



49° Congresso della Società Italiana di Biologia Marina

Cesenatico (FC), 4-8 giugno 2018



VOLUME DEI PRE-PRINT

F. TULLI, R. CERRI, G. CARDINALETTI, A. NICCOLAI*, E. TIBALDI

Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (Di4A), Università di Udine,
Via Sondrio, 2 - 33100 Udine, Italia.
francesca.tulli@uniud.it

*Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente (DISPAA), Università di Firenze,
Piazzale delle Cascine, 18 - 50144 Firenze, Italia.

DIGERIBILITÀ DI BIOMASSE MICROALGALI QUALI INGREDIENTI SOSTENIBILI NEI MANGIMI PER L'ACQUACOLTURA

NUTRIENT DIGESTIBILITY OF SELECTED MICROALGAE AS SUSTAINABLE INGREDIENTS IN AQUAFEED

Abstract - Whole-cell dried microalgae biomass represents possible candidate ingredients for more sustainable aquafeed. The study estimated the nutritive value of *Tetraselmis suecica*, *Tisochrysis lutea*, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis ocellata* and *Arthrospira platensis* dried biomass for rainbow trout, a carnivorous fish species. Significant differences were recorded in the apparent digestibility coefficients of nutrients among the microalgae biomasses. The highest values were recorded for *T. lutea* (90.6% for d.m.; 92.6% for crude protein; 90.0% for organic matter and 94.3% for energy) while the lowest were registered with *C. sorokiniana* (52.6% for d.m.; 63.1% for crude protein; 57.9% for organic matter and 61.8% for energy).

Key-words: microalgae, *Oncorhynchus mykiss*, digestibility, ingredient, sustainability.

Introduzione - È ben noto che larga parte della sostenibilità dell'acquacoltura sia legata all'alimentazione (Henriksson *et al.*, 2012). La sfida è stata raccolta dall'industria mangimistica che da tempo ha ridotto l'impiego di farine ed oli di pesce per contenere la pressione sulle risorse alieutiche utilizzando anche nelle formulazioni per le specie ittiche carnivore, ingredienti vegetali di origine terrestre (Tacon e Metian, 2015). Le biomasse microalgali, per il loro ridotto impatto ambientale rispetto ad ingredienti convenzionali (Muller-Feuga, 2004; Zmora e Richmond, 2004; Lupatsch, 2009; Kiron *et al.*, 2016; Sarker *et al.*, 2016a), hanno suscitato recentemente un grande interesse per un loro potenziale impiego mangimistico grazie anche al notevole miglioramento dei sistemi produttivi (Tredici *et al.*, 2015). Tuttavia la stima del loro valore nutritivo per le specie ittiche carnivore solo di recente è stata oggetto di valutazioni specifiche (Tulli *et al.*, 2012; Sorensen *et al.*, 2016; Cardinaletti *et al.*, 2018) e costituisce un'informazione indispensabile per il loro impiego nelle formulazioni. Lo scopo della ricerca è stato la stima del valore nutritivo di biomasse microalgali liofilizzate quali potenziali ingredienti per mangimi per la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), specie carnivora di grande interesse per l'acquacoltura nazionale.

Materiali e metodi - *Tetraselmis suecica*, *Tisochrysis lutea*, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis ocellata* e *Arthrospira platensis* sono state coltivate presso l'Università di Firenze in fotobioreattori (PBR) del tipo "Green Wall Panel" (GWP®-I) (patent WO 2004/074423A2). Le biomasse microalgali sono state liofilizzate per consentirne l'inclusione in alimenti composti prodotti presso il mangimificio sperimentale dell'Università di Udine. I coefficienti di digeribilità apparente (CDA) della sostanza secca, della proteina e dell'energia degli ingredienti microalgali sono

stati valutati *in vivo* per la trota iridea negli impianti sperimentali dell'Università di Udine con il metodo indiretto e per differenza rispetto alla digeribilità della dieta di riferimento (Tab. 1) nella quale l'ingrediente test viene sostituito in proporzione definita (30%) (NRC, 2000). La celite (Celite[®], Prolabo, Francia), che contiene >95% w/w di ceneri acido insolubili (CAI) è stata utilizzata quale marcatore esterno indigeribile e aggiunta (15 g/kg) a ciascuna miscela prima della pellettatura a freddo.

Tab. 1 - Composizione della dieta di riferimento (g/kg).
Composition of the reference diet (g/kg).

