

INTERREG VI-A ITALIA SLOVENIJA 2021-2027

BeBlue Beyond Bluegrass:

Rafforzare l'agroalimentare sostenibile mediante
l'acquaponica

Krepitev trajnostne agroživilske proizvodnje z akvaponiko

INTERREG VI-A ITALIA SLOVENIJA 2021-2027

Bando di Capitalizzazione/ Poziv za Kapitalizacijo N. 01/2022R

Project code: ITA-SI0100069 BeBlue

Start date: September 1st, 2023 – Duration 24 months

D1.3.1

Produzione di pesce e microgreen in acquaponica: linee guida della tecnologia / Akvaponska pridelava mikrozelenja in rib: tehnološke smernice

WP1 – Oltre Bluegrass: digitalizzazione e diversificazione dei prodotti / Nadaljevanje Bluegrass: Digitalizacija in diverzifikacija proizvodov

A1.3 – Test di nuovi prodotti: microgreen e nanotecnologie / Testiranje novih proizvodov: sladkovodna akvaponika

Progetto/ projekt:	INTERREG ITALIA – SLOVENIA BeBlue – Beyond Bluegrass
No del Progetto/ številka projekta:	ITA-SI0100069
Versione/ različica:	1
Data di invio/ datum odpreme:	31/03/2025
Partner responsabile/ odgovorni partner:	UNILJ
Autori/ avtorji:	Ana Slatnar, Vid Žitko, Matteo Maglitto, Andrej Udovč

Tipo di Deliverable / Vrsta končnega izdelka		
R	Documento, Report / Dokument, poročilo	X
DEM	Dimostratore, pilota, prototipo - Demo, pilotni projekt, prototip	X
DEC	Websites, videos, etc. / Spletne strani, videoposnetki itd.	
OTHER		

Livello di divulgazione / Stopnja razširjanja		
PU	Pubblico - Javni	
CO	Confidenziale, solo per i partners di progetto, il segretario tecnico e il Comitato di gestione del programma / zaupno, samo za projektne partnerje, tehničnega sekretarja in odbor za upravljanje programa	x

Approvazione del deliverable / Odobritev izročka		
Autori/ avtorji::	Ana Slatnar, Vid Žitko, Matteo Maglitto, Andrej Udovč	
Approvato internamente/ Interno odobreno	29/3/2025	
Approvato dal WP Leader/ Odobril vodja delovne skupine:	Roberto Pastres (UNIVE)	
Approvato dal coordinator/ Odobril koordinator	Roberto Pastres (UNIVE)	

Contatti del coordinator / Kontakti koordinatorja	
Coordinatore del progetto/ Koordinator projekta	Prof. Roberto Pastres
Ente del coordinator/ Koordinator projekta Organizacija	Università Ca' Foscari di Venezia/ Univerza Ca' Foscari v Benetkah
Indirizzo / naslov	Via Torino 155, 30172, Mestre (VE) - Italia
E-mail	pastres@unive.it
Project web-site	https://www.ita-slo.eu/it/beblue

Interreg
Italia-Slovenija

BeBlue



Cofinanziato
dall'Unione europea
Sofinancira
Evropska unija

D1.3.1 PRODUZIONE DI PESCE E MICROGREEN IN ACQUAPONICA: LINEE GUIDA DELLA TECNOLOGIA	7
BEBLUE IN SINTESI	8
SINTESI	10
INTRODUZIONE	11
MICROGREENING E PISCICOLTURA ACQUAPONICA: LINEE GUIDA TECNOLOGICHE	12
Introduzione teorica	12
CONTESTO E METODOLOGIA	14
Biofortificazione delle piante	14
Come funziona la biofortificazione attraverso il confezionamento?	17
Sfide e vincoli	17
Integrazione di test di ecotossicità e analisi chimico-fisiche	18
Metodologia sperimentale	19
Applicazione pratica	19
Origine e conservazione degli organismi di prova	21
Piano di campionamento	21
RISULTATI CON LE SCOPERTE	23
CONCLUSIONI	28
FONTI:	31
D1.3.1 AKVAPONSKA PRIDELAVA MIKROZELNJA IN RIB: TEHNOLOŠKE SMERNICE	33
BEBLUE NA KRATKO	34
POVZETEK	36
UVOD	37
AKVAPONSKA PRIDELAVA MIKROZELENJAVE IN RIB: TEHNOLOŠKE SMERNICE	38
Teoretični uvod	38
KONTEKST IN METODOLOGIJA	40
Biofortifikacija rastlin	40
Kako deluje biofortifikacija prek embalaže?	42
Izzivi in omejitve	43
Integracija ekotoksičnih testov in kemijsko-fizičnih analiz	43

Eksperimentalna metodologija	44
Praktična uporaba	45
Izvor in ohranjanje testnih organizmov	46
Načrt vzorčenja	46
REZULTATI Z UGOTOVITVAMI.....	48
SKLEPNE UGOTOVITVE.....	53
VIRI:.....	56

BeBlue Beyond Bluegrass:

Rafforzare l'agroalimentare sostenibile mediante
l'acquaponica

D1.3.1 PRODUZIONE DI PESCE E MICROGREEN IN ACQUAPONICA: LINEE GUIDA DELLA TECNOLOGIA

BEBLUE IN SINTESI

BeBlue - Beyond Bluegrass, contribuisce al raggiungimento dell'obiettivo specifico SO2.6 del programma di cooperazione transfrontaliera Italia-Slovenia: "Promuovere la transizione verso un'economia circolare ed efficiente sotto il profilo delle risorse". Il progetto si propone di facilitare la diffusione dell'acquaponica. Mediante questa tecnologia circolare e sostenibile è possibile la co-produzione di pesce a specie vegetali in sistemi a ricircolo. BeBlue capitalizza i risultati conseguiti dal progetto di cooperazione transfrontaliera BLUEGRASS, (<https://2014-2020.ita-slo.eu/bluegrass>), che introdusse l'acquaponica nell'area di programma,

A tal fine, BeBlue predisporrà strumenti per:

- 1) ottimizzare la gestione degli impianti acquaponici, mediante la loro digitalizzazione e lo sviluppo di un prototipo di "Digital Twin";
- 2) dimostrare il potenziale utilizzo di sistemi acquaponici per ottenere prodotti innovativi ad alto valore aggiunto quali: i) macroalghe; ii) salicornia; iii) micro-ortaggi.
- 3) valutare la sostenibilità ambientale dei prodotti, mettendo a punto un calcolatore in grado di fornire l'impronta ambientale di prodotto (Product Environmental Footprint).
- 4) Valutare la sostenibilità economica di tali produzioni, mediante utilizzeremo metodi di analisi di mercato per analizzare l'accettabilità dell'uso della tecnologia acquaponica da parte di produttori e consumatori e svilupperemo uno strumento per valutare il ritorno sugli investimenti dei sistemi acquaponici
- 5) Aumentare la conoscenza e visibilità dell'acquaponica tra gli operatori del settore e i potenziali investitori

Il piano di lavoro di BeBlue si articola in 3 pacchetti, o Work Package, i cui obiettivi specifici sono riassunti di seguito. Oltre ad attività di trasferimento tecnologico o networking, essi includono anche attività di comunicazione e divulgazione, mirate a diverse tipologie di potenziali fruitori.

WP1: Oltre Bluegrass: digitalizzazione e diversificazione dei prodotti

Obiettivi: Migliorare gli impianti pilota messi a punto in BLUEGRASS e sviluppare, mettere alla prova e divulgare strumenti digitali per supportare la gestione e l'ottimizzazione di un impianto acquaponico.

WP2: Strumenti per la valutazione della sostenibilità ambientale ed economica.

Obiettivi: Sviluppare strumenti a supporto degli investitori e operatori nella progettazione e gestione di sistemi acquaponici, fornendo linee guida per selezionare prodotti e strumenti web-based per la valutazione della sostenibilità economica e ambientale.

WP3: Networking e valorizzazione

Obiettivi: favorire lo sviluppo e la valorizzazione delle conoscenze generate dal precedente progetto Bluegrass e dalle nuove attività, rinforzando il networking transnazionale con processi partecipativi e diffusione dei risultati.

SINTESI

Il progetto BeBlue - Beyond Bluegrass si inserisce nel programma di cooperazione transfrontaliera Italia-Slovenia, che mira a promuovere la transizione verso un'economia circolare e l'efficienza delle risorse. Il progetto si concentra sulla diffusione della tecnologia dell'acquaponica, che consente la produzione simultanea di pesci e piante in sistemi a ricircolo, contribuendo così a pratiche agricole sostenibili.

Il rapporto, intitolato "Produzione acquaponica di micropropagazione e pesci: linee guida tecnologiche", descrive i risultati di una sperimentazione sulla produzione integrata di pesci d'acqua dolce e micropropagazione in un sistema pilota presso la Facoltà di Biotecnologie e Acquacoltura (UNILJ), e fornisce linee guida per l'integrazione delle nanotecnologie nei sistemi acquaponici. Poiché la qualità dei raccolti ittici e vegetali e la sicurezza per il consumo e per l'ambiente sono una delle principali preoccupazioni dei gestori dei sistemi di produzione acquaponica, abbiamo condotto esperimenti che integrano test di ecotossicità e analisi chimico-fisiche, oltre al monitoraggio delle tecnologie di produzione.

L'obiettivo di questa attività è stato quello di testare l'efficienza produttiva della produzione integrata di pesci d'acqua dolce e della micropropagazione in un sistema di produzione chiuso e, sulla base dei risultati ottenuti, fornire agli utenti una guida tecnologica appropriata su come implementare questo tipo di tecnologia e, allo stesso tempo, metterli in guardia dai potenziali problemi e rischi di questo approccio.

INTRODUZIONE

Il progetto BeBlue contribuisce a risolvere le sfide tecnologiche e ambientali fornendo strumenti concreti per l'espansione dell'acquaponica nell'area del Programma. L'acquaponica, già introdotta con successo attraverso il progetto BLUEGRASS (<https://www.ita-slo.eu/it/bluegrass>), consente di risparmiare il 90% di acqua rispetto alla coltivazione di piante nel terreno e di ridurre gli oneri ambientali legati alle emissioni di azoto e fosforo dell'acquacoltura. Si tratta di una tecnologia scalabile che consente di installare le piante in una varietà di luoghi, dai terreni agricoli alle aree urbane. Il sistema consente la produzione di cibo sia in aziende agricole domestiche su piccola scala sia in aziende commerciali più grandi con un elevato valore aggiunto. L'acquaponica combina le conoscenze dell'agronomia e dell'acquacoltura, che il progetto BeBlue estende alla produzione di alghe, fortemente promossa dall'Unione Europea.

Nell'era moderna dello sviluppo culinario, i micro germogli stanno diventando un prodotto molto ricercato e, poiché vengono consumati freschi e quindi richiedono brevi percorsi di trasporto tra la produzione e il consumo, la loro produzione in sistemi acquaponici che possono essere allestiti vicino ai mercati di consumo è molto sostenibile e in aumento. Questa è stata una delle ragioni decisive per includere questo tipo di ortaggi nel nostro esperimento pilota.

I microgreens, germogli - giovani germogli di verdure ed erbe commestibili, sono riconosciuti per il loro ricco contenuto nutrizionale, l'aspetto attraente e i sapori forti. Vengono solitamente raccolti tra i 7 e i 21 giorni dopo la germinazione, quando compaiono le prime foglie vere. Sebbene offrano notevoli opportunità per i consumatori, gli chef e i coltivatori attenti alla salute, devono affrontare diverse sfide a livello di coltivazione, distribuzione e commercializzazione.

I microgreens sono spesso definiti "superfoods" perché sono ricchi di sostanze nutritive. Diversi studi hanno dimostrato che i microgreen possono contenere fino a **40 volte più nutrienti** (come vitamine, minerali e antiossidanti) delle verdure adulte.

Punti di forza dei nutrienti:

- Vitamine: elevate concentrazioni di vitamine C, E e K e di betacarotene.
- Minerali: ricchi di calcio, magnesio, ferro e potassio.
- Antiossidanti: polifenoli e altri antiossidanti che proteggono dai danni cellulari e favoriscono la salute generale.
- Sostanze fitochimiche: i microgreen contengono composti benefici che possono contribuire a ridurre il rischio di alcune malattie, tra cui quelle cardiache e il cancro.

MICROGREENING E PISCICOLTURA ACQUAPONICA: LINEE GUIDA TECNOLOGICHE

Introduzione teorica

Le esperienze e le ricerche condotte finora sulla produzione di microgreening in sistemi acquaponici dimostrano che si tratta di un metodo promettente che consente una produzione sostenibile con un uso ridotto di acqua e fertilizzanti minerali, ma che deve affrontare sfide come la **disponibilità sbilanciata di nutrienti, l'accumulo di materia organica nel sistema, il controllo del pH e la sicurezza microbica** (Delaide et al, Uno dei dilemmi principali è il **rapporto tra le esigenze delle piante e gli escrementi dei pesci**, in quanto i sistemi acquaponici spesso non forniscono concentrazioni ottimali di alcuni micronutrienti, che possono influire sulla crescita e sul valore nutrizionale della microdiversità (Saha et al.), Inoltre, vi sono sfide legate alla **potenziale presenza di agenti patogeni**, in quanto i batteri presenti negli escrementi dei pesci possono essere trasferiti alle piante, richiedendo un attento monitoraggio degli standard igienici e dei sistemi di filtrazione (Schmautz et al., 2017). Nonostante queste limitazioni, la ricerca conferma che i sistemi acquaponici rappresentano un **modello efficace per l'agricoltura urbana**, soprattutto con i miglioramenti nella **formulazione dei nutrienti, nella filtrazione biologica e nello sviluppo di sistemi di monitoraggio automatizzati** (Goddek et al., 2019).

L'elevata densità di nutrienti, unita al basso contenuto calorico, rende i microgreens particolarmente interessanti per i consumatori attenti alla salute.

I micro ortaggi hanno una durata di conservazione molto breve, di solito solo 5-7 giorni in condizioni di conservazione ideali. È altamente deperibile e le sue foglie tenere appassiscono rapidamente.

Tabella1 : Famiglie vegetali e specie di alcune delle piante utilizzate nel microgreening e discusse in questa rassegna (Verlinden, 2020)

Famiglia	Tipo
Apiaceae	<i>Coriandrum sativum</i> <i>Daucus carota</i> <i>Petroselinum crispum</i>
Amaranthaceae	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> <i>Beta vulgaris</i> ubsp. <i>vulgaris</i> - gruppo di ciclabili

	<i>Amaranthus spp.</i>
Amaryllidaceae	<i>Allium schoenoprasum</i>
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> <i>Tagetes spp.</i>
Boraginaceae	<i>Borago officinalis</i>
Brassicaceae	<i>Brassica juncea</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>rapa</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>rosularis</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>chinensis</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>niposinica</i> <i>Eruca sativa</i> <i>Lepidium bonariense</i> <i>Raphanus raphanistrum</i> var. <i>sativus</i> <i>Raphanus sativus</i> var. <i>longipinnatus</i>
Fabaceae	<i>Pisum sativu</i> <i>Trigonella foenum-graecum</i>
Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i> <i>Melissa officinalis</i> <i>Perilla frutescens</i>
Poaceae	<i>Triticum aestivum</i> <i>Cereale Secale</i> <i>Zea mays</i>
Poligonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i> <i>Rumex acetosa</i>

Poiché la qualità dei raccolti ittici e vegetali e la sicurezza per il consumo e l'ambiente sono una delle principali preoccupazioni dei gestori dei sistemi

acquaponici, oltre a monitorare le tecnologie di produzione, abbiamo condotto esperimenti che integrano test ecotossicologici e analisi chimico-fisiche.

I test di ecotossicità sono uno strumento fondamentale per il **monitoraggio dei sistemi acquaponici, in quanto forniscono informazioni complementari e spesso più approfondite** rispetto ai tradizionali **parametri chimico-fisici**. Mentre questi ultimi (pH, temperatura, ossigeno disciolto, livelli di azoto e fosfati) descrivono le condizioni ambientali attuali del sistema, i test ecotossicologici valutano l'effettivo impatto biologico di queste condizioni, rivelando **effetti sub-letali e letali** che potrebbero sfuggire alle analisi chimiche convenzionali.

