ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE PER L'ABRUZZO ED IL MOLISE

"G.CAPORALE"

DOCUP PESCA REGIONE ABRUZZO
BANDO 2003 – MISURA 4.6 – "AZIONI INNOVANTI"
PROGETTO 06/IM/03/AB

"PROGETTO PILOTA PER L'ALLEVAMENTO DI UNA SPECIE ITTICA INNOVATIVA: LA SOGLIOLA (*Solea vulgaris*)"

RELAZIONE TECNICA FINALE

DR. ALESSANDRA PAOLINI

SETTEMBRE 2005

SCHEDA TECNICA DEL PROGETTO

Importo	48.111,95
Data approvazione	26 novembre 2004 DH 18/44 – progetto cod. 06/IM/03/AB
Data inizio attività	15.02.2005
Data fine attività	31.08.2005
Data variante	18.01.2005
Data approvazione variante	27.01.2005
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. A. De Ascentiis, dr. M. Torresi, dr. M. Vallerani, dr. C. Egidi, dr. A.Pavone. Consulente: dr. Lorenzo Gennari. Coadiuvatore tecnico: Alessandro Perazzitti. Un ringraziamento particolare per la collaborazione ai volontari: dr. Giuseppina Candelori.
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 – Origine e qualità delle uova
2.2 – Semina, schiusa e riassorbimento del sacco vitellino
2.3 – Periodo da giorno 3 a giorno 25
2.4 - Periodo da giorno 26 a giorno 59
2.5 - Periodo da giorno 60 a giorno 123
2.6 - Fotografie e biometrie degli stadi larvali e post-larvali
2.7 – Analisi microbiologiche delle acque

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 vulgaris*).

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. Nell'ambito del terzo progetto si è svolto un ciclo completo di allevamento larvale e di svezzamento del sarago pizzuto, con successiva prova di ingrasso presso un impianto intensivo. In questo progetto abbiamo condotto un ciclo completo di allevamento larvale e di svezzamento della sogliola comune.

La prima parte della presente relazione riguarda la descrizione delle strutture e dei vari protocolli di produzione del fito-zooplancton. La seconda parte della relazione riporta i risultati del ciclo di allevamento larvale e di svezzamento della sogliola.

L'attività oggetto della presente relazione si é svolta dal 15 febbraio al 31 agosto 2005. Il ciclo di allevamento larvale e di svezzamento della sogliola si é svolto dal 27 aprile al 28 giugno 2005, per un periodo di circa 2 mesi. A luglio 2005, parte degli avannotti sono stati trasferiti, per la fase successiva di preingrasso presso un impianto sito ad Ortona.

Kingdom	ANIMALIA
Phylum	CHORDATA
Class	ACTINOPTERYGII
Order	PLEURONETTIFORMI
Family	SOLEIDI
Common Name/s	COMMON SOLE
Genus, species	*Solea vulgaris*

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).

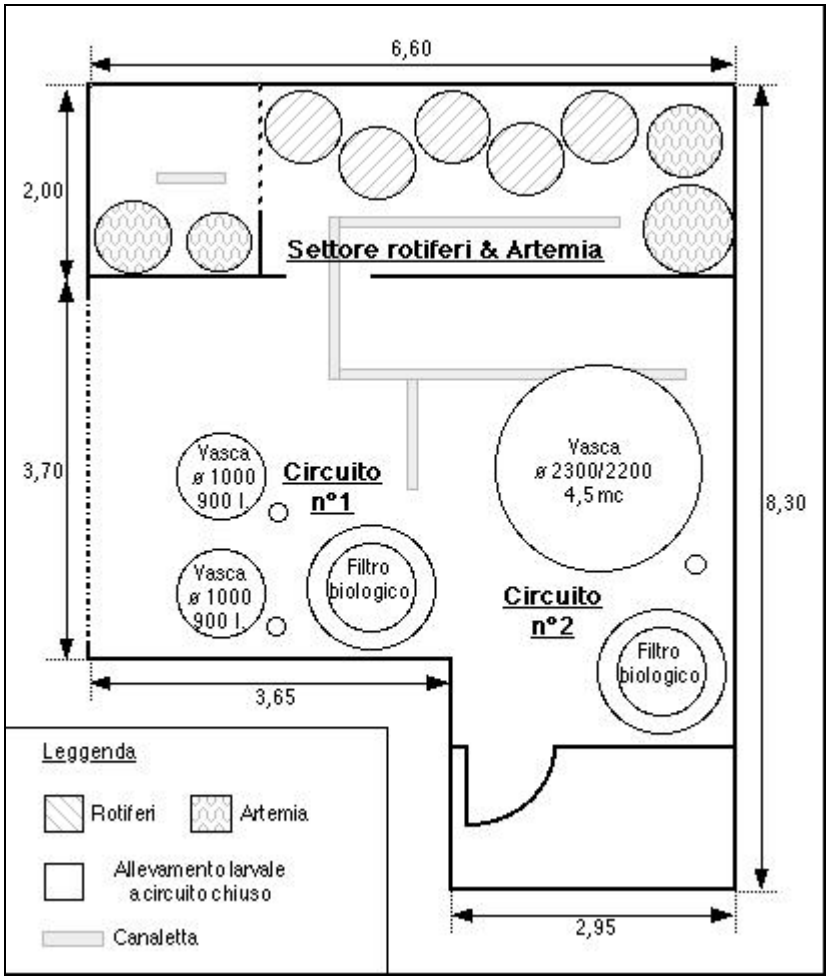


Figura 1 - Disposizione generale

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 e 3).

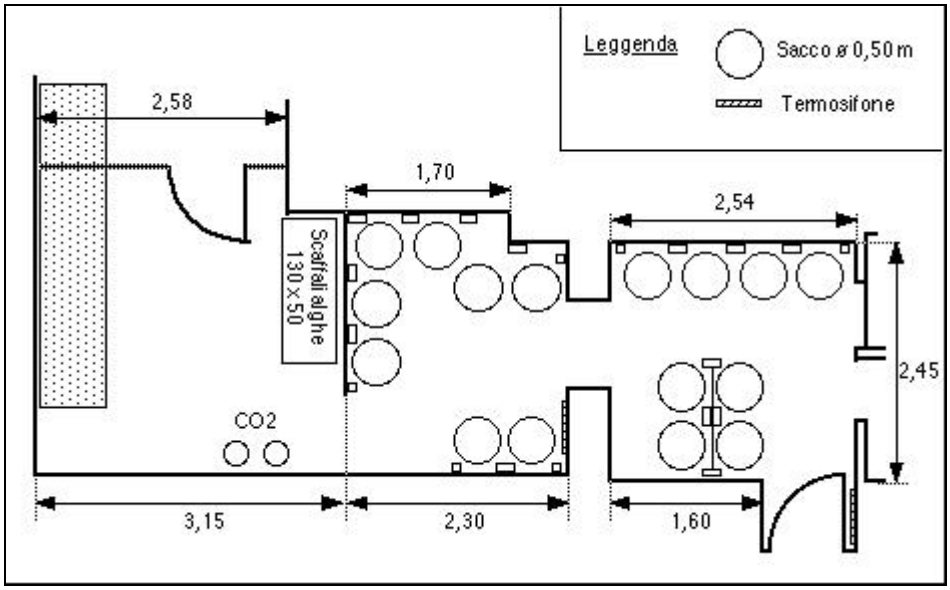


Figura 2 – Locale piccoli e grandi volumi algali

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".

Figura 3 – Locale produzione fito-plancton

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 successivi 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).

Figura 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. Tutti i cicli condotti nell'ambito della sperimentazione in oggetto si sono svolti nelle vasche V1 e V2 del 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) (figura 6).
In considerazione del comportamento tipicamente bentonico della sogliola, le vasche sono state modificate con l'inserimento di un fondo piatto, di colore chiaro, posizionato a metà altezza di ciascuna vasca. Il fondo piatto, posizionato a circa 70 cm dal bordo superiore, definisce un volume utile di 525 litri (vedere figura 5).

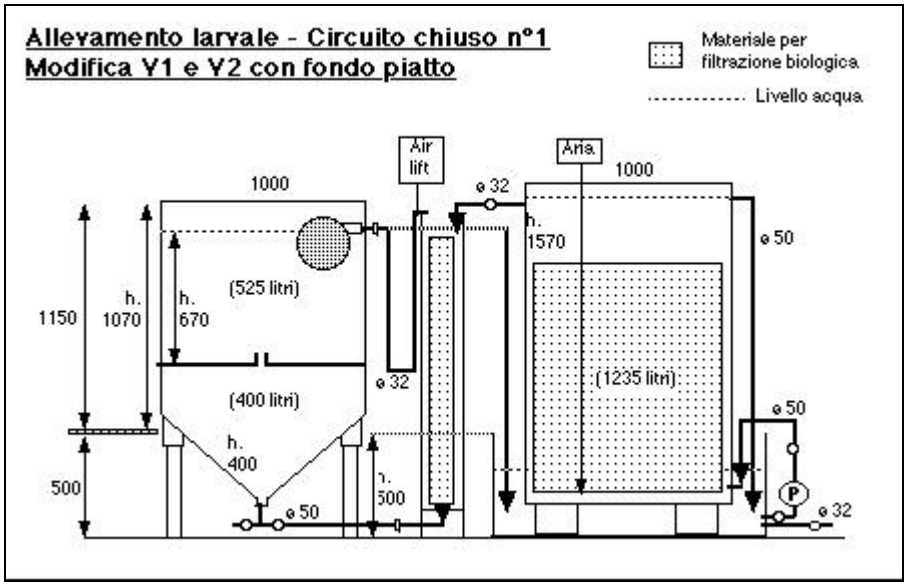


Figura 5 - Vasche da 1 mc circuito chiuso n°1

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).
Rispetto ai cicli precedenti, il circuito chiuso, é stato anche dotato di una pompa di calore in grado di mantenere la temperatura dell'acqua costante. Con un circuito indipendente, l'acqua, prelevata dalla vasca di ripresa nel punto di scarico dei tubi di livello del filtro biologico e delle vasche, sottoposta a scambio termico, é immessa nella stessa vasca di ripresa nel punto di prelievo della pompa che serve il filtro biologico.

Figura 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 presente progetto sull'allevamento del sarago pizzuto, il circuito non è stato adoperato.

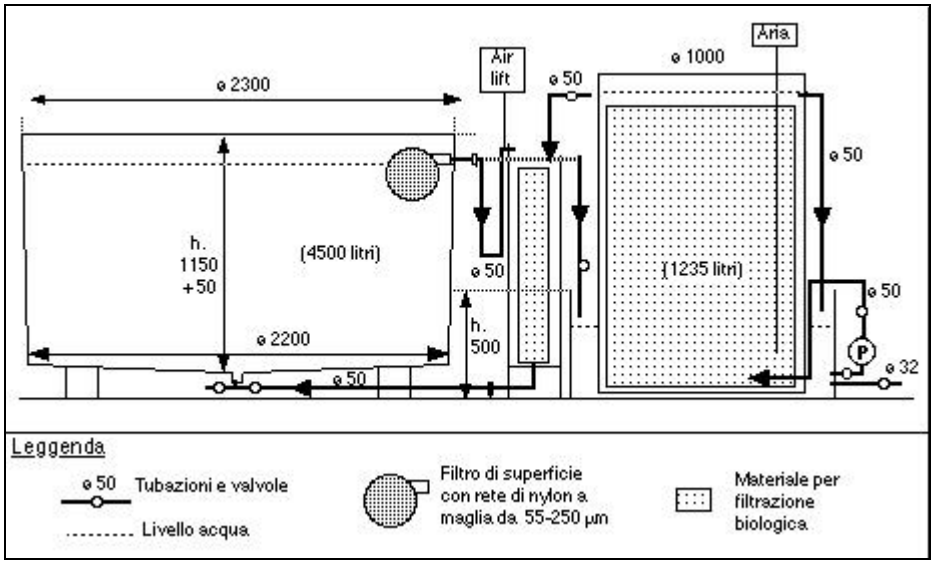


Figura 7 - Circuito chiuso e vasca utilizzati per l'allevamento larvale del pagro

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) (figura 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).

Figura 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 O_2);
- circolazione dell'acqua omogenea all'interno del filtro;
- materiale filtrante sempre immerso nell'acqua;
- corretto funzionamento del galleggiante di controllo della pompa.

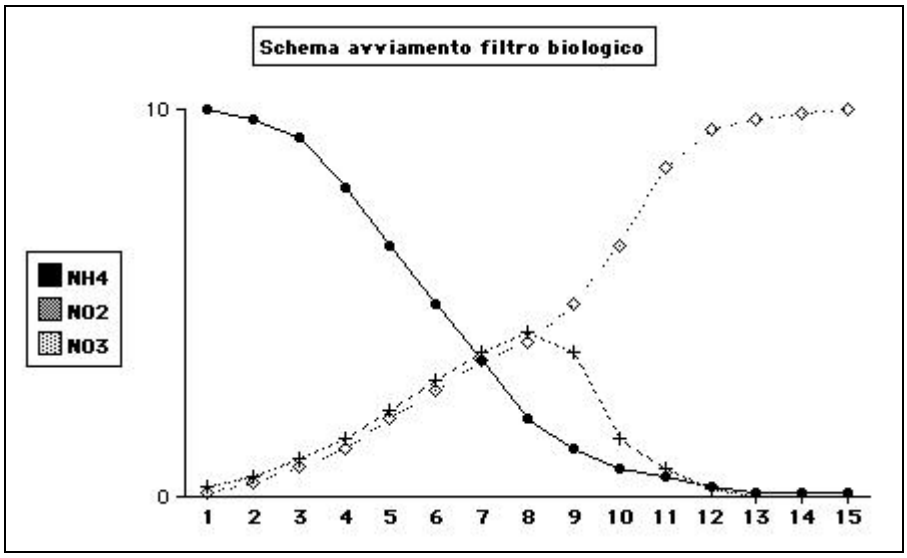


Figura 9 - Principio di funzionamento della filtrazione biologica

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).

Nell'ambito del progetto sull'allevamento larvale della sogliola, solo il ceppo *Nannochloropsis* sp. È stato adoperato. Le colture 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 si é svolto tra gennaio e febbraio 2005. Le alghe 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.

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 sono 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.

1.7 METODICHE DI COLTURA ED ARRICCHIMENTO DEI ROTIFERI

I rotiferi (figura 10) sono organismi mobili di 50-250 μm (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.

Figura 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.

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 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.

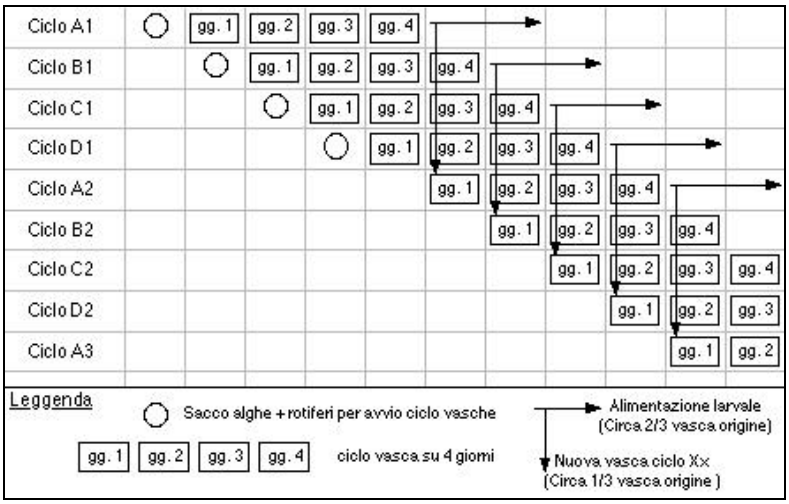


Figura 11 - Schema di gestione delle vasche di coltura e di arricchimento dei rotiferi

La coltura e l'arricchimento dei rotiferi sono stati eseguiti con diete artificiali INVE.

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

Tabella 1 - Composizione del "Culture Selco" (INVE)

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

Tabella 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".

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* .

1.8 METODICHE DI SCHIUSA ED ARRICCHIMENTO DELL'ARTEMIA

L'*Artemia salina* é un piccolo crostaceo 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.

