

L. STABILI<sup>1-2</sup>, M.I. ACQUAVIVA<sup>1</sup>, R.A. CAVALLO<sup>1</sup>, E. CECERE<sup>1</sup>, G. PORTACCI<sup>1</sup>,  
A. PETROCELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ricerca sulle Acque (CNR-IRSA), Sede secondaria di Taranto Via Roma 3, 74123 Taranto (TA), Italia

<sup>2</sup> DISTeBA, Università del Salento, 73100 Lecce (LE), Italia  
loredana.stabili@irsa.cnr.it

## LE MACROALGHE COME BIORISANATORI E LORO APPLICAZIONI IN ECONOMIA CIRCOLARE: IL PROGETTO REMEDIALIFE

### MACROALGAE AS BIOREMEDIATORS AND THEIR APPLICATIONS IN THE CIRCULAR ECONOMY: THE REMEDIALIFE PROJECT

**Abstract** - Here we reported the results of the REMEDIA Life Project concerning macroalgae cultivated in an integrated multitrophic aquaculture (IMTA) system realized in the Gulf of Taranto (Italy). The species *Chaetomorpha linum* (O.F. Müller) Kützing and *Gracilaria bursa-pastoris* (S.G. Gmelin) P.C. Silva were considered. Their bioremediation capability was evaluated as well as their potential exploitation since large amounts of macroalgae were obtained which represented a co-product of bioremediation opening new markets in relation to their high commercial value and in the light of a circular economy in line with the "Blue Growth". Macroalgal biomass could be used to create biotechnological products, including innovative feed (to be supplied directly on the farm during fish farming), fertilizers and bioactive compounds with antioxidant and antibacterial action, useful in the pharmaceutical and nutraceutical fields. Finally, macroalgae could be used in the field of human nutrition as a delicious and healthy "novel food".

**Key-words:** Macroalgae, integrated multitrophic aquaculture, circular economy, antibacterial activity, innovative fodder.

**Introduzione** - Il progetto REMEDIA Life, finanziato dall'Unione Europea, è stato sviluppato per dimostrare l'efficacia di un sistema di Acquacoltura Multitrofica Integrata (IMTA) per mitigare gli effetti negativi sull'ambiente dovuti a un impianto di maricoltura ubicato nel Mar Grande di Taranto. Per la prima volta in Europa, è stata realizzata una gestione eco-friendly dell'impresa, basata sull'impiego di un set innovativo di organismi biorisanatori (policheti, mitili, spugne e macroalghe) affiancato all'allevamento dei pesci. In questo sistema, i policheti, i mitili e le spugne sono organismi filtratori che abbattano la concentrazione di batteri, fitoplancton e particolato in sospensione. Le macroalghe, invece, utilizzano per la loro crescita i sali di azoto e fosforo derivanti dai rifiuti dei diversi organismi evitando l'eutrofizzazione delle acque. Le biomasse dei biorimediatori ottenute nel sistema IMTA sono state notevoli e rappresentano un "co-product" della biorimediazione potenzialmente sfruttabili in un'ottica di economia circolare e in linea con la "Blue Growth". Per quanto riguarda le macroalghe vari studi riportano la loro capacità di sintetizzare una vasta e diversificata gamma di metaboliti secondari con diverse proprietà antiossidanti, antibatteriche, antitumorali ed antinfiammatorie (Dhargalkar & Verlecar, 2009; Perez *et al.*, 2016). Nel progetto sono state coltivate le specie *Chaetomorpha linum* (Chlorophyta, Cladophorales) e *Gracilaria bursa-pastoris* (Rhodophyta, Gracilariales), con ottime performances di crescita. Scopo del presente contributo è quindi fornire una panoramica sui diversi utilizzi delle biomasse algali prodotte in svariati settori tra cui la farmaceutica, la nutraceutica, la dietetica e la mangimistica.

