56	7,0	34	25	59	8,6	8,3	16	15	26	27	28	31
	Mar	35	43	36	57	6,8	35	26	26	5,7	12	1,0	5,3	24	44	38	39
	Apr	37	49	51	65	7,8	28	23	27	5,8	12	3,6	7,2	32	39	36	28
	Mag	76	54	64	79	11	16	22	26	5,3	13	6	9,5	24	32	29	29
	Giu	51	53	56	50	5,5	23	16	18	2,2	18	10	6,9	36	32	27	42
	Lug	50	53	56	42	6,0	33	16	42	7,2	8,8	10	3,9	34	37	32	46
	Ago	37	53	43	60	5,1	37	21	10	8,4	1,2	9	3,7	28	37	38	34
	Set	27	59	61	54	4,0	26	21	22	5,1	9,2	10	10	51	37	32	39
	Ott	40	54	47	48	2,6	33	19	34	13	10	13	13	28	33	34	33
	Nov	45	58	55	51	5,2	32	25	33	9,3	11	13	16	39	32	32	32
	Dic	47	56	63	63	7,0	30	29	26	4,6	25	13	16	34	32	28	24

Tab. 4b: Percentuali mensili su peso secco (%dwt) di carboidrati totali, polisaccaridi solforati solubili, proteine totali e ceneri a S. Giuliano in *U. rigida*, *G. longissima* (*G.long*), *G. gracilis* (*G. grac.*) e *G. vermiculophylla* (*G.verm.*).

% dw		CARBOIDRATI				POLISACCARIDI SOLFORATI SOLUBILI				PROTEINE				CENERI			
STZ.	MESE	<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>	<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>	<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>	<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>
SG	Gen	55	73	77	70	7,8	48	36	33	8,7	14	30	9,3	23	15	14	12
	Feb	54	49	46	52	4,3	23	28	36	15	12	13	11	27	28	30	31
	Mar	42	55	58	44	4,6	29	45	19	13	5,2	6	11	33	33	39	41
	Apr	44	78	75	64	3,5	34	30	6,6	4,2	10	16	9,2	27	30	22	47
	Mag	50	60	63	53	3,3	19	33	4,6	5,9	12	15	8,3	41	21	22	32
	Giu	47	74	59	60	2,2	33	30	23	4,8	1,4	15	6,0	44	26	26	33
	Lug	32	55	60	53	1,5	27	31	9,3	1,3	14	16	9,2	43	37	32	38
	Ago	33	56	48	47	4,4	28	13	23	7,4	8,2	10	12	32	33	34	32
	Set	48	49	64	61	7,2	32	19	13	6,8	10	6,3	10	31	38	33	34
	Ott	54	57	56	56	6,0	34	23	16	8,9	11	20	11	33	33	31	33
	Nov	39	53	66	47	5,6	38	12	17	10	9,3	16	15	27	25	22	22
	Dic	44	62	57	54	7,8	41	23	26	5,1	16	16	16	33	32	36	30

Tab. 5: Matrice di correlazione non-parametrica di Spearman tra i parametri ambientali e le principali frazioni biochimiche algali in *U. rigida*, *G. longissima* (*G.long*), *G. gracilis* (*G.grac.*) e *G. vermiculophylla* (*G.verm.*).