La particolare sensibilità degli organismi utilizzati nei test di ecotossicità consente di rilevare precocemente i cambiamenti ambientali, agendo come un **sistema di allarme precoce** per potenziali problemi nel sistema. Un esempio importante è il **monitoraggio dell'eutrofizzazione**, un fenomeno complesso innescato da un eccesso di nutrienti (principalmente azoto e fosforo) che può minacciare seriamente l'equilibrio dell'ecosistema acquaponico. In questo contesto, i test di ecotossicità permettono di valutare tempestivamente gli effetti biologici dell'accumulo di nutrienti, consentendo misure di prevenzione mirate.

L'integrazione di test di ecotossicità e analisi chimico-fisiche rappresenta un approccio integrato alla valutazione del rischio ambientale, fondamentale per **comprendere le complesse interazioni tra le diverse sostanze chimiche e i loro effetti sinergici sugli organismi acquatici**. Questo approccio integrato supporta una gestione più informata e sostenibile del sistema, garantendo condizioni ottimali per la crescita di pesci e piante e promuovendo la stabilità a lungo termine dell'intero sistema acquaponico.

CONTESTO E METODOLOGIA

Biofortificazione delle piante

Le basi della biofortificazione delle piante: la biofortificazione è il processo di miglioramento del valore nutrizionale delle piante attraverso l'aumento del contenuto di micronutrienti essenziali come il ferro (Fe), lo zinco (Zn) e il selenio (Se), attraverso la riproduzione convenzionale, l'ingegneria genetica o tecniche agronomiche come l'uso di fertilizzanti arricchiti e nanomateriali (Bouis & Saltzman, 2017). La biofortificazione mira a ridurre l'insorgenza di **carenze di micronutrienti** nelle diete umane, poiché molte persone nei Paesi in via di

sviluppo consumano una dieta prevalentemente vegetale, spesso povera di nutrienti essenziali (White & Broadley, 2009).

Esistono tre metodi principali di biofortificazione:

1. **Biofortificazione genetica** - incrocio selettivo o modifica genetica di piante per aumentare il contenuto di nutrienti, ad esempio il riso dorato fortificato con vitamina A (Paine et al., 2005).
2. **Biofortificazione agronomica** - l'uso di fertilizzanti arricchiti o nanofertilizzanti per migliorare il contenuto di micronutrienti nelle piante, come il nano-Zn e il nano-Se per aumentare il contenuto di zinco e selenio nei cereali (Dimkpa & Bindraban, 2018).
3. **Biofortificazione microbica** - l'uso di microrganismi benefici come rizobatteri e funghi micorrizici per aiutare le piante ad assorbire meglio i nutrienti dal suolo (Rana et al., 2020).

La biofortificazione svolge un ruolo importante nel miglioramento della sicurezza alimentare e della salute pubblica, in quanto può contribuire a **ridurre l'anemia, l'indebolimento del sistema immunitario e altre malattie** legate alla carenza di minerali e vitamine essenziali.

Gli studi condotti finora sull'uso delle nanotecnologie per la biofortificazione delle piante dimostrano che i nanomateriali svolgono un ruolo importante nel migliorare il contenuto di nutrienti essenziali, promuovere la crescita e proteggere le piante dai fattori di stress. Le ricerche confermano che le nanoparticelle come il ferro (Fe) su scala nanometrica, il nanozinco (Zn) e il selenio (Se) su scala nanometrica consentono un migliore assorbimento dei micronutrienti nei tessuti vegetali, aumentandone la biodisponibilità per il consumo umano (Rico et al., 2011). Ad esempio, l'uso di nano-Se nella lattuga e negli spinaci ha dimostrato un maggiore accumulo di selenio e una migliore attività antiossidante nelle piante, che potrebbe avere un impatto positivo sulla salute dei consumatori (Rai et al., 2018).

Oltre a migliorare il valore nutrizionale, i nanomateriali contribuiscono ad aumentare la produttività delle piante. Il nano-SiO₂ è stato identificato come un efficace biostimolante che rafforza la struttura meccanica delle piante, aumenta la tolleranza alla siccità e riduce la suscettibilità alle malattie (Khan et al., 2017). Gli studi condotti con il nano-Zn nel microgreening hanno dimostrato una germinazione più rapida e un aumento della biomassa vegetale, oltre a un maggiore contenuto di zinco nella parte commestibile delle piante, fondamentale per prevenire la carenza di questo elemento nella dieta (Mahakham et al., 2017).

Nonostante i numerosi effetti positivi, la ricerca evidenzia anche potenziali rischi. Alte concentrazioni di alcune nanoparticelle possono causare fitotossicità, che influisce negativamente sulla crescita e sullo sviluppo delle piante. Inoltre, gli effetti a lungo termine dei nanomateriali sull'ecosistema e sulla salute umana non sono ancora del tutto noti e sono necessari un uso cauto e ulteriori studi per determinare le concentrazioni sicure (Tripathi et al., 2017). Nonostante queste sfide, le nanotecnologie rappresentano un grande potenziale per la biofortificazione delle piante e l'agricoltura sostenibile, in quanto offrono una maggiore sicurezza alimentare e riducono la necessità di fertilizzanti minerali e pesticidi.

La questione se la biofortificazione delle piante sia più efficace con le **sementi o con l'applicazione fogliare** dipende dal tipo di pianta, dal micronutriente applicato e dalle condizioni di coltivazione. Entrambi i metodi hanno vantaggi e limiti, con la ricerca che dimostra che **l'applicazione fogliare (foliar) è spesso più efficace per l'assorbimento rapido e mirato dei micronutrienti**, mentre **l'applicazione delle sementi consente una distribuzione più uniforme dei nutrienti e un approvvigionamento a lungo termine della pianta** (Ranjbar et al., 2021).

1. Biofortificazione mediante applicazione alle sementi

Il trattamento dei semi con nanoparticelle o micronutrienti migliora la **germinazione, la crescita iniziale e lo sviluppo delle radici**, consentendo un migliore assorbimento dei nutrienti dal substrato (Mahakham et al.), I semi possono immagazzinare e rilasciare gradualmente i nutrienti, riducendo la necessità di applicazioni successive di fertilizzanti (Dimpka & Bindraban, 2018). Tuttavia, l'efficacia di questo metodo può essere limitata a causa della **bassa mobilità di alcuni nutrienti** all'interno della pianta e del potenziale di effetti fitotossici a concentrazioni troppo elevate di nanomateriali (Liu & Lal, 2021).

2. Biofortificazione mediante applicazione fogliare (applicazione fogliare)

L'applicazione fogliare consente un **assorbimento più rapido dei micronutrienti** ed è particolarmente efficace per elementi come il ferro (Fe), lo zinco (Zn) e il selenio (Se), che hanno una mobilità limitata dalle radici alle parti superiori della pianta (White & Broadley, 2009). Le nanoparticelle possono essere assorbite rapidamente attraverso le fessure o la cuticola della foglia, il che aumenta la biodisponibilità dei micronutrienti e riduce le perdite dovute alla fissazione nel suolo (Rico et al., 2011). Tuttavia, le sfide possono essere legate all'**efficienza dell'applicazione**, poiché i nanomateriali possono rimanere sulla superficie fogliare senza essere

trasferiti all'interno della pianta, e concentrazioni eccessive possono anche causare **stress o tossicità** (Tripathi et al., 2017).

La biofortificazione è possibile applicando micronutrienti o sostanze bioattive all'imballaggio, che agisce come **fonte di nutrienti che vengono gradualmente rilasciati nell'alimento**. Questo approccio è particolarmente interessante per le colture sensibili come il **microgreening**, dove l'**imballaggio attivo** può prolungare la durata di conservazione, migliorare il valore nutrizionale e proteggere dalla contaminazione microbica (Emamifar et al., 2011).

Come funziona la biofortificazione attraverso il confezionamento?

1. **Deposizione di micronutrienti o nanoparticelle sulla superficie interna dell'imballaggio** - **Elementi biodisponibili** come **zinco (Zn), ferro (Fe) o selenio (Se)** vengono depositati sull'imballaggio e poi **rilasciati gradualmente nell'alimento**, aumentandone il valore nutrizionale (García et al., 2018).
2. **Uso di imballaggi attivi con attività antibatterica** - Nanoparticelle di argento (Ag), zinco (ZnO) o silicio (SiO₂) possono impedire la **crescita di agenti patogeni e l'ossidazione dei nutrienti**, prolungando **la freschezza e la sicurezza degli alimenti** (Silva et al., 2019).
3. **Confezionamento che regola il rilascio dei nutrienti** - L'incapsulamento dei micronutrienti in **nanomateriali polimerici** consente un **rilascio controllato** dei minerali a seconda dell'**umidità, del pH o della temperatura**, che può aumentare la stabilità e l'assorbimento dei nutrienti negli alimenti (Ranjbar et al., 2021).

Sfide e vincoli

- **Controllo del rilascio dei nutrienti** - È essenziale che i micronutrienti siano rilasciati **in una forma biodisponibile** senza alterare **il gusto, la consistenza o la qualità dell'alimento**.
- **Sicurezza e regolamentazione** - L'uso di nanoparticelle negli imballaggi richiede **test per verificare l'impatto sulla salute umana e sull'ambiente**, per prevenire la potenziale tossicità o la migrazione di sostanze indesiderate negli alimenti (Arfat et al., 2018).
- **Sostenibilità** - La ricerca è alla ricerca di **materiali biodegradabili o riciclabili** che permettano un **uso ecologicamente accettabile dell'imballaggio attivo**.

Attività 1.3

La micropropagazione può essere coltivata in sistemi privi di suolo e con risorse limitate: i loro brevi cicli di crescita possono essere ottimizzati selezionando specie ittiche appropriate, regolando la densità dei pesci e utilizzando alimenti adeguati. Abbiamo testato l'uso delle nanotecnologie in acquaponica per i microgreens nel sistema acquaponico di Lubiana. In questo modo, abbiamo voluto verificare se **(1)** migliora le proprietà delle piante, aumentando così la resistenza alle malattie e agli stress ambientali; **(2)** migliora la funzione dei tessuti o degli organelli delle piante, producendo così un alimento funzionale; e **(3)** prolunga la durata di conservazione dei microgreens impregnando le nanoparticelle nell'imballaggio.

Integrazione di test di ecotossicità e analisi chimico-fisiche

Per la valutazione della qualità dell'acqua nel sistema acquaponico d'acqua dolce situato presso la Facoltà di Biotecnologie dell'Università di Lubiana, l'organismo bioindicatore scelto è stato l'alga verde unicellulare comunemente nota come *Selenastrum capricornutum* (precedentemente nota come *Pseudokirchneriella subcapitata*, ma attualmente ribattezzata *Raphidocelis subcapitata*), che verrà indicata come *S. capricornutum* in tutto il presente rapporto. Questa specie è stata scelta per la sua particolare **sensibilità** anche alle **condizioni di eutrofizzazione**, ma anche per la **semplicità e la velocità del test**.

Selenastrum capricornutum

L'alga verde unicellulare *Selenastrum capricornutum* (Figura 1) è diventata un organismo chiave nel campo dell'ecotossicologia grazie alle sue caratteristiche. Questa microalga verde unicellulare è diventata un punto di riferimento nei test di laboratorio grazie alla sua rapida crescita, alla facilità di coltivazione e, soprattutto, alla sua capacità di rispondere in modo sensibile e prevedibile alla presenza di inquinanti, come i costituenti chimici puri delle acque reflue industriali e urbane, nonché allo studio degli effetti di pesticidi e fertilizzanti. La sua tendenza a crescere in sospensione senza formare aggregati, insieme alle dimensioni uniformi delle cellule, la rende particolarmente adatta alla realizzazione di test standardizzati.



Immagine1 - *Selenastrum capricornutum*

La sua reattività ai nutrienti, in particolare ai composti azotati, è interessante: sebbene

i composti azotati siano una delle principali fonti di nutrienti per l'organismo, **un** loro **eccesso** può innescare diversi meccanismi **tossici**. **L'ammoniaca** può causare stress ossidativo e danni alle membrane cellulari, i **nitrati** possono saturare i sistemi di assimilazione dell'azoto oltre certe concentrazioni, mentre i **nitriti** interferiscono con i sistemi di trasferimento degli elettroni.

I test con *S. capricornutum* seguono protocolli rigorosi e standardizzati a livello internazionale, stabiliti da organizzazioni come l'OCSE e l'EPA. Durante i test vengono monitorati diversi parametri, dal tasso di proliferazione cellulare a eventuali cambiamenti morfologici e all'**efficienza fotosintetica**. I test forniscono risultati in tempi relativamente brevi (72-96 ore), sono a basso costo e garantiscono un'elevata riproducibilità.

Metodologia sperimentale

Il protocollo sperimentale prevedeva l'uso di colture de-immobilizzate di *Selenastrum capricornutum* esposte **per 96 ore** a campioni d'acqua prelevati da diversi punti del sistema acquaponico. Dopo il periodo di esposizione, è stata valutata la concentrazione **di clorofilla** e l'eventuale **inibizione rispetto al gruppo di controllo (controllo negativo)**.

L'analisi della clorofilla è stata eseguita secondo la procedura metodologica standardizzata APAT-IRSA/CNR (29/2003 Manuals and Guidelines), che prevede l'estrazione del pigmento dalla biomassa algale mediante incubazione in acetone al 90% per 24 h, seguita dalla quantificazione mediante misure spettrofotometriche. Questo approccio metodologico ha permesso di ottenere una valutazione quantitativa dell'impatto dei campioni sulla fisiologia dell'organismo in esame.

Applicazione pratica

L'implementazione di un sistema di monitoraggio biologico basato su *Selenastrum capricornutum* è stata concepita come **strumento complementare alle analisi chimiche** nei sistemi acquaponici. L'importanza di integrare questo approccio biologico deriva dalla sua capacità di fornire una valutazione più completa dello stato del sistema. Mentre le analisi chimiche forniscono una "istantanea" dei parametri dell'acqua, l'uso di bioindicatori **permette di valutare l'effetto biologico cumulativo delle** condizioni del

sistema, agendo come un sistema di identificazione di potenziali problemi. I bioindicatori possono rivelare problemi che potrebbero non essere immediatamente evidenti dalle sole analisi chimiche, consentendo **un allarme precoce** e quindi l'adozione di azioni preventive per gestire il sistema in modo più efficace.

Infatti, la sola osservazione visiva del colore delle alghe nella cuvetta può fornire importanti informazioni preliminari sullo stato di salute del sistema: **un colore** che si discosta dal tipico verde intenso può indicare cambiamenti nei parametri di crescita, stress metabolico o squilibri nutrizionali. Per un'analisi più dettagliata del contenuto di pigmenti, si possono utilizzare **tecniche spettrofotometriche** per determinare l'esatta composizione e concentrazione dei pigmenti fotosintetici, fornendo informazioni quantitative sullo stato metabolico e di stress delle microalghe.

Un aspetto tecnico importante è la possibilità **di collegare alcuni dei fotobioreattori** per la crescita della popolazione algale unicellulare direttamente al sistema acquaponico senza la necessità di complesse modifiche strutturali, consentendo un'implementazione rapida e poco invasiva. È quindi possibile implementare il sistema come **soluzione "fai-da-te"** dopo un'adeguata formazione iniziale degli allevatori o degli agricoltori. Da un punto di vista economico, il sistema è interessante anche per i piccoli produttori. La messa a punto iniziale richiede un investimento moderato per l'acquisto delle attrezzature di base, come un fotobioreattore e uno spettrofotometro portatile per le analisi in campo, che può essere utilizzato anche per le analisi chimiche. I costi operativi sono limitati principalmente all'acquisto del terreno di coltura e dei materiali di consumo, il che consente al sistema di essere sostenibile a lungo termine. I costi dell'investimento iniziale possono essere ammortizzati **riducendo la frequenza delle analisi chimiche esterne** e, soprattutto, prevenendo problemi che potrebbero richiedere interventi costosi. Infine, i produttori possono sviluppare il proprio database di riferimento specifico per il loro sistema, integrando il controllo biologico nelle loro normali pratiche di gestione.