**Materiali e Metodi - Raccolta e coltivazione delle macroalghe** - Dopo la raccolta nel Mar Piccolo, le macroalghe sono state trasportate, trapiantate in retine e coltivate nel sistema IMTA. La coltivazione di *C. linum* è durata da ottobre fino a marzo mentre *G. bursa-pastoris* è stata coltivata da aprile fino a settembre. Sono stati realizzati 3 cicli di coltivazione. L'impianto di maricoltura in cui è stato realizzato il sistema IMTA si estende su una superficie di 0,06 Km<sup>2</sup> ed è situato in un'area semiconfinata del Mar Grande (Mar Ionio, Italia) a circa 600 m dalla costa ed è composto da 15 gabbie (Ø 22 m), disposte a una profondità compresa tra 7 e 12 m che producono circa 100 tonnellate/anno di spigole *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) e orate *Sparus aurata*, Linnaeus, 1758. Le retine contenenti le alghe sono state posizionate attorno alle gabbie di allevamento dei pesci a 0,5 m dalla superficie. Dopo un periodo di permanenza nell'impianto (6 mesi per ciascuna specie), le macroalghe sono state raccolte ed impiegate per i diversi studi.

**Attività antiossidante e antibatterica** - L'estratto lipidico algale è stato ottenuto tramite l'utilizzo di un estrattore soxhlet con una soluzione di cloroformio/metanolo 2:1 a 55°C per 24 ore. L'estratto è stato usato per valutare l'attività antiossidante con due differenti metodi: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) e Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) (Stabili *et al.*, 2016). Lo stesso estratto (concentrazione finale di 5 mg/mL in etanolo) è stato utilizzato per valutare l'attività antibatterica mediante saggio di inibizione di crescita batterica in piastra (metodo Bauer *et al.*, 1966). Sono stati utilizzati ceppi di vibroni e patogeni umani emergenti. Nel saggio un'aliquota pari a 100 µL di ciascuna sospensione batterica è stata seminata per spread plate su piastre contenenti 30 mL di Marine Agar o Plate Count agar rispettivamente. Su ogni piastra, sono stati adagiati dischetti di carta Whatman N° 1 (6 mm di diametro) imbevuti con 100 µL dei differenti estratti algali. Dopo il periodo di incubazione la zona di inibizione attorno al disco evidenziava l'attività antibatterica dell'estratto.

**Realizzazione di un mangime innovativo** - Individui del polichete *Sabella spallanzanii* (Gmelin, 1805) e l'alga *C. linum* ottenuti nel sistema IMTA ripuliti dagli epibionti, sciacquati con soluzione fisiologica sterile all'8‰, essiccati in stufa a 60°C e ridotti in farina sono stati impiegati per l'inclusione nel mangime sperimentale. Il mangime innovativo è stato ottenuto tramite miscelazione delle materie prime tradizionali con quelle sperimentali (farina di policheti e macroalghe in percentuale variabile dal 5 al 10%). Oltre al mangime innovativo, è stato preparato un mangime di controllo avente la stessa composizione dell'innovativo ma nel quale la percentuale di proteine e lipidi derivante da alghe e policheti era sostituita da fonti convenzionali. I due mangimi sono stati usati per una prova di accrescimento di spigola (*Dicentrarchus labrax*, individui giovanili di 36 giorni, peso iniziale medio pari a 0.050 ± 0.001 g) durata 2 mesi con l'impiego di tre vasche "trattamento" e tre vasche "controllo".

**"Novel food" da macroalghe** - È stato determinato il profilo lipidico e il contenuto di acidi grassi delle due specie algali. Per i lipidi totali è stato usato il metodo di Folch *et al.* (1957) mediante estrazione con metanolo/cloroformio/acqua (1/2/1) La composizione degli acidi grassi è stata determinata secondo Budge & Parrish (2003). In breve, gli acidi grassi dei lipidi totali sono stati transesterificati in esteri metilici come riportato da Stabili *et al.* (2014). Dopo raffreddamento è stato aggiunto 1 ml di acqua distillata e si è agitato vigorosamente. Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) sono stati raccolti nella fase benzenica superiore che è stata trasferita in una fiala e l'essiccazione è stata ottenuta mediante flusso di azoto. Le analisi dei FAME sono stati eseguite tramite gascromatografia utilizzando un GC HP 6890 (Hewlett Packard, Wilmington, DE, USA). I

FAME sono stati separati con una colonna capillare Omegawax 250 (Supelco, Bellafonte, PA, USA) e sono stati identificati confrontando i tempi di ritenzione ottenuti con quelli noti standard (FAME mix, Supelco-USA) Tutti i test sono stati condotti in triplicato.