Figura 12 - *Artemia salina*

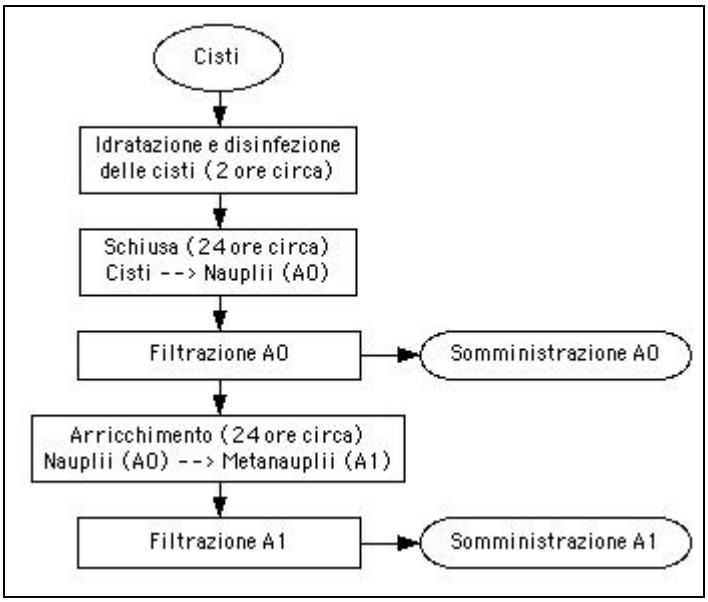


Figura 13 - Schema di utilizzo dell'artemia

Nell'ambito del presente progetto, sono state somministrate allo stadio nauplii, 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 indicative (INVE)	
Proteine	54 %
Lipidi	11 %
Ceneri	8 %
Umidità 8 %	
n-3 HUFA	15 mg/g peso secco
(Per utilizzo senza arricchimento)	

Tabella 3 - Composizione Artemia "AF 430" (INVE)

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

Tabella 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.

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

Tabella 5 - Composizione "A1 DHA Selco" (INVE)

1.9 DIETE ARTIFICIALI

Lo svezzamento si é svolto con la dieta artificiale "Aglonorse" della EWOS, già testata con successo nello svezzamento della sogliola. Tale dieta oltre a contenere materie prime di alta qualità, risultava particolarmente appetibile e di conseguenza idonea a favorire una corretta risposta alimentare. Sona state adoperate sbriciolati di granulometria 100-400 μm e 400-600 μm con le seguente caratteristiche:

Analisi indicative	
Proteine 59 % Lipidi 20 % Carboidrati 4 % Fibre 1 %	Ceneri 9-15 % Umidità 8 %

Tabella 6 - Composizione del "Proton" (INVE)

Figura 14 - Somministrazione mangime

1.10 MODALITÀ DI MONITORAGGIO DEL CICLO DI ALLEVAMENTO LARVALE

Monitoraggio delle condizioni in vasca

Durante le fasi di allevamento larvale e di svezzamento, le condizioni in vasca sono state monitorate in continuo, con rilevamento giornaliero dei seguenti parametri:

- temperatura (°C) (*);
- ossigeno disciolto (mg/litro) (*);
- luce;
- aerazione;
- tipo di circolazione a circuito chiuso (parziale o totale);
- rinnovo giornaliero di acqua in vasca (% volume della vasca).
- rinnovo giornaliero di acqua nella vasca di ripresa del filtro (% volume del filtro).
- nitriti (mg/l NO^{2-}) in vasca di allevamento larvale (*) e nel filtro biologico (*).

I suddetti parametri e tutte le variazioni apportate nella gestione della vasca, sono riportati in allegato 1. L'indicazione "( )" si riferisce alla media giornaliera di 2 o più rilevamenti.*

Oltre al rilevamento dei 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 delle mortalità (mortalità effettive e stimate);
- da giorno 12 a giorno 20, controllo dell'insufflazione della vescica natatoria;
- dall'inizio dell'alimentazione a giorno 20, controllo giornaliero della percentuale di larve alimentate (pancia piena, semi-piena o vuota);
- controllo periodico del comportamento in vasca e della vitalità delle larve;
- 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 della mortalità é avvenuto con diverse modalità a seconda delle dimensioni, dello sviluppo e del comportamento delle larve. I dati di mortalità sono tutti riportati in allegato 2.

Nei primi giorni, le larve essendo molto piccole, scarsamente pigmentate e distribuite in modo abbastanza uniforme in tutta la vasca, risultava difficile sifonare il fondo senza prelevare numerosi soggetti vivi. Inoltre, considerata la modifica eseguita sulle vasche, con l'inserimento di un fondo piatto a metà altezza, le operazioni di spurgo non erano più fattibili. Di conseguenza, nel periodo iniziale, risultava impossibile disporre di indicazioni affidabili sull'effettiva mortalità e si rendeva necessario procedere a delle stime della densità in vasca mediante conte e/o valutazioni visive.
Successivamente, quando le larve hanno cominciato a raggrupparsi sul fondo e sulle pareti, si é potuto procedere quotidianamente alla pulizia del fondo (sifonamento), nonché alla stima dei morti raccolti sia sul fondo sia a galla.
Sulla base delle stime iniziali e dei rilevamenti successivi, si é poi proceduto 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 congruità della risposta alimentare.

Biometrie e fotografie

Con cadenza settimanale venivano effettuati rilievi biometrici 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 misurate successivamente mediante un apposito software (IM 500).

2. RISULTATI E DISCUSSIONE

2.1 ORIGINE E QUALITÀ DELLE UOVA

Le uova sono state fornite dall'impianto "Veneto Agricoltura" di Pellestrina. La fornitura é stata caratterizzata da una serie di difficoltà che hanno condizionato lo svolgimento dell'intera prova e hanno determinato un ritardo complessivo di 45 giorni rispetto ai programmi iniziali. Si ringrazia la "Veneto Agricoltura" per la totale disponibilità nell'affrontare e nel risolvere le situazioni avverse venute a crearsi. Senza la loro qualificata collaborazione la sperimentazione non si sarebbe potuto svolgere.

I riproduttori, stimolati con LH-Rh a rilascio progressivo il 16 marzo 2005, hanno cominciato a deporre dopo 2 giorni. Dall'inizio, le uova raccolte sono state caratterizzate da tassi di fecondazione piuttosto bassi, con l'impossibilità di ottenere lotti di uova abbastanza numerosi per raggiungere la densità iniziale di circa 120 larve per litro. Dopo circa un mese, senza che sia stato avviato il primo ciclo di allevamento larvale, si é sovrapposto un problema di blocco dello sviluppo embrionale, con mortalità della quasi totalità delle uova prima della schiusa. Considerata la situazione venuta a crearsi, é stato deciso di procedere alla semina, appena possibile, indipendentemente dalla numerosità e della qualità dei lotti.
A fine aprile, con alcuni lotti di uova di qualità accettabile, si é proceduto a tre semine successive come riassunto in tabella 7.

Data semina	Lotto	Data schiusa	Stato alla semina	Età alla semina	Destinazione
27 aprile 2005	A1	25 apr. A.M.	Larve	giorno 2	Ciclo V2a (Ciclo eliminato dopo 3 giorni)
	A2	26 apr. A.M.	Larve	giorno 1	
	B	27 apr. A.M.	Larve	giorno 0	Ciclo V1a (Ciclo accorpata al ciclo V2b)
	C	28 apr. A.M.	Uova	giorno -1	
	D	29 apr. A.M.	Uova	giorno -2	
30 aprile 2005	A	notte 29-30 apr.	Larve	giorno 0	Ciclo V2b (Ciclo accorpata al ciclo V1a)
	B	notte 30-01 mag.	Uova	giorno -1	
	C	notte 01-02 mag.	Uova	giorno -2	
12 maggio 2005	A	notte 10-11 mag.	Larve	giorno 1	Ciclo V1b (Ciclo eliminato dopo 5 giorni)
	B	notte 11-12 mag.	Larve	giorno 0	

Tabella 7 - Riepilogo delle semine e dei lotti di origine

Sia nei lotti rimasti presso l'impianto di Pellestrina, sia nei lotti seminati presso l'impianto di Torre Cerrano, i dati di schiusa e di sopravvivenza larvale sono risultati bassi:

- le percentuali di schiusa documentate sono rimaste inferiori o uguali al 70 %;
- le mortalità documentate, registrate tra il primo e il secondo giorno dopo la schiusa, sono risultate mediamente del 50 % delle larve schiuse.

I problemi all'origine della suddetta situazione non sono stati del tutto individuati, tuttavia una serie di interventi e/o scelte mirate a migliorare la situazione, hanno avuto un impatto positivo:

- variazione del rapporto tra i sessi nelle vasche dei riproduttori, adottando un rapporto di almeno un maschio per ciascuna femmina;
- utilizzo di acqua di mare al posto dell'acqua della laguna (lavori in corsi);
- proseguimento dell'alimentazione dei riproduttori con alimento fresco per tutto il periodo di deposizione;
- decisione di privilegiare il trasporto di uova, rispetto al trasporto di larve.

2.2. SEMINA, SCHIUSA E RIASSORBIMENTO DEL SACCO VITELLINO

Semina

Il protocollo iniziale prevedeva la semina di 80.000 uova per vasca, anche provenienti da 2-3 lotti deposti ad un giorno d'intervallo l'uno dall'altro, in modo da raggiungere, con una schiusa dell'80 %, una densità larvale iniziale di 120 larve per litro (vasche di volume unitario 525 litri). Purtroppo, per i motivi evidenziati nel precedente capitolo, la disponibilità e la qualità delle uova non ha consentito di raggiungere tal obiettivo.

Semina del 27 aprile 2005 - Cicli V1a e V2a

L'emissione, la raccolta e l'incubazione delle uova presso l'impianto di Pellestrina si sono svolti alla temperatura di circa 15°C. Alla consegna dei quattro lotti di uova o di larve, la temperatura nei rispettivi contenitori era mediamente di 17,9°C.

Il trasporto ha avuto luogo nel pomeriggio del 27 aprile, con un automezzo dotato di aria condizionata. All'arrivo presso l'impianto di Torre Cerrano, la temperatura media nei contenitori era di 17,5°C. Prima della semina, i contenitori, ancora chiusi, sono stati immersi nell'acqua della vasca di destinazione affinché le temperature interne ed esterne si potessero equilibrare. Raggiunta la temperatura di 17 °C i contenitori sono stati aperti.

Le uova e le larve della prima semina provenivano da 5 emissioni consecutive:

- emissione nella notte del 22-23 aprile e raccolta il 23 mattina;
- emissione nella notte del 23-24 aprile e raccolta il 24 mattina;
- emissione nella notte del 24-25 aprile e raccolta il 25 mattina;
- emissione nella notte del 25-26 aprile e raccolta il 26 mattina;
- emissione nella notte del 26-27 aprile e raccolta il 27 mattina.

- Il lotto A, proveniente dalle prime due emissioni, costituito da larve schiuse la mattina del 25 e del 26 aprile, stimato pari a 8.000 larve il 26 aprile (giorno 0/1) e a 4-5.000 larve alla consegna (giorno 1/2), é stato seminato nella vasca V2 (ciclo V2a).
- Il lotto B, proveniente dalla terza emissione, costituito da larve schiuse durante il trasporto, stimato alla consegna pari a 13-15.000 uova (giorno 0), é stato seminato nella vasca V1 (ciclo V1a).
- Il lotto C, proveniente dalla quarta emissione, costituito da uova, stimato alla consegna pari a 13-15.000 uova (giorno -1), é stato seminato nella vasca V1 (ciclo V1a).
- Il lotto D, proveniente dall'ultima emissione, costituito di uova é stato inizialmente mantenuto a parte, poi stimato e seminato il 28 aprile nella vasca V1 (ciclo V1a).

Dopo la semina del 27 aprile, risultava un totale di 4.500 larve a giorno 2/3 nella V2 (ciclo V2a) e un totale di 28.000 uova e larve a giorno -1/0 giorni nella V1 (ciclo V1a). Dopo l'aggiunta dell'ultimo lotto nella V1, stimato in 8.500 uova il 28 aprile mattina (giorno -1), risultavano un totale teorico di 36.500 uova e larve a giorno -1/0/1.

Semina del 30 aprile 2005- Ciclo V2b

L'emissione, la raccolta e l'incubazione delle uova presso l'impianto di Pellestrina si sono svolti alla temperatura di circa 17°C. Alla consegna dei tre lotti di uova o di larve, la temperatura nei rispettivi contenitori era mediamente di 19°C.

Il trasporto ha avuto luogo nel pomeriggio del 30 aprile, con un automezzo dotato di aria condizionata. All'arrivo presso l'impianto di Torre Cerrano, la temperatura media nei contenitori era di 19,4°C. Prima della semina, i contenitori, ancora chiusi, sono stati immersi nell'acqua della vasca di destinazione affinché le temperature interne ed esterne si possano equilibrare. Raggiunta la temperatura di 17°C i contenitori sono stati aperti.

Le uova e le larve della prima semina provenivano da 3 emissioni consecutive:

- emissione nella notte del 27-28 aprile e raccolta il 28 mattina;
- emissione nella notte del 28-29 aprile e raccolta il 29 mattina;
- emissione nella notte del 29-30 aprile e raccolta il 30 mattina;

- Il lotto A, proveniente dalla prima emissione, costituito da larve schiuse nella notte del 29-30 aprile, stimato alla consegna pari a 24-30.000 larve (giorno 0), é stato seminato nella vasca V2 (ciclo V2b).
- Il lotto B, proveniente dalla seconda emissione, costituito da uova, stimato alla consegna pari a 14.000 uova (giorno -1), é stato seminato nella vasca V2 (ciclo V2b).
- Il lotto C, proveniente dall'ultima emissione, costituito di uova, stimato alla consegna pari a 14.000 uova (giorno -2), é stato seminato nella vasca V2 (ciclo V2b).

Dopo la semina del 30 aprile, risultavano 55.000 uova e larve a giorno -2/-1/0 nella V2 (ciclo V2b).

Semina del 12 maggio 2005- Ciclo V1b

L'emissione, la raccolta e l'incubazione delle uova presso l'impianto di Pellestrina si sono svolti alla temperatura di circa 17°C. Alla consegna dei due lotti di larve, la temperatura nei rispettivi contenitori era mediamente di 18°C.
Il trasporto ha avuto luogo nel pomeriggio del 30 aprile, con un automezzo dotato di aria condizionata. All'arrivo presso l'impianto di Torre Cerrano (ore 19.00), la temperatura media nei contenitori era di 18,6°C. Prima della semina, i contenitori, ancora chiusi, sono stati immersi nell'acqua della vasca di destinazione affinché le temperature interne ed esterne si possano equilibrare. Raggiunta la temperatura di 17,3°C i contenitori sono stati aperti.

Le uova e le larve della prima semina provenivano da 2 emissioni consecutive:

- emissione nella notte del 08-09 maggio e raccolta il 09 mattina;
- emissione nella notte del 09-10 maggio e raccolta il 10 mattina;

- Il lotto A, proveniente dalla prima emissione, costituito da larve schiuse nella notte del 10-11 maggio, stimato pari a 21.000 uova il 09 maggio, pari a 9.000 larve il 11 maggio (giorno 0) e pari a 4.500 larve alla consegna (giorno 1), é stato seminato nella vasca V1 (ciclo V1b).
- Il lotto B, proveniente dalla seconda emissione, costituito da larve schiuse nella notte del 11-12 maggio, stimato pari a 11.000 uova il 10 maggio, pari a 10.000 uova il 11 maggio (giorno -1) e pari a 6.000 larve alla consegna (giorno 0), é stato seminato nella vasca V1 (ciclo V1b).

Dopo la semina del 12 maggio risultavano 10.500 larve a giorno 0/1 nella V1 (ciclo V1b).

Riassorbimento del sacco vitellino (dalla semina all'inizio dell'alimentazione)

Per tutti i cicli, durante la fase iniziale di riassorbimento del sacco vitellino, le condizioni in vasca sono rimaste le seguenti:

- luce spenta;
- unico punto di aerazione centrale, senza pietra porosa;
- circolazione a circuito chiuso, sia attraverso il filtro biologico mediante pompa, che attraverso il filtro intermedio mediante air-lift.

Cicli V1a - Semina del 27 aprile 2005

Il ciclo V1a é stato avviato con la semina di larve a giorno 1/2 dopo la schiusa, ad una densità di 8,5 larve per litro. Già dalla mattina successiva (giorno 2/3), la densità in vasca risultava quasi nulla: un controllo sul filtro di superficie aveva evidenziato la presenza di numerose larve morte, inducendo a ridurre il ricambio da 4 a 2,4, poi a 1 litri / min. Al terzo giorno (giorno 3/4), il ciclo é stato eliminato per assenza di larve vive.

