



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

Tesi di Laurea Magistrale

“Sostituzione totale di *Artemia salina* nella dieta di
Dicentrarchus labrax per la produzione larvale”

Relatori

Prof. Alberto Castelli

Dott. Francesco Lenzi

Candidato

Dario Moschiera

ANNO ACCADEMICO

2016/2017

Indice

Riassunto.....	3
1: Introduzione.....	5
2: Scopo dello studio.....	7
3: Materiali e metodi.....	8
3.1: <i>Dicentrarchus labrax</i>	8
3.2: Spawning.....	10
3.3: Incubatoio.....	12
3.4: Alimentazione.....	15
3.4.1: Rotiferi.....	15
3.4.2: <i>Artemia salina</i>	22
3.5: Fine periodo di incubazione.....	31
3.5.1: Trasferimento larve.....	34
3.6: Pilot scale hatchery.....	34
3.6.1: Parametri.....	34
3.6.2: Inizio sperimentazione.....	35
3.6.3: Alimenti sperimentali.....	37
3.6.4: Richieste nutrizionali.....	38
3.6.5: Controlli biometrici.....	44
3.6.6: Procedure.....	44
3.6.7: Patologie e deformità riscontrate	49
3.7: Salinity stress test.....	58
3.8: Analisi statistica	59
4: Risultati.....	61
4.1: Lunghezze raggiunte.....	61

4.2: Analisi della varianza.....	64
4.3: Peso umido e secco individuale.....	66
4.4: Deformità.....	70
4.5: Sopravvivenza.....	71
4.6: Risultati del Salinity stress test.....	72
5: Discussione e conclusioni	73
6: Bibliografia.....	78

Riassunto

L'intento di questo studio è quello di testare l'efficacia di 4 differenti tipi di alimento secco (LFR78, LFR79, LFR80, LFR81), volti a sostituire al 100% un tipo di alimento vivo (*Artemia salina*), nella produzione larvale della specie *Dicentrarchus labrax*, osservando le eventuali differenze morfologiche e fisiologiche che tale sostituzione comporta durante tutte le fasi di crescita larvale, soprattutto la performance in termini di crescita e sopravvivenza.

Tali differenze possono essere riscontrate attraverso l'utilizzo di parametri che verranno successivamente comparati per definirne le entità.

Lo studio è stato condotto attraverso l'utilizzo di uno stock di 600.000 larve, ricavate da circa 1.000.000 di uova prelevate da un apposito raccogliitore al quale sono collegate 2 vasche di riproduttori con fotoperiodo controllato.

Le larve, ottenute dalla schiusa delle uova avvenuta circa 72 ore dopo la raccolta, sono state immesse in una vasca da 6.000 litri per i primi 10 giorni, così da ottenerne un lotto omogeneo prima della somministrazione dei 4 tipi di alimento secco utilizzati come trattamenti.

Successivamente circa 225.000 larve sono state trasferite in una pilot scale hatchery composta da 15 vasche con capacità di 390 litri cadauna, in modo da ottenere una concentrazione di circa 30/40 larve per litro.

Le larve sono state sottoposte a 5 differenti trattamenti in 3 repliche a partire dall'11mo giorno di vita:

- Tr.1 Controllo: dieta standard con Orange, rotiferi e *Artemia* di tipo AF ed EG.

- Tr.2 Sostituzione totale di *Artemia* con LFR78 e rotiferi (fino a 20 giorni)
- Tr.3 Sostituzione totale di *Artemia* con LFR79 e rotiferi (fino a 20 giorni)
- Tr.4 Sostituzione totale di *Artemia* con LFR80 e rotiferi (fino a 20 giorni)
- Tr.5 Sostituzione totale di *Artemia* con LFR81 e rotiferi (fino a 20 giorni)

Tutti i trattamenti sono stati sottoposti alle medesime condizioni ambientali ottimali, quali temperatura ($18\pm 1^{\circ}\text{C}$), salinità (38ppt), intensità della luce, fotoperiodo (14L/10D) e percentuale di ricambio d'acqua giornaliero, per tutta la sperimentazione, durata 42 giorni.

Settimanalmente sono stati prelevati campioni di 20 individui per vasca i quali sono stati anestetizzati con benzocaina per poter effettuare biometrie, attraverso l'utilizzo di uno stereo microscopio, che prevedono misure della lunghezza standard, misure del peso umido e secco, conta dei raggi della pinna caudale, sviluppo della vescica natatoria e del tratto digerente, controllo della presenza di alimento all'interno di quest'ultimo, presenza di bolle d'aria e calcoli e verifica dell'eventuale presenza di deformità fisiche.

Al quarantesimo giorno è stato effettuato uno stress test salino per ogni trattamento per verificare la resistenza delle larve, che sono state sottoposte ad un'elevata salinità (62 ppt) per 1 ora.

Tutti i dati raccolti sono stati analizzati statisticamente al fine di valutare le differenze tra i vari trattamenti, per poter giungere ad una conclusione riguardo l'efficacia dei 4 tipi di alimento secco presi in esame, per la produzione larvale di *Dicentrarchus labrax* in assenza di *Artemia* come prede vive.

1. Introduzione

L'alimentazione, nella produzione larvale di specie ittiche come *Dicentrarchus labrax*, è ancora oggetto di studio poiché rappresenta uno dei principali vincoli per il raggiungimento di una resa ottimale in termini di crescita e sopravvivenza.

Ancora oggi, in acquacoltura, la produzione larvale delle specie ittiche dipende strettamente da una dieta basata sulla fornitura di prede vive, come Rotiferi e *Artemia*, (Cahu & Zambonino Infante, 2001). In natura le larve di *Dicentrarchus labrax*, essendo carnivore seguono una dieta a base di specie planctoniche come nauplii di cirripedi, copepodi e larve di policheti (Ferrari & Chierogato, 1981).

La produzione di specie planctoniche in ambito di acquacoltura è però complessa ad elevate densità, per cui vengono utilizzate specie come *Brachionus plicatilis* e nauplii di *Artemia salina* essendo facilmente ottenibili su larga scala.

Tuttavia rotiferi e *Artemia* non forniscono il giusto apporto nutrizionale, motivo per il quale subiscono un processo di arricchimento con acidi grassi essenziali prima di essere forniti come dieta nelle larve del branzino.

La produzione dell'alimento vivo, all'interno degli impianti di acquacoltura, ha chiaramente un impatto a livello economico significativo, dovendo disporre di specifiche infrastrutture e manodopera.

Per tale motivo negli ultimi anni sono stati portati avanti progetti di ricerca che ponessero i propri sforzi nel creare mangimi artificiali volti a sostituire parzialmente, o ancora meglio totalmente l'alimento vivo nella dieta delle larve di pesce.

Gli obiettivi di tali progetti di ricerca sono molteplici:

- Creare alimenti che abbiano un apporto nutritivo ottimale, grazie anche alla possibilità di fornire elementi nutritivi non presenti negli organismi zooplanctonici facenti parte della dieta naturale delle larve, e che siano facilmente digeribili;
- Creare alimenti con caratteristiche fisiche come alta galleggiabilità, dimensioni adeguate e un basso tasso di lisciviazione che conferiscono all'alimento appetibilità e facilità nella cattura da parte delle larve.

Nonostante i numerosi studi condotti negli anni, l'obiettivo di sostituire totalmente l'alimento vivo con uno artificiale non è stato ancora raggiunto, poiché creare il giusto rapporto tra esigenze nutrizionali delle larve e le caratteristiche che conferiscono all'alimento la taglia, l'appetibilità, la facilità di cattura e la digeribilità, risulta essere estremamente complesso.

Ciò nonostante in alcuni studi sono stati raggiunti risultati positivi, infatti durante l'ultimo decennio, il periodo pre-svezzamento è stato notevolmente ridotto grazie ai risultati conclusivi ottenuti in laboratorio. Ad esempio, Le Ruyet et al. (1993) ha formulato una dieta adeguata per sostenere una buona crescita e sopravvivenza nel branzino (*Dicentrarchus labrax*) dal giorno 40 (40 days post hatch), quando lo svezzamento è avvenuto durante il 55° giorno. Nel 1997, una crescita significativa e una buona sopravvivenza (vicino a quelle ottenute da un'alimentazione con alimento vivo) sono state ottenute nel branzino alimentato solo con una dieta artificiale dal giorno 20 (Zambonino Infante et al.). In uno studio, è stato riportato che il 35% delle larve di branzino, alimentate esclusivamente con alimento artificiale a partire dall'apertura della bocca, è sopravvissuto al giorno 28 (Cahu et al.). Il tasso di sopravvivenza può essere attribuito alla efficienza della dieta artificiale (Cahu & Zambonino Infante, 2001).

2. Scopo dello studio

La tesi, che si inserisce in questo contesto, ha avuto come obiettivo il testare un regime alimentare che prevede la sostituzione totale dell'alimento vivo (*Artemia salina*), con un alimento inerte artificiale durante la fase di pre-svezzamento nella dieta di *Dicentrarchus labrax*.

Nello specifico è stata valutata l'efficacia di 4 alimenti sperimentali (LFR78,79,80,81).

La prima fase di alimentazione esogena, subito dopo l'apertura della bocca, che avviene dopo il totale assorbimento del sacco vitellino, è molto delicata in termini di assimilazione, per cui durante questa fase sono stati forniti i rotiferi contemporaneamente agli alimenti sperimentali fino a 20 dph, non avendo, le larve, fino a quel momento un sistema digerente ben sviluppato che gli permettesse una corretta digestione degli alimenti formulati.

Passato questo periodo, quindi a partire da 21 dph, vengono forniti soltanto gli alimenti sperimentali al fine di valutare il loro effetto su accrescimento, deformità e sopravvivenza durante tutto il periodo di pre-svezzamento (42dph).

La dieta basata sulla sostituzione totale di *Artemia salina* con i 4 alimenti formulati viene confrontata con un protocollo di alimentazione standard che prevede l'utilizzo di rotiferi, *Artemia* e un alimento formulato già testato e in commercio (**O.range®**), al fine di valutare le eventuali differenze nei parametri sopra descritti.

3. Materiali e Metodi

La sperimentazione è stata condotta presso il testing center I.N.V.E., “Maricoltura di Rosignano Solvay s.r.l”, sito a Rosignano Solvay, in provincia di Livorno.

3.1. *Dicentrarchus labrax*

La specie su cui è stata effettuata la sperimentazione è

Dicentrarchus labrax.

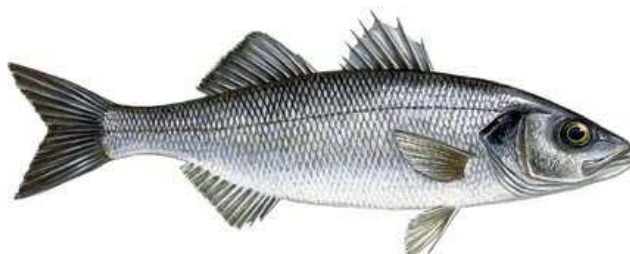
Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758), nota comunemente come spigola o branzino è un pesce osseo marino e d'acqua salmastra della famiglia Moronidae.

Distribuzione e habitat

La spigola è diffusa nell'Atlantico

nordorientale temperato e subtropicale dalla Norvegia al Senegal, nel mar Mediterraneo, dove è comune, e nel mar Nero. Non è presente nel mar Bianco, nel mare di Barents, nel mar Baltico e nel mar Caspio. Nella parte nord dell'areale migra verso acque più profonde in inverno.

