ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE

"G.CAPORALE"

DOCUP PESCA REGIONE ABRUZZO
BANDO 2003 – MISURA 4.6 – "AZIONI INNOVANTI"
PROGETTO 05/IM/03/AB

"PROGETTO PILOTA PER L'ALLEVAMENTO DI UNA SPECIE ITTICA INNOVATIVA: IL SARAGO"

RELAZIONE TECNICA FINALE

DR. ALESSANDRA PAOLINI

MAGGIO 2005

SCHEDA TECNICA DEL PROGETTO

Data domanda	15 ottobre 2003
Importo	55.673,99
Data approvazione	07 maggio 2004 DH 18/44 – progetto cod. 05/IM/03/AB
Data inizio attività	16.07.2004
Data fine attività	31.05.2005
Data variante	-
Data approvazione variante	-
Tipo di finanziamento	Fondi Docup-Sfop (Documento unico di Programmazione – Strumento Finanziario di Orientamento alla Pesca) Il finanziamento è composto per il 72% da risorse comunitarie e per il 28% da risorse nazionali. Queste a loro volta sono costituite per il 70% da risorse del Ministero delle Risorse Agricole e Forestali, per il 30% da risorse della Regione Abruzzo
Partecipanti	Dott.ssa A.Paolini,dr. M.Vallerani, dr. A.De Ascentiis, dr.M.Torresi, dr. A.Pavone. Consulente: dr. Lorenzo Gennari. Coadiuvatore tecnico: Alessandro Perazzitti. Un ringraziamento particolare per la collaborazione ai volontari: dr. Giuseppina Candelori, dr. Daniele Cargini
Sede delle attività	Centro di Biologia delle Acque, sede di Torre Cerrano, Pineto (TE).

INDICE

Introduzione

1. 0 – Materiali e metodi

1.1- Settore per la produzione delle alghe unicellulari
1.2 -Settore per la produzione dei rotiferi e dell'artemia
1.3 -Allevamento larvale - Circuito chiuso n°1
1.4 -Allevamento larvale - Circuito chiuso n°2
1.5 -Modalità di gestione dei filtri biologici
1.6 -Metodiche di coltivazione delle alghe unicellulari
1.7- Metodiche di coltura ed arricchimento dei rotiferi
1.8- Metodiche di schiusa ed arricchimento dell'artemia
1.9 -Diete artificiali
1.10-Modalità di monitoraggio del ciclo di allevamento larvale

2.0 – Risultati e discussione

2.1 -Semina, schiusa e riassorbimento del sacco vitellino (giorno 2-4)
2.2 - Periodo da giorno 3 (2/4) a giorno 30 (29/31)
2.3 - Periodo da giorno 31 (30/32) a giorno 65 (64/66)
2.4 - Fotografie e biometrie degli stadi larvali e post-larvali
2.5 - Preingrasso e ingrasso

Conclusioni

Bibliografia

Allegati

Allegato 01 – Medium coltivazioni algali
Allegato 02 – Cicli coltivazione algale
Allegato 03 – Condizioni in vasca

INTRODUZIONE

Nel periodo 2000-2006, con i fondi Docup Pesca, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" ha avuto l'opportunità di sviluppare proprie competenze nel settore dell'allevamento larvale, dello svezzamento e dell'ingrasso di specie ittiche marine di interesse commerciale. L'attività svolta si é incentrata su quattro specie ittiche innovative, quali la cernia (*Epinephelus marginatus*), il pagro (*Pagrus pagrus*), il sarago pizzuto (*Puntazzo puntazzo*) e la sogliola (*Solea solea*).

Il primo progetto, oltre a risultati preliminari sull'allevamento larvale della cernia, ha visto la realizzazione delle strutture e l'avvio delle produzioni di alimento vivo per le larve (fito-zooplancton). Il secondo progetto, relativo al pagro, ha visto un'ulteriore standardizzazione delle produzioni di fito-zooplancton e il completamento del primo ciclo di allevamento larvale, questo terzo progetto, relativo all'allevamento larvale del sarago pizzuto, ha visto lo svolgimento del secondo ciclo completo di allevamento larvale.

La prima parte della relazione, a testimonianza dello sforzo di standardizzazione delle tecniche e di formazione degli addetti, riguarda la descrizione delle strutture, dei vari protocolli e dei risultati conseguiti nella produzione del fito-zooplancton. La seconda parte della relazione riporta i risultati del ciclo di allevamento larvale del sarago pizzuto e delle prove d'ingrasso successive.

L'attività oggetto della presente relazione si é svolta dal 16 luglio 2004 a maggio 2005.
Il ciclo di allevamento larvale del sarago pizzuto si é svolto dal 23 ottobre al 30 dicembre 2004, per un periodo di circa 2 mesi. A fine dicembre 2004, gli avannotti sono stati trasferiti, per la fase successiva di preingrasso e d'ingrasso, presso un impianto di allevamento intensivo di Civitavecchia (Nuova Azzurra). Nell'ultimo campionamento i pesci avevano raggiunto un peso medio di 7,2 gr.

Kingdom	ANIMALIA
Phylum	CHORDATA
Class	ACTINOPTERYGII
Order	PERCIFORMES
Family	SPARIDAE
Common Name/s	SHARPSNOUT SEA BREAM
Genus, species	*PUNTAZZO PUNTAZZO*
Species Authority	CETTI, 1777

1. MATERIALI E METODI

Nell'ambito del primo progetto DOCUP, realizzato nel 2003, sono stati installati n°2 impianti pilota a circuito chiuso, entrambi destinati all'allevamento larvale delle specie ittiche marine, nonché tutte le strutture destinate alla produzione dell'alimento vivo (settore fito-zooplancton). Il settore per la produzione delle alghe é stato installato al pianterreno della Torre (figura 2), mentre le rimanenti strutture sono collocate in un locale sottostante (figura 1).

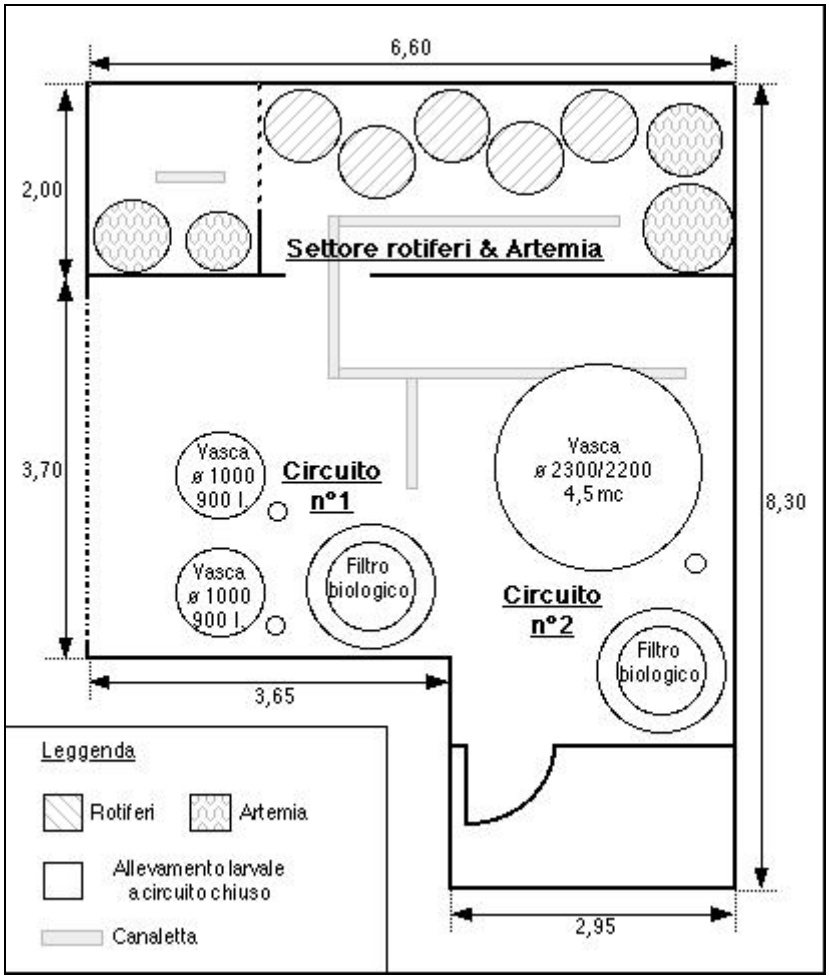


Fig.1 - Disposizione generale

Il prelievo di acqua marina avviene mediante una presa mobile, collegata alle linee di adduzione verso vari settori. Lo scarico avviene periodicamente dopo passaggio in appositi vasconi di stoccaggio e decantazione.

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

1.1 SETTORE PER LA PRODUZIONE DELLE ALGHE UNICELLULARI

Il settore per la produzione algale si compone di un locale per i "piccoli volumi" dove mantenere i ceppi e crescerli fino a volumi di coltura di 5-10 litri e di un locale adiacente dove sono stati collocati 16 supporti per sacchi di coltura di 200-300 litri (figura 2, 3).

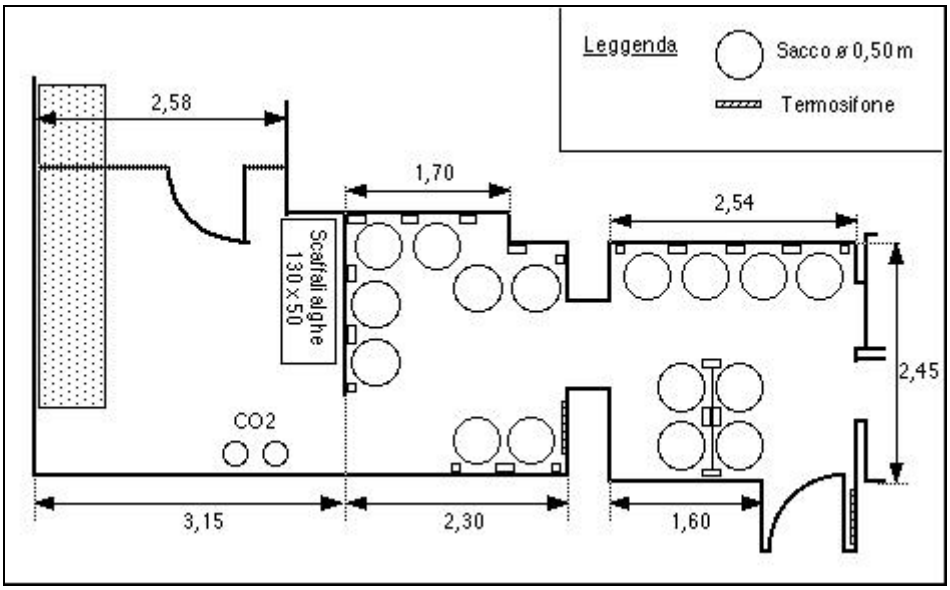


Fig.2 – Locale piccoli e grandi volumi algali

Il riempimento dei vari volumi é assicurato da una linea che porta l'acqua filtrata ad un micron (4 cartucce), dalle vasche del settore fito-zoo ubicato nel locale sottostante, al locale per i "piccoli volumi" ubicato al pianterreno della Torre. Una seconda linea consente, secondo un percorso inverso rispetto a quello precedente, di trasportare le alghe prodotte nel locale sottostante adibito all'allevamento larvale.
Tutti gli ambienti sono dotati di termoregolazione in modo da mantenere la temperatura costante su 20-22°C in qualsiasi periodo dell'anno. L'aria, dopo filtrazione ad un micron (3 cartucce), può essere addizionata di anidride carbonica.
L'illuminazione, fondamentale per i processi di fotosintesi, é assicurati da neon a "luce naturale".

1.2 SETTORE PER LA PRODUZIONE DEI ROTIFERI E DELL'ARTEMIA

Il settore fito-zooplancton, destinato alla produzione dell'alimento vivo (rotiferi ed Artemia), é ubicato in una dipendenza del locale sottostante (figura 4). L'ambienti é dotato di un impianto di termoregolazione indipendente in grado di mantenere una temperatura costante di 24-25°C. L'adduzione di acqua di mare é assicurata da una linea proveniente dalla presa a mare. Prima dell'emissione in vasca l'acqua é filtrata con passaggi successsivi in cartucce da 20, 10, 5 ed 1 micron. L'aria, dopo filtrazione ad un micron (3 cartucce), é distribuita a tutte le vasche. Un impianto indipendente fornisce ossigeno puro a tutte le vasche.
Per la coltura (ciclo di 3 giorni) e l'arricchimento (ciclo di 24 ore) dei rotiferi sono state previste 5 vasche tronco-coniche di 425 litri. Per la schiusa dell'Artemia (ciclo di 24 ore) sono previste 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 di 425 litri e l'altra di 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).

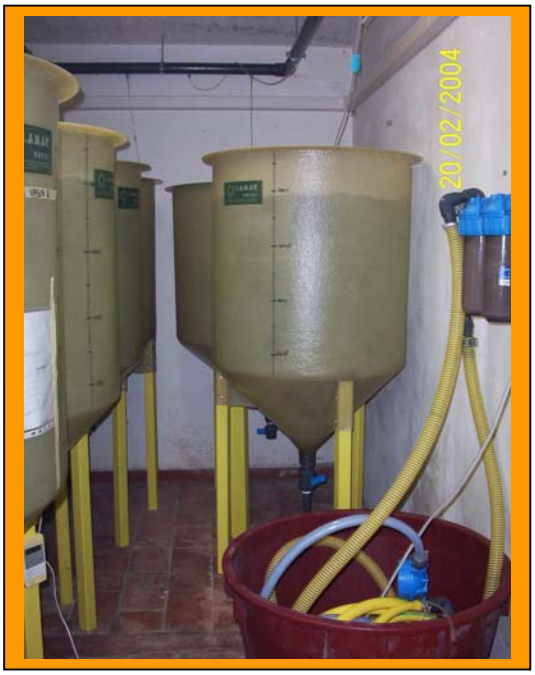


Fig.4 – Locale produzione Rotiferi e Artemia

1.3 ALLEVAMENTO LARVALE - CIRCUITO CHIUSO N°1

Il circuito chiuso n°1, ubicato nel locale sottostante la Torre (figura 5), é costituito da n°2 vasche tronco-coniche di 0,9 mc (vasche V1 e V2) collegate a circuito chiuso con una vasca di riserva di 1,2 mc, facente funzione di filtro biologico. Nell'ambito del progetto sull'allevamento del sarago pizzuto, il circuito non è stato adoperato.

