ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE PER L'ABRUZZO E IL MOLISE
"G. CAPORALE"

DOCUP PESCA REGIONE ABRUZZO
BANDO 2001 – MISURA 4.6 "AZIONI INNOVANTI"
PROGETTO 01/IM/01/AB
"RIPRODUZIONE DI SPECIE TTICHE INNOVANTI"

RELAZIONE TECNICA FINALE

Dr. Alessandro PAVONE

Marzo 2004

INDICE

Introduzione

1. Infrastrutture realizzate nell'ambito del progetto
- 1.1 Settore per la produzione di alghe unicellulari
- 1.2 Settore per la produzione di rotiferi ed Artemia
- 1.3 Circuito chiuso con vasche da 1 mc
- 1.4 Circuito chiuso con vasca da 4 mc
- 1.5 Strutture annesse

2. Colture algali: lavori svolti e protocolli adottati
- 2.1 Aspetti fondamentali
- 2.2 Protocollo di produzione del ceppo *Nannochloropsis sp*
- 2.3 Protocollo di produzione del ceppo *Isochrysis sp*

3. Coltura e arricchimento dei rotiferi: lavori svolti e protocolli adottati
- 3.1 Aspetti fondamentali
- 3.2 Protocollo di produzione adottato

4. Standardizzazione schiusa e arricchimento Artemia

5. Prova allevamento larvale Cernia: risultati preliminari
- 5.1 Trasporto delle uova, prima parte dell'incubazione e semina
- 5.2 Fine dell'incubazione e schiusa delle uova
- 5.3 Allevamento larvale
- 5.4 Biometrie e istologia

Conclusioni

Allegati

Allegato 1	Medium utilizzati per le colture algali
Allegato 2	Protocollo di conta delle colture algali
Allegato 3	- Cicli algali - *Nannochloropsis sp.* - prove del tiosolfato - *Isochrysis sp.* - Ciclo completo di *Nannochloropsis sp.* - Ciclo completo di *Isochrysis sp.*
Allegato 4	- Cicli rotiferi - Brachionus plicatilis (RP) - Brachionus rotundiformis (RR) - alimentazione di una coltura in boccia - coltura in boccia di RP - coltura in boccia di RR - coltura di rotiferi RR in sacco algale - coltura in vasca di RR - schema di alimentazione in produzione ed in arricchimento
Allegato 5	- protocollo di filtrazione dei rotiferi
Allegato 6	- ciclo larvale - vasca 1, condizioni in vasca - vasca 1, alimentazione - vasca 1, dati mortalità - vasca 1, biometrie
Allegato 7	- immagini

SCHEDA TECNICA

Data domanda	Bando DOCUP PESCA REGIONE ABRUZZO del 7 agosto 2001 Domanda del 30 ottobre 2001
Importo	128.018,84 €
Data approvazione	DH 18/29 del 22 novembre 2002
Data inizio attività	Luglio 2003
Data fine attività	30 marzo 2004
Data variante	7 novembre 2003
Data approvazione variante	DH 18/67 del 19 dicembre 2003
Tipo di finanziamento	38.405,65 € - Partecipazione dell'IZSAM 25.603,76 € - Contributo Stato Italiano 64.009,42 € - Contributo UE
Partecipanti	Dr. Alessandro Pavone - IZSAM Dr. Alessandra Paolini - IZSAM Dr. Miriam Berti - IZSAM Dr. Lorenzo Gennari – Libero Professionista ICRAM – Roma CURDAM di S.Benedetto del Tronto (AP) Alessandro Perazzitti – coudiavatore tecnico
Sede delle attività	Torre Cerrano in Pineto (TE)

INTRODUZIONE

La relazione è riferita alla realizzazione del progetto Docup 01/IM/01/AB "Riproduzione di specie ittiche innovative" presentato nel dicembre 2001 (bando 2001- DOCUP PESCA – REGIONE ABRUZZO) dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", nel periodo dicembre 2002 - marzo 2004.

Rispetto alla stesura iniziale del progetto (dicembre 2001), il trasferimento delle attività presso la sede di Torre Cerrano, dal sito originariamente indicato e l'evoluzione delle tecniche di allevamento larvale della cernia (pubblicazioni Trieste 2002) hanno motivato una serie di variazioni, che sono state anche l'oggetto di un secondo progetto Docup prima e di una richiesta di variante poi. Il progetto DOCUP II, presentato nel dicembre del 2002 (bando 2002) prevedeva l'allestimento di un reparto esterno per l'allevamento larvale in "grandi volumi", con tecnica di tipo "mesocosmo" (3 vasche da 40 mc), un reparto interno per l'allevamento larvale in piccoli volumi, con tecnica di tipo "intensivo" (2 vasche da 1 mc a circuito chiuso), 2 vasche da 16 mc ad uso multiplo (stabulazione riproduttori e/o preingrasso), nonché la realizzazione di una presa a mare per grandi volumi d'acqua marina.
Purtroppo una serie di ritardi burocratici - amministrativi (autorizzazioni di Enti terzi pervenute fuori dei termini previsti dal bando) hanno impedito l'adozione di questa soluzione tecnica.
Considerata l'impossibilità di integrare i due progetti, é stato deciso di realizzare, come variante del primo progetto, due impianti a circuito chiuso per l'allevamento larvale in" piccoli volumi" e con tecnica di tipo "intensivo" (2 vasche da 1 mc e una vasca da 4 mc).

Premesso quanto sopra, lo svolgimento del progetto Docup 01/IM/01/AB, relativo alla "Riproduzione di specie ittiche innovative", ha visto la realizzazione di parte delle strutture nel luglio 2003, lo svolgimento di un ciclo di allevamento larvale della cernia (*Epinephelus marginatus*) nell'agosto 2003. Il progetto è stato poi completato, per i lavori, nell'autunno 2003 (presentazione della relativa variante) per l'aspetto relativo alla standardizzazione delle metodiche di produzione dell'alimento vivo dall' ottobre 2003 al marzo 2004.

Nel caso specifico del ciclo di allevamento larvale della cernia, i tempi burocratici hanno comportato la consegna degli impianti nei giorni immediatamente precedenti l'arrivo delle uova di cernia, con alcune difficoltà logistiche relative all'avvio dei cicli di produzione dell'alimento vivo (alghe e rotiferi). Di conseguenza la sperimentazione è stata orientata all'utilizzazione di uno solo dei 2 circuiti chiusi (2 vasche da 1 mc) e questo ha condizionato la prova. E' stato quindi possibile completare la prima parte del ciclo di allevamento larvale, ricavando indicazioni tecnico - sperimentali estremamente utili.

Si riporta di seguito una descrizione delle strutture realizzate nell'ambito del progetto, i vari protocollo adottati per la produzione dell'alimento vivo, nonché un'analisi del ciclo sperimentale di allevamento delle cernia svolto nell'estate 2003.

1. INFRASTRUTTURE REALIZZATE NELL'AMBITO DEL PROGETTO

A conclusione dell'iter precedentemente riassunto, sono dunque stati realizzati un **impianto pilota**, dotato di 3 vasche a circuito chiuso, destinato all'allevamento larvale di specie ittiche marine, nonché le strutture destinate alla produzione dell'alimento vivo (**settore fito-zoo-plancton**). La disposizione generale é riportata di seguito, con un settore per la produzione delle alghe ubicato al pianterreno della Torre, qui indicato come "*laboratorio fito-zoo*" (*figura 1*) e le rimanenti strutture collocate in un locale sottostante, qui indicato come "*avannotteria*" (*figura 4*).
Il prelievo di acqua marina avviene mediante una presa mobile, collegata alle varie linee di adduzione (*immagine 01*). Lo scarico, autorizzato dalla Provincia ai sensi della legge 152/99, avviene periodicamente in mare, dopo passaggio in serbatoi di stoccaggio e prelievo.

1.1 Settore per la produzione di alghe unicellulari

Il laboratorio fito-zoo (*figura 01*) è strutturato in due locali distinti: uno per i cosiddetti "piccoli volumi" algali, dove mantenere i ceppi e crescerli fino a volumi di coltura di 5-10 litri (*immagine 04*) e di un locale adiacente dove sono stati collocati 16 supporti per sacchi di coltura di 200-300 litri (*immagine 03*).

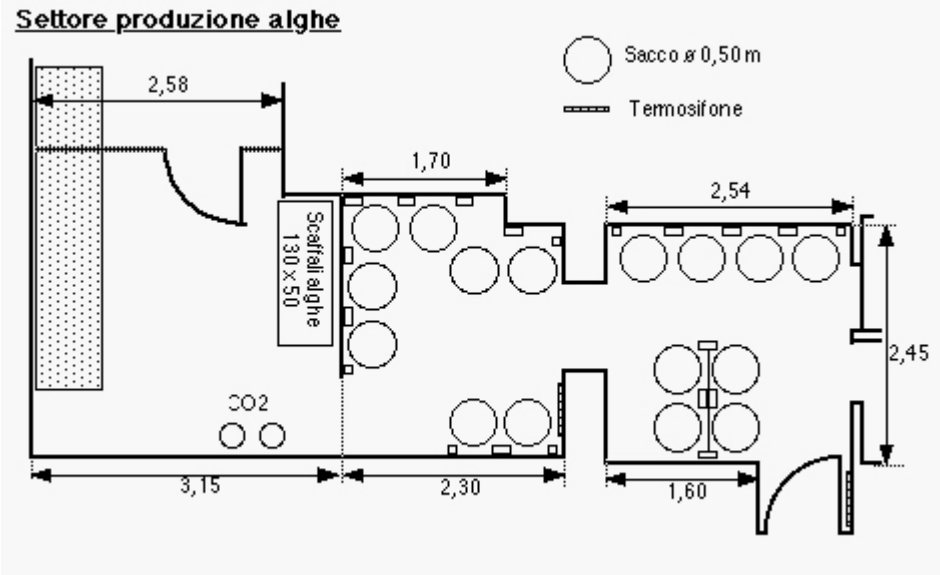


Figura 01

L'approvvigionamento dell'acqua marina é assicurato da una linea che porta l'acqua filtrata, mediante sollevamento meccanico, dall'avannotteria al locale per i "piccoli volumi". Una seconda linea consente, per gradiente idrostatico, il percorso inverso rispetto a quello precedente e quindi di portare le alghe prodotte al locale avannotteria.
Tutto il settore dei piccoli volumi è dotato di termoregolazione in modo da mantenere la temperatura costante su 20-22°C in qualsiasi periodo dell'anno. L'aria immessa nelle colture è filtrata con cartucce da 10, 5 e 1 micron e poi addizionata di anidride carbonica.
L'illuminazione, fondamentale per i processi di fotosintesi, é assicurati da una batteria di neon a "luce naturale", sia nel locale dei piccoli volumi, sia nel locale dei sacchi.

1.2 Settore per la produzione di rotiferi ed Artemia

La produzione dell'alimento vivo zooplanctonico (rotiferi ed Artemia) é ubicata in una dipendenza del locale avannotteria (*figura* 4). L'ambiente è dotato di un impianto di termoregolazione indipendente in grado di mantenere una temperatura costante di 24-25°C.

L'adduzione dell'acqua di mare é assicurata da una linea proveniente dal sistema di prelievo a mare (*immagine* 1). Prima dell'immissione nei circuiti l'acqua é filtrata con passaggi successivi in cartucce da 25, 10, 5 ed 1 micron.
L'aria dopo filtrazione con cartucce da 10, 5 e 1 micron, é distribuita a tutte le vasche.
Un impianto indipendente fornisce ossigeno puro a tutte le vasche.

Per la coltura (ciclo di 4 giorni) e l'arricchimento (ciclo di 24 ore) dei rotiferi sono state utilizzate 5 vasche tronco-coniche da 425 litri/cad.
Per la schiusa dell'Artemia (ciclo di 24 ore) sono state utilizzate 2 vasche tronco-coniche: la prima di 240 litri e la seconda di 425 litri, mentre per l'arricchimento sono previste 2 vasche di cui una da 425 litri e l'altra da 650 litri.
Risultano complessivamente i seguenti volumi:

- n°1 vasca da 240 litri (diametro 600, cilindro h.800 e cono h.400 mm);
- n°7 vasche da 425 litri (diametro 800, cilindro h.800 e cono h.400 mm);
- n°1 vasca da 650 litri (diametro 1000, cilindro h.800 e cono h.400 mm).

1.3 Circuito chiuso n° 1 dell'allevamento larvale con vasche da 0,9 mc

Il circuito chiuso n°1, costituito da n°2 vasche tronco-coniche di 0,9 mc, é ubicato nel locale avannotteria (*figura* 4 - *figura* 2 - *immagine* 02).

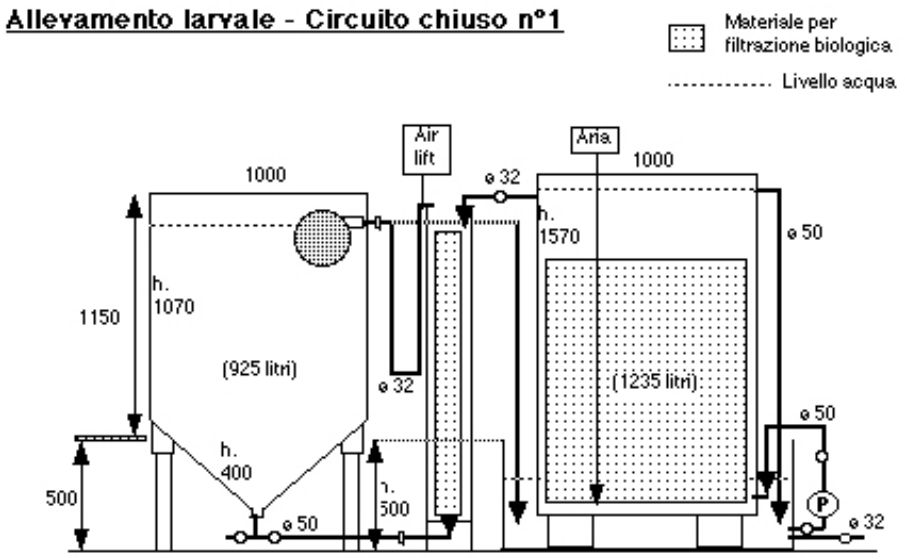


Figura 02

Le vasche sono collegate, a circuito chiuso, al filtro biologico (*figura 02*). Le vasche di allevamento larvale, di forma tronco conica, con piedi di sostegno, hanno un diametro di un metro, una parte cilindrica superiore alta 1 metro e un cono alto 0,4 metro. Il fondo é verniciato di colore chiaro e le pareti di nero (materiale atossico).
La circolazione idrica, da e verso il filtro, é assicurata in duplice modo, mediante "air-lift", durante le prime fasi di allevamento larvale e mediante pompa durante le fasi successive. L'ingresso d'acqua in vasca avviene dal fondo ed é regolabile mediante valvola a sfera. Il livello dell'acqua in vasca é determinato dall'altezza del tubo di sfioro dal quale l'acqua ritorna in filtrazione.

1.4 Circuito chiuso per allevamento larvale con vasca da 4 mc

Il circuito chiuso n° 2, costituito da n°1 vasca circolare di 4 mc, é ubicato nel locale avannotteria (*figura 3*).