È una specie strettamente costiera (occasionalmente può trovarsi fino a un centinaio di metri di profondità) che popola ambienti di ogni tipo nei pressi della riva, sia con fondali duri che sabbiosi. Essendo molto eurialina penetra regolarmente, soprattutto in estate, nelle acque salmastre di lagune e foci. Può raggiungere non di rado le acque



Classificazione scientifica	
Dominio	Eukaryota
Regno	Animalia
Sottoregno	Eumetazoa
Ramo	Bilateria
Phylum	Chordata
Subphylum	SVertebrata
Superclasse	Gnathostomata
Classe	Actinopterygii
Sottoclasse	Osteichthyes
Superordine	Acanthopterygii
Ordine	Perciformes
Sottordine	Percoidi
Famiglia	Moronidae
Genere	Dicentrarchus
Specie	D. labrax

Nomenclatura binomiale

Dicentrarchus labrax
Linnaeus, 1758

A close-up photograph of a sea bream (Dicentrarchus labrax) fish, showing its head, eye, and scales in detail. The fish is positioned vertically, with its head at the top of the frame.

completamente dolci. Ha abitudini demersali. I giovanili stazionano prevalentemente in acque salmastre.

Descrizione morfologica

La spigola ha corpo piuttosto affusolato, scarsamente compresso sui lati. La testa è allungata (da 5 a 6 volte il diametro dell'occhio) ed è caratteristica per avere la fronte dritta. La bocca è grande, può allungarsi leggermente a tubo quando aperta, e raggiunge l'occhio, che è abbastanza piccolo. La mandibola è leggermente sporgente sulla mascella. Le pinne dorsali sono due, separate da uno spazio; la prima dorsale è formata da 8-10 raggi spinosi, la seconda da 12-13 raggi molli. La pinna anale è leggermente più corta della seconda dorsale, ha 3 raggi spinosi e 10-12 raggi molli. La pinna caudale è biloba ma non profondamente incisa. Scaglie abbastanza piccole ma evidenti; sono presenti anche sulla testa. Linea laterale evidente. Il preopercolo è dentellato sul bordo ed ha dentelli più grandi sulla parte inferiore, sull'opercolo sono presenti due grosse spine rivolte in avanti. La colorazione è argentea sui fianchi con ventre bianco e dorso grigio argenteo talvolta con riflessi dorati, verdastri o bluastri. Una macchia nera, non sempre evidente soprattutto nei grandi esemplari, è presente nella parte superiore del bordo dell'opercolo. I giovanili fino ai 10–15 cm di lunghezza hanno i fianchi punteggiati di scuro, carattere mai presente nell'adulto (a differenza che nell'affine spigola maculata).

La taglia massima è di un metro, mediamente misura attorno a 50 cm. Il peso massimo noto è di circa 12 kg.

Alimentazione

Caccia soprattutto di notte. Si nutre di invertebrati di vario genere come crostacei, molluschi e pesci. I giovanili catturano prevalentemente invertebrati, gli adulti si nutrono quasi esclusivamente di altri pesci come anguille e latterini.

Riproduzione

Nel mar Mediterraneo la deposizione delle uova avviene in inverno, nei mari più nordici in primavera. La riproduzione avviene in gruppi, una volta all'anno per ogni individuo. Le uova sono pelagiche, galleggiano grazie alla presenza di 2 gocce d'olio. La maturità sessuale avviene tra 2 e 4 anni nel Mediterraneo e tra 4 e 7 anni (maschi) o tra 5 e 8 anni (femmine) nell'Atlantico temperato freddo. Le uova schiudono all'incirca in tre giorni e lo sviluppo larvale dura circa 40 giorni.

Allevamento

D. labrax è oggetto di acquacoltura in numerosi paesi mediterranei dove costituisce la più importante specie per l'allevamento ittico. I maggiori produttori sono Grecia, Turchia, Italia, Spagna, Croazia ed Egitto. Viene allevata soprattutto nelle lagune. Si tratta del primo pesce marino (eccettuati i salmonidi) ad essere stato allevato in Europa. Vengono utilizzate sia tecniche intensive che estensive di allevamento.

3.2 Spawning

Le larve sono state ottenute da uno stock di 1.000.000 di uova fertilizzate, attraverso una riproduzione naturale, da 2 vasche di riproduttori, site all'interno dell'impianto, con termo periodo controllato, alle quali è collegato un "raccoltore", una vasca all'interno della quale si accumulano le uova.

Tale procedimento è possibile grazie al fatto che le uova fertili sono galleggianti, avendo una densità inferiore a quella dell'acqua, e per forza centrifuga vengono spinte verso la parete esterna della vasca dove trovano un tubo collettore aperto controcorrente che le convoglia in una vasca esterna, il raccogliatore.

Le uova, una volta prelevate dal raccogliatore, sono state selezionate, cioè poste all'interno di una mastella con capienza di 60 l, a questo punto, le uova non fertilizzate e degenerate precipitano sul fondo e dopo circa 20 minuti le uova fertilizzate accumulate sulla superficie sono state trasferite manualmente, attraverso l'utilizzo di un becher, all'interno degli "schiuditoi", apposite vasche poste in quasi totale assenza di luce, dove avviene la schiusa delle uova dopo circa 72 ore.

Tutte le vasche utilizzate per tali procedimenti sono provviste di diffusori porosi per mantenere un'adeguata concentrazione di ossigeno disciolto, di tubi di piccolo diametro dai quali fuoriesce aria per poter mantenere un certo grado di idrodinamicità, e da filtri con maglia di nylon di 250 micron per il ricambio di acqua.

3.3 Incubatoio

Sono state così ottenute circa 600 mila larve che sono state trasferite dallo schiuditoio ad una vasca da 6000 l per la fase di incubazione, per 10 giorni, per poter iniziare con un

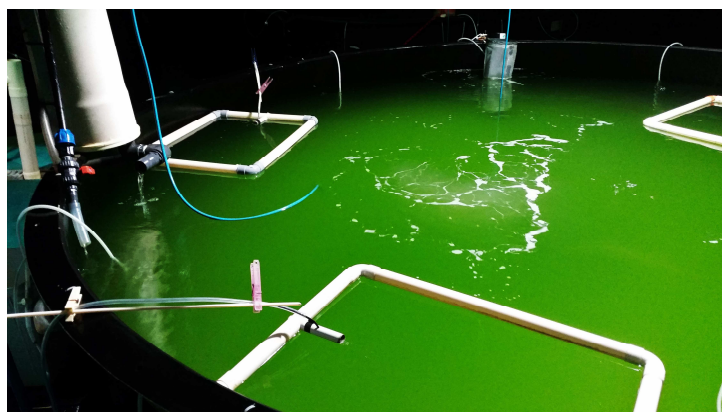


Fig.1- Vasca di incubazione

lotto omogeneo di larve dall'inizio dell'introduzione del mangime secco da prendere in esame.

La vasca di incubazione (Fig.1) è dotata di una pietra porosa per la diffusione dell'ossigeno, di un filtro in nylon in uscita da 500 μ m, da una serie di tubi di piccolo diametro per ottenere un adeguata idro-dinamicità, e da 3 air blower skimmer (a partire dal giorno in cui viene immessa l'alga in vasca) per mantenere l'acqua superficiale libera da qualsiasi film lipidico che potrebbe impedire il contatto delle larve con la superficie e compromettere la formazione della vescica natatoria.

Fin dal primo giorno nella vasca di incubazione le larve sono state poste ad una temperatura di 14,5°C, ed è stata aumentata di mezzo grado ogni due giorni, fino ad arrivare ad una temperatura di 17°C, per favorire il riassorbimento dell'oil globe ed anticipare il momento in cui le larve cominciano a nutrirsi, ciò è reso possibile grazie ad un sistema di termo-regolazione per mantenere la temperatura desiderata.

La salinità viene mantenuta a 38ppt, come nelle vasche dei riproduttori, per i primi 4 giorni, poi viene gradualmente diminuita fino ad arrivare a 27ppt dal giorno 7-9, per poi essere riportata al valore iniziale con la stessa gradualità. Diminuendo la salinità,

le larve sono probabilmente in grado di risparmiare energia associata al costo dell'osmoregolazione che come richiesta metabolica è bassa quando l'ambiente esterno è isoosmotico rispetto ai loro fluidi corporei, favorendo così la formazione della vescica natatoria, che avviene simultaneamente in quasi tutti gli individui intorno all'ottavo giorno dalla schiusa (L. D. Woolley & J. G. Qin 2010).

Per i primi due giorni le larve sono state mantenute in condizioni di buio non avendo ancora sviluppato pigmenti fotosensibili, dal secondo giorno, che coincide con le prime formazioni dei pigmenti fotosensibili, l'illuminazione è stata impostata a circa 90 lux, e a partire dal terzo giorno, quando l'80% delle larve hanno sviluppato i pigmenti fotosensibili, l'intensità luminosa è stata impostata a 600 lux per il restante periodo di incubazione.

Il tasso di ricambio d'acqua è stato impostato al 200% al giorno (0,694 l/min) per l'intero periodo di incubazione.

Dal 3° giorno è stato introdotto in vasca **Mic-F®**, una miscela microbica altamente concentrata, formata da ceppi di *Bacillus* selezionati che sono in grado di crescere ed agire sia in acqua che nell'intestino del pesce. I diversi ceppi producono esoenzimi che supportano la digestione degli alimenti, con conseguente crescita e processo di svezzamento più rapidi e un più facile approccio ad una dieta basata su alimento secco. Essi, inoltre, producono composti che inibiscono la crescita di *Streptococcus*, *Vibrio* e altri batteri patogeni all'interno della vasca e dell'intestino del pesce, di conseguenza si ottiene una riduzione della mortalità dei pesci. I residui degli alimenti non consumati e le feci saranno rapidamente smaltiti per la continua attività del *Bacillus*, con conseguente miglioramento della qualità dell'acqua e pulizia del fondo della vasca.

Dal 4° giorno, quando la maggior parte delle larve ha sviluppato i pigmenti fotosensibili, fino alla fine dell'incubazione, vengono aggiunti in vasca 380g di *Nannochloropsis sp.*, disciolti in 10l di acqua, una microalga appartenente alla famiglia delle Eustigmataceae, con lo scopo di attenuare e diffondere uniformemente la luce incidente sulla vasca e favorire la formazione della vescica natatoria attraverso il contatto delle larve con la superficie. Infatti l'insufflazione gassosa iniziale della vescica natatoria avviene quando le larve inglobano aria dalla superficie (Lindsey D. Woolley & Jian G. Qin 2010). Senza *Nannochloropsis*, le larve starebbero sul fondo poiché fortemente disturbate dalla fonte luminosa artificiale e puntiforme.

Inoltre le microalghe costituiscono il primo anello della catena alimentare, cioè il produttore primario, grazie alla sua capacità di sintetizzare molecole organiche utilizzando l'energia solare. Esse sono utilizzate anche come fonte alimentare indiretta, nella produzione di zooplancton (ad esempio, rotiferi e *Artemia*), che a sua volta viene utilizzato come alimento per le larve. Per l'allevamento di larve secondo la '**green water technique**', le alghe sono utilizzate direttamente nelle vasche. Questa tecnica è oggi una procedura normale, dato che è stata ampiamente utilizzata per migliorare la crescita delle larve, la sopravvivenza e l'ingestione degli alimenti (Makridis, Reitan & Olsen 1997; Reitan, Rainuzzo, & Olsen 1997). Il miglioramento della qualità delle larve osservato quando si utilizzano le microalghe è stato spiegato da diversi studi, che hanno dimostrato che le microalghe forniscono nutrienti direttamente alle larve (Moffatt 1981), contribuiscono alla conservazione della qualità nutrizionale delle prede vive (Makridis & Olsen 1999), forniscono cambiamenti nel contrasto visivo del mezzo e nella sua composizione chimica (Naas, Naess & Harboe 1992, Naas, Huse & Iglesias 1996) e giocano un ruolo importante

nella diversificazione della microflora nell'intestino delle larve (Nicolas , Robic & Ansquer 1989; Reitan et al 1997;. & Skjermo Vadstein 1999; Olsen, Olsen, Attramadal, Christie, Birkbeck, Skjermo & Vadstein 2000).