Origine e conservazione degli organismi di prova

Le microalghe *Selenastrum capricornutum* sono state ottenute in provette contenenti **perle algali**, con la possibilità di de-immobilizzare gli organismi in meno di 30 minuti, quando richiesto per i test di tossicità in acqua dolce (Figura 2). Il terreno di coltura è stato preparato secondo le specifiche del metodo US-EPA del 1978. Le restanti colture algali sono state conservate nel laboratorio animale del sito Shoreline, situato nel Parco Scientifico di Padriciano (Trieste), dove sono state mantenute in **condizioni ambientali controllate**, con particolare attenzione alla temperatura, al regime luminoso e all'ossigenazione.



Figura2 - Alimentazione di colture algali e di una provetta di perle di *Selenastrum capricornutum* de-immobilizzate.

Piano di campionamento

Il monitoraggio del sistema acquaponico di acqua dolce situato presso l'Università di Lubiana è stato effettuato attraverso **due eventi di campionamento nei mesi di ottobre e dicembre 2024**. Sono stati individuati sei punti di campionamento strategici per caratterizzare le diverse sezioni del sistema, consentendo di monitorare il flusso d'acqua attraverso il sistema (Figura 3).

Punti di campionamento		Codice
a	Immissione di acqua nelle vasche per pesci	F_IN
b	Uscita dell'acqua dalle vasche dei pesci	F_OUT
c	Pozzetto	SM
d	Tecnica del film nutritivo	NFT
e	Flusso e riflusso	EF

f	Cultura in acque profonde	DWC
---	---------------------------	-----

Il campionamento ha riguardato sia la **parte ittica** del sistema, con prelievi all'ingresso e all'uscita delle vasche dei pesci e nella sump, sia le diverse **sezioni idroponiche** rappresentate dai sistemi Deep Water Culture, Nutrient Film Technique e Ebb and Flow (Tabella 1). Questa disposizione dei punti di campionamento consente di monitorare eventuali variazioni della qualità dell'acqua lungo l'intero percorso del sistema.

Per ogni punto di campionamento sono stati raccolti campioni d'acqua per l'**analisi dei parametri chimico-fisici** e delle concentrazioni **di nutrienti**, oltre che per i **test ecotossicologici** condotti utilizzando la microalga *Selenastrum capricornutum* come organismo bioindicatore d'acqua dolce.

Tabella 1 - Punti di campionamento

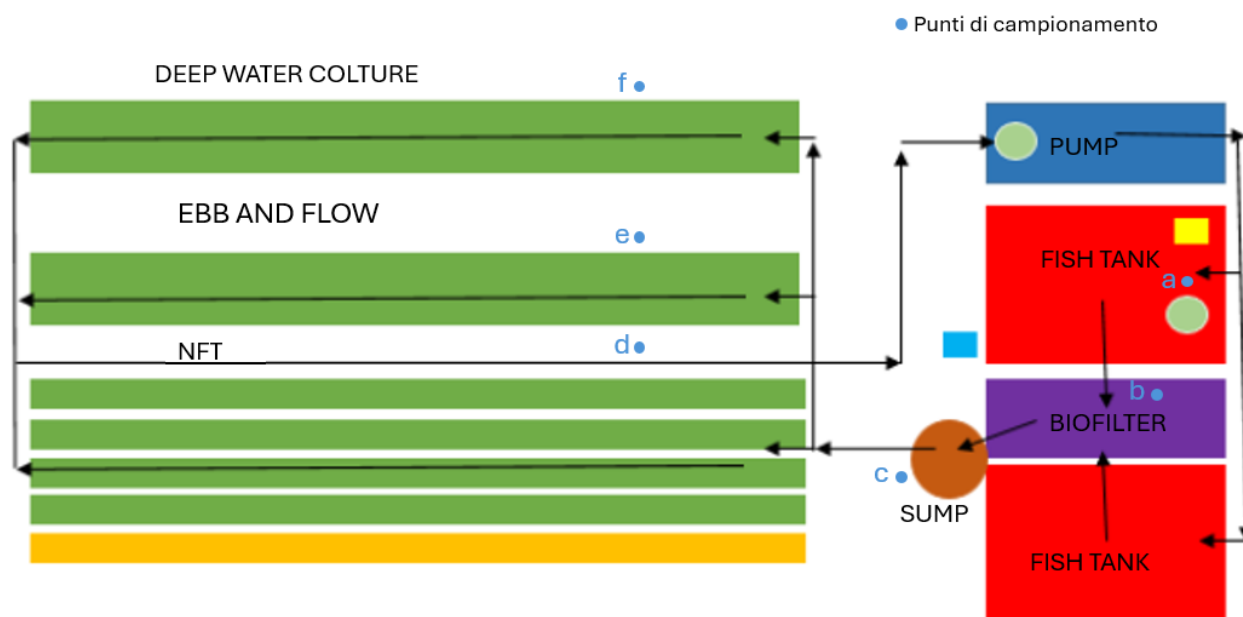


Figura3 - Schema del sistema acquaponico con i punti di campionamento.



Figura4 - Campionamento nel sistema

RISULTATI CON LE SCOPERTE

I test sui substrati di crescita hanno mostrato la migliore idoneità dell'uso di fibre di canapa e di cellulosa, con risultati migliori quando si sono utilizzati i tamponi in fibra di canapa, poiché i tamponi in cellulosa hanno trattenuto un alto livello di acqua, nonostante la massima riduzione del flusso nel canale NFT. La densità di semina è stata effettuata secondo le raccomandazioni degli esperti e dipende dalla massa assoluta dei semi di ciascuna specie vegetale.

La densità di semina dipende dal tipo e dalla varietà di microgreens e dallo stadio di sviluppo in cui vengono raccolti. Ad esempio, la densità può variare da un seme per cm² per i piselli e il girasole a 10 semi per cm² per le specie e le varietà che hanno semi piccoli (crescione, ecc.). Aumentando la densità di semina da uno a tre semi per cm² per i microgreen di rucola, mizuna e senape si è notata una differenza significativa nel peso dei microgreen appena raccolti.

Per una germinazione più rapida, mettere a bagno i semi più grandi (ad esempio, fagioli, piselli, barbabietole e girasoli) in acqua tiepida per alcune ore o per tutta la notte. Cospargere uniformemente il seme o la miscela di semi selezionati e premerlo leggermente nel substrato di coltivazione. Spruzzare leggermente l'acqua sui semi e aggiungere acqua al terreno di coltura per mantenerlo umido.

Posizionare il vassoio su un davanzale ed esporlo alla luce del sole. Aggiungere regolarmente acqua al vassoio ogni giorno e cospargere i semi o, più tardi, la germinazione. Bisogna fare attenzione a non far seccare i semi/germi e a non bagnare troppo (sviluppo di malattie). Nelle giornate di sole, ci siamo aiutati coprendo i canali con tessuti sottili (ad esempio le ortiche per coprire le verdure in primavera), che sono serviti a mantenere umidi i semi e lo strato superiore del terreno di coltura, ma solo fino allo stadio di emergenza.



Immagine: semi di ravanella e di pisello su cuscinetti di canapa e cellulosa.

Una volta scelto il terreno di coltura e la densità di semina, abbiamo deciso di testare i germi utilizzando la nanotecnologia. Seguendo le raccomandazioni e considerando la velocità del ciclo di crescita e la possibilità di introdurre il nanonutriente nell'intero sistema acquaponico, poiché non sappiamo quale sarebbe il possibile effetto sulle altre piante incluse nel sistema e sui pesci, abbiamo deciso di testare il possibile arricchimento con selenato di sodio (Na_2SeO_4) attraverso le foglie.

Benefici dell'applicazione fogliare del selenio:

- Assorbimento più rapido e maggiore efficienza - Il Se è assorbito più facilmente e rapidamente dalle piante attraverso i pori delle foglie che attraverso le radici.
- Aumento mirato del Se nella parte commestibile della pianta - Per il microgreening, il contenuto chiave di Se è nelle foglie, dove il Se si accumula durante l'applicazione fogliare.
- Ridotta perdita di nutrienti - Quando viene applicato per via fogliare, il Se non è soggetto a legami nel terreno di coltura o a lisciviazione, come può accadere quando viene coltivato nel suolo.

Dopo aver esaminato la letteratura, abbiamo scelto una concentrazione di 10 mg/L (0,126 mM Se). L'applicazione è stata effettuata quando i cotiledoni erano aperti. Eravamo interessati a capire se l'applicazione di selenio avrebbe (1) migliorato le proprietà del microgreening e (2) migliorato il contenuto di selenio

del microgreening (biofortificazione), producendo così un alimento funzionale. Siamo giunti a una conclusione interessante. Sia nel pisello che nel cavolo rapa, l'applicazione di selenio non ha influenzato lo spessore dell'epidermide superiore e inferiore, del tessuto a palizzata e del tessuto spugnoso, né il numero di lobi delle foglie. Non sono state riscontrate differenze nella resa di entrambe le specie. La determinazione del contenuto di selenio nella parte commestibile è aumentata di 6,5 volte rispetto al germe di pisello non trattato e di 7,8 volte rispetto al germe di ravanella non trattato. Possiamo essere soddisfatti dei risultati di , poiché il contenuto di Se nei microgreens può essere aumentato in modo significativo mediante applicazione fogliare (biofortificazione fogliare), con un aumento che dipende dalla concentrazione di Se applicata, dalla forma di Se e dalla specie vegetale. Uno studio condotto finora sui germogli di broccoli (Puccinelli et al., 2017) ha dimostrato che l'applicazione fogliare di 10 μM di seleniato di sodio (Na_2SeO_4) ha aumentato il contenuto di Se nei germogli da 10 a 20 volte rispetto alle piante di controllo. Uno studio sui germogli di senape (Schiavon et al., 2013) ha rilevato che l'applicazione fogliare di Se consente un migliore immagazzinamento del selenio nei tessuti vegetali, con un aumento del contenuto di Se nelle foglie fino a 15 volte rispetto alle piante senza aggiunta di Se. Uno studio sugli spinaci (Hawrylak-Nowak et al., 2015) ha rilevato che l'applicazione fogliare di Se sotto forma di selenite (SeO_3^{2-}) aumenta l'accumulo di selenio nelle foglie da 5 a 12 volte, con una maggiore biodisponibilità di Se per l'uomo rispetto all'applicazione al suolo.

In questo studio, la **risposta fisiologica** dell'alga unicellulare *Selenastrum capricornutum* all'acqua di un sistema acquaponico è stata valutata analizzando **l'inibizione della clorofilla a (Chl a)**, utilizzando questo parametro come indicatore dello stress fisiologico dell'organismo.

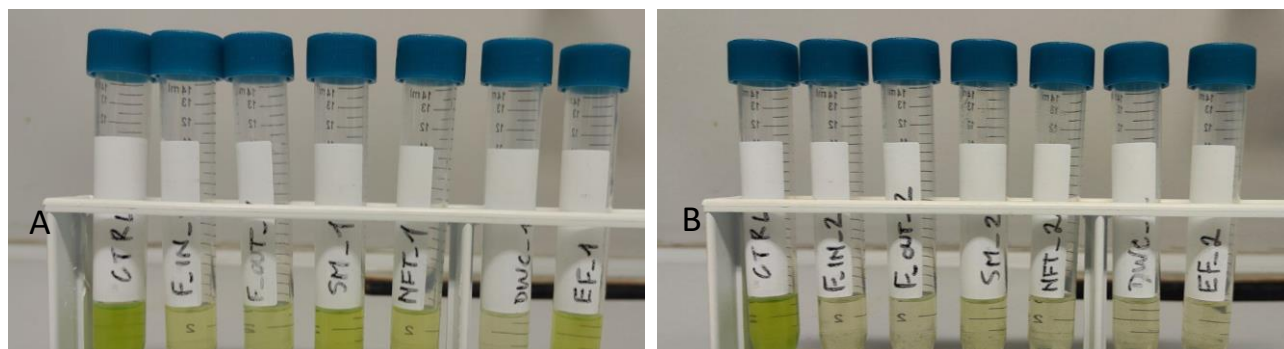


Figura 6 - Estratto di clorofilla da *Selenastrum capricornutum* (A) primo campionamento (B) secondo campionamento. La prima provetta a sinistra rappresenta il campione di controllo negativo (CTRL), mentre le altre provette rappresentano i punti di campionamento del sistema acquaponico.

Nei risultati ottenuti, le microalghe esposte a campioni contenenti diverse concentrazioni di azoto e fosfato hanno mostrato una significativa variabilità nel contenuto di clorofilla. In particolare, **concentrazioni eccessive di azoto** hanno **inibito la** sintesi di **clorofilla**.

Allo stesso tempo, durante il periodo di coltivazione di 96 ore, il colore della coltura è passato dal tipico verde intenso al verde chiaro nei campioni con maggiore inibizione dei pigmenti (Figura 6).

I grafici a barre successivi rappresentano la percentuale **di inibizione della clorofilla a rispetto al controllo negativo** in *Selenastrum capricornutum*. L'altezza delle barre rappresenta la percentuale di inibizione del pigmento. Le barre più basse indicano una minore inibizione, il che indica un buono stato fisiologico dell'organismo. Al contrario, le colonne più alte rappresentano un'alta percentuale di inibizione, indicando uno stress fisiologico significativo che interferisce con la normale produzione di pigmenti fotosintetici. La parte superiore dei grafici mostra le **concentrazioni di nitrati** (NO₃-) e **fosfati** (PO₄³⁻) per ciascun campione.

Inibizione percentuale della clorofilla a in *Selenastrum capricornutum* - primo campionamento

I risultati ottenuti esponendo la microalga *Selenastrum capricornutum* a campioni raccolti **nell'ottobre 2024** rivelano un quadro iniziale di **moderato stress fisiologico** della microalga (Fig. 7). Le percentuali di inibizione della clorofilla a oscillano tra il 25% e il 35%, indicando un leggero squilibrio nutrizionale. I valori di nitrati compresi tra 42,1 e 45,4 mg/L e di fosfati compresi tra 1,4 e 1,6 mg/L indicano un sistema che comincia a mostrare i primi segni di sovraccarico di nutrienti, ma non è ancora in una fase critica.

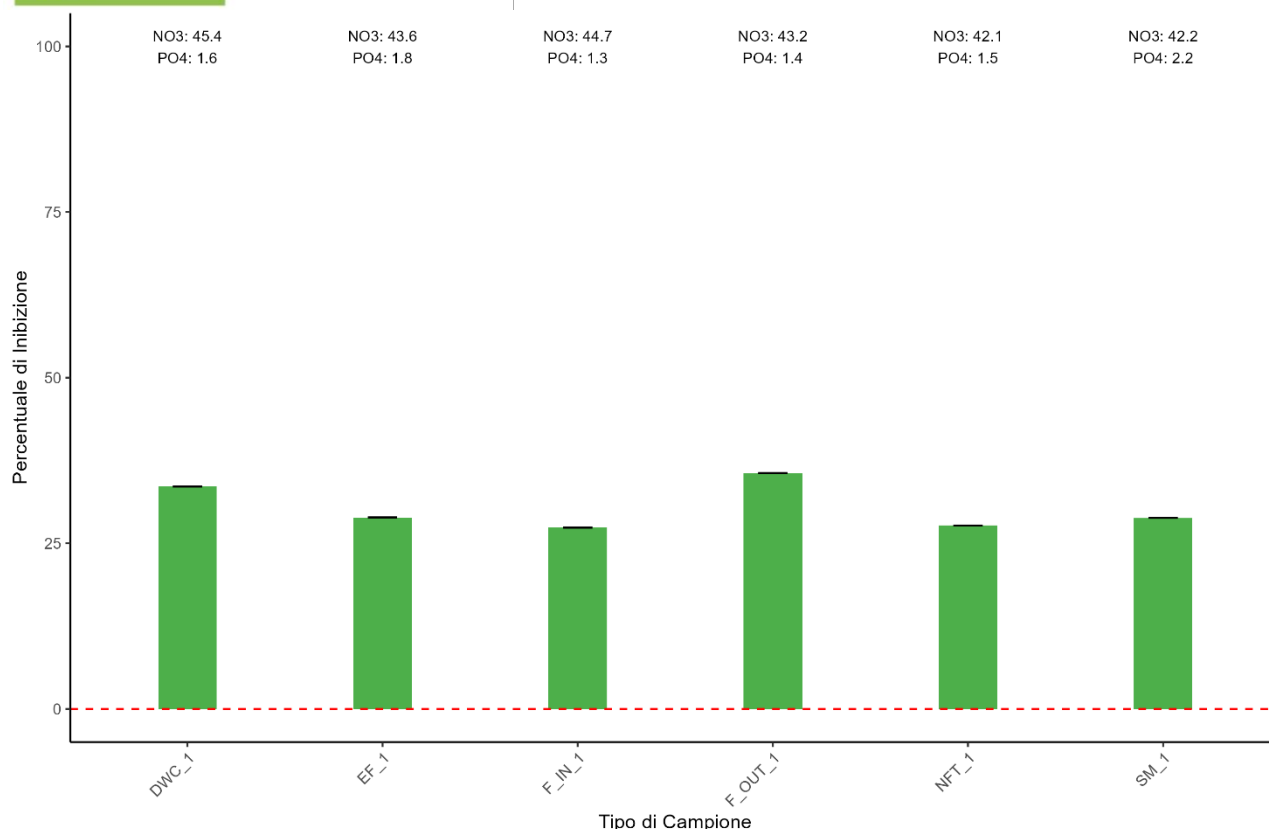


Figura 7 - Inibizione percentuale della clorofilla a in *S. capricornutum* esposto a campioni d'acqua raccolti da diversi punti del sistema acquaponico (ottobre 2024). L'altezza delle barre rappresenta la percentuale di inibizione dei pigmenti. Le colonne più basse indicano una minore inibizione, che indica un buono stato fisiologico dell'organismo. Al contrario, le colonne più alte rappresentano un'alta percentuale di inibizione, indicando uno stress fisiologico significativo che interferisce con la normale produzione di pigmenti fotosintetici.