MESE	CARBOIDRATI				POLISACCARIDI SOLFORATI SOLUBILI				PROTEINE				CENERI			
	<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>	<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>	<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>	<i>U. rigida</i>	<i>G. long.</i>	<i>G. grac.</i>	<i>G. verm.</i>
Temp	-0,11	-0,20	-0,13	-0,08	-0,47	-0,26	-0,41	-0,76	-0,44	-0,57	-0,12	-0,42	0,37	0,28	0,03	0,53
Prof	0,09	0,09	-0,21	0,01	-0,17	0,03	-0,03	0,06	0,04	-0,08	-0,35	0,13	0,46	0,13	0,01	0,02
DO	-0,27	-0,02	0,06	0,12	0,21	0,14	0,10	0,15	0,10	0,35	0,19	0,26	-0,36	0,07	0,11	-0,08
FPM	0,25	0,34	0,27	0,00	0,38	0,24	0,44	0,68	0,24	0,13	0,32	0,30	-0,08	-0,52	-0,26	-0,57
pHw	-0,44	-0,03	-0,05	0,02	-0,38	-0,12	-0,09	-0,34	-0,13	0,00	-0,04	-0,12	0,15	0,35	0,18	0,35
Ehw	0,02	0,02	-0,13	-0,15	0,33	0,02	-0,01	0,11	0,16	0,47	0,01	0,21	-0,13	-0,08	0,15	-0,03
salinità	0,27	0,14	0,13	0,24	-0,03	0,48	0,14	0,24	0,65	0,40	0,00	0,45	-0,26	-0,34	-0,18	-0,59
Chl-a	-0,30	-0,39	-0,24	-0,15	-0,20	-0,26	-0,51	-0,45	-0,31	-0,35	-0,34	-0,29	0,26	0,57	0,35	0,44
[RP]	-0,05	0,34	0,13	-0,25	0,13	-0,38	0,34	0,07	-0,74	-0,14	0,03	-0,44	0,28	-0,30	-0,30	0,17
[Si]	-0,23	-0,14	-0,09	-0,67	0,25	-0,39	0,01	0,08	-0,57	-0,21	-0,29	-0,40	0,33	0,23	0,16	0,45
[NH4+]	0,06	0,05	-0,15	-0,25	0,49	-0,04	0,25	0,63	0,06	0,31	-0,19	0,17	-0,04	-0,18	0,12	-0,26
[NO2-]	-0,35	-0,19	-0,32	-0,55	0,36	-0,24	0,01	0,46	-0,24	0,03	-0,43	-0,01	0,17	0,30	0,37	0,11
[NO3-]	0,03	0,00	-0,17	-0,24	0,52	-0,07	0,28	0,64	0,00	0,23	-0,17	0,22	-0,14	-0,09	0,10	-0,21
pHs	-0,01	0,15	0,31	0,21	0,09	0,16	0,15	0,17	0,08	0,15	0,58	0,06	-0,35	-0,41	-0,21	-0,32
Ehsed	-0,11	-0,01	-0,13	0,28	0,08	-0,21	-0,24	-0,14	0,14	0,13	0,27	0,37	-0,22	0,05	0,13	0,06
Light-b	0,40	0,02	0,04	0,35	-0,12	0,24	0,02	-0,36	0,12	-0,10	0,33	0,33	-0,36	-0,30	-0,39	-0,05
Biom	-0,22	0,34	0,28	0,02	-0,27	-0,09	0,19	-0,20	-0,31	0,02	0,15	-0,42	0,20	-0,17	-0,10	0,08
Cover	-0,13	0,18	0,24	0,20	-0,39	-0,07	0,00	-0,40	-0,19	-0,19	0,09	-0,48	0,28	0,08	-0,04	0,09

Legenda: valori significativi in rosso per $p < 0,05$; abbreviazioni vedi legenda Fig. 5 pag. 151.

Tab. 6: Produttività e principali componenti nutrizionali in piante vascolarizzate e macroalghe.

specie	prodotto	Produttività fw kg fw m ⁻²	dw/ fw	Produttività	Valori biochimici medi (% dw)**		
				dw kg dw m ⁻²	CHO	PRT	CNR
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	soia	0,2	31%	0,1	31%	42%	5,1%
<i>Zea mays</i> L.	mais	0,5	90%	0,5	83%	11%	1,3%
<i>Triticum aestivum</i> L.	grano tenero	0,3	90%	0,3	84%	12%	1,7%
<i>Saccharum officinarum</i> L.	canna da zucch.	5,7	18%	1,0	94%	3,4%	1,7%
<i>Malus domestica</i> Borkh.	mela	1,7	15%	0,3	92%	1,7%	1,3%
<i>Ipomoea batatas</i> L.	patata dolce	1,1	23%	0,3	89%	6,9%	4,4%
<i>U. rigida</i>	ao-nori	15-25	20%	3,0-5,0	46%	7,4%	32%
<i>G. gracilis</i>	ogo-nori	9,0-21	15%	1,4-3,1	58%	13%	29%
<i>G. longissima</i>	ogo-nori	11-28	15%	1,7-4,2	58%	11%	31%
<i>G. vermiculophylla</i>	<i>Gracilaria</i> nera	14-22	15%	2,1-3,3	57%	11%	32%

