ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE PER L'ABRUZZO ED IL MOLISE IZSA&M

"G.CAPORALE"

DOCUP PESCA REGIONE ABRUZZO
BANDO 2003 – MISURA 4.6 – "AZIONI INNOVANTI"
PROGETTO 04/IM/03/AB

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

RELAZIONE TECNICA FINALE

DR. ALESSANDRA PAOLINI

MAGGIO 2005

SCHEDA TECNICA DEL PROGETTO

Data domanda	15 ottobre 2003
Importo	57.195,41
Data approvazione	22 luglio 2004 DH 18/44 – progetto cod. 04/IM/03/BO
Data inizio attività	16.02.2004
Data fine attività	31.05.2005
Data variante	-
Data approvazione variante	-
Tipo di finanziamento	Fondi Docup-Sfop (Documento unico di Programmazione – Strumento Finanziario di Orientamento alla Pesca) Il finanziamento è composto per il 72% da risorse comunitarie e per il 28% da risorse nazionali. Queste a loro volta sono costituite per il 70% da risorse del Ministero delle Risorse Agricole e Forestali, per il 30% da risorse della Regione Abruzzo
Partecipanti	dott. ssa A.Paolini, dr. M. Vallerani, dr. A.De Ascentiis, Dott.ssa M.Torresi, dr. A.Pavone. Consulente: dr. Lorenzo Gennari. Coadiuvatore tecnico: Alessandro Perazzitti. Un ringraziamento particolare per la collaborazione ai volontari: dr. Camilla Egidi, dr. Luca Tosti, dr. Marco Carlini.
Sede delle attività	Centro di Biologia delle Acque, sede di Torre Cerrano, Pineto (TE).

INDICE

INTRODUZIONE

1. 0 – Materiali e metodi

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

2.0 – Risultati e discussione

2.1 - Semina, schiusa riassorbimento del sacco vitellino (giorno 1-3)
2.2 - Periodo da giorno 4 a giorno 30
2.3 - Periodo da giorno 31 a giorno 58
2.4 - Fotografie e biometrie degli stadi larvali e post-larvali
2.5 - Preingrasso e ingrasso

CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

N°3 ALLEGATI

Kingdom	ANIMALIA
Phylum	CHORDATA
Class	ACTINOPTERYGII
Order	PERCIFORMES
Family	SPARIDAE
Genere species	*Pagrus Pagrus*
Common Name/s	RED PORGY (E)
Species Authority	(Linnaeus, 1758)

Il Pagro (*Pagrus pagrus*) è uno Sparide dal corpo ovale, piuttosto alto, con profilo del capo verticale e convesso, di color rosso o rosa vivace sul dorso, rosa ai lati e con ventre argenteo; la testa è più scura dalla nuca; la coda è rosa con le punte bianche. Sopra la linea laterale si notano delle macchiette azzurre. Caratteristica è una banda azzurro scura che attraversa l'occhio, evidente soprattutto nei giovani fino a 15 cm. Le mascelle presentano anteriormente 4-6 grossi denti, seguiti da tre serie di denti acuminati caniniformi e da due serie di molariformi. Il pagro raggiunge una lunghezza massima di 82 cm, ma è comune da 20 a 60 cm.
La riproduzione va da aprile a giugno e la maturità sessuale è raggiunta verso i 24 cm di lunghezza; si nutre di crostacei, molluschi, pesci ed alghe.
In Mediterraneo esistono altre due specie di pagro: il *Pagrus auriga* ed il *Pagrus caeruleosticus*, rari nei mari italiani, il primo si differenzia per la presenza di tre lunghi raggi filamentosi nella prima pinna dorsale, il secondo per la presenza di macchie di colore blu sul dorso e sui fianchi.
Il pagro è un pesce demersale di fondo roccioso o sabbioso; da giovane soggiorna spesso vicino ai fondali ricchi di alghe e sulle praterie di posidonia, ma in genere vive in acque profonde, specialmente nel periodo invernale, si può spingere fino a 250 m di profondità, generalmente rimane entro i 100 m. È' distribuito in tutto il Mediterraneo ed Atlantico, ma non si incontra spesso nei nostri mari. In estate si avvicina al litorale per la riproduzione.
Il Pagro è inserito nella lista rossa delle specie minacciate (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. - 2004 IUCN Red List of Threatened Species. www.redlist.org).

INTRODUZIONE

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

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

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

L'attività oggetto della presente relazione si é svolta dal dicembre 2003 a maggio 2005. Il ciclo di allevamento larvale del pagro si é svolto dal 02 aprile al 01 giugno 2004, per un periodo di 2 mesi.
Ad inizio giugno 2004, gli avannotti sono stati trasferiti, per la fase successiva di preingrasso e d'ingrasso, presso un impianto di allevamento intensivo di Civitavecchia (Nuova Azzurra).
Nell'ultimo campionamento del 21 aprile 2005, i pesci avevano raggiunto il peso medio di circa 80,6 g.

1. MATERIALI E METODI

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

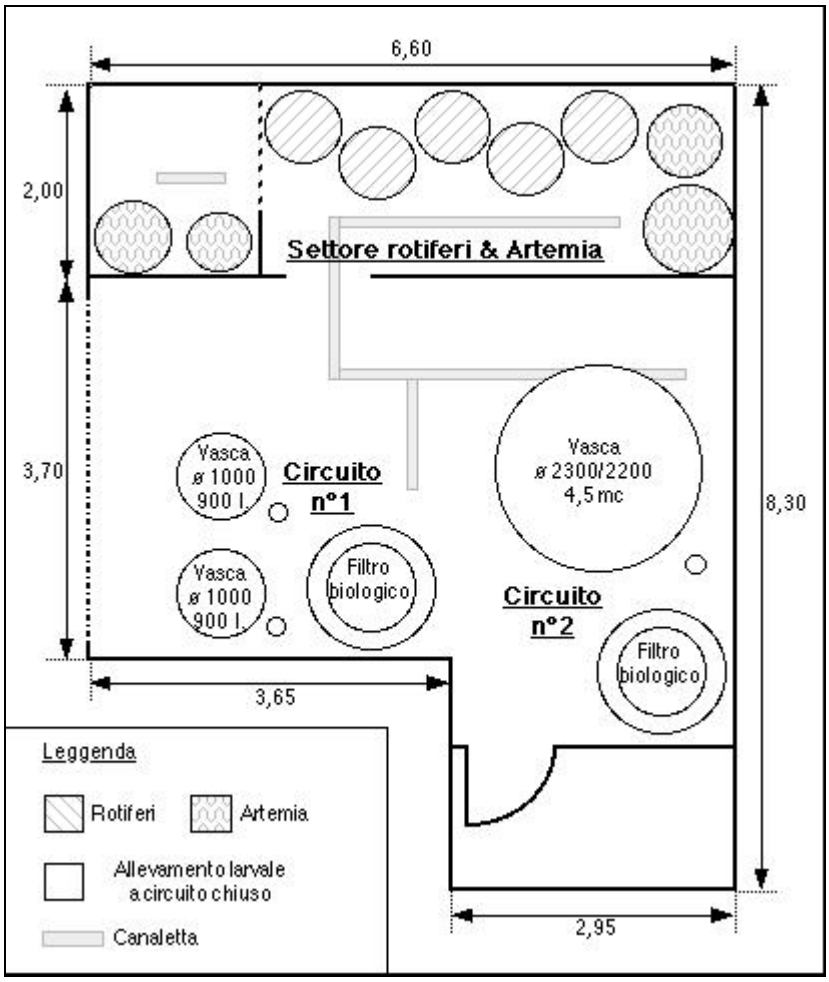


Fig.1 - Disposizione generale

Il prelievo di acqua marina avviene mediante una presa mobile, collegata alle linee di adduzione verso vari settori. Lo scarico avviene periodicamente dopo passaggio in apposite vasche 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/o ra 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).

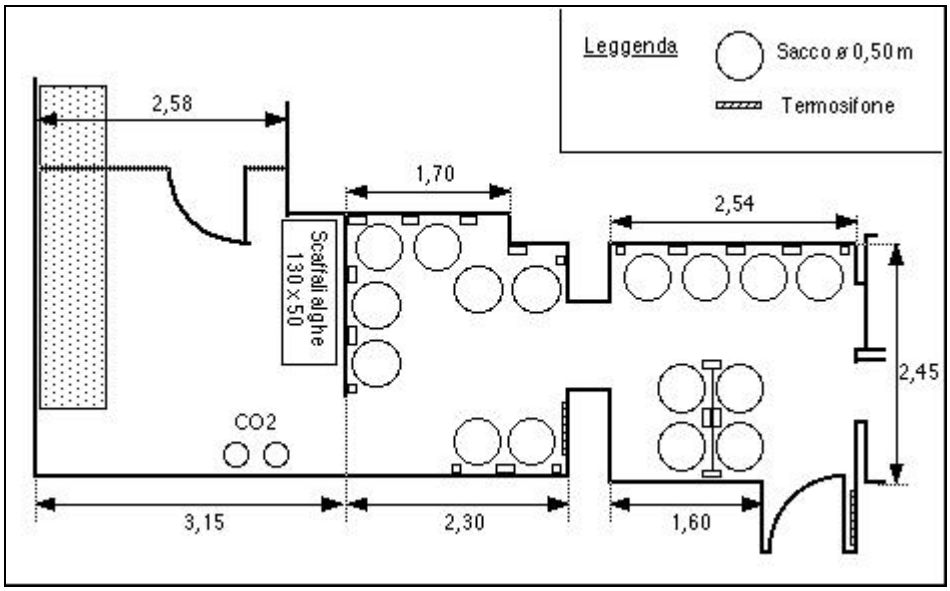


Fig.2 – Locale piccoli e grandivolumi algali

Il riempimento dei vari volumi é assicurato da una linea che porta l'acqua filtrata ad un micron (3 cartucce), dalle vasche del settore fito-zoo ubicato nel locale sottostante (Fig.3), 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".

Fig.3 – Locale produzione fitoplancton

1.2 SETTORE PER LA PRODUZIONE DEI ROTIFERI ED 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'ambiente 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 25, 10 ed 1 micron.
L'aria, dopo filtrazione ad un micron (3 cartucce), é distribuita a tutte le vasche. Un impianto indipendente fornisce ossigeno puro a tutte le vasche.
Per la coltura (ciclo di 3 giorni) e l'arricchimento (ciclo di 24 ore) dei rotiferi sono state previste 5 vasche tronco-coniche di 425 litri. Per la schiusa dell'Artemia (ciclo di 24 ore) sono previste 2 vasche tronco-coniche: la prima di 240 litri e la seconda di 425 litri, mentre per l'arricchimento sono previste 2 vasche di cui una di 425 litri e l'altra di 650 litri.
Risultano complessivamente i seguenti volumi:

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

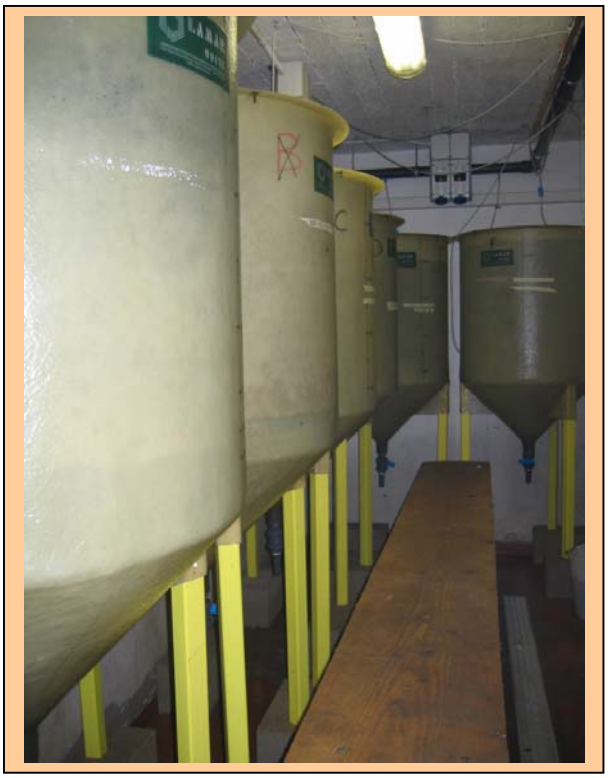


Fig.4 – Locale produzione Rotiferi e Artemia

1.3 ALLEVAMENTO LARVALE – CIRCUITO CHIUSO N°1

Il circuito chiuso n°1, ubicato nel locale sottostante la Torre (figura 5), é costituito da n°2 vasche tronco-coniche di 0,9 mc (vasche V1 e V2) collegate a circuito chiuso con una vasca di riserva di 1,2 mc, facente funzione di filtro biologico. Nell'ambito del progetto sull'allevamento del pagro, le due vasche sono state adoperate per l'incubazione e la schiusa delle uova, nonché per i primi 3 giorni di allevamento larvale.

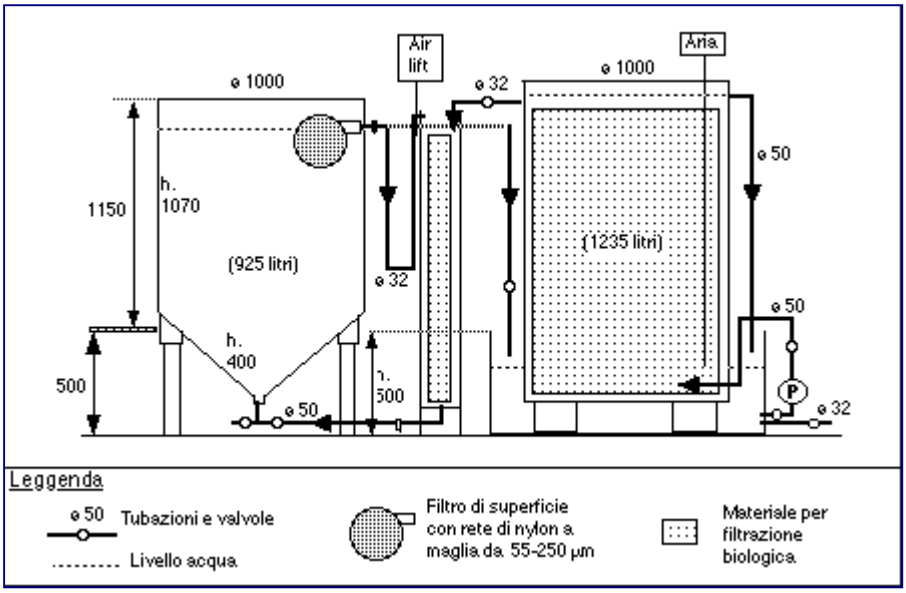


Fig.5 - Vasche da 1 mc circuito chiuso n°1

Le vasche di allevamento larvale, di forma tronco-conica, dotate di piedi di sostegno, hanno un metro di diametro interno, una parte cilindrica superiore alta 1 metro e un cono alto 0,4 metro. Il fondo e le pareti sono in vetroresina senza verniciatura (colore beige) (fig.6).
La circolazione idrica generale é assicurata in duplice modo, mediante "air-lift" durante le prime fasi di allevamento larvale e mediante pompa durante le fasi successive. L'ingresso d'acqua in vasca é assicurato dal fondo ed é regolabile mediante valvola a sfera. Il livello dell'acqua in vasca é determinato dall'altezza del tubo di sfioro dal quale l'acqua ritorna in filtrazione. La portata massima di ciascuno air-lift é di 2,5-3 litri/min (circolazione parziale), mentre la massima portata del circuito é di 1,4 litri/sec, ossia di circa 5 mc/ora (circolazione totale).