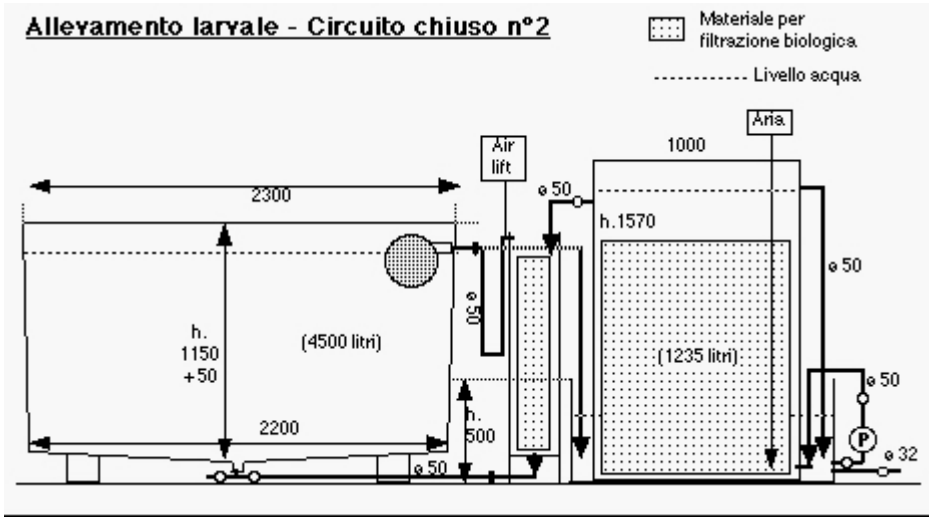


Figura 03

Le vasche sono collegate, a circuito chiuso, al sistema di filtrazione biologica come nel precedente circuito. La vasca di allevamento larvale, a pianta circolare, di forma tronco-conica, ha un diametro di 2,2-2,3 metri, una parte cilindrica con parete inclinate alta 1,15 metro e un fondo conico con lieve pendenza. Il fondo e le pareti sono verniciati di colore grigio (materiale atossico).
La circolazione idrica, da e verso il filtro, é assicurata in duplice modo, mediante "air-lift", durante le prime fasi di allevamento larvale e mediante pompa durante le fasi successive. L'ingresso d'acqua in vasca avviene dal fondo ed é regolabile mediante valvola a sfera. Il livello dell'acqua in vasca é determinato dall'altezza del tubo di sfioro dal quale l'acqua ritorna in filtrazione.

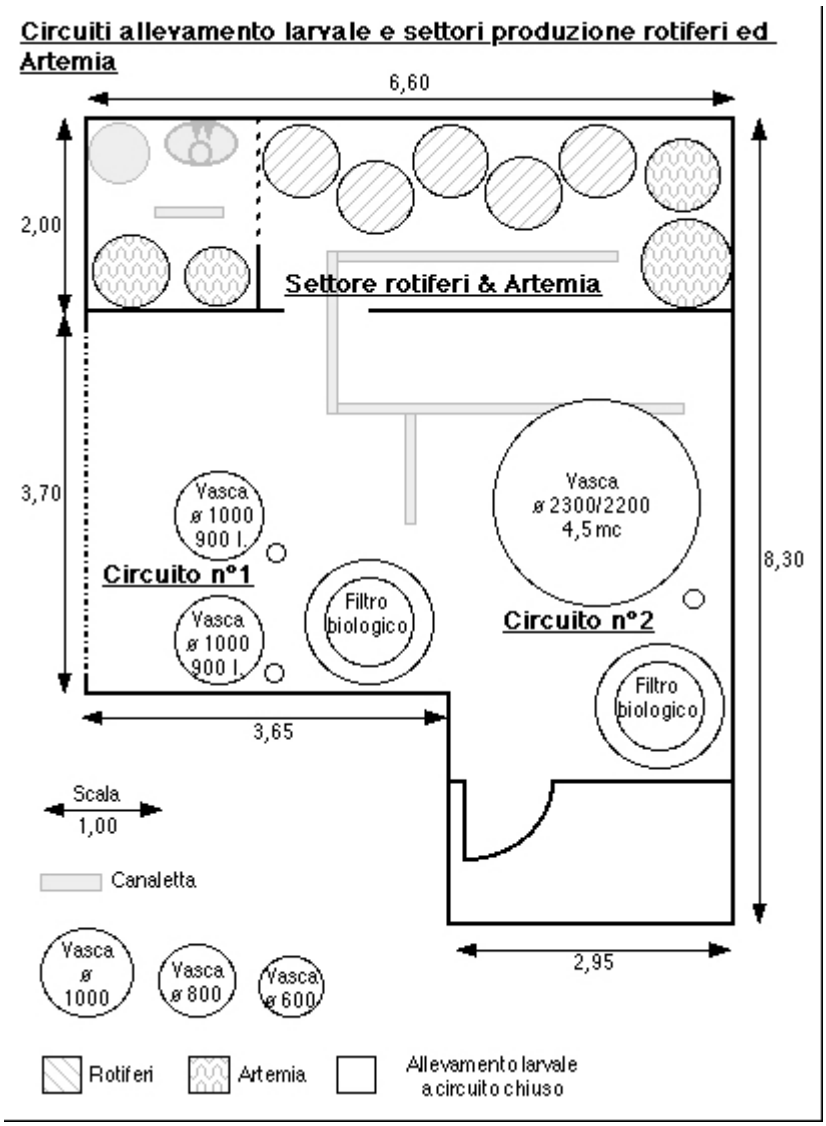


Figura 04

1.5 Strutture annesse

L'aerazione in vasca e la circolazione mediante air-lift sono assicurati da una soffiante a canale laterale con portata 80-100 mc/ora di aria.
Un impianto indipendente fornisce ossigeno puro a tutte le vasche.

2. COLTURE ALGALI: LAVORI SVOLTI E PROTOCOLLI ADOTTATI

Il settore per le colture algali é stato realizzato ed avviato in due tempi: il locale per i "piccoli volumi" é stato completato ed avviato a fine luglio 2003, mentre il locale adiacente, dove sono stati collocati 16 supporti per sacchi di coltura di 200-300 litri, é stato avviato nel dicembre 2003.

Sono stati prescelti 2 ceppi di alghe unicellulari tra i più comunemente utilizzati nell'allevamento larvale delle specie ittiche marine: *Nannochloropsis sp.* e *Isochrysis sp*. Il primo ceppo risulta ricco in EPA (acido eicosapentenoico 20:5 n.3), mentre il secondo é ricco in DHA (acido docosaesenoico 22:6 n3). Entrambi i ceppi, che risultano idonei per l'allevamento larvale in "acqua verdi' e per l'eventuale arricchimento dei rotiferi, sono stati acquistati presso il Culture Colletion of Algae and Protozoa – CCAP - (Scotland, UK).
Nel caso specifico è stato adoperato solo il ceppo *Nannochloropsis sp.*, sia per l'aggiunta in vasca di allevamento larvale (metodo detto delle "acqua verdi"), sia per l'arricchimento dei rotiferi. Il ceppo *Isocrysis sp*., notoriamente a crescita più lenta, è stato momentaneamente scartato. Le alghe sono state coltivate in sacchi in fase esponenziale di crescita, fino a concentrazioni di 20-30 milioni di cellule/cc (*immagine 03*).

La standardizzazione dei vari protocolli, svoltasi da maggio a luglio 2003, presso l'Università di Camerino e successivamente, fino a marzo 2004, presso la sede di Torre Cerrano, ha poi interessato entrambi i ceppi. La scheda riassuntiva dei vari cicli effettuati é riportata in *allegato 3*. Al fine di consentire la creazione di un archivio di riferimento, sono stati anche realizzati tre file "Excel", da utilizzare per l'elaborazione che si intende ottenere.

Se il protocollo di mantenimento e di coltura del ceppo *Nannochloropsis sp.* é da considerarsi del tutto messo a punto, sussistono ancora delle difficoltà per la gestione del ceppo *Isochrysis sp*, data la maggior durata del ciclo vitale, una pronunciata sensibilità alla CO_2 ed ai gradienti di temperatura di questa specie. Il lavoro di standardizzazione sta proseguendo contestualmente alla creazione dell'archivio di riferimento e del protocollo di registrazione dei dati.

2.1 Aspetti fondamentali

La gestione delle alghe comporta il "mantenimento del ceppo" e i vari "cicli di coltura" che vengono svolti a seconda delle esigenze di allevamento larvale.

Mantenimento dei ceppi
Il "mantenimento del ceppo" si svolge solitamente in provette da 10 cc, contenenti i medium descritti *nell'allegato* 1, che vengono rinnovate ogni 30 giorni. Nel mantenere i vari ceppi é sempre opportuno fare almeno 2 repliche di ogni provetta, aspettando l'effettiva crescita delle alghe del nuovo inoculo prima di eliminare le provette di origine.
Qualora si voglia avviare un nuovo ciclo di coltura, si provvede a fare alcune repliche aggiuntive che serviranno ad inoculare il primo volume di coltura (500 cc).

Cicli di coltura
I cicli di coltura comportano passaggi successivi nei seguenti volumi: beute da 500 cc, beute da 2 litri, beute da 5 litri e sacchi da 200-300 litri. Tempi e modalità di inoculo dipenderanno dai ceppi coltivati e dai medium adoperati (vedere punti 2.2 e 2.3).

Condizioni di coltura
Il mantenimento e la coltivazione avviene nelle seguenti condizioni:
- acqua filtrata e disinfettata, con salinità 25-28 ‰;
- temperatura costante di 20-21° C;
- aerazione;
- illuminazione continua con luce naturale;
- "medium" di coltura.

Prima dell'inoculo, i volumi da 0,5, 2 e 5 litri sono autoclavati a 120°C per 20-30 minuti, mentre l'acqua dei sacchi é sottoposta a clorazione e neutralizzazione mediante aggiunta di tiosolfato (vedere *allegato 3*).

Monitoraggio delle colture
Il controllo delle colture può avvenire mediante conte (protocollo in *allegato 2*) delle cellule algali (milioni di cellule/cc) o mediante semplice valutazione visiva della crescita della popolazione (densità e colore).
Nel caso delle provette di mantenimento, dove i rischi di contaminazioni e/o di inquinamento devono essere ridotti al minimo, é opportuno evitare le conte, limitandosi ad un semplice controllo visivo. Nelle colture in volumi da 500 cc a 200-300 litri, finalizzate all'inoculo di altri volumi di coltura, si debbono evitare al massimo le conte o procedere ad un'unica conta finale, prima del trasferimento nel volume successivo. Infine, per quanto riguarda i sacchi, finalizzati all'allevamento larvale e/o l'arricchimento dei rotiferi, si valuta giornalmente la crescita mediante controllo visivo effettuando poi la conta finale, imposta dalla necessità di definire i quantitativi da somministrare.

Pur se le conte comportano un rischio, rimangono il principale strumento per giungere ad una corretta standardizzazione dei vari protocolli. Ai fini della standardizzazione sono state effettuate conte periodiche ogni 8-10 giorni per le provette di mantenimento e ad intervalli di 2-3 giorni per gli altri volumi di coltura (*allegato 2*).

2.2 Protocollo di produzione del ceppo *Nannochloropsis sp*

Le colture di *Nannochloropsis sp.*(*immagine 00*) sono state effettuate con medium "f/2 modificato". La composizione del medium é riportata in *allegato 1*. In base ai risultati della standardizzazione, é stato adottato il seguente protocollo:

a) Mantenimento in provette da 10 cc.
- inoculo con 1 cc dalla provetta precedente;
- coltura da 5-10 M cell/cc a 50-100 M cell/cc;
- durata coltura di 20-30 giorni.
- Illuminazione laterale: lux 2.030

b) Coltura di partenza in beuta da 500 cc.
- inoculo con n°1-2 provette a 50-100 M cell/cc;
- coltura fino a a 80 M cell/cc;
- durata coltura di 15-20 giorni.
- Illuminazione laterale e sotto la base: lux 2.740

c) Coltura in beute da 500 cc.
- inoculo con 100 cc dalla beuta 500 cc di partenza (80 M cell/cc);
- coltura da 20 M cell/cc a 80 M cell/cc;
- durata coltura di 8-10 giorni.
- Illuminazione laterale e sotto la base: lux 2.740

d) Coltura in beute da 2 litri.
- inoculo da n°1 beuta da 500 cc (80 M cell/cc);
- coltura da 20 M cell/cc a 50 M cell/cc;
- durata coltura di 4-5 giorni.
- Illuminazione laterale e sotto la base: lux 2.740

e) Coltura in beute da 5 litri.
- inoculo con n°1 beuta da 2 litri (50 M cell/cc);
- coltura da 20 M cell/cc a 50 M cell/cc;
- durata coltura di 4-5 giorni.
- Illuminazione laterale e sotto la base: lux 2.740

f) Coltura in sacchi da 200 litri.
- inoculo con n°2 beute da 5 litri (50 M cell/cc);
- coltura da 2,5 M cell/cc a 40 M cell/cc;
- durata coltura di 9-10 giorni.
- Illuminazione laterale: lux 2.200.

2.3 Protocollo di coltura del ceppo *Isochrysis sp. (tahiti)*

Le colture di *Isochrysis sp.* (*immagine 00*) sono state condotte con medium di "Walne". La composizione del medium é riportata in *allegato 1*. In base ai risultati della standardizzazione, é stato adottato il seguente protocollo:

a) Mantenimento in provette da 10 cc
- inoculo con 1 cc da provetta precedente;
- coltura da 2-2,5 M cell/cc a 20-25 M cell/cc;
- durata coltura di circa 30 giorni.
- Illuminazione laterale: lux 2.030

b) Coltura di partenza in beuta da 500 cc
- inoculo con n°1-2 provette a 20-25 M cell/cc;
- coltura fino a a 20 (15) M cell/cc;
- durata coltura di circa 20 giorni.
- Illuminazione laterale e sotto la base: lux 2.740

c) Coltura in beute da 500 cc
- inoculo con 100 cc da beuta 500 cc di partenza (20 M cell/cc);
- coltura da 4 (3) M cell/cc a 25 (15) M cell/cc;
- durata coltura di 15-20 giorni.
- Illuminazione laterale e sotto la base: lux 2.740

d) Coltura in beute da 2 litri
- inoculo con n°1 beuta da 500 cc (25 M cell/cc);
- coltura da 6,25 (3,75) M cell/cc a 20 (15) M cell/cc;
- durata coltura di 10-12 giorni.
- Illuminazione laterale e sotto la base: lux 2.740

e) Coltura in beute da 5 litri
- inoculo con n°1 beuta da 2 litri (20 M cell/cc);
- coltura da 8 (6) M cell/cc a 20 (15) M cell/cc;
- durata coltura di 8-10 giorni.
- Illuminazione laterale e sotto la base: lux 2.740

f) Coltura in sacchi da 200 litri

- inoculo con n°4 beute da 5 litri (20 M cell/cc);
- coltura da 2 (1,5) M cell/cc a 12 (10) M cell/cc;
- durata coltura di 15 giorni.
- Illuminazione laterale: lux 2.200.

3. COLTURA E ARRICCHIMENTO DEI ROTIFERI: LAVORI SVOLTI E PROTOCOLLI ADOTTATI

L'impianto per la coltura e l'arricchimento dei rotiferi, necessari al ciclo sperimentale di allevamento larvale della cernia, é stato avviato nel luglio 2003. sono stati utilizzati rotiferi della specie *Brachionus rotundiformis* (*immagine 05*), provenienti da un'avannotteria di spigole ed orate operante nel settore. Successivamente é stato acquistato, presso la CCAP, un ceppo della specie *Brachionus plicatilis*, a sua volta inserita nel programma di standardizzazione. La standardizzazione, svoltasi da ottobre 2003 a marzo 2004 ha dunque interessato sia la specie *B. rotundiformis*, sia la specie *B. plicatilis.*

Il protocollo di standardizzazione non è completato per la fase relativa allo sviluppo intensivo, in quanto le densità raggiunte sono ancora inferiori agli standard attesi. La ragione è stata individuata nella scarsa ossigenazione dell'acqua nel momento in cui si ha la popolazione in crescita esponenziale. Le prove stanno continuando con l'ausilio di un sistema di erogazione d'ossigeno nelle vasche tronco-coniche, che è stato acquistato dall'IZSAM con fondi extra-progetto. Contestualmente si è creato il protocollo per la creazione dell'archivio di riferimento e di registrazione dei dati.
Infine, risulta opportuno controllare accuratamente la qualità dell'acqua di mare durante il periodo invernale (torbidità, nitriti, ecc..), sottoponendo l'acqua prelevata ad un continuo monitoraggio (data di prelievo, stato del mare, torbidità, pH, NO^{2-}, NO^{3-}, temperatura, salinità e destinazione di uso).

3.1 Aspetti fondamentali

I rotiferi sono organismi mobili di 50-250 micron (nematelminti), che si riproducono in modo partenogenetico se mantenuti in condizioni favorevoli.
Il *Brachionus plicatilis* ha dimensioni che variano da 130 a 340 micron, con temperature ottimali di crescita a 25°C.
Il *Brachionus rotundiformis* ha dimensioni che variano da 100 a 210 micron, con temperature ottimali a 28°C.
La loro produzione, oltre al "mantenimento dei ceppi di origine", comporta una fase detta di "coltura", con lo scopo di raggiungere alte densità per unità di volume (800 -1.000 rotiferi/cc), ed una fase detta di "arricchimento", volta ad incorporare, nei rotiferi precedentemente allevati, i nutrienti destinati a coprire i fabbisogni larvali. I rotiferi sono organismi filtratori che possono essere alimentati con alghe unicellulari, lievito o diete artificiali appositamente formulate. Di solito l'arricchimento é eseguito con diete artificiali formulate in base ai fabbisogni larvali, ma può anche essere svolto su alghe, anche se questa eventualità richiede elevate quantità di colture algali, che la rendono un'operazione estremamente impegnativa.