Inibizione percentuale della clorofilla a in *Selenastrum capricornutum* - secondo campionamento

I risultati del **secondo campionamento**, effettuato **nel dicembre 2024**, mostrano un drastico peggioramento delle condizioni del sistema (Figura 8). **Le percentuali di inibizione della clorofilla a aumentano drasticamente**, raggiungendo valori compresi tra l'85% e il 95%. L'aumento della concentrazione di nitrati, che ora varia tra 81,4 e 92,4 mg/L, e la stabilizzazione dei fosfati intorno a 2,0-2,4 mg/L, testimoniano il progressivo accumulo di composti azotati, che minaccia l'equilibrio dell'ecosistema.

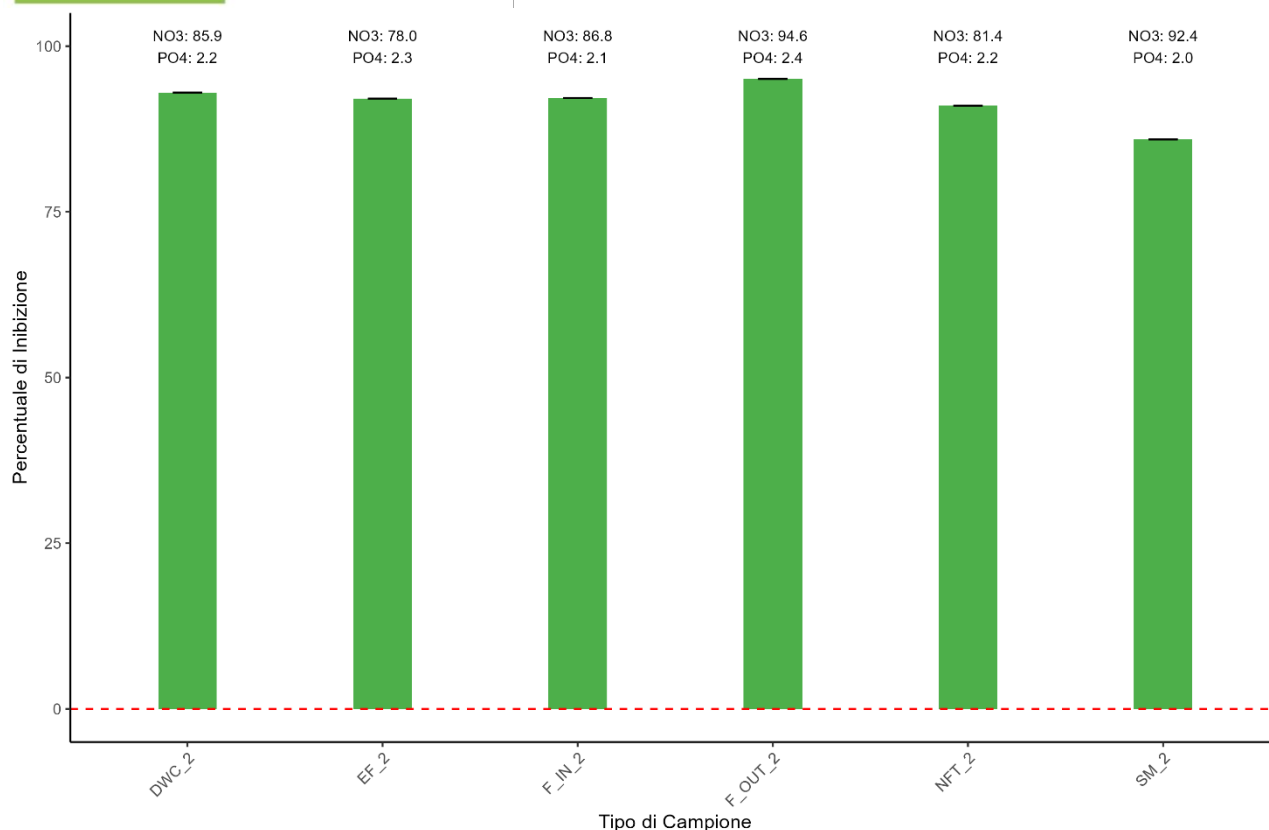


Figura 8 - Inibizione percentuale della clorofilla a in *S. capricornutum* esposto a campioni d'acqua raccolti da diversi punti del sistema acquaponico (dicembre 2024). L'altezza delle barre rappresenta la percentuale di inibizione dei pigmenti. Le colonne più basse indicano una minore inibizione, che indica un buono stato fisiologico dell'organismo. Al contrario, le colonne più alte rappresentano un'alta percentuale di inibizione, indicando uno stress fisiologico significativo che interferisce con la normale produzione di pigmenti fotosintetici.

CONCLUSIONI

L'applicazione fogliare di selenio nei microgreening può aumentare il contenuto di Se da 5 a 20 volte, a seconda della specie vegetale, della forma di selenio e della concentrazione di applicazione. Questo metodo è efficace per produrre microgreens biofortificati con un valore nutrizionale più elevato, ma richiede un'ottimizzazione precisa della concentrazione di Se per evitare effetti tossici.

Se l'obiettivo è quello di **stimolare la crescita precoce e la distribuzione uniforme dei nutrienti**, la letteratura riporta che il **rivestimento dei semi è una scelta migliore**. Tuttavia, se l'obiettivo è **correggere rapidamente le carenze di micronutrienti o aumentare il contenuto di alcuni elementi nelle parti commestibili della pianta**, l'applicazione fogliare è più efficace. Una **combinazione dei due metodi** è spesso la strategia ottimale, in quanto garantisce sia un apporto a lungo termine sia un rapido adattamento alle esigenze

nutritive della pianta . Tuttavia, sarebbe anche necessario tenere conto dei possibili effetti sui pesci del sistema in futuro. Questo è stato anche il motivo per cui nel nostro caso non abbiamo deciso di applicare il prodotto sui semi, poiché temevamo che potesse verificarsi una lisciviazione attraverso il flusso dell'acqua e quali eventuali conseguenze avrebbe potuto avere sui pesci.

L'attività finale riguardava la possibilità che l'applicazione di nanoparticelle agli imballaggi possa prolungare la durata di conservazione. Qui abbiamo incontrato una preoccupazione e un problema prima dell'implementazione. La preoccupazione riguarda la necessità di confezionare il germe. In un'indagine condotta contemporaneamente alla nostra attività, uno studente che sta svolgendo la sua tesi di laurea (Mestnik, tesi in corso) è giunto alla conclusione che la maggior parte dei germogli (microgreens) viene consumata da esercizi di ristorazione che, per avere una durata di conservazione più lunga, vogliono ricevere i germogli non tagliati, insieme al terreno di coltura, che conferisce loro la massima freschezza. Il secondo problema riguarda la biofortificazione mediante applicazione al packaging, un approccio innovativo che consente il **rilascio graduale di micronutrienti** nell'alimento, aumentando così il valore nutrizionale dei microgreens, migliorandone la sicurezza e prolungandone la durata di conservazione. L'uso di **nanoparticelle di zinco (ZnO), argento (Ag) e selenio (Se)** negli imballaggi può ridurre la **contaminazione microbica**, poiché questi materiali sono antibatterici e impediscono la crescita di microrganismi patogeni (Silva et al., 2019). Inoltre, **l'imballaggio attivo** con micronutrienti può consentire un **arricchimento graduale degli alimenti**, compensando così le perdite di nutrienti che si verificano durante lo stoccaggio o il trasporto (García et al., 2018). Ad esempio, la ricerca dimostra che l'imballaggio con **nanoparticelle di ZnO non solo inibisce la crescita batterica, ma migliora anche il contenuto di zinco degli alimenti**, contribuendo alla qualità nutrizionale del prodotto finale (Arfat et al, Tuttavia, nonostante il potenziale promettente, sono necessari ulteriori studi per valutare **l'efficienza del rilascio di nutrienti, la stabilità dei materiali e i potenziali problemi di sicurezza** per l'uso commerciale, poiché la migrazione di alcune nanoparticelle negli alimenti può rappresentare un **rischio per la salute** (Duncan, 2011). È quindi fondamentale **sviluppare quadri normativi** e condurre **ricerche a lungo termine sull'impatto di questi materiali** sulla sicurezza alimentare e sulla salute dei consumatori. Allo stesso tempo, non abbiamo trovato un esempio adatto per arricchire l'imballaggio e vedere il senso del processo, poiché i microgreen non sono qualcosa che i clienti vogliono avere impacchettato.

Per tutta la durata dell'esperimento, la sicurezza microbica dei germogli è stata una questione importante. Sebbene i microgreens siano generalmente più sicuri

dei germogli, possono comunque contenere agenti patogeni come *Salmonella*, *E. coli* o *Listeria*, soprattutto se vengono coltivati in condizioni non igieniche o se la fonte d'acqua è contaminata. La contaminazione può avvenire in varie fasi della produzione, tra cui la scarsa igiene nella manipolazione e nel confezionamento, l'uso di acqua o di terreni di coltura contaminati. I microgreens vengono spesso consumati crudi, il che significa che non vengono sottoposti a una "fase di distruzione" (come la cottura) per eliminare i batteri nocivi, per cui è essenziale attuare rigorose pratiche di sicurezza alimentare. Approfondendo la ricerca, siamo giunti all'interessante conclusione che le Linee guida per la sicurezza microbica degli alimenti, che si rivolgono al consumatore finale, non contengono attualmente alcuna norma relativa alla microdegradazione. Poiché l'argomento ci interessava molto, abbiamo condotto un ulteriore studio importante, i cui risultati sono attualmente in fase di elaborazione e dimostrano l'urgenza della gravità di questo problema.

Una ricerca condotta con l'alga verde unicellulare *Selenastrum capricornutum* ha rivelato un quadro interessante della **sensibilità** di questo microrganismo ai **cambiamenti ambientali** nei sistemi acquaponici. L'organismo si è rivelato un **indicatore biologico**, in grado di rivelare variazioni anche minime dei parametri nutritivi attraverso cambiamenti nei suoi meccanismi metabolici.

La possibilità di ottenere informazioni sullo stato di salute del sistema in tempi brevi rappresenta un importante **valore aggiunto** rispetto alle analisi chimiche tradizionali. Il test sulle microalghe si rivela quindi **un metodo complementare alle** analisi chimico-fisiche, consentendo una valutazione biologica dell'impatto dei parametri ambientali che integra e arricchisce le informazioni ottenute con i metodi analitici tradizionali.

Il dato più importante emerso dallo studio è la forte **correlazione inversa** tra la concentrazione di **nutrienti** e la sintesi **dei pigmenti** fotosintetici. In particolare, il nitrato ha mostrato un effetto pronunciato, causando una graduale inibizione dei processi metabolici anche a concentrazioni relativamente basse. Questo risultato evidenzia la capacità di *S. capricornutum* di agire come un sistema **di allarme precoce**, rilevando gli squilibri dell'ecosistema in una fase molto precoce.

Da un punto di vista metodologico, il protocollo sviluppato presenta chiari vantaggi: velocità di esecuzione, riproducibilità dei risultati, sostenibilità economica e facilità di implementazione, che lo rendono interessante anche per le **unità produttive più piccole**. In particolare, la strumentazione utilizzata, incentrata su uno spettrofotometro portatile ampiamente utilizzato in acquacoltura, è un dispositivo a basso costo che incide solo in minima parte sul costo complessivo dell'investimento. Questo strumento, già

comunemente utilizzato per l'analisi dei nutrienti, può essere impiegato anche per la stima della clorofilla, mantenendo bassi i costi operativi e rendendo il protocollo accessibile e sostenibile.

FONTI:

- Arfat, Y. A., Ejaz, M., Jacob, H., & Ahmed, J. (2018). Decifrare il potenziale dei film bionanocompositi nell'imballaggio alimentare: una rassegna. *Carbohydrate Polymers*, 181, 811-820.
- Bouis, H. E., & Saltzman, A. (2017). Migliorare la nutrizione attraverso la biofortificazione: una revisione delle prove di HarvestPlus, dal 2003 al 2016. *Global Food Security*, 12, 49-58.
- Delaide, B., Goddek, S., Gott, J., Soyeurt, H., & Jijakli, M. H. (2016). Le prestazioni di crescita della lattuga (*Lactuca sativa* L. var. Sucrine) in soluzione acquaponica complementata superano quelle della coltura idroponica. *Water*, 8(10), 467.
- Dimkpa, C. O., & Bindraban, P. S. (2018). Nanofertilizzanti: nuovi prodotti per l'industria? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26), 6462-6473.
- Duncan, T. V. (2011). Applicazioni delle nanotecnologie nell'imballaggio e nella sicurezza alimentare: materiali barriera, antimicrobici e sensori. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1), 1-24.
- Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M., & Soleimani-Zad, S. (2011). Effetto dell'imballaggio nanocomposito contenente Ag e ZnO sulla durata di conservazione del succo d'arancia fresco. *Food Control*, 22(2), 408-413.
- García, A., Castillo, L. A., Pérez, E., Barbosa, S. E., & Hossain, S. (2018). Imballaggi alimentari attivi basati su nanocompositi biopolimerici: una rassegna. *Food Hydrocolloids*, 83, 293-315.
- Goddek, S., Joyce, A., Kotzen, B., & Burnell, G. M. (2019). Sistemi di produzione alimentare acquaponici: tecnologie combinate di acquacoltura e produzione idroponica per il futuro. *Springer Nature*.
- Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., & Matraszek-Gawron, R. (2015). La biofortificazione del selenio aumenta l'accumulo di carotenoidi nelle foglie di lattuga e allevia la risposta della pianta allo stress da salinità. *Frontiers in Plant Science*, 6, 111.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticelle: proprietà, applicazioni e tossicità. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931.
- Liu, R. e Lal, R. (2021). Potenzialità delle nanoparticelle ingegnerizzate come fertilizzanti per aumentare le produzioni agronomiche. *Science of The Total Environment*, 799, 149418.
- Mahakham, W., Theerakulpisut, P., Maensiri, S., Phumying, S., & Sarmah, A. K. (2017). Nanoparticelle di ZnO ecologiche: influenza sulla germinazione dei semi e sulla crescita delle piantine di riso (*Oryza sativa* L.). *Scientific Reports*, 7(1), 1-11.
- Paine, J. A., Shipton, C. A., Chaggar, S., Howells, R. M., Kennedy, M. J., Vernon, G., ... & Drake, R. (2005). Migliorare il valore nutrizionale del Golden Rice attraverso l'aumento del contenuto di pro-vitamina A. *Nature Biotechnology*, 23(4), 482-487.
- Puccinelli, M., Malorgio, F., Pezzarossa, B. (2017). Arricchimento di selenio nelle colture orticole. *Molecole*, 22(7), 933.
- Rai, M., Birla, S., & Ingle, A. P. (2018). Tendenze emergenti nelle nanotecnologie per la sicurezza alimentare sostenibile e la protezione ambientale. *Microbiologia applicata e biotecnologia*, 102(10), 4289-4301.