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

1.4 ALLEVAMENTO LARVALE – CIRCUITO CHIUSO N°2

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

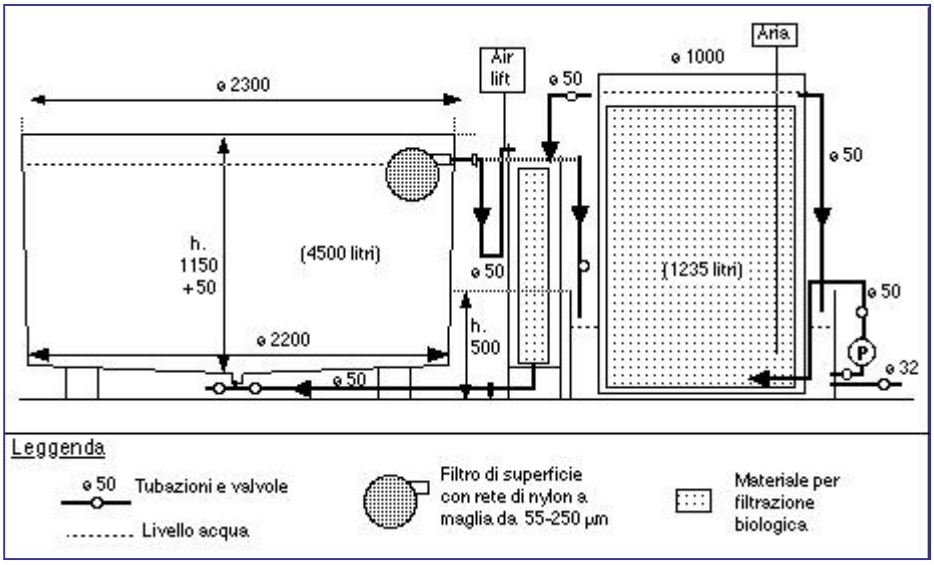


Fig.7 - Circuito chiuso e vasca utilizzati per l'allevamento larvale

La vasca di allevamento larvale (fig.8), a pianta circolare, di forma tronco-conica, ha un diametro di 2,2-2,3 metri, una parte cilindrica con parete inclinate alta 1,15 metro e un fondo conico con lieve pendenza. Il fondo e le pareti sono verniciati di colore grigio (materiale atossico).
La circolazione idrica 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).

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. Nell'ambito del progetto sull'allevamento del pagro, la gestione del filtro biologico é stata condizionata da un avviamento tardivo ed incompleto. Per l'avvio completo del filtro, si deve considerare un periodo di 50-60 giorni con aggiunta giornaliera di NH4+, nonché un rinnovo totale dell'acqua, prima di utilizzare il circuito per un ciclo di allevamento larvale. Successivamente, in periodo di allevamento larvale, l'apporto di sostanze azotate, assicurato dal metabolismo larvale e dall'apporto alimentare, crescerà progressivamente con l'aumento della biomassa in vasca.

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

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

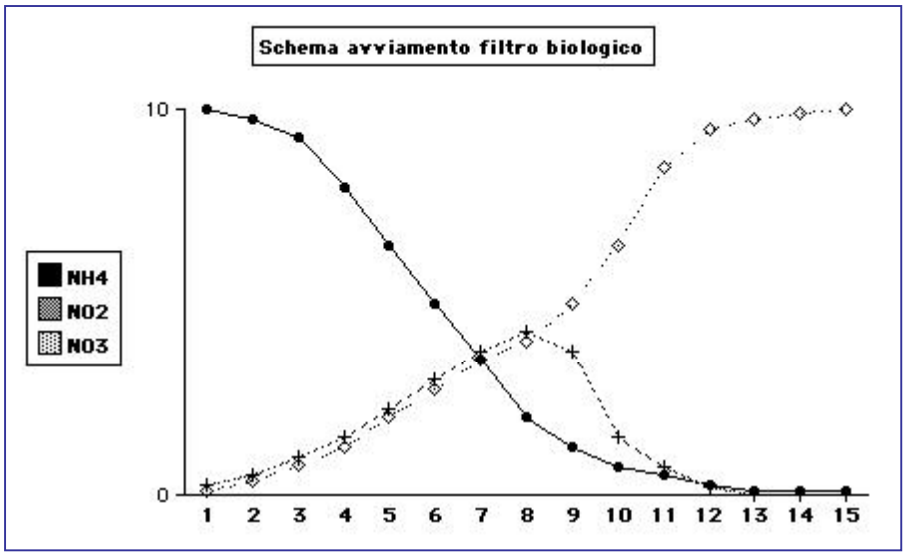


Fig.9 - Principio di funzionamento della filtrazione biologica

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 "acque verdi", che per l'arricchimento dei rotiferi, sono stati acquistati presso il CCAP (GB).
Nell'ambito del progetto sull'allevamento larvale del pagro, é stato utilizzato solo il ceppo *Nannochloropsis sp.*, mentre il ceppo *Isochrysis sp*. é stato oggetto di ulteriori lavori di standardizzazione delle metodiche di produzione.

Aspetti fondamentali e aggiornamento dei protocolli

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

Condizioni di coltura

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

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

Mantenimento dei ceppi e avvio del ciclo di produzione

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

Cicli di produzione

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

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

Le colture di *Nannochloropsis sp.* sono state effettuate con medium "f/2 modificato" (allegato 1) e sulla base dei risultati della standardizzazione (protocollo in allegato 2.)
Lo "start up" delle produzioni di *Nannochloropsis sp.* si é sovrapposto con la fine del periodo di standardizzazione svolto nell'ambito del precedente progetto. Tra dicembre 2003 e gennaio 2004, sono stati avviati 3 cicli di produzione: il primo da sacchi di 200 l preesistenti e gli altri 2 da provette da 10 cc (protocollo). Il primo ciclo é stato eliminato in seguito ad inquinamento dei sacchi con rotiferi. Il secondo ciclo é stato eliminato per scarsa crescita algale nei volumi iniziali (500 cc). Il terzo ciclo é stato completato in 88 giorni.Non essendo le alghe del terzo ciclo sufficienti per coprire il fabbisogno del ciclo di allevamento larvale del pagro, é stato avviato un quarto ciclo di produzione, partendo da sacchi di *Nannochloropsis sp.* concentrate provenienti dall'impianto di Civitavecchia. Tutte le alghe prodotte sono state utilizzate per l'aggiunta diretta in vasca di allevamento larvale (metodo detto delle "acque verdi") e/o per l'avvio di nuove colture di rotiferi.

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

Le colture di *Isochrysis sp.*sono state condotte con medium "Walne" (allegato 1) e sulla base dei risultati della standardizzazione (protocollo in allegato 2.) Il primo ciclo di produzione, avviato da un sacco di 200 litri, ottenuto durante la fase standardizzazione del precedente progetto, é stato perso per inquinamento da altri ceppi algali. Il secondo ciclo di produzione, avviato a metà marzo, da provette da 10 ml (protocollo) é stato completato in 90 giorni, ma non é stato disponibile in tempo per il ciclo di allevamento larvale del pagro.

1.7 METODICHE DI COLTURA ED ARRICCHIMENTO DEI ROTIFERI

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

Fig.10 – Brachionus plicatilis (Rotifero) con uova

L'Istituto dispone dei 2 ceppi di rotiferi, *Brachionus rotundiformis* e *Brachionus plicatilis*, il primo proveniente da un'altra avannotteria e il secondo acquistato presso il CCAP (GB).
Entrambi i ceppi sono stati utilizzati nell'ambito del ciclo sperimentale sul pagro.
Il perfezionamento delle tecniche di produzione e l'apporto di ossigeno nelle vasca di produzione, hanno consentito il raggiungimento di densità (n° di rotiferi/ml) in linea con gli standard del settore.

Aspetti fondamentali e aggiornamento dei protocolli

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

Condizioni di coltura e di arricchimento

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

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

Mantenimento dei ceppi e avvio del ciclo di produzione

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

Cicli di produzione su alghe

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

Produzione su lievito

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

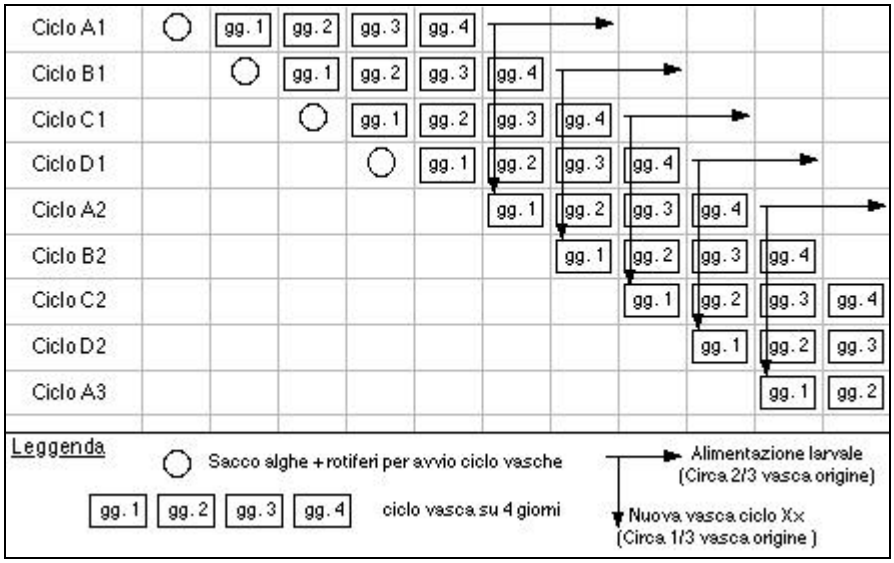


Fig.11 - Schema di gestione delle vasche di coltura e di arricchimento dei rotiferi

Produzione ed arricchimento in vasca

Da ogni sacco maturo, ottenuto come descritto precedentemente, si ottiene una vasca iniziale. Poi, al quarto giorno di produzione e dopo arricchimento, i rotiferi vengono in parte utilizzati per l'alimentazione larvale (60-70%) e in parte per l'avvio della vasca successiva. Da una vasca iniziale si potrà ripetere tale operazione fino a 10-12 volte, poi si dovrà ripartire da una vasca iniziale derivata dall'inoculo un sacco algale. Alternando le vasche di produzione seconda la logica illustrata in figura 6 si garantisce la continua disponibilità di rotiferi per l'alimentazione larvale.
Coltura ed arricchimento dei rotiferi sono stati eseguiti con diete artificiali INVE.

Analisi indicativa (INVE)			
Proteine	min. 35 %	Vit.A	500.000 IU/kg
Lipidi	min. 16 %	Vit.D	50.000 IU/kg
Ceneri	max. 12 %	Vit.E	3.600 IU/kg
Umidità	5 %	Vit.C	3.000 IU/kg
Σ n-3 HUFA		min. 35 mg/g peso secco	
DHA/EPA		min. 2	

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

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

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

Somministrazione da giorno1 a giorno3, con dose giornaliera di "Culture Selco", determinata sulla base della densità di rotiferi in vasca (mediamente di 240 g/mc):

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

Variante di arricchimento per la mattina:

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

Variante arricchimento per il pomeriggio:

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

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

Al fine di garantire la continua disponibilità di rotiferi si é proceduto con il protocollo di gestione illustrato in figura 6. Dopo lo "start up" delle produzioni di *B. rotundiformis* nel marzo 2004, dal 02 al 05 aprile, sono state avviate 4 cicli di produzione in vasca, tutti lanciati ad un giorno d'intervallo. Di fronte ai problemi riscontrati nel secondo e nel terzo ciclo, sono stati avviati altri 2 cicli sostitutivi.

Vasca iniziale	Data avvio	n° vasche successive	Massima concentrazione	Osservazioni
A	02 aprile	n°6	992	Avvio difficile
F	03 aprile	n°1	130	Crollo al 3° giorno
E	04 aprile	n°1	118	Scarsa crescita
D	05 aprile	n°3	709	2° e 3° vasca scarse
C	20 aprile	n°3	1.344	Ciclo nella norma
F	29 aprile	n°2	1.238	Ciclo nella norma

L'andamento dei vari cicli di produzione ha evidenziato una notevole variabilità, da un lato per l'inquinamento da ciliati e dall'altro la qualità dell'acqua prelevata da mare. In effetto, malgrado la filtrazione dell'acqua ad un micron, si é messo in evidenza la permanenza di materiale in sospensione che comportava una torbidità residua, nonché la formazione di depositi sulle pareti.

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

Successivamente allo "start up" delle produzioni di *B. plicatilis.* svoltosi nel aprile 2004, sono stati avviati due soli cicli di produzione in vasca.

Vasca iniziale	Data avvio	n° vasche successive	Massima concentrazione	Osservazioni
B	03 aprile	n°3	208	Scarsa crescita
E	13 aprile	n°4	968	Andamento variabile

L'analisi dei risultati rispecchia quanto già descritto per *B. rotundiformis*.