Condizioni di "mantenimento in stato quiescente" dei ceppi di origine

Nei periodi in cui non occorrono rotiferi, i ceppi sono mantenuti in stato "quiescente" (assenza di uova) in volumi da 500 a 1.000 cc nelle seguenti condizioni:

- concentrazioni da alcuni rotiferi/cc a 50-100 rotiferi/cc;
- alimentazione nulla o ridotta (alghe o lievito);
- acqua filtrata (limpida) e disinfettata, con salinità tra 25 e 35 ‰;
- temperatura di 24-26° C;
- aria al minimo o assente.

Le colture di mantenimento devono essere rinnovate ogni 20-30 giorni, in modo da prevenire la formazione di depositi e/o di torbidità. Il trasferimento, da un volume a quello successivo, avviene mediante sifone e dopo sedimentazione di eventuali residui in sospensione. Per evitare di perdere il ceppo di origine é sempre opportuno mantenere almeno 2 repliche per ogni ceppo allevato.

Condizioni di mantenimento su lievito in "stato attivo" dei rotiferi

Nelle circostanze in cui risulta utile mantenere le colture in uno "stato attivo" (riproduzione partenogenetica) senza dovere raggiungere alte densità, si opera in volumi da 10 a 200 litri, con somministrazione di lievito comune (*Saccharomyces cerevisiae*). Il mantenimento "attivo" si svolge nelle seguenti condizioni:

- concentrazioni variabili, ma comunque inferiori a 500 rotiferi/cc;
- alimentazione con lievito, mediante 2 somministrazioni giornaliere:
- acqua filtrata e disinfettata, con salinità tra 25 e 35 ‰;
- temperatura di 24-26° C;
- unico tubo di aerazione e regolazione medio-alta.

La quantità di lievito da somministrarsi è di 0,8 g di lievito al giorno per milione di rotiferi, per la specie *B. rotundiformis* e di 1,0 - 1,5 g di lievito al giorno per milione di rotiferi, per la specie *B. plicatilis*.

Le colture devono essere rinnovate ogni 5 - 7 giorni in modo da prevenire la formazione di depositi e/o di torbidità. Il trasferimento, da un volume a quello successivo, avviene mediante sifone e dopo sedimentazione di eventuali residui in sospensione (*allegato 4*).

Condizioni di produzione intensiva

Nei periodi di produzione intensiva, la coltura e l'arricchimento dei rotiferi avviene nelle seguenti condizioni:

- concentrazioni variabili (vedere protocollo punto 3.2);
- alimentazione con alghe (*Nannochloropsis sp, Isochrysis sp, ecc...)* nella fase iniziale del ciclo e con diete artificiali nelle fasi successive;
- acqua filtrata e disinfettata, con salinità tra 25 e 35 ‰.
- temperatura di 24-26° C;
- aerazione variabile e ossigeno mantenuto sopra 6 ppm.

Prima dell'inoculo, le provette da 10 cc e le beute da 500 e 1.000 cc sono autoclavati a 120°C per 20-30 minuti, mentre l'acqua dei sacchi e delle vasche é sottoposta a clorazione e neutralizzazione mediante aggiunta di tiosolfato.

Monitoraggio delle colture

Per il campione della coltura da sottoporre a controllo, la conta si svolge mediante osservazioni del contenuto di una pipetta da 1 cc allo stereomicroscopio. Prima di ogni prelievo, il campione deve essere accuratamente rimescolato. La conta si limita alla parte graduata della pipetta. Il valore di concentrazione dei rotiferi per cc si ottiene dalla media dei valori rilevati in 10 osservazioni. La conta deve essere accompagnata da un controllo visivo sulla vitalità dei rotiferi campionati e sul numero di uova che portano.

Nelle colture di "mantenimento in stato quiescente" le conte non si effettuano.

Nelle colture di "mantenimento su lievito in stato attivo" le conte devono essere svolte ogni 2-3 giorni.

Nelle fasi di mantenimento su alghe, la conta si effettua quando si verifica un esaurimento delle alghe, prima del trasferimento nelle colture successive.

Nelle vasche di produzione intensiva e di arricchimento le conte devono essere eseguite tutti giorni (*allegato 4*).

3.2 Protocollo di produzione adottato

La prima fase del ciclo si svolge su colture algali mature di *Nannochloropsis sp*(≥ 30 milioni di cellule/cc), mentre la seconda fase del ciclo si svolge in vasca con somministrazione di diete artificiali.

I passaggi sono i seguenti:

1. Inoculo di una beuta da 500 o da 1.000 cc contenente una coltura algale matura, con rotiferi provenienti da un volume di mantenimento "in stato quiescente". Si mantiene la coltura, posta sullo scaffale illuminato e con aerazione regolata al minimo, finchè dalla concentrazione iniziale di pochi rotiferi si arriva ad avere fino a 200-300 rotiferi/cc;

2. Inoculo di una beuta da 2 litri con i rotiferi provenienti dalla precedente coltura. Si mantiene la coltura, posta sullo scaffale illuminato e con aerazione regolata al minimo, finchè dalla concentrazione iniziale di 50-100 rotiferi/cc si raggiungono i 200-300 rotiferi/cc;

3. Inoculo di una beuta da 5 litri con i rotiferi provenienti dalla precedente coltura. Si mantiene la coltura, posta sullo scaffale illuminato e con aerazione regolata al minimo, finchè dalla concentrazione iniziale di 50-100 rotiferi/cc si arriva ai 200-300 rotiferi/cc;

4. Inoculo di una beuta da 10 litri con i rotiferi provenienti dalla precedente coltura. Si mantiene la coltura, posta sullo scaffale illuminato e con aerazione regolata al minimo, finchè dalla concentrazione iniziale di 50-100 rotiferi/cc si arriva ai 400-500 rotiferi/cc;

5. Inoculo, con rotiferi provenienti dalla precedente coltura, di un sacco da 200 litri. Si mantiene la coltura finchè la concentrazione iniziale di 5 -10 rotiferi/cc arriva fino a 200-400 rotiferi/cc;

6. Inoculo, di una vasca contenente acqua filtrata e disinfettata, con i rotiferi provenienti dal sacco di cui al punto d). La vasca è dotata di n°2 tubi laterali con pietra porosa (aria) ed n°1 tubo centrale anch'esso con pietra porosa (ossigeno puro); sono inserite inoltre n°2 spugnette tipo "scotch bright" in superficie per la eliminazione dei residui di alimento. Giornalmente inoltre si effettua lo spurgo (dopo interruzione dell'aria per 10-15 minuti per favorire permetterela concentrazione dei nella parte superiore della vasca) e pulizia della parete interna della vasca con una spugna (dopo lo spurgo e prima di rimettere l'aria). L'alimentazione dei rotiferi, attuata con diete artificiale bilanciate, è somministrata come da tabella del fornitore opportunamente adattata (*allegato 4*).

7. Passaggio dei rotiferi provenienti dalla vasca di cui al punto e). Una parte della coltura può essere utilizzata per l'alimentazione delle larve, mentre il rimanente serve ad inoculare una nuova vasca, contenente un volume equivalente di acqua filtrata e disinfettata. Il tempo trascorso tra l'inoculo di una vasca e il suo passaggio non dovrà superare i 4-5 giorni. E' consigliabile ripetere tale operazione per un massimo di 10-15 passaggi, dopodiché sarà opportuno ripartire da un nuovo ciclo su alghe.

Gli inoculi a),b),c),d) si realizzano mediante trasferimento con sifone, dopo sedimentazione di eventuali residui in sospensione.

Nei passaggi successivi, cioè nei passaggi da un sacco ad una vasca di produzione (e) o da una vasca di produzione ad un'altra (f), il trasferimento si effettua mediante filtrazione del volume di origine, il cui contenuto viene concentrato e risciacquato prima di essere trasferito nel volume di destinazione (vedere protocollo in *allegato 5*).

4. STANDARDIZZAZIONE SCHIUSA E ARRICCHIMENTO ARTEMIA

L'impianto per la schiusa e l'arricchimento dell'Artemia non é mai stato avviato su scala produttiva, perché l'allevamento larvale della cernia si è concluso prima che questo alimento fosse necessario in grandi quantità. La standardizzazione è attualmente in corso a carico dell'IZSAM.

5. PROVA ALLEVAMENTO LARVALE CERNIA: RISULTATI PRELIMINARI

Premessa

A seguito di ricerche sulla maturazione sessuale della cernia e sull'ottenimento dei relativi gameti (G. Marino & coll. 2000-2002), la riproduzione della specie é stata, finora, condotta in condizioni sperimentali diverse: i metodi utilizzati andavano dall'allevamento larvale intensivo (T. De Wolf & coll. 2002) all'allevamento estensivo in sistemi detti "mesocosmo". Finora, i risultati raggiunti non hanno permesso di sviluppare, su scala industriale, le tecniche sperimentate adottate e messe a punto .

La presente prova, svolta con metodo intensivo ed in "acque verdi", ha avuto per obiettivo di contribuire ad incrementare il campo delle conoscenze sulla riproduzione artificiale della cernia (*Epinephelus marginatus*). La prova si é svolta nel periodo luglio-agosto del 2003.

5.1 Trasporto delle uova, prima parte dell'incubazione e semina in vasca

Le uova sono state fornite dall'Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare - ICRAM, nell'ambito dell'accordo di collaborazione in corso tra i due istituti. Sono stati consegnati 3 lotti di uova della deposizione del 22 luglio 2003 (intorno alle ore 12.00), provenienti da riproduttori ICRAM stabulati in un allevamento del brindisino.

Il trasporto si é svolto in taniche di 30 litri. Il viaggio, della durata di circa 6-7 ore, é avvenuto con un automezzo condizionato a temperatura costante (24-26°C). All'atto della semina, le taniche sono state immerse nella vasca di destinazione per circa un'ora fino al raggiungimento della stessa temperatura (25°C) nelle taniche e in vasca.
Le uova sono state controllate alla partenza e all'arrivo.

La semina é avvenuta circa 12 ore dopo l'emissione delle uova, in 2 vasche tronco-coniche di 900 litri ciascuna. Le uova del lotto 1, per un totale di circa 142.000 unità vitali, sono state seminate in vasca 1 (Tabella 1), ottenendo una densità di 157 uova/litro.

Tabella 1: lotto seminato in vasca 1

Lotto n1 ===> Vasca 1				
Volume contenitore (l.)	30		Numero uova	146,132
Volume acqua (l.)	17		Densità uova (n/l.)	8,596
	Partenza	Arrivo		
Temperatura (C)	26.1	26.3		
Ossigeno (mg/l.)	20.3	27.0		
Tasso di fecondazione (%)	100	-	**Numero uova vitali**	
Galleggianti (%)	100	100		
Segmentazione regolare (%)	99.5	97.2	142,040	

Le uova del lotto 2 e del lotto 3, per un totale di circa 114.000 unità, sono state seminate in vasca 2 (Tabella 2), ottenendo una densità di 126 uova/litro.

Tabella 2: lotti seminato in vasca 2

Lotto n2 ===> Vasca 2				
Volume contenitore (l.)	30		Numero uova	61,000
Volume acqua (l.)	15		Densità uova (n/l.)	4,067
	Partenza	Arrivo		
Temperatura (C)	26.1	25.1		
Ossigeno (mg/l.)	19.5	24.5		
Tasso di fecondazione (%)	93	-	**Numero uova vitali**	
Galleggianti (%)	100	100		
Segmentazione regolare (%)	85.0	90.3	55,083	

Lotto n3 ===> Vasca 2				
Volume contenitore (l.)	30		Numero uova	120,000
Volume acqua (l.)	13		Densit uova (n/l.)	9,231
	Partenza	Arrivo		
Temperatura (C)	26.2	24.8		
Ossigeno (mg/l.)	20.1	27.0		
Tasso di fecondazione (%)	47	-	**Numero uova vitali**	
Galleggianti (%)	100	100		
Segmentazione regolare (%)	33.0	49.0	58,800	

Disponendo di 3 lotti di uova e di solo due vasche per la semina, si sono uniti i lotti 2 e 3.

5.2 Fine dell'incubazione e schiusa delle uova

La parte finale dell'incubazione e la schiusa si sono svolte in assenza di luce, ad una temperatura compresa tra 24,5 e 25,5 °C, con aerazione e ricambio in vasca regolati al minimo.
L'aerazione, assicurata da un singolo tubo in posizione centrale e senza pietra porosa, é stata regolata in modo da garantire una distribuzione omogenea delle uova all'interno della vasca, evitando che andassero ad impattare sulle pareti.
Il ricambio dell'acqua, cioè il passaggio attraverso il filtro biologico, é stato regolato tra 1 e 2 l/min, cioè pari al 7-14 % all'ora.

La schiusa si é verificata, in entrambe le vasche, intorno alle ore 16.00 del 23 luglio 2003 (giorno 0), cioè 28 ore dopo la deposizione (*immagine 08*). Dopo la schiusa, la regolazione dell'aria ed il ricambio sono rimasti invariati.

Nella vasca 1, la conta delle larve, effettuata la mattina del giorno 1, ha evidenziato una densità di circa 10 larve al litro, corrispondente ad una sopravvivenza del 6,34 %. Gli spurghi effettuati tra giorno 0 e giorno 1 non hanno evidenziato una percentuale di uova non schiuse superiore al 10 % delle uova seminate, indicando una percentuale di schiusa probabilmente vicino al 90 %. Di conseguenza la bassa sopravvivenza a giorno 1 non dovrebbe dipendere da una bassa percentuale di schiusa, ma piuttosto da un'elevata mortalità nelle ore immediatamente successive.

Tale mortalità, non evidenziata negli spurghi, é stata parzialmente rilevata nelle operazioni di pulizia dei filtri superficiali e sembra riconducibile a fattori idrodinamici in vasca, ossia ad un eccesso di flusso verso il filtro biologico, che ha causato l'adesione delle uova al filtro superficiale, posto all'uscita delle vasca.

Tabella 3: schiusa nella vasca 1

Vasca 1	
Numero uova lotto 1 seminati	142,040
Volume vasca (l.)	900
Densità uova (n/l.)	158
Numero larve giorno 1	9,000
Volume vasca (l.)	900
Densità uova a giorno 1 (n/l.)	10
Sopravvivenza a giorno 1 (%)	**6.34**

Nella vasca 2, la conta delle larve in vasca effettuata la mattina del giorno 1, ha evidenziato una densità inferiore a 0,5 larve al litro, corrispondente una una sopravvivenza inferiore all'1 %. Gli spurghi effettuati tra giorno 0 e giorno 1 hanno evidenziato una percentuale di uova non schiuse inferiore al 20 % delle uova seminate, indicando una percentuale di schiusa comunque alta. Di conseguenza, come per la vasca 1, la sopravvivenza a giorno 1, non dovrebbe dipendere da una bassa percentuale di schiusa, ma piuttosto da un'elevata mortalità nelle ore successive. Tale mortalità, non evidenziata negli spurghi, é stata parzialmente rilevata nelle operazioni di pulizia dei filtri superficiali e sembra in parte riconducibile a fattori idrodinamici in vasca, dello stesso tipo del precedente.

Tabella 4: schiusa nella vasca 2

Vasca 2	
Numero uova lotto 2 seminati	55,083
Numero uova lotto 3 seminati	58,800
Volume vasca (l.)	900
Densità uova (n/l.)	127
Numero larve giorno 1	450
Volume vasca (l.)	900
Densità uova a giorno 1 (n/l.)	0.5
Sopravvivenza a giorno 1 (%)	**0.77**

Le larve di cernia sono estremamente piccole alla schiusa (qualche millimetro) e tendono, in modo particolare, rispetto ad altre specie, a risentire del flusso in vasca. In tale condizioni, la scelta di garantire un ricambio in vasca, seppur limitato, dalla schiusa in poi, si é rivelata errata. Malgrado un ricambio estremamente limitato (air-lift regolato al minimo), le caratteristiche delle larve, insieme al ridotto volume della vasca, hanno determinato l'aderenza delle larve al filtro con conseguenti perdite.