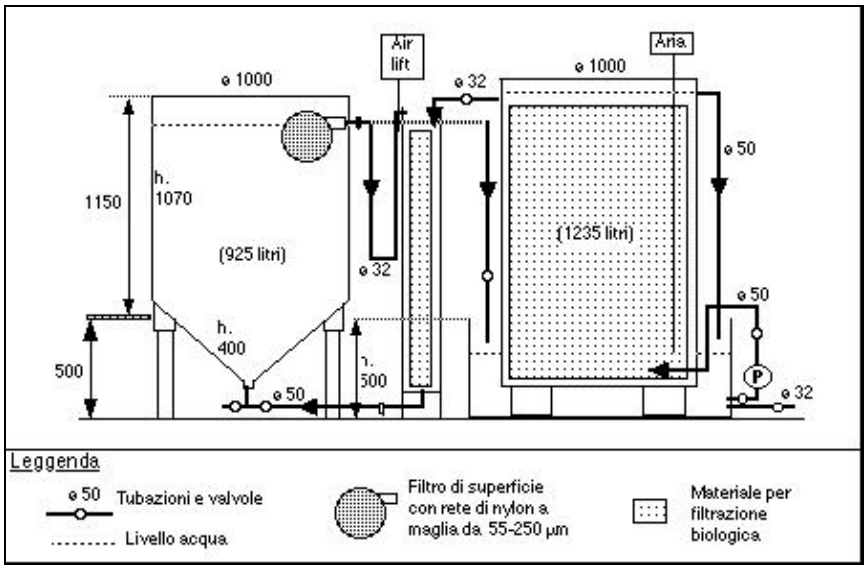


Fig.5 - Vasche da 1 mc circuito chiuso n°1

Le vasche di allevamento larvale, di forma tronco-conica, dotate di piedi di sostegno, hanno un metro di diametro interno, una parte cilindrica superiore alta 1 metro e un cono alto 0,4 metro. Il fondo e le pareti sono in vetroresina senza verniciatura (colore beige) (fig.6).
La circolazione idrica generale 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 é assicurato 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. La portata massima di ciascuno air-lift é di 2,5-3 litri/min (circolazione parziale), mentre la massima portata del circuito é di 1,4 litri/sec, ossia di circa 5 mc/ora (circolazione totale).

Fig.6 - Vasche allevamento larvale circuito chiuso n°1

1.4 ALLEVAMENTO LARVALE - CIRCUITO CHIUSO N°2

Il circuito chiuso n°2, ubicato nel locale sottostante la Torre (figura 7), é costituito da n°1 vasca circolare di 4 mc (vasca V3) collegata a circuito chiuso con una vasca di riserva di 1,2 mc, facente funzione di filtro biologico. Nell'ambito del progetto sull'allevamento del sarago pizzuto, la vasca V3 é stata adoperata per l'intero ciclo di allevamento larvale.

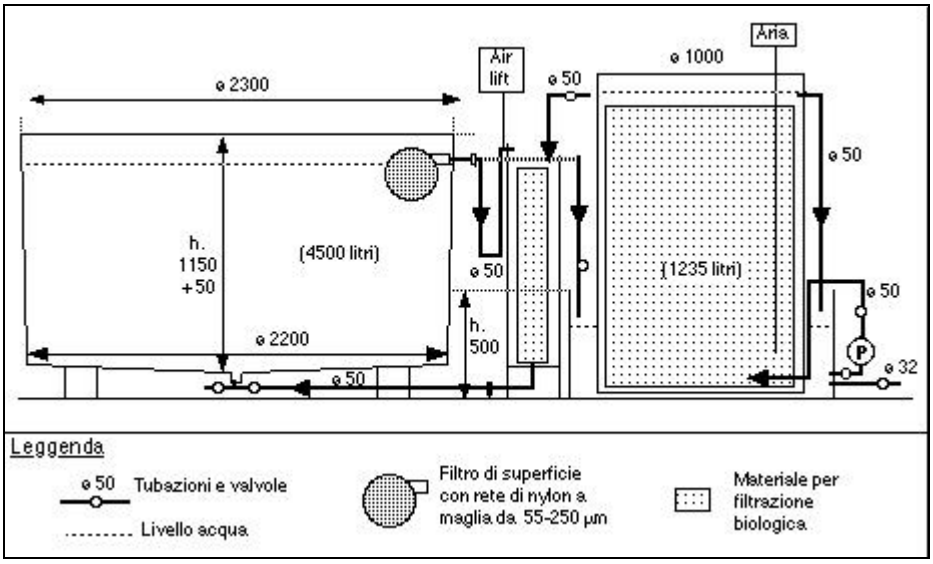


Fig.7 - Circuito chiuso e vasca utilizzati per l'allevamento larvale del pagro

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) (fig.8).
La circolazione idrica generale 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 é assicurato 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. La portata massima dell'air-lift é di circa 5 litri/min (circolazione parziale), mentre la massima portata del circuito é di 1,5 litri/sec, ossia di circa 5 mc/ora (circolazione totale).

Fig.8 – Vasca allevamento larvale circuito chiuso n°2

1.5 MODALITÀ DI GESTIONE DEI FILTRI BIOLOGICI

I filtri dei due circuiti hanno le stesse caratteristiche:

- volume filtrante (altezza 1,35 m) di 1,05 mc;
- materiale filtrante costituito da "Biosfere" con circa 1.000 mq/mc di superficie disponibile;
- portata massima di 1,4 l./sec, ossia filtrazione di 6,5 mc/h/mq con una velocità di passaggio di 1,8 mm/sec (filtrazione lenta).

Il principio di funzionamento del filtro, che vede la trasformazione dell'ammoniaca in nitriti e nitrati, a carico di specifiche popolazioni batteriche, é riassunto in figura 9. Per l'avvio completo del filtro, si deve considerare un periodo di 50-60 giorni con aggiunta giornaliera di NH4+, nonché un rinnovo totale dell'acqua, prima di utilizzare il circuito per un ciclo di allevamento larvale. Successivamente, in periodo di allevamento larvale, l'apporto di sostanze azotate, assicurato dal metabolismo larvale e dall'apporto alimentare, crescerà progressivamente con l'aumento della biomassa in vasca.

In regola generale, durante la fase di allevamento larvale, é fondamentale assicurarsi dei seguenti aspetti:

- funzionamento in continuo;
- rinnovo minimo giornaliero del 5-10% dell'acqua del circuito;
- corretto livello di ossigenazione dell'acqua (_ 5 mg/litro di O2);
- circolazione dell'acqua omogenea all'interno del filtro;
- materiale filtrante sempre immerso nell'acqua;
- corretto funzionamento del galleggiante di controllo della pompa.

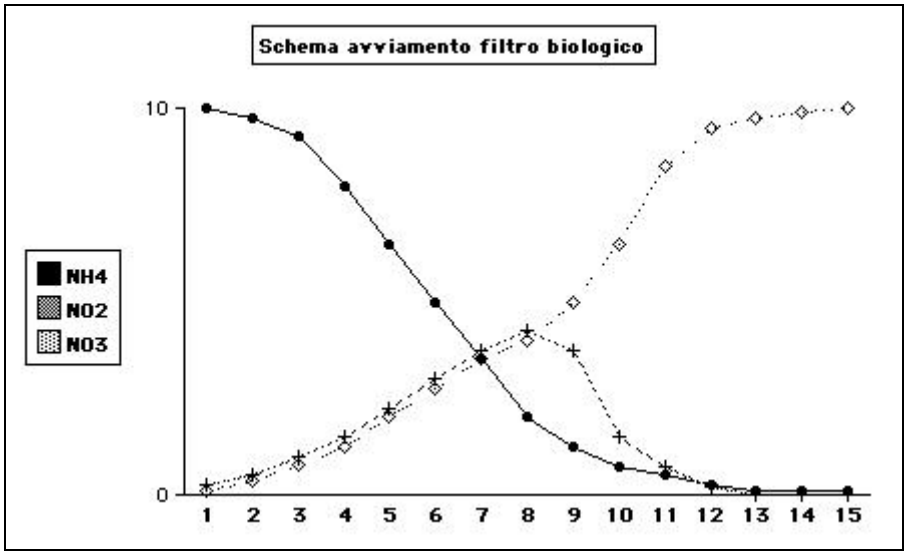


Fig.9 - Principio di funzionamento della filtrazione biologica

Nell'ambito del progetto sull'allevamento del sarago pizzuto, malgrado condizioni di avviamento del filtro nella norma, i valori di nitriti registrati hanno presentato una serie di picchi che, seppure inferiori rispetto al precedente ciclo (pagro), hanno condizionato il risultato finale. Sulla base delle cause ipotetiche del problema, si prospettano alcune modifiche in vista dei futuri cicli:

- prove di riduzione e/o eliminazione dell'aerazione;
- eliminazione di eventuali "vie preferenziali" mediante l'inserimento di una piastra da fondo;
- sostituzione delle "biosfere 1000" che potrebbero non essere adatte;
- incremento della velocità di filtrazione.

1.6 METODICHE DI COLTIVAZIONE DELLE ALGHE UNICELLULARI

L'Istituto dispone di 2 ceppi di alghe unicellulari, *Nannochloropsis sp.* e *Isochrysis sp.*, tra i più comunemente utilizzati nell'allevamento larvale delle specie ittiche marine: il primo risulta relativamente ricco in EPA (acido eicosapentenoico 20:5 n.3), mentre il secondo é piuttosto ricco in DHA (acido docosaesenoico 22:6 n3). Entrambi i ceppi, che risultano idonei sia per l'allevamento larvale in "acqua verdi", che per l'arricchimento dei rotiferi, sono stati acquistati presso il CCAP (GB). Inoltre, ad inizio settembre 2004, l'Istituto è venuto in possesso di un ceppo di *Tetraselmis sp*.
Nell'ambito del progetto sull'allevamento larvale del sarago pizzuto, sono stati utilizzati sia il ceppo *Nannochloropsis sp.* che, in misura minore, il ceppo *Tetraselmis sp*.

Aspetti fondamentali e aggiornamento dei protocolli

Si riportano di seguito, a prescindere dei ceppi, un riassunto dei principali protocolli applicati al mantenimento dei ceppi e ai cicli di produzione.

Condizioni di coltura

- acqua filtrata (limpida) e disinfettata (*), con salinità 25-28 ‰;
- temperatura costante di 20-21° C;
- aerazione variabile a seconda del volume di coltura;
- illuminazione continua con luce naturale;
- aggiunta del "medium" di coltura idoneo alla specie coltivata.

(*) I piccoli volumi sono sistematicamente autoclavati a 120°C per 20-30 minuti, mentre l'acqua dei sacchi e delle vasche é sottoposta a disinfezione con 0,10 cc/litro di soluzione commerciale di cloro al 14-18% e successiva neutralizzazione con 0,10 cc/litro di soluzione di tiosolfato al 20%.

Mantenimento dei ceppi e avvio del ciclo di produzione

Il mantenimento dei ceppi si svolge in provette da 10 cc, che vengono rinnovate ogni 20-30 giorni, con 3 repliche per ciascun ceppo. I cicli di produzione sono avviati mediante l'inoculo di un volume iniziale di 500 cc con 1 o 2 delle suddette provette. Le provette sono mantenute senza aerazione.

Cicli di produzione

I cicli di produzione comportano passaggi successivi nei seguenti volumi: beute iniziale da 500 cc, beute da 2 litri, beute da 5 litri e sacchi da 200-300 litri. Tempi e modalità di inoculo dipendono dai ceppi coltivati e dai medium adoperati (vedere allegato 2). Per entrambi i ceppi e in condizioni normali, l'intero ciclo richiede 50 giorni dall'inoculo iniziale all'ottenimento del primo sacco maturo di 200 litri. Ad eccezione dei sacchi sui quali vengono effettuate delle conte a fine ciclo (milioni di cellule/cc), il controllo delle colture avviene mediante valutazione visiva della crescita algale (densità e colore). In effetti, al fine di limitare al massimo i rischi di contaminazioni, é meglio evitare le conte nei volumi intermedi.

Produzioni di *Nannochloropsis sp.* nell'ambito del presente progetto

Le colture di *Nannochloropsis sp.* sono state effettuate con medium "f/2 modificato" (allegato 1) e sulla base dei risultati della standardizzazione (protocollo in allegato 2.)
Lo "start up" delle produzioni di *Nannochloropsis sp.* si é svolto tra fine agosto 2004 e inizio settembre 2004 con l'avvio di 3 cicli di produzione: i primi 2 da provette da 10cc (protocollo) ed il terzo da un sacco di 200 lt preesistente. I due cicli di produzione con inoculo iniziale da provette, hanno avuto una durata di 61 e 70 giorni, fino all'ottenimento del primo sacco da 200lt.
Le alghe dei 3 cicli, sono state utilizzate per l'aggiunta diretta in vasca di allevamento larvale (metodo detto delle "acque verdi" e/o per l'avvio di nuove colture di rotiferi.