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

Fig.12 – Metanauplio di *Artemia salina*

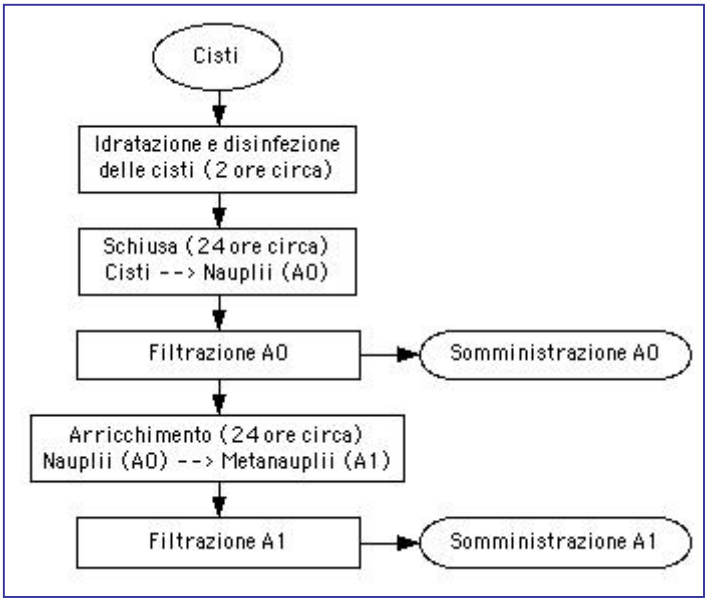


Fig.13 - Schema di utilizzo dell'artemia

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

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

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

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

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

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

Aspetti fondamentali e aggiornamento dei protocolli

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

Idratazione e schiusa

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

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

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

Arricchimento

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

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

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

1.9 DIETE ARTIFICIALI

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

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

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

Fig.14 – Somministrazione mangime

1.10 MODALITÀ DI MONITORAGGIO DEL CICLO DI ALLEVAMENTO LARVALE

Monitoraggio condizioni in vasca

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

- temperatura (media giornaliera di 3 rilevamenti) (°C);
- ossigeno disciolto (media giornaliera di 3 rilevamenti) (mg/l.);
- luce;
- aerazione;
- tipo di circolazione a circuito chiuso (parziale o totale);
- rinnovo di acqua nel circuito (% volume totale giornaliero).
- nitriti (mg/l NO_2^-) nella vasca di allevamento larvale (3 rilevamenti al giorno);
- nitrati (mg/l NO_3^{--}) nella ripresa del circuito chiuso (3 rilevamenti al giorno).

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

- controllo e registrazione giornaliera della mortalità (effettiva e stimata);
- da giorno 7 a giorno 20, controllo giornaliero della percentuale di insufflazione della vescica natatoria;

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

Monitoraggio della mortalità

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

Biometrie e fotografie

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

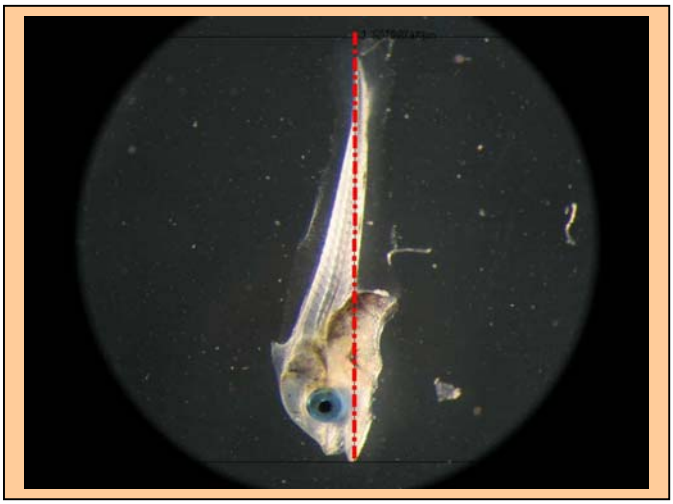


Fig.15 – Rilievi biometrici

2. RISULTATI E DISCUSSIONE

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

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

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

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

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

2.1 SEMINA, SCHIUSA E RIASSORBIMENTO DEL SACCO VITELLINO (GIORNO 1-3)

Nella fase iniziale, svoltasi nelle vasche V.1 e V.2, tutti i parametri sono rimasti nella norma ad eccezione delle temperature. In effetti, si sono verificate alcune difficoltà nel controllo delle temperature, con valori in vasca troppo alti rispetto alla temperatura di deposizione delle uova.

Origine delle uova

Le uova sono state fornite dall'ICRAM (Istituto Centrale di Ricerca Applicata al Mare), nell'ambito della collaborazione in corso tra i due istituti. I riproduttori, stabulati preso un impianto ubicato in Sicilia (Acquacoltura Mediterranea - Trapani), erano stati mantenuti in condizioni naturali di temperatura e di fotoperiodo. La deposizione é avvenuta naturalmente senza procedere a stimolazione ormonale.
Il lotto utilizzato nell'ambito del presente ciclo sperimentale, costituito da 600.000 uova proveniva da una deposizione del 01 aprile 2004. La temperatura all'emissione delle uova era di 15,5 °C. La percentuale di fecondazione, stimata all'atto della raccolta delle uova, si attestava su 93,1 % (circa 560.000 uova vitali).
Per il trasporto, il suddetto lotto é stato diviso equamente in n°3 contenitori da 15 litri, con 200.000 uova ciascuno. La spedizione ha avuto luogo via aereo, da Palermo a Roma Fiumicino, il pomeriggio del giorno di deposizione (01 aprile 2004). Da Roma, i tre contenitori sono stati caricati su un automezzo con impianto di aria condizionata e consegnati presso l'impianti di Torre Cerrano in tarda serata. All'arrivo, la temperatura media nei 3 contenitori era di 17, 2°C.

Semina

La semina ha avuto luogo nella notte tra il 01 e il 02 aprile 2004, nelle due vasche tronco-coniche da 0,9 mc del circuito n°1 (vasche V1 e V2). Prima della semina, i 3 contenitori, ancora chiusi, sono stati immersi nell'acqua delle vasche di destinazione affinché le temperature interna ed esterna potessero equilibrarsi. Raggiunta la temperatura di 18,4°C i contenitori sono stati aperti e le uova sono state equamente divise nella misura di 300.000 in V.1 e di 300.000 in V.2.

Incubazione (giorno 1-0)

Durante la fase d'incubazione sono state mantenute le seguenti condizioni:

- temperatura in vasca nell'intervallo 18,4±0,2 °C;
- filtri di superficie con rete da 55 µm;
- ricambio in vasca regolato al minimo (air-lift - 2 litri/min);
- punto di aerazione centrale, senza pietra porosa;
- niente luce e vasca coperta.

L'aerazione, era regolata in modo da garantire una ripartizione omogenea delle uova in vasca, senza che essi vadano a sbattere sulle pareti.
Gli spurghi da fondo vasca sono stati effettuati giornalmente con la raccolta dei seguenti quantitativi di uova non fecondate e/o con processo embrionale abortito:

- V.1: 50 g. il 02 apr. e 56 g. il 03 apr., cioè un totale di 106 g. di uova;
- V.2: 67 g. il 02 apr. e 48 g. il 03 apr., cioè un totale di 115 g. di uova.

Considerando la media di 1.200.000 uova / kg, si possono stimare 127.000 uova perse in V.1 e 138.000 uova perse in V.2. La notevole mortalità osservata durante la fase di incubazione é probabilmente riconducibile alle condizione di trasporto ed in particolare all'incremento termico dai 15,5 °C della deposizione ai 18,4°C della di semina. Malgrado le notevoli mortalità (45 % circa), un controllo effettuato sulle uova vitali ha evidenziato una segmentazione regolare ed uno sviluppo embrionale nella norma.

Schiusa e riassorbimento del sacco vitellino (giorno 0-3)

La schiusa si é verificata la mattina del 03 aprile (giorno 0). Successivamente, le larve sono state mantenute in V.1 e V.2 fino al 06 aprile (giorno 3 dopo la schiusa).

Durante la fase iniziale di riassorbimento del sacco vitellino sono state mantenute le seguenti condizioni:

- temperatura in vasca nell'intervallo 17,6±0,2 °C;
- filtro di superficie con rete da 55 µm;
- ricambio in vasca regolato al minimo (air-lift - 2 litri / min);
- punto di aerazione centrale, senza pietra porosa;
- niente luce.

Gli spurghi, effettuati dopo la schiusa, con scadenza giornaliera, hanno evidenziato un'ulteriore mortalità, senza che sia possibile stimarne l'importanza numerica. In effetti, le larve appena schiuse non sono ancora pigmentate e risulta molto difficile contarle.
I controlli della densità larvale in vasca, effettuati a giorno 1 (04 aprile) e a giorno 3 (06 aprile) hanno evidenziato, prima del trasferimento, la presenza media di circa 35 larve per litro, ossia di 31.500 larve per vasca. Sulla base di tale stime, la sopravvivenza a giorno 3, prima del trasferimento in vasca di allevamento larvale (V3), pari a 63.000 larve vive rispetto alle 560.000 uova vitali del lotto di origine, risulta del 11,3 % delle uova vitali alla spedizione. Come accennato precedentemente per le uova, la notevole mortalità larvale nei primi giorni, é anch'essa riconducibile alle condizioni di trasporto e di semina.

2.2 DA GIORNO 4 A GIORNO 30

A giorno 3, tutte le larve sono state trasferite dalle vasche V.1 e V.2, nella vasca V.3 del circuito chiuso n°2. Il trasferimento é avvenuto mediante secchi, dopo avere portato la vasca di destinazione alla stessa temperatura di quelle di provenienza.

Densità larvale iniziale

Poche ore dopo il trasferimento, la densità in vasca é stata stimata pari a 13,5 larve per litro, corrispondente ad un numero in vasca di 54.000 soggetti. I dati di sopravvivenza, dalla deposizione al trasferimento in V.3, sono riassunti in tabella 7.

Semina			
Conta	600,000 uova		
Tasso di fecondazione	93.1%		
Uova vitali	558,600 uova		
Incubazione	**N°**	**% conta iniziale**	**%uova fecondati**
Uova raccolti (spurghi) - V.1	127,000		
- V.2	138,000		
Totale V.1 e V.2	265,000		
Rimanenza	335,000	55.8	-
Giorno 1 - Giorno 3	**N°**	**% conta iniziale**	**%uova vitali**
Conta larve vive - V.1	31,500		
-V.2	31,500		
Totale V.1 e V.2	63,000	10.5	11.3
Totale V.3	54,000	9.0	9.7

Tab.7 - Dati di sopravvivenza dalla semina a giorno 3

Condizioni in vasca

Al trasferimento le condizioni in vasca erano le seguenti:

- temperatura in vasca di 18,3 °C;
- filtro di superficie con rete da 55 µm;
- ricambio in vasca di 5 litri/min (air-lift);
- n°3 punti di aerazione senza pietra porosa, di cui uno centrale e due laterali;
- assenza di luce.

Nel periodo da giorno 3 a giorno 30, sono intervenuti una serie di variazioni:

- l'aerazione e il ricambio idrico sono stati progressivamente incrementati;
- i rinnovi di acqua nel circuito sono stati progressivamente aumentati;
- da giorno 4, si é proceduto all'accensione del neon sopra la vasca, con 13 ore di luce (09.00 - 22.00) e 11 ore di buio (22.00 - 09.00);
- da giorno 8, la luce é stata attenuata mediante il posizionamento di un telo ombreggiante sopra il neon.

Nel periodo considerato, si sono verificati due picchi di nitriti con concentrazioni massime superiori o uguali a 0,20 mg/l NO_2^-: il primo tra giorno 15 e giorno 19 e il secondo da giorno 27 a giorno 30. Con ogni probabilità, il filtro biologico, avviato il 27 febbraio, non era ancora a regime.
Per abbassare le concentrazioni di nitriti si é provveduto a frequenti rinnovi dell'acqua nel circuito nelle proporzioni riportate in allegato 5 e riassunte in figura 16 (% di rinnovo giornaliero).

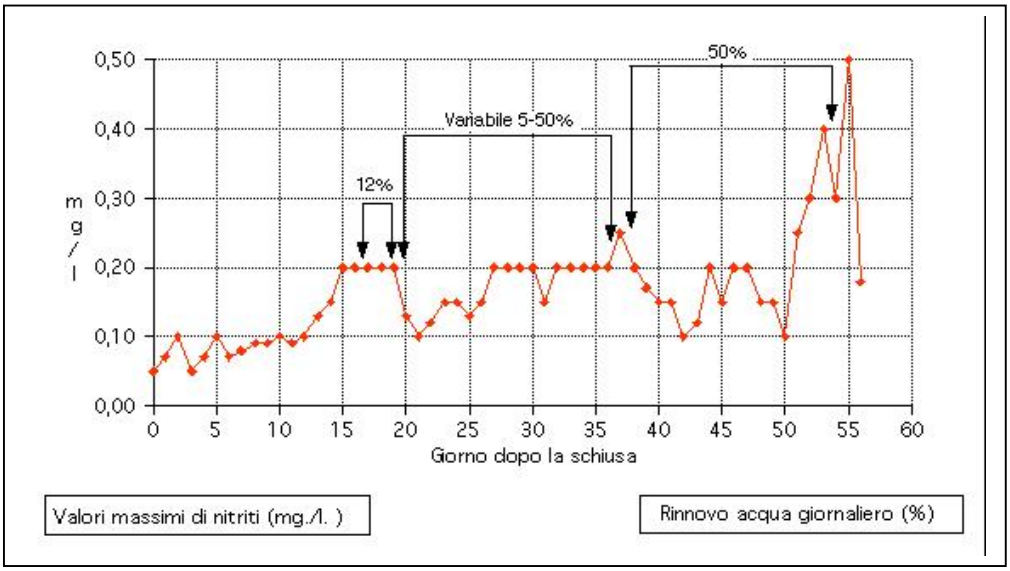


Fig.16 - Grafico nitriti e rinnovi acqua giornalieri

Il primo picco, da giorno 15 a giorno 19 é stato caratterizzato da rinnovi giornalieri ancora bassi (12 %) e da concentrazioni di nitriti costanti su valori di circa 0,20 mg/l. Il secondo picco da giorno 27 a giorno 30 é stato invece caratterizzato da rinnovi giornalieri più importanti e da concentrazioni di nitriti frequentemente sotto 0,10 mg/l.

Mortalità stimate e registrate

I dati di mortalità e le relative stime, monitorati ed analizzati come descritto nei materiali e metodi, sono riassunti in figura 17. Partendo da una popolazione a giorno 3, di 54.000 larve (13,5 larve/litro) e applicando le seguenti stime di mortalità:

- 15 % di mortalità a giorno 3, dopo il trasferimento;
- 10-5 % al giorno nei primi 4 giorni di alimentazione (giorno 4-7);

risulta una popolazione in vasca, a giorno 8, di circa 34.500 larve.

Successivamente, da giorno 8 a giorno 30, sulla base dei rilevamenti a fondo vasca (sifonamento), degli spurghi e dei morti a galla (bordi e schiumatori), si evidenzia un picco di mortalità da giorno 18 a giorno 21. Tale mortalità, che si é verificata 2-3 giorni dopo il primo picco di nitriti (giorno 15-19 con valori costanti di circa 20 mg/l), é probabilmente riconducibile ad un'intossicazione da nitriti.
L'assenza di mortalità in concomitanza del secondo picco di nitriti (giorno 27-30 con valori massimi di circa 20 mg/l) é probabilmente dovuto ai maggiori rinnovi effettuati, nonché ad una minore sensibilità delle larve.