Dal confronto dell'andamento delle mortalità, immediatamente dopo la schiusa, si nota una maggior mortalità nella vasca 2 e questo, probabilmente, può essere relazionato con le percentuali iniziali di uova a segmentazione regolare, rispettivamente del 97-99% nel lotto 1 e 47-93 % nei lotti 2 e 3.

La scarsa sopravvivenza iniziale, sembra dunque riconducibile, da una parte alle condizioni idrodinamiche in vasca e dall'altra alla qualità iniziale delle uova.
In volumi ridotti (vasche da 1 mc) sarà quindi opportuno aspettare almeno 7-10 giorni dopo la schiusa, prima di procedere ad un ricambio minimo in vasca.

5.3 Allevamento larvale

La vasca 2 é stata eliminata a causa dell'elevata mortalità registrata al primo giorno. I dati successivi riguardano solo la vasca 1, il cui ciclo di allevamento larvale é stato condotto per altri 25 giorni (*immagini 09, 10, 11 e 12*).

La vasca é stata monitorata tutti giorni, con rilevamento dei seguenti dati:

- temperatura (°C);
- ossigeno disciolto (mg/l);
- densità larvale (n° / litro);
- mortalità (n° morti raccolti dopo spurghi e pulizia);
- alghe somministrate (milioni cellule/cc);
- densità di rotiferi in vasca (n°/cc).

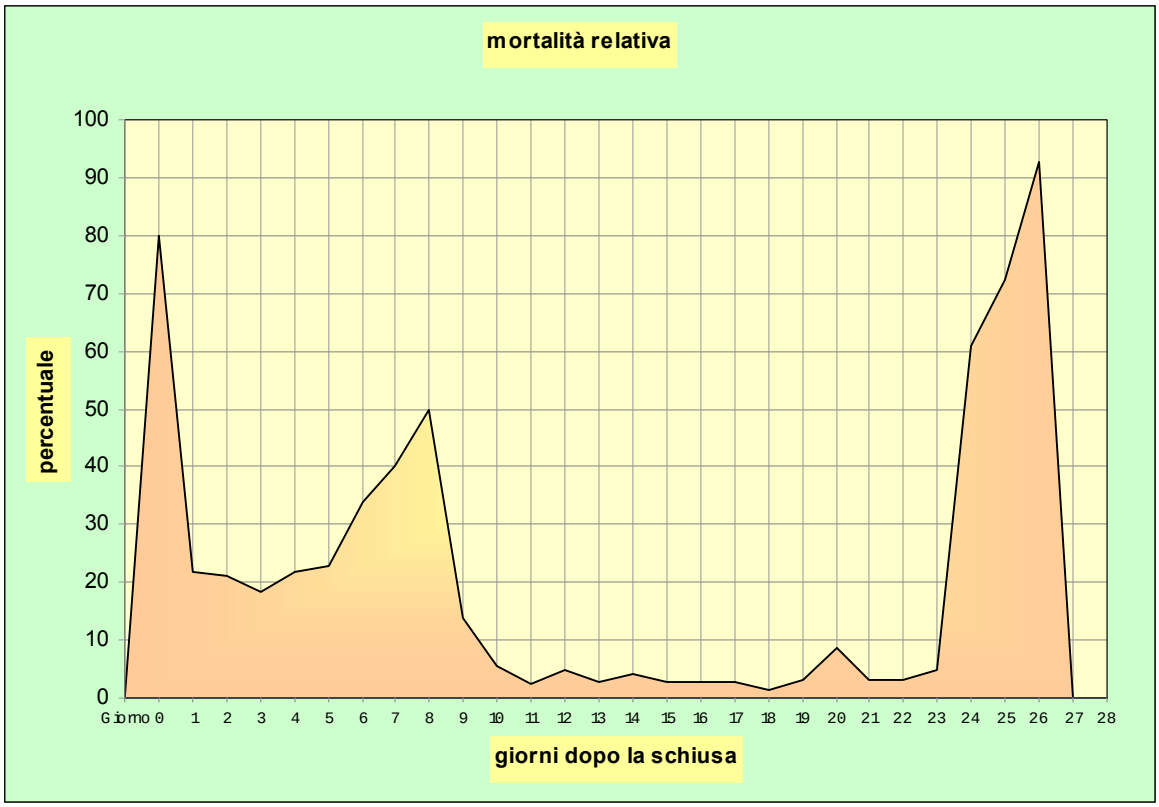
I dati rilevati sono riportati nell'*allegato* 6.

Per tutto il periodo di allevamento larvale, la temperatura in vasca é rimasta nell'intervallo 23,5-24,5° C.
La concentrazione di ossigeno disciolto nell'acqua ha subito alcune variazioni riconducibili alla presenza di alghe e alle modalità di aerazione dell'acqua:

- media di 7,5 mg/l. da giorno 0 a giorno 3 (prima dell'introduzione delle alghe);
- calo progressivo, da valori medi di 7,4 a giorno 4, fino a valori medi di 6,0 tra giorno 8 e giorno 9 (aerazione senza pietra porosa);
- valori compresi tra 7,0 e 8,5 per il resto del ciclo (aerazione con pietra porosa).

Il monitoraggio della mortalità si é svolto mediante conta delle larve in vasca fino a giorno 10, periodo durante il quale le larve erano distribuite in modo omogeneo nel volume di allevamento larvale. Successivamente, il comportamento gregario delle larve, che si raggruppavano nelle zone d'ombra in superficie, ha impedito di procedere a stime attendibili della densità in vasca. Da giorno 19, l'evoluzione della popolazione é stata determinata in base ai morti raccolti sul fondo e negli spurghi (*allegato 7*).
Il grafico successivo riporta la mortalità relativa come elaborata dai suddetti dati.

Grafico 1: mortalità relativa nella vasca 1



Si possono individuare due picchi di mortalità oltre al picco di iniziale. Essi si registrano nei giorni 6-8 e dal 24° giorno.
Note al grafico: al 3° giorno si è avuta l'apertura della bocca delle larve. Al 6° giorno è stato arrestato il ricambio. Al 9° giorno è stata utilizzata una pietra porosa in funzione di dispersore dell'aria.

Riassorbimento del sacco vitellino e apertura della bocca

Per tutto il periodo di riassorbimento del sacco vitellino, fino alla prima alimentazione esogena, la vasca é stata tenuta in semioscurità in modo da rallentare l'attività delle larve e da ritardare di conseguenza l'inizio dell'alimentazione.

L'apertura della bocca é stata osservata a giorno 3 (*immagine 09*), circa 75 ore dopo la schiusa, a tale stadio il riassorbimento del sacco vitellino non é ancora completato.
Nelle ore successive all'apertura della bocca si é proceduto ad una prima introduzione in vasca delle alghe (*Nannochloropsis sp.*) e alla prima somministrazione di rotiferi.
Contestualmente la vasca é stata scoperta e la luce é stata accesa.

Periodo di allevamento in "acque verdi" e di alimentazione su rotiferi

Da giorno 4, la concentrazione di alghe in vasca é stata mantenuta costante tra 300.000 e 500.000 cellule algali/cc in modo da garantire condizioni di allevamento larvale in "acque verdi".
Tale tecnica presenta una serie di vantaggi:

- un'attenuazione dell'intensità luminosa;
- lo sviluppo di una flora batterica legata alla presenza delle alghe;
- una maggiore stabilità dei vari parametri chimici dell'acqua rispetto ai sistemi detti "in acque chiare";
- un apporto alimentare per i rotiferi presenti in vasca;
- un apporto alimentare, seppure ridotto, per le larve.

Come primo alimento vivo, sono stati utilizzati dei rotiferi "piccoli" della specie "*Brachionus rotundiformis* ", raccomandati per la prima alimentazione delle larve di specie ittiche marine di piccole dimensioni. L'alimentazione con rotiferi si sarebbe dovuta svolgere mediante l'aggiunta quotidiana di rotiferi arricchiti (mattina e pomeriggio), in modo da mantenere 5-10 rotiferi/cc per circa 16 ore su 24 e l'eliminazione, mediante ricambio notturno, dei rotiferi non consumati durante la giornata. Purtroppo, la mancanza di rotiferi in quantità sufficiente per un corretto svolgimento dell'alimentazione, ha costretto ad utilizzare l'intero stock disponibile già dal 2° giorno di alimentazione.

Considerata la situazione creatasi, il ricambio in vasca é stato interrotto per evitare la dispersione dei rotiferi che, riproducendosi, hanno mantenuto una popolazione in vasca sufficiente per sostenere, almeno dal punto di vista quantitativo, l'alimentazione delle larve. Tuttavia, trattandosi di rotiferi non arricchiti, l'apporto alimentare, in termini qualitativi, é stato seriamente compromesso ed é probabilmente all'origine dell'ultimo picco di mortalità registrato da giorno 24 in poi. In effetti, nelle specie ittiche marine, in cui il fabbisogno in acidi grassi poli-insaturi é particolarmente alto, l'impossibilità di disporre di rotiferi arricchiti risulta determinante.
I rotiferi presenti in vasca, cresciuti esclusivamente su alghe del ceppo *Nannochloropsis sp.* a bassa concentrazione, non sono stati in grado di fornire il DHA di cui le larve hanno bisogno e di cui il ceppo algale utilizzato é solitamente carente.

Il picco di mortalità registrato da giorno 6 a giorno 8, potrebbe essere riconducibile ad un abbassamento dell'ossigeno disciolto in acqua, sotto la soglia di tolleranza delle larve. Tale abbassamento, determinato dall'interruzione del ricambio per non disperdere i rotiferi, é stato compensato da una modifica dell'aerazione in vasca mediante inserimento di una pietra porosa sul terminale della cannula dell'aria.

Prova di somministrazione di nauplii d'Artemia

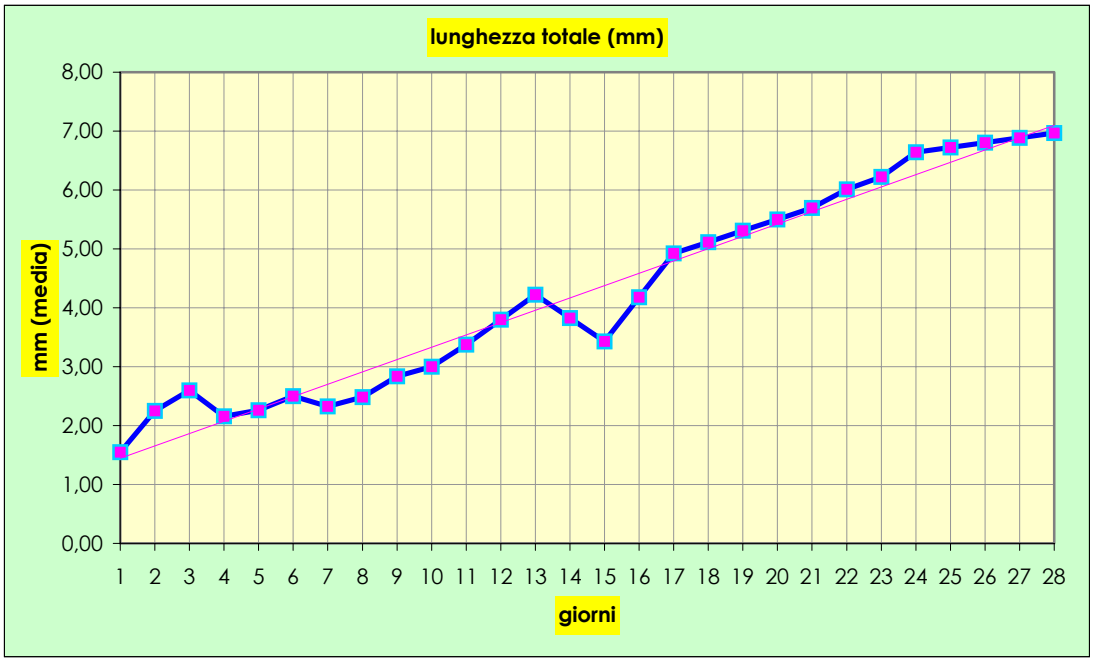
Da giorno 19, si é proceduto all'introduzione di nauplii di Artemia in vasca, nella misura di circa 1-2 nauplii/cc, ma le larve non sono state in grado di predarli. L'introduzione dell'Artemia mirava a sostituire parzialmente i rotiferi, somministrando mediante i nauplii, gli acidi grassi poli-insaturi necessari allo sviluppo larvale.
Purtroppo, l'introduzione dell'Artemia, con la necessità di eliminare tutti giorni i nauplii, ha comportato una serie di rinnovi quasi totali dell'acqua in vasca, con una riduzione delle concentrazioni algali sotto 300.000 cellule algali/cc. Tale riduzione ha contribuito ad un ulteriore peggioramento della qualità dei rotiferi.

5.4 Biometrie e istologia

Quotidianamente, la popolazione larvale é stata monitorata con misura della lunghezza totale (dall'estremità anteriore all'estremità caudale). La tabella con i dati rilevati é riportata in *allegato 8*.

Il grafico presenta un andamento decrescente nella norma fino a giorno 15-20, mentre nei giorni successivi si osserva un notevole rallentamento del tasso di crescita probabilmente riconducibile alle carenze alimentari accennate precedentemente. I valori rilevati da giorno 13 a giorno 15, inferiori all'andamento grafico, vanno imputati a probabili errori di misurazione.

Grafico 2: Accrescimenti delle larve nella vasca 1



Alcuni soggetti prelevati da giorno 25 in poi sono risultati abbastanza grandi per l'inclusione e la preparazione per istologia.

CONCLUSIONI

Malgrado i problemi tecnici emersi nella fase di avviamento, in un settore di attività sostanzialmente nuovo, è possibile affermare che 3 importanti traguardi siano stati raggiunti:

1) Lo svolgimento del primo ciclo di allevamento larvale sulla cernia, ha inoltre consentito di raccogliere una serie di dati tecnici fondamentali per la diffusione della conoscenza dell'allevamento larvale di *Epinephelus marginatus*, specie di notevole pregio commerciale, verso la quale la ricerca proseguirà i suoi sforzi.

2) Lo svolgimento del primo ciclo di allevamento larvale della cernia, insieme al lavoro di standardizzazione della produzione dell'alimento vivo, ha consentito di raggiungere un discreto livello tecnico del personale.

3) L'istituto dispone di un impianto sperimentale funzionale, completo di settore fito-zoo-plancton per la produzione dell'alimento vivo e di 2 vasche a circuito chiuso per l'allevamento larvale delle specie ittiche marine.

Un ulteriore sforzo di messa a punto tecnica dell'impianto e dei protocolli consentirà la partecipazione dell'Istituto in progetti di ricerca su scala europea. I progetti relativi all'allevamento larvale del pagro (*Pagrus pagrus*), della cernia (*Epinephelus marginatus*) e del sarago pizzuto (*Puntazzo puntazzo*), presentati nel 2003, hanno questa finalità.

L'ampliamento delle strutture con la realizzazione di vasche a "grandi volumi" (mesocosmo) sarebbe auspicabile per continuare tale tipo di ricerche e per porsi su un piano di alta competitività nel settore della zootecnia ittica.

ALLEGATO 01 – MEDIUM UTILIZZATI PER LE COLTURE ALGALI

SOLUZIONI DI WALNE.

Soluzione principale

1) 45 g sale bisodico dell'EDTA (Na_2EDTA)

2) 33,6 g H_3BO_3 Acido borico

3) 100 g $NaNO_3$ Nitrato di sodio

4) 20 g NaH_2PO_4-$2H_2O$ Biidrogenato di sodio

5) 1,3 g $FeCl_3$-$6H_2O$ Cloruro di ferro idrato

6) 0,36 g $MnCl_2$-$4H_2O$ Cloruro di manganese idrato

7) 1 cc soluzione di tracce di metalli
In 100 cc H_2O distillata :
- 2,1 g $ZnCl_2$
- 2,0 g $CoCl_2.6H_2O$
- 0,9 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$
- 2,0 g $CuSO_4.5H_2O$

Mescolare nell'ordine, in 1 litro di acqua distillata.

Bollire per 5 minuti.

Soluzione vitaminica.

1) 10 mg B12 Cianocobolamina

2) 200 mg B1 Tiamina cloridrato

Mescolare in 0,1 litro di acqua distillata.