Nei 3 giorni di durata del ciclo, i principali parametri in vasca sono stati i seguenti: temperatura di 17,4±0,4°C, ossigeno disciolto tra 7,2 e 7,3 mg/litro, e nitriti tra 0,03 e 0,10 mg/litro (vedere allegato 1). Questo primo ciclo ha messo in evidenza la necessità di mantenere un ricambio limitato, dopo la schiusa e per i primi giorni di allevamento larvale. In effetti le larve appena schiuse sono molto piccole e poco attive.

Il calo registrato nella prima notte dopo la semina é probabilmente dovuto a diversi fattori:

- ricambio iniziale troppo elevato;
- sbalzi termici nelle operazioni di trasferimento;
- problemi di qualità della semina (1);
- stress di trasporto (trasporto di larve).

(1) Nel periodo di incubazione presso l'impianto di Pellestrina, si era già registrata una mortalità del 44 % tra giorno 0/1 e giorno 1/2, mortalità che é probabilmente proseguita nel trasporto e dopo la semina.

	Data	Lotto	Giorno	Stima	Densità larvale
Pellestrina	26 apr.	A1+A2	0/1	8.000 larve	-
	27 apr.	A1+A2	1/2	4.500 larve	-
Trasferimento P.M. (Trasporto larve)					
Torre Cerrano	27 apr.	V2	1/2	4.500 larve	8,5 larve / litro
	28 apr.	V2	2/3	Quasi niente	-
	29 apr.	V2	3/4	Niente	-
Fine ciclo					

Tabella 8 - Ciclo V2a - Riassunto fase iniziale

Cicli V1a - Semina del 27 aprile 2005

Sulla base dei dati medi precedentemente riportati (capitolo 2), é stata applicata una percentuale di schiusa del 70 % sul numero di uova stimato alla consegna (lotti B e C) e dopo l'integrazione della semina (lotto D). Ne deriva un totale teorico di 25.500 larve a giorno 0/1/2 dopo la schiusa, con una densità iniziale di 48,5 larve per litro. Il giorno successivo (giorno 1/2/3), sulla base delle valutazioni visive e di alcune conte di controllo, si é stimato una rimanenza in vasca di circa 13.500 larve, ossia una mortalità relativa del 47 %. A giorno 2/3/4 (inizio dell'alimentazione alle 17.00), secondo lo stesso procedimento, la popolazione in vasca é stato stimata pari a 8.000 larve (15 larve per litro) con una mortalità relativa del 40,5 %. La mortalità relativa complessiva, registrata nei primi due giorni, risulta dunque pari al 68,5 % delle larve schiuse.

	Data	Lotto	Giorno	Stima	Densità larvale
Pellestrina	27 apr.	B C D	0 -1 -2	14.000 uova 14.000 uova -	-
Trasferimento P.M. (Trasporto uova e larve)					
Torre Cerrano	27 apr.	B + C D	-1/0 -2	28.000 uova/larve -	-
	28 apr.	D	-1	8.500 uova	-
		Aggiunta Lotto D nella V1			
		V1	-1/0/1	36.500 uova/larve	
	Schiusa completata (Percentuale di schiusa del 70 %)				
	29 apr.	V1	0/1/2	25.500 larve	48,5 larve / litro
	30 apr.	V1	1/2/3	13.500 larve	25,5 larve / litro
	01 mag.	V1	2/3/4	8.000 larve	15 larve / litro
	Inizio alimentazione alle 17.00				

Tabella 9 - Ciclo V1a - Riassunto fase iniziale

Nei 4 giorni di schiusa e di riassorbimento del sacco vitellino, i principali parametri in vasca sono rimasti stabili: temperatura di 17,5±0,5 °C, ossigeno disciolto tra 7 e 7,3 mg/litro, e nitriti tra 0,03 e 0,07 mg/litro (vedere allegato 1). Come nel ciclo V2a, un controllo sul filtro di superficie aveva evidenziato la presenza di uova e di larve morte e aveva indotto a ridurre il ricambio da 4 a 2,4, poi a 1 litri/min. Rispetto al ciclo precedente, l'impatto del ricambio elevato (4 litri/min), risulta comunque minore in quanto 2 lotti non erano ancora schiusi quando il ricambio é stato abbassato.

Il calo registrato durante i primi 2 giorni di allevamento larvale, é probabilmente dovuto a diversi fattori:

- ricambio iniziale troppo elevato;
- sbalzi termici nelle operazioni di trasferimento;
- problemi di qualità della semina.

Cicli V2b - Semina del 30 aprile 2005

Sulla base dei dati medi precedentemente riportati (capitolo 2), é stata applicata una percentuale di schiusa del 70 % sul numero di uova stimate alla consegna (lotti B e C), nonché una mortalità del 30 % sul lotto di larve (lotto A). Ne deriva una rimanenza teorica di 38.000 larve a giorno 0/1/2 dopo la schiusa, con una densità iniziale di 72,5 larve per litro.

Il giorno successivo (giorno 1/2/3, con inizio dell'alimentazione alle 09.00), sulla base delle valutazione visive e di alcune conte di controllo, si é stimato una rimanenza in vasca di circa 15.000 larve (28,5 larve per litro), ossia una mortalità relativa del 60,5 %.

	Data	Lotto	Giorno	Stima	Densità larvale
Pellestrina	30 apr.	A B C	0 -1 -2	27,000 larve 14,000 uova 14,000 uova	-
Trasferimento P.M. (Trasporto uova e larve)					
Torre Cerrano	30 apr.	V2	-2/-1/0	55,000 uova/larve	-
	01 mag.	V2	-1/0/1	-	-
	Schiusa completata (Percentuale di schiusa del 70 %)				
	02 mag.	V2	0/1/2	38,000 larve	72,5 larve / litro
	03 mag.	V2	1/2/3	15,000 larve	28,5 larve / litro
	Inizio alimentazione alle 09.00				

Tabella 10 - Ciclo V2b - Riassunto fase iniziale

Durante la fase di schiusa e di riassorbimento del sacco vitellino, i principali parametri in vasca sono rimasti stabili: temperatura di 17,5±0,5 °C, ossigeno disciolto tra 7,2 e 7,5 mg/litro, e nitriti tra 0,01 e 0,06 mg/litro (vedere allegato 1). Sulla base delle osservazioni sulla semina del 27 aprile, il ricambio é stato mantenuto su 2 litri/min.

Il calo registrato durante i primi giorni di allevamento larvale, é probabilmente riconducibile agli sbalzi termici nelle operazioni di trasferimento e ai problemi di qualità della semina.

Cicli V1b - Semina del 12 maggio 2005

Il ciclo V1b é stato avviato con la semina di larve a giorno 0/1 dopo la schiusa, ad una densità di 20 larve per litro. Da giorno 1/2 a giorno 2/4, si é registrato un calo progressivo della densità in vasca.

	Data	Lotto	Giorno	Stima	Densità larvale
Pellestrina	9 mag.	A	-2	21,000 uova	-
	10 mag.	A B	-1 -2	- 11,000 uova	-
	11 mag.	A B	0 -1	9,000 larve 10,000 uova	-
	Schiusa completata (Schiusa del 43 % lotto A e del 60 % lotto B)				
	12 mag.	A	1	4,500 larve	-
		B	2	6,000 larve	
Trasferimento P.M. (Trasporto larve)					
Torre Cerrano	12 mag.	V1	1/2	10,500 uova/larve	20 larve / litro
	13 mag.	V1	2/3	Calo progressivo	-
	14 mag.	V1	3/4		-
	15 mag.	V1	3/4		-
	Inizio alimentazione alle 09.00				

Tabella 11 - Ciclo V1b - Riassunto fase iniziale

Trattandosi delle ultime deposizioni, l'insuccesso di quest'ultimo ciclo é principalmente riconducibile alla qualità della semina. Il ciclo V1b é stato eliminato al secondo giorno di alimentazione e 5 giorni dopo la semina. Il calo registrato dopo la semina é probabilmente dovuto a diversi fattori:

- problemi di qualità della semina (2);
- sbalzi termici nelle operazioni di trasferimento;
- stress di trasporto (trasporto di larve).

(2) Nel periodo presso l'impianto di Pellestrina, si é registrato una percentuale di schiusa del 43 % e una mortalità del 50 % tra giorno 0 e giorno 1 per il lotto A, e una percentuale di schiusa del 60 % per il lotto B.

2.3 PERIODO DA GIORNO 3 A GIORNO 25

A giorno 2/3/4 dopo la schiusa (giorno 3), si stimava una densità larvale in V1 (ciclo V1a) di 15 larve per litro. A giorno 1/2/3 dopo la schiusa (giorno 2), si stimava una densità larvale in V2 (ciclo V2b) di 28,5 larve per litro. Dopo circa 10 giorni di allevamento larvale, le larve dei due cicli, rispettivamente a giorno 9/10/11 e a giorno 12/13/14 (mediamente giorno 12), sono state accorpate nella V2.
Nel prosieguo della relazione, per maggiore semplicità, l'età é indicato mediante un unico valore medio come precedentemente indicato tra parentesi e senza la specifica "dopo la schiusa".

Condizioni in vasca

Per i due cicli e per tutto il periodo considerato le condizioni in vasca sono rimaste costanti:

- temperatura in vasca di 17,5±0,6°C;
- ossigeno disciolto di 7,4±0,4 mg / litro;
- a giorno 7 (V1a) e giorno 4 (V2b), ricambio in vasca aumentato da 2 a 3 litri / min;
- circolazione a circuito chiuso, con rinnovi giornalieri in vasca e/o nel filtro;
- concentrazioni di nitriti tra 0,04 e 0,11 mg / litro;
- n°1 punto centrale di aerazione senza pietra porosa (aumento progressivo);
- ascensione della luce in corrispondenza della prima somministrazione di alghe e di rotiferi, poi tutti giorni dalle 08.30 alle 21.00;
- luce attenuata mediante un telo ombreggiante tra il neon e la vasca;
- filtro di superficie con rete da 55 µm fino a giorno 5, con rete da 100 µm fino a giorno 19 e con rete da 100 (di giorno) o 245 µm (di notte) successivamente.

Tutte le variazioni sono riassunte in allegato 1.

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 2.

Ciclo V1a

All'inizio dell'alimentazione esogena (giorno 3), si stimava una popolazione in V1 (ciclo V1a) di 8.000 soggetti (15 larve per litro). Nei giorni successivi, sulla base di valutazioni visive e di conte di controllo, si é proceduto giornalmente alla stima della rimanenza in vasca. A giorno 13, 970 larve sono state contate e trasferite in V2.
La resa del ciclo V1a a giorno 13, rispetto al numero di larve schiuse (25.500 soggetti) risulta del 3,8 %. Le mortalità relative, ri-calcolate per l'intero ciclo, sono espresse graficamente in figura 15. Le mortalità registrate sono principalmente riconducibili alla scarsa qualità della semina.

Ciclo V2b

All'inizio dell'alimentazione esogena (giorno 2), si stimava una popolazione in V2 (ciclo V2b) di 15.000 soggetti (28,5 larve per litro). Nei giorni successivi, sulla base di valutazioni visive e di conte di controllo, si é proceduto giornalmente alla stima della rimanenza in vasca. A giorno 10, prima dell'aggiunta delle larve proveniente dal ciclo V1a, si stimava un rimanenza nella V2 di circa 5.000 larve.

La resa del ciclo V2b a giorno 10, rispetto alle larve schiuse (38.000 soggetti) risultava del 13,2 %. Le mortalità relative, ri-calcolate per l'intero ciclo, sono espresse graficamente in figura 16. Ad eccezione di un problema di intasamento notturno del filtro di superficie che ha determinato la perdita circa 5.000 larve, le mortalità registrate sono notevolmente minori rispetto al ciclo precedente.

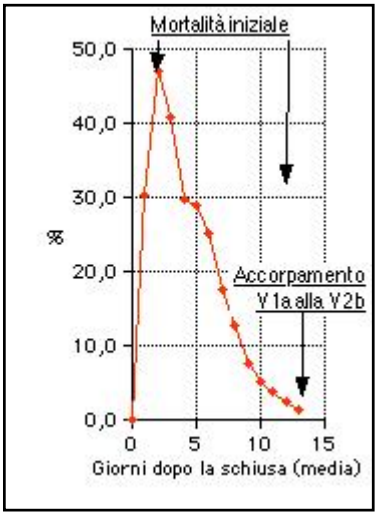


Figura 15 - Curva delle mortalità relative del ciclo V1a

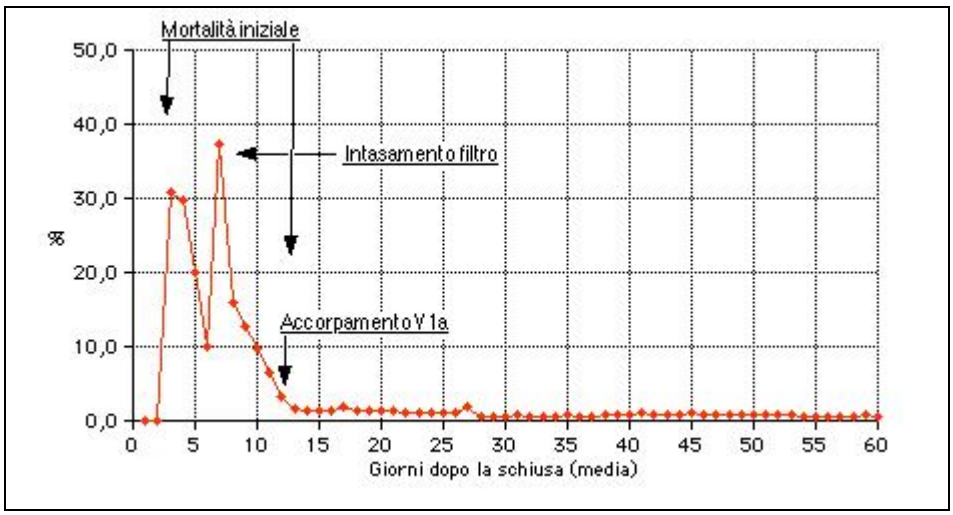


Figura 16 - Curva delle mortalità relative del ciclo V2b e dopo l'accorpamento V1a-V2b

Prima dell'accorpamento, l'andamento delle mortalità é stato simile per i due cicli, anche se meno grave nel ciclo V2b. Successivamente e fino a giorno 25, le mortalità sono rimaste costanti tra 1 e 1,5 % al giorno.

Somministrazione delle alghe

I due cicli sono stati condotti con la tecnica detta delle "acque verdi", tecnica 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.

A giorno 3 (ciclo V1a) e a giorno 2 (ciclo V2b), successivamente all'apertura della bocca delle larve del primo lotto di ciascun ciclo, si é provveduto all'ascensione della luce, alla prima aggiunta di alghe e alla prima somministrazione di rotiferi. Nei giorni successivi, le alghe sono state aggiunte in vasca, alle 09.00 della mattina, immediatamente dopo l'ascensione della luce e prima dell'inizio di somministrazione dei rotiferi.
Dalla prima somministrazione fino a giorno 12 per il ciclo V1a e a giorno 9 per il ciclo V2b, l'aggiunta giornaliera, di circa 15-20 litri di coltura matura di *Nannochloropsis sp.* (30-40 milioni di cellule per cc), era equivalente ad una concentrazione in vasca di allevamento larvale di 750.000 cellule algali per cc. Nel periodo successivo e fino a giorno 17 (cicli accorpati), la concentrazione algale é stata mantenuta su una media di 500.000 cellule algali per cc. Negli ultimi 2 giorni (giorno 18 e giorno 19) la concentrazione é stata ulteriormente ridotta a circa 300.000 cellule algali per cc.

Somministrazione dei rotiferi e controllo dell'alimentazione

Da giorno 3-4 a giorno 21, i rotiferi sono stati somministrati tutti giorni, dalle 09.00 alle 21.00, mantenendo una concentrazione di prede in vasca tra 10 e 25 rotiferi per 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 2-3 ore).
I quantitativi giornalieri somministrati sono riassunti in tabella 12.