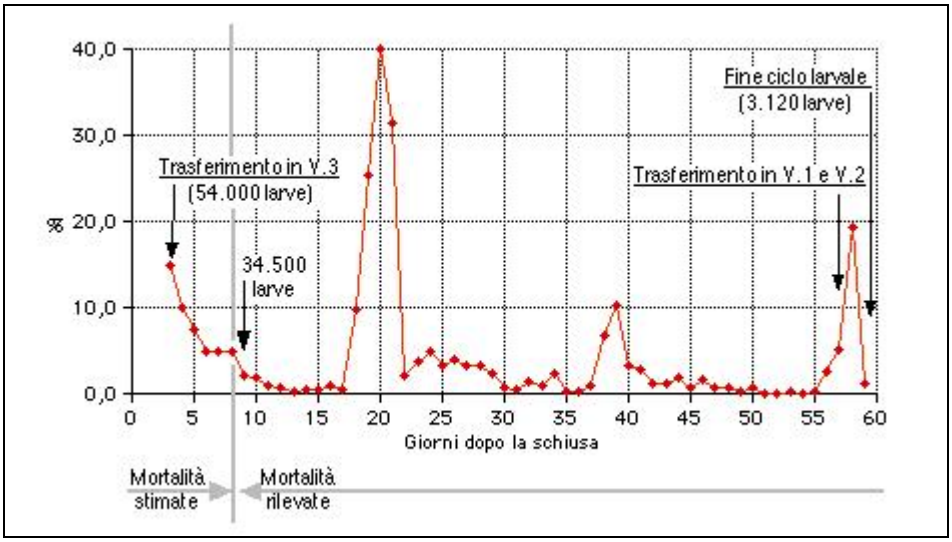


Fig.17 - Curva delle mortalità relative

Modalità di somministrazione di alghe

Il presente ciclo sperimentale é stato condotto secondo la tecnica dette delle "acque verdi". A giorno 4 (07 aprile), successivamente all'apertura della bocca, si é provveduto all'ascensione della luce, alla prima aggiunta di alghe e alla prima somministrazione di rotiferi (pomeriggio).

La tecnica delle "acqua verdi" é stata prescelta per i vari vantaggi che presenta:

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

Per tutto il periodo da giorno 4 a giorno 30, le alghe sono state aggiunte in vasca, alle ore 09.00 della mattina, immediatamente dopo l'ascensione della luce e prima dell'inizio di somministrazione dei rotiferi. L'aggiunta giornaliera, di circa 40-60 litri di coltura matura di *Nannochloropsis sp.* (35-50 milioni di cellule/ml), era equivalente ad una concentrazione in vasca di allevamento larvale di circa 500.000 cellule algali/ml.

Modalità di somministrazione dei rotiferi

Da giorno 4 a giorno 24, i rotiferi sono stati somministrati tutti giorni, dalle 09.00 alle 21.00, mantenendo una concentrazione di prede in vasca pari a 7,5-10 rotiferi/cc. I rotiferi arricchiti per la mattina erano filtrati alle 09.00 e disponibili fino alle 14.00 (5 ore), mentre quelli per il pomeriggio erano filtrati alle 15.00 e disponibili fino alle 21.00 (6 ore).
Dopo la prima somministrazione della mattina (ore 09.00) e del pomeriggio (ore 15.00), la concentrazione di rotiferi in vasca era mantenuta costante, mediante controlli nel numero rimasto in vasca ed integrazione fino a 7,5-10 rotiferi/cc (controlli ogni 2 ore).
Da giorno 25 a giorno 30, la somministrazione della mattina é stata sospesa, mentre le modalità di quella del pomeriggio sono rimaste invariate.

I quantitativi giornalieri somministrati sono riassunti nella tabella sottostante.

Periodo	Rotiferi somministrati (milioni/giorno)	Rimanenza media alle ore 09.00 (n/cc)	Osservazioni
Giorno 4	5.0	-	Solo pomeriggio
Giorno 5 - Giorno 9	20.2	3.5	
Giorno 10 - Giorno 14	24.0	4.3	
Giorno 15 - Giorno 19	44.2	2.5	Picco nitriti
Giorno 20 - Giorno 24	50.0	1.3	
Giorno 25 - Giorno 30	28.2	2.5	Inizio artemia a gg.25

Tab.8 - Rotiferi somministrati

La scarsa densità larvale iniziale (13,5 larve/litro) e la necessità di mantenere comunque una densità di prede di almeno 7,5 rotiferi/ml, hanno determinato la permanenza in vasca di rotiferi "vecchi" (arricchimento del giorno precedente), con un minore livello qualitativo delle prede disponibili, rispetto alla somministrazione di rotiferi appena arricchiti.

Controllo dell'alimentazione su rotiferi

I quantitativi somministrati hanno avuto un andamento regolare. Malgrado le mortalità registrate e le concentrazioni di nitriti, il comportamento alimentare é rimasto nella norma.

Giorno	Pancia piena o semi-piena	Numero larve
4	83 %	25 / 30
5	-	-
6	90 %	(25+2) / 30
7	97 %	29 / 30
8	80 %	(19+5) / 30
9	86 %	(25+5) / 35
10	93 %	(21+7) / 30
11	97 %	(21+8) / 30
12	96 %	(20+2) / 23
13	-	-
14	90 %	9 / 10
15	80 %	(2+6) / 10
16	95 %	(9+10) / 20
17	95 %	19 / 20
18	-	-
19	95 %	19 / 20
Controllo almeno 2 ore dopo l'inizio dell'alimentazione. (n a pancia piena + n a pancia semi-piena) / n totale larve		

Tab.9 - Controllo alimentazione

Controlli vescica natatoria

Da giorno 8 sono stati posizionati n°2 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 (Fig.18). Gli schiumatori, sono stati puliti ad intervallo di un ora e per tutta la giornata.
Le larve hanno iniziato ad insufflare la vescica natatoria da giorno 10. Dal giorno successivo é stato eseguito, insieme al controllo dell'alimentazione, il rilevamento giornaliero delle percentuale di soggetti con regolare insufflazione della vescica natatoria. I dati sono riassunti in tabella 10.

Fig.18 – Vescica natatoria

Giorno	Vescica natatoria	Numero
11	43%	13 / 30
12	74%	17 / 23
13	-	-
14	90%	9 / 10
15	80%	8 / 10
16	100%	20 / 20

Tab.10 - Controlli vescica natatoria

Da giorno 18 a giorno 21, in coincidenza con il picco di mortalità, si sono osservate alcuni soggetti a digiuno e con iper-insufflazione della vescica natatoria. Tale sintomatologia é scomparsa nei giorni successivi.

Modalità di somministrazione dei nauplii di Artemia (A0)

A giorno 25 e a giorno 26, l'artemia A0 é stata somministrata solo di mattina. Da giorno 27 a giorno 31, l'artemia A0 é stata somministrata tutto il giorno, dalle 09.00 alle 21.00, mantenendo una concentrazione di prede in vasca pari a 1,5 A0/ml.
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 in vasca era mantenuta costante, mediante controlli del numero rimasto in vasca ed integrazione fino a 1,5 A0/cc (controlli ogni 2 ore).
I quantitativi giornalieri somministrati sono riassunti in tabella 11.

2.3 DA GIORNO 31 A GIORNO 58

L'inizio del periodo é stato determinato dalla sospensione delle somministrazioni di alghe e di rotiferi.

Condizioni in vasca

Nel periodo da giorno 31 a giorno 57 sono intervenuti ulteriori variazioni:

- l'aerazione e il ricambio idrico sono stati ulteriormente incrementati;
- i rinnovi di acqua nel circuito sono stati mantenuti su livelli del 50% giornaliero;
- sono stati utilizzati dei filtri di superficie da 100 µm e da 250 µm.

Nel periodo considerato, si sono verificati altri due picchi di nitriti con concentrazioni massime superiori o uguali a 0,20 mg/l NO_2^-: il primo tra giorno 32 e giorno 38 e il secondo da giorno 51 a giorno 55.
Il secondo picco, é stato caratterizzato da concentrazioni massime superiori o uguali a 0,50 mg/l NO_2^- (vedere Fig.14), con l'impossibilità di proseguire il ciclo in condizioni accettabili. Considerata la biomassa in vasca e la mancanza di acqua di rinnovo, é stato deciso di trasferire gli avannotti presso l'impianto di preingrasso di destinazione.

Mortalità stimate e registrate

I dati di mortalità e le relative stime, monitorati ed analizzati come descritto nei materiali e metodi, sono riassunti in figura 15. Sulla base dei rilevamenti a fondo vasca (sifonamento), degli spurghi e dei morti a galla (bordi e schiumatori), si evidenziano due picchi di mortalità: il primo da giorno 38 a giorno 40 ed il secondo da giorno 57 a giorno 58. Entrambi i picchi sono riconducibili ad una probabile intossicazione da nitriti.

Nell'ambito delle operazioni di trasferimento (01 giu.04), gli avannotti del peso medio di 0,25-0,35 grammi (stima), sono stati contati. Con un numero finale di 3.300 avannotti, risulta una sopravvivenza del 0,59 % rispetto alle 560.000 uova vitali del lotto di origine.

Modalità di somministrazione dell'Artemia arricchita (A1)

Da giorno 32 a giorno 57 l'artemia A1 é stata somministrata tutti giorni, dalle 09.00 alle 21.00, mantenendo una concentrazione di prede in vasca pari a 1,5 A0/cc.

Come risulta in tabella 11, i consumi sono aumentati regolarmente, proporzionalmente all'incremento di biomassa delle popolazione larvale.

Periodo	Tipo	**Artemie Somministrate** (milioni/giorno)	**Rimanenza media alle ore 09.00** (n/cc)	**Osservazioni**
Giorno 25 - Giorno 26	A0	5.6	- / 0	Solo mattina
Giorno 27 - Giorno 31	A0	6.0	0.6	Fine rotiferi gg.31
Giorno 32 - Giorno 36	A1	7.6	0.4	Inizio mangime
Giorno 37 - Giorno 41	A1	9.0	0.5	
Giorno 42 - Giorno 46	A1	16.1	0.3	
Giorno 47 - Giorno 51	A1	19.1	0.0	
Giorno 52 - Giorno 56	A1	26.4	0.0	Fine prova

Tab.11 - Artemie somministrate

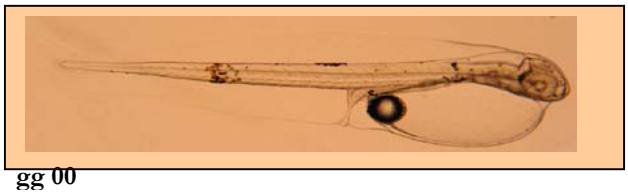
Modalità di somministrazione del mangime

Da giorno 32 a giorno 57 sono stati somministrati quantitativi crescenti di dieta artificiale "Proton INVE" (200-400 µm).

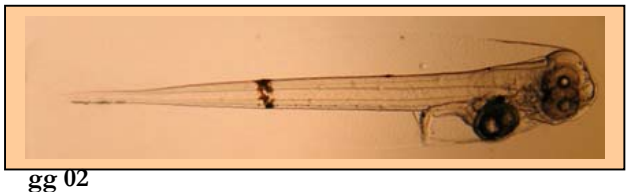
Da giorno 32 a giorno 40, la somministrazione dei 2 grammi giornalieri, é avvenuta manualmente in 4-6 volte al giorno e su tutta la superficie della vasca. Lo scopo era di abituare le larve al mangime e di stimolare il metabolismo enzimatico, in concomitanza con lo sviluppo e la differenziazione dell'apparato digerente. Da giorno 41 in poi, il mangime, in quantità crescenti da 2 a 10 g al giorno, é stato somministrato in un punto unico della vasca, mediante l'installazione e l'utilizzo di una mangiatoia a nastro. A fine ciclo sperimentale tutti i pesci erano svezzati. Dopo il trasferimento tutti gli avannotti sono stati alimentati esclusivamente con diete artificiali.

2.4 FOTOGRAFIE E BIOMETRIE DEGLI STADI LARVALI E POST LARVALI

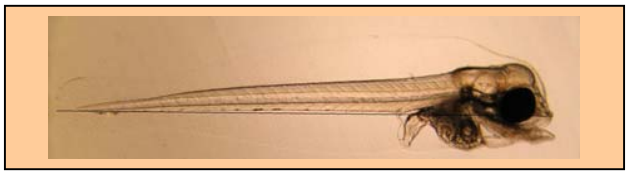
Dalla schiusa a giorno 46, sono stati prelevati periodicamente dei campioni di circa 10 larve, che sono state fotografate una ad una con apparecchio digitale. Dalle fotografie, mediante un apposito software, le larve sono state misurate individualmente.



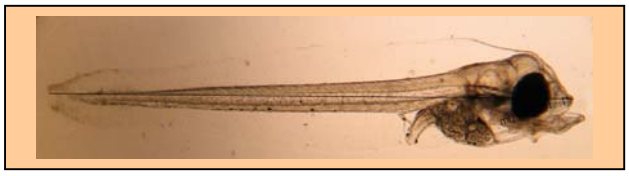
gg 00



gg 02



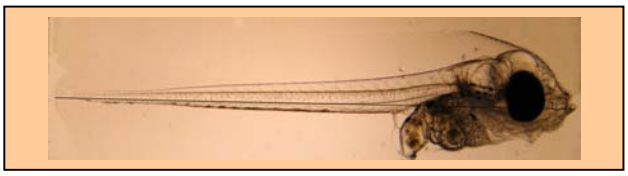
gg 04



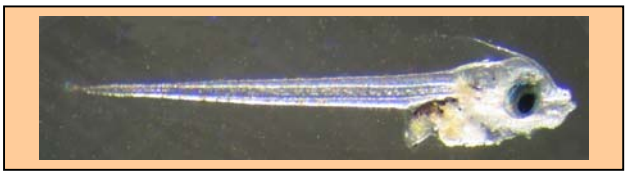
gg 05

gg 06

gg 07



gg 08



gg 09

gg 13

gg 14

gg 15

gg 16

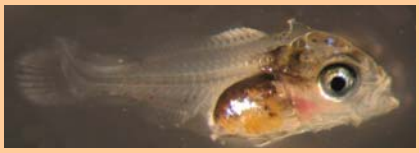
gg 18

gg 19

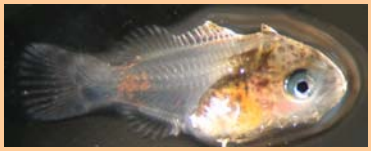
gg 20

gg 23

gg 25

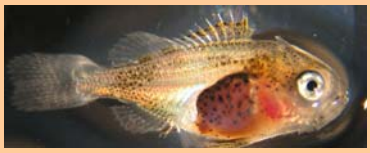


gg 29



gg 31

gg 34



gg 37

gg 41

gg 46

gg 53

gg 145

Si riporta in figura 19 la curva di crescita ottenuta riportando la media delle lunghezze relative di ogni campionamento. Si desume dal grafico un accrescimento regolare.