Conservare in frigorifero.

Per coltura normale : aggiungere 1 cc di soluzione principale e 0,1 cc di soluzione vitaminica.

Per coltura di mantenimento : metà dosi

SCHEDA N°1 : SOLUZIONI DI COLTURA PER CHLORELLA SP.

In 1 litro H_2O distillata : (1)
- 30 g $ZnSO_4.H_2O$
- 25 g $CuSO_4.5H_2O$
- 30 g $CoSO_4.7H_2O$
- 20 g $MnSO_4.H_2O$

10 cc

In 1 litro H_2O distillata :
- 50 g $FeCl_3.6H_2O$

10 cc

In 1 litro H_2O distillata :
- 25 g $Na_2MoO_4.2H_2O$

10 cc

In 1 litro H_2O distillata :
- 50 g NaEDTA.$2H_2O$

100 cc

Soluzione finale di oligoelementi.
Aggiungere a 800 cc H_2O distillata :

10 cc
10 cc
10 cc
100 cc

Mescolare nell'ordine.

Bollire per 5 minuti.

Soluzione finale sali minerali.
In 1 litro H_2O distillata :
- 300 g $NaNO_3$
- 30 g KH_2PO_4
- 20 g NH_4Cl

Bollire per 5 minuti.

(3) In 1 litro H_2O distillata :
- 100 mg biotina

10 cc

(3) In 1 litro H_2O distillata :
- 10 g tiamina

10 cc

(3) In 1 litro H_2O distillata :
- 100 mg vit.B12. (4)

10 cc

Soluzione finale vitamine. (2)
In 1 litro H2O distillata :

10 cc
10 cc
10 cc

Conservare in frigorifero.

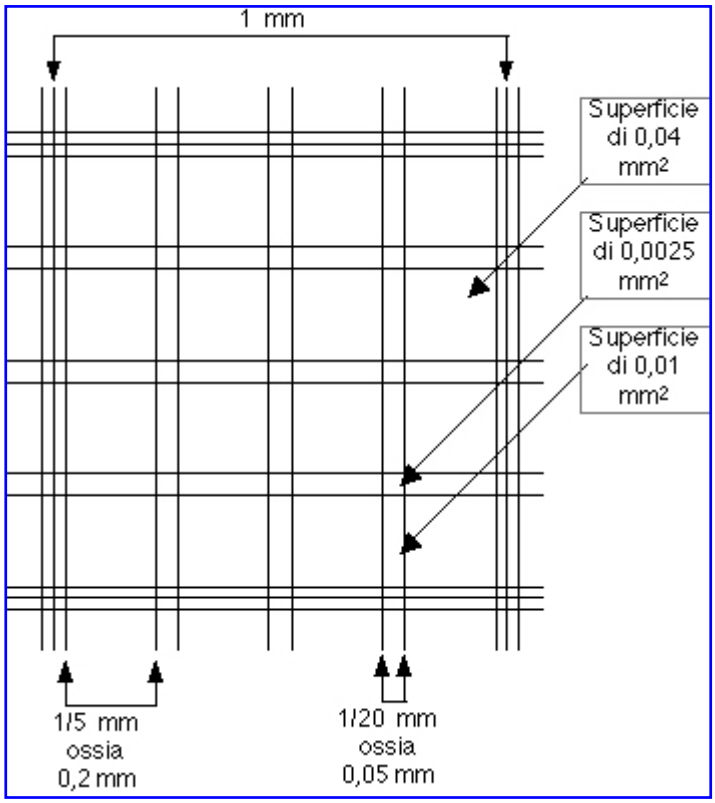
Per coltura normale : aggiungere 1 cc di ogni soluzione finale per litro di acqua di coltura.
Per coltura di mantenimento : aggiungere 0,5 cc delle soluzioni finali di oligominerali e sali minerali.

(1) Rinnovare ogni 6 mesi.
(2) Rinnovare ogni 3 mesi.
(3) Conservare in frigorifero.
(4) Vitamina B12 cristalizzata.

ALLEGATO 2 - PROTOCOLLO DI CONTA DELLE COLTURE ALGALI

CAMERA DI BURKER

Il risultato delle conte é espresso in "milioni di cellule per cc" dopo conta sulla camera di Burker e moltiplicazione per il fattore corrispondente al volume di lettura/
La conta si svolge sul seguente reticolo:



Lo spessore di acqua, con una corretta installazione del copri-oggetto é di 1/10 di mm pari a 0,1 mm, per cui risultano i seguenti volumi:
- quadrato grande di 0,1 x 0,04 = 0,004 mm^3, ossia 1/250 di mm^3;
- rettangolo di 0,1 x 0,01 = 0,001 mm^3, ossia 1/1.000 di mm^3;
- quadrato piccolo di 0,1 x 0,0025 = 0,00025 mm^3, ossia 1/4.000 di mm^3.

Considerato che un cc (cm^3) é pari a 1.000 mm^3, risultano i seguenti fattori:
- conta nel quadrato grande x 250.000 (2,5 105);
- conta nel rettangolo x 1.000.000 (106);
- conta nel quadrato piccolo x 4.000.000 (4 10^6).

Prelievo dal volume di coltura

Prelevare un campione dal centro della coltura:
- in provette operare il prelievo direttamente per la conta, cambiando l'estremità della micropipetta per ogni prelievo da un volume di coltura all'altro;
- in piccoli volumi (beute o palloni) operare 1-2 prelievi mediante pipetta da 10 cc e trasferire il contenuto un piccolo beker, cambiando pipetta per ogni prelievo da un volume di coltura all'altro;
- in sacchi, operare un prelievo mediante beker di 50-100 cc. Cambiare beker per ogni prelievo da un volume di coltura all'altro.

Nel caso particolare delle provette di mantenimento e dei piccoli volumi, evitare accuratamente qualsiasi rischio di inquinamento incrociato tra le varie colture.
Mantenere il volume prelevato, per tutto il tempo di conta, con una minima aerazione. Diversamente mescolare bene prima di ogni prelievo per conta.

Metodo di conta
Una conta attendibile richiede le seguenti condizioni:

- conta immediatamente dopo il suddetto prelievo (entro 10 minuti);
- omogeneità del contenuto del beker all'atto del prelievo con la micropipetta;
- corretto posizionamento del copri-oggetto di cui dipende lo spessore di acqua.

A seconda della concentrazione algale, scegliere la superficie su cui fare la conta. Contare sempre nello stesso modo (es. alghe all'interno e alghe sul bordo sinistro e sul bordo superiore). Non contare i grumi.
Ripetere la conta 10 volte, in 10 aree diverse della camera di Burker. Fare la media delle conte e calcolare la concentrazione per cc utilizzando il fattore moltiplicativo corrispondente all'area prescelta per la conta.

Qualora il risultato non sia in accordo con le aspettative (colore e/o conte precedenti) ripetere tutta l'operazione.

N.B.: Isochrysis e alghe mobili
Una volta posizionato il copri-oggetto, mettere una piccolissima goccia di cloro a lato di quest'ultimo senza spostare niente. Aspettare l'effetto del cloro prima di effettuare la conta.

ALLEGATO 3 - CICLI ALGALI, NANNOCHLOROPSIS SP.

N°	Codice			Origine	Data lancio	Data fine	Destinazione
1	N	P	SBT1	SBT	set 10, 2003	ott 14, 2003	--> P1
2	N	P	SBT2a	SBT	ott 6, 2003	ott 28, 2003	--> M1, M1* e P/Rr
3	N	P	SBT2b			-	Eliminata
4	N	500	P1	1	ott 14, 2003	07 nov 2003	--> P2
5	N	P	M1 1a *	2	ott 28, 2003	nov 25, 2003	--> M2 *
6	N	P	M1 1b *				--> M3 *
7	N	P	M1 1c *			-	Eliminata
8	N	P	M1 1d *			-	Eliminata
9	N	P	M1 1e			nov 25, 2003	--> M4
10	N	P	M1 1f			-	Eliminata
11	N	P	+ Rr 14.11/a	2	ott 28, 2003	nov 19, 2003	--> P/Rr (a1/a2)
12	N	P	+ Rr 14.11/b				--> Vol.2l/Rr
13	N	500	P2 1A	4	07 nov 2003	nov 19, 2003	--> vol.2000 per Rr
14	N	500	P2 1B			nov 18, 2003	--> C1 *
15	N	500	P2 1C				--> C2 *
16	N	500	P2 1D				--> Prova Tiosolfato
17	N	500	P2 1E			nov 19, 2003	--> vol.2000 per Rr
18	N	500	P2 1F				
19	N	500	C1 1a *	14	nov 18, 2003	nov 26, 2003	--> vol.2000 C1 *
20	N	500	C1 1b *				
21	N	500	C2 1a *	15			--> vol.2000 C2 *
22	N	500	C2 1b *				
23	N	P	+ Rr /a1	11	nov 19, 2003	+ rotif.14/11	Ok
24	N	P	+ Rr /a2				Eliminate
25	N	2000	+ Rr /A	13 + 12	nov 19, 2003	nov 27, 2003	Sacco filtrato ed utilizzato per lancio del ciclo produttivo dei rotiferi in vasca
26	N	2000	+ Rr /E	17 + 12			
27	N	2000	+ Rr /F	18 + 12			
28	N	P	M2 1a *	5	nov 25, 2003	-	Eliminata
29	N	P	M2 1b *			dic 24, 2003	--> M5 *
30	N	P	M3 1a *	6		-	Eliminata
31	N	P	M3 1b *			dic 24, 2003	--> M6 *
32	N	P	M4 1a	9		-	Eliminata
33	N	P	M4 1b			dic 24, 2003	--> M7
34	N	2000	C1 1a *	19	nov 26, 2003	dic 3, 2003	--> vol.5000 C1 *
35	N	2000	C1 1b *	20			
36	N	2000	C2 1a *	21			--> vol.5000 C2 *
37	N	2000	C2 1b *	22			
38	N	5000	C1 1a *	34	dic 3, 2003	dic 19, 2003	--> S200 C1 *
39	N	5000	C1 1b *	35			
40	N	5000	C2 1a *	36			--> S200 C2 *
41	N	5000	C2 1b *	37			
42	N	S200	C1 *	38 + 39	dic 19, 2003	gen 21, 2004	--> S200 Prova Tiosolfato
43	N	S200	C2 *	40 + 41		-	Analisi Ac. grassi
44	N	P	M5 1a *	29	dic 24, 2003	-	Eliminate
45	N	P	M5 1b *			-	salvo M5 1b *
46	N	P	M6 1a *	31		-	--> avvio C2/pagro
47	N	P	M6 1b *			-	

N°	Codice			Origine	Data lancio	Data fine	Destinazione
48	N	P	M7 1a	33	dic 24, 2003	feb 10, 2004	--> avvio C2/pagro
49	N	P	M7 1b	33	dic 24, 2003	gen 23, 2004	--> M8
						feb 10, 2004	--> M9
50	N	S200	Controllo*	42	gen 21, 2004	feb 16, 2004	--> Colt.1Rp + Colt.7Rr
						feb 18, 2004	--> C1/Pagro A --> Colt.9 Rr
						mar 10, 2004	--> 1 sacchi C1 Pagro E
51	N	S200	T 12 % * + Rr	42	gen 21, 2004	feb 9, 2004	--> Colt.5 Rr/sacco
52	N	P	M8 1a	49	gen 23, 2004	mar 9, 2004	--> M10 1 a/f
53	N	P	M8 1b			mar 11, 2004	--> avvio C2/pagro
54	N	P	M9 1a	49	feb 10, 2004	mar 9, 2004	Eliminate
55	N	P	M9 1b				
56	N	500	C2/pagro A	45 + 48	feb 10, 2004	mar 9, 2004	--> C2/pagro (n°2 vol.500) x2
57	N	500	C2/pagro B				
58	N	S200	+ Rr (Colt.7)	50	feb 16, 2004	feb 16, 2004	--> Colt.7 Rr/sacco
59	N	S200	+ Rp (Colt.1)			feb 20, 2004	--> Colt.1 Rp/sacco
60	N	S200	C1/pagro A	50	feb 18, 2004	feb 27, 2004	--> 2 sacchi C1/pagro
61	N	S200	+ Rr (Colt.9)				--> Colt.9 Rr/sacco
62	N	S200	C1/pagro C	60	feb 27, 2004	mar 12, 2004	Inquinati da Rr
63	N	S200	C1/pagro D				--> Colt.10 Rr/vasca E
64	N	500	C2/pagro C	56	mar 9, 2004 (125/500 cc)	mar 12, 2004	Tutti eliminati Scarsa crescita
65	N	500	C2/pagro D				
66	N	500	C2/pagro E	57			
67	N	500	C2/pagro F				
68	N	P	M10 1a	52	mar 9, 2004 (P:1/10 cc) (B:7/500 cc)	mar 12, 2004	--> ceppo donato a Istituto Croato
69	N	P	M10 1b			apr 9, 2004 da M10 1c	--> M11
70	N	P	M10 1c				
71	N	P	M10 1d	53			
72	N	P	M10 1e				
73	N	P	M10 1f				
74	N	S200	C1/pagro E	50	mar 10, 2004	mar 19, 2004	--> 2 sacchi C1/pagro
75	N	500	C3/pagro A	52 + 53	mar 11, 2004	mar 26, 2004	--> 2 vol.500 C3/pagro
76	N	S200	C1/pagro F	74	mar 19, 2004	mar 26, 2004	--> 4 sacchi C1/pagro
77	N	S200	C1/pagro G			mar 27, 2004	
78	N	S200	C1/pagro H	76	mar 26, 2004	apr 1, 2004	Inquinati da Rr --> Vasche Rr D & F ciclo pagro
79	N	S200	C1/pagro I				
80	N	S200	C1/pagro L	77	mar 27, 2004	apr 3, 2004	
81	N	S200	C1/pagro M				
82	N	500	C3/pagro B	75	mar 26, 2004	apr 9, 2004	--> vol. 2.000 C3/pagro
83	N	500	C3/pagro C				

N = Nannochloropsis sp./CCAP 211/78 & I = Isochrysis sp/CCAP 927/14
Legenda:
Note: P=provette; 500=beuta da 500cc; 2.000=beuta da 2.000cc; S200=sacco da 200 litri.

ALLEGATO 3 – CICLI ALGALI, PROVA DEL TIOSOLFATO

Nannochloropsis sp.				**Data inizio**	gen 21, 2004		
PROVA TIOSOLFATO							
CONDIZIONI DI COLTURA				**COLTURA DI ORIGINE**			
Volume	200	litri		Data lancio	dic 23, 2003		
Salinità	27	mg./l.		Codice	Ncp S201		
Temperatura	20	°C		Data di conta	gen 21, 2004	Conta	30M / cc
						Prelievo	33,0 litri

DATA	**Giorno**	**Conta A.M.** (Mcell/cc)	**Conta A.M.** (Mcell/cc)
		***Controllo* Serie 2**	***12%* serie 3**
21/01/2004	1	5,6	5,2
22/01/2004	2	5,4	6,0
23/01/2004	3	6,4	8,8
24/01/2004	4	10,4	9,2
25/01/2004	5	10,4	12,4
26/01/2004	6	15,2	11,4
27/01/2004	7	20,6	24,8

Dati relativi alla prova del tiosolfato comprovanti una normale crescita algale in acqua disinfettata con cloro e neutralizzata con una soluzione al tiosolfato al 12%.

ALLEGATO 3 - CICLI ALGAL, ISOCHRYSIS SP.