3.4 Alimentazione

L'alimento vivo è la componente principale nella dieta delle larve allevate. Le larve rimangono in uno stato relativamente poco sviluppato fino a quando il sacco vitellino è esaurito. Alla prima alimentazione il sistema digestivo è ancora rudimentale, privo di uno stomaco, e gran parte della digestione delle proteine avviene nelle cellule epiteliali dell'intestino posteriore (Govoni, Boehlert & Watanabe 1986). Tale sistema digestivo non è ancora in grado di digerire alimenti formulati in modo da poter consentire la sopravvivenza e la crescita delle larve se paragonate a quelle allevate con alimento vivo. Infatti, nonostante i recenti progressi nello sviluppo di diete inerti per larve di pesce (ad esempio, Lazo, Dinis, Holt, Faulk & Arnold 2000; Cahu & Infante 2001; Koven, Kolkovski, Hadas, Gamsiz & Tandler, 2001), l'alimentazione della maggior parte delle specie di interesse per l'acquacoltura si basa ancora sull'alimento vivo durante le prime fasi di vita (Luis EC Conceicao et Al. 2010).

3.4.1 Rotiferi (*Brachionus plicatilis*)

Il successo dei rotiferi come organismo di coltura si deve a molteplici fattori, tra cui la loro natura planctonica, la tolleranza ad una vasta gamma di condizioni ambientali ed un elevato tasso di riproduzione (0,7-1,4 offspring.female⁻¹.day⁻¹). Inoltre, le loro piccole dimensioni e una velocità di nuoto abbastanza lenta li rendono una preda ideale per le larve di pesci che hanno appena riassorbito il loro sacco vitellino, ma

non possono ancora ingerire i nauplii di *Artemia* essendo troppo grandi. Tuttavia, il maggiore potenziale della coltura di rotiferi è la possibilità di allevare questi animali ad altissima densità (1000 rot ml⁻¹). Alle alte densità, gli animali si riproducono rapidamente e possono quindi contribuire alla formazione di grandi quantità di alimento vivo in un brevissimo periodo di tempo. Ultimo, ma non meno importante, essendo animali filtratori, risulta più semplice l'inserimento nei loro tessuti dei nutrienti specifici essenziali per le larve predatrici (cioè attraverso la tecnica di arricchimento; vedi oltre) (Manual on rotifer production and use for aquaculture; INVE).

Morfologia e biologia dei rotiferi

I rotiferi appartengono al più piccolo gruppo di metazoi delle quali sono state descritte oltre 1000 specie, il 90% di esse abitano habitat d'acqua dolce. Raggiungono raramente i 2 mm di lunghezza corporea. I maschi hanno dimensioni ridotte e sono meno sviluppati rispetto alle femmine, misurando solo 60µm. Il corpo di tutte le specie è costituito da un numero costante di cellule, le diverse specie di *Brachionus* contengono circa 1000 cellule.

La crescita dell'animale è assicurata dall' aumento del plasma e non per divisione cellulare.

L'epidermide contiene uno strato denso di proteine come la cheratina che si chiama lorica. La forma della lorica e il profilo delle spine consentono la determinazione delle varie specie e morfotipi. Il corpo del rotiferi è differenziato in tre parti distinte, comprensivi di testa, tronco e piede (Fig.2). La testa porta l'organo rotatorio o corona che è facilmente riconoscibile dalla ciliazione anulare, e che da origine al nome di Rotifero.

La corona a scomparsa assicura locomozione e un movimento d'acqua vorticoso che facilita l'assorbimento di piccole particelle di cibo (soprattutto alghe e detriti). Il tronco contiene il tratto digerente, il sistema escretore e gli organi genitali. Un organo caratteristico per i rotiferi è rappresentato dal mastax (cioè un apparato calcificato nella regione della bocca), che è molto efficace nella molatura delle particelle ingerite. Il piede è una struttura retrattile ad anello non segmentata che termina con una o quattro piccole appendici (Fig.2).

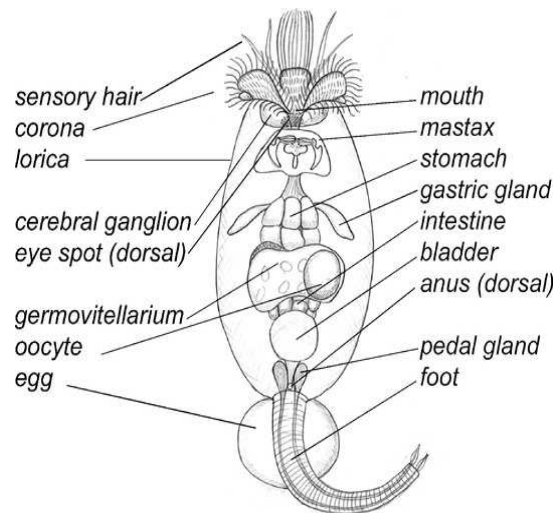


Fig.2- Morfologia di *Brachionus plicatilis*

La durata della vita di rotiferi è stata stimata essere tra 3,4 a 4,4 giorni a 25 ° C. In generale, le larve diventano adulte dopo 0,5 a 1,5 giorni e le femmine da allora in poi

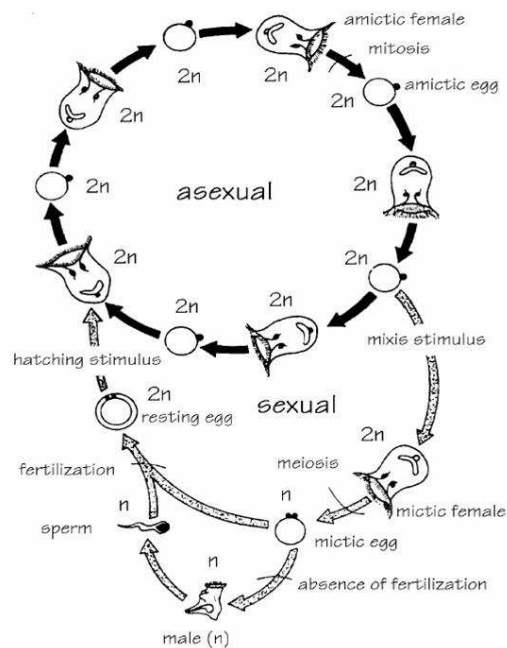


Fig.3- Ciclo vitale di *Brachionus plicatilis*

iniziano a deporre le uova circa ogni quattro ore. Si ritiene che le femmine possano produrre dieci generazioni di figli prima di morire. L'attività di riproduzione di *Brachionus* dipende dalla temperatura dell'ambiente.

Il ciclo vitale di *Brachionus plicatilis* può essere rappresentato da due modalità di riproduzione (Fig.3). Durante la partenogenesi femminile le femmine amittiche

producono uova amittiche (diploide, cromosomi $2n$) che si schiudono e sviluppano in femmine amittiche. In condizioni ambientali specifiche le femmine passano a una più complicata riproduzione sessuale con conseguente produzione di femmine mittiche e amittiche. Anche se entrambi non sono distinguibili morfologicamente, le femmine mittiche producono uova aploidi (n cromosomi). Le larve formatesi da queste uova mittiche non fecondate si sviluppano in maschi aploidi.

Questi maschi sono circa un quarto della dimensione della femmina; non hanno tratto digestivo e nessuna vescica, ma hanno un testicolo singolo che è pieno di sperma. Le uova mittiche che si schiudono in maschi sono significativamente più piccole in termini di dimensioni, mentre le uova mittiche fecondate sono più grandi e hanno uno strato esterno più spesso, leggermente granulato.

Va sottolineato che la densità della popolazione svolge un ruolo importante nella determinazione del modo di riproduzione.

Monzon

Age	Temp	Salinity (ppt)	Light (lux)	Water exchan (%/day)	WE (l/min)	MIC-F	Nanno F(g)	Rot (R/ml)	AF (mill)	EG (Mill)	Size 1/2 (g)	Size 2/4 (g)	Remarks
0	14,5	38		200	0,694	30							Density: around 100/l
1	14,5	38		200	0,694	30							
2	15	38	90	200	0,694	30							
3	15	38		200	0,694	30							
4	15,5	35		200	0,694	30	380	10					Place skimmer
5	15,5	33		200	0,694	30	380	15					
6	16	30		200	0,694	30	380	15					
7	16	27		200	0,694	30	380	15					Check Swimbladder
8	16,5	27		200	0,694	30	380	15					
9	16,5	27		200	0,694	30	380	15					
10	17	30		200	0,694	30	380	15					Check SB (>90%)

A partire dal 4° giorno di età, fino al 17° per i controlli e fino al 20° per i trattamenti, vengono quindi forniti i Rotiferi (*Brachionus plicatilis*, Fig. 4), con una quantità di 60.000.000, per mantenere una concentrazione di 10 rotiferi per ml di acqua.



Fig.4- Esempio di *brachionus plicatilis*.

I rotiferi forniti sono stati allevati all'interno dell'impianto in un apposito reparto.

I rotiferi, per le colture, possono essere ottenuti dal loro ambiente naturale, o da istituti di ricerca o centri di incubazione commerciali. L'inoculo delle beute viene effettuato con una densità iniziale di 2 rotiferi/ml⁻¹. Il cibo è costituito dall'alga unicellulare *Nannochloropsis*. Le alghe vengono centrifugate e concentrate a 1-2·10⁸ cell/ml⁻¹. Il concentrato algale viene conservato a 4 ° C in frigorifero per un periodo massimo di 7 giorni, coincidente con un ciclo di coltura dei rotiferi. Ogni giorno il concentrato algale viene omogeneizzato per agitazione e vengono forniti 200 µm a ciascuna beuta.

Dopo una settimana la densità dei rotiferi aumenta da 2 a 200 individui/ml⁻¹ (Fig.5). I rotiferi vengono risciacquati, una piccola parte è utilizzata per il

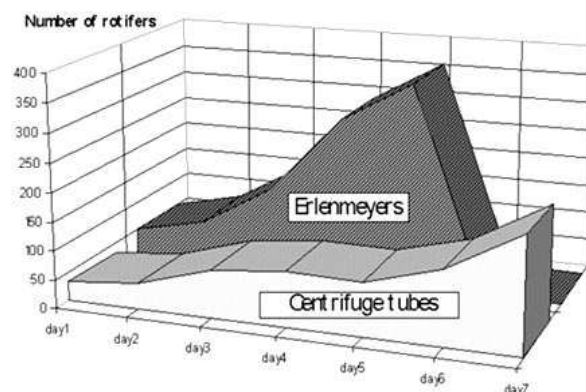


Fig. 5- Tasso di crescita della popolazione di rotiferi nella coltura stock (pipette da centrifuga) e durante l'upscaling nelle beute.

manutenimento dello stock, e i restanti rotiferi possono essere utilizzati per l'upscaling. Inoltre, dopo alcuni mesi dalla coltura regolare le colture di riserva saranno disinfettate come descritto in precedenza al fine di mantenerle pulite e in buona salute. Tuttavia, il mantenimento continuo delle riserve di colture vive di *Brachionus* non elimina il rischio di contaminazione batterica.

I rotiferi ottenuti vengono successivamente immessi in vasche da 1200 L a 25 ppt di salinità e ad una temperatura di 26-27°C, ottenendo una concentrazione di circa 400 individui/ml⁻¹.

In tali vasche viene aggiunto una soluzione con volume noto contenente l'alimento composto da 83% di lievito e 17% di **Roboost Selco®**.

Roboost Selco® (produzione INVE) è un nuovo concetto rivoluzionario per la coltura dei rotiferi che è stato progettato per essere usato in combinazione con il lievito fresco, che è attualmente il più facile, più pulito e più economico ingrediente utilizzato per la coltura dei rotiferi in tutto il mondo.

Dopo 72 ore i rotiferi vengono trasferiti in due vasche, una da 400L e un'altra da 900L, per il processo di arricchimento, per 24 ore.

Per tale processo viene utilizzato un additivo, **easy DRY Selco®** (INVE), un prodotto di arricchimento secco sia per i rotiferi che per l'*Artemia* che è, come suggerisce il nome, estremamente facile da usare. Si compone di una formulazione che rinforza l'alimento vivo con livelli equilibrati di HUFAs, proteine, vitamine e altri ingredienti chiave. Ciò che lo distingue da altri prodotti di arricchimento è l'inclusione di immunostimolanti e di un ingrediente specifico che è in grado di mantenere una bassa crescita microbiologica sia durante la fase di arricchimento che durante l'alimentazione delle larve, il che renderà le larve

più forti e resistenti. Può essere utilizzato come un arricchimento tradizionale (dopo il ciclo di coltura) o addirittura direttamente nella vasca di arricchimento durante l'ultima fase della coltura.