**Risultati - *Biomassa algale*** - La produzione di biomassa algale ottenuta nei tre cicli di coltivazione è stata pari a 1400 Kg nel I ciclo produttivo, 700 Kg nel II ciclo e 1800 Kg nel III ciclo produttivo.

***Attività antiossidante e antibatterica*** - I risultati relativi all'attività antiossidante sono riportati in Tabella 1. L'attività più elevata è stata riscontrata nell'estratto lipidico di *G. bursa-pastoris* sia come TEAC che come ORAC.

Tab.1 - Attività antiossidante degli estratti lipidici algali misurata utilizzando i test chimici *in vitro* TEAC e ORAC (n = 4). Tutti I valori rappresentano la media  $\pm$  la deviazione standard.

*Antioxidant activity of algal lipid extracts measured by using TEAC and ORAC in vitro chemical assays (n = 4). All values represent the mean  $\pm$  standard deviation.*

Specie algale	TEAC ( $\mu\text{mol Trolox Equivalenti/g estratto}$ )	ORAC ( $\mu\text{mol Trolox Equivalenti/g estratto}$ )
<i>Chaetomorpha linum</i>	37,987 $\pm$ 2,297	170,960 $\pm$ 16,829
<i>Gracilaria bursa-pastoris</i>	47,365 $\pm$ 3,990	256,650 $\pm$ 31,647

L'attività antimicrobica era solo presente nell'estratto lipidico di *C. linum* che si è rivelato efficace contro *Vibrio ordalii* e *V. vulnificus*. Al contrario, è stato inefficace contro *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. mediterranei*, *V. parahaemolyticus* e *V. salmonicida*, nonché contro tutti i patogeni umani *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Streptococcus agalactiae*. Gli estratti lipidici algali con queste interessanti attività antibatteriche ed antiossidanti sono stati inseriti in microcapsule per la successiva immissione sul mercato.

***Realizzazione di un mangime innovativo*** - Il mangime innovativo a base di farina di policheti e alghe è risultato stabile rimanendo integro durante la sperimentazione. Esso non ha rilasciato olio nell'ambiente di allevamento e non ne ha modificato i parametri chimico-fisici, come dimostrato dalle misurazioni effettuate. In Tabella 2 sono riportati i risultati ottenuti inclusi i valori di alcuni indici produttivi. L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i trattamenti e i controlli per tutti i parametri misurati con un guadagno in biomassa pari a  $0,55 \pm 0,01$  g nel caso del mangime innovativo e di  $0,62 \pm 0,04$  g nel controllo. Inoltre dalle analisi istologiche condotte non sono state evidenziate alterazioni della mucosa e sottomucosa della tunica dello stomaco nei pesci trattati.

***"Novel food" da macroalghe*** - Grazie alle analisi condotte si è osservato che le alghe coltivate sono particolarmente ricche di lipidi e in particolare di acidi grassi della serie  $\omega 3$  e  $\omega 6$ . Di seguito è riportato il profilo in acidi grassi dell'alga *C. linum*.

Tab.2 – Indici produttivi osservati in esemplari di *Dicentrarchus labrax* nutriti con mangime di controllo e innovativo (ogni valore rappresenta la media  $\pm$  D.S.).