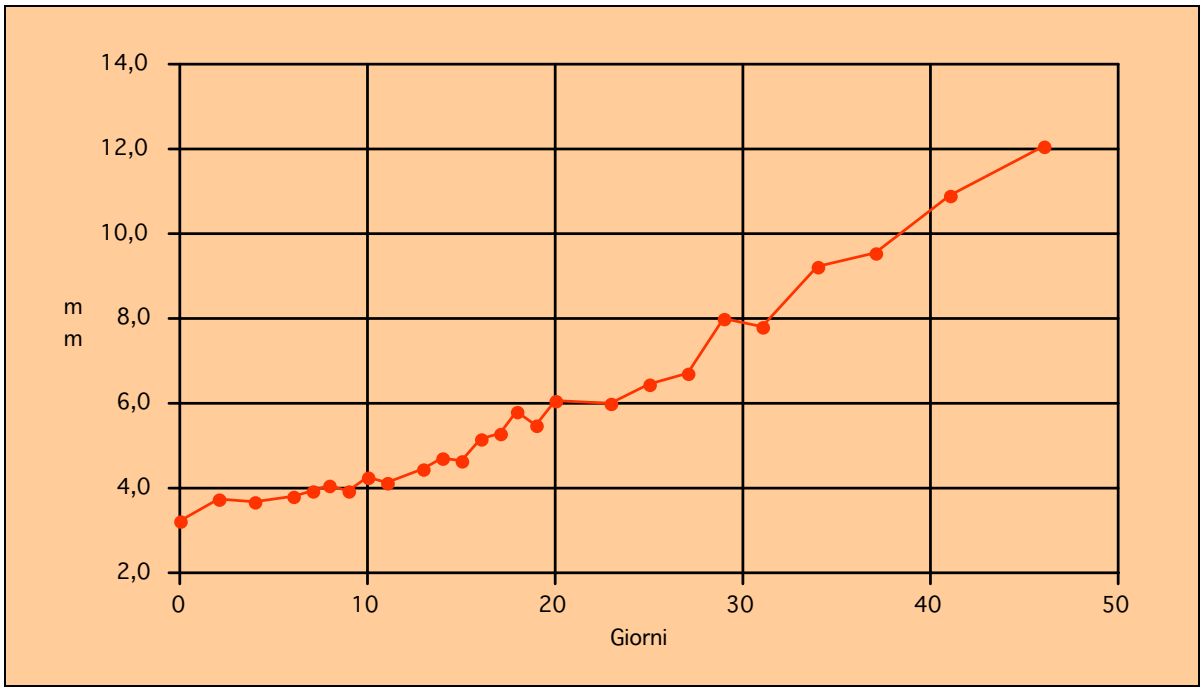


Fig.19 - Accrescimenti larvali

2.5 PREIGRASSO E INGRASSO

I pesci (Fig.20) sono stati inizialmente seminati in 2 vasche circolari da 2 mc, in condizioni di allevamento intensivo (Fig.21). Le vasche di forma tronco-conica (diametro 1,8 m), erano posizionate all'esterno e approvvigionate con acqua di mare a temperatura stagionale (intervallo 13- 28°C).
Tra fine aprile ed inizio maggio 2005, i pesci sono stati divisi in 4 vasche e mantenuti nelle medesime condizioni. Le fasi di preingrasso ed ingrasso sono state monitorate da giugno 2004 a maggio 2005.

Fig.2

Già nella fase di preingrasso si é evidenziata un'anomala pigmentazione degli avannotti di produzione artificiale che presentavano tutti una livrea prevalentemente grigia con solo pochi riflessi arancioni, rispetto al colore rosso intenso dei soggetti selvatici. Al fine di verificare l'eventuale reversibilità del problema si é provato, in una delle due vasche, a somministrare una dieta addizionata di astaxantina e cantaxantina (pigmenti carotenoidi). Malgrado un lieve incremento dei riflessi arancioni nei soggetti trattati, la prova é stata interrotta in quanto evidentemente non risolutiva. E' molto probabile che le cause del problema siano da ricercare nella modalità di allevamento larvale.

A prescindere dalla suddetta prova, sono state somministrate diete artificiali per specie ittiche marine di granulometria crescente, da diete sbriciolate di 500/800 micron a diete estruse di 3 mm (tab.12):

PERIODO	TIPO		GRANULOMETRIA
02.06.04 - 17.06.04	Dieta 1		500/800µm
18.06.2004 - 31.07.2004	Dieta 2	Vasca 1 – 2x	1 mm
		Vasca 2 – 2	
01.08.2004 - 19.08.2004	Dieta 3		1,8 mm
20.08.2004 - 31.08.2004	Dieta 4		1,5 mm
01.09.2004 - 31.09.2004	Dieta 5		2 mm
01.10.2004 - 30.11.2004	Dieta 6		3 mm
01.12.2004 - 28.03.2005	Dieta 7		3 mm
01.04.2005 - 23.05.2005	Dieta 8		4 mm

Tab.12 – Diete somministrate durante la fase di ingrasso

Da un primo campionamento eseguito in data 11 giu. 04, risultano pesi medi di 0,53 g in vasca A e di 0,60 g in vasca B. Da una secondo campionamento eseguito in data 20 ago.04, insieme ad una conta di controllo, risultano 1.564 pesci di 10 g nella vasca A e n° 1.465 pesci di 10,6 g nella vasca B. Da un terzo campionamento eseguito in data 17 nov.04, risultano pesi medi di 39,2 g in vasca A e di 47,7 g in vasca B. Inoltre, nel periodo dal 20 ago.04 al 11 nov.04, risulta una mortalità registrata di 350 soggetti in vasca A e di 393 soggetti in vasca B.

I campionamenti successivi sono stati condotti prelevando lo stesso numero di soggetti da ciascuna vasca. Da un campionamento parziale, eseguito in data 23 febbraio 2005, su 12 pesci, risulta un peso medio di 74,7 g, una lunghezza totale di 15,8 cm ed un altezza di 5,2 cm. Dall'ultimo campionamento, eseguito in data 21 aprile 2005 su 40 soggetti (figura 22, 23), risulta un peso medio di 80,6 grammi (coefficiente di variazione 12,8) e una lunghezza totale media di 16 cm (coefficiente di variazione 7,2).
Tutti i dati sono riassunti in tabella 13 e fig.24.

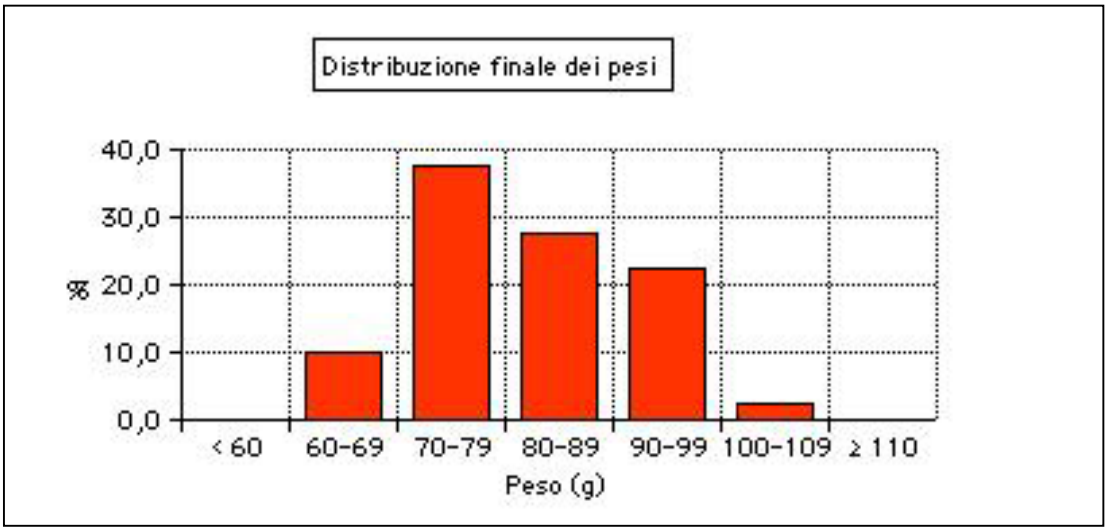


Fig.22 – Pesi, campionamento finale del 21 aprile 2005

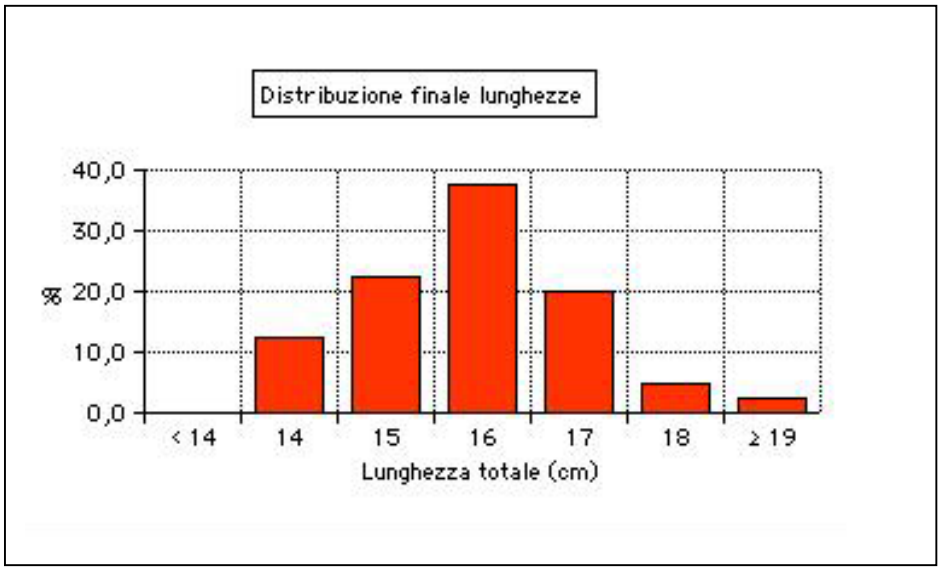


Fig.23 – Lunghezze, campionamento finale del 21 aprile 2005

Luogo & data	Numero (n°)	Peso medio (g)	Carico (kg/mc)	Mortalità (n°)	(%)
Trasferimento					
01 giu.04	3,300	0,25 - 0,35	-	-	-
Vasca A / 2004					
11 giu.04	1,700	0.53	0.5	-	-
20 ago.04	1,564	10.0	7.8	136	8.0
11 nov.04	1,214	39.2	23.8	350	22.4
Vasca B / 2004					
11 giu.04	1,600	0.60	0.5	-	-
20 ago.04	1,465	10.6	7.8	135	8.4
11 nov.04	1,072	47.7	25.6	393	26.8
2005					
23 feb.05	-	74.7	-	-	-
21 apr.05	-	80.6	-	-	-

Tab.13 - Campionamenti 2004-2005

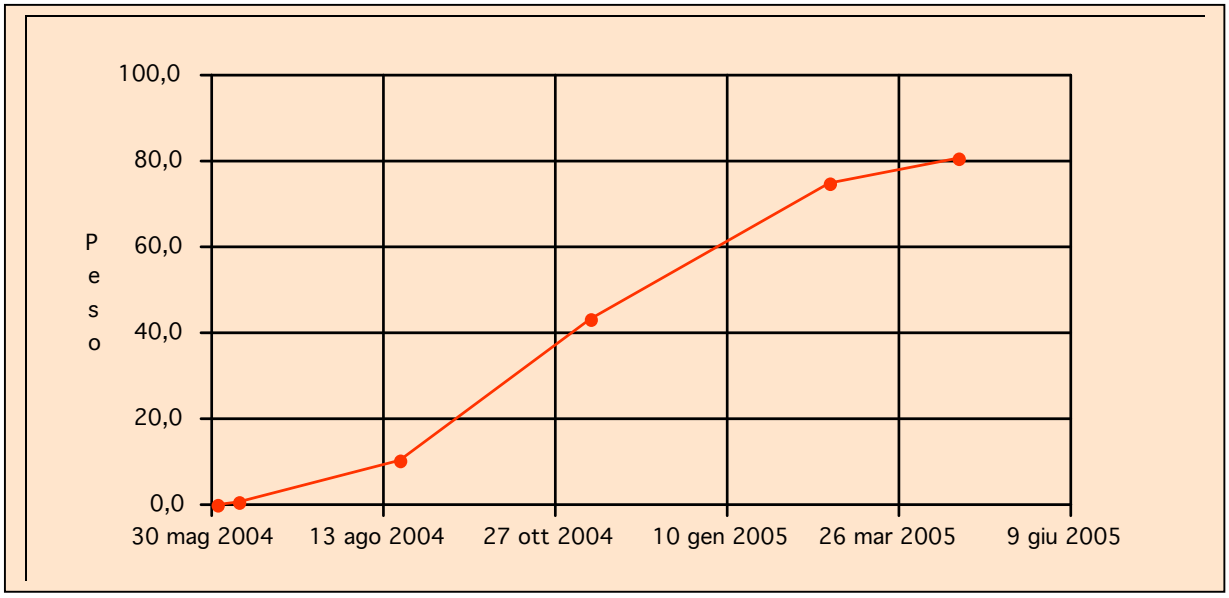


Fig.24 - Accrescimenti ingrasso

Nel campionamento eseguito il 17 nov.04, si é anche notato in alcuni soggetti una lieve deformità a livello della pinna caudale. La manifestazione e/o l'amplificazione di tale anomalia é probabilmente riconducibile alla forma delle vasche (vasche circolari).

2.6 CONCLUSIONI

Il pagro é probabilmente uno dei migliori candidati per la diversificazione delle specie ittiche marine di interesse commerciale.