N°	Codice			Origine	Data lancio	Data fine	Osservazioni
1	I		SBT1	SBT	set 10, 2003	ott 14, 2003	--> P1
2	I	P	SBT2a		ott 6, 2003	ott 28, 2003	--> M1
3	I	P	SBT2b	SBT			--> M2
4	I	500	P1	1	ott 14, 2003	nov 11, 2003	--> P2
	I	P	M1a	2	ott 28, 2003	nov 25, 2003	--> M3
6		P	M1b			nov 25, 2003	--> M4 *
7	I	500		4	nov 11, 2003	dic 3, 2003	--> C1 *
8	I	500	P2 1b			dic 3, 2003	--> C2 *
9	I	P	M2a	3	nov 14, 2003	-	Eliminate
10	I	P	M2b			-	
11	I	P	M2c				
12	I	P	M2d			-	
13	I	P	M3a	5		-	Scarsa crescita !! Eliminate
14	I	P	M3b			-	
15	I	P	M4a *			-	
16	I	P	M4b *			-	
17	I	500		7	dic 3, 2003	-	Eliminato
18	I	500	C1 1b *			dic 27, 2003	Rilancio di altri 2 cicli con vol.500 + M5* e M6
19	I		C2 1a *	8			
20	I	500	C2 1b *				
21	I	P		19	dic 24, 2003	-	Eliminata
22	I	P	M5b *			feb 4, 2004	--> M7 *
23	I		M6a			feb 4, 2004	--> M8
24	I	P	M6b			-	Eliminata
25		500	C1 1a *	18	dic 27, 2003	gen 13, 2004	--> vol.2000 C1 *
26	I	500	C1 1b *	19			
27	I	500	C2 1a *	20			--> vol.2000 C2 *
28	I	500	C2 1b *	20			
29	I	2000	C1 1a *	25	gen 13, 2004	feb 4, 2004	--> vol.5000 C1 *
30	I	2000		26			
31	I	2000	C2 1a *	27			--> vol.5000 C2 *
32	I	2000	C2 1b *	28			
33	I	P	M7a *	22	feb 4, 2004	-	Eliminate a fine conte
34	I	P					
35	I	P	M8a	23	feb 4, 2004	mar 9, 2004	--> M9 1a/1f -- C2/pagro A/B
36	I	P	M8b				
37	I	5000	C1 1a *	29	feb 4, 2004		--> S200 C1 *
38	I	5000	C1 1b *	30			
39	I	5000		31			--> S200 C2 *
40	I	5000	C2 1b *	32			
41	I	S200	C1 A*	37 + 38	feb 27, 2004	mar 11, 2004	A --> C1/pagro A B e rim.za A: eliminati
42	I	S200	C2 B*	39 + 40			
43	I	P	M9 1a		mar 9, 2004 (P:1/10 cc) (B:7/500 cc)	apr 9, 2004	Eliminate
44	I	P	M9 1b				
45	I	P	M9 1c				
46	I	500	C2/pagro A			mar 18, 2004	Eliminata
47	I	P	M9 1d	36	mar 9, 2004 (P:1/10 cc) (B:7/500 cc)	mar 12, 2004	--> Miriam/Croazia
48	I	P	M9 1e			apr 9, 2004	Eliminate
49	I	P	M9 1f				
50	I	500	C2/pagro B			mar 18, 2004	--> vol.2000 C2/pagro
51	I	S200	C1/pagro A	41	mar 11, 2004	mar 22, 2004	Eliminato / Inquinato altro ceppo algale
52	I	2000	C2/pagro B	50	mar 18, 2004	mar 26, 2004	--> 2 x 2000 C2/pagro
53	I	2000	C2/pagro C	52	mar 26, 2004	Da fare	--> 2 x 5000 C2/pagro
54	I	2000	C2/pagro D				
55	I	P	M10 1a	52	mar 26, 2004	Da fare	--> M12
56	I	P	M10 1b				
Note:	N = Nannochloropsis sp./CCAP 211/78 & I = Isochrysis sp/CCAP 927/14						

ALLEGATO 3 – CICLI ALGALI, CICLO COMPLETO DI NANNOCHLOROPSIS SP.

NANNOCHLOROPSIS	500	cc	-	**Data inizio**	nov 18, 2003
PROVA	Ciclo completo Ncp 2			**A.M./P.M.**	A.M.
					37943
MOTIVAZIONI			500 cc	20 milioni/cc	--> 80 milioni/cc (1/1)
Standardizzazione ciclo completo.			2000 cc	20 milioni/cc	--> 50 milioni/cc (1/1)
			5000 cc	20 milioni/cc	--> 50 milioni/cc (2/1)
			200 l	2,5 milioni/cc	--> 40 milioni/cc
CONDIZIONI DI COLTURA			**COLTURA DI ORIGINE**		
Medium	F2M		Riferimento	Provetta e vol. 500 cc successivo	
Salinità	27	mg./l.	Data lancio	nov 18, 2003	
Origine acqua	40 mg./l. + acqua dolce		Medium	F2M	
Temperatura	23	°C	Conta	104,8	milioni
pH	variabile		Prelievo	100	cc
Luce	2+2				
CO2	no				

	N° cellule (milioni)				
DATA	**Giorno**	**500-1a**	**Giorno**	**500-1b**	**Osservazioni**
nov 18, 2003	1	20,96	1	20,96	Densità iniziale
nov 19, 2003	2	38,0	2	41,2	
nov 21, 2003	3	49,6	3	60,3	
nov 24, 2003	4	57,8	4	57,6	
nov 26, 2003	8	87,2	8	85,2	
					trasf.to in 2000 ml

	N° cellule (milioni)				
DATA	**Giorno**	**2000-1a**	**Giorno**	**2000-1b**	**Osservazioni**
nov 26, 2003	1	21,80	1	21,30	Densità iniziale
nov 28, 2003	3	18,8	3	28,4	
dic 1, 2003	6	38,0	6,0	38,0	
dic 3, 2003	8	44,4	8,0	48,8	
					Trasf.to in vol da 5000cc

	N° cellule (milioni)				
DATA	**Giorno**	**5000-1a**	**Giorno**	**5000-1b**	**Osservazioni**
dic 3, 2003	1	17,76	1	19,52	Densità iniziale
dic 5, 2003	3	32,4	3	36,6	
dic 9, 2003	7	36,0	7,0	34,0	
dic 12, 2003	10	40,8	10,0	48,8	
dic 15, 2003	13	40,8	13,0	46,4	
dic 19, 2003	17	44,4	17,0	47,6	
					Trasf.to in vol da 200l

	N° cellule (milioni)				
DATA	**Giorno**	**S202**			**Osservazioni**
dic 19, 2003	1	2,30			Densità iniziale
dic 23, 2003	5	10,8			
dic 27, 2003	9	15,2			
dic 30, 2003	12	24,0			
gen 2, 2004	15	16,4			
gen 5, 2004	18	34,8			
gen 8, 2004	21	30,0			
					Centifugati 40lt

ALLEGATO 3 – CICLI ALGALI, CICLO COMPLETO DI ISOCHRYSIS SP.

ISOCHRYSIS	500	cc	-	**Data inizio**	dic 27, 2003
PROVA	Ciclo completo Iso 1			**A.M./P.M.**	A.M.
					37983

MOTIVAZIONI	500 cc	5 milioni/cc	--> 15 milioni/cc (1/1)
Standardizzazione ciclo completo.	2000 cc	4 milioni/cc	--> 20 milioni/cc (1/1)
	5000 cc	8 milioni/cc	--> 20 milioni/cc (2/1)
	200 l	2 milioni/cc	--> 12 milioni/cc

CONDIZIONI DI COLTURA			**COLTURA DI ORIGINE**		
Medium	W		Riferimento	Provetta e vol. 500 cc successivo	
Salinità	27	mg./l.	Data lancio	dic 27, 2003	
Origine acqua	40 mg./l. + acqua dolce		Medium	W	
Temperatura	23	°C	Conta	16,0	milioni
pH	variabile		Prelievo	160	cc
Luce	2+2				
CO2	no				

	N° cellule (milioni)				
DATA	**Giorno**	**500-1a**	**Giorno**	**500-1b**	**Osservazioni**
dic 27, 2003	1	5,12	1	5,12	Densità iniziale
dic 31, 2003	5	20,8	5	15,6	
gen 13, 2004	17	15,2	17	21,6	Tras.to in vol da 2000cc

	N° cellule (milioni)				
DATA	**Giorno**	**2000-1a**	**Giorno**	**2000-1b**	**Osservazioni**
gen 13, 2004	1	2,30	1	3,00	Densità iniziale
gen 19, 2004	7	8,0	7	10,0	
gen 23, 2004	11	10,0	11,0	8,4	
gen 26, 2004	14	12,0	14,0	8,4	
gen 26, 2004	14	15,6	14,0	13,2	
gen 29, 2004	17	15,6	17,0	13,2	
feb 2, 2004	21	16,4	21,0	11,2	
feb 4, 2004	23				Trasf.to in 5 litri

	N° cellule (milioni)				
DATA	**Giorno**	**5000-1a**	**Giorno**	**5000-1b**	**Osservazioni**
feb 4, 2004	1	6,60	1	4,50	Densità iniziale
feb 10, 2004	7	9,2	7	7,2	

	N° cellule (milioni)				
DATA	**Giorno**	**S201**			**Osservazioni**
feb 10, 2004	1	0,40			Densità iniziale
feb 27, 2004	18	0,4			Eliminato

ALLEGATO 4 - CICLI ROTIFERI, BRACHIONUS PLICATILIS (RP)

N°	Codice			Origine	Data lancio	Data fine	Osservazioni
1	Rp	50 cc	CCAP	CCAP	dic 3, 2003		10 cc -> M1
							40 cc -> M2
2	N	500	M1	N + 1	dic 5, 2003	dic 17, 2003	--> M3
3	N	2000	M2 "B"	N + 1	dic 11, 2003	dic 27, 2003	--> M4
4	N	2000	M3 "C"	2	dic 17, 2003	gen 12, 2004	--> M5 1a "C"
5	N	2000	M3 "D"				--> M5 1a "D"
6	N	Bo 10	M4 "A"	N + 3	dic 27, 2003	gen 12, 2004	--> M6
7	Rp	Bo 10	M5 1a "C"	4	gen 12, 2004	feb 17, 2004	NO2 alto - Eliminata
8	Rp	Bo 10	M5 1b "D"	5			--> M7
9	Rp	Bo 10	M6 1a "L"	6			--> M8
10	Rp	Bo 10	M6 1b "M"			feb 9, 2004	Crollata - Eliminata
11	Rp	Bo 10	M7 1a	8	feb 17, 2004	mar 3, 2004	50% --> M7 1a bis 50% --> Colt.1/vasca C
12	Rp	Bo 10	M7 1b	8	feb 17, 2004	mar 3, 2004	50% --> M7 1b bis 50% --> Colt.1/vasca C
13	Rp	Bo 10	M8 1a	9	feb 17, 2004	feb 20, 2004	--> Colt.1/sacco
14	Rp	Bo 10	M8 1b				
15	N+Rp	S200	Colt.1/sacco	(59)13+14	feb 20, 2004	mar 3, 2004	--> Colt.1/vasca C
16	Rp	Vasca	Colt.1/v. C	15	mar 3, 2004	mar 29, 2004	Eliminata (1)
(Dal sacco 15 e dal 50% delle bocce 11 e 12) - (1) Coltura inquinata e crescita nulla. (1) Scarsa crescita (Protein Selco disciolto in acqua di mare !!!) + inquinamento da ciliati.							
17	Rp	Bo 10	M7 1a bis	11	mar 3, 2004	mar 29, 2004	--> divisa in M8 1a/1b
18	Rp	Bo 10	M7 1b bis	12	mar 3, 2004	mar 29, 2004	--> divisa in M8 1c/1d
19	Rr	P	Ricup.1	-	mar 23, 2004	apr 7, 2004	--> Ceppo puro il 07 apr passate tutte Vol 500 Ncp
20	Rr	P	Ricup.2	-			
21	Rr	P	Ricup.3	-			
22	Rr	P	Ricup.4	-			
23	Rp	Bo 10	M8 1a	17	mar 29, 2004	apr 3, 2004	--> V.B ciclo pagro
24	Rp	Bo 10	M8 1b	17	mar 29, 2004	apr 3, 2004	50 %--> V.B ciclo pagro
						apr 7, 2004	--> divisa in M9 1a/1b
25	Rp	Bo 10	M8 1c	18	mar 29, 2004	apr 3, 2004	--> V.B ciclo pagro
26	Rp	Bo 10	M8 1d				

ALLEGATO 4 – CICLI ROTIFERI, BRACHIONUS ROTUNDIFORMIS (RR)

N°	Codice			Origine	Data lancio	Data fine	Osservazioni
1	N	2000	+ Rr / A	(25)	nov 19, 2003	nov 27, 2003	Volumi algali di origine
2	N	2000	+ Rr / E	(26)			Vedere storico
3	N	2000	+ Rr / F	(27)			alghe
4	Rr	Bo 10	P1 "A"	1	nov 27, 2003	dic 12, 2003	2 l. --> M1 (1)
						dic 16, 2003	Rim.za --> Colt.1
5	Rr	Bo 10	P1 "E"	2	nov 27, 2003	dic 12, 2003	2 l. --> M1 (1)
						dic 17, 2003	2 l. / Prova tiosolf. (1)
							Rim.za --> Colt.1
6	Rr	Bo 10	P1 "F"	3	nov 27, 2003	dic 12, 2003	2 l. --> M1 (1)
						dic 16, 2003	50 cc / Vol. Ncp M2
							Rim.za --> Colt.1
7	Rr	Bo 10	M1 "B"	4 + 5 + 6	dic 12, 2003		--> M4 / M5
8	N	2000	M2	(N) + 6	dic 16, 2003	dic 27, 2003	--> M3
9	Rr	Vasca	Colt.1	4 + 5 + 6	dic 16, 2003	-	Eliminata (2)
10	Rr	Bo 10	Controllo	5	dic 17, 2003	gen 9, 2004	--> Colt.2
11	Rr	Bo 10	Tiosolf.15 %				--> M7
12	Rr	Bo 10	Tiosolf.20 %				--> Colt.2
13	N	Bo 10	M3 "B"	(N) + 8	dic 27, 2003		--> M6
14	N	Bo 10	M3 "C"				--> Colt.2
15	Rr	Bo 10	M4 "D"	7			--> Colt.2
16	Rr	Bo 10	M4 "E"				--> Colt.2
17	Rr	Bo 10	M5 "B2"	7	dic 31, 2003		--> Colt.2
18	Rr	Vasca	Colt.2	10/17	gen 9, 2004	gen 19, 2004	Eliminata (3)
19	Rr	Bo 10	M6 1a "F"	13	gen 9, 2004		--> M8
20	Rr	Bo 10	M6 1b "G"				
21	Rr	Bo 10	M7 1a "HT"	11	gen 9, 2004		Eliminate
22	Rr	Bo 10	M7 1b "IT"				(ciliati)
23	Rr	Bo 10	M8 1a	19/20	gen 16, 2004	gen 26, 2004	Diviso in M9 1a
						feb 3, 2004	Diviso in M10 1a
						feb 10, 2004	Diviso in M12 1a
						feb 14, 2004	--> Colt.6/sopra
24	Rr	Bo 10	M8 1b	19/20	gen 16, 2004	gen 26, 2004	Diviso in M9 1b
						feb 3, 2004	Diviso in M10 1b
						feb 10, 2004	Diviso in M12 1b
						-	Eliminata
25	Rr	Bo 10	M8 1c	19/20	gen 16, 2004	gen 20, 2004	Diviso in M9 1c
						gen 29, 2004	--> Colt.3/sotto
26	Rr	Bo 10	M8 1d	19/20	gen 16, 2004	gen 20, 2004	Diviso in M9 1d
						gen 29, 2004	--> Colt.4/sopra
27	N	500	Msp 1A	(43) + 24	gen 23, 2004	feb 26, 2004	--> Msp 2 (4)
28	N	500	Msp 1B				Eliminato
29	Rr	Bo 10	M9 1c	25	gen 20, 2004	gen 29, 2004	--> Colt.3/sotto
30	Rr	Bo 10	M9 1d	26			--> Colt.4/sopra

N.B.: 29 gen. presenza di ciliati in 24, 30 e 31.