Produzioni di *Tetraselmis sp*. nell'ambito del presente progetto

Le colture di *Tetraselmis_sp.* sono state effettuate con medium "f/2 modificato" (allegato 1). Il ciclo di produzione, avviato da un sacco di 200lt inoculato con 20lt di coltura algale proveniente dall'avannotteria di Civitavecchia, ha consentito di disporre, per tutta la durata del ciclo di allevamento larvale del sarago pizzuto, di alcuni sacchi da 200lt. In due occasioni, l'aggiunta di alghe per le "acque verdi" è stata condotta con alghe del ceppo di *Tetraselmis_sp.*

1.7 METODICHE DI COLTURA ED ARRICCHIMENTO DEI ROTIFERI

I rotiferi (fig.10) sono organismi mobili di 50-250 micron (nematelminti), che si riproducono in modo partenogenetico se mantenuti in condizioni favorevoli. Sono organismi filtratori che possono essere alimentati con alghe unicellulari, lievito o idonee diete artificiali. La loro produzione, oltre al "mantenimento dei ceppi ", comporta una fase detta di "coltura", con lo scopo di raggiungere alte densità (800-1.200 rotiferi/cc) a prescindere dalla qualità nutritiva per le larve, ed una fase detta di "arricchimento" volta ad incorporare, nei rotiferi precedentemente allevati, i nutrienti destinati a coprire i fabbisogni larvali.

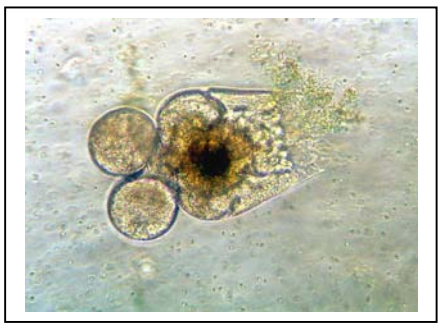


Fig.10 – *Brachionus plicatilis* (Rotifero) con uova

L'Istituto dispone dei 2 ceppi di rotiferi, *Brachionus rotundiformis* e *Brachionus plicatilis* , il primo proveniente da un'altra avannotteria e il secondo acquistato presso il CCAP (GB). Entrambi i ceppi sono stati utilizzati nell'ambito del ciclo sperimentale sul sarago pizzuto.

Aspetti fondamentali e aggiornamento dei protocolli

Si riportano di seguito, a prescindere dei ceppi, un riassunto dei principali protocolli applicati al mantenimento dei ceppi e ai cicli di produzione.

Condizioni di coltura e di arricchimento

- acqua filtrata (limpida) e disinfettata (*), con salinità 25-35 ‰;
- temperatura costante di 24-26° C;
- aerazione variabile (**) e ossigeno mantenuto sopra 6 ppm;
- alimentazione con alghe, lievito o diete artificiali.

(*) I piccoli volumi sono sistematicamente autoclavati a 120°C per 20-30 minuti, mentre l'acqua dei sacchi e delle vasche é sottoposta a disinfezione con 0,10 cc/litro di soluzione commerciale di cloro al 14-18% e successiva neutralizzazione con 0,10 cc/litro di soluzione di tiosolfato al 20%.
(**) Tutte le vasche sono provviste di un punto centrale per l'erogazione di ossigeno e di 4 punti laterali per l'erogazione di aria. In superficie, vengono posizionate 2 "trappole di scotch bright" di circa 20 x 20 cm ciascuna.

Mantenimento dei ceppi e avvio del ciclo di produzione

Nei periodi in cui i rotiferi non servono, il mantenimento si svolge in beute di 500 cc, a 20-22° C e senza aerazione. Il rinnovo dei volumi comporta l'introduzione di 200 cc della coltura precedente (50-100 rotiferi/cc), di 100 cc di coltura algale di *Nannochloropsis sp*. e di 200 cc di acqua di mare filtrata e disinfettata. I volumi sono rinnovati ogni 20-30 giorni, con 2 o 3 repliche per ciascun ceppo. Il rilancio di un ciclo di produzione, a partire di un volume di mantenimento, comporta l'introduzione di 200 cc di coltura di mantenimento (50-100 rotiferi/cc) e di 300 cc di coltura algale di *Nannochloropsis sp.*

Cicli di produzione su alghe

I cicli di produzione comportano passaggi successivi nei seguenti volumi: beute iniziale da 500 cc, beute da 2 litri, beute da 5 litri, pallone da 10 litri e sacchi da 200-300 litri, con trasferimento dell'intero volume precedente in quello successivo e il completamento con coltura algale di Nannochloropsis sp. Per entrambi i ceppi e in condizioni normali, l'intero ciclo richiede 30-40 giorni dall'inoculo iniziale all'ottenimento di un sacco maturo di 200 litri.

Produzione su lievito

Qualora sia necessario mantenere le colture in uno "stato attivo" (riproduzione partenogenetica effettiva), ma con concentrazione inferiori a 300-500 rotiferi/cc, si opera in volumi da 10 a 100 litri, con somministrazione esclusiva di lievito (2 volte al giorno) con 0,8 g di lievito al giorno e per milione di rotiferi per il ceppo *B. rotundiformis* e 1,0-1,5 g di lievito al giorno e per milione di rotiferi per il ceppo *B. plicatilis* .

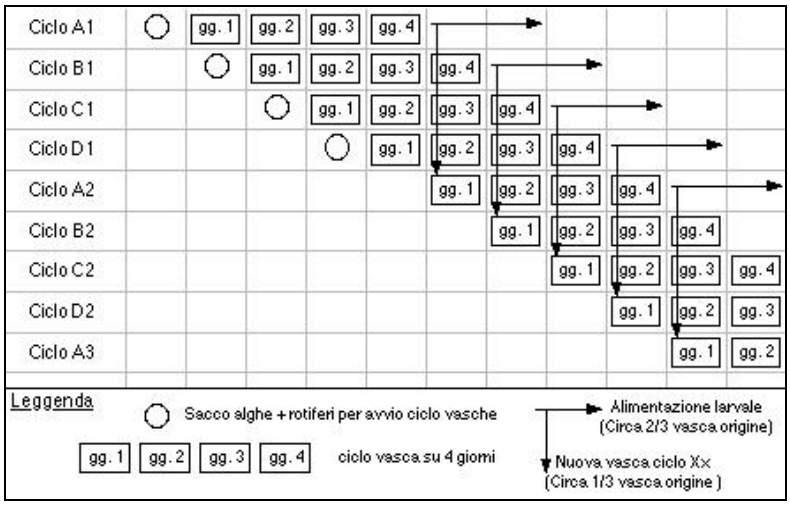


Fig.11 - Schema di gestione delle vasche di coltura e di arricchimento dei rotiferi

Produzione ed arricchimento in vasca

Da ogni sacco maturo, ottenuto come descritto precedentemente, si ottiene una vasca iniziale. Poi, al quarto giorno di produzione e dopo arricchimento, i rotiferi vengono in parte utilizzati per l'alimentazione larvale (60-70%) e in parte per l'avvio della vasca successiva. Da una vasca iniziale si potrà ripetere tale operazione fino a 10-12 volte, poi si dovrà ripartire da una vasca iniziale derivata dall'inoculo un sacco algale. Alternando le vasche di produzione seconda la logica illustrata in figura 11 si garantisce la continua disponibilità di rotiferi per l'alimentazione larvale. Coltura ed arricchimento dei rotiferi sono stati eseguiti con diete artificiali INVE.

Analisi indicativa (INVE)			
Proteine	min. 35 %	Vit.A	500.000 IU/kg
Lipidi	min. 15 %	Vit.D	350.000 IU/kg
Ceneri	max. 13 %	Vit.E	3.600 IU/kg
Umidità	5 %	Vit.C	3.000 IU/kg
n-3 HUFA		min. 38 mg/g peso secco	
DHA/EPA		min. 2	

Tab.1 - Composizione del "Culture Selco" (INVE)

Analisi indicativa (INVE)			
Proteine	min. 28 %	Vit.A	1.500.000 IU/kg
Lipidi	min. 29 %	Vit.D3	150.000 IU/kg
Ceneri	max. 13 %	Vit.E	7.200 IU/kg
Umidità	5 %	Vit.C	20.000 IU/kg
n-3 HUFA		min. 75 mg/g peso secco	
DHA/EPA		min. 2	

Tab.2 - Composizione del "DHA Protein Selco" (INVE)

Somministrazione da giorno 1 a giorno 3, con dose giornaliera di "Culture Selco", determinata sulla base della densità di rotiferi in vasca (mediamente di 240 g/mc):

- ore 09.00: 25 % della dose giornaliera di "Culture Selco";
- ore 13.30: dose fissa di 100 g/mc di "DHA Protein Selco";
- ore 17.30: 25 % della dose giornaliera di "Culture Selco";
- ore 22.00: 50 % della dose giornaliera di "Culture Selco".

Variante di arricchimento per la mattina:

- ore 22.00: dose fissa di 125 g/mc di "DHA Protein Selco"

Variante arricchimento per il pomeriggio:

- ore 09.00: dose fissa di 62,5 g/mc di "DHA Protein Selco";
- ore 13.30: dose fissa di 62,5 g/mc di "DHA Protein Selco".

Produzioni di *Brachionus rotundiformis* nell'ambito del presente progetto

Dopo lo "start up" delle produzioni di *B. rotundiformis* ad inizio settembre 2004, il 13 ottobre, é stato avviato un ciclo di produzione in vasca. I rotiferi prodotti, più piccoli rispetto all'altro ceppo, sono stati somministrati nei primi 2 giorni di alimentazione larvale. Successivamente l'alimentazione é stata condotta solo con *B. plicatilis.*

Vasca Iniziale	Data avvio	n° vasche successive	Massima concentrazione	Osservazioni
F	13 ottobre	n°3	2.268	Utilizzo 100% per le larve

Produzioni di *Brachionus plicatilis* nell'ambito del presente progetto

Successivamente allo "start up" delle produzioni di *B. plicatilis.* svoltosi ad inizio settembre 2004, sono stati avviati quattro cicli di produzione in vasca.

Vasca iniziale	Data avvio	n° vasche successive	Massima concentrazione	Osservazioni
B	03 settembre	n° 09	1.600	Sostituito nuovo ciclo
A	11 ottobre	n° 10	1.100	Eliminato (fine ciclo larve)
B	11 ottobre	n° 02	900	Perso (residui cloro)
E	11 ottobre	n° 02	1.200	Perso (residui cloro)
E	30 ottobre	n° 01	700	Utilizzo 100% per larve
C	08 novembre	n° 01	650	Utilizzo 100% per larve

Il primo ciclo (vasca B del 03 settembre), avviato nell'ipotesi di una semina precoce, é stato eliminato e sostituito da nuovi cicli. Successivamente, tutta la produzione é stata assicurata da un unico ciclo (vasca A del 11 ottobre), mentre 2 cicli sono stati persi per errori di dosaggio del cloro per la disinfezione dell'acqua. In un secondo tempo, per ogni evenienza, sono stati avviati altri 2 cicli di produzione che, in considerazione della minore crescita rispetto al suddetto ciclo, sono stati somministrati in totalità alle larve.
L'andamento dei vari cicli di produzione ha evidenziato una minore variabilità rispetto al passato (standardizzazione e ciclo larvale pagro), anche se i problemi di inquinamento da ciliati e di qualità dell'acqua permangono.

1.8 METODICHE DI SCHIUSA ED ARRICCHIMENTO DELL'ARTEMIA

L'*Artemia salina* é un piccolo crostacei che viene somministrato durante l'allevamento larvale delle di specie ittiche marine, sia allo stadio di nauplii subito dopo la schiusa, che allo stadio metanauplii dopo arricchimento (figura 13).

Le artemie si ottengono da cisti (forme di resistenza) disponibili in commercio.

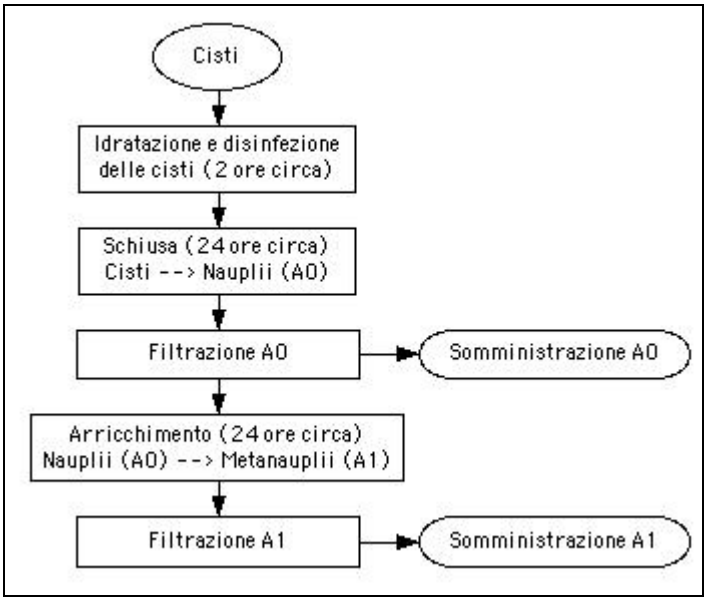


Fig.13 - Schema di utilizzo dell'artemia

Allo stadio nauplii, sono state somministrate artemie "AF-430" (INVE), particolarmente piccole (± 430 µm) e molto ricche in acidi grassi. Allo stadio metanauplii, sono state somministrate artemie "EG" (INVE), di ± 490 µm ed esclusivamente destinate all'arricchimento.

Analisi indicativa (INVE)	
Proteine	54 %
Lipidi	11 %
Ceneri	8 %
Umidità	8 %
n-3 HUFA	15 mg/g peso secco
(Per utilizzo senza arricchimento)	

Tab.3 - Composizione Artemia "AF 430" (INVE)

Analisi indicativa (INVE)	
Proteine	54 %
Lipidi	12 %
Ceneri	8 %
Umidità	8 %

Tab.4 - Composizione Artemia "EG" (INVE)

Circa 6 ore dopo la schiusa, i nauplii cominciano ad alimentarsi e possono di conseguenza essere arricchiti per diventare il vettore di quello che si vuole somministrare alle larve in base ai loro fabbisogni.

Aspetti fondamentali e aggiornamento dei protocolli

Si riporta di seguito un riassunto dei principali protocolli applicati alla schiusa e all'arricchimento dell'Artemia.