Entrambi i prodotti sono stati testati contemporaneamente all'interno dell'azienda su larga scala, ottenendo risultati positivi sia in termini di crescita che di sopravvivenza, garantendo un apporto adeguato di elementi nutritivi, che saranno di fondamentale importanza per la crescita e lo sviluppo delle larve.

Al termine del processo di arricchimento, i rotiferi vengono prelevati dalle vasche e concentrati attraverso l'utilizzo di un "concentrator rinser", e conservati in una cella frigorifera, per poi essere utilizzati come alimento vivo per le larve di *Dicentrarchus labrax*.

3.4.2 *Artemia salina*

A partire dall' 11° giorno, per i controlli, è stato somministrato come alimento vivo la specie *Artemia salina* (Fig.6), dapprima i naupli, tipo AF (piccole dimensioni, ma ricchi di acidi grassi polinsaturi essenziali), ideali per il passaggio da una dieta basata sui rotiferi, fino



Fig.6- Esemplare di *Artemia salina*

al 19° giorno, e successivamente, a partire dal 14° giorno di età, i metanaupli, tipo EG (dimensioni grandi, ma poveri in acidi grassi polinsaturi essenziali), fino alla fine della sperimentazione.

Tra gli alimenti vivi usati nella larvicoltura di pesci e molluschi, i naupli del gambero *Artemia salina* costituiscono il prodotto alimentare più ampiamente usato. Ogni anno, più di 2000 tonnellate di cisti di *Artemia* sono commercializzate in tutto il mondo per la schiusa in loco di naupli di 0,4 millimetri.

Morfologia e ciclo biologico

Artemia salina appartiene al Phylum Artropoda, Classe Branchipoda, Ordine Anostraca.

E' un piccolo crostaceo caratterizzato dall'assenza dello scudo dorsale, che in natura si concentra in popolazioni molto caratterizzate, tipiche di ambienti fortemente salini (laghi salati, saline) situati in zone dal clima temperato o tropicale dove, per mancanza di competitori e predatori, raggiunge densità elevatissime.

E' un animale filtratore che, setacciando sabbia e detriti, si nutre in prevalenza di microrganismi fino ad una dimensione di 50 micron.

Nel suo ambiente naturale in certi periodi dell'anno produce cisti che galleggiano sulla superficie dell'acqua (Fig.7) e che vengono spinte verso terra dal vento e dalle onde. Queste cisti sono metabolicamente inattive e non si sviluppano ulteriormente fintanto che vengono mantenute asciutte. Dopo l'immersione in acqua di mare, le cisti di forma biconcava si idratano, diventando sferiche, e all'interno del guscio l'embrione riprende il suo metabolismo interrotto. Dopo circa 20 h la membrana esterna delle cisti si rompe e l'embrione appare, circondato da una membrana (Fig. 8). Mentre l'embrione pende sotto il guscio vuoto (= "stadio a ombrello") lo sviluppo del nauplio è

completato ed entro un breve periodo di tempo la membrana si rompe e il nauplio liberamente natante nasce (Fig. 9)



Fig.7- Raccolta di cisti di *Artemia salina* da un lago salato.

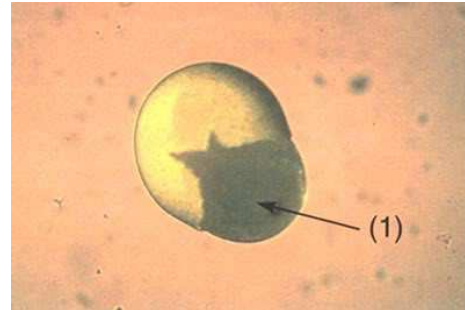


Fig. 8- Stadio di rottura della cisti.
(1) occhio naupliare.

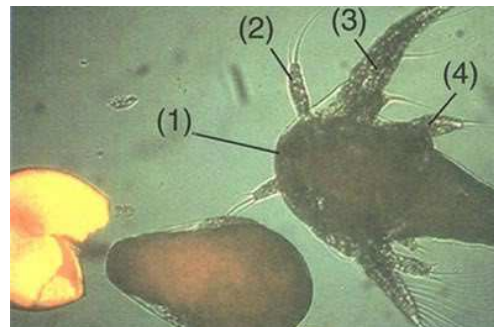


Fig.9- Embrione nello stadio “ombrello” a sinistra e nauplio instar I a destra. (1) occhio naupliare; (2) antennula; (3) antenna; (4) mandibola.

Il primo stadio larvale (instar I; da 400 a 500µm di lunghezza) presenta un colore marrone - arancio, un occhio rosso nella regione della testa e tre paia di appendici: le prime antenne (funzione sensoriale), le seconde antenne (funzioni di locomozione e filtraggio-cibo) e le mandibole (funzione di assimilazione del cibo). La zona ventrale è coperta da un grande labrum o labbro superiore (assimilazione del cibo: trasferisce le particelle di cibo dalle setole filtranti alla bocca). Le larve instar I non assimilano cibo visto che il loro sistema digestivo non è ancora funzionante, infatti si nutrono solo del loro sacco vitellino.

Dopo circa 8 ore, l'animale muta nel secondo stadio larvale (instar II). Piccole particelle di cibo (cellule algali, batteri, detriti) aventi dimensioni che vanno da 1 a 50 µm vengono filtrate dalle seconde antenne e ingerite dal tratto digestivo finalmente funzionante.

La larva continua a crescere e cambia muta circa 15 volte. Appaiono nel tronco delle appendici lobulari chiamate toracopodi. Su entrambi i lati del nauplio si sviluppano dei complessi occhi laterali. Dallo stadio instar 10 in poi, avvengono importanti cambi morfologici e funzionali: le antenne perdono la loro funzione locomotoria e avvengono le differenziazioni sessuali. Nei maschi sviluppano degli uncini prensili, mentre le antenne delle femmine diventano appendici sensoriali. I toracopodi si differenziano in tre diverse parti chiamate: telopoditi (locomozione), endopoditi (filtraggio-cibo) e membrane esopodite (branchie).

L'*Artemia* adulta (\pm 1 cm di lunghezza) ha un corpo allungato con due complessi occhi a stelo, un tratto digestivo lineare, antenne sensoriali e 11 paia di toracopodi (Fig.10 e 11). Il maschio (fig.10) ha un paio di peni nella zona posteriore della regione del tronco. La femmina può essere facilmente

riconosciuta dalla sacca di cova o utero situato proprio dietro l'undicesimo paio di toracopodi. Le uova si sviluppano in due ovaie tubolari nell'addome. Una volta maturate diventano sferiche e migrano attraverso degli ovidotti nell'utero.

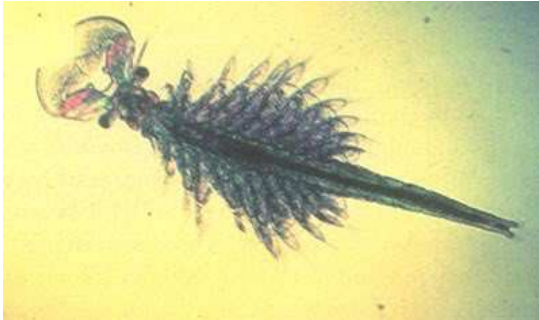


Fig. 10-Adulto maschio

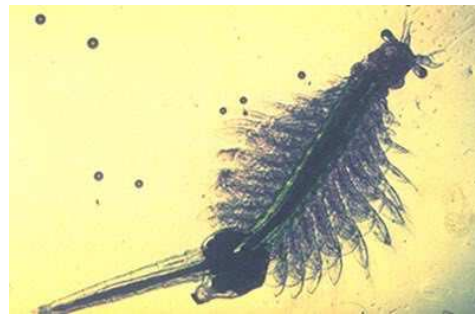


Fig.11-Adulto femmina

Le uova fertilizzate solitamente si sviluppano in naupli (riproduzione ovovivipara) rilasciati dalla madre. In condizioni estreme (alta salinità, bassi livelli di ossigeno) gli embrioni si sviluppano solo fino allo stadio di gastrula. A quel punto sono avvolti da un sottile guscio ed entrano in uno stato di blocco metabolico o dormiente (diapausa) e vengono rilasciati dalla femmina (riproduzione ovipara). Di norma, sia la riproduzione ovipara che ovovivipara vengono usate da tutte le specie di *Artemia*, e le femmine possono passare da un modo di riproduzione all'altro. Le cisti una volta espulse, galleggiano nelle acque altamente saline e vengono portate a riva dove si accumulano e si asciugano. Come risultato di questo processo di disidratazione il meccanismo di diapausa viene attivato; le cisti si trovano a quel punto in uno stato inerte e possono riattivare il loro sviluppo embrionale quando saranno reidratate e troveranno le loro condizioni ottimali.

In condizioni ottimali, le artemie possono vivere per vari mesi, crescendo da naupli e raggiungendo lo stadio adulto in soli 8 giorni e si riproducono ad una media di 300 naupli o cisti ogni 4 giorni.

Le cisti di *Artemia salina* vengono raccolte proprio dall'INVE dal Great Salt Lake in Utah, Stati Uniti, e allevate all'interno dell'azienda in uno specifico reparto.

Le cisti, prima di essere utilizzate, subiscono un processo di sterilizzazione per evitare possibili infezioni batteriche a danno delle larve predatrici.

Uno dei maggiori problemi incorsi nei primi allevamenti di pesci marini e gamberi era la suscettibilità delle larve alle infezioni microbiche. Si credeva che il cibo vivo fosse un'importante fonte di batteri patogeni che venivano trasferiti attraverso la catena alimentare alle larve predatrici. Il *Vibrio* sp. costituisce la principale flora batterica presente nelle soluzioni di cova delle cisti di *Artemia*. Molti *Vibrio* sono batteri opportunisti che possono causare malattie, mortalità e focolai negli allevamenti larvali, specialmente quando i pesci sono stressati o non mantenuti in condizioni ottimali.

I gusci delle cisti di *Artemia* possono essere attaccati da batteri, funghi e impurità organiche contaminate: la contaminazione batterica nel liquido di allevamento può raggiungere numeri superiori a 10^7 CFU/ml (CFU=unità formanti colonia). Con alte densità di cisti mantenute ad alta temperatura durante la schiusa, lo sviluppo batterico può essere considerevole tanto da rendere torbido il media di coltura, causando un calo di produttività dell'allevamento.

Come primo step, le cisti vengono immerse in vasche da 50 e 80 l per la schiusa.

Chiaramente, l'ambiente in cui vengono trattate le cisti e successivamente i naupli, viene mantenuto nelle condizioni ideali per tale scopo, ponendo attenzione ai parametri quali:

- Forte aerazione (ossigeno disciolto superiore ai 2mg/l, preferibilmente 5 mg/l)
- temperatura (tra i 25 e i 28°C)
- salinità (utilizzo acqua di mare)
- pH (>8)
- densità di cisti (La densità delle cisti può anche interferire con altri fattori abiotici essenziali all'allevamento come il pH, l'ossigeno e l'illuminazione. La densità può arrivare fino a 5g/l per le vasche piccole (< 20 l) ma va ridotto ad un massimo di 2g/l per quelle più grandi, al fine di minimizzare le lesioni meccaniche tra naupli ed evitare condizioni d'acqua troppo inquinate.)
- illuminazione (almeno 2000 lux sulla superficie).

La schiusa avviene entro le 24 ore, per cui è necessario riuscire a separare le capsule dai naupli.

I gusci delle cisti non devono essere introdotti nelle vasche di coltura. Quando si raccolgono le cisti normalmente, la completa separazione dei naupli dal loro guscio non è sempre possibile. Le cisti non schiuse e i gusci vuoti potrebbero causare effetti deleteri se introdotti nelle vasche larvali ed ingeriti dai predatori: non possono essere digeriti e possono ostruire stomaco ed intestino.