I risultati del ciclo sperimentale, illustrati nella presente relazione, evidenziano da un lato l'ottima crescita delle larve allevate in condizioni artificiali e l'assenza di problemi di rilievo nell'alimentazione, ma in controparte, conferma i problemi di pigmentazione già riportati in bibliografia.
Nell'ambito del congresso "Seafarming today and tomorow" tenutosi a Trieste nell'ottobre 2002, M. Pavlidis & coll., mettevano in evidenza come il principale ostacolo, allo sviluppo delle produzioni di pagro su scala industriale, l'anomala pigmentazione dei soggetti prodotti in condizioni artificiali.
Malgrado i suddetti problemi e a dimostrazione che si riescono già, seppure con costi non sostenibili, a produrre soggetti con pigmentazione naturale, il Dr.Pascal Divanach riportava le prime produzioni di avannotti, nonché la disponibilità presso alcuni impianti del bacino mediterraneo, di prodotto di taglia commerciale (2002).
I risultati ottenuti con la somministrazione, in fase di preingrasso ed ingrasso, di diete addizionate di pigmenti carotenoidi, sembrano indicare che il problema della diversa pigmentazione rispetto ai soggetti selvatici possa essere solo attenuato, ma non risolto, mediante la somministrazione tardiva di una dieta modificata.
Sarebbe interessante individuare da una parte l'origine del problema e dall'altra il momento dello sviluppo larvale in cui si determina. Nell'ottobre 2004, durante il congresso, tenutosi a Barcellona, sono stati presentati nuovi lavori con alcune ipotesi sull'origine del problema. Se tali ipotesi dovessero trovare conferma, sarebbe molto interessante riproporre la sperimentazione con l'obbiettivo di ottenere avannotti con regolare pigmentazione ad un costo di produzione che sia compatibile con le attuali condizioni di mercato.

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

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

BIBLIOGRAFIA

- Balsamo V. e Monaco S. Tecniche di allevamento di nuove specie in maricoltura. SIPI, Submitted.

- Biology and rearing technology of the red porgy, *Pagrus pagrus*: a review – M.Pavlidis, A.Fostier, P.Divanach and M.Kentouri – Istituto di Biologia Marina di Creta, Grecia; Dipartimento di Biologia dell'Università di Creta, Grecia; INRA-SCRIBE, Rennes Cedex, Francia.

- Capitoli, R.R. and E.M. Haimovici. 1993. Feeding of the red porgy (*Pagrus pagrus*) in Southern Brazil. Frente-Marit 14: 81-86.

- Ciechomski, J.D. de & G. Weiss. 1973. Desove y desarrollo embrionario y larval del besugo, *Pagrus pagrus* (Linne) en el Mar Argentino (Pisces, Sparidae). Physis, Secc. A, 32(85): 481-487.

- Conides, A., and Glamuzina, B., 2001. Study of the early larval development and growth of the red porgy, *Pagrus pagrus* with emphasis on the mass mortalities observed during this phase. Scientia Marina, 65(3), 193-200

- Divanach P., Kentouri M., Charalambakis G., Pouget F., Sterioti A., 1993. Comparison of growth performance of six Mediterranean fish species reared under intensive farming conditions in Crete (Greece), in raceways with the use of self feeders. Int. Conf. Bordeaux Aquaculture, Bordeaux (France), 25-27 Mar 1992. PRODUCTION, ENVIRONMENT AND QUALITY. GHENT BELGIUM EUROPEAN AQUACULTURE SOCIETY. SPEC. PUBL. EUR. AQUACULT. SOC. 18: 285-297

- Eiras J.C., Rego A.A., 1987. The histopathology of Scomber japonicus infection by Nematobothrium scombri (Trematoda: Didymozoidae) and of larval anisakid nematode infections in the liver of Pagrus pagrus. MEM. INST. OSWALDO CRUZ. 82(2): 155-159

- Harris,-P.J.; McGovern,-J.C. 1997. Changes in the life histiry of red porgy, *Pagrus pagrus*, from the southeastern United States, 1972-1994. Fish. Bull. 95: 732-747.

Mihelakakis, A., Yoshimatsu, T., Tsolkas, C. 2001. Spawning in captivity and early life history ofcultured Red porgy, *Pagrus pagrus*. Aquaculture 199: 333-352.

- Hernandez Cruz, C.M., Salhi, M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Gonzalez, M.M., and Fernandez Palacios, H. 1999. Rearing techniques for red porgy (*Pagrus pagrus*) during larval development. Aquaculture 179: 489-497.

- Hood, P.B. and Johnson, A.K. 2000. Age, growth, mortality, and reproduction of red porgy (*Pagrus pagrus*), from the eastern Gulf of Mexico. Fish. Bull. 98: 723-735.

- Kentouri M., O'-Neill D., Divanach P., Charalambakis G., 1994. A study on the quantitative water requirements of red porgies, Pagrus pagrus L. (Pisces: Sparidae), during early on-growing under self-feeding conditions. AQUACULT. FISH. MANAGE. 25(7): 741-752.

- Kentouri M., Pavlides M., Papandroulakis N., Divanach P., 1995. Culture of the red porgy, Pagrus pagrus, in Crete. Present knowledge, problems and perspectives. In: "Marine Aquaculture Finfish Species Diversification". Proceedings of the seminar of the ciheam network on technology of aquaculture in the Mediterranean (tecam), Nicosia (Cyprus), 14-17 jun 1995. Zaragoza (Spain) CIHEAM 1995, 16: 65-78

- Kentouri, M., G. Koumoundouros, P. Divanach & A. Sterioti. 1992. The embryonic development of red porgy (*Pagrus pagrus*) and of common dentex (*Dentex dentex*) in Crete. Proceedings of the XXXIII C.I.E.S.M. Congress, 12-17 October, Trieste, 3 pp.

- Kokokyris, L., Brusle, S., Kentouri, M., and Fostier, A. 1999. Sexual maturity and hermaphroditism of the red porgy (*Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae). Mar. Biol. 134: 621-629.

- Kokokyris, L., Fostier, A., Divanach, P., and Kentouri, M. 1997. Sexuality of reared populations of the red porgy (*Pagrus pagrus* (L., 1758). Juvenile bisexuality or diandric protogyny? Pp. 199-201 in Proceedings of the 5th Hellenic Symposium on Oceanography and Fisheries. Volume 2. Fisheries.

- Labropoulou, M. and Papadopoulou Smith, K.N. 1999. Foraging Behaviour Patterns of Four Sympatric Demersal Fishes. Est. Coast. Shelf Sci. 49: 99-108.
- Labropoulou, M., Machias, A., and Tsimenides, N.. 1999. Habitat selection and diet of juvenile red porgy, (*Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). Fish. Bull. 97: 495-507.

- Mendez E., Anastasiadis P., Kentouri M., Pavlidis M., Divanach P., 1995. Preliminary data on spawning activity of five Mediterranean teleost species kept in captivity, in Crete (Greece). In: "Actas del V° Congreso Nacional de Aquicultura", Universitat de Barcelona, Castelló i Orvay, F. and Calderer i Reig, A. (eds.): 398-403.

- Mylonas, C.C. , Papadaki, M. and P. Divanach 2003. Seasonal changes in gamete production and quality in the red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture Research 34: 1161-1170

- Pajuelo, J.G. and J.M. Lorenzo, 1996. Life history of the red porgy (*Pagrus pagrus)* (Teleostei: Sparidae) off the Canary Islands, central east Atlantic. Fish. Res. 28:163-177

- Papaconstantinou, C. and E. Caragitsou, 1989. Feeding interactions between two sympatric species *Pagrus pagrus* and Phycis phycis around Kastellorizo island (Dodecanese, Greece). Fish. Res. 7:329-342.
- Parker, R.O. Jr. 1990. Tagging studies and diver observations of fish populations on live-bottom reefs of the U.S. southeastern coast. Bull. Mar. Sci. 46: 749-760.

- Porrello S., Marino G., Finoia M.G., Mandich A., Massari A., Santulli A., Messina M.C., Andaloro F., Vivona

P., 1998. Accrescimento e riproduzione di Pagrus pagrus. BIOL. MAR. MEDIT. 5(3):1186-1191.

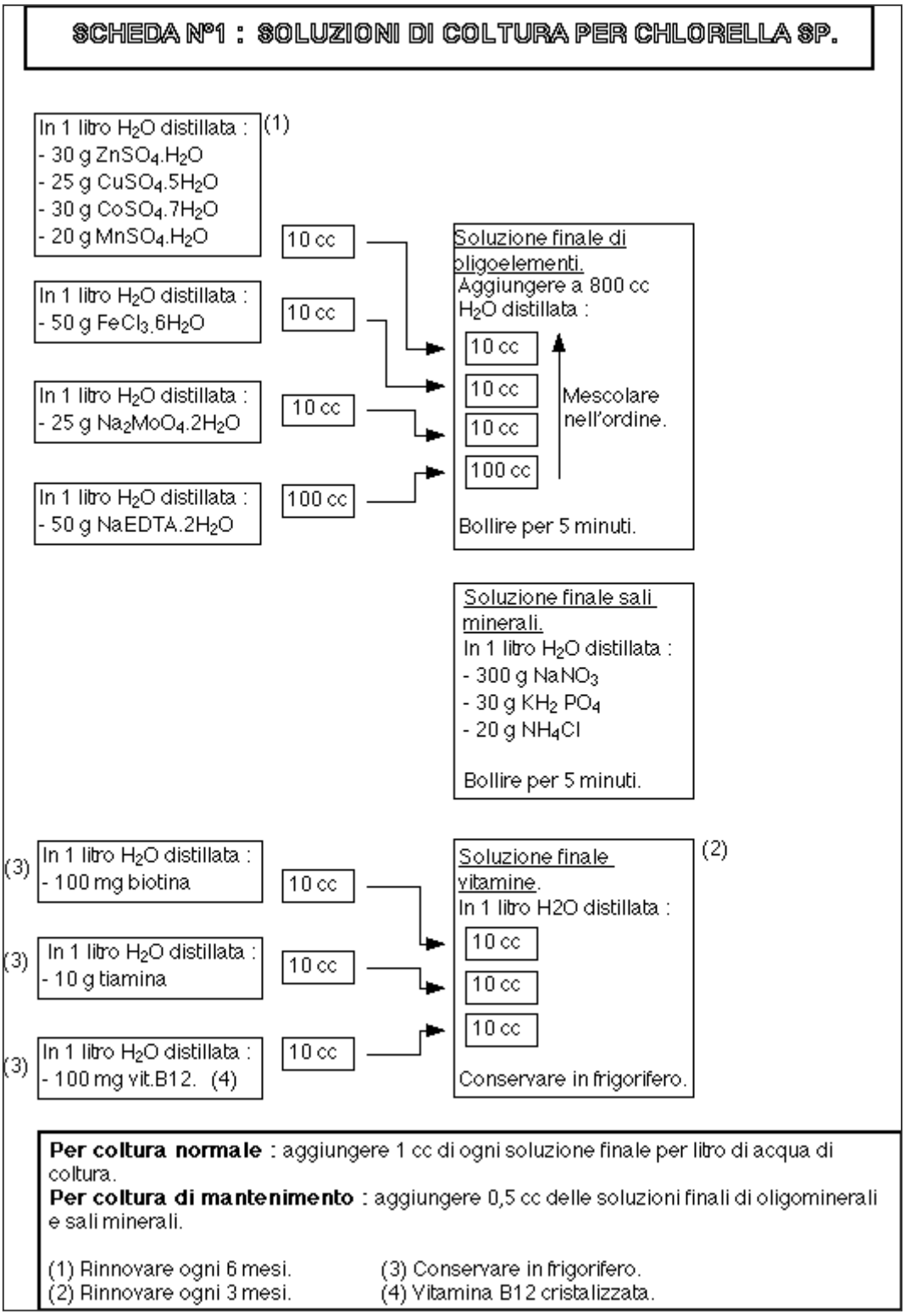
- S.Chatzifotis, M.Pavlidis, C.Doñate Jimeno, G.Vardanis, P.Divanach – Centro Ellenico per le Ricerche Marine, Istituto d'Acquacoltura, Heraklion, Creta, Grecia – Dipartimento di Biologia dell'Università di Creta, Grecia.

- Vassilopoulou, V. and Papaconstantinou, C. 1992. Age, growth and mortality of the red porgy (*Pagrus pagrus*), in the Eastern Mediterranean Sea (Dodecanese, Greece). Vie Milieu 42: 51-55.

- Watanabe, T. & V. Kiron. 1996. Red sea bream (*Pagrus major*). In: N. Bromage & R. Roberts (eds.). Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science, New York, pp. 398-413.

ALLEGATO 1

Preparazione f2 guillard modificato



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

Preparazione Walne

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.

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

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

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

Coltura di partenza in beuta da 500 cc (** / -)
- inoculo con n°1-2 provette a 20-25 M cell/cc;
- coltura fino a a 20 (15) M cell/cc;
- durata coltura di circa 20 giorni.

Coltura in beute da 500 cc (** / -)
- inoculo con 100 cc da beuta 500 cc di partenza (20 M cell/cc);
- coltura da 4 (3) M cell/cc a 25 (15) M cell/cc;
- durata coltura di 15-20 giorni.

Coltura in beute da 2 litri (** / -)
- inoculo con n°1 beuta da 500 cc (25 M cell/cc);
- coltura da 6,25 (3,75) M cell/cc a 20 (15) M cell/cc;
- durata coltura di 10-12 giorni.

Coltura in beute da 5 litri (** / **)
- inoculo con n°1 beuta da 2 litri (20 M cell/cc);
- coltura da 8 (6) M cell/cc a 20 (15) M cell/cc;
- durata coltura di 8-10 giorni.

Coltura in sacchi da 200 litri (****)
- inoculo con n°4 beute da 5 litri (20 M cell/cc);
- coltura da 2 (1,5) M cell/cc a 12 (10) M cell/cc;
- durata coltura di 15 giorni.