Idratazione e schiusa

Le cisti vengono messe a bagno per 1-2 ore, in acqua dolce addizionata di 0,1-0,2 cc/litro di soluzione commerciale di cloro al 14-18%, in presenza di aerazione e alla densità di circa 150 g/litro. A fine idratazione, si lavano molto bene prima di procedere. La schiusa, della durata di 24 ore, avviene nelle seguenti condizioni:

- acqua filtrata (limpida) e disinfettata (*), con salinità 30-35 ‰;
- temperatura costante di 30° C;
- forte aerazione e/o ossigenazione (**);
- 1,5 g di cisti per litro (cisti precedentemente idratate e disinfettate).

(*) L'acqua delle vasche é sottoposta a disinfezione con 0,10 cc/litro di soluzione commerciale di cloro al 14-18% e successiva neutralizzazione con 0,10 cc/litro di soluzione di tiosolfato al 20%.
(**) Tutte le vasche sono provviste di un punto centrale per l'erogazione di ossigeno e di 2 punti laterali per l'erogazione di aria. Le pietre porose sono posizionate a 15 cm del fondo del cono, per consentire il deposito dei vari residui.

Arricchimento

L'arricchimento, della durata di 6-12 ore, avviene nelle medesime condizioni della schiusa e si svolge con circa 250.000 nauplii per litro. Provenienti da un unico lotto di cisti, le artemie filtrate e messe in arricchimento dopo la schiusa, sono sottoposte ad un arricchimento 6 ore (200 g/mc di "A1 DHA Selco") per la somministrazione della mattina e ad un arricchimento di 12 ore (200+100 g/mc di "A1 DHA Selco") per la somministrazione del pomeriggio.

Analisi indicativa (INVE)			
Lipidi	67 %	Vit.A	1.500.000 IU/kg
Ceneri	max. 2 %	Vit.D	3150.000 IU/kg
Umidità	30 %	Vit.E	3.600 IU/kg
		Vit.C	800 IU/kg
n-3 HUFA	min. 200 mg/g peso secco		
DHA/EPA	3.0		

Tab.5 - Composizione "A1 DHA Selco" (INVE)

1.9 DIETE ARTIFICIALI

Lo svezzamento é stato condotto con "Proton" (INVE) di granulometria 150-300 µm e 200-400 µm (fig.14).

Analisi indicativa (INVE)	
Proteine 58 % Lipidi 14 % Ceneri 12 % N.F.E 9 % Umidità 8 %	Vit.A 30.000 IU/kg Vit.D 32.500 IU/kg Vit.E 700 IU/kg Vit.C 2.000 IU/kg
n-3 HUFA DHA/EPA	30 mg/g peso secco 2.0

Tab.6 - Composizione del "Proton" (INVE)

1.10 MODALITÀ DI MONITORAGGIO DEL CICLO DI ALLEVAMENTO LARVALE

Le condizioni in vasca sono state monitorate in continuo, con rilevamento giornaliero dei seguenti parametri:

- temperatura (media giornaliera di 2 rilevamenti) (°C);
- ossigeno disciolto (media giornaliera di 2 rilevamenti) (mg/l.);
- luce;
- aerazione;
- tipo di circolazione a circuito chiuso (parziale o totale);
- rinnovo di acqua nel circuito (% volume totale giornaliero).
- nitriti (mg/l NO2-) in vasca di allevamento larvale (2 rilevamenti al giorno);
- nitrati (mg/l NO3--) nella ripresa del circuito chiuso (2 rilevamenti al giorno).

I suddetti parametri e tutte le variazioni apportate nella gestione della vasca, sono riportati in allegato 3. Oltre al rilevamento dei vari parametri ambientali, sono stati registrati i principali interventi in vasca e sono stati eseguiti una serie di controlli periodici come ricapitolato di seguito:

- controllo e registrazione giornaliera della mortalità (effettiva e stimata);
- da giorno 7 a giorno 20, controllo giornaliero della percentuale di insufflazione della vescica natatoria;
- dall'inizio dell'alimentazione a giorno 30, controllo giornaliero della percentuale di larve alimentate (pancia piena o semi-piena);
- controllo periodico del comportamento in vasca e della vitalità larvale;
- registrazione delle operazione di pulizia del fondo vasca (sifonamento);
- registrazione delle operazioni di pulizia e sostituzione dei filtri di superficie;
- registrazione delle operazioni relative alla gestione degli schiumatori.

Monitoraggio della mortalità

Il monitoraggio delle mortalità é avvenuto con diverse modalità a seconda delle dimensioni e dello sviluppo delle larve. Nei primi giorni, le larve essendo molto piccole, scarsamente pigmentate e distribuite in modo abbastanza uniforme in tutta la vasca, risulta difficile sifonare il fondo senza prelevare numerosi soggetti vivi. Inoltre, considerate le dimensioni della vasca e la pendenza del fondo, le operazioni di spurgo interessano solo l'area in prossimità dello scarico e non danno indicazioni affidabili sull'effettiva mortalità. In tale contesto, sulla base di stime visive e dell'esperienza, si possono solo applicare, per ri-calcolare la popolazione in vasca, delle percentuali di mortalità stimate. Successivamente, quando le larve tendono a raggrupparsi in superficie, si può invece procedere quotidianamente allo spurgo, alla pulizia del fondo (sifonamento) e alla stima di eventuali mortalità a galla. Sulla base delle stime iniziali e dei rilevamenti successivi, si procede poi al calcolo delle mortalità relative e ad una stima della popolazione in vasca, in modo da quantificare eventuali episodi di mortalità e da valutare la risposta alimentare.

Biometrie e fotografie

Con cadenza settimanale venivano effettuati rilievi biometrici (Fig.15) sia sulle larve che sugli avannotti. Le larve venivano fotografate tramite camera digitale collegata a microscopio ottico o a stereo-microscopio in relazione alla grandezza dei soggetti e successivamente attraverso un apposito software (IM 500) misurate. Dopo il trasferimento nel impianto di acquacoltura intensiva di Civitavecchia (Roma), le misurazioni sono state effettuate con metro lineare in occasione di sopralluoghi effettuati con cadenza trimestrale.

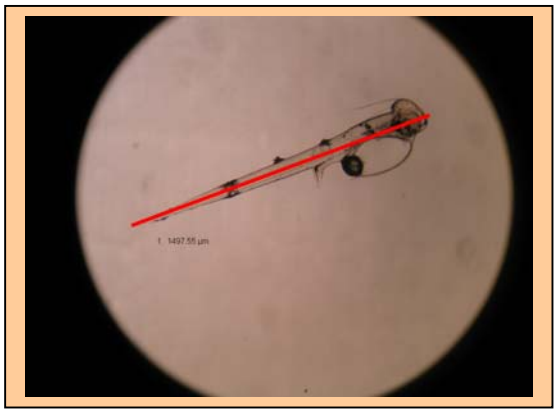


Fig.15 – Rilievi biometrici

2. RISULTATI e DISCUSSIONE

A prescindere dalla specie ittica marina oggetto di sperimentazione, lo svolgimento del ciclo di allevamento larvale segue una logica sempre abbastanza simile, basata sulla dieta somministrata e sulla capacità delle larve di assumerla:

1)Periodo di incubazione (2-4 giorni), che si conclude con la schiusa delle uova, e periodo di riassorbimento del sacco vitellino che ha una durata di 4-8 giorni dopo la schiusa.

2)Periodo di alimentazione con rotiferi, che si protrae per 20-30 giorni, dall'inizio dell'alimentazione esogena (apertura della bocca), fino a giorno 30-35 dopo la schiusa. Durante tale periodo, si verifica solitamente l'insufflazione della vescica natatoria (periodo di 1-2 settimane da giorno 6-8 in poi).

3)Periodo di alimentazione con artemia salina, che inizia 8-12 giorni prima della sospensione dei rotiferi e che si conclude alla fine dello svezzamento. Le artemie sono somministrate allo stadio nauplii nei primi 5-10 giorni di alimentazione e allo stadio di metanauplii arricchiti nel periodo successivo.

4)Periodo di svezzamento con somministrazione di mangimi sbriciolati in proporzioni crescenti, con progressiva sostituzione dell'artemia salina.

2.1 SEMINA, SCHIUSA E RIASSORBIMENTO DEL SACCO VITELLINO FINO A GIORNO 2-4

La semina é avvenuta direttamente in V3.

Origine delle uova

Le uova sono state fornite dalla Panittica Pugliese (Azienda privata). I riproduttori, stabulati preso il loro impianto ubicato in provincia di Brindisi, erano stati mantenuti in condizioni naturali di temperatura e di fotoperiodo. La deposizione é avvenuta naturalmente senza procedere a stimolazione ormonale.
Nell'ambito del presente ciclo sperimentale, sono stati utilizzati due lotti di uova provenienti dallo stesso gruppo di riproduttori, ma da 2 diverse deposizioni rispettivamente del 22 ottobre e del 24 ottobre 2004. Il primo lotto, proveniente dalla deposizione del 22 ottobre 2004, era costituito da 180.000 uova. Il secondo lotto, proveniente dalla deposizione del 24 ottobre 2004, era costituito da 120.000 uova.

Le uova di entrambi i lotti sono schiuse presso la Panittica Pugliese. La temperatura all'emissione e alla schiusa delle uova era compresa tra 20,5 e 20,9°C:

- schiusa del Lotto A il 24 ottobre 2004: giorno 0
- schiusa del Lotto B il 26 ottobre 2004: giorno 0

Semina (giorno 0/2)

Il trasporto ha avuto luogo nel pomeriggio del 26 ottobre 2004. I due contenitori con le larve sono stati caricati su un automezzo con impianto ad aria condizionata e consegnati presso l'impianti di Torre Cerrano in serata (ore 18.00). All'arrivo, la temperatura media nei contenitori era di 20,2°C.

La semina ha avuto luogo la sera del 26 ottobre 2004, direttamente nella Vasca 3 (4,5 mc). Prima della semina, i contenitori, ancora chiusi, sono stati immersi nell'acqua della vasca di destinazione affinché le temperature interni ed esterni si possano equilibrare. Raggiunta la temperatura di 19,6°C i contenitori sono stati aperti e le larve sono state liberate.
Disponendo di una unica vasca, i lotti delle 2 deposizioni sono stati uniti. Nella presente relazione e nei documenti allegati, l'età delle larve é indicata con due numeri relativi all'età di ciascun lotto (A e B) o con l'età media dei due lotti.
Da un controllo eseguito immediatamente dopo la semina, risultavano larve con la bocca chiusa e con delle riserve vitelline ancora abbondanti (lotto B), nonché larve con la bocca aperta, ma non funzionale, e con riserve vitelline ridotte al globulo lipidico (lotto A).

Considerando una percentuale di schiusa dell'80 % circa, applicata a 300.000 uova raccolte, si stima un numero iniziale di 240.000 larve a giorno 1 (giorno 0/2).

Riassorbimento del sacco vitellino (da giorno 0/2 a giorno 1/3)

Durante la fase iniziale di riassorbimento del sacco vitellino, le condizioni in vasca sono state le seguenti:
- temperatura in vasca nell'intervallo 20,0±0,3 °C;
- filtro di superficie con rete da 55 µm;
- ri-circolo parziale, solo attraverso il filtro biologico piccolo (air-lift);
- ricambio in vasca regolato al minimo (5 litri / min);
- punto di aerazione centrale, senza pietra porosa;
- luce spenta.

Il comportamento larvale e la differenza di età tra i due lotti ha reso impossibile stimare I la densità larvale in vasca, in quanto la distribuzione delle larve non era omogenea. Si é dunque proceduto ad una stima visiva, applicando, dopo trasporto e semina, una mortalità stimata pari a 40.000 larve (16,7%). Ne deriva a giorno 2 (giorno 1/3) una stima di 200.000 larve.

2.2 PERIODO GIORNO 3 (2-4) - GIORNO 30 (29-31)

Densità larvale iniziale

A giorni 2/4, dopo una stima pari ad altri 10.000 morti in corrispondenza con il primo giorno di alimentazione (lotto A), si stima una densità larvale in vasca pari a circa 42 larve per litro (190.000 soggetti).

Condizioni in vasca

Tutte le variazioni sono riassunte in allegato 5.
All'inizio dell'alimentazione, le condizioni in vasca erano le seguenti:
- temperatura in vasca di 20,5±0,2°C;
- filtro di superficie con rete da 55 µm di giorno e filtro da 100 µm di notte;
- ricambio in vasca regolato al minimo (5 litri/min));
- n°3 punti di aerazione senza pietra porosa, di cui uno centrale e due laterali;
- ascensione della luce in corrispondenza con la prima somministrazione di alghe e rotiferi.

Nel periodo da giorno 3 a giorno 30, sono quindi intervenuti una serie di variazioni:
- l'aerazione ed il ricambio idrico sono stati progressivamente incrementati;
- i rinnovi di acqua nel circuito sono stati progressivamente aumentati;
- da giorno 4, si é proceduto all'accensione del neon sopra la vasca, con 13 ore di luce (09.00 - 22.00) e 11 ore di buio (22.00 - 09.00);
- da giorno 3 a giorno 15, la luce é stata attenuata mediante il posizionamento di un telo ombreggiante tra il neon e la vasca. Il telo é stato poi rimesso a giorno 24.

Nel periodo considerato, si sono verificati due picchi di nitriti con concentrazioni medie superiori o uguali a 0,05 mg/l NO_2^-: il primo da giorno 6 a giorno 13 ed il secondo da giorno 19 a giorno 33. Per abbassare le concentrazioni di nitriti, si é provveduto a frequenti rinnovi dell'acqua nel circuito nelle proporzioni riportate in allegato 5 e riassunte in figura 16 (% di rinnovo giornaliero).