Per tale scopo viene adottato il metodo **SEP-ART**, che prevede la separazione dei gusci sfruttando il magnetismo.

Le cisti, dopo la raccolta dal loro ambiente naturale, subiscono un trattamento che conferisce un rivestimento magnetico, quindi subito dopo la schiusa l'acqua di coltura contenente le capsule e i naupli viene trasferita dalla vasca ad una mastella contenente una serie di magneti (SEP-ART machine, Fig. 12) che attraggono



Fig.12- Sep-art machine

quindi soltanto le capsule, garantendo una separazione completa senza arrecare alcun danno ai naupli.

Dopo tale processo i naupli vengono trasferiti in altre vasche per la fase di arricchimento, previsto per l'*Artemia* di tipo EG.

Un'importante fattore che determina i valori nutrizionali dell'*Artemia* per l'utilizzo come cibo vivo per le larve di organismi marini, è il contenuto di acidi grassi essenziali EFA, EPA e DHA. A differenza delle specie di acqua dolce, molti organismi marini non riescono a biosintetizzare gli EFA. Pertanto si è trovato che si può migliorare la scarsa quantità di acidi grassi, utilizzando un arricchimento di acidi grassi insaturi (HUFA). E ciò è possibile in quanto l'*Artemia* possiede caratteristiche di alimentazione primitive, infatti quando muta nel secondo stadio larvale diventa un filtratore non selettivo e a quel punto

sarà molto semplice incorporare i nutrienti desiderati e manipolare la loro composizione biochimica. Questo metodo di bioincapsulazione viene usato in tutti gli allevamenti di pesci e crostacei di tutto il mondo.

Nel nostro caso, per il processo di arricchimento, è stato utilizzato il prodotto INVE **S.presso®**, un'emulsione di differenti composti che apportano all'animale, tramite la preda viva, vitamine, carboidrati e gli importantissimi acidi grassi polinsaturi che permettono uno sviluppo veloce e corretto in tutte le sue fasi.

Una volta concluso il processo di arricchimento, l'*Artemia* viene raccolta dalle vasche e conservata all'interno di una cella frigorifera con diffusore di ossigeno, pronta per essere utilizzata.

3.5 Fine periodo di incubazione

Al termine degli 11 giorni di incubazione, che corrispondono al decimo giorno di età delle larve, queste ultime erano pronte per essere trasferite in una “pilot scale hatchery”, dove è stata effettuata la sperimentazione di sostituzione totale di alimento vivo con un alimento secco.

Prima di parlare di questo argomento è importante specificare che durante tutto il periodo di incubazione venivano effettuati dei controlli per assicurarsi che tutti i parametri sia chimico-fisici che biologici fossero adeguati.



Fig.13- sonda utilizzata per misurazioni di ossigeno disciolto e temperatura

Infatti giornalmente venivano misurati parametri quali ossigeno disciolto e temperatura attraverso l'utilizzo di una sonda multi-parametrica (Fig.13), nonché la mortalità attraverso il metodo della sifonatura del fondo delle vasche, con l'utilizzo appunto di un sifone che aspira dal fondo della vasca sia i detriti che i corpi delle larve morte che si depositano, all'interno di un contenitore dotato di aperture laterali coperte da un filtro che fa passare soltanto l'acqua trattenendo le larve al suo interno.

Le larve morte vengono quindi contate o attraverso l'utilizzo di campioni, quando il numero risulta essere visivamente elevato, o contandoli uno per volta in caso contrario, e tutti i dati raccolti giornalmente vengono riportati in apposite schede (Fig.14), comprese le quantità di alimento fornito, che verranno successivamente utilizzate per le valutazioni finali.

Date:	AGE:																		
Tank	T am:	DO am:	T pm:	DO pm:	Daily quantities			Rots (mill)			AF (mill)			EG (mill)			DRY	DRY	Siphoned
					Rot	AF	EG	9h00	12h00	16h00	9h00	13h00	16h00	9h00	13h00	16h00			deads
MB1 cont																			
MB2 LFR78																			
MB3 LFR79																			
MB4 LFR80																			
MB5 LFR81																			
MB6 cont																			
MB7 LFR78																			
MB8 LFR79																			
MB10 LFR80																			
MB11 LFR81																			
MB12 cont																			
MB13 LFR78																			
MB14 LFR79																			
MB15 LFR80																			
MB16 LFR81																			

Fig.14- esempio di scheda raccolta dati giornalieri

Sono stati effettuati anche controlli con cadenza settimanale per altri parametri dell'acqua come pH, salinità e quantità di nitriti, nitrati e ammoniaca presenti, su campioni di acqua sia in ingresso che all'interno del circuito.

Tali analisi sono state effettuate all'interno di un laboratorio presente nell'azienda utilizzando un pHmetro (pH), un rifrattometro (salinità) e un kit di reagenti per nitriti, nitrati e ammoniaca con conseguente utilizzo di uno spettrofotometro per la lettura dei dati.

Tutte le analisi sono state effettuate nel pieno rispetto delle norme di sicurezza.



pHmetro a sinistra e rifrattometro a destra



Reagenti e spettrofotometro

3.5.1 Trasferimento larve

All'undicesimo giorno di età le larve sono state trasferite in una “pilot scale hatchery” dove ha avuto inizio la sperimentazione di una serie di alimenti secchi volti a sostituire al 100% l'*Artemia salina* di cui parleremo in seguito.

Il trasferimento è stato eseguito utilizzando dei recipienti con capacità di 100 L, nei quali veniva riversata l'acqua della vasca contenente le larve, molto delicatamente per evitare di danneggiare queste ultime.

3.6 Pilot scale hatchery

Circa 225.000 larve sono così state trasferite e suddivise in 15 vasche con capacità di 390 litri in modo da



ottenere circa 10-15.000 larve per vasca con una densità di 30-40 larve litro.

Anche in questo caso le vasche sono dotate di diffusori di ossigeno, un flusso d'aria per mantenere un'adeguata idrodinamicità, blower skimmer per eliminare eventuali film lipidici e schiume in eccesso dalla superficie, e dei filtri che consentono un ricambio d'acqua giornaliero.

3.6.1 Parametri

La temperatura dell'acqua segue l'andamento già descritto per il periodo di incubazione per cui viene posta a 17°C il primo giorno, per poi essere aumentata di mezzo grado nei successivi due giorni e posta a 18 per tutto il resto della sperimentazione.

La salinità è di 33 ppt il primo giorno, 36 il secondo e 38 dal terzo fino alla fine della sperimentazione seguendo anche in questo caso l'andamento già descritto per il periodo di incubazione.

L'intensità luminosa da 600 lux precedentemente impostata dall'incubatoio diminuisce a 80 lux dal tredicesimo giorno di età fino al ventinovesimo per poi essere impostata a 150 lux dal trentesimo giorno fino alla fine della sperimentazione.

Il ricambio d'acqua giornaliero viene mantenuto al 200% fino al 34° giorno di età per poi essere aumentato gradualmente fino a raggiungere il 400% gli ultimi due giorni della sperimentazione.

L'alga (*Nannochloropsis* sp.) viene fornita soltanto fino al 15° giorno di età.

3.6.2 Inizio sperimentazione (disegno sperimentale)

Come già detto precedentemente, lo studio è stato effettuato su larve di *Dicentrarchus labrax* aventi 11 dph (days post hatch) fino a 42dph.

Sono stati eseguiti 5 trattamenti in 3 repliche, randomizzati in 15 vasche:

Tr.1 Controllo: dieta standard con O.range, rotiferi e *Artemia*.

Tr.2 Rotiferi-LFR78 (no *Artemia*)

Tr.3 Rotiferi-LFR79 (no *Artemia*)

Tr.4 Rotiferi-LFR80 (no *Artemia*)

Tr.5 Rotiferi-LFR81 (no *Artemia*)

Nel controllo oltre agli alimenti vivi viene fornito un tipo di alimento secco prodotto e già testato con ottimi risultati dall'azienda stessa negli anni passati, l'O.range.

L'**O.range®** è una linea di alimenti formulata solo con ingredienti di prima qualità specifica per larve di pesce. Si tratta di un prodotto in micro particelle, privo di polvere e non solubile quando gettato in acqua. È composto da proteine e contiene livelli adeguati di n-3 HUFA e DHA / EPA.

In quanto rappresenta una linea di alimenti completa, O.range offre una scelta flessibile tra le dimensioni e la formulazione, con la distribuzione delle particelle omogenea in tutte le dimensioni. Esso rappresenta una strategia nutrizionale costituito da 3 blocchi di formulazione (piccole, grandi e extra grande) che sono perfettamente compatibili e integrate in una linea di alimentazione principale con 4 diverse dimensioni.

Ogni blocco contiene ingredienti specifici per le larve, post-larve e avannotti:

O.range START

Progettato per supportare lo sviluppo delle larve durante i primi 25 giorni di vita. L'alimentazione presenta tutte le caratteristiche che sono normalmente associate all'alimento vivo.

O.range Wean

Una dieta perfettamente bilanciata che può essere utilizzato anche come sostituto parziale dell'*Artemia* nello svezzamento precoce di larve (età fino a 45 giorni).

O.range grow

Formulato per migliorare la salute e la resistenza dei giovani post-larva, offre alta energia digeribile per supportare la crescita esponenziale.

3.6.3 Alimenti sperimentali

Gli alimenti utilizzati per la sperimentazione, LFR78, LFR79, LFR80 ed LFR81 sono stati prodotti dall'INVE utilizzando il metodo dell'estrusione.

L'estrusione è un processo tecnologico ampiamente utilizzato nell'industria alimentare attraverso il quale materiali amidacei e/o proteici, in presenza di liquidi, vengono convertiti in un impasto che successivamente viene essiccato e polverizzato in diverse misure adatte per tutti gli stadi di crescita delle larve.

La composizione degli alimenti viene formulata per soddisfare le richieste nutrizionali delle larve.

3.6.4 Richieste nutrizionali

I cambiamenti dell'apparato digerente delle larve durante lo sviluppo larvale lasciano supporre che il fabbisogno nutrizionale non è simile tra le larve e giovanili.

Recenti studi hanno rivelato specificità nelle esigenze nutrizionali delle larve.

La maggior parte degli studi realizzati sui requisiti nutrizionali dei pesci si sono concentrati su requisiti lipidici (Watanabe & Kiron, 1994; Sargent et al 1999).

L'uso della dieta formulata ha permesso di investigare sul fabbisogno proteico delle larve, ed ottenere una maggior parte di dati attendibili sulla richiesta lipidica (Chantal Cahu and José Zambonino Infante 2001.).

Richiesta lipidica

Le uova di pesce presentano un alto contenuto lipidico.

I lipidi sono, insieme agli aminoacidi liberi, la più importante riserva di energia negli embrioni dei pesci marini (Vetter et al.,1983; Ronnestad et al., 1999). In una recente revisione, Sargent et al. (1999) ha sostenuto che la composizione lipidica delle uova si accorda con la richiesta di lipidi delle larve.

Molti esperimenti sono stati condotti per determinare la composizione lipidica ottimale nella dieta formulata per le larve di pesci marini e una particolare attenzione è stata posta sui fosfolipidi e maggiormente sulla richiesta degli acidi grassi insaturi (HUFA).

Richiesta di Fosfolipidi

Un effetto benefico dato dall'assunzione di fosfolipidi (PL) nella dieta è stato segnalato già nel 1981 (Kanazawa et al.) e da questa data, la richiesta di fosfolipidi nelle larve è stata ampiamente studiata (Coutteau et al.1997).

Tuttavia, i pesci hanno dimostrato di essere in grado di sintetizzare ex novo fosfolipidi (Sargent et al., 1993).

Per spiegare la necessità di fosfolipidi negli stadi larvali, Kanazawa (1993) e Geurden et al. (1995) hanno suggerito che le larve erano incapaci di sintetizzare PL ad una velocità sufficiente a soddisfare la richiesta per un periodo di elevata moltiplicazione cellulare.