*Production indices observed in Dicentrarchus labrax specimens fed with control and innovative feed (each value represents the mean  $\pm$  S.D.).*

	Mangime di controllo	Mangime innovativo
Biomass gain (g)	0,62 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,01
Tasso specifico di crescita %	4,32 $\pm$ 0,21	4,14 $\pm$ 0,16
Tasso di sopravvivenza	87,00 $\pm$ 2,00	96,00 $\pm$ 2,00
Coefficiente di variazione di lunghezza	7,08 $\pm$ 0,24	6,03 $\pm$ 0,20

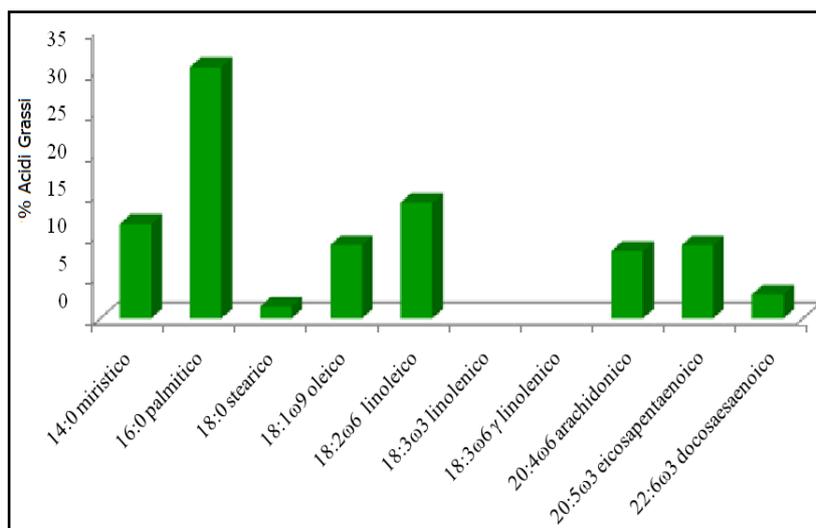


Fig. 1 – Composizione percentuale dei più importanti acidi grassi nell'alga verde *C. linum*.

*Percentage composition of the most important fatty acids in the green alga C. linum.*

**Conclusioni** - Il sistema IMTA realizzato a Taranto può essere visto come un vero e proprio "orto marino" dove coltivare le alghe utili come fonte di composti ad azione antibatterica, antiossidante ma anche come sorgente gli acidi grassi della serie  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 di cui le alghe in questione sono particolarmente ricche utili per l'alimentazione di specie ittiche e come "novel food" per l'alimentazione umana. Questo aspetto è particolarmente innovativo dato che ad oggi conosciamo soltanto il 40% della dispensa marina e dobbiamo guardare al mare con una mentalità più aperta.

### Bibliografia

- BAUER A.W., KIRBY W.M., SHERRIS J.C., TURCCK M. (1966) - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**: 493-496.
- BUDGE S.M., PARRISH C.C. (2003) - FA determination in cold water marine samples. *Lipids*, **38**: 781-791.
- DHARGALKAR V.K., VERLECAR X.N. (2009) - Southern Ocean seaweeds: A resource for exploration in food and drugs. *Aquaculture*, **287**: 229-242.
- FOLCH J., LESS M., STONE STANLEY G.H. (1957) - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**:497-508.
- PÉREZ M.J., FALQUÉ E., DOMÍNGUEZ H. (2016) - Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Mar. Drugs*, **14**: 52.
- STABILI L., ACQUAVIVA M.I., BIANCOLINO F., CAVALLO R.A., DEPASCALI S.A., FANIZZI F.P., NARRACCI M., CECERE E., PETROCELLI A. (2014) - Biotechnological potential of the seaweed *Cladophora rupestris* (Chlorophyta, Cladophorales) lipidic extract. *New Biotechnol.*, **31**: 436-444.
- STABILI L., FRASCHETTI S., ACQUAVIVA M.I., CAVALLO R.A. DE PASCALI S.A., FANIZZI F.P., GERARDI C., NARRACCI M., RIZZO L. (2016) - The potential exploitation of the mediterranean invasive alga *Caulerpa cylindracea*: can the invasion be transformed into a gain? *Mar. Drugs*, **14**: 210-210.