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

ALLEGATO 3

Condizioni in vasca

Data	Giorno	Temp. (°C)	Ossigeno (mg O_2/l)	Luce	Aria	Ricambio (l/min)	Circolazione acqua	Nitriti (mg NO_2/l)	Acqua nuova Vasca	Acqua nuova Circuito	Osservazioni
Incubazione e schiusa (V.1)											
apr 2, 2004	**-1**	18,4	-	Luce	N°1 punto	Circuito	Parziale	-		-	
apr 3, 2004	**0**	-	-	spenta	centrale	chiuso	(Solo	-	Circa 2%	-	Schiusa
apr 4, 2004	**1**	17,6	8,4	&	senza	2 l./min	(filtro biologico	0,05	/giorno	-	
apr 5, 2004	**2**	18,5	9,8	vasca	pietra	(13%/ora)	intermedio)	0,07	(spurghi)	-	
apr 6, 2004	**3**	18,1	5,8	coperta	porosa			0,10		-	Trasferimento in V.3
Incubazione e schiusa (V.2)											
apr 2, 2004	**-1**	18,4	-	Luce	N°1 punto	Circuito	Parziale	-		-	
apr 3, 2004	**0**	-	-	spenta	centrale	chiuso	(Solo	-	Circa 2%	-	Schiusa
apr 4, 2004	**1**	17,6	8,3	&	senza	2 l./min	(filtro biologico	0,05	/giorno	-	
apr 5, 2004	**2**	18,0	9,6	vasca	pietra	(13%/ora)	intermedio)	0,05	(spurghi)	-	
apr 6, 2004	**3**	18,0	5,9	coperta	porosa			0,10		-	Trasferimento in V.3
Allevamento larvale giorno 4 / giorno 30 (V.3)											
apr 6, 2004	**3**	18,3	-	Spenta	N°1 punto	Circuito		0,05		-	
apr 7, 2004	**4**	18,0	8,7		centrale	chiuso		0,06	Da gg.8	-	
apr 8, 2004	**5**	17,8	8,0	Luce	+	5 l./min	Parziale	0,07	Circa 1%	-	
apr 9, 2004	**6**	17,6	7,8	accesa	n° 2 punti	(7,5%/ora)	(Solo	0,07	/giorno	-	
apr 10, 2004	**7**	17,5	7,8	09.00-22.00	laterali		(filtro biologico	0,08	(pulizia	-	
apr 11, 2004	**8**	17,5	7,9	&		Acqua	intermedio)	0,09	del fondo)	-	
apr 12, 2004	**9**	17,4	7,9	Telo ombra	Tutti senza	nuova		0,08		-	
apr 13, 2004	**10**	17,3	7,8	da gg.8	pietra	Trascurabile		0,09		-	
apr 14, 2004	**11**	17,3	7,7		porosa			0,09		-	
apr 15, 2004	**12**	17,4	7,9					0,10		-	

Condizioni in vasca

Data	Giorno	Temp. (°C)	Ossigeno (mg O_2/l.)	Luce	Aria	Ricambio (l./min)	Circolazione acqua	Nitriti (mg NO_2/l.)	Acqua nuova Vasca	Acqua nuova Circuito	Osservazioni
Allevamento larvale giorno 4 / giorno 30 (V.3) - Segue											
apr 16, 2004	**13**	17,6	7,3	Luce accesa 09.00-22.00 & Telo ombra	N°1 punto centrale + n° 2 punti laterali Tutti senza pietra porosa Aumento progressivo	Circuito chiuso Aumento progressivo da 5 l./min (7,5%/ora) a 10 l./min (15%/ora) Acqua nuova Variabile 2-8 l./min	Parziale 23/24 ore (Solo (filtro biologico intermedio) & Totale per circa 30-60 min/gg	0,11	1,5 %	-	Concentrazioni critici di nitriti ==> mortalità larvale da gg.18 a gg.21
apr 17, 2004	**14**	17,5	6,8					0,15	2,5 %	10 %	
apr 18, 2004	**15**	17,6	6,9					0,18	2,5 %	-	
apr 19, 2004	**16**	17,5	7,0					0,20	12 %	15 %	
apr 20, 2004	**17**	17,3	7,4					0,20	12 %	-	
apr 21, 2004	**18**	17,2	7,6					0,20	12 %	20 %	
apr 22, 2004	**19**	17,3	7,7					0,20 / 0,12	45 %	-	
apr 23, 2004	**20**	17,3	7,8					0,13 / 0,10	45 %	20 %	
apr 24, 2004	**21**	17,3	7,9					0,10	5 %	-	
apr 25, 2004	**22**	17,5	7,9					0,12	5 %	-	
apr 26, 2004	**23**	17,1	7,9					0,13	25 %	-	
apr 27, 2004	**24**	16,9	7,7					0,13	25 %	20 %	
apr 28, 2004	**25**	16,6	7,9					0,13	50 %	15 %	
apr 29, 2004	**26**	17,1	7,4					0,15 / 0,08	50 %	-	
apr 30, 2004	**27**	17,4	7,2					0,15	5 %	-	
mag 1, 2004	**28**	17,6	7,4					0,20 / 0,05	50 %	-	Concentrazioni critici di nitriti
mag 2, 2004	**29**	17,6	7,2					0,20	33 %	10 %	
mag 3, 2004	**30**	17,7	7,3					0,20/0,10	50 %	20 %	
Allevamento larvale giorno 31 / giorno 58 (V.3)											
mag 4, 2004	**31**	17,9	6,9	Luce accesa 09.00-22.00	Come sopra con aumento progressivo	Come sopra 10 l./min + 2-8 l./min	Come sopra Parziale + Totale	0,15	25 %	-	Concentrazioni critici di nitriti ==> mortalità contenuta
mag 5, 2004	**32**	17,7	7,1					0,20/0,15	45 %	-	
mag 6, 2004	**33**	17,5	7,2					0,20	25 %	-	
mag 7, 2004	**34**	17,3	7,3					0,20/0,15	30 %	-	
mag 8, 2004	**35**	17,3	7,4					0,20/0,15	40 %	-	
mag 9, 2004	**36**	17,3	7,4					0,20	30 %	20 %	

Condizioni in vasca

Data	Giorno	Temp. (°C)	Ossigeno (mg O_2/l.)	Luce	Aria	Ricambio (l./min)	Circolazione acqua	Nitriti (mg NO_2/l.)	Acqua nuova Vasca	Acqua nuova Circuito	Osservazioni
Allevamento larvale giorno 31 / giorno 58 (V.3) - Segue											
mag 10, 2004	**37**	17,3	7,3	Luce accesa 09.00-22.00	Come sopra con aumento progressivo	Circuito chiuso Aumento progressivo da 10 l./min (15%/ora) a 15 l./min (20%/ora) Acqua nuova Variabile 8-12 l./min	Parziale 22/24 ore (Solo (filtro biologico intermedio) & Totale per circa 60-90 min/gg	0,25	50 %		
mag 11, 2004	**38**	17,3	7,2					0,20	50 %		
mag 12, 2004	**39**	17,4	7,3					0,20/0,15	55 %		
mag 13, 2004	**40**	18,0	7,9					0,15/0,10	50 %		
mag 14, 2004	**41**	18,6	7,1					0,15/0,08	55 %		
mag 15, 2004	**42**	18,5	7,0					0,10	50 %		
mag 16, 2004	**43**	18,7	7,0					0,10	50 %		
mag 17, 2004	**44**	19,0	7,1					0,20/0,08	50 %		
mag 18, 2004	**45**	19,1	6,9					0,15/0,10	50 %		
mag 19, 2004	**46**	19,2	6,8					0,20/0,10	50 %		
mag 20, 2004	**47**	19,1	6,3					0,20/0,12	50 %		
mag 21, 2004	**48**	19,4	6,4					0,15/0,08	50 %		
mag 22, 2004	**49**	20,5	6,1					0,15/0,08	50 %		
mag 23, 2004	**50**	20,4	6,6					0,15/0,08	50 %		
mag 24, 2004	**51**	21,6	6,8					0,25/0,10	50 %		
mag 25, 2004	**52**	20,8	6,5					0,30/0,10	50 %		Nuovo aumento dei nitriti ==> alta mortalità da gg.55
mag 26, 2004	**53**	19,6	5,6					0,40/0,10	50 %		
mag 27, 2004	**54**	19,4	6,2					0,30/0,10	50 %		
mag 28, 2004	**55**	19,4	6,5					0,50/0,10	90 %		
mag 29, 2004	**56**	19,3	7,1					0,20/0,08	75 %		
mag 30, 2004	**57**	Trasferimento in V.1 e V.2 per conta e successiva spedizione.									
mag 31, 2004	**58**										
giu 1, 2004	**59**	Spedizione Civitavecchia									

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

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE

"G.CAPORALE"

DOCUP PESCA REGIONE ABRUZZO
BANDO 2003 - MISURA 4.6 - "AZIONI INNOVANTI"
PROGETTO 04/IM/03/AB

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

INTEGRAZIONI alla RELAZIONE TECNICA FINALE

DR. ALESSANDRA PAOLINI

MAGGIO 2005

ESAME ORGANOLETTICO

Il 30 maggio i pagri sono stati pescati nelle vasche dell'impianto SGM di Civitavecchia (Roma) per essere sottoposti all'esame organolettico, effettuando una prova comparativa con spigole di pari età (14 mesi di vita) pescate nello stesso momento.
E'stato utilizzato il metodo ISO 8587:1988, Sensory Analysis, Methodology, Ranking.
I campioni di pagro e di spigola appena pescati sono stati posti in ghiaccio e trasportati in laboratorio dove sono stati sottoposti a cottura semplice e quindi somministrati a 8 consumatori a cui è stato chiesto di valutare le seguenti caratteristiche: odore, consistenza, sapore, presenza di spine.

Risultati

La valutazione data dagli 8 consumatori ai filetti di pagro e spigola cotti è riportata nella tabella seguente:

Caratteristiche	Pagro	Spigola
Odore		
di pesce fresco	6	4
di mare	2	3
di mangime		1
Consistenza		
Morbida	2	6
Normale	5	2
Stopposa	1	
Sapore		
Di mare	5	5
Di pesce selvatico	3	
Di pesce allevato		3
Di carne		
Presenza di spine		
Modesta	1	2
Accettabile	4	5
Fastidiosa	2	1

Considerazioni

La spigola (vedi paragrafo precedente) è risultata avere carni più grasse rispetto al pagro e questo ha influito positivamente sulla morbidezza del filetto e negativamente sulle caratteristiche del sapore.
La presenza di spine ritenuta da 2 consumatori eccessiva nel pagro è dovuta alla robustezza in questa specie delle costole e degli pterigofori, gli ossicini che sostengono la pinna dorsale. Molto poco presenti sono invece le miospine, ovvero le "spine" presenti tra i fasci muscolari che costituiscono un limite al consumo di alcune specie (es. grongo) e che sono realmente insidiose in quanto sottili e presenti all'interno della polpa.
Durante la preparazione si è potuto inoltre apprezzare la migliore filettabiltà del pagro rispetto alla spigola. Il pagro ha una forma più arrotondata rispetto alla spigola che ha una forma allungata e schiacciata, infatti lo spessore medio del pagro è di 2,6 cm mentre lo spessore medio della spigola è 1,9 cm, per questo risulta più facile nel pagro separare il filetto dalla colonna vertebrale, filetto che risulta spesso e consistente e quindi con migliori carattestiche reologiche e di lavorabilità.

VALUTAZIONE DELLA MASSA MAGRA

Sono stati pescati 20 pagri nelle vasche dell'impianto SGM di Civitavecchia (Roma) per essere sottoposti alla valutazioni biometriche e bromatologiche. E' stata effettuata una prova comparativa con 20 spigole di pari età (14 mesi di vita) pescate nello stesso momento.
I campioni di pagro e di spigola appena pescati sono stati posti in ghiaccio e trasportati in laboratorio dove sono stati misurati e pesati (biometrie). Inoltre da ognuno di essi è stato prelevato il fegato ed un cubetto di muscolatura e cute al di sotto della pinna dorsale. I fegati di tutti i soggetti di una stessa specie così come i pezzetti di muscolatura sono stati omogeneizzati ed analizzati come campione unico.

Risultati

Esame biometrico
I risultati dell'esame biometrico sono riportati nella tabelle seguenti:

PAGRO				
lunghezza cm	peso totale gr	peso eviscerato gr	visceri e grasso periviscerale gr	
17	111,3	104,21	7,09	
17,50	119,8	112	7,8	
18,00	119,8	113	6,8	
18,50	161,9	148,6	13,3	
17,00	120,4	112	8,4	
17,00	118,9	111,1	7,8	
14,00	60,7	57,03	3,67	
17,00	107,3	101,1	6,2	
15,50	119,6	110,2	9,4	
16,00	105,5	98,5	7	
18,00	144,5	134,6	9,9	
17,50	132	120,7	11,3	
18,20	133,4	124,7	8,7	
16,00	98,7	92,4	6,3	
18,00	144,4	134,9	9,5	
16,50	100,9	95,2	5,7	
17,00	119,5	111,31	8,19	
18,80	160,6	150,11	10,49	
16,50	138,8	130	8,8	
17,50	145,41	136,42	8,99	
17,1	123,2	114,9	8,3	Media
1,131312698	23,51403466	21,60789973	2,144796	deviazione standard

SPIGOLE				
lunghezza cm	peso totale gr	peso eviscerato gr	visceri e grasso periviscerale gr	
23,7	173,3	144,9	28,4	
23,1	163,8	140	23,8	
24	163,3	144,4	18,9	
23	144,8	126,3	18,5	
22	128,3	109,44	18,86	
23,5	138,9	122,2	16,7	
24	144,4	127,1	17,3	
25,5	184,7	160,7	24	
23,5	144,12	124,85	19,27	
22,5	132,7	114,4	18,3	
21,5	128	110,7	17,3	
21	117,1	102,9	14,2	
22,7	126,1	110,1	16	
25,5	182	163,8	18,2	
21,5	118,8	101,9	16,9	
24,5	176,9	151,6	25,3	
21,5	137,4	116,5	20,9	
24,3	173,5	145,9	27,6	
23,2	164	144,2	19,8	
23,4	141,25	125,1	16,15	
23,195	149,1685	129,3495	19,819	Media
1,276704	21,6783776	18,9197239	3,960394584	deviazione standard

L'analisi bromatologica dei filetti ha dato il seguente risultato:

	Pagro		Spigola	
	muscolo	fegato	muscolo	Fegato
Proteine g/100gr	20,19	9,54	18,99	8,74
Lipidi g/100gr	1,48	6,31	3,88	14,98

Considerazioni

I dati mostrano che a parità di età le spigole hanno un peso eviscerato leggermente superiore a quello dei pagri (14,4 gr) mentre il peso dei visceri e del grasso periviscerale è più che doppio, questo indica che i pagri hanno dato luogo ad un prodotto più magro, come sottolineato dai risultati dell'analisi bromatologia. Il risultato è ancora più interessante se si considera che le due specie sono state alimentate con lo stesso mangime, somministrato nelle stesse quantità (1% del peso vivo).