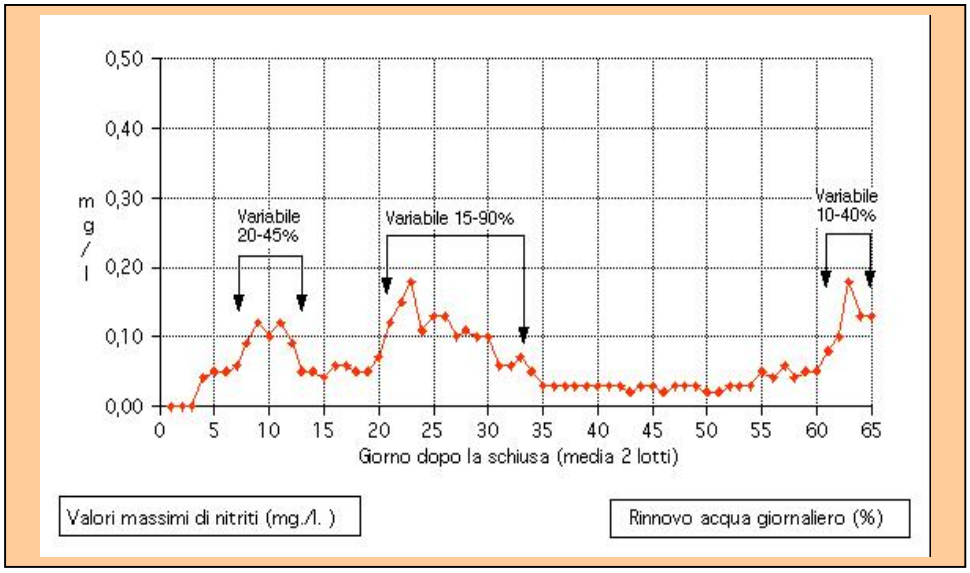


Fig.16 - Grafico nitriti e rinnovi acqua giornalieri

Il primo picco, da giorno 6 a giorno 13, é stato caratterizzato da rinnovi giornalieri del 20-45 % del volume circolante e da concentrazioni di nitriti comprese nell'intervallo 0,05-0,12 mg/l. Il secondo picco, da giorno 19 a giorno 33, é stato caratterizzato da rinnovi giornalieri maggiori (15-90 % del volume circolante) e da concentrazioni di nitriti nell'intervallo 0,05-0,18 mg/l.

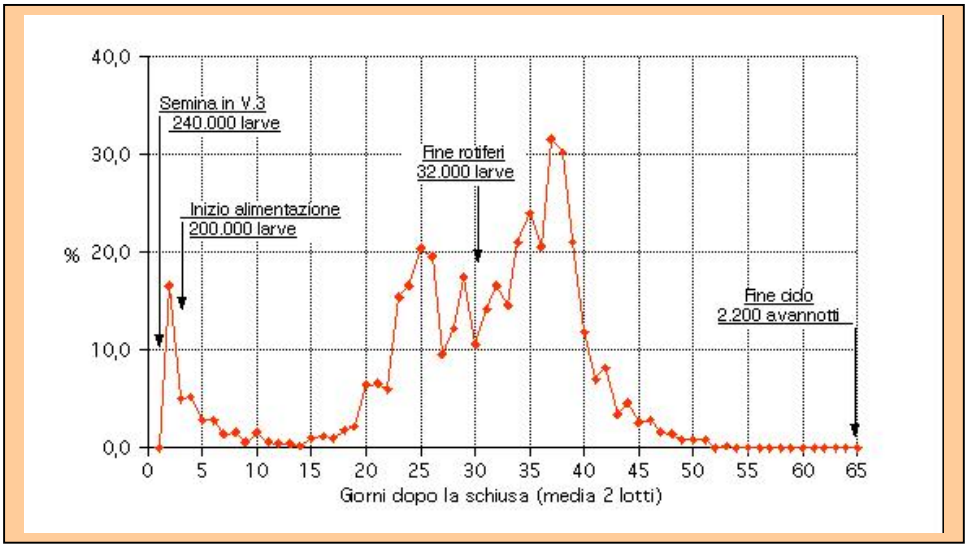


Fig. 17 - Curva delle mortalità relative

Mortalità stimate e registrate

I dati di mortalità e le relative stime, monitorati ed analizzati come descritto al punto 1 della presente relazione, sono riportati in allegato 6 e riassunti in figura 17.

Partendo da una popolazione a giorno 3 di 190.000 larve (42 larve/litro) e applicando le seguenti stime di mortalità:

- 5,3 % di mortalità a giorno 4, cioè al 2° giorno di alimentazione (lotto A);
- 2,8-2,9 % al 3° e 4° giorno di alimentazione (giorno 5 e giorno 6) (lotti A e B);
- 1,5-1,6 % al 5° e 6° giorno di alimentazione (giorno 7 e giorno 8) (lotti A e B).

risulta una popolazione in vasca a giorno 8 di circa 165.000 larve.

Successivamente, da giorno 8 a giorno 30, sulla base dei rilevamenti dopo la pulizia a fondo vasca (sifonamento) e delle stime applicate, si evidenzia una lieve mortalità a giorno 10 (1.700 morti a fondo vasca) in corrispondenza del primo picco di nitriti (giorno 6-13) ed un periodo di mortalità più prolungato, da giorno 20 a giorno 44, in corrispondenza del secondo picco di nitriti (giorno 19-33). Quest'ultimo periodo é stato caratterizzato dalla presenza di numerose larve che non si alimentavano e che presentavano un evidente stato di iper-insufflazione della vescica natatoria.

A giorni 30 (giorno 29/31) si stima una densità larvale in vasca pari a circa 7 larve per litro (32.000 soggetti).

Modalità di somministrazione delle alghe

Il presente ciclo sperimentale é stato condotto con la tecnica dette delle "acque verdi". A giorno 3 (28 ottobre), successivamente all'apertura della bocca delle larve del lotto A, si é provveduto all'ascensione della luce, alla prima aggiunta di alghe e alla prima somministrazione di rotiferi (fine mattinata).
La tecnica delle "acqua verdi" é stata prescelta per i vari vantaggi che presenta:

- un'attenuazione dell'intensità luminosa;
- lo sviluppo di una flora batterica specifica, 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.

Da giorno 03 a giorno 09, le alghe sono state aggiunte in vasca, alle ore 09.00 della mattina, immediatamente dopo l'ascensione della luce e prima dell'inizio di somministrazione dei rotiferi. L'aggiunta giornaliera, di circa 80-100 litri di coltura matura di *Nannochloropsis sp.* (25-35 milioni di cellule/cc), era equivalente ad una concentrazione in vasca di allevamento larvale di 500.000 cellule algali/cc. Nel periodo successivo, da giorno 10 a giorno 30, la concentrazione algale é stata mantenuta su una media di 400.000 cellule algali/cc. In 2 occasioni (giorno 15 e giorno 22), l'aggiunta di alghe é stata fatta con concentrazioni di 15.000-25.000 cellule per cc di *Tetraselmis sp.*, in modo da ottenere una colorazione identica a quella normalmente raggiunta con l'aggiunta di 400-500.000 cellule/cc di *Nannochloropsis sp.*.

Modalità di somministrazione dei rotiferi

Da giorno 3 a giorno 30, i rotiferi sono stati somministrati tutti giorni, dalle 09.00 alle 21.00, mantenendo una concentrazione di prede in vasca tra 5 e 7 rotiferi/cc. I rotiferi arricchiti per la mattina erano filtrati alle 09.00 e disponibili fino alle 14.00 (5 ore), mentre quelli per il pomeriggio erano filtrati alle 15.00 e disponibili fino alle 21.00 (6 ore). Dopo la prima somministrazione della mattina (ore 09.00) e del pomeriggio (ore 15.00), la concentrazione di rotiferi in vasca era mantenuta costante, mediante controlli nel numero rimasto in vasca e successiva integrazione quando necessario (controlli ogni 2 ore).

I quantitativi giornalieri somministrati sono riassunti nella tabella sottostante.

Periodo	**Rotiferi somministrati** (milioni/giorno)	**Rimanenza media alle ore 09.00** (n/cc)	**Osservazioni**
Giorno 3-4	21	- /12,0	Alimentazione solo larve lotto A
Giorno 5 - Giorno 9	26	5.2	
Giorno 10 - Giorno 14	65	0.4	
Giorno 15 - Giorno 19	58	0.0	
Giorno 20 - Giorno 24	58	0.2	Mortalità 10%/gg - A0 da gg.21
Giorno 25 - Giorno 30	49	0.6	Mortalità 15%/gg - A0

Tab.8 - Rotiferi somministrati

Per i primi due giorni, l'alimentazione che ha avuto inizio dal giorno 3, ha interessato solo le larve del lotto A. Da un controllo eseguito alla sera del primo giorno di somministrazione (giorno 2-4), risultavano larve con la bocca ancora chiusa e con riserve vitelline evidenti (lotto B) e larve con la bocca aperta e funzionale (lotto A), di cui 30% a pancia piena, 35% a pancia semi-piena e 35% a pancia vuota. Il giorno successivo (giorno 3-5), risultavano larve con la bocca appena aperta e non ancora funzionale (lotto B) e larve con la bocca aperta e funzionale (lotto A), di cui 69% a pancia piena, 25% a pancia semi-piena e 6% a pancia vuota.

Fino a giorno 8, la bassa densità larvale (35-40 larve / litro) e la necessità di mantenere comunque una densità di prede di almeno 5-7 rotiferi/cc, hanno determinato la permanenza in vasca, prima della somministrazione della mattina, di rotiferi "vecchi" (arricchimento del giorno precedente), con un minore livello qualitativo delle prede disponibili, rispetto alla somministrazione di rotiferi appena arricchiti. Successivamente, l'aumento dei consumi da un lato e l'incremento dei ricambi notturni dall'altro, hanno consentito di evitare tale problematica.

Da giorno 10 a giorno 20 i quantitativi somministrati sono rimasti costanti e nella norma. Successivamente, tali quantitativi sono diminuiti, sia a causa delle mortalità registrate da giorno 20 in poi, che in funzione dell'inizio di somministrazione di Artemia da giorno 21.

Controllo dell'alimentazione su rotiferi

Fino all'inizio di somministrazione dell'Artemia il comportamento alimentare é rimasto nella norma: da i controlli effettuati, e riportati di seguito, tutte le larve si sono alimentate regolarmente. Fino a giorno 8, é stato possibile distinguere le larve dei 2 lotti e procedere ad un analisi disgiunta dei dati di alimentazione.

Giorno	Pancia piena o semi-piena	Numero larve	Note
3	65 %	(6+7)/20	Solo lotto A
4	94 %	(11+4)/16	Solo lotto A
5	100 % 65 %	(22+2)/24 (7+4)/17	Lotto A Lotto B
6	100 % 80 %	(10+0)/10 (7+1)/10	Lotto A Lotto B
7	100 % 100 %	(13+1)/14 (5+2)/7	Lotto A Lotto B
8	100 % 83 %	(14+1)/15 (3+2)/6	Lotto A Lotto B
9	100 %	(14+3)/17	Lotti A e B
10	90 %	(12+6)/20	" "
11	100 %	(16+4)/20	" "
12	100 %	(14+4)/18	" "
13	100 %	(20+0)/20	" "
14	100 %	(18+0)/18	" "
15	100 %	(18+2)/20	" "
16	100 %	(19+1)/20	" "
17	100 %	(16+0)/16	" "
18	89 %	(13+3)/18	" "
19	94 %	(16+1)/18	" "
20	95 %	(17+2)/20	" "
Controllo almeno 2 ore dopo l'inizio dell'alimentazione. (n° a pancia piena + n° a pancia semi-piena) / n° totale larve			

Tab.9 - Controllo alimentazione con rotiferi

Controlli vescica natatoria

Da giorno 6 a giorno 15 sono stati posizionati da 2 a 3 schiumatori in superficie al fine prevenire la formazione di un film oleoso sul pelo dell'acqua, fenomeno che notoriamente ostacola la normale insufflazione della vescica natatoria. Gli schiumatori, venivano sistematicamente puliti nell'arco della giornata.
Le larve hanno iniziato ad insufflare la vescica natatoria da giorno 7 (6/8) e presentavano tutte la vescica natatoria a giorno 13 (12/14). I dati sono riassunti nella tabella sottostante.

Giorno	Vescica natatoria	Numero
8	52%	11 / 21
9	82%	14 / 17
10	-	-
11	95%	19 / 20
12	94%	17 / 18
13	100%	20 / 20
14 / 20	100%	n20 / controllo

Tab.10 - Controlli vescica natatoria

Da giorno 19, in coincidenza con il secondo picco di nitriti, si sono osservati vari soggetti a digiuno e con iper-insufflazione della vescica natatoria.

Somministrazione dei nauplii di Artemia (A0)

Da giorno 21 a giorno 30, l'artemia A0 é stata somministrata tutto il giorno, dalle 09.00 alle 21.00, mantenendo una concentrazione di prede in vasca pari a 0,5-1,0 A0/cc. Le artemie per la mattina erano filtrate alle 09.00 e disponibili fino alle 14.00 (5 ore), mentre quelle per il pomeriggio erano filtrate alle 15.00 e disponibili fino alle 21.00 (6 ore). Dopo la prima somministrazione della mattina (ore 09.00) e del pomeriggio (ore 15.00), la concentrazione di artemia era mantenuta costante, mediante controlli del numero rimasto in vasca e successiva integrazione quando necessario (controlli ogni 2 ore).
I quantitativi giornalieri somministrati sono riassunti in tabella 5.

Controllo dell'alimentazione su rotiferi e Artemia A0 (giorno 21 - giorno 30)

All'inizio della somministrazione di Artemia tutte le larve del lotto A hanno immediatamente mangiato artemia, mentre parte delle larve del lotto B hanno continuato ad alimentarsi esclusivamente su rotiferi per qualche giorno:

- giorno 21: 65% delle larve lotto B con 1-2 A0 in pancia e 35% con solo rotiferi.
- giorno 22: 60% delle larve lotto B con 1-2 A0 in pancia e 40% con solo rotiferi.
- giorno 23: 100% delle larve lotto B con 1-2 A0 in pancia.
- giorno 24: 100% delle larve lotto B con 1-2 A0 in pancia.

Per tutto il periodo di somministrazione di nauplii di Artemia, il comportamento alimentare delle larve é rimasto nella norma: da i controlli effettuati le tutte le larve si sono alimentate regolarmente.
I dati sono riassunti nella tabella sottostante.