N°	Codice			Origine	Data lancio	Data fine	Osservazioni
31	Rr	Bo 10	M9 1a	23	gen 26, 2004	feb 3, 2004	Diviso in M11 1a
						feb 10, 2004	Diviso in M13 1a
						feb 14, 2004	--> Colt.6/sopra
32	Rr	Bo 10	M9 1b	24	gen 26, 2004	gen 29, 2004	--> Colt.3/sotto
33	Rr	Vasca	Colt.3/sotto	25+29+32	gen 29, 2004	feb 6, 2004	200 litri / Eliminata (4)
34	Rr	Vasca	Colt.4/sopra	26+30	gen 29, 2004	feb 12, 2004	200 litri / Eliminata (4)
35	Rr	Bo 10	M10 1a	23	feb 3, 2004	feb 9, 2004	--> Colt.5/sacco Ncp
36	Rr	Bo 10	M10 1b	24	feb 3, 2004	feb 10, 2004	Diviso in M12 1b
						feb 19, 2004	--> Colt.8/vasca B
37	Rr	Bo 10	M11 1a	31	feb 3, 2004	feb 10, 2004	Diviso in M14 1a
						feb 17, 2004	--> M11 1b/1c
38	N+Rr	S200	Colt.5/sacco	(51) + 35	feb 9, 2004	feb 20, 2004	Eliminato (5)
39	Rr	Bo 10	M12 1a	23	feb 10, 2004	feb 17, 2004	--> M12 1b/1c
40	Rr	Bo 10	M12 1b	24		feb 19, 2004	--> Colt.8/vasca B
41	Rr	Bo 10	M13 1a	31		feb 16, 2004	--> Colt.7/sacco
42	Rr	Bo 10	M14 1a	37		feb 17, 2004	--> M15
43	Rr	Vasca	Colt.6/sopra	23 + 31	feb 14, 2004	feb 20, 2004	Eliminata (6)
44	N+Rr	S200	Colt.7/sacco	(58) + 41	feb 16, 2004	feb 19, 2004	--> Colt.7/vasca A
45	Rr	Bo 10	M11 1b	37	feb 17, 2004	feb 19, 2004	--> Colt.8/vasca B
46	Rr	Bo 10	M11 1c				
47	Rr	Bo 10	M12 1b	39			
48	Rr	Bo 10	M12 1c				
49	Rr	Bo 10	M15 1a	42	feb 17, 2004	feb 20, 2004	--> M16
50	Rr	Bo 10	M15 1b			mar 3, 2004	--> Colt.9/vasca D
51	Rr	Vasca	Colt.7/vasca A	44	feb 19, 2004	feb 26, 2004	--> Colt.7/vasca A.bis
52	Rr	Vasca	Colt.8/vasca B	6 bocce	feb 19, 2004	feb 27, 2004	Eliminata (7)
53	Rr	Bo 10	M16 1a	49	feb 20, 2004	feb 24, 2004	--> M17
54	Rr	Bo 10	M16 1b				--> M18
55	Rr	Bo 10	M17 1a	53	feb 24, 2004	feb 27, 2004	--> Colt.9/sacco Ncp
56	Rr	Bo 10	M17 1b			mar 3, 2004	--> Colt.9/vasca D
57	Rr	Bo 10	M18 1a	54			
58	Rr	Bo 10	M18 1b			mar 3, 2004	--> M19
59	Rr	Vasca	Colt.7/V.A.bis	51	feb 26, 2004	mar 7, 2004	Eliminata (8)
60	Rr	500	Msp 2	27	feb 26, 2004	mar 2, 2004	--> Msp3 (9) --> C1/pagro (10)
61	N+Rr	Vasca	Colt.9/sacco	(61) + 55	feb 27, 2004	mar 3, 2004	--> Colt.9/vasca D
62	Rr	500	Msp3	60 + Ncp	mar 2, 2004	mar 11, 2004	--> Msp4 (9)
63	Rr	500	C1/pagro	60 + Ncp	mar 2, 2004	mar 10, 2004	--> Bo 10 C1/pagro
64	Rr	Vasca	Colt.9/vasca D	Sacco+Bo	mar 3, 2004	mar 10, 2004	--> Colt.9/vasca D2
65	Rr	Bo 10	M19 1a	58	mar 3, 2004		--> M20
66	Rr	Bo 10	M19 1b				--> M21

N°	Codice			Origine	Data lancio	Data fine	Osservazioni
67	Rr	Bo 10	M20 1a	65	mar 6, 2004		--> M22
68	Rr	Bo 10	M20 1b				
69	Rr	Bo 10	M21 1a	66	mar 9, 2004	mar 11, 2004	Smezzato
						mar 18, 2004	1/4 --> "scorta"
						apr 2, 2004	--> V.A ciclo pagro
70	Rr	Bo 10	M21 1b	66	mar 9, 2004	mar 11, 2004	Eliminate
71	Rr	Bo 10	M22 1a	67			
72	Rr	Bo 10	M22 1b				
73	Rr	Bo 10	M22 1c	68	mar 9, 2004	mar 11, 2004	Eliminate
74	Rr	Bo 10	M22 1d			mar 11, 2004	Smezzata
						mar 29, 2004	Diviso in M23 1a/1b
75	Rr	Vasca	Colt.9/v. D2	64	mar 10, 2004		Eliminata (11)
76	Rr	Bo 10	C1/pagro	63 + Ncp	mar 10, 2004	apr 2, 2004	--> V.A ciclo pagro
77	Rr	500	Msp4	62 + Ncp	mar 11, 2004	apr 1, 2004	--> Msp5 (9)
78	Rr	Vasca	Colt.10/v. E	(62+63)	mar 12, 2004	mar 19, 2004	--> Colt.10/v.E2 (11)
79	Rr	Bo 10	"scorta"	69	mar 18, 2004	mar 29, 2004	Diviso in M23 1c/1d
80	Rr	Vasca	Colt.10/v. E2	78	mar 19, 2004	mar 27, 2004	--> Colt.10/v.E3 (11)
81	Rr	Vasca	Colt.10/v. E3	80	mar 27, 2004	apr 1, 2004	--> Colt.10/v.E4
82	Rr	Bo 10	M23 1a	74	mar 29, 2004	apr 2, 2004	--> V.A ciclo pagro
83	Rr	Bo 10	M23 1b			mar 31, 2004	Eliminata
84	Rr	500	Msp5	77 + Ncp	apr 1, 2004	apr 14, 2004	--> Msp6 (9)
85	Rr	Bo 10	M23 1c	79	mar 29, 2004	apr 2, 2004	50%--> V.A ciclo pagro
							50% --> M24
86	Rr	Bo 10	M23 1d	79	mar 29, 2004	apr 2, 2004	--> V.A ciclo pagro
87	Rr	Vasca	Colt.10/v. E4	80	apr 1, 2004	apr 5, 2004	--> V.D ciclo pagro
Vasca A ciclo pagro fatto con 69, 76, 82, metà 85 e 86.							
Vasca D ciclo pagro fatto con 87							

Legenda:
Rr=Brachionus rotundiformis;

ALLEGATO 4 - ALIMENTAZIONE DI UNA COLTURA IN BOCCIA DI RR

Brachionus rotundiformis					**Data inizio** feb 24, 2004				
PROVA Rr M/17 1a									
CONDIZIONI DI COLTURA				**COLTURA DI ORIGINE**					
Volume	9	litri		Data lancio	feb 20, 2004				
Salinità	32	mg./l.		Codice	M/16 1a				
Temperatura	24	°C		Data di conta	feb 24, 2004		Conta	720	/ cc
							Prelievo	4	litri
DATA	**Giorno**	**Conta A.M.** (n°/cc)	**Volume** (litri)	**N°tot** (milioni)	Alimento	**Razione/gg** (g/milione)	**N° pasti**	**A.M.** (g)	**P.M.** (g)
feb 24, 2004	1	360	9	3,2	L	0,8	2	1,3	1,3
feb 25, 2004	2	445	9	4,0	L	0,8	2	1,6	1,6
feb 27, 2004	4	1.007	9	9,1	L	0,8	2	3,6	3,6

Alimenti: L = Lievito, CS = Culture Selco, CS3 = Culture Selco 3000, PS = Protein Selco,
Tabella inerente le condizioni di coltura in bocce da 9l del Brachionus rotundiformis(parametri fisici,coltura di provenienza e alimento somministrato).

ALLEGATO 4 – COLTURA IN BOCCIA DI RP

DATA	CONTE **Rp M/7 1a**										Rot/cc	Uova	Ciliati	Lievito gr/24h	NOTE
20/02	16	12	15	15	25	20	24	34	27	26	21	+	-	0.2	Densità iniziale
23/02	27	36	20	26	23	24	38	35	31	37	30	+/++	-	0.24	
25/02	28	32	25	36	17	32	30	28	34	32	29	+	-	0.2	
27/02	55	37	48	38	46	48	39	35	50	46	44	+	-	0.4	
01/03	28	32	13	27	31	26	28	25	14	21	25	0/+	-	0.2	Trasferimento in vasca(200l)

Tabella esplicativa delle conte effettuate giornalmente sulla coltura di Brachionus plicatilis, del calcolo della media di rotiferi/cc e conseguente alimentazione e delle condizioni della coltura(uova/rot e presenza di ciliati). I valori riportati mostrano un andamento crescente nei primi quattro giorni di coltura dopo i quali è previsto il trasferimento in volumi maggiori.

ALLEGATO 4 – COLTURA IN BOCCIA DI RR

DATA	CONTE **Rr M/17 1a**										Rot/cc	Uova	Ciliati	Lievito gr/24h	NOTE
24/02	34	32	43	37	43	42	40	36	35	39	381	+	+	4	Densità iniziale, da 1/2di M/16 1a
25/02	35	42	36	53	47	42	38	53	51	48	445	+/++	+/++	3.6	
27/02	73	125	117	101	75	102	97	110	99	108	1007	+/++	+/++	8	Messi in sacco algale da 200l

Tabella esplicativa delle conte effettuate giornalmente sulla coltura di Brachionus rotundiformis, del calcolo della media di rotiferi/cc e conseguente alimentazione e delle condizioni della coltura(uova/rot e presenza di ciliati). I valori riportati mostrano un andamento crescente nei primi quattro giorni di coltura dopo i quali è previsto il trasferimento in volumi maggiori.

ALLEGATO 4 – COLTURA DI ROTIFERI RR IN SACCO ALGALE

		Conte (numero rotiferi/cc)											
Data	**T°**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**Media** ***N°rot/cc***	**Note**
27/02	24	51	45	50	50	49	54	52	46	56	49	50	Densità iniziale
01/03	24	341	360	472	510	462	458	469	501	465	485	452	
02/03	25	500	458	556	459	503	512	496	513	509	507	500	
03/03	24											500	Filtrazione-> vasca D(200l)

Esempio di tabella per la raccolta dei dati relativi alla coltura di rotiferi in sacco algale da 200 litri.
Si noto l'aumento della concentrazione dei rotiferi nei primi tre giorni, dopo i quali si provvede alla filtrazione della coltura stessa e successivo trasferimento in vasca.

ALLEGATO 4 - COLTURA IN VASCA DI RR

Data	°T	O_2	Nr rot/cc	Dieta artificiale INVE (g)	N° di Uova	NO_2 mg/l	Note
13/03	25.0	4,6	106	8	0/+	0.2	
14/03	24,3	4.8	110	10	0/+	>1.5	
15/03	24.1	4.7	96	8.5	+	>1.5	Presenza di numerosi Ciliati
16/03	24.6	5.0	184	15	+	0.16	
17/03	24.6	5.1	237	20	+	0.3	
18/03	24.7	4.4	232	20	+	0.15	Presenza di numerosi Ciliati
19/03		4.2	236	18	+	0.05	Filtrazione-→E2

Esempio di tabella per raccolta dei dati relativi alla produzione di rotiferi in vasca.
Si noti come, dopo 4 giorni, si osservi un arresto della replicazione e la concentrazione si stabilizzi.

ALLEGATO 4 - SCHEMA DI ALIMENTAZIONE DEI ROTIFERI IN PRODUZIONE ED IN ARRICCHIMENTO

Vasche con rotiferi in produzione			
Ore 9	Ore 13.30	Ore 17.30	Ore 22
CS 60 gr/mc	DHA 25 gr/mc	CS 60 gr/mc	CS 120 gr/mc

Vasche con rotiferi in arricchimento per essere somministrati alle larve la mattina del giorno seguente			
Ore 9	Ore 13.30	Ore 17.30	Ore 22
CS 60 gr/mc	DHA 25 gr/mc	CS 60 gr/mc	DHA 125/gr mc

Vasche con rotiferi in arricchimento per essere somministrati alle larve al pomeriggio			
Ore 9	Ore 13.30	Ore 17.30	Ore 22
DHA 62,5 gr/mc	DHA 62,5 gr/mc	CS 60 gr/mc	CS 120 gr/mc

Legenda:
CS = Culture Selco (INVE) dieta artificiale pronta per l'alimentazione dei rotiferi
DHA= DHA Protein Selco (INVE) miscela per l'arricchimento dei rotiferi (aumento del valore nutrizionale)

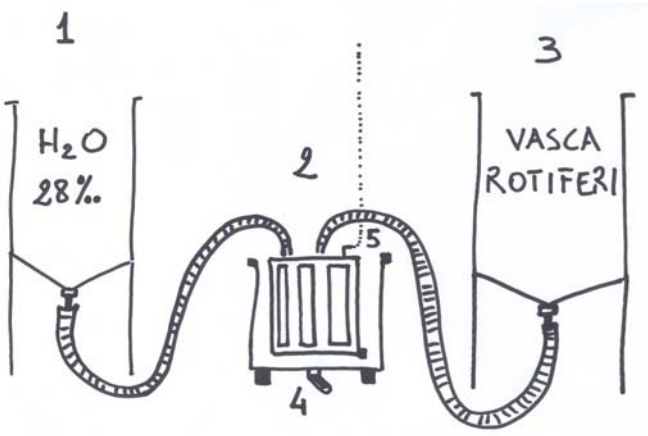
ALLEGATO 5 -PROTOCOLLO DI FILTRAZIONE DEI ROTIFERI

GIORNO PRECEDENTE PASSAGGIO
Preparare vasca con 150lt di acqua di mare, e inserire una resistenza per portare la temperatura a 26°C
Preparare 300lt di acqua di mare nella vasca vicina filtro rotiferi (1), **mettere acqua di mare fino ad una altezza di 30cm direttamente nella vasca filtro** (2) **e inserire in ambedue le vasche una resistenza per portare la temperatura a 26°C.**

AZIONI PRELIMINARI AL PASSAGGIO
Inserire un tubo, opportunamente lavato con acqua dolce, nella valvola della vasca da filtrare contenente i rotiferi **(3).**
Poggiare l'altra estremità di questo tubo su un prefiltro costituito da un cestello in metallo su cui poggia un panno filtrante
Inserire tubo, opportunamente lavato con acqua dolce nella valvola della vasca con acqua per il risciacquo **(1).**
Inserire un raccordo **(4)** al rubinetto di uscita del filtro affinchè l'acqua cada nel tubo che connette ai serbatoi di stoccaggio degli scarichi.
Preparare due secchi ben puliti.
Inserire tubicino aria in vasca filtro **(5).**

PASSAGGIO
Aprire completamente e con movimento deciso la valvola della vasca rotiferi **(3),** quando tutta la vasca si svuota, staccare il tubo e alzarlo immediatamente per far defluire l'acqua rimasta al suo interno nel filtro.
Aprire la valvola della vasca per il risciacquo **(1)** e contemporaneamente aprire scarico filtro **(4)** in modo che la quantità d'acqua in uscita sia compensata dalla stessa quantità d'acqua in entrata.

AZIONI CONCLUSIVE
Aspettare che siano filtrati tutti i rotiferi e che l'acqua nel filtro copra appena la parte basale dello stesso.
Sollevare il filtro **(2)** facendo attenzione a non premere con le dita sulla rete filtrante.
Poggiare il filtro sul bordo della vasca che lo contiene.
Aprire tappo alla base del filtro e far defluire i rotiferi in secchi.
Versare il contenuto dei secchi nella vasca delle larve e/o in una nuova vasca di coltura, secondo come stabilito dalle conte del giorno.
Sciacquare bene il filtro e la vasca che lo contiene.