*FAO database (FAOSTAT; 2014; media globale)

**Duke et Atchley (1984), USDA Food Composition Database; www.valori-alimenti.com.

Tab. 7: Contenuto di agar native e desolforato in *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* e *Gracilaria vermiculophylla*

Tipo di agar	Species	Agar (%)	da desolforato a nativo (x1.8)		Autori
agar nativo	<i>G. gracilis</i>	30%			Marinho-Soriano (2001)
agar nativo	<i>G. gracilis</i>	26%			Marinho-Soriano et Bourret (2003)
agar desolforato	<i>G. gracilis</i>	(12-18%)	agar nativo →	(22-32%)	Mollet et al. (1998)
agar nativo	<i>G. gracilis</i>	(13-40%)			Rebello et al. (1997)
agar nativo	<i>G. gracilis/G. longissima</i>	39%			Wakibia et al. (2001)
agar nativo	<i>G. gracilis/G. longissima</i>	(21-24%)			Mclachlan et Bird (1986)
agar desolforato	<i>G. longissima</i>	(8-16%)	agar nativo →	(14-29%)	Mollet et al. (1998)
agar desolforato	<i>G. vermiculophylla</i>	18%	agar nativo →	32%	Mollet et al. (1998)
agar desolforato	<i>G. vermiculophylla</i>	14%	agar nativo →	25%	Sousa et al. (2010)
agar nativo	<i>G. vermiculophylla</i>	29%			Vergara-Rodarte (2010)
agar nativo	<i>G. gracilis</i>	(11-45%) 25 %			questo studio
agar nativo	<i>G. longissima</i>	(15-48%) 32%			questo studio
agar nativo	<i>G. vermiculophylla</i>	(4-58%) 25%			questo studio

Legenda: (range min-max%) media%

Tab. 8: Comuni tecniche di estrazione della ficoeritrina da alghe e cianobatteri.

Autori	distruzione/omogenizzazione tessuti (ENG)	Soluzioni estraenti	Time
Benavides <i>et al.</i> (2006)	freeze-thawing/sonication/pestle and mortar	distilled water, 0,02%NaN ₃	10 min
Dumay <i>et al.</i> (2013)	liquid nitrogen & enzyme (xilanase)	acetate buffer 50 mM, pH5	-
Glazer and Fang (1973)	French press	1mM C ₂ H ₆ OS + 50mM C ₂ H ₃ NaO ₂ , pH5.5	30 min
Glazer and Hixson (1975)	freeze-thawing/tissue grinder/French press	10mM PB, pH7.0	-
Moreth and Yentsch (1970)	hand drill tissue homogenizer	100mM PB, pH 6.0	1-5 min
Niu <i>et al.</i> (2006)	freeze-thawing	distilled water, 0,02%NaN ₃	24h
Sasim <i>et al.</i> (2014)	glass tissue grinder	250mM Trizma base , 10mM EDTA, lysozyme	max 30ore
Wiley and Neefus (2007)	pestle and mortar	100mM PB , pH 6.8	24h
Zimba (2012)	freeze-thawing/sonication	PB , Asolectin-CHAPS, pH 3.7 & pH 6.7	-

Tab. 9: Produzione algale e produttività della ficoeritrina.

Specie	Produzione algale*	Autori	Produttività PE
	Kg fw m ⁻² anno ⁻¹		g m ⁻² anno ⁻¹
<i>Gracilaria sp.</i>	2,2 - 23	Edding <i>et al.</i> (1987)	3,0 - 31
<i>G. verrucosa</i>	3,7 - 24	Mclachlan and Bird (1986)	5,5 - 36
<i>G. longissima</i>	11 - 28	Sfriso <i>et Sfriso</i> (2017)	16 - 41
<i>G. vermiculophylla</i>	14 - 22	Sfriso <i>et Sfriso</i> (2017)	17 - 27
<i>P. morrowii</i>	0,15 - 0,24	Sfriso <i>et al.</i> (1994b)	0,10 - 0,16
<i>P. ebnigata</i>	0,37 - 1,70	Sfriso <i>et al.</i> (1994b)	1,10 - 5,10
<i>A. subulata</i>	27	Huang <i>et al.</i> (2002)	61