Giorno	Pancia piena o semi-piena	Numero larve	Note
21	88%	(29+6)/40	Lotti A e B
22	100%	(16+4)/20	" "
23	100%	(20+0)/20	" "
24	95%	(16+3)/20	" "
25	100%	(18+2)/20	" "
26	100%	(18+0)/18	" "
27	-	-	" "
28	100%	(17+1)/18	" "
29	-	-	" "
30	100%	(17+1)/18	" "
Controllo almeno 2 ore dopo l'inizio dell'alimentazione. (n° a pancia piena + n° a pancia semi-piena) / n° totale larve			

Tab.11 - Controllo alimentazione con rotiferi e A0

2.3 PERIODO GIORNO 31 (30-32) - GIORNO 65 (64-66)

L'inizio di questo periodo é stato determinato dalla sospensione definitiva della somministrazione congiunta di alghe e di rotiferi.

Condizioni in vasca

Nel periodo da giorno 31 a giorno 62 sono intervenuti ulteriori variazioni:
- l'aerazione e il ricambio idrico sono stati ulteriormente incrementati;
- orari di luce e telo ombreggianti sono rimasti invariati.
- i rinnovi di acqua nel circuito sono stati aumentati in corrispondenza dei picchi di nitriti;

Nel periodo considerato, si sono verificati due picchi di nitriti con concentrazioni medie superiori o uguali a 0,05 mg/l NO_2^-: il primo fino a giorno 33 ed il secondo a fine ciclo da giorno 61. Per abbassare le concentrazioni di nitriti, si é provveduto a frequenti rinnovi dell'acqua nel circuito nelle proporzioni riportate in allegato 5 e riassunte in figura 1 (% di rinnovo giornaliero).
Il primo picco, da giorno 19 a giorno 33, é stato caratterizzato da rinnovi giornalieri del 15-90 % del volume circolante e da concentrazioni di nitriti nell'intervallo 0,05-0,18 mg/l.
Il secondo picco, da giorno 61 a giorno 65, é stato caratterizzato da rinnovi giornalieri del 10-40 % del volume circolante e da concentrazioni di nitriti nell'intervallo 0,08-0,18 mg/l.

Mortalità stimate e registrate

I dati di mortalità e le relative stime, monitorati ed analizzati come descritto al punto 1 della presente relazione, sono riportati in allegato 6 e riassunti in figura 2.

Il periodo di mortalità registrato da giorno 20 a giorno 44, già evidenziato al precedente punto 3.3 in corrispondenza del secondo picco di nitriti (giorno 19-33), ha drasticamente inciso sulla popolazione in vasca che, da 150.000 larve a giorno 18, é calata a 2.500 larve a giorno 45 (mortalità complessiva del 98,5 %).

Tale mortalità é senz'altro riconducibile al picco di nitriti registrato da giorno 19 a giorno 33, anche se il protrarsi delle mortalità e dei sintomi, malgrado un ritorno su valori di nitriti da considerarsi nella norma, induce a sospettare di una eziologia multi-fattoriale. A favore di quest'ultima ipotesi, il confronto con i risultati del ciclo sul pagro (*Pagrus pagrus*), in cui i valori di nitriti registrati erano stati molto più alti, evidenzia una maggiore mortalità delle larve di sarago malgrado valori di nitriti mediamente più bassi. Un ipotesi alternativa potrebbe anche essere una particolare sensibilità ai nitriti delle larve di sarago pizzuto (*Puntazzo puntazzo*) rispetto ad altre specie ittiche marine.

Il 30 dicembre (giorno 66), nell'ambito delle operazioni di trasferimento, sono stati contati 2.200 avannotti del peso medio di 0,3-0,4 grammi (stima). A fine ciclo, risulta dunque una sopravvivenza del 0,92 % rispetto alle 240.000 larve alla semina (giorno 1).

Somministrazione dell'Artemia arricchita (A1)

Da giorno 31 a giorno 55 l'artemia A1 arricchita é stata somministrata tutti giorni, dalle 09.00 alle 21.00, mantenendo una concentrazione di prede in vasca pari a 0,8-1,0 A1/cc la mattina e di 0,5-0,6 A1/cc il pomeriggio.

Le artemie per la mattina erano filtrate alle 09.00 e disponibili fino alle 14.00 (5 ore), mentre quelle per il pomeriggio erano filtrate alle 15.00 e disponibili fino alle 21.00 (6 ore). Dopo la prima somministrazione della mattina (ore 09.00) e del pomeriggio (ore 15.00), la concentrazione di artemia era mantenuta costante, mediante controlli del numero rimasto in vasca e successiva integrazione quando necessario (ogni 2 ore).
Da giorno 56 a giorno 60 l'artemia A1 é stata somministrata solo di pomeriggio, dalle 15.00 alle 21.00, mantenendo una concentrazione di prede in vasca pari a 0,3 A1/cc.
I quantitativi giornalieri somministrati sono riassunti in tabella 5.

Periodo	Artemie somministrate		Rimanenza media alle ore 09.00	Osservazioni
	Tipo	(milioni/giorno)	(n/cc)	
Giorno 21 - Giorno 24	A0	4.2	- / 0,17	Mortalità 10%/gg
Giorno 25 - Giorno 30	A0	4.6	0.33	Mortalità 15%/gg - Fine rotif.
Giorno 31 - Giorno 35	A1	5.7	0.28	Mortalità 19%/gg
Giorno 36 - Giorno 40	A1	4.1	0.20	Mortalità 23%/gg - Mangime
Giorno 41 - Giorno 45	A1	6.1	0.14	Mortalità 5%/gg
Giorno 46 - Giorno 50	A1	7.5	0.00	
Giorno 51 - Giorno 55	A1	6.1	0.06	Inizio svezzamento
Giorno 56 - Giorno 60	A1	2.0	0.00	Solo P.M.

Tab.12 - Artemie somministrate

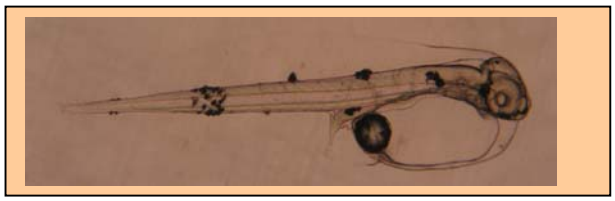
Da giorno 21 a giorno 30, come osservato per i consumi di rotiferi, i quantitativi di A0 somministrati sono rimasti costanti, mentre da giorno 31 a giorno 40, tali quantitativi sono diminuiti a causa delle mortalità registrate. Successivamente, concluse le mortalità i consumi sono aumentati regolarmente proporzionalmente all'incremento di biomassa delle popolazione in vasca.
Da giorno 51 si é provveduto ad un aumento progressivo del mangime e alla riduzione dei quantitativi di artemia A1 somministrati.

Somministrazione del mangime

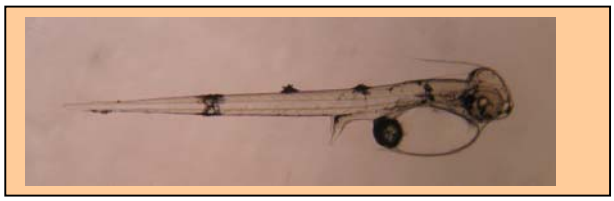
Da giorno 39 a giorno 65 sono stati somministrati quantitativi crescenti di dieta artificiale "Proton INVE" (200-500 µm).
Da giorno 39 a giorno 49, la somministrazione di 2 grammi giornalieri, é avvenuta manualmente in 4-6 volte al giorno e su tutta la superficie della vasca. Lo scopo era di abituare le larve al mangime e di stimolare il loro metabolismo enzimatico, in concomitanza con lo sviluppo e la differenziazione dell'apparato digerente.
Da giorno 50 in poi, il mangime, in quantità crescenti da 4 a 70 g al giorno, é stato somministrato in un punto unico della vasca, mediante l'installazione e l'utilizzo di una mangiatoia a nastro.
A giorno 61, tutti i pesci erano svezzati. Dopo il trasferimento tutti gli avannotti sono stati alimentati esclusivamente con diete artificiali.

2.4 FOTOGRAFIE E BIOMETRIE DEGLI STADI LARVALI E POST_LARVALI

Dalla schiusa a giorno 50, sono stati prelevati periodicamente dei campioni di circa 10 larve, che sono state fotografate una ad una con apparecchio digitale. Dalle fotografie, mediante un apposito software, le larve sono state misurate individualmente.

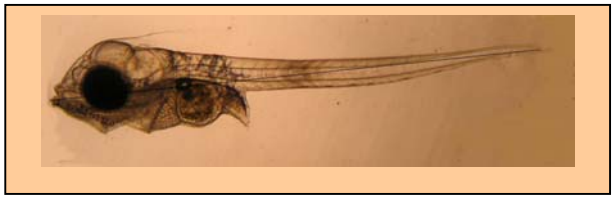


gg 01



gg 02

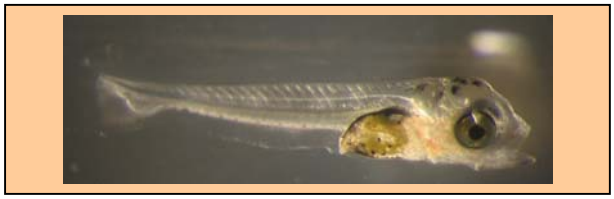
gg 03



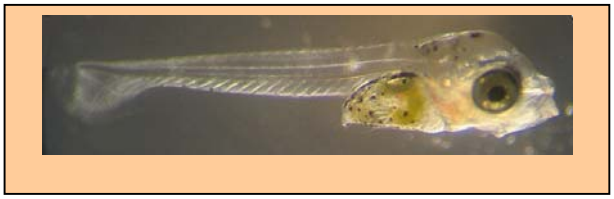
gg 08

gg 14

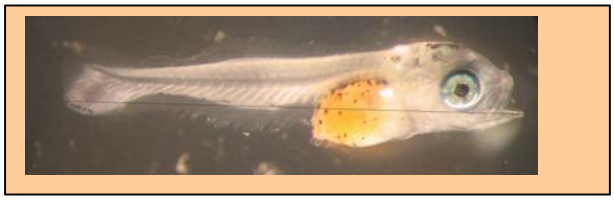
gg 16



gg 18

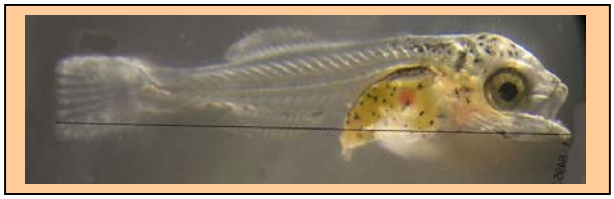


gg 19



gg 22

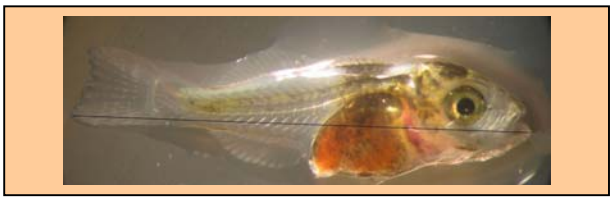
gg 26



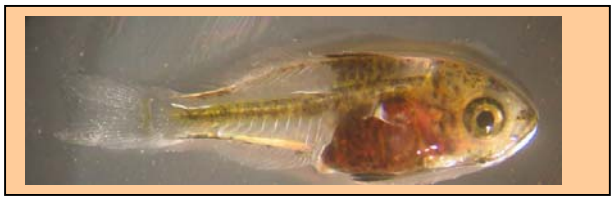
gg 28

gg 30

gg 33



gg 38



gg 44

gg 50

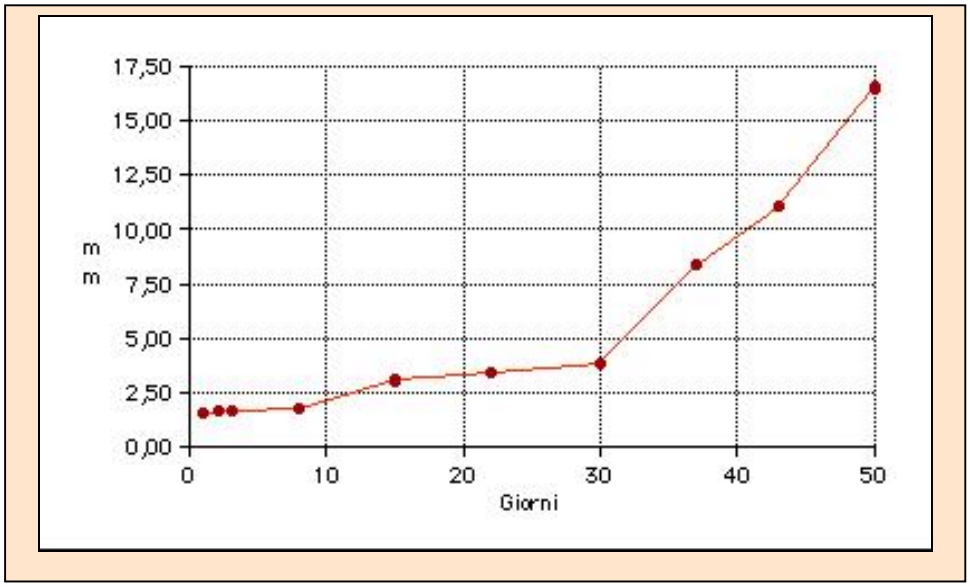


Fig.18 - Accrescimenti larvali

2.5 PREINGRASSO E INGRASSO

I pesci sono stati seminati in due vasche circolari da 2 mc, in condizioni di allevamento intensivo (Fig.19, 20). Le vasche di forma tronco-conica (diametro 1,8 m), erano posizionate all'esterno e approvvigionate con acqua di mare a temperatura stagionale (intervallo 13- 28°C).
Considerata la scarsa omogeneità di taglia degli avannotti (semina iniziale con uova di 3 giorni consecutivi), nei giorni successivi alla semina, i pesci sono stati selezionati, trasferendo i soggetti più piccoli in vasca A e quelli più grandi in vasca B.
Le fasi di preingrasso ed ingrasso sono state monitorate da gennaio 2005 a maggio 2005.