- Rana, K. L., Kour, D., Yadav, N., Yadav, A. N., & Kumar, M. (2020). Biofilm microbici di importanza agricola: biodiversità, significato ecologico e applicazioni biotecnologiche. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1241-1261.
- Ranjbar, M., Sadeghipour, H. R., & Aghili, R. (2021). Il priming dei semi con nanoparticelle di ossido di zinco migliora la crescita delle piantine di orzo sotto stress salino. *Journal of Plant Nutrition*, 44(5), 665-678.
- Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Interazione di nanoparticelle con piante commestibili e loro possibili implicazioni nella catena alimentare. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3485-3498.
- Saha, S., Monroe, A., & Day, M. R. (2016). Crescita, resa, qualità delle piante e nutrizione del basilico (*Ocimum basilicum* L.) in sistemi agricoli senza suolo. *Scientia Horticulturae*, 212, 218-226.
- Schiavon, M., Pilon-Smits, E. A. H., Mongiat, S., et al. (2013). Biofortificazione con selenato e selenite nei germogli di Brassicaceae: effetti sull'accumulo e sulla speciazione del selenio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10961-10967.
- Schmutz, Z., Loeu, F., Liebisch, F., Graber, A., & Mathis, A. (2017). Potenziale dell'integrazione delle piante medicinali nei sistemi acquaponici. *Water*, 9(3), 211.
- Silva, N. H. C. S., Drumond, I., Almeida, I. F., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Vilela, C. (2019). Imballaggi attivi a base di cellulosa per applicazioni alimentari: una rassegna. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 533-546.
- Linee guida sulla sicurezza microbiologica degli alimenti destinati al consumatore finale ([Guidelines 2019.pdf](#))
- Tripathi, D. K., Shweta, Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., ... & Sharma, N. C. (2017). Una panoramica sulle nanoparticelle prodotte nelle piante: assorbimento, traslocazione, accumulo e fitotossicità. *Fisiologia e biochimica delle piante*, 110, 2-12.
- Verlinden S. 2020. Microgreens: definizioni, tipi di prodotti e pratiche di produzione. *Horticultural Reviews*, 47: 85-124, <https://doi.org/10.1002/9781119625407.ch3>
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2009). Biofortificazione delle colture con sette elementi minerali spesso carenti nella dieta umana - ferro, zinco, rame, calcio, magnesio, selenio e iodio. *New Phytologist*, 182(1), 49-84.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2009). Biofortificazione delle colture con sette elementi minerali spesso carenti nella dieta umana - ferro, zinco, rame, calcio, magnesio, selenio e iodio. *New Phytologist*, 182(1), 49-84.

BeBlue Beyond Bluegrass:

Krepitev trajnostne agroživilske proizvodnje z akvaponiko

D1.3.1 AKVAPONSKA PRIDELAVA MIKROZELNJA IN RIB: TEHNOLOŠKE SMERNICE

BEBLUE NA KRATKO

Projekt BeBlue - Beyond Bluegrass prispeva k doseganju specifičnega cilja SO 2.6 Programa čezmejnega sodelovanja Italija-Slovenija: "Spodbujanje prehoda na krožno gospodarstvo, gospodarno z viri". Namen projekta je olajšati širjenje akvaponike. S to krožno in trajnostno tehnologijo je mogoča koprodukcija rib z rastlinskimi vrstami v reciklacijskih sistemih. Projekt BeBlue temelji na rezultatih, doseženih v okviru projekta čezmejnega sodelovanja BLUEGRASS, <https://2014-2020.ita-slo.eu/bluegrass>, ki je na programskem območju uvedel akvaponiko.

V ta namen bo BeBlue vzpostavil orodja za:

- 1) optimizirati upravljanje akvaponskih sistemov z njihovo digitalizacijo in razvojem prototipa "digitalnega dvojčka";
- 2) prikazati možnosti uporabe akvaponskih sistemov za pridobivanje inovativnih proizvodov z visoko dodano vrednostjo, kot so: i) makroalge; ii) slanuše; iii) mikrozelenjava (kalice).
- 3) oceno okoljske trajnosti proizvodov z razvojem kalkulatorja okoljskega odtisa proizvoda (Product Enviromental Footprint).
- 4) oceno ekonomske trajnosti teh proizvodov, tako da bomo z metodami tržne analize analizirali sprejemljivost uporabe akvaponske tehnologije pri proizvajalcih in potrošnikih in razvili za oceno donosnosti naložb v akvaponske sisteme.
- 5) povečanje znanja in prepoznavnosti akvaponike med proizvajalci in potencialnimi vlagatelji.

Delovni načrt BeBlue je razdeljen na tri sklope ali delovne pakete, katerih posebni cilji so povzeti v nadaljevanju. Poleg dejavnosti prenosa tehnologije ali mreženja vključujejo tudi dejavnosti komuniciranja in razširjanja, namenjene različnim vrstam potencialnih uporabnikov.

WP1: Beyond Bluegrass: digitalizacija in diverzifikacija proizvodov

Cilji: Izboljšati pilotne rastline, razvite v okviru projekta BLUEGRASS, ter razviti, preizkusiti in razširjati digitalna orodja za podporo upravljanju in optimizaciji akvaponskih sistemov.

WP2: Orodja za oceno okoljske in ekonomske trajnosti

Cilji: Razviti orodja za podporo vlagateljem in upravljavcem pri načrtovanju in upravljanju akvaponskih sistemov z zagotavljanjem smernic za izbiro proizvodov in spletnih orodij za oceno ekonomske in okoljske trajnosti.

WP3: Mreženje in promocija rezultatov

Cilji: Spodbujanje razvoja in valorizacije znanja, pridobljenega v okviru prejšnjega projekta Bluegrass in novih dejavnosti, krepitev nadnacionalnega povezovanja v mreže s participativnimi procesi in razširjanje rezultatov.

POVZETEK

Poročilo projekta BeBlue – Beyond Bluegrass je del programa čezmejnega sodelovanja Italija-Slovenija, katerega cilj je spodbujanje prehoda na krožno gospodarstvo in učinkovito rabo virov. Projekt se osredotoča na širjenje tehnologije akvaponike, ki omogoča sočasno pridelavo rib in rastlin v recirkulacijskih sistemih, s čimer prispeva k trajnostni kmetijski praksi.

Poročilo, naslovljeno »Akvaponska pridelava mikrozelenja in rib: tehnološke smernice«, opisuje rezultate poskusa integrirane proizvodnje sladkovodnih rib in mikrozelenja v pilotnem sistem na Bioterhniški fakulteti (UNILJ), ter podaja smernice vključevanja nanotehnologije v akvaponske sisteme. Ker je pri pridelavi v akvaponskih sistemih kakovost pridelka rib in zelenjave ter varnost za uživanje in za okolje ena glavnih skrbi upravljalcev sistemov smo poleg spremljanja pridelovalnih tehnologij izvajali tudi poskuse z integracijo ekotoksičnih testov in kemijsko fizikalnih analiz.

Cilj te aktivnosti je bil testirati proizvodno učinkovitost integrirane pridelave sladkovodnih rib in mikrozelenja v zaprtem proizvodnem sistemu in na podlagi pridobljenih rezultatov uporabnikom podati ustrezne tehnološke usmeritve, kako izvajati tovrstno tehnologijo in jih hkrati tudi opozoriti na možne težave in nevarnosti pri tovrstnem pristopu.

UVOD

Projekt BeBlue prispeva k reševanju tehnoloških in okoljskih izzivov s konkretnimi orodji za širitev akvaponike na programskem območju. Akvaponika, ki je bila že uspešno uvedena s projektom BLUEGRASS (<https://www.ita-slo.eu/it/bluegrass>), omogoča 90-odstotni prihranek vode v primerjavi z gojenjem rastlin v zemlji in zmanjšuje okoljske obremenitve, povezane z izpusti dušika in fosforja iz ribogojstva. Gre za prilagodljivo tehnologijo, ki omogoča vzpostavitev obratov na različnih lokacijah – od kmetijskih zemljišč do mestnih območij. Sistem omogoča pridelavo hrane tako na majhnih gospodinskih obratih kot na večjih komercialnih obratih z visoko dodano vrednostjo. Akvaponika združuje znanja iz agronomije in ribogojstva, kar projekt BeBlue razširja tudi na pridelavo alg, kar Evropska unija močno spodbuja.

Mikro kalice v sodobnem času razvoja kulinarike postajajo zelo iskan proizvod, in ker se uživajo prteteno sveže in zato potrebujejo med pridelavo in porabo kartke transportne poti, je njihove pridelava v akvaponskih sistemih, ki jih je možno postaviti blizu nbavnih trgov, zelo zanimiva uin v porastu. To je bil eden od odločitvenih razlogov, da smo tovrstno zelenjavo tudi vključili v naš pilotni poskus.

Mikrozelenjava, kalice -mladi poganjki užitne zelenjave in zelišč, so prepoznani po bogati hranilni vsebini, privlačnem videzu in močnih okusih. Običajno se pobirajo med 7 in 21 dni po kalitvi, ko se pojavijo prvi pravi listi. Čeprav ponujajo pomembne priložnosti za potrošnike, ki so osredotočeni na zdravje, kuharske mojstre in pridelovalce, se pri gojenju, distribuciji in komercializaciji srečujejo z več izzivi.

Mikrozelenjava se pogosto označuje kot "superživila", saj je polna hranilnih snovi. Različne študije so pokazale, da lahko mikro zelenjava vsebuje do **40-krat več hranil** (kot so vitamini, minerali in antioksidanti) kot odrasla zelenjava.

Poudarki hranil:

- Vitamini: Visoke koncentracije vitaminov C, E in K ter beta-karotena.
- Minerali: Bogato s kalcijem, magnezijem, železom in kalijem.
- Antioksidanti: polifenoli in drugimi antioksidanti, ki ščitijo pred celičnimi poškodbami in podpirajo splošno zdravje.
- Fitokemikalije: Mikro zelenjava vsebuje koristne spojine, ki lahko pomagajo zmanjšati tveganje za nekatere bolezni, vključno s srčnimi boleznimi in rakom.

AKVAPONSKA PRIDELAVA MIKROZELENJAVE IN RIB: TEHNOLOŠKE
SMERNICE

Teoretični uvod

Dosedanje izkušnje in raziskave o pridelavi mikrozelenjave v akvaponskih sistemih kažejo, da gre za obetavno metodo, ki omogoča trajnostno pridelavo z zmanjšano porabo vode in mineralnih gnojil, vendar se sooča z izzivi, kot so **neuravnotežena dostopnost hranil, kopičenje organskih snovi v sistemu, nadzor pH in mikrobiološka varnost** (Delaide in sod., 2016). Ena ključnih dilem je **razmerje med rastlinskimi potrebami in izločki rib**, saj akvaponski sistemi pogosto ne zagotavljajo optimalne koncentracije določenih mikrohranil, kar lahko vpliva na rast in hranilno vrednost mikrozelenjave (Saha in sod., 2016). Poleg tega so izzivi povezani tudi s **potencialno prisotnostjo patogenov**, saj se lahko bakterije iz ribjih izločkov prenesejo na rastline, kar zahteva natančen nadzor higienskih standardov in filtracijskih sistemov (Schmautz in sod., 2017). Kljub tem omejitvam raziskave potrjujejo, da akvaponski sistemi predstavljajo **učinkovit model za urbano kmetijstvo**, še posebej ob izboljšavah v **formulaciji hranil, biološki filtraciji in razvoju avtomatiziranih nadzornih sistemov** (Goddek in sod., 2019).

Visoka gostota hranil, skupaj z nizko kalorično vsebino, naredi mikrozelenjavo še posebej privlačno za zdravju zavedne potrošnike.

Mikro zelenjava ima zelo kratek rok trajanja, običajno le 5-7 dni pri idealnih pogojih skladiščenja. Je zelo pokvarljiva, njeni nežni listi pa hitro ovenejo.

Preglednica 2: Družine rastlin in vrste nekaterih rastlin, ki se uporabljajo pri pridelavi mikrozelenja in so obravnavani v tem pregledu (Verlinden, 2020)

Družina	Vrsta
Apiaceae	<i>Coriandrum sativum</i> <i>Daucus carota</i> <i>Petroselinum crispum</i>
Amaranthaceae	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> <i>Beta vulgaris</i> ubsp. <i>vulgaris</i> – <i>cicla</i> group <i>Amaranthus</i> spp.
Amaryllidaceae	<i>Allium schoenoprasum</i>
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> <i>Tagetes</i> spp.

Boraginaceae	<i>Borago officinalis</i>
Brassicaceae	<i>Brassica juncea</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italic</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>rapa</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>rosularis</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>chinensis</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>niposinica</i> <i>Eruca sativa</i> <i>Lepidium bonariense</i> <i>Raphanus raphanistrum</i> var. <i>sativus</i> <i>Raphanus sativus</i> var. <i>longipinnatus</i>
Fabaceae	<i>Pisum sativu</i> <i>Trigonella foenum-graecum</i>
Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i> <i>Melissa officinalis</i> <i>Perilla frutescens</i>
Poaceae	<i>Triticum aestivum</i> <i>Secale cereal</i> <i>Zea mays</i>
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i> <i>Rumex acetosa</i>

Ker je pri pridelavi v akvaponskih sistemih kakovost pridelka rib in zelenjave ter varnost za uživanje in za okolje ena glavnih skrbi upravljalcev sistemov smo poleg spremljanja pridelovalnih tehnologij izvajali tudi poskuse z integracijo ekotoksičnih testov in kemijsko fizikalnih analiz.

Ekotoksični testi predstavljajo ključno orodje pri **spremljanju akvaponskih sistemov**, saj zagotavljajo **dopolnilne in pogosto globlje informacije** v primerjavi s tradicionalnimi **kemijsko-fizičnimi parametri**. Medtem ko ti slednji (pH, temperatura,

raztopljeni kisik, nivoji dušikovih in fosfatnih snovi) opisujejo trenutne okoljske pogoje sistema, ekotoksični testi ocenjujejo dejanski biološki vpliv teh pogojev, razkrivajoč **subletalne in letalne učinke**, ki bi lahko ušli običajnim kemijskim analizam.

Posebna občutljivost organizmov uporabljenih v ekotoksičnih testih omogoča zgodnje odkrivanje okoljskih sprememb, saj delujejo kot **zgodnji alarmni sistem** za morebitne težave v sistemu. Pomemben primer je **spremljanje evtrofikacije**, kompleksnega pojava, ki ga sproži presežek hranil (predvsem dušika in fosforja), ki lahko resno ogrozi ravnovesje akvaponskega ekosistema. V tem kontekstu ekotoksični testi omogočajo pravočasno oceno bioloških učinkov nabiranja hranil, kar omogoča ciljno preprečevanje ukrepov.

Integracija ekotoksičnih testov in kemijsko-fizičnih analiz predstavlja celostni pristop k oceni okoljskega tveganja, ki je ključnega pomena za **razumevanje kompleksnih interakcij med različnimi kemikalijami in njihovimi sinergijskimi učinki na vodne organizme**. Ta integrirani pristop podpira bolj premišljeno in trajnostno upravljanje sistema, zagotavlja optimalne pogoje za rast rib in rastlin ter spodbuja dolgoročno stabilnost celotnega akvaponskega sistema.

KONTEKST IN METODOLOGIJA

Biofortifikacija rastlin

Osnove biofortifikacije rastlin: Biofortifikacija je proces izboljšanja hranilne vrednosti rastlin s povečanjem vsebnosti esencialnih mikrohranil, kot so železo (Fe), cink (Zn) in selen (Se), bodisi s klasičnim žlahtnjenjem, genetskim inženiringom ali agronomskimi tehnikami, kot je uporaba obogatenih gnojil in nanomaterialov (Bouis & Saltzman, 2017). Cilj biofortifikacije je zmanjšati pojav **mikrohranilnih pomanjkljivosti** v prehrani ljudi, saj mnogi prebivalci držav v razvoju zaužijejo pretežno rastlinsko hrano, ki je pogosto revna z bistvenimi hranili (White & Broadley, 2009).