Farina di pesce - <i>Fish meal</i>	370,0
Glutine di frumento - <i>Wheat gluten</i>	100,0
Concentrato proteico della soia - <i>Soy protein concentrate</i>	120,0
Lievito di birra - <i>Dry brewer's yeast</i>	60,0
Amido pregelatinizzato di frumento - <i>Pregelat. wheat starch</i>	120,0
Farinaccio di frumento - <i>Wheat middlings</i>	62,8
Olio di pesce - <i>Fish oil</i>	80,0
Olio di colza - <i>Canola oil</i>	40,0
Lecitina di soia - <i>Soy lecithin</i>	20,0
Vitamine & Minerali mix - <i>Vitamin & Mineral mix</i>	12,2
Celite - <i>Celite</i>	15,0

La raccolta delle feci è stata effettuata utilizzando il sistema di raccolta costituito di una tripletta di vasche collegate ad una colonna di sedimentazione sviluppato dall'Università di Guelph (Cho, 1992). Ciascuna delle vasche della tripletta conteneva 20 trotelle (peso medio 16,9±2 g; 1,0 kg biomassa per unità) distribuite in maniera randomizzata da un lotto di animali provenienti da un impianto commerciale (Trotta Piave Sile, TV). Le unità sperimentali erano alimentate da acqua di pozzo che assicurava condizioni ottimali per la specie (temperatura: 13,5±1 °C; ossigeno disciolto: 8,3±1 mg/l; pH: 8,1±0,2). Ogni ciclo di raccolta si componeva di un periodo di 10 giorni adattamento degli animali alla dieta a cui seguiva un periodo di raccolta del materiale fecale di 9 gg. Le diete venivano somministrate in due pasti giornalieri in funzione della biomassa presente in vasca (1%). Le feci raccolte giornalmente venivano immediatamente centrifugate (8000 g × 20 min a 5 °C), congelate (-20 °C), liofilizzate e omogenate prima delle determinazioni analitiche. Il contenuto in sostanza secca (ISO 6496-1999), azoto (ISO 5983-1987), ceneri (ISO 5984-2002), ceneri acido insolubili (G.U. EEC n. L. 155/21. 12.7.71) ed energia (ISO 9831-1998) delle diete e delle feci è stato analizzato secondo AOAC (1990).

I coefficienti di digeribilità apparente (CDA) sono stati calcolati secondo la formula:

$$CDA (\%) = 100 \cdot (a-b)/a;$$

dove a: rapporto tra il nutriente e il marcatore nella dieta; b: rapporto tra il nutriente e il marcatore nelle feci (Austreng, 1978). I coefficienti di digeribilità apparente sono stati analizzati mediante ANOVA utilizzando il software SPSS-PC, Release 17.1 (IBM SPSS Statistics, Westlands Centre, Quarry Bay, HK).

Risultati - In Tab. 2 è riportata la composizione centesimale delle biomasse microalgali considerate.

Tab. 2 - Composizione chimica (g/100 g) e contenuto energetico (kJ/g) delle biomasse microalgali liofilizzate.
Proximate analysis (g/100 g) and energy content (kJ/g) of the freeze dried microalgae biomasses.

	Sostanza secca	Proteina grezza	Lipidi grezzi	Ceneri	Energia
<i>Chlorella sorokiniana</i>	91,99	49,22	1,09	6,51	19,77
<i>Arthrospira platensis</i>	95,94	61,52	0,91	6,73	19,99
<i>Tetraselmis suecica</i>	93,45	18,75	1,93	15,35	15,93
<i>Tisochrysis lutea</i>	93,58	40,67	15,02	13,79	20,87
<i>Nannochloropsis ocellata</i>	96,68	42,23	3,71	14,14	21,18

La digeribilità delle diverse biomasse microalgali è risultata significativamente diversa ($P < 0,05$) (Tab. 3). *T. lutea* ha fatto registrare i valori maggiori di digeribilità della sostanza secca (90,6%), della proteina (92,6%), della sostanza organica (90,0%) e dell'energia (94,3%) mentre i coefficienti di digeribilità più bassi sono stati registrati da *C. sorokiniana* (52,6%, 63,1%, 57,9% e 61,8%, rispettivamente per sostanza secca, proteina grezza, sostanza organica ed energia). Le altre specie hanno fatto registrare valori intermedi.

Tab. 3 - Coefficienti di digeribilità apparente (CDA, %) della sostanza secca, proteina, sostanza organica (S.O.) ed energia delle biomasse microalgali (n=3).
Apparent Digestibility Coefficient (ADC, %) of dry matter, crude protein, organic matter (O.M.) and energy of the microalgae biomass (n=3).

CDA	Sostanza Secca	Proteina	S.O.	Energia
<i>Chlorella sorokiniana</i>	52,58 ± 2,17 ^c	63,12 ± 1,87 ^c	57,90 ± 1,23 ^c	61,84 ± 2,32 ^c
<i>Arthrospira platensis</i>	86,44 ± 1,37 ^b	82,90 ± 0,27 ^b	75,02 ± 1,88 ^b	80,55 ± 5,34 ^b
<i>Tetraselmis suecica</i>	81,05 ± 1,63 ^b	84,37 ± 1,29 ^b	81,59 ± 1,65 ^a	76,29 ± 0,78 ^b
<i>Tisochrysis lutea</i>	90,61 ± 1,41 ^a	92,55 ± 0,23 ^a	90,02 ± 0,79 ^a	94,26 ± 2,90 ^a
<i>Nannochloropsis ocellata</i>	60,13 ± 3,58 ^c	79,71 ± 0,24 ^b	62,64 ± 3,22 ^c	56,15 ± 1,08 ^c

Medie di colonna contrassegnate da lettere diverse sono statisticamente diverse, $P < 0,05$.