Sono state somministrate diete artificiali per specie ittiche marine di granulometria crescente, da diete sbriciolate di 500/800 micron a diete estruse di 1,8 mm (tab.12):

PERIODO	TIPO	GRANULOMETRIA
01.01.2005 - 13.03.2005	Dieta 1	500/800 m
14.03.2005 - 13.04.2005	Dieta 1 + Dieta 2	500/800 m & 1 mm
14.04.2005 - 06.05.2005	Dieta 2	1 mm
07.05.2005 - 23.05.2005	Dieta 2 + Dieta 3	1 mm & 1,3 mm
24.05.2005 - 11.06.2005	Dieta 3	1,3 mm
12.06.2005 - 16.06.2005	Dieta 4	1,8 mm

Tab.12 – Diete somministrate durante la fase di ingrasso

Da un primo campionamento eseguito in data 23 feb.05 su 30 soggetti per vasca, risultano pesi medi di 0,58 g in vasca A e 0,77 g in vasca B (media della popolazione di 0,67 g). Da un secondo campionamento eseguito in data 21 aprile.05 risultano pesi medi di 1,21 g in vasca A (66 soggetti) e di 1,78 g in vasca B (69 soggetti), con rispettive lunghezze totali medie di 3,32 e 4,29 cm. Dai dati accorpati ed elaborati, in modo da dare una indicazione sulla popolazione nel suo insieme (figura 21), risultano un peso medio di 1,47 g (coefficiente di variazione 20,2) ed una lunghezza totale media di 3,91 cm (coefficiente di variazione 17,5). In entrambi i casi, i coefficienti di variazione calcolati per l'intera popolazione, riflettono la scarsa omogeneità di taglia degli avannotti (uova di 3 giorni consecutivi).
L'ultimo campionamento, eseguito in data 16 giu.05, é stato condotto prelevando lo stesso numero di soggetti da ciascuna vasca. Da un campione di 40 avannotti, risultano un peso medio di 7,2 g per una lunghezza totale media di 7,5 cm (Fig.22).

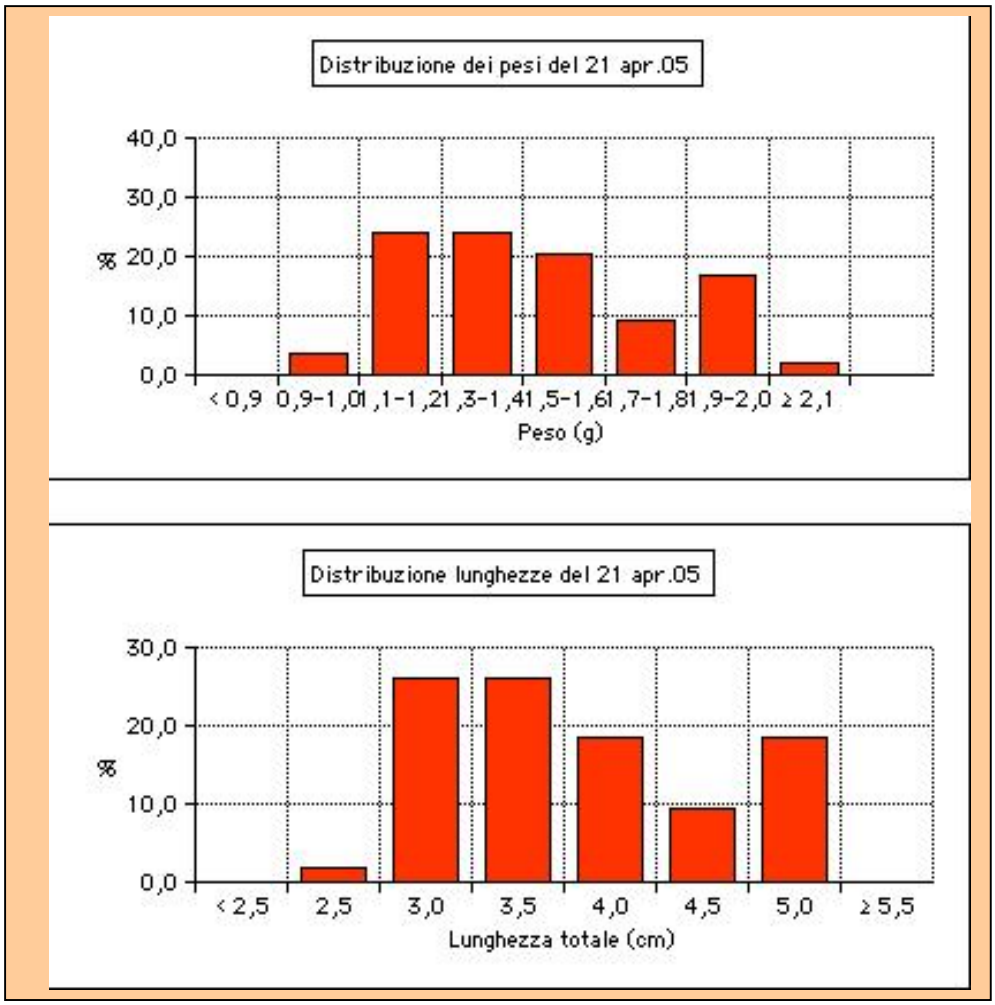


Fig.21 – Campionamenti del 21 aprile 2005

Luogo & data	Peso medio (g)			Lungh. Tot. (cm)	
Trasferimento 30 dic. 04	Popolazione				
	0,3 - 0,4			-	
23 feb.05	Vasca A	Vasca B	Popolazione		
	0.58	0.77	0.67	-	
21 apr.05	Vasca A	Vasca B	Misto	Vasca A	Vasca B
	1.21	1.80	1.47	3,32	4,29
16 giu.05	Popolazione			Popolazione	
	7.2			7.5	

Fig.21 – Campionamenti 2005

CONCLUSIONI

Il sarago pizzuto rimane senz'altro un ottimo candidato per la diversificazione delle specie ittiche marine di interesse commerciale. I risultati del ciclo sperimentale, illustrati nella presente relazione, confermano sia l'ottima crescita delle larve allevate in condizioni artificiali, che l'assenza di problemi di rilievo nell'alimentazione e nello svezzamento. La riproduzione tardiva della specie (autunno) e la conseguente disponibilità di avannotti a ridosso del periodo invernale rappresentano tuttavia un handicap rispetto ad altre specie come la spigola e l'orata che hanno una riproduzione invernale e che possono raggiungere la taglia commerciale (300–400 gr) con un unico inverno in produzione. In effetti, come dimostrato anche dalla fase di preingrasso descritta nella presente relazione, il sarago pizzuto raggiunge alla fine del primo inverno in produzione un peso medio spesso insufficiente per consentire il raggiungimento della taglia commerciale entro il secondo inverno.

Nell'ambito del congresso "Seafarming today and tomorow" tenutosi a Trieste nell'ottobre 2002, il Dr. Pascal Divanach riportava una produzione di circa 35 milioni di avannotti di sarago (*Diplodus sargus e Puntazzo puntazzo*) nell'intero bacino mediterraneo, nonché la disponibilità di prodotto di taglia commerciale presso molti impianti, ma precisava che la specie non aveva altre prospettive che la copertura di piccoli "mercati di nicchia". A prescindere del sopramenzionato problema legato al periodo riproduttivo, il sarago pizzuto presenta, se alimentato con diete per specie ittiche eurialine, dei tassi di crescita superiori a quelli dell'orata e della spigola.

Seppure non esaustiva, è stata condotta un'indagine per capire quali siano, a livello regionale, le potenzialità commerciali della specie: il sarago pizzuto risulta pescato in piccoli quantitativi e viene generalmente commercializzato come "cassa mista", senza mettere in evidenza un prodotto che altrimenti avrebbe buone potenzialità se differenziato da altre specie di minore interesse economico ed organolettico.

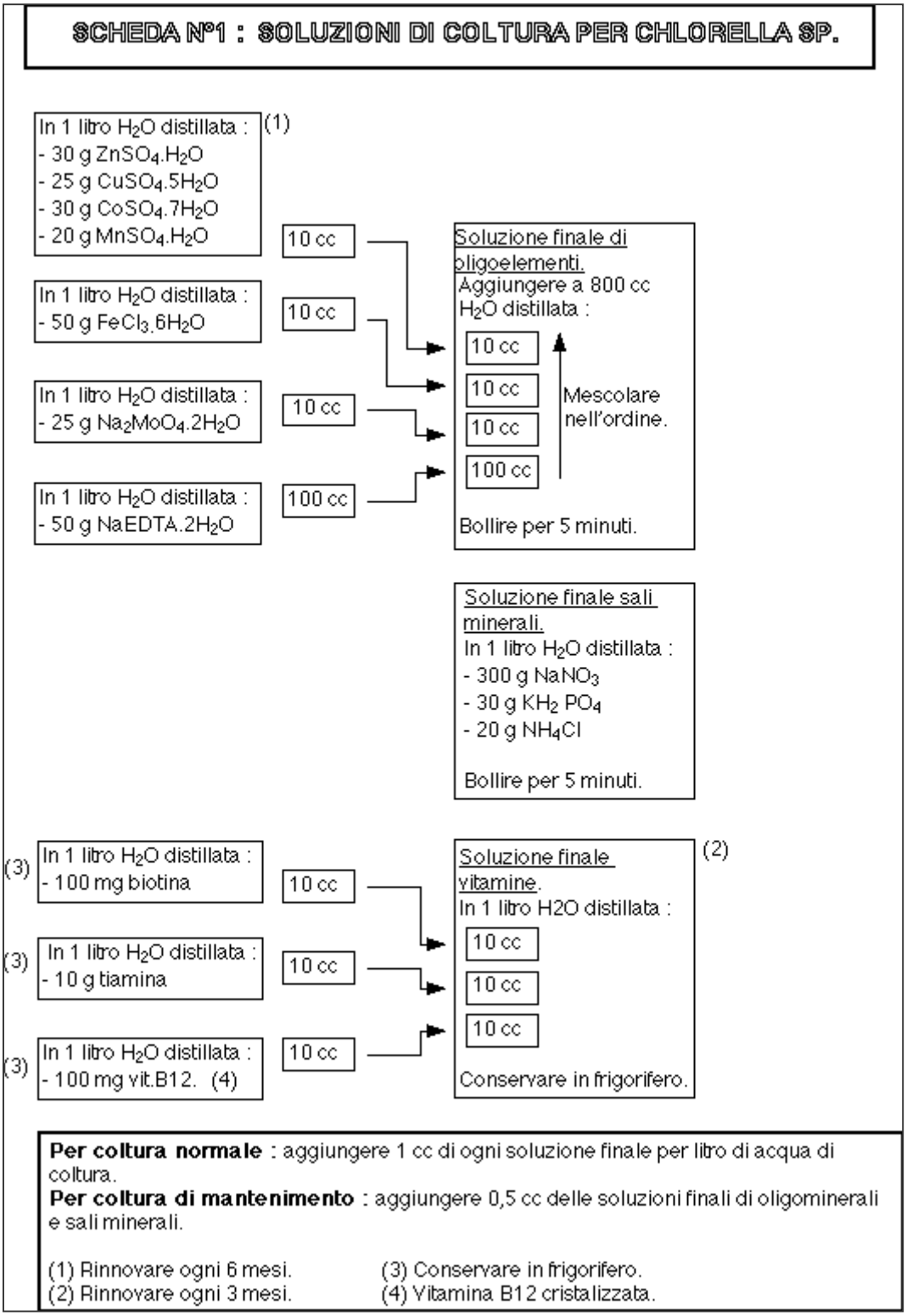
Per concludere, sia per i piccoli quantitativi pescati, che per l'assenza di uno specifico riconoscimento qualitativo della specie nei mercati ittici e malgrado le ridotte produzioni di acquacoltura, si renderebbe necessario, qualora si volesse avviare produzione su scala industriale, uno sforzo di promozione del prodotto. In effetti, per molte specie cosiddette "innovative" il principale ostacolo ad uno sviluppo delle produzioni deriva, non tanto dalle difficoltà di natura zootecnica, ma molto spesso da una sottovalutazione della necessità di promuovere i prodotti "nuovi" con idonee politiche commerciali sul breve-medio periodo.