Infatti, il PL è un componente importante nella membrana cellulare.

Gli studi sono stati condotti per chiarire il ruolo dei fosfolipidi nella dieta.

Il ruolo dei fosfolipidi come fonte di energia è stato menzionato da Olsen et al. (1991), così come le larve hanno una limitata digeribilità dei lipidi neutri. E 'stato anche suggerito che i PL sono più efficienti dei lipidi neutri come fonte di HUFA (Koven et al., 1993, Salhi et al., 1999).

Il ruolo dei fosfolipidi nel facilitare l'emulsione lipidica e la digestione è stato anche ipotizzato, ma ha portato a conclusioni controverse. È stato dimostrato un ruolo fondamentale dei PL nel migliorare il trasporto di lipidi tra i vari tessuti e gli organi.

I lipidi sono trasportati come lipoproteine.

La fosfatidilcolina è il principale lipide polare nelle lipoproteine del pesce (Sheridan, 1988).

Un ruolo indiretto dei PL deve essere anche considerato per interpretare l'effetto benefico dell'incorporazione dei PL nelle diete composte.

I PL migliorerebbero la coesione della dieta microparticolata e quindi ridurrebbero la lisciviazione dei nutrienti solubili.

Gli studi sono ora condotti per determinare il ruolo specifico delle diverse classi di fosfolipidi, soprattutto la fosfatidilcolina e il fosfatidilinositolo.

Richiesta di acidi grassi essenziali (HUFA)

Gli acidi grassi altamente insaturi (HUFA) sono stati identificati come componenti dietetici essenziali per i pesci marini da molto tempo, dato che i pesci marini non sono in grado di sintetizzarli.

Una particolare attenzione è stata posta all'acido eicosapentaenoico (EPA = C20: 5n-3) e all'acido docosaesaenoico (DHA = C22: 6n-3), presenti in grandi quantità nelle membrane cellulari dei pesci.

Gli esperimenti condotti utilizzando prede vive (Izquierdo et al, 1989 Watanabe et Kiron, 1994) o una dieta composta (Zambonino Infante e Cahu, 1999) hanno dimostrato che il livello ottimale di EPA + DHA nella dieta per le larve di pesci marini è di circa il 3% di sostanza secca.

Richiesta Proteica

Il livello proteico ottimale per le larve di specie d'acqua dolce è stato ampiamente studiato.

È superiore nelle larve e nei giovani che negli adulti per le stesse specie. Questa differenza è stata attribuita al tasso di crescita elevato e ad un elevato utilizzo di proteine come fonte di energia nelle larve (Dabrowski, 1986).

Al contrario, i dati relativi al fabbisogno proteico delle larve dei pesci marini sono carenti e il livello proteico nella dieta generalmente si attestava intorno al 50-70%, sulla base dei dati ottenuti sugli avannotti.

Il primo tentativo di determinare le concentrazioni di proteine nella dieta della spigola a fasi giovanili è stata condotta da Peres et al. (1996) alimentando le larve dal giorno 15 al giorno 35 con diete composte isoenergetiche incorporando un gradiente a livello proteico (farina di pesce più caseina idrolizzata). La migliore crescita è stata osservata con il 50% di proteine. Una crescita leggermente più lenta è stata osservata con il 60%. Una crescita più inadeguata è stata osservata con il 30 e il 40% di proteine (Fig. 15).

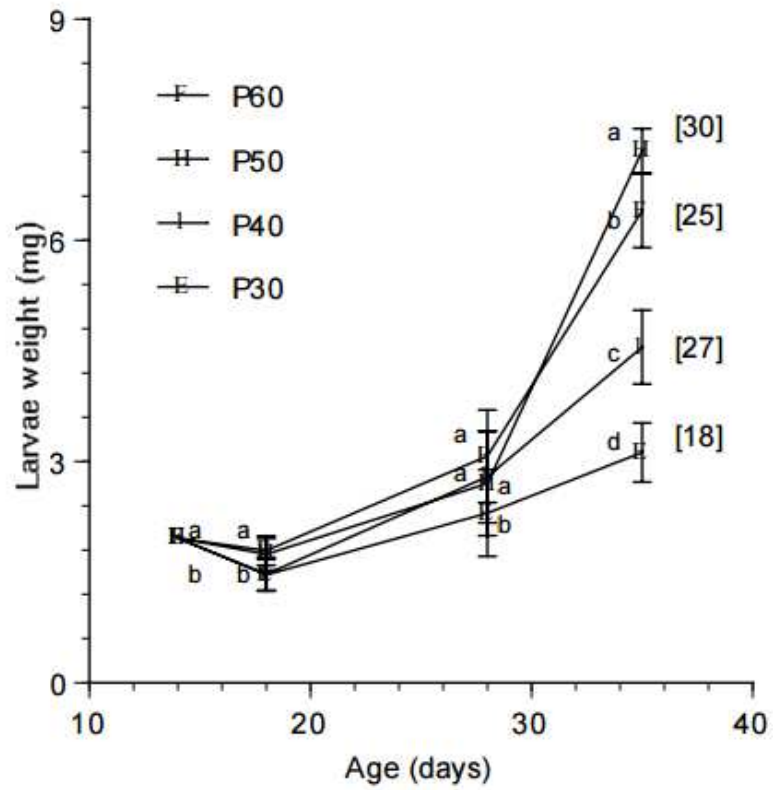


Fig.15- Growth (wet weight) of sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) fed from day 14 with isoenergetic compound diets incorporating 30, 40, 50 or 60% proteins. Survival rate, from hatching to Day 36, is in brackets (from Pères et al., 1996). Means \pm SEM (n=4) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Composizione approssimativa degli alimenti sperimentali

	LFR78	LFR79	LFR80	LFR81
Dry matter %	95,0	95,0	95,0	95,0
Crude protein	56	56	56	56
CP/DM	58,9	58,9	58,9	58,9
Crude Fat	12,0	12,0	12,0	12,0
Crude fat hydrolysis	12,4	12,4	12,4	12,4
Crude ash	10,1	10,1	10,1	10,1
Crude Fiber	0,7	0,7	0,7	0,7
Starch	11,0	11,0	11,0	11,0
sum n-3 HUFA	40,0	40,0	40,0	40,0
22:6 n-3/ 20:5 n-3 (DHA/EPA)	2,0	2,0	2,0	2,0
Notes	Dry ingredients	Fresh ingredients	Fresh ingredients	Fresh ingredients

3.6.5 Controlli biometrici

Come per il periodo di incubazione anche durante il periodo della sperimentazione nella pilot scale hatchery sono stati eseguiti i medesimi controlli con cadenza giornaliera e settimanale.

Ma a differenza del periodo di incubazione vengono adesso eseguiti controlli biometrici settimanalmente.

I controlli biometrici consistono nell'effettuare misurazioni della lunghezza del corpo, conteggio dei raggi della pinna caudale e misurazione del peso umido e secco, e ulteriormente si annota la presenza/assenza della vescica natatoria, eventuale presenza di calcoli, riscontro della presenza di alimento all'interno dell'intestino, presenza di gas bubble, iperinflazione della vescica e verifica della presenza di deformità quali:

- Deopercolazione dx/sx
- Head deformity
- Spinal deformity
- Fin deformity

3.6.6 Procedure

I controlli biometrici, come già detto, venivano effettuati con cadenza settimanale e venivano eseguiti su tutte le vasche per tutti i trattamenti su campioni di 30 individui per vasca.

Il campionamento veniva eseguito attraverso l'utilizzo di pipette per prelevare gli individui dalle vasche durante le prime biometrie essendo le dimensioni corporee di questi ultimi molto ridotte, successivamente venivano utilizzati dei retini per lo stesso scopo.

Prelevati dalle vasche, gli individui venivano posti in dei piccoli contenitori di plastica bianca riempiti di acqua marina per poi essere trasportati in laboratorio.

Una volta in laboratorio gli individui venivano collocati all'interno di una soluzione contenente benzocaina (0,3g/l) utilizzata come anestetico.

Successivamente, dopo che la soluzione contenente benzocaina ha fatto il suo effetto, gli individui venivano sistemati all'interno di piastre trasparenti per poter eseguire l'analisi al microscopio.

Il microscopio, utilizzato per eseguire tali analisi, era uno stereomicroscopio

Leica S8 Apo (Fig.16) dotato di un



Fig.16- Leica S8 Apo

ottica micrometrica per poter effettuare la misurazione della lunghezza corporea dei campioni, e tutte le osservazioni citate sopra.

I pesi venivano misurati attraverso l'utilizzo di una bilancia da laboratorio KERN pfb (max 3000g d=0,01g), per tale scopo venivano utilizzati dei piccoli contenitori che venivano precedentemente pesati per essere tarati. Successivamente i 30 individui

utilizzati per le osservazioni al microscopio venivano posizionati all'interno di tali contenitori al fine di rilevarne il peso umido.

In seguito tutti i contenitori sono stati collocati all'interno di una stufa da laboratorio ad una temperatura di 60°C per 24h per poterne rilevare successivamente il peso secco.

Esempio di scheda per raccolta dati delle biometrie

Trial	Project cod	Date	Species	Treatment	Live Food enr	Tank	Age	nr	SL(U)	SL(mm)	Inflated	Mast	Calcoli	Dry Fe	Flexi	PCF	Oil Glo	Op Dx	Op SX	Bil	Tot deop	Spinal	Tail de	Head	Fin defor	OK	Remarks	
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	1	9,5	9,50	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	2	9	9,00	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	3	9,8	9,80	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	4	8,2	8,20	0		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	5	9,8	9,60	0		1	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	6	8,5	8,50	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	7	8,9	8,90	1		1	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	8	8,8	8,80	0		1	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	9	9,3	9,30	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	10	8,7	8,70	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	11	9,1	9,10	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	12	9	9,00	0		1	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	13	9,8	9,60	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	14	8,8	8,60	0		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	15	9	9,00	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	16	8,8	8,80	0		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	17	8,5	8,50	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	18	8,7	8,70	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	19	8,2	8,20	0		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	Control		B1	14	20	9,7	9,70	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	1	7,8	7,60	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	2	9	9,00	1		1	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	3	8,2	8,20	0		1	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	4	8	8,00	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	5	8	8,00	0		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	6	8,2	8,20	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	7	8,2	8,20	0		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	8	8,8	8,60	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	9	8,2	8,20	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	10	8	8,00	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	11	8,5	8,50	1		0	0	0													gas bubble
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	12	7,9	7,90	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	13	9	9,00	0		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	14	8,5	8,50	1		0	0	3													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	15	8	8,00	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	16	7,7	7,70	1		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	17	8,7	8,70	0		0	0	0													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	18	7,5	7,50	1		0	0	3													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	19	8,7	8,70	1		0	0	4													
Screen1 Bass	400026	18-mrt-16	Bass	LFRT8		B2	14	20	8	8,00	0		1	0	0													

Misure dei pesi

Tank	Date	treat	Age	Tarra(g)	Brutto	Nr fish	nett	Ind WW(MG)	Brutto DW(g)	Net DW	Ind DW(mg)
B1	18-mrt-16	Control	14	1,1386	1,2398	30	0,10	3,37	1,15090	0,0123	0,410
B2	18-mrt-16	LFR78	14	1,1325	1,2145	30	0,08	2,73	1,14070	0,0082	0,273
B3	18-mrt-16	LFR79	14	1,1454	1,2516	30	0,11	3,54	1,15460	0,0092	0,307
B4	18-mrt-16	LFR80	14	1,1774	1,2981	30	0,12	4,02	1,18600	0,0086	0,287
B5	18-mrt-16	LFR81	14	1,1764	1,2846	30	0,11	3,61	1,18790	0,0115	0,383
B6	18-mrt-16	Control	14	1,1443	1,2256	29	0,08	2,80	1,15550	0,0112	0,386
B7	18-mrt-16	LFR78	14	1,1784	1,2592	30	0,08	2,69	1,18670	0,0083	0,277
B8	18-mrt-16	LFR79	14	1,1759	1,2645	30	0,09	2,95	1,18590	0,0100	0,333
B10	18-mrt-16	LFR80	14	1,1506	1,2236	30	0,07	2,43	1,16140	0,0108	0,360
B11	18-mrt-16	LFR81	14	1,1457	1,2176	30	0,07	2,40	1,15550	0,0098	0,327
B12	18-mrt-16	Control	14	1,1520	1,2394	30	0,09	2,91	1,16440	0,0124	0,413
B13	18-mrt-16	LFR78	14	1,1431	1,2083	30	0,07	2,17	1,15230	0,0092	0,307
B14	18-mrt-16	LFR79	14	1,1466	1,2193	30	0,07	2,42	1,16	0,0103	0,343
B15	18-mrt-16	LFR80	14	1,1457	1,2158	30	0,07	2,34	1,16	0,0099	0,330
B16	18-mrt-16	LFR81	14	1,1515	1,2282	30	0,08	2,56	1,1627	0,0112	0,373

3.6.7 Patologie e Deformità riscontrate

Da queste prime biometrie si riscontra la presenza di alcuni individui affetti da calcolosi, iperinflazione della vescica natatoria, presenza di gas bubble e da diversi tipi di deformità scheletriche come il prognatismo, la lordosi e la cifosi.