¹CDA (%) = $\{[(\% \text{ nutriente nella dieta} / \% \text{ marcatore nella dieta}) - (\% \text{ nutriente nella feci} / \% \text{ marcatore nelle feci})] / (\% \text{ nutriente nella dieta} / \% \text{ marcatore nella dieta})\} \times 100$.

Means in the same column not sharing common letters are significantly different, $P < 0,05$.

¹ADC (%) = $\{[(\% \text{ nutriente nella dieta} / \% \text{ marcatore nella dieta}) - (\% \text{ nutriente nella feces} / \% \text{ marcatore nella feces})] / (\% \text{ nutriente nella dieta} / \% \text{ marcatore nella dieta})\} \times 100$.

Conclusioni - Nonostante il crescente interesse, la scarsa disponibilità e gli alti prezzi di mercato delle biomasse microalgali pongono ancora un limite al loro impiego quali ingredienti in alimenti commerciali (Shields e Lupatsch, 2012). I risultati del presente studio oltre a fornire una stima della digeribilità di alcune specie di microalghe quali potenziali ulteriori ingredienti sostenibili nella mangimistica, evidenziano una considerevole variabilità nel loro valore nutritivo. Alcune di esse infatti, come *C. sorokiniana* e *N. ocellata* possono difficilmente rispondere alla pressante richiesta di

sostenibilità da parte del settore. Pertanto, a fronte di ampie potenzialità offerte dalle biomasse microalgali nell'alimentazione di specie ittiche anche carnivore, occorre individuare ed intervenire sui fattori che ne influenzano il valore nutritivo ed effettuare una valutazione specifica per non comprometterne da ultimo anche il contributo alla sostenibilità ambientale derivante da un loro impiego nelle formulazioni.

Bibliografia

- AOAC (1990) - *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. A.A.V.V., Washington. DC: 1198 pp.
- AUSTRENG E. (1978) - Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture*, **13**: 265-272.
- CARDINALETTI G., MESSINA M., BRUNO M., TULLI F., POLI B.M., GIORGI G., CHINI-ZITTELLI G., TREDICI M., TIBALDI E. (2018) - Effects of graded levels of a blend of *Tisochrysis lutea* and *Tetraselmis suecica* dried biomass on growth and muscle tissue composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets low in fish meal and oil. *Aquaculture*, **485**: 173-182.
- CHO C.Y. (1992) - Feeding systems for rainbow trout and other salmonids with reference to current estimates of energy and protein requirements. *Aquaculture*, **100**: 107-123.
- HENRIKSSON M., CEDERBERG C., SWENSSON C. (2012) - Impact of cultivation strategies and regional climate on greenhouse gas emissions from grass/clover silage. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A- Animal Science*, **62** (4): 233-237.
- LUPATSCH I. (2009) - Quantifying nutritional requirements in aquaculture - the factorial approach. In: Burnell G., Allan G. (eds), *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency. Quality and Environmental Management*. Woodhead Publishing, Cambridge: 417-439.
- KIRON V., SØRENSEN M., HUNTLEY M., VASANTH G.K., GONG Y., DAHLE D., PALIHAWADANA A.M. (2016) - Defatted biomass of the microalga, *Desmodesmus* sp., can replace fishmeal in the feeds for Atlantic salmon. *Front. Mar. Sci.*, **3**: 67.
- MULLER-FUEGA A. (2004) - Microalgae for aquaculture: the current global situation and future trends. In: A. Richmond (ed), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK: 152-178.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2011) - Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/13039>.
- SARKER P., GAMBLE M., KELSON S., KAPUSCINSKI A. (2016) - Nile tilapia (*O. niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients. *Aquac. Nutr.*, **22**: 109-119.
- SHIELDS R.J., LUPATSCH I. (2012) - Algae for aquaculture and animal feeds. *Technikfolgenabschätzung - Theorie und Praxis*, **21**: 23-37.
- SØRENSEN M., BERGE G.M., REITAN K.I., RUYTER B. (2016) - Microalga *Phaeodactylum tricornerutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) - Effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. *Aquaculture*, **460**: 116-123.
- TACON A.G.J., METIAN M. (2015) - Feed Matters: Satisfying the Feed Demand of Aquaculture. *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, **23** (1): 1-10.
- TREDICI M.R., BASSI N., PRUSSI M., BIONDI N., RODOLFI L., CHINI ZITTELLI G., SAMPIETRO G. (2015) - Energy balance of algal biomass production in a 1-ha "Green Wall Panel" plant: how to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. *Appl. Energy*, **154**: 1103-1111.
- TULLI F., CHINI ZITTELLI G., GIORGI G., POLI B.M., TIBALDI E., TREDICI M.R. (2012) - Effects of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, **21**: 1-11.
- ZMORA O., RICHMOND A. (2004) - Microalgae for aquaculture. In: Richmond, Amos (ed), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK: 365-379.

Ricerca finanziata dal progetto AGER2 – SUSHIN/2016 Codice ricerca 2016-0112.