Periodo	Rotiferi somministrati (milioni/giorno)	Rimanenza media alle ore 09.00 (n/cc)	Osservazioni
Ciclo V1a			
Giorno 3	1.5	-	Alimentazione alle 17.00
Giorno 4 - Giorno 8	5.3	4.4	da 10/15 a 7,5 rotiferi / cc
Giorno 9 - Giorno 13	5.3	3.3	7,5 rotiferi / cc
Ciclo V2b			
Giorno 2	1.5	-	Alimentazione alle 09.00
Giorno 3 - Giorno 7	6.5	4.7	da 15 a 10 rotiferi / cc
Giorno 8 - Giorno 10	7.9	2.7	10 rotiferi / cc
Ciclo V1a + ciclo V2b			
Giorno 12 - Giorno 16	11.7	2.7	da 10 a15 rotiferi / cc
Giorno 17 - Giorno 21	12.6	7.4	15-25 rotiferi / cc (Inizio artemia a giorno 20)

Tabella 12 - Rotiferi somministrati

Ciclo V1a

I quantitativi giornalieri somministrati sono rimasti invariati nel periodo considerato, ma sono aumentati progressivamente se riportati alla popolazione larvale rimasta in vasca, passando da 1,5 milioni a 2,1 milioni al giorno ogni 1.000 larve. Tali quantitativi risultano sproporzionati, ma derivano dal fatto che maggiore parte dei rotiferi somministrati sono stati poi eliminati con l'acqua di ricambio, senza essere effettivamente consumati. In effetti, considerata la ridotta densità larvale in vasca, é stato difficile trovare un equilibrio tra la densità di prede (n°rotiferi per cc) necessaria a garantire una corretta alimentazione e l'opportunità di evitare la permanenza dei rotiferi del giorno precedente.

Dall'inizio dell'alimentazione e fino a giorno 9, i controlli sull'alimentazione larvale (vedere tabella 13) hanno fatto registrare una certa variabilità, caratterizzata dalla presenza di numerose larve con al massimo uno o due rotiferi nella pancia. Al contrario, da giorno 10, le larve prelevate sono risultate tutte con la pancia piena, a conferma della voracità che si riscontrava anche dall'osservazione del comportamento in vasca.

Giorno	Pancia piena e semi-piena	Note
3	30%	Molte larve con bocca chiusa
4	72%	Ancora larve con bocca chiusa
5	-	
6	100%	35 % delle larve con solo 1 o 2
7	87%	rotiferi nella pancia
8	70%	" "
9	100%	" "
10	100%	Larve molto voraci e tutte
11	100%	con la pancia piena.
12	100%	" "
13	-	

Tabella 13 - Controllo dell'alimentazione del ciclo V1a

Ciclo V2b

Rispetto al ciclo precedente, l'alimentazione é stata anticipata di 36 ore con una risposta alimentare immediata (80 % delle larve regolarmente alimentate a giorno 3). Ciò sembra dimostrare che il primo lotto del ciclo (lotto A), malgrado l'avvenuta schiusa durante il trasporto, abbia avuto una sopravvivenza superiori rispetto a quella degli altri due lotti.

I quantitativi giornalieri somministrati sono rimasti invariati nel periodo considerato, ma sono aumentati progressivamente se riportati alla popolazione larvale rimasta in vasca, passando 0,6 milioni a 0,9 milioni al giorno ogni 1.000 larve. La maggiore densità larvale in vasca rispetto al ciclo V1a, ha reso più agevole trovare un equilibrio tra la densità di prede (n° rotiferi per cc) necessaria a garantire una corretta alimentazione e l'opportunità di evitare la permanenza di rotiferi del giorno precedente. Di conseguenza, il rapporto tra quantitativi somministrati e consumi effettivi é risultato più congruo.

Giorno	Pancia piena e semi-piena	Note
2	-	Ancora larve con bocca chiusa
3	80%	Alcune larve con solo 1 o 2
4	70%	rotiferi nella pancia
5	100%	" "
6	100%	" "
7	100%	" "
8	88%	Larve molto voraci e tutte
9	100%	con la pancia piena.
10	-	

Tabella 14 - Controllo dell'alimentazione del ciclo V2b

Dall'inizio dell'alimentazione e fino a giorno 8, i controlli sull'alimentazione larvale (vedere tabella 14) hanno fatto registrare una minore variabilità rispetto al ciclo V1a, con la presenza di poche larva con al massimo uno o due rotiferi nella pancia. Da giorno 9, le larve prelevate sono risultate tutte con la pancia piena ed estremamente voraci.

Nell'insieme il comportamento alimentare e la gestione del ciclo V2b sono risultati più soddisfacenti rispetto al ciclo V1a. In assenza di altri lotti larvale di migliore qualità per fare un confronto più attendibile, sembra emergere che la debole risposta alimentare iniziale delle larve del ciclo V1a possa essere attribuita alla scarsa qualità della semina piuttosto che a un normale comportamento della specie. Rimane comunque il fatto che le larve di sogliola presentano una attività limitata nei primi giorni di alimentazione, comportamento che giustifica una densità iniziale di prede in vasca dell'ordine di 15-25 rotiferi per cc.

Dopo accorpamento V1a + V2b

I quantitativi giornalieri somministrati sono rimasti invariati nel periodo considerato, per attestarsi tra 2 e 2,4 milioni al giorno ogni 1.000 larve. In questo caso, le mortalità essendo ridotte, lo scarso aumento dei consumi é riconducibile ai cambiamenti nel comportamento alimentare, nonché ad un probabile ritardo nell'inizio di somministrazione di artemia.

Dall'accorpamento in poi, il comportamento alimentare é stato condizionato dall'inizio della metamorfosi e dal passaggio da un comportamento pelagico ad un comportamento bentonico. Da giorno 13 in poi, la percentuale di larve appoggiate sul fondo é aumentata progressivamente fino ad interessare maggiore parte popolazione in vasca (giorno 19-20).

Da giorno 16 a giorno 20, lo spostamento progressivo delle larve in prossimità del fondo, dove, ad eccezione di qualche breve spostamento, rimanevano immobili, é stato accompagnato da un calo dei consumi di rotiferi. Malgrado un aumento dell'aria al fine di favorire una migliore ripartizione dei rotiferi nell'intera colonna d'acqua e una densità di prede fino a 25 rotiferi per cc, i consumi sono rimasti invariati.

Somministrazione dei nauplii di Artemia (A0) e controllo dell'alimentazione

Da giorno 20 a giorno 25, l'artemia A0 (nauplii appena schiusi) é stata somministrata tutti i giorni, dalle 09.00 alle 21.00, mantenendo una concentrazione di prede in vasca compresa tra 0,5 e 1 A0 per 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 2-3 ore).

Dal primo giorno di somministrazione, 100 % delle larve controllate avevano mangiato almeno 2 nauplii. Nei sei giorni di somministrazione di A0 i consumi giornalieri sono aumentati progressivamente da 0,25 a 0,75 milioni al giorno, con una media di 0,56 nauplii al giorno. Per tutto il periodo considerato, il comportamento alimentare delle larve é rimasto nella norma e tutte le larve controllate sono risultate regolarmente alimentate.

Controlli vescica natatoria

Considerati la dimensione della vasca e il comportamento poco attivo delle larve fino a giorno 10, non é stato possibile posizionare gli schiumatori di superficie al fine prevenire la formazione di un film oleoso sul pelo dell'acqua, fenomeno che notoriamente ostacola la normale insufflazione della vescica natatoria. Uno schiumatore é stato posizionato in V2 da giorno 18, solo in modo da mantenere la superficie dell'acqua pulita (5 ore al giorno).

Da giorno 12 a giorno 20, nell'ambito dei controllo sull'alimentazione larvale, é stata anche rilevata la percentuale di soggetti con vescica natatoria. Tale percentuale non ha mai superato il 25 % dei soggetti controllati ed é spesso risultato superiore nei soggetti prelevati a galla, rispetto a quelli presi sul fondo.

Giorno	Vescica natatoria
12	25%
13	26%
14/16	-
17	22%
18	0%
19	-
20	20%

Tabella 15 - Controlli vescica natatoria

Sembra comunque che lo sviluppo della vescica natatoria non sia di fondamentale importanza nella sogliola (specie bentonica) e che avvengono con modalità diverse rispetto alle specie pelagiche comunemente allevate (spigole, orate, ecc....).

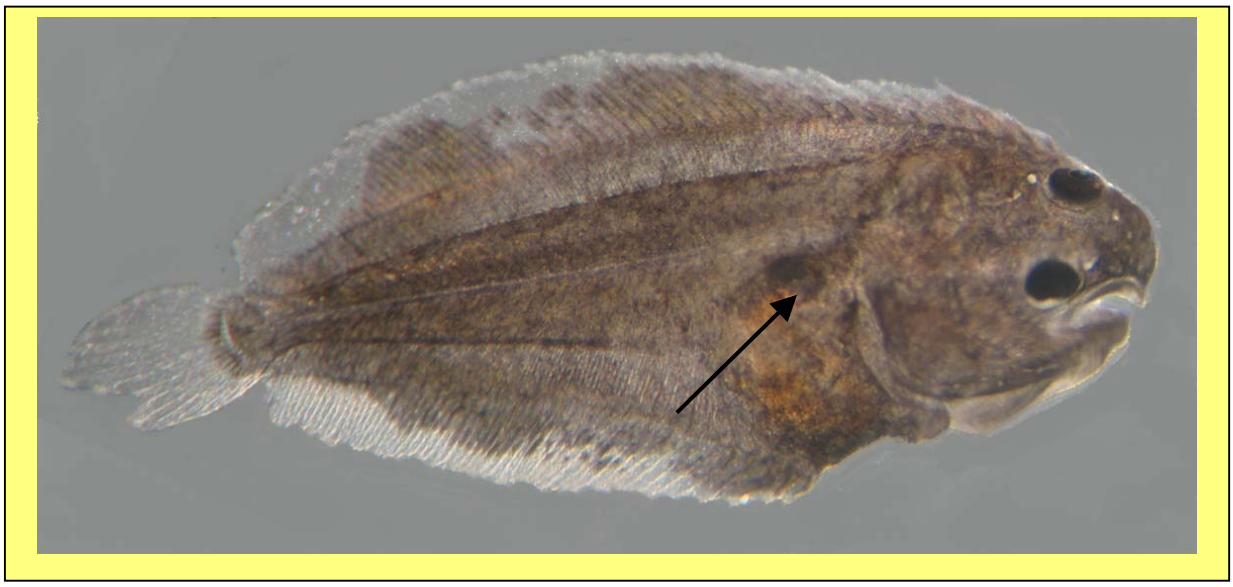


Figura 17 - Vescica natatoria su una larva di 21 giorni

Bilancio del periodo da giorno 0 a giorno 25

Il protocollo iniziale, definito sulla base dei risultati pubblicati da "Veneto Agricoltura" e impostato per una temperatura media di 17,5°C e una densità di circa 120 larve per litro, prevedeva una somministrazione di 25-35 rotiferi per cc rotiferi fino a giorno 18-20 e una somministrazione di nauplii di artemia da giorno 16-18. Purtroppo la scarsa densità larvale e le difficoltà di gestione della vasche hanno comportato una serie di variazioni. Tuttavia, sulla base dell'esperienza maturata e in vista di futuri cicli sperimentali, emergono i seguenti elementi di sintesi.

a) Vasca di allevamento larvale
Nella fase iniziale, fino a giorno 8-10, con larve pelagiche molto piccole e poco attive, sarebbe stato opportuno disporre di vasche più larghe, in modo da evitare problemi di gestione del filtro di superficie e dello schiumatore. Successivamente, dal momento in cui le larve adottano un comportamento bentonico, vasche tronco-coniche sarebbero state idonee in quanto le larve aderiscono senza nessun problemi sia sul fondo sia sulle pareti. Considerata poi l'impossibilità, prima di giorno 25, di sifonare correttamente il fondo senza catturare o rovinare le larve, la scelta iniziale di dotare le vasche di un fondo piatto é risultata inopportuna. Infine, sia per il controllo delle larve che per il trasferimento a fine ciclo, risulta comunque opportuno disporre di vasche non troppo profondi. Di conseguenza, vasche tronco-coniche, con un'altezza del cilindro pari alla metà del diametro e un'altezza del cono pari ad un terzo del diametro, risponderebbero bene alle varie esigenze del primo periodo.

Inoltre, con le vasche in vetro-resina non verniciata (marrone chiaro) é risultato spesso difficile vedere i soggetti meno pigmentati. Di conseguenza, sarebbe opportuno per la gestione ed il controllo, disporre di vasche verniciate di grigio, anche se rimane da chiarire quale effetto può avere il colore della vasca sull'effettiva pigmentazione delle larve.

b) Gestione iniziale delle vasche di allevamento larvale
Nella fase iniziale, fino a giorno 8-10, in cui le larve sono particolarmente piccole e poco attive, é opportuno limitare al massimo i ricambi in vasca (inferiore 5 % per ora) e mantenere l'aria abbastanza bassa. Nell'ipotesi di disporre di vasche tronco-coniche e considerate le difficoltà di sifonamento, sarebbe opportuno procedere giornalmente ad uno spurgo dal fondo.
Nel dubbio a riguardo dell'importanza o meno dello sviluppo della vescica natatoria, e disponendo di vasche con maggiore superficie rispetto al volume utile, sarebbe opportuno procedere, da giorno 3, alla rimozione del film oleoso superficiale mediante il posizionamento di almeno un schiumatore (triangolo aperto).

c) Gestione dell'alimentazione larvale

Considerati da un lato i problemi di alimentazione con rotiferi riscontrati da giorno 17 a giorno 22 e dall'altro l'ottima risposta alle prime somministrazione di artemia (giorno 20), sarebbe stato opportuno anticipare il passaggio rotiferi-artemia di 5 giorni.
Per il futuro, la programmazione potrebbe essere la seguente:

- inizio dell'alimentazione a giorno 3;
- "acque verdi" da giorno 3 a giorno 16, con 500-750.000 cellule per cc;
- somministrazione di rotiferi arricchiti da giorno 3 a giorno 16, con densità di prede in progressivo aumento da 15 a 25-30 rotiferi per cc;
- somministrazione di nauplii di artemia da giorno 14 a giorno 20, con densità di prede 1-1,5 A0 per cc.

d) Sviluppo e metamorfosi

Alla temperatura di 17,5°C e nella condizioni precedentemente descritte:

- risultavano già soggetti con insufflazione della vescica natatoria a giorno 12;
- l'inizio di migrazione dell'occhio si é riscontrata nei primi soggetti a giorno 15;
- il passaggio ad un comportamento bentonico si é svolto progressivamente da giorno 13 a giorno 19-20;
- a giorno 25, la metamorfosi era completata nell'intera popolazione.

Le suddette osservazioni trovano conferma nei dati bibliografici disponibili.

2.4 PERIODO DA GIORNO 26 A GIORNO 59

L'inizio di questo periodo é stato determinato dalla sospensione definitiva delle somministrazioni congiunte di alghe e di rotiferi. Per tutto il periodo considerato le larve sono rimaste in V2 (cicli V1a e V2b accorpati) dove sono state regolarmente svezzate a mangime.

Condizioni in vasca

Per il periodo da giorno 26 a giorno 49 le condizioni in vasca sono rimaste costanti:

- temperatura in vasca di 17,8±0,5°C;
- ossigeno disciolto di 7,5±0,3 mg/litro;
- ricambio in vasca aumentato a giorno 40, da 3 a 4 litri/min;
- circolazione a circuito chiuso, con rinnovi giornalieri nel filtro;
- concentrazioni di nitriti tra 0,02 e 0,07 mg/litro;
- n°1 punto centrale di aerazione senza pietra porosa (aumento progressivo);
- luce dalle 08.30 alle 21.00, attenuata mediante un telo ombreggiante;
- di giorno, filtro di superficie con rete da 100 µm e di notte filtro con rete da 245 µm.

Da giorno 50 a giorno 59, i seguenti parametri hanno subito le alcune variazioni:

- temperatura in vasca di 19±1°C, con maggiore variabilità;
- ossigeno disciolto di 7,0±0,5 mg/litro, in lieve calo;
- ricambio in vasca costante di 4 litri/min;
- circolazione a circuito chiuso, con rinnovi giornalieri nel filtro;
- concentrazioni di nitriti tra 0,06 e 0,10 mg/litro.

Tutte le variazioni sono riassunte in allegato 1.

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 2. Le mortalità relative, ri-calcolate per l'intero ciclo, sono espresse graficamente in figura 16.
Per tutto il periodo da giorno 26 a giorno 59, le mortalità sono rimaste costanti tra 0,5 e 1 % al giorno. Il 28 giugno (giorno 59) si stima una rimanenza in V2 di 3.900 avannotti.