Calcolosi

I calcoli urinari (Fig.17) possono essere osservati nell'uretra o nella vescica urinaria. Hanno l'aspetto di piccole pietre grigiastre o giallastre. Il colore può essere a volte rossastro durante lo stadio larvale. Sono essenzialmente cristalli di fosfato di calcio, $Ca_5(PO_4)_3$. I calcoli



Fig.17- Calcolo urinario

urinari possono essere osservati a partire dalle larve agli stadi giovanili. Fino a una lunghezza totale larvale di 20 mm, i calcoli possono essere osservati al microscopio. Quando le dimensioni dei pesci aumentano, i calcoli possono essere rilevati solo utilizzando raggi X.

I calcoli si ritengono essere correlati allo stress e ad una cattiva gestione, ma non sembrano essere sistematicamente letali.

La frequenza di presenza di calcoli in stock ittici varia dallo 0 al 30%. In alcuni casi particolari, può raggiungere il 60%.

Per l'allevamento larvale, i calcoli sono il primo segnale di scarsa qualità della popolazione, a causa di molti fattori come la gestione, la qualità dell'acqua, scarsa alimentazione ecc. (Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream - Volume 1, Alessandro Moretti, Mario Pedini Fernandez-Criado, Giancarlo Cittolin, Ruggero Guidastrì; 1999)

Iperinsufflazione della vescica natatoria

Johnson e Katavic (1984) identificarono la sindrome da stress dell'ipertrofia della vescica natatoria (fig.18). L'ipertrofia, associata con la sindrome da stress della vescica natatoria è legata ad un malfunzionamento del sistema osmoregolatore, che porta alla ritenzione idrica. Questo stress interferisce con la capacità delle larve di mantenere la loro



Fig.18- Vescica natatoria iperinsufflata

posizione nella colonna d'acqua. Una differenza di densità generata dalla ritenzione idrica può spingere

le larve verso la superficie dell'acqua sovrasatura di gas, i quali possono essere facilmente assorbiti dalla vescica natatoria causandone un'iperinflazione. (Lindsey D. Woolley and Jian G. Qin; 2010).

Gas bubble

La malattia da Gas bubble è un processo non infettivo indotto fisicamente, causato dalla non compensata pressione iperbarica dei gas totali disciolti. Quando la compensazione della pressione è insufficiente, i gas disciolti possono formare emboli (nel sangue) e l'enfisema (nei tessuti). La risultante anomala presenza fisica di gas è

in grado di bloccare i vasi sanguigni (emostasi) o lacerare i tessuti, e può portare alla morte.

Prognatismo

Il prognatismo mandibolare o protrusione del labbro inferiore (fig.19), è una malformazione dello sviluppo che determina un fenotipo facciale particolarmente distintivo.

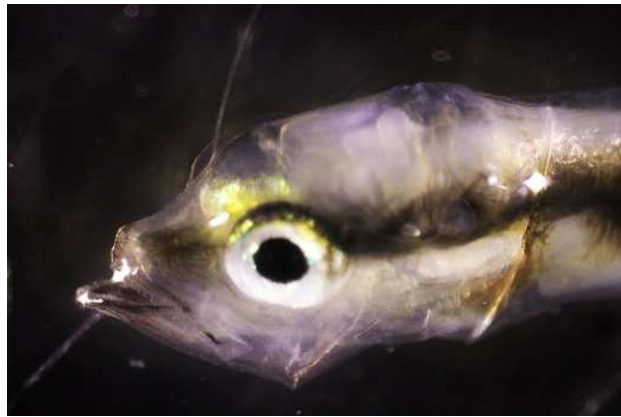


Fig.19- Larva affetta da prognatismo mandibolare.

Il prognatismo viene definito come un'alterazione nell'accrescimento dei segmenti ossei di mandibola e mascella, che determina un raffronto anomalo tra le superfici dentarie con conseguente mal occlusione, e problemi masticatori.

Nei pesci teleostei le strutture anatomiche che delimitano il cavo orale derivano dal primo arco viscerale che durante l'organogenesi origina la porzione craniale dello splancocranio dividendosi in cartilagine palato-quadrata e cartilagine di Meckel, e da porzioni del secondo arco viscerale o ioideo che originano lo iosimplotico. Dall'abbozzo della cartilagine di Meckel si sviluppa anteriormente, tramite ossificazione intramembranosa paracondrale, l'osso dentale mentre posteriormente si accresce, per ossificazione endocondrale, l'osso angolare, articolato tramite il quadrato al neurocranio. Queste strutture rappresentano la base ossea della mandibola. È possibile ipotizzare che i casi di prognatismo mandibolare siano connessi ad un esagerato allungamento dell'abbozzo cartilagineo o ad un'alterata ossificazione della porzione dentale o angolare che concorrono a formare il corpo mandibolare. Nelle larve di branzino, la presenza delle strutture cartilaginee che compongono il cavo orale è visibile al termine del riassorbimento del sacco vitellino;

l'inizio dell'ossificazione mandibolare avviene a 25 giorni dalla schiusa e risulta completa in tutti i suoi elementi ad 80 giorni (Kuzir et al.,2004).

Il prognatismo mandibolare negli avannotti di branzino è compatibile con la vita, non deprime sensibilmente l'accrescimento durante le fasi di ingrasso, non aumenta la suscettibilità alle malattie.

Sebbene il prognatismo tenda con l'accrescimento ad essere meno pronunciato rispetto alla fase di avannotto, viene ritenuta dagli allevatori una caratteristica estetica sgradevole per l'acquirente; considerato che il branzino viene proposto al dettaglio prevalentemente intero e non in filetti, la morfologia della testa rientra tra i principali parametri di valutazione per il cliente, determinando deprezzamento del prodotto. Gli avannotti prognati rappresentano per l'avannotteria un costo in termini di spazio d'allevamento, alimento somministrato, manodopera impiegata nel processo di selezione manuale, e causano un deprezzamento della partita in fase di vendita ai centri di ingrasso. La selezione e lo scarto dei soggetti malformati rappresenta non solo un problema di natura economico-manageriale, ma anche un problema di benessere animale. Ad oggi, gli studi condotti sulle malformazioni nelle prime fasi di sviluppo in *D. labrax* non hanno evidenziato una causa univoca per il prognatismo mandibolare suggerendo di fatto, per questo carattere, un'etiologia multifattoriale (Abdel et al., 2004; Villeneuve et al., 2005).

Le principali cause sono da attribuire a somministrazione di diete con eccessive quantità di vitamina A (Mazurais et al., 2009), e studi condotti sul ruolo dei lipidi nello sviluppo larvale del branzino (Villeneuve et al., 2005) hanno evidenziato il ruolo degli acidi grassi nel modulare la trascrizione dei geni coinvolti nel loro metabolismo, per cui un rapporto non ottimale tra fosfolipidi e lipidi neutri o un

eccesso di PUFA Ω 3 nella dieta determina un aumento delle malformazioni e della mortalità delle larve (Villeneuve et al., 2005).

Deformità vertebrali

Le deformità vertebrali sono tra le più importanti malformazioni scheletriche, avendo un'alta incidenza in molte specie, sia in condizioni naturali che in condizioni di allevamento (Divanach et al., 1996). La lordosi emale, inizialmente era la più grave deformazione vertebrale nel branzino di acquacoltura, ma il lavoro scientifico sul ruolo dell'inflazione della vescica natatoria (Chatain, anni 1986, 1987, 1994; Chatain e Ounais-Guschemann, 1990) e la velocità della corrente dell'acqua (Divanach et al., 1997) hanno contribuito in modo significativo al suo controllo. D'altro canto, vi sono poche informazioni sul resto delle deformità nella regione vertebrale che possono influenzare una percentuale significativa di novellame di branzino con vescica natatoria funzionale (Boglione et al., 1995).

Lordosi

Le anomalie morfo-anatomiche sono state considerate come il problema più significativo di natura

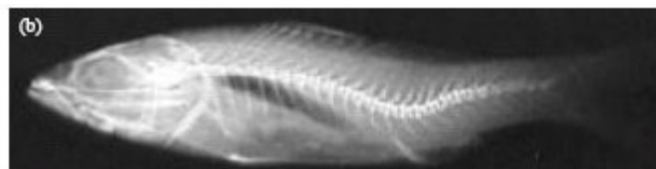


Fig.20- Individuo affetto da lordosi.

biologica nell'acquacoltura di pesci del Mediterraneo. In generale, si sviluppano a causa della scarsa conoscenza delle ottimali preferenze ambientali del pesce nelle diverse fasi della loro vita. Di conseguenza, e nonostante gli imponenti progressi compiuti nelle modalità di allevamento, l'alimentazione e il controllo delle malattie, le anomalie morfo-anatomiche continuano ad influenzarne la produzione (Koumoundouros et al, 2002a., 2004; Planas & Cunha, 1999; Boglione et al., 2003; Cahu et al., 2003; Sfakianakis et al., 2004), a volte raggiungendo frequenze di addirittura il 90% (risultati non pubblicati). Si sviluppano soprattutto durante i primi

cicli vitali dei pesci, e possono influenzare la morfologia esterna, la sopravvivenza, il tasso di crescita, il comportamento e, infine, i costi di produzione e l'efficacia delle avannotterie (Divanach et al., 1996; Koumoundouros et al., 1997a, b, 2002a).

La lordosi (Fig.20) è la più grave e ampiamente studiata deformità vertebrale. Secondo il centro dello sviluppo anatomico, la lordosi può influenzare la regione pre-emale o la regione emale della colonna vertebrale. In tutte le specie, la lordosi pre-emale è associata alla non inflazione della vescica natatoria e si è pensato potesse essere attribuito ad un meccanismo di compensazione per la mancanza di galleggiamento da un anomalo nuoto obliquo (Chatain e Dewavrin, 1989). La lordosi emale, è stata per la prima volta differenziata dalla pre-emale da Divanach et al. (1997) in giovanili di *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) e da Kihara et al. (2002) in *Pagrus major*, ed è stata attribuita all'intenso sforzo di nuoto del pesce con vescica natatoria iperinflatata. La lordosi emale può raggiungere livelli elevati di prevalenza (addirittura il 70%), in particolare in *D. labrax* (Divanach et al., 1997). (D.G. Sfakianakis et al.,2006).