Obstajajo tri glavne metode biofortifikacije:

4. **Genetska biofortifikacija** – selektivno križanje rastlin ali gensko spreminjanje za povečanje vsebnosti hranil, na primer zlati riž, obogaten z vitaminom A (Paine in sod., 2005).
5. **Agronomska biofortifikacija** – uporaba obogatenih gnojil ali nanognojil za izboljšanje vsebnosti mikrohranil v rastlinah, kot so nano-Zn in nano-Se za povečanje vsebnosti cinka in selena v žitih (Dimkpa & Bindraban, 2018).

6. **Mikrobna biofortifikacija** – uporaba koristnih mikroorganizmov, kot so rizobakterije in mikorizne glive, ki pomagajo rastlinam pri boljši absorpciji hranil iz tal (Rana in sod., 2020).

Biofortifikacija ima pomembno vlogo pri izboljšanju prehranske varnosti in javnega zdravja, saj lahko pomaga pri **zmanjšanju anemije, oslabiljenega imunskega sistema in drugih bolezni**, povezanih s pomanjkanjem esencialnih mineralov in vitaminov.

Dosedanje študije o uporabi nanotehnologije za biofortifikacijo rastlin kažejo, da imajo nanomateriali pomembno vlogo pri izboljšanju vsebnosti esencialnih hranil, spodbujanju rasti in zaščiti rastlin pred stresnimi dejavniki. Raziskave potrjujejo, da nanodelci, kot so nanoželezo (Fe), nanocink (Zn) in nanoselen (Se), omogočajo boljšo absorpcijo mikrohranil v rastlinskih tkivih, kar povečuje njihovo biološko dostopnost za prehrano ljudi (Rico in sod., 2011). Na primer, uporaba nano-Se pri solati in špinači je pokazala povečano akumulacijo selena ter izboljšano antioksidativno aktivnost rastlin, kar lahko pozitivno vpliva na zdravje potrošnikov (Rai in sod., 2018).

Poleg izboljšane hranilne vrednosti nanomateriali prispevajo k večji produktivnosti rastlin. Nano-SiO₂ je bil prepoznan kot učinkovit biostimulant, ki krepi mehansko strukturo rastlin, povečuje toleranco na sušo in zmanjšuje dovzetnost za bolezni (Khan in sod., 2017). Študije z nano-Zn pri mikrozelenju so pokazale hitrejšo kalitev in večjo biomaso rastlin, hkrati pa tudi povečano vsebnost cinka v užitnem delu rastlin, kar je ključnega pomena za preprečevanje pomanjkanja tega elementa v prehrani (Mahakham in sod., 2017).

Kljub številnim pozitivnim učinkom raziskave opozarjajo tudi na morebitna tveganja. Visoke koncentracije nekaterih nanodelcev lahko povzročijo fitotoksičnost, kar negativno vpliva na rast in razvoj rastlin. Poleg tega dolgoročni vplivi nanomaterialov na ekosistem in zdravje ljudi še niso povsem raziskani, zato je potrebna previdna uporaba in nadaljnje študije za določitev varnih koncentracij (Tripathi in sod., 2017). Kljub tem izzivom nanotehnologija predstavlja velik potencial za biofortifikacijo rastlin in trajnostno kmetijstvo, saj omogoča boljšo prehransko varnost ter zmanjšuje potrebo po mineralnih gnojilih in pesticidih.

Vprašanje, ali je biofortifikacija rastlin učinkovitejša z **nanosom na semena ali na liste**, je odvisno od vrste rastline, uporabljenega mikrohranila in rastnih razmer. Obe metodi imata prednosti in omejitve, pri čemer raziskave kažejo, da je **foliarna (listna) aplikacija pogosto učinkovitejša za hiter in ciljan vnos mikrohranil**,

medtem ko **nanosi na semena omogočajo bolj enakomerno porazdelitev hranil in dolgoročno oskrbo rastline** (Ranjbar in sod., 2021).

3. Biofortifikacija z nanosom na semena

Obdelava semen z nanodelci ali mikrohranili izboljša **kalitev, začetno rast in razvoj koreninskega sistema**, kar omogoča boljšo absorpcijo hranil iz substrata (Mahakham in sod., 2017). Semena lahko shranjujejo in postopoma sproščajo hranila, kar zmanjša potrebo po kasnejših aplikacijah gnojil (Dimpka & Bindran, 2018). Vendar pa je učinkovitost te metode lahko omejena zaradi **nizke mobilnosti nekaterih hranil** znotraj rastline in možnosti fitotoksičnih učinkov pri previsokih koncentracijah nanomaterialov (Liu & Lal, 2021).

4. Biofortifikacija z nanosom na liste (foliarna aplikacija)

Listna aplikacija omogoča **hitrejšo absorpcijo mikrohranil** in je še posebej učinkovita za elemente, kot so železo (Fe), cink (Zn) in selen (Se), ki imajo omejeno mobilnost iz korenin v zgornje dele rastline (White & Broadley, 2009). Nanodelci se lahko hitro absorbirajo skozi listne reže ali kutikulo, kar poveča biološko razpoložljivost mikrohranil in zmanjša izgube zaradi fiksacije v tleh (Rico in sod., 2011). Kljub temu so lahko izzivi povezani z **učinkovitostjo nanosa**, saj nanomateriali lahko ostanejo na površini listov brez prenosa v notranjost rastline, prav tako pa lahko previsoke koncentracije povzročijo **stres ali toksičnost** (Tripathi in sod., 2017).

Biofortifikacija je možna z nanosom mikrohranil ali bioaktivnih snovi na pakirno embalažo, pri čemer embalaža deluje kot **vir hranil, ki se postopoma sproščajo v živilo**. Ta pristop je še posebej zanimiv pri občutljivih pridelkih, kot je **mikrozelenje**, kjer lahko **aktivna embalaža** podaljša rok uporabnosti, izboljša hranilno vrednost in zaščiti pred mikrobiološko kontaminacijo (Emamifar in sod., 2011).

Kako deluje biofortifikacija prek embalaže?

4. **Nanos mikrohranil ali nanodelcev na notranjo površino embalaže** – Na embalažo se nanesejo **biološko razpoložljivi elementi**, kot so **cink (Zn), železo (Fe) ali selen (Se)**, ki se nato **postopoma sproščajo v živilo**, kar povečuje njegovo prehransko vrednost (García in sod., 2018).
5. **Uporaba aktivne embalaže z antibakterijskim delovanjem** – Nanodelci srebra (Ag), cinka (ZnO) ali silicija (SiO₂) lahko preprečijo **razvoj patogenov in oksidacijo hranil**, kar podaljša **svežino in varnost hrane** (Silva in sod., 2019).

6. **Embalaža, ki regulira sproščanje hranil** – Encapsulacija mikrohranil v **polimerne nanomateriale** omogoča **kontrolirano sproščanje** mineralov v odvisnosti od **vlage, pH ali temperature**, kar lahko poveča stabilnost in absorpcijo hranil v živilih (Ranjbar in sod., 2021).

Izzivi in omejitve

- **Nadzor sproščanja hranil** – Ključno je, da se mikrohranila sproščajo v **biološko dostopni obliki**, ne da bi spremenila **okus, teksturo ali kakovost živila**.
- **Varnost in regulativa** – Uporaba nanodelcev v embalaži zahteva **testiranje vplivov na zdravje ljudi in okolje**, da se prepreči morebitna toksičnost ali migracija nezaželenih snovi v hrano (Arfat in sod., 2018).
- **Trajnost** – Raziskave iščejo **biorazgradljive ali reciklabilne materiale**, ki bi omogočili **ekološko sprejemljivo uporabo aktivne embalaže**.

Aktivnost 1.3

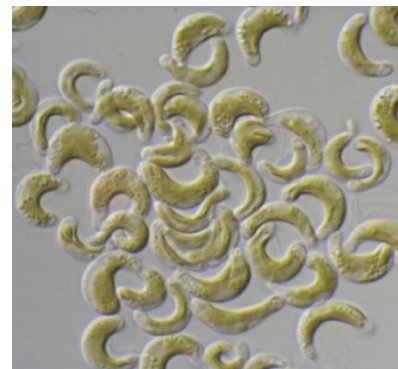
Mikrozelenje lahko gojimo v sistemih brez zemlje in z omejenimi viri: njihove kratke cikle rasti je mogoče optimizirati z izbiro ustreznih vrst rib, uravnavanjem gostote rib in uporabo ustrezne ribje hrane. Na akvaponskem sistemu v Ljubljani smo preizkusili uporabo nanotehnologije na akvaponiki pri pridelavi mikrozelenja. Na ta način smo želeli preveriti ali z omenjenim **(1)** izboljšamo lastnosti rastlin in s tem povečamo odpornost na bolezni in okoljske obremenitve; **(2)** izboljšamo delovanje rastlinskega tkiva ali organele in s tem pridelaamo funkcionalno hrano; in **(3)** ali podaljšamo rok uporabnosti mikrozelenja z impregnacijo nanodelcev v embalažo.

Integracija ekotoksičnih testov in kemijsko-fizičnih analiz

Za oceno kakovosti vode v sladkovodnem akvaponskem sistemu, ki se nahaja na sedežu Fakultete za biotehnologijo Univerze v Ljubljani, je bil izbran kot bioindikator organizem enocelične zelene alge, splošno znane kot *Selenastrum capricornutum* (prej znana kot *Pseudokirchneriella subcapitata*, trenutno pa preimenovana v *Raphidocelis subcapitata*), ki bo v tem poročilu vedno imenovana *S. capricornutum*. Izbrana je bila ta vrsta zaradi njene posebne **občutljivosti** tudi na **pogoje evtrofikacije**, pa tudi zaradi **enostavnosti in hitrosti testa**.

Selenastrum capricornutum

Enocelična zelena alga *Selenastrum capricornutum* (Slika 1) je postala ključni organizem na področju ekotoksiologije zaradi svojih značilnosti. Ta enocelična zelena mikroalga je postala referenca v laboratorijskih testih zaradi hitre rasti, enostavnosti gojenja in predvsem zaradi svoje sposobnosti, da na prisotnost onesnaževal, kot so čisti kemični sestavki industrijskih in urbanih odpadnih voda, pa tudi za proučevanje učinkov pesticidov in gnojil, odgovori na občutljiv in predvidljiv način.



Slika 5 - *Selenastrum capricornutum*

Njena tendenca, da raste v suspenziji brez tvorjenja agregatov, skupaj z enotnimi celičnimi velikostmi, jo naredi še posebej primerno za izvajanje standardiziranih testov.

Zanimiva je njena **odzivnost na hranila**, še posebej na dušikove spojine: čeprav so te ena glavnih virov hranil za organizem, lahko njihov **presežek** sproži različne **toksične** mehanizme. **Ammonijak** lahko povzroči oksidativni stres in poškodbe celičnih membran, **nitriti** lahko nasičijo sisteme za asimilacijo dušika nad določenimi koncentracijami, medtem ko **nitriti** motijo sisteme za prenos elektronov.

Testi s *S. capricornutum* sledijo strogim, na mednarodni ravni standardiziranim protokolom, kot jih določajo organizacije, kot sta OECD in EPA. Med temi testi se spremljajo različni parametri, od stopnje razmnoževanja celic do morebitnih morfoloških sprememb in **učinkovitosti fotosinteze**. Testi zagotavljajo rezultate v relativno kratkem času (72-96 ur), so nizkocenovni in zagotavljajo visoko ponovljivost.

Eksperimentalna metodologija

Eksperimentalni protokol je predvideval uporabo de-immobiliziranih kultur *Selenastrum capricornutum*, ki so bile izpostavljene **96 ur** vzorcem vode, odvzetim iz različnih točk akvaponskega sistema. Po končanem obdobju izpostavljenosti je bila ocenjena koncentracija **klorofila** in morebitna **inhibicija v primerjavi s kontrolno skupino (negativnim nadzorom)**.

Analiza klorofila je bila izvedena v skladu s standardiziranim metodološkim postopkom APAT-IRSA/CNR (Priročniki in smernice 29/2003). Postopek je vključil ekstrakcijo pigmenta iz algalne biomase z inkubacijo v 90% acetonu za 24 ur, nato pa kvantifikacijo s pomočjo spektrofotometričnih meritev. Ta metodološki pristop je omogočil pridobitev kvantitativne ocene vpliva vzorcev na fiziologijo testiranega organizma.

Praktična uporaba

Implementacija sistema za biološki nadzor, temelječega na *Selenastrum capricornutum*, je zasnovana kot **dopolnilno orodje kemijskim analizam** v akvaponskih sistemih. Pomembnost integracije tega biološkega pristopa izhaja iz njegove sposobnosti zagotavljanja bolj celovite ocene stanja sistema. Medtem ko kemijske analize zagotavljajo "trenutno sliko" parametrov vode, uporaba bioindikatorjev **omogoča oceno kumulativnega biološkega učinka** pogojev v sistemu, deluje kot prepoznavni sistem za morebitne težave. Bioindikatorji lahko razkrijejo težave, ki morda niso takoj očitne zgolj s kemijskimi analizami, omogočajo **zgodnje opozarjanje** (early warning) in s tem preventivne ukrepe za bolj učinkovito upravljanje sistema.

Dejansko lahko že sama vizualna opazovanja barve alg v cuveti nudijo pomembne predhodne informacije o zdravju sistema: **barva**, ki odstopa od tipične intenzivne zelene, lahko nakazuje spremembe v parametrih rasti, presnovni stres ali prehranske neravnotežja. Za bolj podrobno analizo vsebnosti pigmentov je mogoče uporabiti **spektrofotometrične tehnike**, ki omogočajo natančno določitev sestave in koncentracije fotosintetskih pigmentov, kar daje kvantitativne informacije o presnovnem stanju in stresu mikroalg.

Pomemben tehnični vidik je možnost **povezovanja nekaterih fotobioreaktorjev** za rast populacije enoceličnih alg neposredno z akvaponskim sistemom brez potrebe po kompleksnih strukturnih spremembah, kar omogoča hitro in malo invazivno implementacijo. Obstaja torej možnost implementacije sistema kot **rešitev "naredi-si-sam"** po začetnem ustreznem usposabljanju rejcev ali kmetov. Z ekonomskega vidika je sistem zanimiv tudi za male proizvajalce. Začetna nastavitve zahteva zmerno vlaganje v nakup osnovne opreme, kot so fotobioreaktor in prenosni spektrofotometer za terensko analizo, ki se lahko uporablja tudi za kemijske analize. Stroški delovanja so omejeni predvsem na nakup gojitvenega substrata in potrošnega materiala, kar omogoča

dolgoročno trajnost sistema. Začetni investicijski stroški se lahko amortizirajo z **zmanjšanjem pogostosti zunanjih kemijskih analiz** in predvsem s preventivo težav, ki bi lahko zahtevale drage posege. Na koncu lahko proizvajalci razvijejo svojo lastno referenčno bazo podatkov, specifično za njihov sistem, z integracijo biološkega nadzora v običajne prakse upravljanja.

Izvor in ohranjanje testnih organizmov

Mikroalge *Selenastrum capricornutum* so bile pridobljene v epruvetah, ki so vsebovale **algalne kroglice**, z možnostjo de-immobilizacije organizmov v manj kot 30 minutah, ko je to potrebno za teste toksičnosti v sladki vodi (Slika 2). Gojišče je bilo pripravljeno v skladu s specifikacijami metode US-EPA iz leta 1978. Preostale algalne kulture so bile shranjene v živalskem laboratoriju na lokaciji Shoreline, ki se nahaja v Science Parku Padriciano (Trst), kjer so bile vzdrževane v **kontroliranih okoljskih pogojih**, s posebnim poudarkom na temperaturi, svetlobnem režimu in oksigenaciji.



Slika 6 – Hranjenje algalnih kultur in epruveta s de-immobiliziranimi kroglicami *Selenastrum capricornutum*.

Načrt vzorčenja

Nadzor nad akvaponskim sistemom sladke vode, ki se nahaja na Univerzi v Ljubljani, je bil izveden skozi **dve vzorčenji**, opravljeni **oktobra in decembra 2024**. Za karakterizacijo različnih sekcij sistema je bilo identificiranih šest strateških vzorčevalnih točk, ki omogočajo spremljanje poteka vode skozi sistem (Slika 3).