Somministrazione dell'Artemia arricchita (A1)

Da giorno 26 a giorno 50, l'artemia arricchita (A1) é stata somministrata tutti giorni, dalle 09.00 alle 21.00, mantenendo una concentrazione costante di prede in vasca di 1 A1 per 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 (ogni 2-3 ore). I quantitativi giornalieri somministrati sono riassunti in tabella 16.

Periodo	Tipo	Artemie somministrate (milioni/giorno)	Rimanenza media alle ore 09.00 (n°/cc)	Osservazioni
Giorno 20 - Giorno 25	A0	0.56	0.36	Fine alghe e rotiferi a gg. 21
Giorno 26 - Giorno 30	A1	1.21	0.04	
Giorno 31 - Giorno 35	A1	1.24	0.00	Giorno 33 - Inizio mangime
Giorno 36 - Giorno 40	A1	1.44	0.00	
Giorno 41 - Giorno 45	A1	1.57	0.00	
Giorno 46 - Giorno 50	A1	1.46	0.00	
Giorno 51 - Giorno 55	A1	1.04	0.04	Giorno 51 - Inizio riduzione A1
Giorno 56 - Giorno 58	A1	0.50	0.00	Giorno 58 - Fine A1

Tabella 16 - Artemie somministrate

Da giorno 26 a giorno 50, i consumi di A1 sono aumentati regolarmente e i controlli sull'alimentazione larvale hanno evidenziato un comportamento alimentare nella norma. Da giorno 51 a giorno 58, i quantitativi di artemia arricchita (A1) somministrati sono stati progressivamente ridotti fino ad essere totalmente sostituiti dalla diete artificiale utilizzata per lo svezzamento.

Svezzamento

La somministrazione della diete artificiale si é svolta manualmente, 4-8 volte al giorno, distribuendo il mangime in più punti della vasca. Considerati la popolazione rimasta in vasca e la dimensione della stessa non é stato ritenuto opportuno ricorrere a sistemi di distribuzione automatica.

Periodo	Granulometria (micron)	Quantità somministrata (grammi/giorno)	Osservazioni
Giorno 33 - Giorno 34	< 400	2	Giorno 33 - Inizio mangime
Giorno 35 - Giorno 37	" "	3	
Giorno 38 - Giorno 41	" "	4	
Giorno 42 - Giorno 44	" "	5	
Giorno 45 - Giorno 46	" "	6	
Giorno 47 - Giorno 48	" "	8	
Giorno 49	" "	10	
Giorno 50	" "	12	
Giorno 51	" "	14	Giorno 51 - Inizio riduzione A1
Giorno 52	" "	16	
Giorno 53	" "	18	
Giorno 54 - Giorno 56	" "	20	
Giorno 57 - Giorno 58	" "	24	Giorno 58 - Fine A1
Giorno 59	" "	30	Solo dieta artificiale

Tabella 17 - Somministrazione di mangime

Da giorno 33 a giorno 50, i ridotti quantitativi somministrati hanno avuto lo scopo di abituare le larve al mangime e di stimolare il loro metabolismo enzimatico, in concomitanza con lo sviluppo e la differenziazione dell'apparato digerente. Dopo pochi giorni dall'inizio di somministrazione del mangime, si poteva osservare un'ottima risposta delle larve, con un aumento dell'attività in vasca in concomitanza con la distribuzione del mangime. Un controllo sull'alimentazione, svolto a giorno 48, cioè prima dell'inizio di riduzione dell'artemia A1, ha evidenziato che 70 % dei soggetti presentava, in modo evidente, del mangime all'interno dell'apparato digerente. Da giorno 51 a giorno 58, si é proceduto allo svezzamento, con passaggio progressivo dall'alimento vivo (A1) alla dieta artificiale. A giorno 59, tutti gli avannotti erano svezzati.

Bilancio del periodo da giorno 26 a giorno 59.

a) Comportamento
Completata la metamorfosi le larve hanno adottato un comportamento tipicamente bentonico per la maggiore parte della giornata. Tuttavia, durante le ore di luce e di alimentazione si osservano sempre numerose larve che nuotano nei pressi della superficie e lungo la parete. Nell'arco della giornate le proporzioni di larve immobili sul fondo, immobili sulle pareti o in acqua, subivano notevoli variazioni.

b) Pigmentazione
Le osservazioni sulla pigmentazione, ha evidenziato una notevole variazione, sia tra i soggetti presenti in vasca, che nei vari stadi dello sviluppo. Nel periodo iniziale da giorno 0 a giorno 15, la pigmentazione, seppure presente e in progressivo aumento, risultava minima e simile in tutte le larve. Da giorno 15 a giorno 40-45, circa 50-60 % dei soggetti in vasca risultavano molto chiari e quasi trasparenti, mentre la rimanente parte della popolazione presentava una pigmentazione evidente anche ad occhio nudo (vedere figure 18 e 19). Un controllo al microscopio, svolto a giorno 26, ha evidenziato, in tutti soggetti prelevati, la presenza di cromatofori , i quali risultavano meno numerosi e puntiformi nei soggetti "chiari" o più numerosi e "scoppiati a stella" nei soggetti "scuri". Non é stato possibile chiarire se un medesimo soggetto, in momenti diversi della giornata, poteva passare da uno stato a quell'altro.
Da giorno 40-45, senza che si siano registrate variazioni significative nelle proporzioni di soggetti "chiari" e di soggetti "scuri", un numero crescente di sogliole ha cominciato a presentare una livrea di tipo adulto (livrea grigia più o meno chiara) con conseguente riduzione progressiva della trasparenza. Da un ulteriore controllo al microscopio, effettuato a giorno 38, non sono emersi cambiamenti di rilievo. E' importante notare che in tutti i soggetti osservati, "chiari" o scuri", i cromatofori erano sempre distribuiti in modo regolare sull'intera superficie corporea.

c) Accumulo di grasso
Le osservazioni di controllo al microscopio hanno evidenziato, nei soggetti da 30 giorni in poi, finché i tessuti sono rimasti abbastanza trasparenti per una corretta osservazione, notevoli accumuli di grasso nella parte posteriore dell'apparato digerente e sotto la dorsale (vedere figura 19). Il grasso si presentava sotto forma di numerose gocce rifrangenti e contigue come evidenziato nella fotografia sottostante.

Sarebbe interessante capire se si tratta di un normale accumulo, presente anche nei soggetti selvatici o se tale riscontro é riconducibile ad un eccesso di grasso nell'alimentazione con alimento vivo arricchito e diete artificiali entrambi ricche di lipidi.

Figura 18 – Larva "chiara" di 40 giorni circa

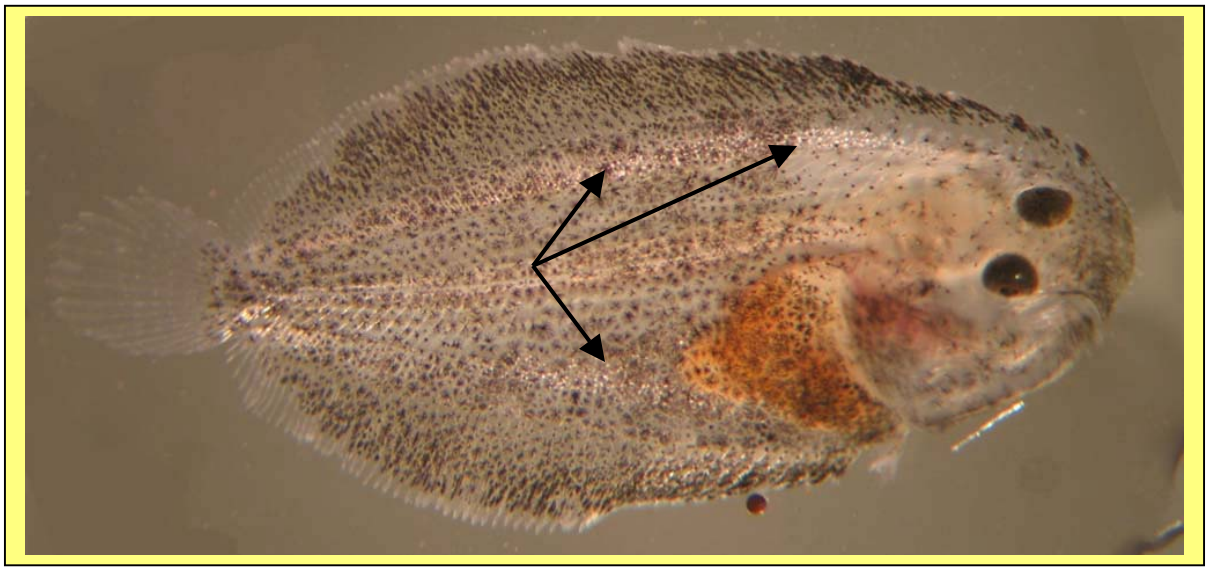


Figura 19 – Larva "scura" di 40 giorni circa
(Le frecce indicano gli accumuli di grasso)

2.5 PERIODO POST-SVEZZAMENTO DA GIORNO 60 A GIORNO 123

Da giorno 60 a giorno 81, per problemi di gestione del circuito chiuso e della vasca V2, gli avannotti sono stato prima trasferiti dalla V2 alla V1 (giorno 66), poi equamente divisi tra le due vasche dopo ripristino della V2 (giorno 70). Lo stress, derivato da detti problemi e dalle successive manipolazione, é stato all'origine di un pesante episodio di mortalità riconducibile ad un infezione da *Vibrio anguillarum*.
A giorno 80-81, ristabilita la situazione sanitaria e come previsto nell'ambito del progetto, tutti i soggetti della V2 e parte di quelli della V1 sono stati trasferiti presso l'impianto "Posidonia" ad Ortona, mentre un centinaio di avannotti sono stati mantenuti presso l'impianto di Torre Cerrano.

Condizioni in vasca nel periodo da giorno 60 a giorno 82

Da giorno 59 a giorno 65, le condizioni in vasca V2 hanno subito ulteriori variazioni rispetto alla fine del periodo precedente:

- temperatura in vasca di 19±1,5°C, con maggiore variabilità giornaliera;
- ossigeno disciolto di 6,5±1 mg/litro, in ulteriore calo e con minimi pomeridiani;
- ricambio in vasca invariato di 4 litri/min;
- circolazione a circuito chiuso, con rinnovi giornalieri sia in vasca, che nel filtro;
- concentrazioni di nitriti in aumento, comprese tra 0,08 e 0,11 mg/litro;
- aumento dell'aerazione centrale.

A fine di contenere l'aumento dei nitriti dovuto al notevole aumento della razione giornaliera di mangime, con passaggio da 10 g (giorno 49) a 40 g al giorno (giorno 65), sono stati ripresi i rinnovi di acqua direttamente in vasca. In occasione di una delle operazioni di rinnovo (giorno 65), il fondo piatto della vasca V2 ha subito uno spostamento, costringendo ad un immediato trasferimento degli avannotti nella vasca V1.
Da giorno 66 a giorno 69, le condizioni in vasca V1, sono state caratterizzate da un funzionamento a fase alterne del circuito chiuso e dal conseguente ulteriore aumento delle temperature in vasca (21±0,5°C). I rinnovi di acqua in vasca hanno consentito di mantenere i nitriti in tra 0,07 e 0,08 mg/litro.
Da giorno 70 a giorno 82, dopo ripristino della vasca V2 e divisione degli avannotti tra V1 e V2, le condizioni in vasca sono state caratterizzate da un progressivo aumento delle temperature medie da 22 a 26°C, dovuto alla progressiva eliminazione della circolazione a circuito chiuso e alla conseguente esclusione della pompa di calore. I continui rinnovi di acqua in vasca hanno consentito di mantenere i nitriti in tra 0,05 e 0,12 mg/litro.

Mortalità registrate nel periodo da giorno 60 a giorno 82

A giorno 66, nell'ambito del trasferimento dalla V2 alla V1, sono stati contati 3.700 avannotti. Tra giorno 70 e giorno 72, nell'ambito del secondo trasferimento in modo da dividere gli avannotti tra V1 e V2, 1.700 avannotti sono stati trasferiti nuovamente in V2.
A giorno 82, nel contesto del trasferimento presso l'impianto di Ortona, sono stati contatti 240 pesci in V1 e 330 pesci in V2.

Da giorno 69-70, é stato riscontrato un numero crescente di soggetti con evidente arrossamento a livello cefalico (figura 20). Da giorno 69, si sono registrati le prime mortalità in V1, mentre da giorno 72 la mortalità interessava la popolazione di entrambi le vasche. La mortalità complessiva registrata da giorno 67 a giorno 82, ammonta 3.130 avannotti, ossia al 84,6 % degli avannotti contati nel trasferimento avvenuto a giorno 66.

Sulla base delle indagini batteriologiche e virali, svolte al fine di individuare un eventuale agente patogeno coinvolto nell'episodio di mortalità precedentemente riportato, hanno dato esito negativo nella ricerca della nodavirosi ed esito positivo per *Vibrio anguillarum*.

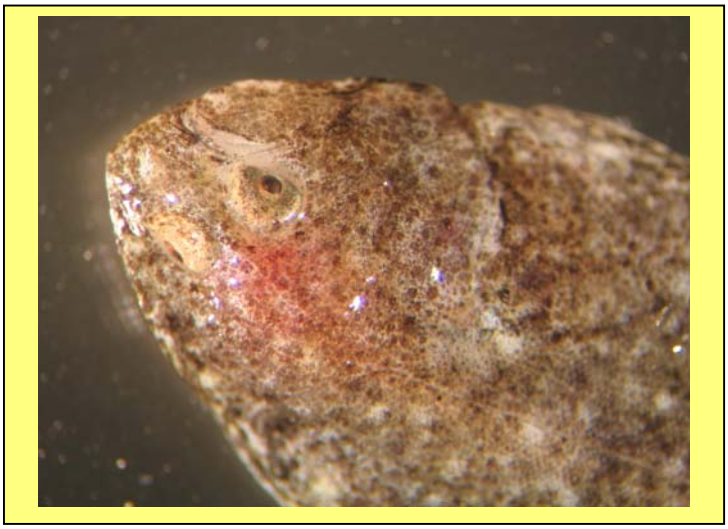


Figura 20 – Arrossamento nei soggetti sintomatici

Tuttavia, la gravità delle mortalità registrate, é riconducibile ad un insieme di fattori inter-connessi senza che sia possibile identificare una causa unica.

a) L'episodio in oggetto si é verificato ne periodo immediatamente successivo allo svezzamento, periodo in cui era comunque prevedibile di registrare la mortalità degli avannotti parzialmente svezzati. Non a caso le prime mortalità hanno interessato i soggetti più piccoli.

b) Il trasferimento svolto in condizioni di urgenza a giorno 66, oltre ad intervenire in un periodo critico, é stato caratterizzato da difficoltà nella pesca dei soggetti aderenti al fondo e alle pareti, con probabili danni cutanei a parte delle popolazione.

c) Il peggioramento delle condizioni in vasca, i livelli di nitriti e i continui interventi di rinnovo dell'acqua, sono stati altrettanti ulteriori fonti di stress.

Tutti questi fattori hanno sicuramente contribuito in modo determinante all'insorgenza della vibriosi.

Periodo da giorno 83 a giorno 123 presso l'impianto di Torre Cerrano

A giorno 81, nel contesto del trasferimento degli avannotti presso l'impianto "Posidonia" ad Ortona, 120 soggetti sono stati tenuti presso l'impianto di Torre Cerrano.

Gli avannotti sono stati mantenuti in una vasca circolare di 0,7 mc, a fondo piatto, di dimensioni ø 1,5 x h. 0,4 m. La vasca, posizionata a terra, era munita da un tubo di carico da un lato e da un tubo di scarico facente livello dal lato opposto. L'adduzione idrica a circuito aperto, con acqua di mare, era assicurata mediante una vasca piezometrica di 0,8 mc. La portata era regolata in modo da garantire almeno un ricambio al giorno.

Nel periodo considerato le condizioni in vasca sono state le seguenti:

- temperatura in vasca di 22±2°C;
- ossigeno disciolto di 6,5±0,5 mg/litro;
- circolazione a circuito aperto, con un ricambio giornaliero;
- concentrazioni di nitriti tra 0,00 e 0,15 mg/litro, con una media di 0,05 mg/litro;
- n°3 punti di aerazione con pietra porosa (aumento progressivo);
- luce dalle 08.30 alle 21.00, attenuata mediante un telo ombreggiante.

Malgrado il funzionamento a circuito aperto, la pulizia periodica delle vasche (2 volte alla settimana) e diversi rinnovi dell'acqua del 80-90 % del volume, i nitriti in vasca hanno fatto registrare in più occasioni dei valori superiori a 0,1 mg/litro.