* I valori riportati sono stati tutti convertiti a Kg fw m⁻² anno⁻¹

Tab 10: Scheda riassuntiva sulle principali caratteristiche dei ceppi batterici selezionati.

sigla	Ve1	Ve25	Ve40	VeHyB
fonte C	agar	agar solforato	agar solforato	idrolizzato
crescita su solido	++	++	+++	++
crescita su liquido	+	+++	+	+++
an/aerobio	aerobio	anaerobio	anaerobio	anaerobio
Gram	Gram -	Gram -	Gram +	Gram +
agar idrolizzato	11%(p/v)/3 giorni	14%(p/v)/3 giorni	N.D.	N.D.
furani	-	cresce con 1g L ⁻¹	inibizione crescita	-30% in 24h
pH finale	7,0	5,5	tra 5 e 6	tra 5 e 6
etanolo a 48h	0	<1 g L ⁻¹	N.D.	<1 g L ⁻¹
acidi grassi a 48h:				
			mg L ⁻¹	
acido acetico	N.D.	24	92	220
propionico	N.D.	0	24	0
iso-butirrico	N.D.	0	0	0
butirrico	N.D.	0	17	0
iso-pentanoico	N.D.	0	20	0
pentanoico	N.D.	0	31	0
iso-caproico	N.D.	0	51	2115
caproico	N.D.	0	48	0
eptanoico	N.D.	0	97	0
note	N.D.	N.D.	N.D.	sviluppo di gas

Legenda: +, ++, +++ corrispondono ai gradi di intensità di crescita; N.D. dato non disponibile; p/v peso su volume.

Estratto per riassunto della tesi di dottorato

Studente: Andrea Sfriso _____ matricola: 816877 _____

Dottorato: in Scienze Ambientali _____

Ciclo: 30° _____

Titolo della tesi : ULVACEAE E RHODOPHYCEAE: CRESCITA, COMPOSIZIONE, POLISACCARIDI SOLFORATI E FITOPIGMENTI PER APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE.

ABSTRACT

Questo studio approfondisce le dinamiche di crescita e la produzione in campo di quattro specie algali a rapido accrescimento: *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima*, *Gracilaria vermiculophylla* e *Ulva rigida*. Inoltre, indaga quelle che sono le principali frazioni biochimiche nelle stesse alghe quanto a contenuto di: carboidrati totali, polisaccaridi solforati idrosolubili, proteine e ceneri durante l'arco di un anno. L'uso congiunto di queste informazioni svela i periodi e le condizioni più idonee per la coltivazione di tali specie e per la produzione di diversi composti. La valorizzazione delle biomasse algali è stata ulteriormente qualificata dallo studio e messa a punto di metodiche innovative, per l'estrazione e la quantificazione delle ficobiliproteine e per la purificazione della ficoeritrina sulle specie di alghe rosse già citate e su altre tre: *Agardhiella subulata*, *Polysiphonia morrowii* e *Pyropia elongata*. Lo studio si completa descrivendo ricerche e metodiche innovative nella loro fase intermedia o preliminare di sviluppo, queste sono: l'idrolisi e la fermentazione delle biomasse ad opera di ceppi batterici lagunari; lo sviluppo di resine ad alta affinità per la purificazione delle proteine "polyhistidina-tag" e la quantificazione dei rilasci d'argento da diverse matrici per mezzo del "quenching" della ficoeritrina.

This study explores the growth dynamics and the field production of four common fast growing macroalgal species: *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima*, *Gracilaria vermiculophylla* e *Ulva rigida*. Moreover, their biochemical fractions were evaluated along one year: i.e. carbohydrates, sulfated polysaccharides, total proteins and ashes. The data collected for both production and composition were evaluated together, to assess the best period and conditions to harvest seaweeds, aiming to maximize the production of specific compounds.

Moreover a new method was developed to extract, measure and purify phycobiliproteins, also from three other species of red seaweeds: *Agardhiella subulata*, *Polysiphonia morrowii* e *Pyropia elongata*. Eventually the last advancements on some incomplete researches and possible future developments were described: the hydrolysis and fermentation of macroalgal biomasses by wild bacterial strains; the production of high affinity resins for polyhistidina-tag protein purification; the quantification of silver released from different matrices by phycoerythrin quenching.