PERFORMANCES ZOOTECNICHE E ANALISI EMATOCHIMICHE SU *Pagrus pagrus*

I pagri stabulati presso l'impianto SGM (Roma) sono stati monitorati durante le fasi di preingrasso ed ingrasso sia dal punto di vista zootecnico che ematochimico.
Le performances zootecniche sono state studiate al fine di valutare quanto questa specie innovante sia effettivamente un valido prodotto di acquacoltura. I parametri zootecnici considerati sono stati accrescimento, qualità organolettiche, quantità di massa magra.
I dati sull'accrescimento sono riportati nella relazione "progetto pilota per l'allevamento di una specie ittica innovativa: il pagro" in particolare nel paragrafo 2.5 intitolato preingrasso ed ingrasso.
La valutazione dei parametri ematici è stata effettuata al fine di ottenere informazioni sul metabolismo di questa specie in allevamento.
Il 27 agosto 2004 è stato effettuato un primo prelievo su spigola per la messa a punto del metodo, nella stessa occasione si è eseguito inoltre un tentativo di prelievo su pagro, che viste le ridotte dimensioni dell'animale (peso medio di 10g) non ha avuto esito positivo.
Nel mese di ottobre, è stato effettuato un secondo tentativo di prelievo su pagro, con animali di circa 40g, la prova ha avuto nuovamente esito negativo viste le ridotte dimensioni degli esemplari.
Gli esami ematochimici sono stati eseguiti da dicembre 2004, quando i pesi medi della popolazione avevano raggiunto un valore di circa 50g, fino a maggio 2005, a cadenza bimestrale, con prelievi effettuati al mattino, un'ora dopo la somministrazione dell'alimento, al fine di evitare possibili variazioni dei livelli enzimatici.
I prelievi del sangue sono stati effettuati prelevando il sangue dalla vena caudale utilizzando siringhe da 1 ml con aghi da 23 e 21 gauge (Fig.25)

Fig. 01 Fase del prelievo

I campioni ematici sono stati trasferiti in provette da 10 ml, ogni provetta conteneva 1 ml di sangue da cui successivamente è stato separato ed analizzato il siero. Il numero dei campioni ematici prelevati al momento di ogni campionamento è stato di 3 per un totale di 15 campioni. Nel primo prelievo (6 dicembre) in ogni provetta è stato messo il sangue di due esemplari perché la quantità di sangue prelevabile da un singolo esemplare non era sufficiente all'esecuzione dell'analisi.

Per ogni campione di siero è stato ricavato il profilo biochimico. I parametri rilevati sono stati i seguenti:

- GOT (AST)
- GPT (ALT)
- Albumina
- Azotemia (BUN) linfociti
- monociti
- eosinofili
- basofili
- grandi cellule non colorate (LUC)
- concentrazione corpuscolare media emoglobina (MCHC)
- conteggio globuli bianchi (WBC)
- cont
- Calcemia
- Colesterolo
- Glucosio
- Bilirubina totale
- Trigliceridi
- Proteine totali
- Acido Urico
- Fosfatasi Alcalina (ALP)
- Amilasi
- Gamma GT
- Creatinina

Il GOT o Transaminasi glutammico-ossalacetico è un enzima presente nel fegato e viene analizzato per studiare le condizioni di questo organo e lesioni del muscolo cardiaco.
Il GPT o Transaminasi glutammico –piruvica è un enzima che da l'esatta valutazione della gravità dell'alterazione del fegato.
L'albumina è una proteina prodotta nel fegato. Valori superiori a quelli ritenuti normali possono essere determinati da disidratazione.
L'azotemia è il tasso della quantità di azoto nel sangue ed indica la funzionalità dei reni; valori diversi da quelli di riferimento indicano una imperfetta depurazione del sangue da parte dei reni.
Il colesterolo è un grasso che puo avere origine dal cibo e dal fegato. La ricerca di questa sostanza nel sangue concorre, con la ricerca dei trigliceridi, a valutare i grassi nell'organismo.
La bilirubina totale è un pigmento contenuto nella bile. Essa si riforma in seguito alla demolizione dell'emoglobina appartenente ai globuli rossi al termine della loro vita.
Le proteine totali indicano lo stato di idratazione ed apportano informazioni ulteriori su fegato, reni e le infezioni.
La fosfatasi alcalina è un enzima dosabile nel sangu, prodotto dall'intestino, dal fegato, da ossa e placenta, si trova nelle vie biliari. Il suo dosaggio viene eseguito per stabilire eventuali malattie delle ossa.
L'amilasi è un enzima che interviene nella idrolizzazione dell'amido introdotto principalmente nel pancreas, meno nelle ghiandole salivari.
La gamma glutamil transpeptidasi è un enzima situato nelle cellule del fegato, del cuore e del rene.
La creatinina è un componente del sangue che viene eliminata dai reni atrraverso l'urina. Se la presenza di creatinina nel sangue è troppo elevata significa che i reni no riescono a farla passare nelle urine e quindi non svolgono bene il loro lavoro.
Le analisi eseguite sui suddetti parametri sono state realizzate mediante strumenti e metodi della Bayer autoanalyzer Opera.
Le tecniche analitiche utilizzate sono di tipo colorimetrico (albumina, proteine totali, calcemia e bilirubina totale), cinetico (GOT, amilasi, gamma GT, GPT e fosfatasi alcalina), enzimatico (Azotemia, glucosio), cinetico-colorimetrico (Trigliceridi e creatinina) ed enzimatico colorimetrico (colesterolo ed acido urico).

RISULTATI

I risultati delle analisi effettuate nel corso dei campionamenti sono indicati nelle tabelle successive. Al fine di semplificare la valutazione dei risultati si è preferito elaborare una tabella per ogni campionamento. I valori medi relativi ai parametri più volte menzionati sono stati poi riassunti in una tabella finale. Cio ha permesso il confronto dei risultati delle analisi effettuate sul siero di pagro con i dati ricavati dagli esami condotti precedentemente sulla spigola e con i dati presenti in letteratura riguardanti il branzino americano (*Morone saxatilis*).

ESAMI	UNiTA MISURA	RANGE	RISULTATI			MEDIA
			1°lotto	2°lotto	3°lotto	
GOT (AST)	IU/L	0-72	117	314	83	171,33
GPT (ALT)	IU/L	46-73	7	17	3	9,00
Albumina	g/dl	1.2-1.5	1,7	2,5	2,1	2,10
Azotemia (BUN)	mg/dl	-	8	5	4	5,67
Calcemia	mg/dl	10.35-12.07	17,5	20,8	20,4	19,57
Colesterolo	mg/dl	164-285	299	329	313	313,67
Glucosio	mg/dl	69-171	59	92	137	96,00
Bilirubina totale	mg/dl	-	0,1	0,1	0,1	0,10
Trigliceridi	mg/dl	-	457	495	417	456,33
Proteine totali	g/dl	3.2-3.9	5	7,6	6,3	6,30
Acido Urico	mg/dl	-	0	0,7	0,1	0,27
Fosfatasi Alcalina (ALP)	IU/L	46-73	46	84	60	63,33
Amilasi	IU/L	-	0	0	0	0,00
Gamma GT	IU/L	-	8	59	16	27,67
Creatinina	mg/dl	0.1-0.3	0,2	0,3	0,1	0,20

Tab. 1 - Risultati delle analisi dei tre campioni di siero di spigola prelevati il 27 agosto 2004

ESAMI	UNiTA MISURA	RANGE	RISULTATI			MEDIA
			1°lotto	2°lotto	3°lotto	
GOT (AST)	IU/L	0-72	420	416	418	418
GPT (ALT)	IU/L	46-73	39	46	43	43,00
Albumina	g/dl	1.2-1.5	1.8	1.7	1.9	1,80
Azotemia (BUN)	mg/dl	-	12	11	10	11,00
Calcemia	mg/dl	10.35-12.07	14	16	13	14,40
Colesterolo	mg/dl	164-285	406	494	570	490
Glucosio	mg/dl	69-171	146	141	139	142
Bilirubina totale	mg/dl	-	0.1	0.1	0.1	0,10
Trigliceridi	mg/dl	-	496	509	513	506
Proteine totali	g/dl	3.2-3.9	5.2	5.8	5.27	5,40
Acido Urico	mg/dl	-	0.7	0.45	0.18	0,40
Fosfatasi Alcalina (ALP)	IU/L	46-73	132	128	112	123
Amilasi	IU/L	-	39	32	34.6	35.20
Gamma GT	IU/L	-	2.9	4.9	1.3	3,03
Creatinina	mg/dl	0.1-0.3	0.7	0.55	0.24	0,50

Tab. 2 - Risultati delle analisi dei tre campioni di siero di pagro prelevati il 6 dicembre 2004

ESAMI	UNiTA MISURA	RANGE	RISULTATI			MEDIA
			1°lotto	2°lotto	3°lotto	
GOT (AST)	IU/L	0-72	946	597	1557	1033.33
GPT (ALT)	IU/L	46-73	60	42	72	58
Albumina	g/dl	1.2-1.5	1.8	1.2	1.6	1.53
Azotemia (BUN)	mg/dl	-	3	3	3	3
Calcemia	mg/dl	10.35-12.07	14.7	13.2	12.1	13.33
Colesterolo	mg/dl	164-285	467	465	348	426.67
Glucosio	mg/dl	69-171	5	66	19	30
Bilirubina totale	mg/dl	-	0.1	0	0.3	0.13
Trigliceridi	mg/dl	-	453	692	677	607.33
Proteine totali	g/dl	3.2-3.9	5.8	4.5	5.3	5.20
Acido Urico	mg/dl	-	0.6	0.2	0.4	0.40
Fosfatasi Alcalina (ALP)	IU/L	46-73	25	61	0	28.67
Amilasi	IU/L	-	24	27	21	24
Gamma GT	IU/L	-	20	9	16	15
Creatinina	mg/dl	0.1-0.3	0.1	0	0.4	0.17

Tab. 3 - Risultati delle analisi dei tre campioni di siero di pagro prelevati il 23 febbraio 2005

ESAMI	UNiTA MISURA	RANGE	RISULTATI			MEDIA
			1°lotto	2°lotto	3°lotto	
GOT (AST)	IU/L	0-72	61	215	193	156,33
GPT (ALT)	IU/L	46-73	35	35	30	33,33
Albumina	g/dl	1.2-1.5	0,8	0,8	0,8	0,80
Azotemia (BUN)	mg/dl	-	6	5	5	5,33
Calcemia	mg/dl	10.35-12.07	11,5	11,1	10	10,87
Colesterolo	mg/dl	164-285	53	109	48	70,00
Glucosio	mg/dl	69-171	25	11	7	14,33
Bilirubina totale	mg/dl	-	0,1	0,2	0,2	0,17
Trigliceridi	mg/dl	-	46	71	48	55,00
Proteine totali	g/dl	3.2-3.9	2,7	2,5	2,7	2,63
Acido Urico	mg/dl	-	0	0,5	0	0,17
Fosfatasi Alcalina (ALP)	IU/L	46-73	53	53	16	40,67
Amilasi	IU/L	-	4	8	6	6,00
Gamma GT	IU/L	-	3	0	2	1,67
Creatinina	mg/dl	0.1-0.3	0,1	0,1	0,1	0,10

Tab. 4 - Risultati delle analisi dei tre campioni di siero di pagro prelevati l'11 aprile 2005

ESAMI	UNiTA MISURA	RANGE	RISULTATI			MEDIA
			1°lotto	2°lotto	3°lotto	
GOT (AST)	IU/L	0-72	497	647	359	501,00
GPT (ALT)	IU/L	46-73	254	298	172	241,33
Albumina	g/dl	1.2-1.5	1,4	c.i.	c.i.	1,40
Azotemia (BUN)	mg/dl	-	11	c.i.	c.i.	11,00
Calcemia	mg/dl	10.35-12.07	c.i.	c.i.	c.i.	c.i.
Colesterolo	mg/dl	164-285	151	227	397	258,33
Glucosio	mg/dl	69-171	38	42	54	44,67
Bilirubina totale	mg/dl	-	c.i.	c.i.	0,1	0,10
Trigliceridi	mg/dl	-	97	230	520	282,33
Proteine totali	g/dl	3.2-3.9	5,1	6,1	6,3	5,83
Acido Urico	mg/dl	-	1,5	3,2	2,1	2,27
Fosfatasi Alcalina (ALP)	IU/L	46-73	5	c.i.	c.i.	5,00
Amilasi	IU/L	-	c.i.	c.i.	c.i.	c.i.
Gamma GT	IU/L	-	c.i.	c.i.	c.i.	c.i.
Creatinina	mg/dl	0.1-0.3	0,6	c.i.	c.i.	0,60

Tab. 5 - Risultati delle analisi dei tre campioni di siero di pagro prelevati il 17 maggio 2005

ESAMI	UN.MISURA	RANGE	SPIGOLA 27 agosto 2004	PAGRO 6 dicembre 2004	PAGRO 23 febbraio 2005	PAGRO 11 aprile 2005	PAGRO 17 maggio 2005
GOT (AST)	IU/L	0-72	171,33	418	1033,33	156,33	501
GPT (ALT)	IU/L	46-73	9	43	58	33,33	241,33
Albumina	g/dl	1.2-1.5	2,1	1,8	1,53	0,8	1,4
Azotemia (BUN)	mg/dl	-	5,67	11	3	5,33	11
Calcemia	mg/dl	10.35-12.07	19,57	14,4	13,33	10,87	c.i.
Colesterolo	mg/dl	164-285	313,67	490	426,67	70	258,33
Glucosio	mg/dl	69-171	96	142	30	14,33	44,67
Bilirubina totale	mg/dl	-	0,1	0,1	0,13	0,17	0,1
Trigliceridi	mg/dl	-	456,33	506	607,33	55	282,33
Proteine totali	g/dl	3.2-3.9	6,3	5,4	5,2	2,63	5,83
Acido Urico	mg/dl	-	0,27	0,4	0,4	0,17	2,27
Fosfatasi Alcalina (ALP)	IU/L	46-73	63,33	123	28,67	40,67	5
Amilasi	IU/L	-	0	36	24	6	c.i.
Gamma GT	IU/L	-	27,67	3	15	1,67	c.i.
Creatinina	mg/dl	0.1-0.3	0,2	0,5	0,17	0,1	0,6

Tab. 6 - Risultati medi delle analisi dei campioni di siero di spigola e pagro prelevati ai diversi intervalli temporali stabiliti

CONSIDERAZIONI

Si osserva un valore molto elevato rispetto a quello di riferimento di *Morone saxatilis* relativamente ai parametri GOT (tutti i campioni) e colesterolo (campione agosto, dicembre e febbraio) dovuto probabilmente alle tecnologie di allevamento che tendono a somministrare mangimi molto grassi (estruso) per aumentare la velocità di accrescimento ed ingrasso e diminuire i tempi di produzione.
Questo si ripercuote negativamente sul metabolismo epatico come comprovato dall'elevato livello di GOT e come osservato all'esame anatomopatologico dall'aspetto istologico del fegato.