Figura 21 – Impianto di Torre Cerrano

Durante tutto il periodo considerato, gli avannotti sono stati alimentati con dieta artificiale di granulometria crescente e hanno dimostrato un comportamento alimentare nella norma. la prova di creare un letto di sabbia a fondo vasca ha avuto un riscontro positivo in quanto gli avannotti hanno dimostrato di prediligere le aree con presenza di sabbia. Purtroppo, se da un lato l'esperimento e risultato positivo per le larve, dall'altro ha creato delle notevoli difficoltà nelle operazioni di pulizia del fondo. Nel periodo considerato, la mortalità registrata é stata di 6 soggetti su un totale di 120 avannotti.

Gli avannotti sono stati campionati a giorno 101 e a giorno 117, facendo registrare dei pesi medi rispettivamente di 0,41 e 0,53 grammi. Altri pesi, registrati tra il 22 e il 27 settembre (giorno 145-150), indicavano un peso medio di 0.66 grammi.
Le misure di lunghezza totale sono riportate nel capitolo successivo.

Periodo da giorno 83 a giorno 117 presso l'impianto "Posidonia" ad Ortona

A giorno 80-81, ristabilita la situazione sanitaria e come previsto nell'ambito del progetto, 330 avannotti della V2 e 120 avannotti della V1 sono stati trasferiti presso l'impianto "Posidonia" ad Ortona.

Figura 22 – Impianto di Ortona

Gli avannotti sono stati mantenuti in una vasca rettangolare di 1,5 mc, a fondo piatto, di dimensioni 1,5 x 2,5 x h. 0,4 m. La vasca, posizionata in lieve pendenza, era munita da un tubo di carico da un lato e da una griglia di scarico dal lato opposto. L'adduzione idrica a circuito aperto, con acqua di mare, era assicurata da vasca piezometrica di 0,6 mc.

Il protocollo iniziale prevedeva:

- una temperatura in vasca di 20±2°C;
- 2 punti di aerazione con pietra porosa;
- 12 ore di luce (08.00-20.00) con funzionamento manuale;
- il riempimento della vasca piezometrica 3 volte al giorno;
- l'alimentazione come da tabella, mediante un alimentatore a nastro o manualmente;
- la pulizia del fondo ogni 3 giorni.

Da un campionamento effettuato a giorno 97 (5 agosto 2005), risultava un peso medio di 0.05 grammi, mentre la lunghezza totale degli avannotti appariva circa un terzo delle lunghezze totali dei soggetti rimasti presso l'impianto di Torre Cerrano. Confrontato con il campionamento svolto a giorno 101 presso l'impianto di Torre Cerrano, dal quale risultava un peso medio di 0.41 grammi, si evinceva chiaramente un ritardo di crescita, nonché un evidente stato di denutrizione.
La situazione emersa al controllo è stata interpretata come conseguenza di una serie di fattori fisiologici e di stress all'origine della situazione. Fra i fattori individuati, tre sono sicuramente determinanti:
1 – lo sbalzo termico dalle temperature medie di 26,5 – 27°C presso l'impianto di Cerrano a quelle medie di 20 – 21°C presso la struttura Posidonia. Malgrado l'acqua di mare fosse alla stessa temperatura presso i due siti, la temperatura in vasca presso l'impianto di Ortona subiva un notevole calo in quanto gli impianti erano ubicati in locale semi-interrato e piuttosto freddo. La minore temperatura, oltre a rappresentare un fattore di stress, ha anche comportato un calo della razione alimentare giornaliera;
2 - la qualità dell'acqua; prelevata in zona portuale e senza subire nessun trattamento, potrebbe risultare, sotto vari aspetti, diversa dall'acqua dell'impianto di Torre Cerrano;
3 – il tempo di trasferimento; evidentemente precoce considerata la specie oggetto della sperimentazione.
Inoltre malgrado le raccomandazioni per il rispetto del protocollo fornito e per una maggiore attenzione al comportamento e allo stato degli avannotti, gli addetti incaricati di gestire l'impianto di Ortona hanno sottovalutato le difficoltà, che si è poi si sono rivelate ingestibili nei successivi controlli.
Tra il sopralluogo del 22 agosto e quello del 25 agosto, si è purtroppo riscontrato un pesante episodio di mortalità. Il 25 agosto, 28 avannotti sopravvissuti sono stati riportati presso l'impianto di Torre Cerrano. Gli avannotti, pesantemente denutriti, sono tutti morti nei giorni successivi al trasferimento.

2.6 BIOMETRIE E FOTOGRAFIE

Dalla schiusa a giorno 121 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.

Biometrie

I risultati sono riassunti in tabella 18 e in figura 23. L'elaborazione grafica evidenzia un accrescimento regolare sia delle larve, sia delle post-larve. La relativa diminuzione della crescita relativa durante il periodo dello svezzamento e nei giorni successivi sono probabilmente riconducibili alle difficoltà iniziali di assimilazione della dieta artificiale da parte delle sogliole. In effetti, le difficoltà incontrate da altri autori, sono solitamente imputate alla scarsa capacità della sogliola di assimilare le dieta artificiale, piuttosto che ad un problema di ingestione del mangime.

Età (giorni dopo la schiusa)	Lunghezza totale media (mm)
3,5	2,09
11	5,25
18,5	7,19
21	7,66
25	8,64
28	10,19
33,5	11,46
40,5	14,15
57	16,25
63	17,79
69	18,28
90	33
109	45
147	52

Tabella 18 - Accrescimenti

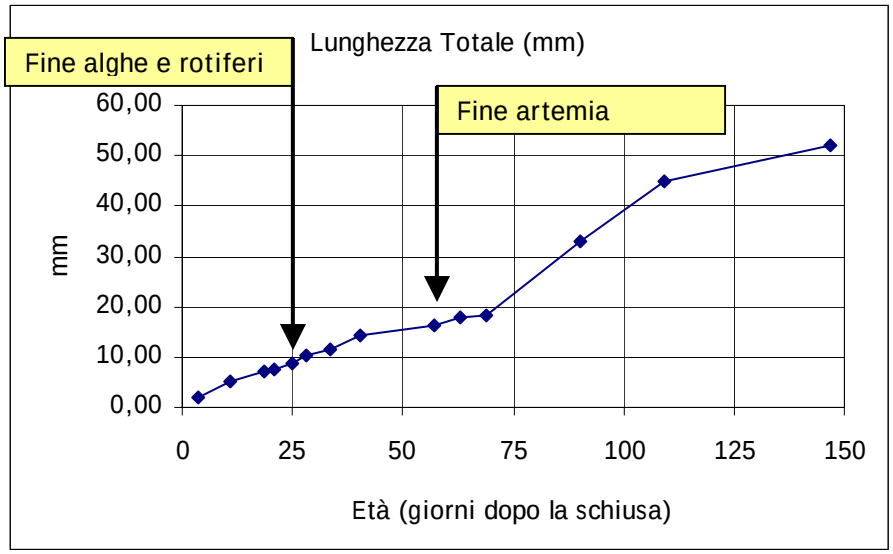
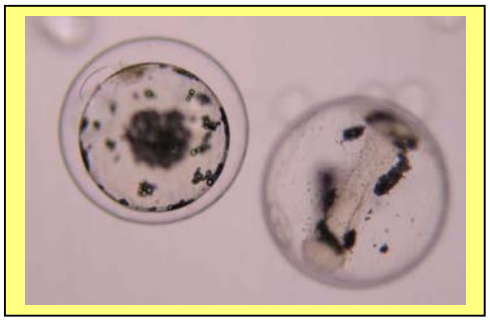


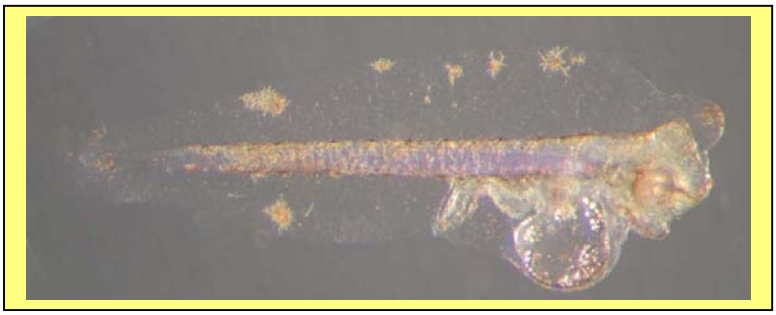
Figura 23 - Accrescimenti

Fotografie

Da fotografie svolte lo stesso giorno risultano spesso larve a stadi di sviluppo notevolmente diverso. Ciò deriva sia dalla variabilità individuale a parità di età, sia dalla presenza di larve provenienti da sei lotti di emissione consecutive ad un giorno d'intervallo.

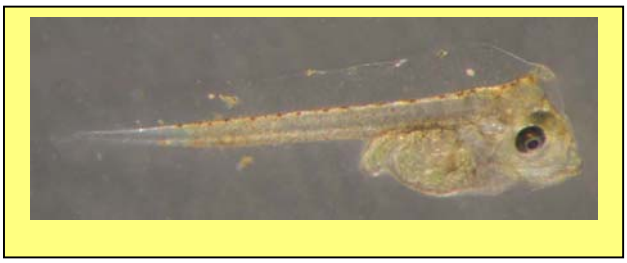


Uova



Giorno 01

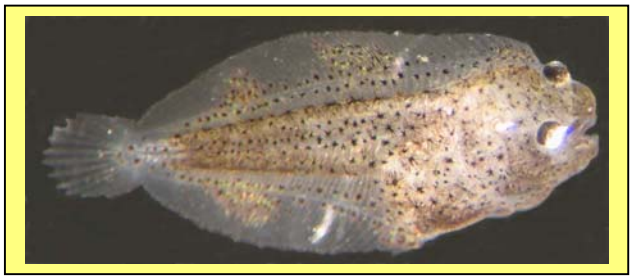
Giorno 03



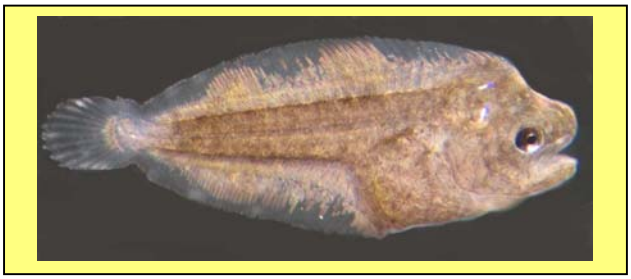
Giorno 04

Giorno 11

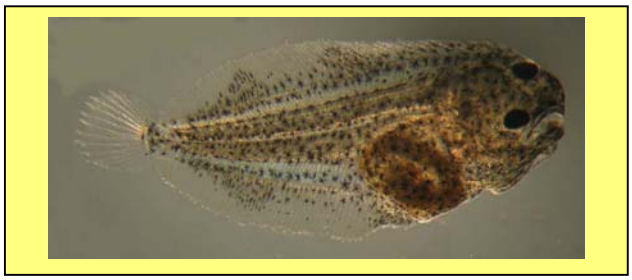
Giorno 12



Giorno 18 (a)



Giorno 18 (b)



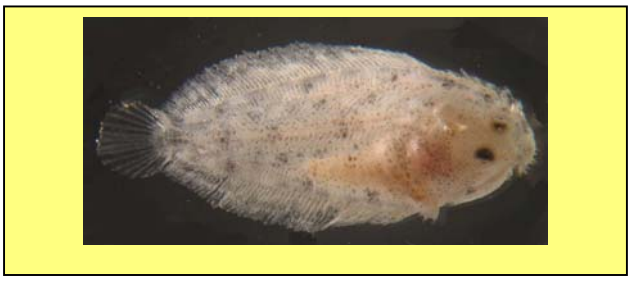
Giorno 21 (a)

Giorno 21 (b)

Giorno 25 (a)

Giorno 25 (b)

Giorno 35



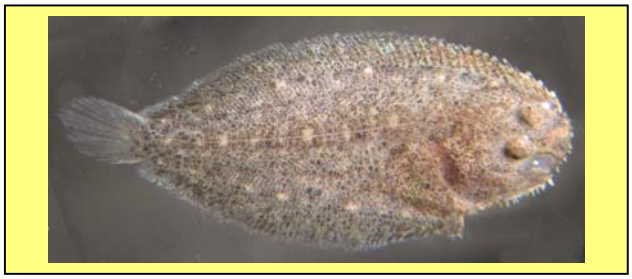
Giorno 39

Giorno 40 (a)

Giorno 40 (b)

Giorno 42

Giorno 57

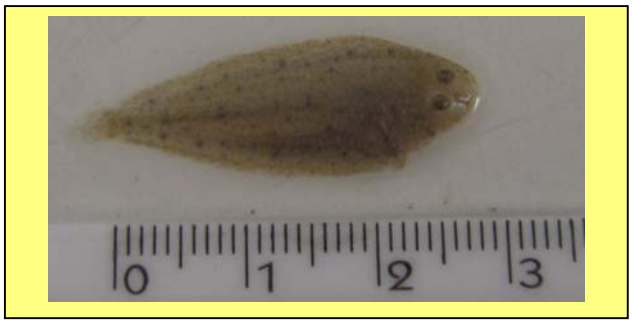


Giorno 63

Giorno 69 (a)

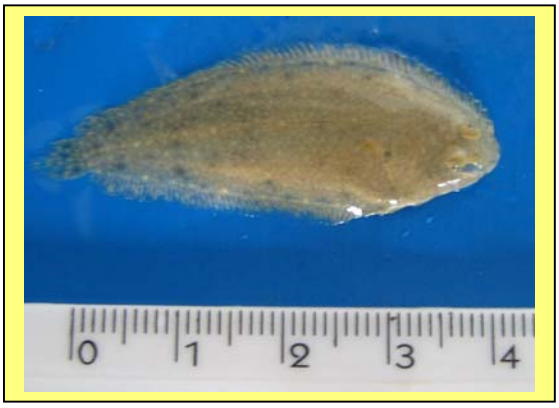
Giorno 69 (b)

Giorno 76



Giorno 90

Giorno 109



Giorno 121

2.7 ANALISI MICROBIOLOGICA DELLE ACQUE

Le analisi batteriologiche delle acque sono state effettuate al fine di valutarne la qualità microbiologica, in rapporto allo stato di salute della specie allevata.
La prima analisi è stata effettuata il 29 aprile in V1 (giorno 1), appena immesse le larve in vasca e 49 giorni dopo l'avviamento del filtro biologico, allo scopo di valutare le condizioni microbiologiche delle acque in vasca e nel filtro. Le analisi successive, tutte svolte in V2 e nel filtro, hanno permesso di determinare settimanalmente la crescita della popolazione microbica nei due ambienti. Le ultime due analisi sono state eseguite in data 8 e 15 luglio (giorno 69 e giorno 76), cioè dopo una serie di trasferimenti tra V1 e V2 e dopo isolamento parziale del filtro.

Le caratteristiche microbiologiche dell'acqua dell'impianto a circuito chiuso sono state monitorate settimanalmente nell'arco della prova per un periodo di circa 2 mesi. I campioni di acqua prelevati ad ogni campionamento sono stati 2 per un totale di 24 campioni prelevati nel corso del ciclo di allevamento. Il prelievo è avvenuto tramite contenitore sterile in punti prestabiliti e localizzati all'uscita del tubo di sfioro della vasca e del filtro.
Le analisi dei campioni di acqua della vasca di allevamento e del filtro sono state condotte nel laboratorio microbiologico del Centro di Biologia delle Acque di Torre di Cerrano (TE) ed hanno riguardato la *carica batterica totale* quale indice di qualità microbiologica. Tale parametro è stato rilevato

mediante conta su piastra petri film 3 M ossia un terreno di coltura sintetico contenente sostanze nutritive quali una sostanza gelificante solubile in acqua fredda ed un indicatore cromatico al tetrazolio atto a facilitare il conteggio delle colonie.
Dopo opportune diluizioni a base 10 realizzate in soluzione fisiologica, aliquote di 1 ml del campione da analizzare sono state inoculate su piastre messe ad incubare in termostato a 22°C.
La semina è stata effettuata in doppio per ciascuna diluizione del campione analizzato e la lettura delle piastre è stata effettuata dopo 72 h. Il valore della carica batterica totale è stato espresso in Unità Formanti Colonie per 1 ml di campione ed è stato indicato come il risultato medio delle diluizioni del campione esaminato.