BIBLIOGRAFIA

- Abellan E., Garcia-Alcazar A., 1995. Pre-growout and growout experiences with white seabream (*Diplodus sargus sargus*, Linnaeus, 1758) and sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*, Cetti, 1977). In: "*Marine aquaculture finfish species diversification. proceedings of the seminar of the ciheam network on technology of aquaculture in the mediterranean*" (TECAM), Nicosia (Cyprus), 14-17 jun 1995. Zaragoza (Spain) CIHEAM 1995, **16**: 57-63
- Balsamo V. e Monaco S.. Tecniche di allevamento di nuove specie in maricoltura. *SIPI*, Submitted. Bermudez L., Garcia-Garcia B., Gomez O., Rosique M.J., Faraco F., 1989. First results of the ongrowing in cages of *Sparus aurata, Puntazzo puntazzo* and *Lithognatus mormyrus* in the Mar Menor (Murcia, S.E. Spain). *EAS Spec. Publ*., Ostende, **10**: 27-28.
- Balsamo V. e Monaco S.. Tecniche di allevamento di nuove specie in maricoltura. *SIPI*, Submitted. Abellan E., Garcia-Alcazar A., 1995. Pre-growout and growout experiences with white seabream (Diplodus sargus sargus, Linnaeus, 1758) and sharpsnout seabream (Diplodus puntazzo, Cetti, 1977). In: *"Marine Acquaculture Finfish Species Diversification"* . Proceedings of theseminar of the ciheam network on technology of aquaculture in the Mediterranean (tecam), Nicosia (Ciprus), 14-17 jun 1995. Zaragoza (spain) CIHEAM 1995, **16:** 57-63.
- Caggiano M., Canese S., Lupo A., Cirillo A., 1993. Experiences of artificial reproduction and larval rearing of sheepshead bream (*Diplodus puntazzo*) in the south of Italy. FROM DISCOVERY TO COMMERCIALIZATION. Carrillo M.; Dahle L.; Morales J.; Sorgeloos P.; Svennevig N.; Wyban J. eds. OOSTENDE BELGIUM EUROPEAN AQUACULTURE SOC. World Aquaculture '93 Int. Conf., Torremolinos (Spain), 26-28 May 1993 *SPEC. PUBL. EUR. AQUACULT. SOC*. **19**: 326.
- Divanach P.; Kentouri M.; Charalambakis G.; Pouget F.; Sterioti A., 1993. Comparison of growth performance of six Mediterranean fish species reared under intensive farming conditions in Crete (Greece), in raceways with the use of self feeders. Int. Conf. Bordeaux Aquaculture,Bordeaux (France), 25-27 Mar 1992. PRODUCTION, ENVIRONMENT AND QUALITY. GHENT BELGIUM EUROPEAN AQUACULTURE SOCIETY. *SPEC. PUBL. EUR. AQUACULT. SOC*.**18**: 285-297
- Faranda F., Cavaliere A., Lo Paro A., Manganaro A., 1983. Accrescimento di *Puntazzo puntazzo* e *Diplodus vulgaris*. Comparazione di due diverse diete. *MEM. BIOL. MAR. OCEANOGR*., **13**:37-53.
- Faranda F., Cavaliere A., Lo Paro A., Manganaro A., Mazzola A., 1985. Preliminary studies on reproduction of *Puntazzo puntazzo* (Gmelin, 1789) (Pisces Sparidae) under controlled conditions. *AQUACULTURE*, **49**: 111-123.
- Favaloro E., 1995-98. Analisi morfometrica e studio delle anomalie scheletriche in *Diplodus puntazzo*(Cetti, 1777 Pisces: Sparidae): prove comparate tra diverse tipologie di allevamento. Tesi di Dottorato in Scienze Ambientali "Ambiente marino e risorse" XI ciclo. Univ. Messina.
- Gatland P., 1995. Growth of *Puntazzo puntazzo* in cages in Selonda Bay, Corinthos, Greece. *In*: M. Lasram (ed.). "*Marine aquaculture finfish species diversification*". Centre International Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, Zaragoza: 47-50.
- Greco S., Lo Paro G., Caridi D., Perdichizzi F., Cammaroto S., Micale V.E., Genovese L., 1992. Controlled spawning and larval development in the sharnout seabream (*Diplodus puntazzo*, Sparidae). *AQUACOLTURE EUROPE*, **16**: 12.
- Greco S., Lo-Paro G., Caridi D., Perdichizzi F., Cammaroto S., Micale V., Genovese L., 1993. Controlled spawning and larval development in the sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*, Sparidae). Int. Conf. Bordeaux Aquaculture, Bordeaux (France), 25-27 Mar 1992. Le Breton A. & Marques A., 1995. Occurrence of an histozoic Myxidium infection in two marin culture species: *Puntazzo puntazzo* and *Pagrus major*. *BULL.EUR.ASS.FISH PATHOL*, **15**: 210-212.
- Micale V., Perdichizzi F., Basciano G., 1996. Aspects of the reproductive biology of the sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). 1. Gametogenesis and gonadal cycle in captivity during the third year of life. *AQUACULTURE* **140**(3): 281-291.
- Lo Paro G., Greco S., Cammaroto S., 1993. Comparison of intensive rearing of sparids (Perciformes, Osteichthyes) in temperate waters. FROM DISCOVERY TO COMMERCIALIZATION. Carrillo M.; Dahle L.; Morales J.; Sorgeloos P.; Svennevig N.; Wyban J. eds. OOSTENDE BELGIUM EUROPEAN AQUACULTURE SOC. World Aquaculture '93 Int. Conf., Torremolinos (Spain), 26-28 May 1993 *SPEC. PUBL. EUR. AQUACULT. SOC*. **19**: 408.

ALLEGATI

Allegato 1 – medium coltivazioni algali



Preparazione f2 guillard modificato

N.B. Invece di bollire le soluzioni porle in autoclave per la sterilizzazione.
Nel nostro caso inoltre, per le colture di mantenimento sono state utilizzate le stesse quantità di soluzioni necessarie per la coltura normale.

Allegato 1 – medium coltivazioni 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

Preparazione Walne

N.B. Invece di bollire le soluzioni, porle in autoclave per la sterilizzazione.
Nel nostro caso per le colture di mantenimento abbiamo utilizzato sempre le stesse quantità delle colture normali.

Allegato 2 – cicli di coltivazione algale

Protocollo di coltura del ceppo *Nannochloropsis* **sp.**

Le colture di *Nannochloropsis sp.* 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:

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.

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.

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.

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.

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.

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.

(** / -): solo i 2 neon a muro.
(** / **): 2 neon a muro + 2 neon sotto.
(****): 4 neon verticali.

Allegato 2 – cicli di coltivazione algale

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

Le colture di *Isochrysis sp..* 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:

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.

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.

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.

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.

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.

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.

(** / -): solo i 2 neon a muro.
(** / **): 2 neon a muro + 2 neon sotto.
(****): 4 neon verticali.
(xx) numeri tra parentesi riferiti a colture in assenza di CO_2.

ALLEGATO 3 - Condizioni in vasca

Data	Giorno	Temp. (°C)	Ossigeno (mg O2/l.)	Luce	Aria	Ricambio (l./min)	Circolazione acqua	Nitriti (mg NO2/l.)	Acqua nuova Vasca	Acqua nuova Circuito	Osservazioni
Incubazione e schiusa (V.1)											
apr 2, 2004	**-1**	18,4	-	Luce	N°1 punto	Circuito	Parziale	-		-	
apr 3, 2004	**0**	-	-	spenta	centrale	chiuso	(Solo	-	Circa 2%	-	Schiusa
apr 4, 2004	**1**	17,6	8,4	&	senza	2 l./min	(filtro biologico	0,05	/giorno	-	
apr 5, 2004	**2**	18,5	9,8	vasca	pietra	(13%/ora)	intermedio)	0,07	(spurghi)	-	
apr 6, 2004	**3**	18,1	5,8	coperta	porosa			0,10		-	Trasferimento in V.3
Incubazione e schiusa (V.2)											
apr 2, 2004	**-1**	18,4	-	Luce	N°1 punto	Circuito	Parziale	-		-	
apr 3, 2004	**0**	-	-	spenta	centrale	chiuso	(Solo	-	Circa 2%	-	Schiusa
apr 4, 2004	**1**	17,6	8,3	&	senza	2 l./min	(filtro biologico	0,05	/giorno	-	
apr 5, 2004	**2**	18,0	9,6	vasca	pietra	(13%/ora)	intermedio)	0,05	(spurghi)	-	
apr 6, 2004	**3**	18,0	5,9	coperta	porosa			0,10		-	Trasferimento in V.3
Allevamento larvale giorno 4 / giorno 30 (V.3)											
apr 6, 2004	**3**	18,3	-	Spenta	N°1 punto	Circuito		0,05		-	
apr 7, 2004	**4**	18,0	8,7		centrale	chiuso		0,06	Da gg.8	-	
apr 8, 2004	**5**	17,8	8,0	Luce	+	5 l./min	Parziale	0,07	Circa 1%	-	
apr 9, 2004	**6**	17,6	7,8	accesa	n° 2 punti	(7,5%/ora)	(Solo	0,07	/giorno	-	
apr 10, 2004	**7**	17,5	7,8	09.00-22.00	laterali		(filtro biologico	0,08	(pulizia	-	
apr 11, 2004	**8**	17,5	7,9	&		Acqua	intermedio)	0,09	del fondo)	-	
apr 12, 2004	**9**	17,4	7,9	Telo ombra	Tutti senza	nuova		0,08		-	
apr 13, 2004	**10**	17,3	7,8	da gg.8	pietra	Trascurabile		0,09		-	
apr 14, 2004	**11**	17,3	7,7		porosa			0,09		-	
apr 15, 2004	**12**	17,4	7,9					0,10		-	

Condizioni in vasca - p.1

Data	Giorno	Temp. (°C)	Ossigeno (mg O2/l.)	Luce	Aria	Ricambio (l./min)	Circolazione acqua	Nitriti (mg NO2/l.)	Acqua nuova Vasca	Acqua nuova Circuito	Osservazioni
Allevamento larvale giorno 4 / giorno 30 (V.3) - Segue											
apr 16, 2004	**13**	17,6	7,3	Luce accesa 09.00-22.00 & Telo ombra	N°1 punto centrale + n° 2 punti laterali Tutti senza pietra porosa Aumento progressivo	Circuito chiuso Aumento progressivo da 5 l./min (7,5%/ora) a 10 l./min (15%/ora) Acqua nuova Variabile 2-8 l./min	Parziale 23/24 ore (Solo (filtro biologico intermedio) & Totale per circa 30-60 min/gg	0,11	1,5 %	-	
apr 17, 2004	**14**	17,5	6,8					0,15	2,5 %	10 %	
apr 18, 2004	**15**	17,6	6,9					0,18	2,5 %	-	
apr 19, 2004	**16**	17,5	7,0					0,20	12 %	15 %	Concentrazioni critici di nitriti ==> mortalità larvale da gg.18 a gg.21
apr 20, 2004	**17**	17,3	7,4					0,20	12 %	-	
apr 21, 2004	**18**	17,2	7,6					0,20	12 %	20 %	
apr 22, 2004	**19**	17,3	7,7					0,20 / 0,12	45 %	-	
apr 23, 2004	**20**	17,3	7,8					0,13 / 0,10	45 %	20 %	
apr 24, 2004	**21**	17,3	7,9					0,10	5 %	-	
apr 25, 2004	**22**	17,5	7,9					0,12	5 %	-	
apr 26, 2004	**23**	17,1	7,9					0,13	25 %	-	
apr 27, 2004	**24**	16,9	7,7					0,13	25 %	20 %	
apr 28, 2004	**25**	16,6	7,9					0,13	50 %	15 %	
apr 29, 2004	**26**	17,1	7,4					0,15 / 0,08	50 %	-	
apr 30, 2004	**27**	17,4	7,2					0,15	5 %	-	
mag 1, 2004	**28**	17,6	7,4					0,20 / 0,05	50 %	-	Concentrazioni critici di nitriti
mag 2, 2004	**29**	17,6	7,2					0,20	33 %	10 %	
mag 3, 2004	**30**	17,7	7,3					0,20/0,10	50 %	20 %	
Allevamento larvale giorno 31 / giorno 58 (V.3)											
mag 4, 2004	**31**	17,9	6,9	Luce accesa 09.00-22.00	Come sopra con aumento progressivo	Come sopra 10 l./min + 2-8 l./min	Come sopra Parziale + Totale	0,15	25 %	-	Concentrazioni critici di nitriti ==> mortalità contenuta
mag 5, 2004	**32**	17,7	7,1					0,20/0,15	45 %	-	
mag 6, 2004	**33**	17,5	7,2					0,20	25 %	-	
mag 7, 2004	**34**	17,3	7,3					0,20/0,15	30 %	-	
mag 8, 2004	**35**	17,3	7,4					0,20/0,15	40 %	-	
mag 9, 2004	**36**	17,3	7,4					0,20	30 %	20 %	

Rinnovo di acqua in vasca espresso in % del volume della vasca (4.000 litri). - Rinnovo di acqua nel circuito espresso in % del volume del filtro grande e della vasca di ripresa (1.500 litri)..

Condizioni in vasca - p.2

Data	Giorno	Temp. (°C)	Ossigeno (mg O2/l.)	Luce	Aria	Ricambio (l./min)	Circolazione acqua	Nitriti (mg NO2/l.)	Acqua nuova Vasca	Acqua nuova Circuito	Osservazioni
Allevamento larvale giorno 31 / giorno 58 (V.3) - Segue											
mag 10, 2004	**37**	17,3	7,3	Luce accesa 09.00-22.00	Come sopra con aumento progressivo	Circuito chiuso Aumento progressivo da 10 l./min (15%/ora) a 15 l./min (20%/ora) Acqua nuova Variabile 8-12 l./min	Parziale 22/24 ore (Solo (filtro biologico intermedio) & Totale per circa 60-90 min/gg	0,25	50 %		
mag 11, 2004	**38**	17,3	7,2					0,20	50 %		
mag 12, 2004	**39**	17,4	7,3					0,20/0,15	55 %		
mag 13, 2004	**40**	18,0	7,9					0,15/0,10	50 %		
mag 14, 2004	**41**	18,6	7,1					0,15/0,08	55 %		
mag 15, 2004	**42**	18,5	7,0					0,10	50 %		
mag 16, 2004	**43**	18,7	7,0					0,10	50 %		
mag 17, 2004	**44**	19,0	7,1					0,20/0,08	50 %		
mag 18, 2004	**45**	19,1	6,9					0,15/0,10	50 %		
mag 19, 2004	**46**	19,2	6,8					0,20/0,10	50 %		
mag 20, 2004	**47**	19,1	6,3					0,20/0,12	50 %		
mag 21, 2004	**48**	19,4	6,4					0,15/0,08	50 %		
mag 22, 2004	**49**	20,5	6,1					0,15/0,08	50 %		
mag 23, 2004	**50**	20,4	6,6					0,15/0,08	50 %		
mag 24, 2004	**51**	21,6	6,8					0,25/0,10	50 %		
mag 25, 2004	**52**	20,8	6,5					0,30/0,10	50 %		Nuovo aumento dei nitriti ==> alta mortalità da gg.55
mag 26, 2004	**53**	19,6	5,6					0,40/0,10	50 %		
mag 27, 2004	**54**	19,4	6,2					0,30/0,10	50 %		
mag 28, 2004	**55**	19,4	6,5					0,50/0,10	90 %		
mag 29, 2004	**56**	19,3	7,1					0,20/0,08	75 %		
mag 30, 2004	**57**	Trasferimento in V.1 e V.2 per conta e successiva spedizione.									
mag 31, 2004	**58**										
giu 1, 2004	**59**	Spedizione Civitavecchia									

Condizioni in vasca - p.3