ALLEGATO 6 - CICLO LARVALE, VASCA 1 - CONDIZIONI IN VASCA

Giorno Data	N°	°C	O2	Luce	Conta n° / l.	Note
lug 22, 2003	-1	26,2	-	-	(schede)	Emmissione alle ore 12.00
		25,0		Buoio	(146.132)	Trasporto
		25,0		Buoio	165	Semina uova
lug 23, 2003	0	24,5	7,7	Buoio	10,0	Schiusa ore16.00: 28 ore dopo l'emissione.
lug 24, 2003	1	24,5	7,5	Buoio	7,2	
lug 25, 2003	2	24,3	7,5	Buoio	6,3	
lug 26, 2003	3	24,2	7,5	Buoio	5,0	N°3 controlli/giorno
	23.30: apertura della bocca (aggiunta alghe + rotiferi)					
lug 27, 2003	4	24,3	7,4	Luce	3,8	
lug 28, 2003	5	24,5	7,3	Luce	3,0	
lug 29, 2003	6	24,5	7,1	Luce	2,3	
lug 30, 2003	7	24,4	7,0	Luce	0,7	
lug 31, 2003	8	24,2	5,8	Luce	0,6	N°2 controlli/giorno
ago 1, 2003	9	23,4	6,2	Luce	0,5	Inserimento pietra porosa
ago 2, 2003	10	23,7	7,9	Luce	0,3	
ago 3, 2003	11	23,8	7,5	Luce	333	Inizio comport.to gregario
ago 4, 2003	12	23,6	7,8	Luce	" "	
ago 5, 2003	13	23,9	8,2	Luce	" "	
ago 6, 2003	14	24,1	8,1	Luce	" "	
ago 7, 2003	15	24,3	7,6	Luce	" "	
ago 8, 2003	16	24,3	7,2	Luce	" "	
ago 9, 2003	17	24,2	7,5	Luce	" "	
ago 10, 2003	18	24,3	6,9	Luce	" "	
ago 11, 2003	19	24,2	7,0	Luce	328	5 morti/spurgo
ago 12, 2003	20	24,5	7,5	Luce	318	10 morti/spurgo - Non mangiano la A0
ago 13, 2003	21	24,4	7,7	Luce	291	20/spurgo + 7/sifone - Non mangiano la A0
ago 14, 2003	22	24,3	7,8	Luce	282	7/spurgo + 2/sifone - Non mangiano la A0
ago 15, 2003	23	24,1	7,9	Luce	273	9/spurgo + 0/sifone - Non mangiano la A0
ago 16, 2003	24	24,7	7,7	Luce	260	11/spurgo + 2/sifone
ago 17, 2003	25	24,6	7,8	Luce	103	148/spurgo + 9/sifone
ago 18, 2003	26	24,3	7,4	Luce	30	62/spurgo + 11/sifone
ago 19, 2003	27			Luce	4	26/spurgo (non sifonato)
20 ago.: passaggio vasca 860 litri --> Boccia 9 litri (stanza picc. vol.)						

ALLEGATO 6 - CICLO LARVALE, VASCA 1 - ALIMENTAZIONE

Giorno Data	N°	Alghe (M cell/cc) Aggiunte	Ora /Da	Rotif. (n°/cc) Rimasti	Totale	Artemia (n°/cc) Rimasti	Totale	Note
lug 22, 2003	-1							Emissione ore12.00 Trasporto Semina uova
lug 23, 2003	0	-	-	-	-	-	-	Schiusa ore16.00
lug 24, 2003	1	-	-	-	-	-	-	
lug 25, 2003	2	-	-	-	-	-	-	
lug 26, 2003	3	0,4	Sera /S	-	0,9	-	-	Sera: inizio Alimentazione
lug 27, 2003	4	0,2	12.00 /B	1,0	1,6	-	-	Rotif./sera
lug 28, 2003	5	0,2	13.00 /B	4,7	7,5	-	-	Rotif./14.00
lug 29, 2003	6	0,9	14.00 /S	9,1	-	-	-	
lug 30, 2003	7	0,3	17.00 /S	9,0	-	-	-	Acqua molto chiara
lug 31, 2003	8	0,4	14.30 /S	9,0	-	-	-	
ago 1, 2003	9	0,4	14.30 /S	1,5	-	-	-	Pb conta Rotif.
ago 2, 2003	10	0,4	15.30 /S	1,9	-	-	-	Pb conta Rotif.
ago 3, 2003	11	0,3	11.30 /S	6,4	-	-	-	
ago 4, 2003	12	0,3	Pranzo /S	16,0	-	-	-	Acqua chiara
ago 5, 2003	13	0,3	Pranzo /S	9,5	-	-	-	Acqua chiara
ago 6, 2003	14	0,9	Pranzo /S	8,9	-	-	-	Acqua chiara
ago 7, 2003	15	0,6	Pranzo /S	10,8	-	-	-	Acqua ± verde
ago 8, 2003	16	0,4	Pranzo /S	14,0	-	-	-	Acqua ± verde
ago 9, 2003	17	0,3	Pranzo /S	16,9	-	-	-	
ago 10, 2003	18	0,5	Pranzo /S	19,3	-	-	-	
ago 11, 2003	19	0,2	Pranzo /S	24,5	-	-	0,30	Inizio A0
ago 12, 2003	20	0,3	Pranzo /S	19,0	-	0,30	1,04	LS 5,6, LT 6,1 mm.
ago 13, 2003	21	0,3	Pranzo /S	20,2	-	0,15	0,71	
ago 14, 2003	22	0,3	Pranzo /S	10,6	-	0,45	1,17	
ago 15, 2003	23	0,3	Pranzo /S	7,5	-	0,25	0,94	
ago 16, 2003	24	0,3	Pranzo /S	8,4	-	0,70	1,69	
ago 17, 2003	25	0,4	Pranzo /S	12,0	16,4	0,50	-	(a) (b)
ago 18, 2003	26	0,5	Pranzo /S	13,9	14,4	0,75	-	(b)
ago 19, 2003	27	0,3	Pranzo /S	11,5	11,9	0,75	1,06	(b)
20 ago.: passaggio vasca 860 litri --> Boccia 9 litri (stanza picc. vol.)								
ago 20, 2003	28	*0,5*	A.M.	14,0	-	-	0,60	(c)
ago 21, 2003	29	*0,5*	A.M.	4,5		0,60	3,00	+ A0 sch.21.08
ago 22, 2003		*0,5*	A.M.	-	-	0,00		Travaso + A0

Formula alghe aggiunte
(litri aggiunti*1000*M/cc)/(litri in vasca*1000)

Formula rotiferi aggiunti
(litri aggiunti*1000*n°/cc)/(litri in vasca*1000)

Formula A0 aggiunte
(litri*1000*n°/cc)/(litri in vasca*1000)

Blu = conta rotiferi in vasca
Verde = Dopo eliminazione artemia residua.

(a) livello abbassato (rimasto 1/3 vol.)
(b) 60 l. alghe/D + 60 l. rotif/coltura
(c) 7 l. acqua + 1 l. alghe/D + 1 l. rotif/beuta 2
+ A1 da vasca di allev.to (sch. 19.08.03)

ALLEGATO 7 – CICLO LARVALE, VASCA 1 – DATI MORTALITÀ

Giorno	% mortalità	Stima n° / vasca	Densità n°/litro	Mortlità
0		113.600	-	
1	21,7	8.500	10,0	-
2		6.658	7,2	-
	18,4	5.242	6,3	
4	21,9	4.278	5,0	-
5		3.343	3,8	-
6		2.578	3,0	
7	40,0	1.700	2,3	-
8		1.020	0,7	-
9	13,7	510	0,6	-
10	5,7	440	0,5	70
11	2,4	415		25
12	4,9	405		10
13	2,6			20
14	4,0	375		10
15	2,8	360		15
16	2,9	350		10
17	2,6	340		10
18	1,5	331		9
	3,1			5
20	8,5	316		10
21	3,1	289		27
22	3,2	280		9
23		271		9
	60,9	258		13
25	72,3			157
26	92,9	28		
27	0,0	2		26
28	-	2		

ALLEGATO 8 - CICLI LARVALI, VASCA 1 – BIOMETRIE

Giorno	medie (mm)	Misure medie (tacche)						
	0,75	3,5	3,5					
0	1,55	7,2	7,0	7,0	7,7			
	2,25	10,5	9,2	11,8				
2	2,60	12,1	12,3	12,0	12,1			11,8
	2,16	10,1	12,2	10,0	8,0			
4		10,6	11,5	10,0	10,0	10,7		
5	2,50	11,7	11,0	11,2	13,0	11,5	11,5	
6	2,33	10,9	10,0	11,3	11,3			
7	2,49	11,6	12,2	11,0				
8	2,84	13,3	13,0	13,5				
9	3,00	14,0	14,0					
10	3,38	15,8	15,5	16,0				
11	*3,80*							
12	4,22		21,0	19,0	19,1			
13								
14	3,43	16,0	16,0	16,0				
	4,18	19,5	19,5					
16	4,92	23,0	19,2	26,0	23,5	23,2		
17	*5,12*							
18	*5,31*							
19	*5,50*							
20	5,69	26,6		27,5	29,7			
21	*6,01*							
22	*6,22*							
23	6,64	31,0	31,0					
24	*6,72*							
25	*6,80*							
26	*6,88*							
27	6,96	32,5	32,5					

ALLEGATO 9 – IMMAGINI

Immagine 01 – dispositivo della presa d'acqua marina mobile.

Immagine 02 – Il filtro biologico del ciclo 1.

Immagine 03 – particolare dei sacchi algali.

Immagine 04 – alghe e rotiferi nei piccoli volumi

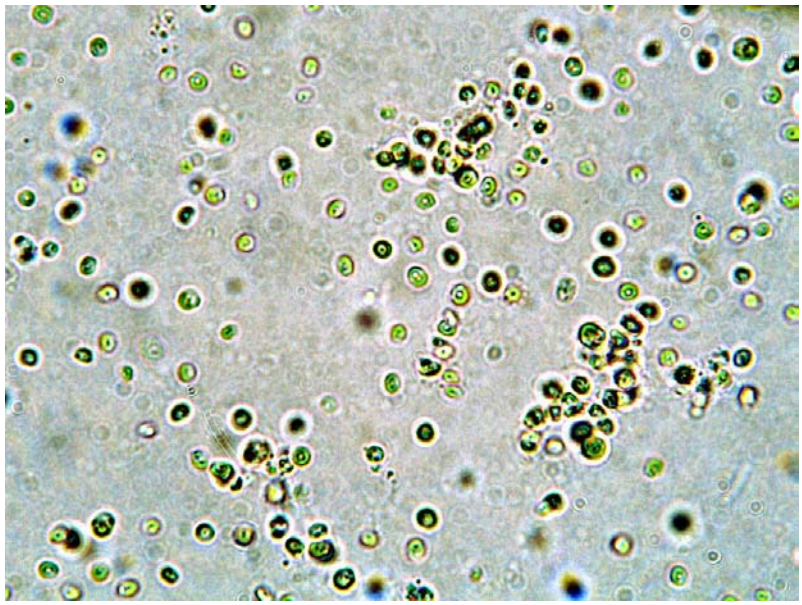


Immagine 05 – cellule di Nannochloropsis sp. (x1.000)

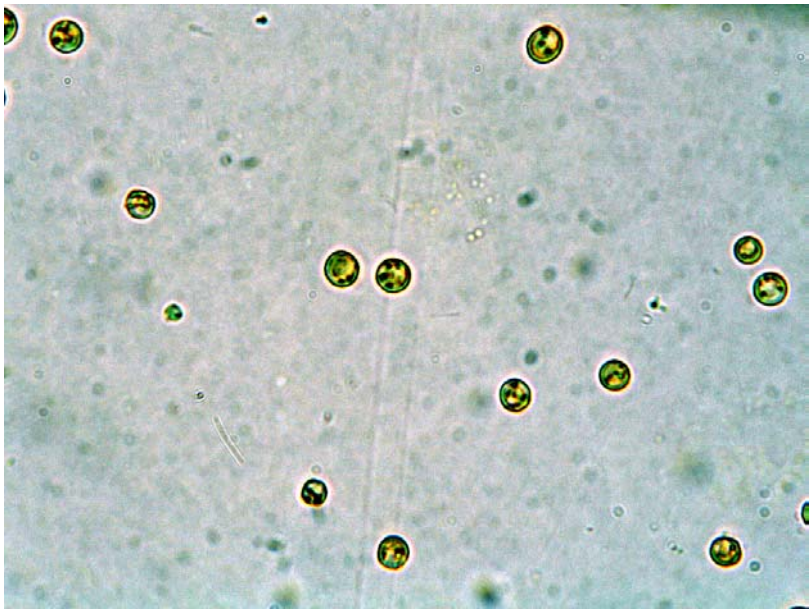


Immagine 06 – cellule di Isochrisys sp.

Immagine 07 – adulto di rotifero *Brachionus r.*

Immagine 08 – uova di cernia alla schiusa

Immagine 09 – larva di cernia a 3 giorni.

Immagine 10 – larva di cernia a 16 giorni.

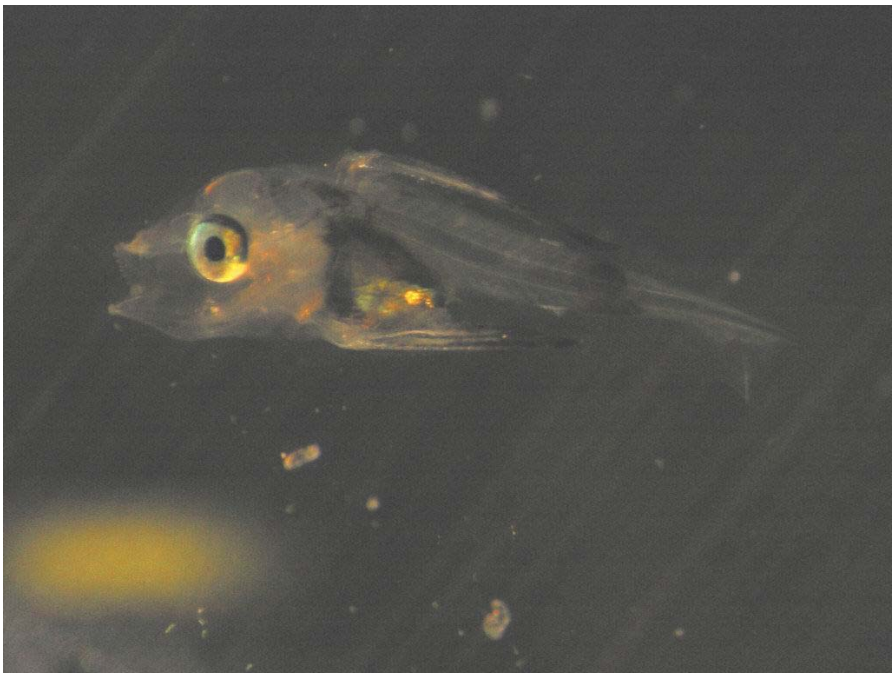


Immagine 11 – larva di cernia a 19 giorni.

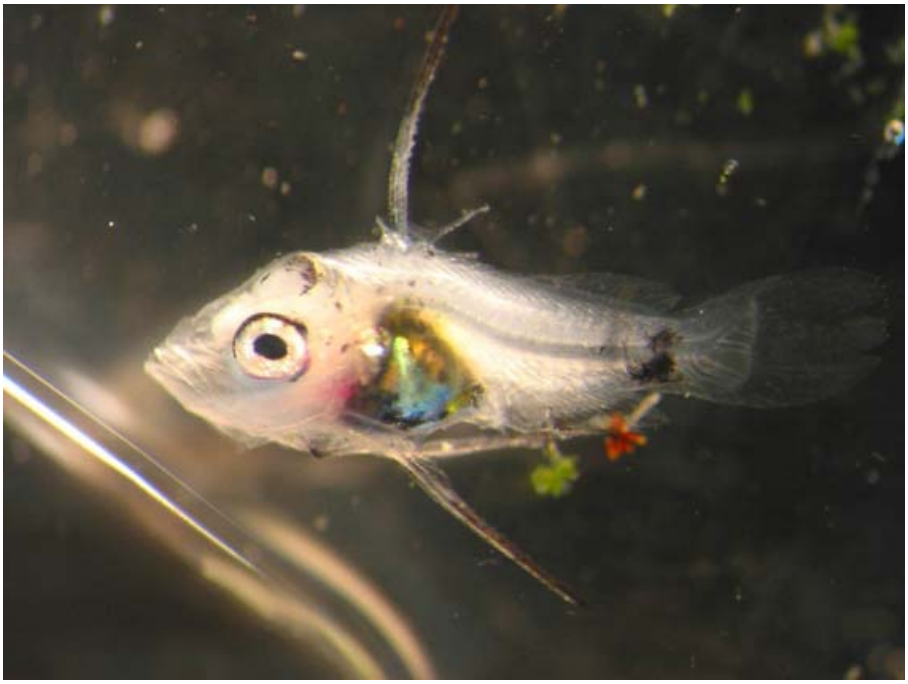


Immagine 12 – larva di cernia a 25 giorni.