	Età *(giorni dopo la schiusa)*	**Carica batterica totale filtro** *(UFC/ml)*	**Carica batterica totale vasca** *(UFC/ml)*
29 aprile	1	3.950	9.800
6 maggio	8	4.550	10.025
13 maggio	13	4.560	10.450
20 maggio	20	4.590	10.400
27 maggio	27	5.366	47.750
3 giugno	34	5.900	48.000
10 giugno	41	6.000	58.600
17 giugno	48	40.000	105.830
24 giugno	55	49.000	150.000
1 luglio	62	73.000	224.000
8 luglio	69	71.000	44.000
15 luglio	75	70.500	78.000

Tabella 19 – Carica batterica totale

Ad eccezione degli ultimi due campionamenti, i risultati delle analisi hanno evidenziato un andamento crescente della carica batterica totale sia nella vasca di allevamento che nel filtro.
Per quanto riguarda l'acqua del filtro l'aumento della flora batterica è stato graduale dal 29 aprile (giorno 1) al 10 giugno (giorno 41) passando da 3950 UFC/ml a 6.000 UFC/ml. Lo stesso andamento è stato rilevato per l'acqua della vasca, ma in questo caso i valori di carica batterica totale sono risultati essere più elevati passando da 9.800 UFC/ml a 58.600 UFC/ml.
Successivamente, in entrambi i casi, sono stati registrati altri due forti incrementi nella crescita della popolazione microbica rispettivamente il 17 giugno (giorno 48) ed il 1° luglio (giorno 62). Il 17 giugno 2005 le cariche microbiche totali del filtro e della vasca di allevamento hanno raggiunto rispettivamente il valore di 40.000 UFC/ml e di 105.830 UFC/ml. Il 1° Luglio 2005 la carica microbica totale si è attestata a 73.000 UFC/ml per quanto riguarda l'acqua del filtro e a 224.000 UFC/ml nell'acqua della vasca. Il primo incremento si é verificato in concomitanza con la somministrazione di artemie in vasca considerate da diversi autori vettori di batteri. Il secondo incremento di rilievo è stato rilevato in prossimità di episodi di mortalità larvale.
Le analisi dell'8 luglio 2005 e del 15 Luglio 2005 hanno evidenziato un arresto della crescita microbica sia nella vasca che nel filtro. Infatti in seguito agli episodi di mortalità larvale sopraccitati il filtro è stato isolato dalla vasca mentre l'acqua di allevamento è stata rinnovata del 90% del suo volume totale.

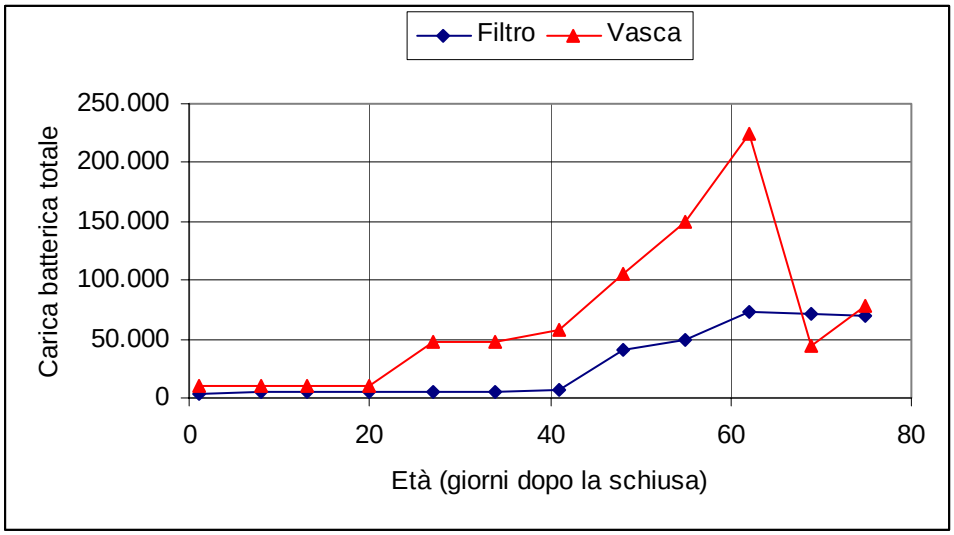


Figura 24 - Carica batterica totale

In definitiva i risultati delle analisi hanno permesso di individuare quantitativamente i microrganismi aerobi ed anaerobi facoltativi presenti nelle acque della vasca di allevamento e del filtro. Inoltre il repentino incremento della concentrazione microbica riscontrato il 1° luglio 2005 ha indotto il sospetto della preesistenza nelle acque di allevamento di microrganismi patogeni per i pesci, i quali avrebbero causato la morte delle larve dalla seconda settimana di Luglio.

CONCLUSIONI

Malgrado notevoli problemi iniziali legati alla disponibilità e alla qualità delle uova, il ciclo sperimentale di allevamento larvale e svezzamento della sogliola (*Solea vulgaris*), della durata di circa 60 giorni, si é svolto correttamente e si é concluso positivamente con la produzione di qualche migliaia di avannotti svezzati.
Successivamente, il periodo post-svezzamento, della durata di altri 60 giorni, é stato caratterizzato da un episodio di patologia (vibriosi) e dalla successiva divisione della popolazione rimasta in due lotti: il primo mantenuto presso l'impianto di Torre Cerrano ed il secondo trasferito presso un impianto sito ad Ortona.

Su quest'ultimo si è già riferito e la conclusione è che sarebbero necessari approfondimenti dedicati alla fase di primo adattamento in ambiente non condizionato.
Con questa specie, infatti, è consigliabile un periodo più lungo in avannotteria, per evitare stress precoci sugli stadi giovanili. Parallelamente è necessaria una elevata professionalità e sensibilità rispetto alle tecniche di allevamento produttivo. La scelta di privilegiare, per la trasferibilità, un'azienda operante sul territorio regionale rientrava in una politica di lungo termine, tesa ad integrare la filiera a livello locale e, anche se i primi risultati sono stati inferiori alle aspettative, si ritiene sia utile proseguire in questa direzione nel futuro.
In tutti i casi la sperimentazione sugli stadi giovanili, relativamente ai ritmi di crescita, continuerà sui soggetti residui presso Torre Cerrano e saranno rendicontati fra qualche mese.

I risultati del ciclo sperimentale, illustrati nella presente relazione, confermano l'assenza di problemi di rilievo, dall'inizio dell'allevamento larvale al completamento della metamorfosi e forniscono elementi utili per un'ulteriore standardizzazione dei protocolli di produzione. Per quanto riguarda la fase di svezzamento, la dieta ed il protocollo adoperati hanno confermato i buoni risultati già conseguiti da "Veneto Agricoltura", presso l'impianto di Pellestrina, nell'ambito del progetto triennale "Riproduzione controllata e primo allevamento della sogliola (*Solea vulgaris*) per la diversificazione della produzione ittica nazionale ed il ripopolamento attivo di bacini confinati".

Secondo molti autori, le difficoltà di svezzamento finora riscontrate con maggior parte delle *diete artificiali* utilizzate, hanno limitato lo sviluppo delle produzioni di sogliola su scala industriale. Se, come dimostrato dai risultati conseguiti, tale ostacolo possa essere superato, la sogliola sarebbe senz'altro un ottimo candidato per la diversificazione delle specie ittiche marine di interesse commerciale.
Sarebbe dunque opportuno proseguire nello sforzo intrapreso al fine di verificare l'effettiva riproducibilità su scala industriale dei risultati conseguiti, anche ai fini del ripopolamento attivo.

BIBLIOGRAFIA

- Ablett R.F. RichardS R.H., 1980. Suitability of twenty-four hour and forty-eight-hour unfed Artemia as an early foodsyuff for '0' group dover sole (Solea solea L.) production. Aquaculture 19, 371-377.
- Boulhic M., Gabaudan J., 1992. Histological study of the organogenesisi of the digestive system and swim bladder of the dover sole, Solea solea (Linnaeus 1758). Aquaculture 102, 373-396.
- Brasola V., 1974. Riproduzione artificiale della sogliola (Solea solea) effettuata consuccesso presso la Laguna di Orbetello. Riv. It. Piscic. Ittiop. A IX 4, 99-101.
- Bromley P.J., 1977. Methods of weaning juvenile hatchery reared sole (Solea solea (L.)) from live food to prepared diets. Aquaculture 12, 337-347.
- Bromley P.J., 1978. The weaning of turbot (Scophthalmus maximus L.) and sole (Solea solea L.) on dry diets. Proc. World on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology I, 450-454.
- Cadena Roa M., Huelvan C.,1982. Use of rehydratable extruded pellets and attractive substances for the weaning of sole (Solea vulgaris). J. World Maric. Soc. 13, 246-253.
- Carvalho-Varela M., Cunha-Ferreira V., 1987. Helminth parasites of the common sole, Solea solea and the senegalese sole, Solea seneganensis, on the Portuguese Continental Coast. Aquaculture 67, 135-138.
- Clark J., Murray K.R., Stark J.R., 1986. Protease development in dover sole (Solea solea L.). Aquaculture 53, 253-262.
- Day O.J. , Howell B.R., Jones D.A., 1997. The effect of dietary hydrolysed fish protein concentrate of the survival and growth of juvenile Dover sole, Solea solea (L.), during and after weaning. Aquaculture Res. 28, 911-921.
- Day O.J. Jones D.A. Howell B.R., 1996. Food consuption, growth and respiration of sole, Solea solea (L.), during early ontogeny in a hatchery environment. Aquaculture Res. 27, 831-839.
- Dendrinos P., Dewan S., Thorpe J.P., 1984. Improvement in the feeding efficiency of larval, post larval and juvenile dover sole (Solea solea L.) by the use of staining to improve the visibility of Artemia used as a food. Aquaculture. 38, 137-144.
- Dendrinos P., Thorpe J.P., 1987. Experiments on the artificial regulation of the amino acid and fatty acid contents of food organisms to meet the assessed nutritional requirements of larval, postlarval and juvenile dover sole (Solea solea L.). Aquaculture 61, 121-154.
- Devauchelle N., Alexandre J.C., Le Corre N., Letty Y.,1987. Spawning of sole (Solea solea) in captivity. Aquaculture 66, 125-147.
- Fluchter J., 1972. Rearing of common sole (Solea solea L.) in small containers and in high density under laboratory conditions. Aquaculture 1, 289-291.
- Fuchus J., 1978. Inluence de la photoperiode sur la croissance et la survie de la larve et du juvenile de sole (Solea solea) en elevage. Aquaculture 15, 63-74.
- Fuchus J., 1981/82. Production de juveniles de sole (Solea solea) en conditios intensives. I. Le premier mois d'elevage. Aquaculture 26, 321-337.
- Fuchus J., 1981/82. Production de juveniles de sole (Solea solea) en conditios intensives. II. Techniques de sevrage entre 1 et 3 mois. Aquaculture. 26, 339-358.
- Gatesoupe F-J., Luquet P., 1981/82. Weaning of the sole (Solea solea) before metamorphosis. Aquaculture 26, 359-368.
- Gatesoupe F-J., 1983. Weaning of sole, Solea solea before metamorphosis, achieved with high growth and survival rates. Aquaculture 32, 401-404.
- Howell B., 1990. Can sole stocks be enhanced by hatchery fish?. Fish Farming Int. 17 (8), 22-23.
- Howell B.R., Baynes S.M., 1995. Progress towards the identification of the sex-determining mechanism of the sole, Solea solea (L.), by the induction of diploid gynogenesis. Aquaculture Res. 26, 135-140.
- Lanari, D., Tibaldi , E., Tulli, F., Salvatori, R. (2001) Weaning Solea vulgaris larvae: effect of stocking rate and diet composition. "International Aquaculture Conference- Where is Aquaculture going in Sothern Europe- Production, consumption, environment, technologies, food safety, health and welfare of the fish farmed in sustainable Aquaculture" Verona,(I) , 26-27th April 2001, p. 24.
- Lanari, D., Maxia, M., Cabiddu, S., Tibaldi, E., 2002. Weaning experiments performed with sole under commercial hatchery conditions. Proceedings of the 10th International Symposium of Nutrition and Feeding in Fish, Rhodes (Greece) 2-7 June 2002, p.118, (abstr).
- Mc Vicar A.H., White P.G.,1981/82. The prevention and cure of an infectious disease in cultivated juvenile dover sole, Solea solea (L.). Aquaculture 26, 213-222.
- Metailler R., Cadena Roa M., Person-Le Ruyet J., 1983. Actractive chemical substances for the weaning of dover sole (Solea vulgaris): qualitative and quantitative approach. J. World Maric. Soc.14, 679-684
- Metailler R., Menu B., Moriniere P.,1981. Weaning of dover sole (Solea vulgaris) using artificial diets. J.World Maric. Soc. 12 (2), 111-116.
- Salvatori R., 1988. Riproduzione artificiale e produzione di giovanili di sogliola (Solea solea L.). Il Pesce 4, 45-47.
- Salvatori R., Lenzi M., Fommei F., Angelini M., 1985. Esperienze di riproduzione artificiale e allevamento larvale della sogliola (Solea solea Fowler). Oebalia XI-2, 737-744.
- Syvret M. L.Q., Pond, C.J., Day, O.J., Nys, C., Coutteau, P., 2000. New feed developments inthe early weaning of larval and juvenile dover sole Solea solea (L.). European Aquaculture Soc., spec. Pubbl.. n.28, p. 693 (abstr.)
- Tibaldi, E., Salvatori, R., Cenedese, M. (2001). Early weaning of Solea solea post-larvae with dry diets at different stocking densities. Preliminary results. In " Recent Progress in Animal Production Science.2- Proceedings of the ASPA XIV Congress, Firenze , June 12-15, 200, p. 727-729.
- Vazquez R., Gonzales S., Rodrigues A., Mourente G., 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first-feeding larvae of the Senegal sole (Solea seneganensis Kaup). Aquaculture 119, 273-286.
- Villani P., 1977. Breve nota sulla riproduzione artificiale della sogliola adriatica, Solea (Pegusa) impar BENN. (Teleostea Solenidae). Riv. It. Piscic. Ittiop. A XII 1, 15-20.
- World Animal Science -Production of Aquatic Animals - fishes.(1995) Nash,C.E. and Novotny A.J. editors, ElSevier,New York.
- Mediterranee et mer noire,zone de peche 37, Revision 1, Vol. 2°,Vertebres (1987), Fisher, W.,Schneider M., Bauchot, M.L., FAO,ROME,pag.1529.

ALLEGATI

Allegato 1 – Medium "f2 Guillard" per coltivazioni algali

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.