Vzorčevalne točke	Koda
-------------------	------

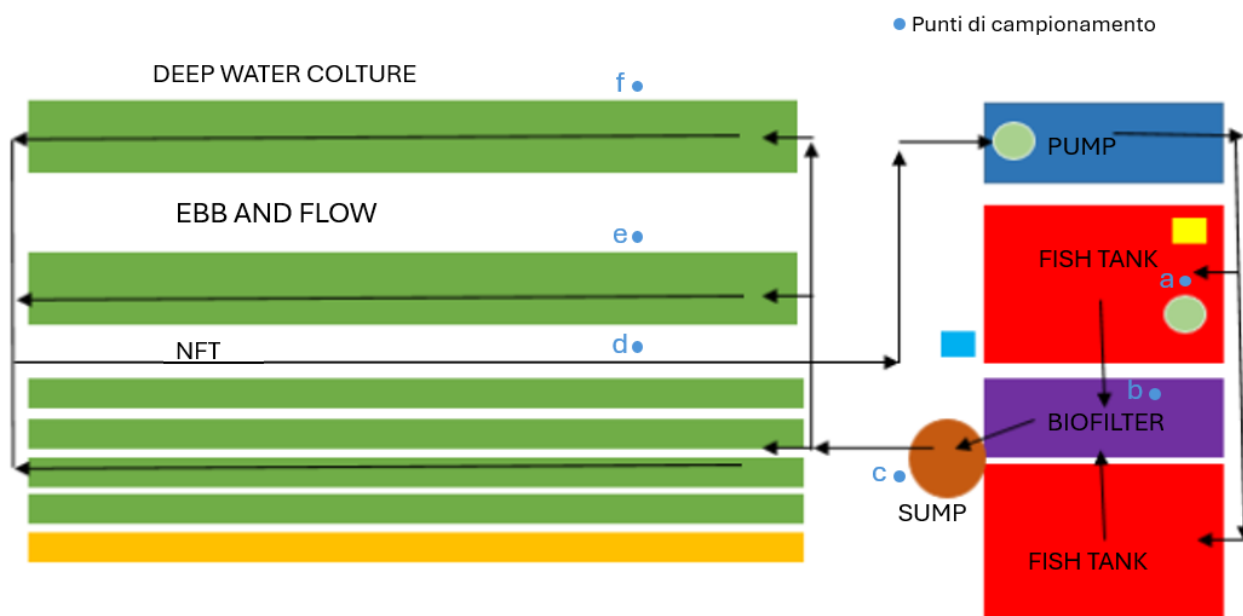
Vzorčenja so zajemala tako **ribji del** sistema, z vzorčenjem na vhodu in izhodu iz ribjih bazenov ter v zbiralnem rezervoarju (sump), kot tudi

različne **hidroponske sekcije**, predstavljene z sistemi Deep Water Culture, Nutrient Film Technique in Ebb and Flow (Tabela 1). Ta razporeditev vzorčevalnih točk omogoča spremljanje morebitnih sprememb v kakovosti vode vzdolž celotnega poteka sistema.

Za vsako vzorčevalno točko so bili odvzeti vzorci vode, namenjeni tako za **analize kemijsko-fizikalnih parametrov** in koncentracij **hranil**, kot tudi za **ekotoksikološke teste**, izvedene z uporabo mikroalge *Selenastrum capricornutum* kot sladkovodnega bioindikatorskega organizma.

a	Vhod vode v ribje bazene	F_IN
b	Izhod vode iz ribjih bazenov	F_OUT
c	Sump	SM
d	Nutrient Film Technique	NFT
e	Ebb and Flow	EF
f	Deep Water Culture	DWC

Tabela 1 – Vzorčevalne točke



Slika 7 - Shema akvaponskega sistema s točkami vzorčenja.



Slika 8 - Vzorčenje v sistemu

REZULTATI Z UGOTOVITVAMI

Testiranja rastnih substratov so pokazala, najboljšo primernost uporabe vlaken iz konoplje in celuloze. Pri čemer smo boljše rezultate dosegali pri uporabi blazinic iz konopljinih vlaken, saj so blazinice iz celuloze zadrževale visoko raven vode, kljub maksimalnemu zmanjšanju pretoka na NFT kanalu. Gostota setve je bila izvedena po strokovnih priporočilih in je odvisna od absolutne mase semena posamezne rastlinske vrste.

Gostota setve je odvisna od vrste in sorte mikrozelenja ter stopnje razvoja, v kateri se jo pobira. Na primer gostota lahko variira od enega semena na cm^2 za grah in sončnico do 10 semen na cm^2 za vrste in sorte, ki imajo majhna semena (vrtna kreša itd.). Povečanje gostote setve z enega na tri semena na cm^2 pri mikrozelenju rukole, mizune in gorčice je pokazalo pomembno razliko v teži sveže pobranega mikrozelenja.

Za hitrejšo kalitev predhodno namočimo večja semena (npr. fižola, graha, rdeče pese in sončnice) v toplo vodo za nekaj ur ali kar čez noč. Izbrano seme oziroma mešanico semen enakomerno potresemo in nekoliko potisnemo v rastni substrat. Z vodo rahlo orosimo seme in v podstavek dolijemo vodo za ohranjanje vlažnosti substrata. Pladenj položimo na okensko polico in ga izpostavimo sončni svetlobi.

Redno vsak dan dolivamo vodo v podstavek in orosimo semena oziroma kasneje tudi kalice. Pri tem moramo biti pozorni, da se semena/kalice ne posušijo, ravno tako pa se izogibamo prekomerni namočenosti (razvoj bolezni). V času sončnih dni smo si pomagali kar s prekrivanjem kanalov z tankimi tkaninami (npr. koprenami za prekrivanje vrtnin spomladi), ki so služile za dodatno vzdrževanje vlažnosti semena in zgornjega sloja rastnega substrata, a le do faze vznika.



Slika: Seme redkvice in graha na konopljinini in celulozni blazinici.

Ko smo imeli določen izbrani rastni substrat in gostoto setve smo se odločili za testiranje kalic z uporabo nanotehnologije. Po priporočilih in glede na hitrost rastnega cikla in možnost vnosa nanohranila v celotni akvaponski sistem, saj ne vemo kakšen možen učinek bi bil na ostale rastline vključene v sistem in ribe smo se odločili, da preverimo možno obogatitev z natrijev selenatom (Na_2SeO_4) preko listov.

Prednosti listne aplikacije selena:

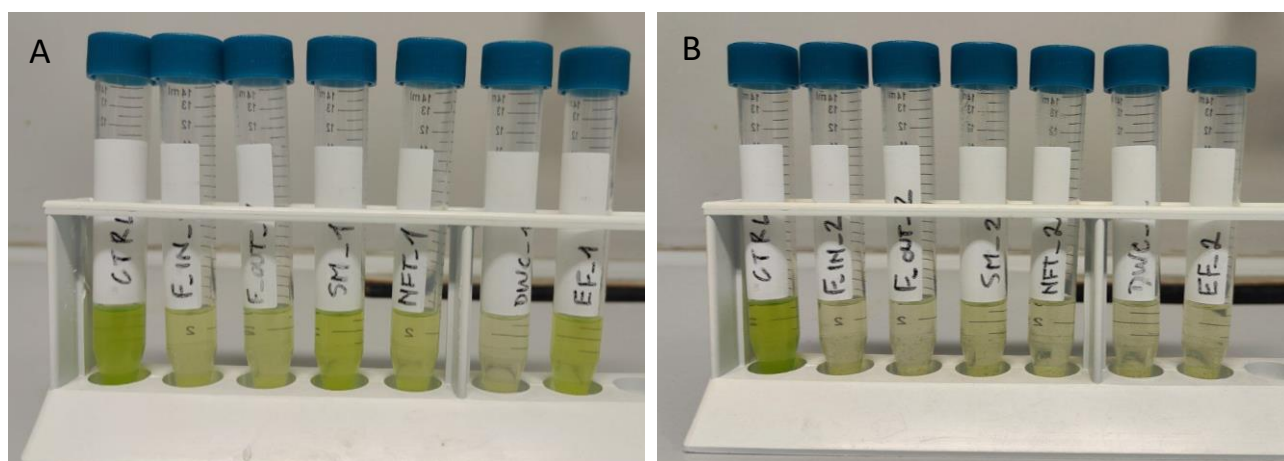
- Hitrejša absorpcija in večja učinkovitost – Rastline lažje in hitreje absorbirajo Se skozi listne pore kot prek korenin.
- Ciljno povečanje Se v užitnem delu rastline – Pri mikrozelenju je ključna vsebnost Se v listih, kjer se Se kopiči pri foliarni aplikaciji.
- Manjša izguba hranil – Pri listnem nanosu Se ni podvržen vezavi v rastnem substratu ali izpiranju, kot se lahko zgodi pri pridelavi v tleh.

Po pregledu literature smo se odločili za koncentracijo 10 mg/L (0,126 mM Se) Aplikacijo smo izvedli, ko so bili klični listi razprti. Zanimalo nas je ali bo aplikacija z selenom (1) izboljšala lastnosti mikrozelenja in (2) izboljšali vsebnost mikrozelenja s selenom (biofortifikacija) in bomo s tem pridelali funkcionalno hrano. Prišli smo do zanimivega zaključka. Tako pri grahu kot kolerabici aplikacija s selenom ni vplivala na debelino zgornje in spodnje povrhnjice, palisadno tkivo in gobasto tkivo ter število listnih rež. Prav tako pri obeh vrstah nismo zaznali razlik v količini pridelka. Določitev vsebnosti selena v užitnem delu se je povečala za 6,5

krat glede na netretirane kalice graha in 7,8 krat pri netretirani kalich redkvice. Z rezultati smo lahko zadovoljni saj se vsebnost Se v mikrozelenju lahko znatno poveča z listno aplikacijo (foliarno biofortifikacijo), pri čemer je povečanje odvisno od koncentracije nanesenega Se, oblike Se in vrste rastline. Dosedanje študije na kalich brokolija (Puccinelli in sod., 2017) je pokazala, da je foliarna aplikacija 10 μM natrijevega selenata (Na_2SeO_4) povečala vsebnost Se v kalich za 10- do 20-krat v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Raziskava na kalich gorčice (Schiavon in sod., 2013) je ugotovila, da listna aplikacija Se omogoča boljše shranjevanje selen v rastlinskem tkivu, pri čemer se vsebnost Se v listih poveča do 15-krat glede na rastline brez dodatka Se. Študija na špinači (Hawrylak-Nowak in sod., 2015) je pokazala, da foliarna uporaba Se v obliki selenita (SeO_3^{2-}) poveča akumulacijo selen v listih za 5- do 12-krat, pri čemer je biološka dostopnost Se za ljudi višja kot pri aplikaciji v tla.

V tej študiji je bila ocenjena **fiziološka reakcija** enocelične alge *Selenastrum capricornutum* na vodo iz akvaponskega sistema, z analizo **inhibicije klorofila a (Chl a)**, pri čemer je bil ta parameter uporabljen kot kazalnik fiziološkega stresa organizma.

V dobljenih rezultatih je mikroalga, izpostavljena vzorcem, ki so vsebovali različne koncentracije dušika in fosfata, pokazala pomembno variabilnost v vsebnosti klorofila. Zlasti so **prekomerne koncentracije dušika** povzročile **inhibicijo** sinteze **klorofila**.



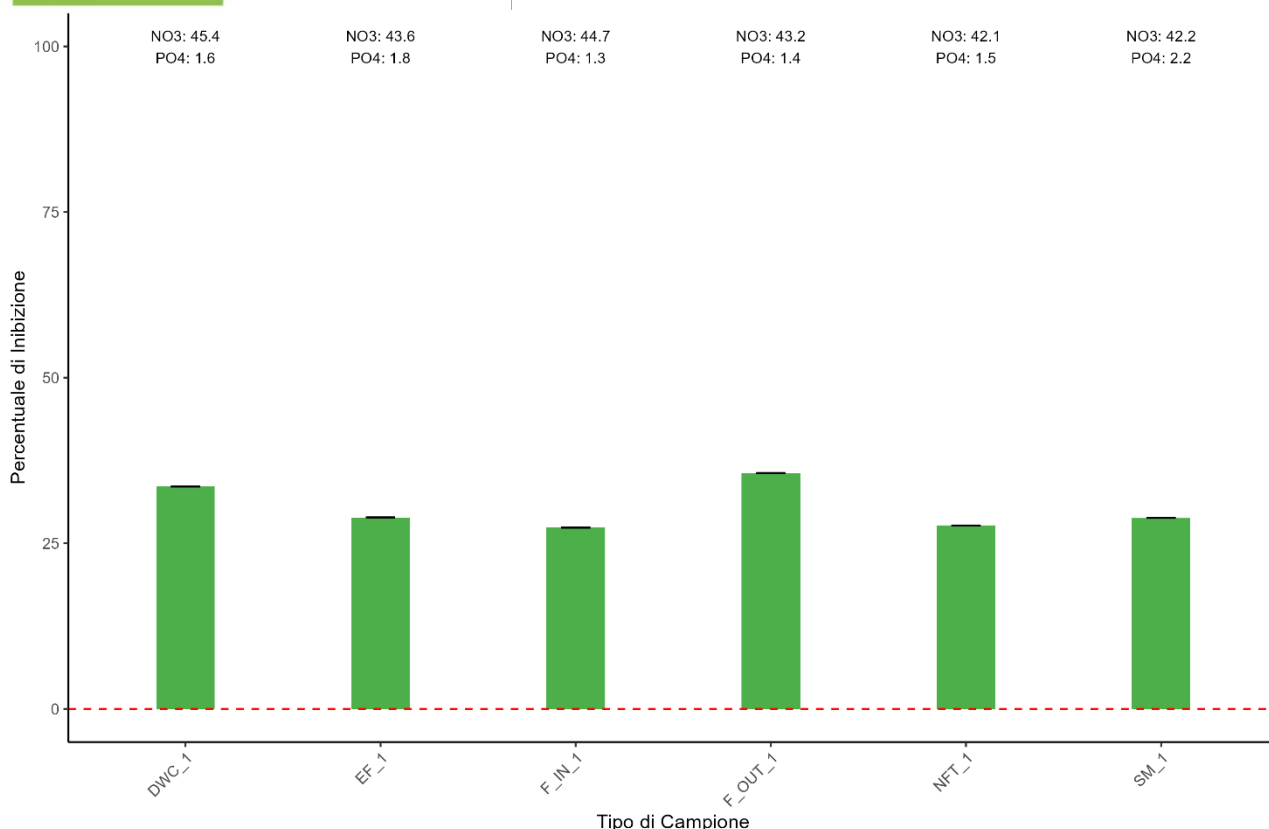
Slika 6 - Izvleček klorofila iz *Selenastrum capricornutum* (A) prvo vzorčenje (B) drugo vzorčenje. Prva epruveta na levi predstavlja negativni kontrolni vzorec (CTRL), medtem ko druge epruvete predstavljajo točke vzorčenja iz akvaponskega sistema.

Hkrati je med 96-urnim gojenjem barva kulture prešla od tipične intenzivne zelene barve do svetlo zelene v vzorcih z večjo inhibicijo pigmentov (Slika 6).

Nadaljnji **stolpčni grafi** predstavljajo odstotek **inhibicije klorofila a v primerjavi z negativnim kontrolnim vzorcem** v *Selenastrum capricornutum*. Višina stolpcev predstavlja odstotek inhibicije pigmentov. Nižji stolpci nakazujejo manjšo inhibicijo, kar pomeni dobro fiziološko stanje organizma. Nasprotno pa višji stolpci predstavljajo visok odstotek inhibicije, kar pomeni pomemben fiziološki stres, ki moti normalno proizvodnjo fotosintetskih pigmentov. V zgornjem delu grafov so prikazane **koncentracije nitratov** (NO₃⁻) in **fosfatov** (PO₄³⁻) za vsak vzorec.