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 "Walne" per 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

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 – 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 – 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)	Condizioni in vasca Altri parametri	Osservazioni
Semina del 27 aprile 2005 - Emissione, Incubazione e schiusa lotti A1-A2 (Pellestrina) --> Ciclo V2a				
apr 23, 2005	**-2**	15°C	Non comunicati	A1: emissione notte 22-23 e raccolta il 23 apr.05
apr 24, 2005	**-2/-1**			A2: emissione notte 23-24 e raccolta il 24 apr.05
apr 25, 2005	**-1/ 0**			A1: schiusa A.M.
apr 26, 2005	**0 / 1**			A2: schiusa A.M.
apr 27, 2005	**1 / 2**	Trasferimento a Torre Cerrano e semina larve ciclo V2a		
Semina del 27 aprile 2005 - Emissione, Incubazione e schiusa lotti B-C-D (Pellestrina) --> Ciclo V1a				
apr 25, 2005	**-2**	15°C	Non comunicati	B: emissione notte 24-25 e raccolta il 25 apr.05
apr 26, 2005	**-2/-1**			C: emissione notte 25-26 e raccolta il 26 apr.05
apr 27, 2005	**-2/ 0**			D: emissione notte 26-27 e raccolta il 27 apr.05 - B: schiusa A.M.
		Trasferimento a Torre Cerrano e semina uova-larve ciclo V1a		
apr 28, 2005	**-1 / 1**		Vedere sotto	C: schiusa A.M.
apr 29, 2005	**0 / 2**			D: schiusa A.M.
Semina del 30 aprile 2005 - Emissione, Incubazione e schiusa lotti A-B-C (Pellestrina) --> Ciclo V2b				
apr 28, 2005	**-2**	17°C	Non comunicati	A: emissione notte 27-28 e raccolta il 28 apr.05
apr 29, 2005	**-2/-1**			B: emissione notte 28-29 e raccolta il 29 apr.05
apr 30, 2005	**-2/ 0**			C: emissione notte 29-30 e raccolta il 30 apr.05
		Trasferimento a Torre Cerrano e semina uova-larve ciclo V2b - A: schiusa notte 29-30 apr.05		
mag 1, 2005	**-1 / 1**		Vedere sotto	B: schiusa notte 30 apr. - 01 mag.05
mag 2, 2005	**0 / 2**			C: schiusa notte 01-02 mag.05
Semina del 12 maggio 2005 - Emissione, Incubazione e schiusa lotti A-B (Pellestrina) --> Ciclo V1b				
mag 9, 2005	**-2**	17°C	Non comunicati	A: emissione notte 08-09 e raccolta il 09 mag.05
mag 10, 2005	**-2/-1**			B: emissione notte 09-10 e raccolta il 10 mag.05
mag 11, 2005	**-1/ 0**			A: schiusa notte 10-11 mag.05
mag 12, 2005	**0 / 1**			B: schiusa notte 11-12 mag.05
		Trasferimento a Torre Cerrano e semina larve ciclo V1b		

Data	Giorno	Temp. (°C)	Ossigeno (mg O2/l.)	Luce	Aria	Ricambio (l./min)	Circolazione acqua	Nitriti (mg NO/l.)	Acqua nuova Vasca (N.B.1)	Acqua nuova Circuito (N.B.2)	Osservazioni
Semina del 27 aprile 2005 - Ciclo V2a - Allevamento larvale da giorno 1/2 a giorno 3/4											
apr 27, 2005	**1 / 2**	17,0	-			4 l./min.	Circolazione	0,03	Riempimento totale		Semina alle 21.00
apr 28, 2005	**2 / 3**	17,0	7,3	Luce spenta	Come V1a	2,4 l./min.	totale	0,08	38 %	-	Filtro 55 µm
apr 29, 2005	**3 / 4**	17,8	7,2			1 l./min.	C. parziale	0,10	60 %	-	Vasca eliminata
		Ciclo V2a eliminato									
Semina del 27 aprile 2005 - Ciclo V1a - Allevamento larvale da giorno 0/2 a giorno 12/14											
apr 27, 2005	**-2 / 0**	17,0	-			4 l./min.	Circolazione	0,03	Riempimento totale		Semina alle 21.00
apr 28, 2005	**-1 / 1**	17,0	7,3	Luce		2,4 l./min.	totale	0,08	38 %	-	Filtro 55 µm
apr 29, 2005	**0 / 2**	17,8	7,2	spenta		1 l./min.	C. parziale	0,07	2 x 55 %	-	
apr 30, 2005	**1 / 3**	18,0	7,1			(dalle 12.00)	(dalle 12.00)	0,04	32 %	20 %	
mag 1, 2005	**2 / 4**	17,6	7,2	Accensione	Un punto			0,04	-	2x20 %	Inizio alimentazione
mag 2, 2005	**3 / 5**	18,2	7,2	alle 17.00	centrale	2 l./min.		0,05	2 x 32 %	33+20 %	
mag 3, 2005	**4 / 6**	18,1	7,1		senza pietra	(13 %/ora)		0,05	-	-	
mag 4, 2005	**5 / 7**	17,7	7,2	Luce	porosa		Circolazione	0,06	32 %	20+40 %	
mag 5, 2005	**6 / 8**	17,4	7,5	accesa			totale	0,05	32 %	-	Filtro 100 µm
mag 6, 2005	**7 / 9**	17,2	7,5	09.00-22.00	Aumento			0,05	27 %	20 %	
mag 7, 2005	**8 /10**	17,2	7,4	&	progressivo	3 l./min.		0,06	27 %	3x20 %	
mag 8, 2005	**9 /11**	17,5	7,6	Telo ombra		(20 %/ora)		0,07	-	4x18 %	
mag 9, 2005	**10/12**	17,4	7,5					0,10	-	2x20 %	
mag 10, 2005	**11/13**	17,5	7,4					0,09	32 %	2x20 %	
mag 11, 2005	**12/14**	17,2	7,8					0,10	-	2x20 %	Vasca accorpata
		Accorpamento del ciclo V1a con il ciclo V2b									
Semina del 30 aprile 2005 - Ciclo V2b - Allevamento larvale da giorno 0/2 a giorno 9/11											
apr 30, 2005	**-2 / 0**	17,0	7,3					0,01	Riemp.to	20 %	Semina alle 21.00
mag 1, 2005	**-1 / 1**	17,8	7,5	Luce spenta				0,04	32 %	2x20 %	Filtro 55 µm
mag 2, 2005	**0 / 2**	17,8	7,2		Come V1a	2 l./min.	Circolazione	0,05	32 %	33+20 %	
mag 3, 2005	**1 / 3**	18,1	7,2	Accensione		(13 %/ora)	totale	0,06	-	-	Inizio alimentazione
mag 4, 2005	**2 / 4**	17,4	7,4	alle 09.00				0,06	32 %	20+40 %	

(segue ....)

Data	Giorno	Temp. (°C)	Ossigeno (mg O2/l.)	Luce	Aria	Ricambio (l./min)	Circolazione acqua	Nitriti (mg NO/l.)	Acqua nuova Vasca (N.B.1)	Acqua nuova Circuito (N.B.2)	Osservazioni
Semina del 30 aprile 2005 - Ciclo V2b - Allevamento larvale da giorno 0/2 a giorno 9/11 (segue ....)											
mag 5, 2005	**3 / 5**	17,4	7,7	Luce accesa 09.00-22.00 & Telo ombra	Come V1a Aumento progressivo	3 l./min. (20 %/ora)	Circolazione totale	0,06	32 %	-	
mag 6, 2005	**4 / 6**	17,0	7,6					0,05	27 %	20 %	Filtro 100 µm
mag 7, 2005	**5 / 7**	17,4	7,4					0,07	27 %	3x20 %	
mag 8, 2005	**6 / 8**	17,3	7,7					0,08	-	4x18 %	
mag 9, 2005	**7 / 9**	17,7	7,4					0,10	-	2x20 %	
mag 10, 2005	**8 /10**	17,4	7,6					0,10	32 %	2x20 %	
mag 11, 2005	**9 /11**	17,5	7,6					0,10	-	3x20 %	Vasca accorpata
		Accorpamento del ciclo V1a con il ciclo V2b									
Semina del 27-30 aprile 2005 - Ciclo V1a-V2b - Allevamento larvale da giorno 10/15 a giorno 57/62											
mag 12, 2005	**10/15**	17,0	7,5	Luce accesa 09.00-22.00 & Telo ombra	Un punto centrale senza pietra porosa Aumento progressivo	3 l./min. (20 %/ora)	Circolazione totale	0,09	-	2x20 %	Larve V1a + V2b
mag 13, 2005	**11/16**	17,0	7,5					0,08	-	3x20 %	
mag 14, 2005	**12/17**	17,0	7,7					0,08	-	3x20 %	
mag 15, 2005	**13/18**	17,0	7,7					0,09	-	4x20 %	
mag 16, 2005	**14/19**	17,2	7,6					0,10	-	2x20 %	
mag 17, 2005	**15/20**	17,3	7,6					0,08	-	2x20 %	
mag 18, 2005	**16/21**	17,2	7,5					0,07	-	2x20 %	
mag 19, 2005	**17/22**	17,0	7,6					0,08	-	2x20 %	
mag 20, 2005	**18/23**	17,0	7,8					0,09	-	2x20 %	F.100 µm di giorno
mag 21, 2005	**19/24**	17,0	7,7					0,11	-	4x20 %	F 245 µm / notte
mag 22, 2005	**20/25**	17,3	7,6					0,08	-	3x20 %	
mag 23, 2005	**21/26**	17,4	7,5					0,06	-	3x20 %	
mag 24, 2005	**22/27**	17,7	7,5					0,07	-	3x20 %	
mag 25, 2005	**23/28**	-	7,4					0,09	-	2x20 %	
mag 26, 2005	**24/29**	17,9	7,5					0,07	-	2x20 %	
mag 27, 2005	**25/30**	17,5	7,8					0,06	-	2x20 %	
mag 28, 2005	**26/31**	17,3	7,7					0,05	-	2x20 %	
mag 29, 2005	**27/32**	17,8	7,6					0,04	-	2x20 %	
mag 30, 2005	**28/33**	17,8	7,5					0,04	-	2x20 %	

(segue ....)

Data	Giorno	Temp. (°C)	Ossigeno (mg O2/l.)	Luce	Aria	Ricambio (l./min)	Circolazione acqua	Nitriti (mg NO/l.)	Acqua nuova Vasca (N.B.1)	Acqua nuova Circuito (N.B.2)	Osservazioni
Semina del 30 aprile 2005 - Ciclo V2b - Allevamento larvale da giorno 0/2 a giorno 9/11 (segue ....)											
mag 5, 2005	**3 / 5**	17,4	7,7	Luce accesa 09.00-22.00 & Telo ombra	Come V1a Aumento progressivo	3 l./min. (20 %/ora)	Circolazione totale	0,06	32 %	-	
mag 6, 2005	**4 / 6**	17,0	7,6					0,05	27 %	20 %	Filtro 100 µm
mag 7, 2005	**5 / 7**	17,4	7,4					0,07	27 %	3x20 %	
mag 8, 2005	**6 / 8**	17,3	7,7					0,08	-	4x18 %	
mag 9, 2005	**7 / 9**	17,7	7,4					0,10	-	2x20 %	
mag 10, 2005	**8 /10**	17,4	7,6					0,10	32 %	2x20 %	
mag 11, 2005	**9 /11**	17,5	7,6					0,10	-	3x20 %	Vasca accorpata
		Accorpamento del ciclo V1a con il ciclo V2b									
Semina del 27-30 aprile 2005 - Ciclo V1a-V2b - Allevamento larvale da giorno 10/15 a giorno 57/62											
mag 12, 2005	**10/15**	17,0	7,5	Luce accesa 09.00-22.00 & Telo ombra	Un punto centrale senza pietra porosa Aumento progressivo	3 l./min. (20 %/ora)	Circolazione totale	0,09	-	2x20 %	Larve V1a + V2b
mag 13, 2005	**11/16**	17,0	7,5					0,08	-	3x20 %	
mag 14, 2005	**12/17**	17,0	7,7					0,08	-	3x20 %	
mag 15, 2005	**13/18**	17,0	7,7					0,09	-	4x20 %	
mag 16, 2005	**14/19**	17,2	7,6					0,10	-	2x20 %	
mag 17, 2005	**15/20**	17,3	7,6					0,08	-	2x20 %	
mag 18, 2005	**16/21**	17,2	7,5					0,07	-	2x20 %	
mag 19, 2005	**17/22**	17,0	7,6					0,08	-	2x20 %	
mag 20, 2005	**18/23**	17,0	7,8					0,09	-	2x20 %	F.100 µm di giorno
mag 21, 2005	**19/24**	17,0	7,7					0,11	-	4x20 %	F 245 µm / notte
mag 22, 2005	**20/25**	17,3	7,6					0,08	-	3x20 %	
mag 23, 2005	**21/26**	17,4	7,5					0,06	-	3x20 %	
mag 24, 2005	**22/27**	17,7	7,5					0,07	-	3x20 %	
mag 25, 2005	**23/28**	-	7,4					0,09	-	2x20 %	
mag 26, 2005	**24/29**	17,9	7,5					0,07	-	2x20 %	
mag 27, 2005	**25/30**	17,5	7,8					0,06	-	2x20 %	
mag 28, 2005	**26/31**	17,3	7,7					0,05	-	2x20 %	
mag 29, 2005	**27/32**	17,8	7,6					0,04	-	2x20 %	
mag 30, 2005	**28/33**	17,8	7,5					0,04	-	2x20 %	

(segue ....)

Data	Giorno	Temp. (°C)	Ossigeno (mg O2/l.)	Luce	Aria	Ricambio (l./min)	Circolazione acqua	Nitriti (mg NO2/l.)	Acqua nuova Vasca (N.B.1)	Acqua nuova Circuito (N.B.2)	Osservazioni
Semina del 27-30 aprile 2005 - Ciclo V1a-V2b - Allevamento larvale da giorno 10/15 a giorno 57/62 (segue....)											
mag 31, 2005	**29/34**	17,8	7,5	Luce accesa 09.00-22.00 & Telo ombra	Un punto centrale senza pietra porosa Aumento progressivo	3 l./min. (20 %/ora)	Circolazione totale	0,03	-	2x20 %	
giu 1, 2005	**30/35**	17,7	7,5					0,03	-	2x20 %	
giu 2, 2005	**31/36**	17,6	7,6					0,03	-	2x20 %	
giu 3, 2005	**32/37**	17,6	7,5					0,02	-	2x20 %	
giu 4, 2005	**33/38**	17,7	7,7					0,03	-	2x20 %	
giu 5, 2005	**34/39**	17,7	7,6					0,04	-	2x20 %	
giu 6, 2005	**35/40**	17,6	7,7					0,04	-	2x20 %	
giu 7, 2005	**36/41**	17,7	7,4					0,06	-	2x20 %	
giu 8, 2005	**37/42**	17,5	7,5					0,05	-	2x20 %	
giu 9, 2005	**38/43**	17,8	7,2			4 l./min. (26 %/ora)		0,06	-	2x20 %	
giu 10, 2005	**39/44**	17,6	7,3					0,07	-	3x20 %	
giu 11, 2005	**40/45**	17,7	7,2					0,08	-	3x20 %	
giu 12, 2005	**41/46**	17,6	7,4					0,07	-	3x20 %	
giu 13, 2005	**42/47**	17,5	7,4					0,06	-	3x20 %	
giu 14, 2005	**43/48**	17,8	7,4					0,07	-	3x20 %	
giu 15, 2005	**44/49**	17,9	7,4					0,05	-	3x20 %	
giu 16, 2005	**45/50**	17,9	7,3					0,06	-	3x20 %	
giu 17, 2005	**46/51**	18,2	7,3					0,07	-	3x20 %	
giu 18, 2005	**47/52**	18,2	7,3					0,06	-	3x20 %	
giu 19, 2005	**48/53**	17,9	7,4					0,07	-	4x20 %	
giu 20, 2005	**49/54**	17,9	7,3					0,07	-	3x20 %	
giu 21, 2005	**50/55**	18,2	7,2					0,07	-	3x20 %	
giu 22, 2005	**51/56**	18,5	7,2					0,06	-	3x20 %	
giu 23, 2005	**52/57**	18,6	6,9					0,09	-	4x20 %	
giu 24, 2005	**53/58**	19,4	6,7					0,09	-	4x20 %	
giu 25, 2005	**54/59**	18,9	6,6					0,09	-	3x20 %	
giu 26, 2005	**55/60**	18,0	6,8					0,09	-	4x20 %	
giu 27, 2005	**56/61**	18,0	6,6					0,09	-	4x20 %	
giu 28, 2005	**57/62**	20,0	6,5					0,10	-	5x20 %	

Data	Giorno	Temp. (°C)	Ossigeno (mg O2/l.)	Luce	Aria	Ricambio (l./min)	Circolazione acqua	Nitriti (mg NO2/l.)	Acqua nuova Vasca (N.B.1)	Acqua nuova Circuito (N.B.2)	Osservazioni
Semina del 12 maggio 2005 - Ciclo V1b - Allevamento larvale da giorno 0/1 a giorno 4/5											
mag 12, 2005	**0 / 1**	17,1	7,6	Luce spenta	(1)	Nullo	C. parziale di notte	0,02	Riemp.to	2x20 %	Semina alle 21.00
mag 13, 2005	**1 / 2**	17,7	7,5			variabile 0,5 - 1,0 l./min.	C. totale di giorno	0,03	-	3x20 %	Filtro 55 µm
mag 14, 2005	**2 / 3**	17,7	7,6					0,05	-	3x20 %	
mag 15, 2005	**3 / 4**	18,0	7,6	Accensione alle 17.00				0,06	-	4x20 %	Inizio alimentazione
mag 16, 2005	**4 / 5**	17,6	7,6					0,10	-	2x20 %	Vasca eliminata
		Ciclo eliminato									

Circolazione totale: Ricambio in vasca proveniente dal filtro biologico (pompa) e dal filtro intermedio (air-lift).

Circolazione parziale: Ricambio in vasca proveniente esclusivamente dal filtro intermedio (air-lift).

N.B.1: Rinnovo di acqua in vasca espresso in % del volume della vasca (925 litri).

N.B.2: Rinnovo di acqua nel circuito espresso in % del volume del filtro biologico con la vasca di ripresa (1.500 litri).