Odstotek inhibicije klorofila a v *Selenastrum capricornutum* – prvo vzorčenje

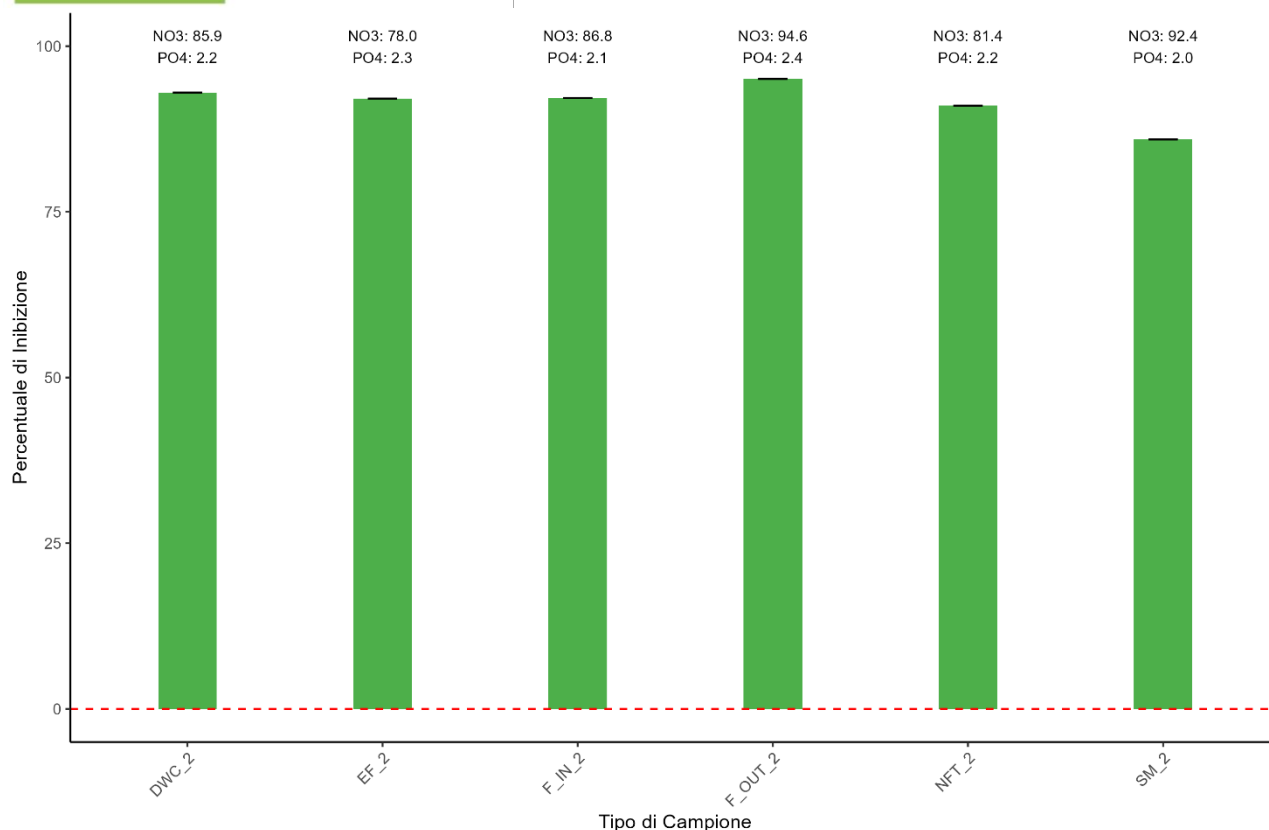
Rezultati, pridobljeni z izpostavitvijo mikroalge *Selenastrum capricornutum* vzorcem, zbranih **oktobra 2024**, razkrivajo začetno sliko **zmerne fiziološkega stresa** mikroalge (Slika 7). Odstotki inhibicije klorofila a se gibljejo med 25 % in 35 %, kar nakazuje rahlo prehransko neravnovesje. Vrednosti nitratov, ki se gibljejo med 42,1 in 45,4 mg/L, ter vrednosti fosfatov, med 1,4 in 1,6 mg/L, nakazujejo sistem, ki začne kazati prve znake preobremenjenosti s hranili, vendar še ni v kritični fazi.



Slika 7 - Odstotek inhibicije klorofila a v *S. capricornutum*, izpostavljeni vzorcem vode, zbranih iz različnih točk akvaponskega sistema (oktober 2024). Višina stolpcev predstavlja odstotek inhibicije pigmentov. Nižji stolpci nakazujejo manjšo inhibicijo, kar pomeni dobro fiziološko stanje organizma. Nasprotno pa višji stolpci predstavljajo visok odstotek inhibicije, kar pomeni pomemben fiziološki stres, ki moti normalno proizvodnjo fotosintetskih pigmentov.

Odstotek inhibicije klorofila a v *Selenastrum capricornutum* – drugo vzorčenje

Rezultati **drugega vzorčenja**, izvedenega **decembra 2024**, kažejo na drastično poslabšanje pogojev v sistemu (Slika 8). **Odstotki inhibicije klorofila a se dramatično povečajo**, dosežejo vrednosti med 85 % in 95 %. Povečanje koncentracije nitratov, ki zdaj variira med 81,4 in 92,4 mg/L, in stabilizacija fosfatov okoli 2,0-2,4 mg/L, pričata o postopnem kopičenju dušikovih spojin, ki ogroža ravnovesje ekosistema.



Slika 8 - Odstotek inhibicije klorofila a v *S. capricornutum*, izpostavljeni vzorcem vode, zbranih iz različnih točk akvaponskega sistema (december 2024). Višina stolpcev predstavlja odstotek inhibicije pigmentov. Nižji stolpci nakazujejo manjšo inhibicijo, kar pomeni dobro fiziološko stanje organizma. Nasprotno pa višji stolpci predstavljajo visok odstotek inhibicije, kar pomeni pomemben fiziološki stres, ki moti normalno proizvodnjo fotosintetskih pigmentov.

SKLEPNE UGOTOVITVE

Listna aplikacija selena pri mikrozelenju lahko poveča vsebnost Se za 5- do 20-krat, odvisno od rastlinske vrste, oblike selena in koncentracije nanosa. Ta metoda je učinkovita za proizvodnjo biofortificiranega mikrozelenja z višjo hranilno vrednostjo, vendar zahteva natančno optimizacijo koncentracije Se za preprečevanje toksičnih učinkov.

Če je cilj **zgodnja rastna spodbuda in enakomerna razporeditev hranil**, je po poročanju literature **nanos na semena boljša izbira**. Če pa želimo **hiter popravek pomanjkanja mikrohranil ali povečano vsebnost določenih elementov v užitnih delih rastline**, je **foliarna aplikacija učinkovitejša**. Optimalno strategijo pogosto predstavlja **kombinacija obeh metod**, saj se s tem zagotovi tako dolgoročna oskrba kot tudi hitra prilagoditev hranilnih potreb rastline. Vendar bi bilo tu v prihodnosti potrebno omogočiti tudi možne učinke na

ribo v sistemu. Ravno to je bil tudi razlog, da se v našem primeru nismo odločili za nanos na semena saj smo se bali ali lahko pride do izpiranja preko toka vode in kakšne morebitne posledice (če sploh kakšne) ima to za ribo.

Zadnja naloga aktivnost je bila ali lahko nanos nanodelcev na embalažo podaljša rok uporabnosti. Tukaj smo pred izvedbo naleteli na pomislek in težavo. Pomislek se nanaša na potrebo o pakiranju kalic. V anketi, ki je tekla ravno v času izvedbe naše aktivnosti je študent v sklopu raziskave diplomskega dela (Mestnik, diplomsko delo v procesu zaključevanja) prišel do zaključka, da največ kalic (mikrozelenja) porabijo gostinski obrati, ki pa si zaradi najdaljše obstojnosti želijo kalice prejeti ne porezane, skupaj z rastnim substratom, kar jim omogoča največjo svežino. Druga težava se nanaša na biofortifikacija z nanosom na pakirno embalažo, ki je inovativen pristop, ki omogoča **postopno sproščanje mikrohranil** v živilo s čimer se povečuje hranilna vrednost mikrozelenja, izboljšuje njegova varnost in podaljšuje rok uporabnosti. Uporaba **nanodelcev cinka (ZnO), srebra (Ag) in selena (Se)** v embalaži lahko zmanjša **mikrobno kontaminacijo**, saj ti materiali delujejo protibakterijsko in preprečujejo rast patogenih mikroorganizmov (Silva in sod., 2019). Poleg tega lahko **aktivna embalaža** z mikrohranili omogoča **postopno obogatitev hrane** in tako nadomesti izgube hranil, ki nastanejo med skladiščenjem ali transportom (García in sod., 2018). Na primer, raziskave kažejo, da embalaža z **nanodelci ZnO ne samo zavira rast bakterij, ampak tudi izboljša vsebnost cinka v živilih**, kar prispeva k prehranski kakovosti končnega proizvoda (Arfat in sod., 2018). Kljub obetavnim možnostim pa so za komercialno uporabo potrebne nadaljnje študije, ki bodo ocenile **učinkovitost sproščanja hranil, stabilnost materialov in morebitne varnostne pomisleke**, saj lahko migracija nekaterih nanodelcev v hrano predstavlja **tveganje za zdravje** (Duncan, 2011). Zato je ključnega pomena, da se **razvijejo regulativni okviri** in se izvedejo **dolgoročne raziskave vpliva teh materialov** na prehransko varnost in zdravje potrošnikov. Hkrati pa enostavno nismo našli ustreznega primera po katerem bi lahko obogatili embalažo in v tem videli smiselnosti postopka saj si mikrozelenjave kupci ne želijo imeti pakiranega.

Med celotnim poskusom se nam je porodilo veliko vprašanje mikrobiloške varnosti kalic. Čeprav je mikrozelenjava na splošno varnejša kot kalčki, lahko še vedno vsebuje patogene, kot so *Salmonela*, *E. coli* ali *Listerija*, zlasti če je gojena v nehygienskih pogojih ali če je vir vode onesnažen. Do kontaminacije lahko pride v različnih fazah pridelave, vključno s slabo higieno pri ravnanju in pakiranju, uporabo onesnažene vode ali rastnih medijev. Mikrozelenjava se pogosto uživa surova, kar pomeni, da ne prestopi "faze uničenja" (kot je kuhanje), ki bi odstranila škodljive bakterije, zato je bistveno izvajati stroge prakse varnosti živil. Ko smo

raziskovali dalje, smo prišli do zanimive ugotovitve, da Smernice za mikrobiloško varnost živil, ki so namenjen končnemu potrošniku, zaenkrat ne vsebuje predpisov, ki bi se nanašali na mikrozelenje. Ker nas je tematika zelo zanimala smo šli v nadaljnjo večjo študijo, kateri rezultati so v tem trenutku v fazi obdelave in kažejo na nujnost resnosti tega pomisleka.

Raziskave, izvedene z enocelično zeleno algo *Selenastrum capricornutum*, so razkrile zanimivo sliko **občutljivosti** tega mikroorganizma na **okoljske spremembe** v akvaponskih sistemih. Organizem se je izkazal za **biološki indikator**, sposoben razkriti tudi rahle spremembe v hranilnih parametrih preko sprememb v svojih presnovnih mehanizmih.

Možnost pridobivanja informacij o zdravju sistema v kratkem času predstavlja pomembno **dodano vrednost** v primerjavi s tradicionalnimi kemičnimi analizami. Test z mikroalga se tako izkaže kot **dopolnilna metoda** kemično-fizičnim analizam, ki omogoča biološko oceno vpliva okoljskih parametrov, ki dopolnjuje in bogati informacije pridobljene s tradicionalnimi analitičnimi metodami.

Najpomembnejši podatek, ki je izšel iz študije, je tesna **obratna korelacija** med koncentracijo **hranil** in sintezo fotosintetskih **pigmentov**. Še posebej so nitrati pokazali izrazit učinek, saj so povzročili postopno inhibicijo presnovnih procesov že pri relativno nizkih koncentracijah. Ta ugotovitev poudarja sposobnost *S. capricornutum* delovati kot sistem **zgodnjega opozarjanja** (early warning), ki zazna neravnovesja v ekosistemu že v zelo zgodnji fazi.

S stališča metodologije protokol, ki je bil razvit, prinaša nedvomne prednosti: hitrost izvedbe, ponovljivost rezultatov, ekonomska trajnost in enostavna izvedba, ki ga naredi privlačnega tudi za **manjše proizvodne enote**. Namreč, uporabljena oprema, osredotočena na prenosni spektrofotometer, ki se pogosto uporablja v akvakulturi, je poceni naprava, ki ima le majhen vpliv na celotni investicijski strošek. Ta instrument, ki se že običajno uporablja za analizo hranil, se lahko uporablja tudi za oceno klorofila, kar omogoča ohranjanje nizkih operativnih stroškov ter naredi protokol dostopen in trajnosten.

VIRI:

- Arfat, Y. A., Ejaz, M., Jacob, H., & Ahmed, J. (2018). Deciphering the potential of bionanocomposite films in food packaging: A review. *Carbohydrate Polymers*, 181, 811-820.
- Bouis, H. E., & Saltzman, A. (2017). Improving nutrition through biofortification: A review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Global Food Security*, 12, 49-58.
- Delaide, B., Goddek, S., Gott, J., Soyeurt, H., & Jijakli, M. H. (2016). Lettuce (*Lactuca sativa* L. var. Sucrine) growth performance in complemented aquaponic solution outperforms hydroponics. *Water*, 8(10), 467.
- Dimkpa, C. O., & Bindraban, P. S. (2018). Nanofertilizers: New products for the industry? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26), 6462-6473.
- Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1), 1-24.
- Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M., & Soleimani-Zad, S. (2011). Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on the shelf life of fresh orange juice. *Food Control*, 22(2), 408-413.
- García, A., Castillo, L. A., Pérez, E., Barbosa, S. E., & Hossain, S. (2018). Active food packaging based on biopolymeric nanocomposites: A review. *Food Hydrocolloids*, 83, 293-315.
- Goddek, S., Joyce, A., Kotzen, B., & Burnell, G. M. (2019). Aquaponics food production systems: Combined aquaculture and hydroponic production technologies for the future. *Springer Nature*.
- Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., & Matraszek-Gawron, R. (2015). Selenium biofortification enhances the accumulation of carotenoids in lettuce leaves and alleviates plant response to salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, 6, 111.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931.
- Liu, R., & Lal, R. (2021). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of The Total Environment*, 799, 149418.
- Mahakham, W., Theerakulpisut, P., Maensiri, S., Phumying, S., & Sarmah, A. K. (2017). Environmentally friendly ZnO nanoparticles: Influence on seed germination and seedling growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Scientific Reports*, 7(1), 1-11.
- Paine, J. A., Shipton, C. A., Chaggar, S., Howells, R. M., Kennedy, M. J., Vernon, G., ... & Drake, R. (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology*, 23(4), 482-487.
- Puccinelli, M., Malorgio, F., Pezzarossa, B. (2017). Selenium enrichment of horticultural crops. *Molecules*, 22(7), 933.
- Rai, M., Birla, S., & Ingle, A. P. (2018). Emerging trends in nanotechnology for sustainable food security and environmental protection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(10), 4289-4301.
- Rana, K. L., Kour, D., Yadav, N., Yadav, A. N., & Kumar, M. (2020). Agriculturally important microbial biofilms: Biodiversity, ecological significances, and biotechnological applications. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1241-1261.
- Ranjbar, M., Sadeghipour, H. R., & Aghili, R. (2021). Seed priming with zinc oxide nanoparticles improves seedling growth in barley under salt stress. *Journal of Plant Nutrition*, 44(5), 665-678.
- Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3485-3498.

- Saha, S., Monroe, A., & Day, M. R. (2016). Growth, yield, plant quality, and nutrition of basil (*Ocimum basilicum* L.) under soilless agricultural systems. *Scientia Horticulturae*, 212, 218-226.
- Schiavon, M., Pilon-Smits, E. A. H., Mongiat, S., et al. (2013). Selenate and selenite biofortification in Brassicaceae sprouts: Effects on selenium accumulation and speciation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10961-10967.
- Schmautz, Z., Loeu, F., Liebisch, F., Graber, A., & Mathis, A. (2017). Potential of integrating medicinal plants into aquaponic systems. *Water*, 9(3), 211.
- Silva, N. H. C. S., Drumond, I., Almeida, I. F., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Vilela, C. (2019). Active cellulose-based packaging for food applications: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 533-546.
- Smernice za mikrobiloško varnost živil, ki so namenjen končnemu potrošniku ([Smernice 2019.pdf](#))
- Tripathi, D. K., Shweta, Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., ... & Sharma, N. C. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 2-12.
- Verlinden S. 2020. Microgreens: definitions, product types, and production practices. *Horticultural Reviews*, 47: 85–124, <https://doi.org/10.1002/9781119625407.ch3>
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182(1), 49-84.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182(1), 49-84.