Cifosi

La Cifosi (Fig.21) è una deformità vertebrale comune in diverse specie di pesci, che viene attribuita alla presenza di parassiti del tipo Myxosporean (Langdon, 1987; Lom et al, 1991), carenze alimentari (Mahajan e Agrawal, 1980;. Furuichi et al, 1997),

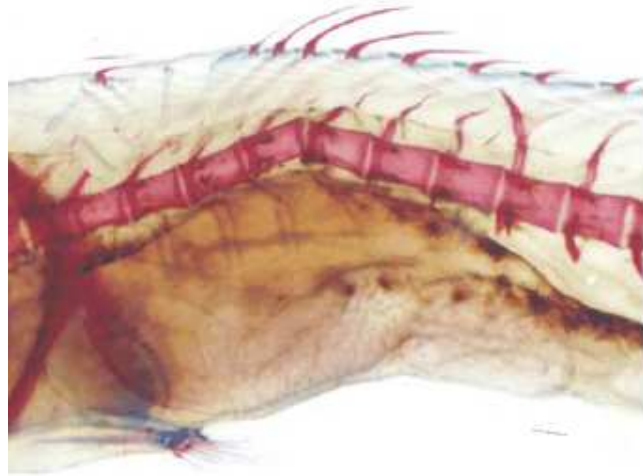


Fig.21- Larva affetta da cifosi.

sostanze inquinanti (Muramoto, 1981;. Van Leeuwen et al, 1986; Lemly, 1993; Kingsford et al., 1996), o per fattori non identificati (Boglione et al, 1995, 2001;.. Divanach et al., 1996; il centro della deformità si trova principalmente sulle vertebre 5 - 6.

Gli esemplari cifotici presentato un comportamento letargico. La cifosi pre emale era altamente correlata alla lordosi emale nei giovani allevati di *D. labrax* (Boglione et al., 1995). Anche se la lordosi e la cifosi sono state particolarmente favorite dalla non inflazione della vescica natatoria, in uno studio, *D. labrax* con vescica normalmente inflata ha anche presentato 14,8% cifosi, anche se solo 8,3% erano gravi (Boglione et al., 1995).

3.7 Salinity stress test

Nel 40° giorno della sperimentazione è stato effettuato uno stress test, sottoponendo le larve ad una salinità elevata, per rilevare le differenze di condizione fisiologica delle larve tra i gruppi di trattamento in termini di mortalità. L'indice di resistenza (CSI – Cumulative Stress Index) è la misura quantitativa della tolleranza ed è dato dalla sommatoria delle mortalità nei diversi momenti di controllo. Il CSI riflette la resistenza agli stress delle larve: più questo indice è elevato e più le larve sono stressate, quindi meno resistenti e più deboli, in generale di qualità minore (Dhert et al.,1992).

Per stabilire il valore della salinità a cui sottoporre le larve, viene eseguito un pre stress test a tre valori crescenti di salinità, per poi utilizzare il valore nel quale si riscontra circa il 50% di mortalità nei campioni.

3.8 Analisi statistica

Ciascuno dei quattro trattamenti è stato replicato in tre vasche di allevamento sperimentali in modo random. Utilizzando il software per l'analisi statistica R, le varianze, delle variabili di risposta lunghezza standard (SL), di ogni trattamento sono state comparate agli altri, considerandole indipendentemente entro i momenti di campionamento (14, 28, 35, 42 dph), attraverso l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) per un disegno gerarchizzato (vasche gerarchizzate in trattamenti), per valutare che la possibile differenza tra trattamenti non sia dovuta al caso. L'equazione del modello lineare può essere semplificata nel modo seguente (Underwood, 1997):

$$X_{ijk} = \mu + A_i + B(A)_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)}$$

Dove μ indica il valore reale della media campionaria, A_i indica l'effetto dell' i -esimo livello del trattamento cui l'osservazione X_{ijk} appartiene, $B(A)_{j(i)}$ rappresenta l'effetto del j -esimo livello vasca gerarchizzato nell' i -esimo livello trattamento ed $\varepsilon_{k(ij)}$ è il termine residuo legato all'unicità dell'osservazione. È stato utilizzato il test C di Cochran al fine di verificare il rispetto delle condizioni di omoschedasticità delle varianze, questo test valuta se la varianza di valore massimo è omogenea rispetto alle altre, ossia non differisce in maniera significativa, garantendo in tal modo una minore probabilità di incorrere in un errore di Tipo I.

Una volta verificata la presenza di differenze significative tra le medie campionarie dei trattamenti, è stato impiegato il test di Student-Newman-Keuls (SNK) per determinare le medie effettivamente e significativamente differenti tra loro, poiché questo test a posteriori effettua le comparazioni a coppie multiple fra medie usando la distribuzione di intervallo studentizzata (Underwood, 1997). Con l'utilizzo di R,

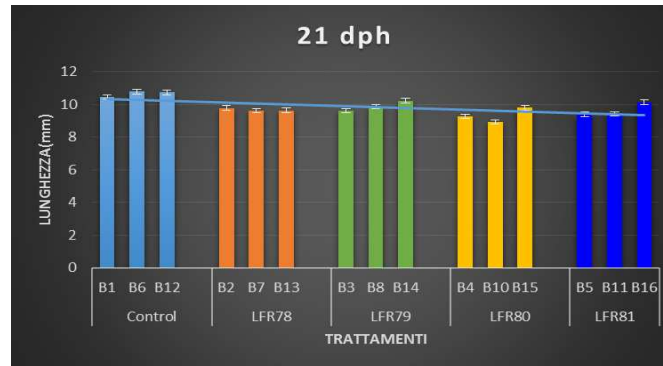
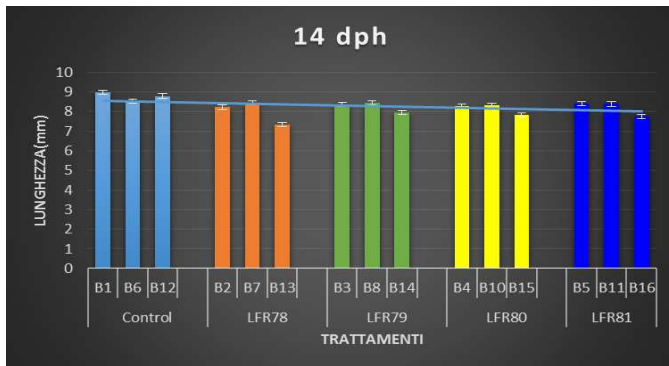
grazie alle comparazioni a coppie multiple è possibile verificare la differenza tra ciascuna coppia di medie e ottenere una matrice in cui gli asterischi indicano le medie di gruppo con differenze significative.

I dati raccolti sul peso umido e secco (IndWW e IndDW) sono stati analizzati statisticamente attraverso l'analisi della varianza ad una via (ANOVA), per verificare se anche in questo caso la possibile differenza tra trattamenti non sia dovuta al caso.

Dai dati ottenuti sono stati costruiti dei grafici utilizzando Microsoft Excel, in modo da poterli confrontare con la variabile di risposta SL.

4. Risultati

4.1. Lunghezze raggiunte



Grafici- Lunghezze standard medie misurate durante ogni biometria con cadenza settimanale per ogni trattamento. Errore standard rappresentato dalle barre di errore positivo.

Nei grafici sono rappresentati i valori medi di lunghezza standard per ogni trattamento misurati durante le biometrie.

È possibile notare come il trattamento di controllo, che segue un'alimentazione standard, al termine della sperimentazione abbia raggiunto dimensioni maggiori ($14,2 \pm 1,2$) rispetto ai trattamenti che seguono una dieta basata sulla sostituzione di *Artemia salina* (TR2 $11,0 \pm 1,2$; TR3 $10,4 \pm 1,3$; TR4 $10,6 \pm 0,8$; TR5 $10,8 \pm 1,0$).

È stato effettuato il test C di Cochran per verificare una delle assunzioni su cui si basa l'analisi della varianza (ANOVA): l'omogeneità delle varianze tra trattamenti (omoschedasticità). Il test di Cochran testa l'ipotesi nulla che non ci siano differenze nella varianza tra trattamenti, ciò significa che se il p-value è $>$ di 0,05 si accetta l'ipotesi nulla che non ci siano differenze nella varianza tra trattamenti. Dai risultati (Tabella 2) emerge che a 14 e 35 dph le varianze risultano non omogenee per cui i dati sono stati trasformati e rianalizzati mostrando ancora non omogeneità delle varianze, per cui l'anova è stata condotta su dati non trasformati utilizzando un p-value più conservativo (p-value 0,01).

	N	K	C	p-value
14 dph	20	15	0,22825	0,019
21 dph	20	15	0,1184	0,23
28 dph	20	15	0,12088	0,19
35 dph	20	15	0,14892	0,013
42 dph	20	15	0,1172	0,26

Tab.2 - Risultati del test di Cochran effettuato tramite R

4.2. Analisi della varianza (ANOVA)

Analysis of Variance Table

Response: sl14

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TR	4	20.606	5.1514	1.7968	0.2061
TR:VA	10	28.669	2.8669	12.1261	<2e-16 ***
Residual	285	67.381	0.2364		

Response: sl21

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TR	4	59.166	14.7915	6.9591	0.006034 **
TR:VA	10	21.255	2.1255	5.4926	1.806e-07 ***
Residual	285	110.287	0.3870		

Response: sl28

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TR	4	227.953	56.988	5.8543	0.01081 *
TR:VA	10	97.345	9.734	20.9226	< 2e-16 ***
Residual	285	132.599	0.465		

Response: sl35

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TR	4	385.50	96.376	22.6363	5.355e-05 ***
TR:VA	10	42.58	4.258	7.5525	1.119e-10 ***
Residual	285	160.66	0.564		

Response: sl42

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TR	4	570.30	142.575	11.847	0.0008239 ***
TR:VA	10	120.34	12.034	15.107	< 2.2e-16 ***
Residual	285	227.04	0.797		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

L'analisi della varianza è stata effettuata per testare l'effetto del trattamento nell'arco temporale che va da 14 a 42 dph e per verificare che la replicazione delle vasche nei trattamenti sia, da un punto di vista statistico, corretta (P-value < 0,05).

Dai dati riportati nella tabella si deduce che dopo 14 dph i dati delle SL non risultano significativi.

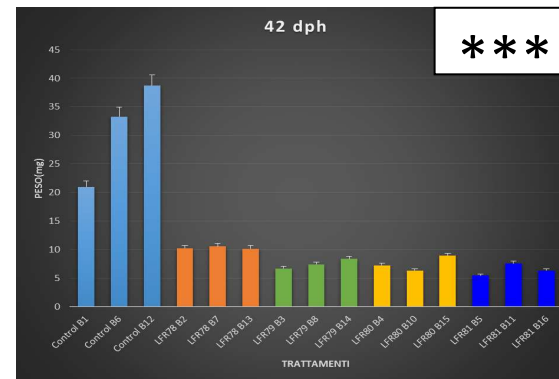
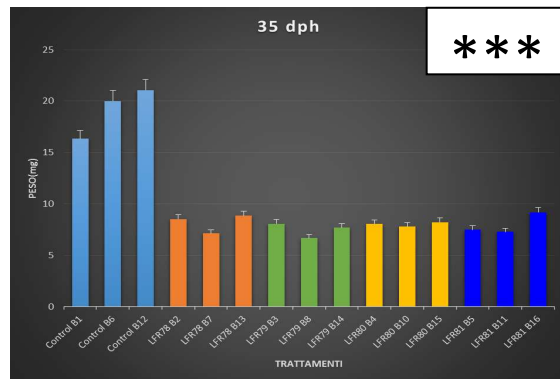
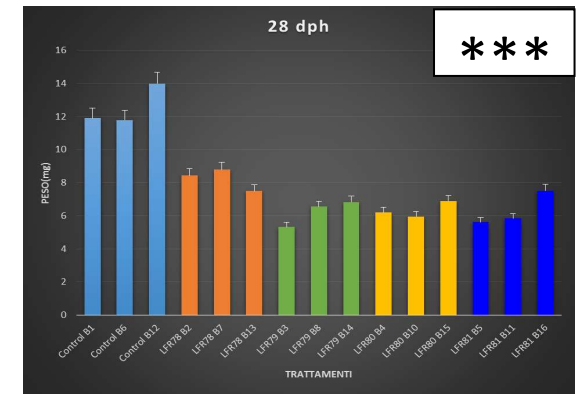
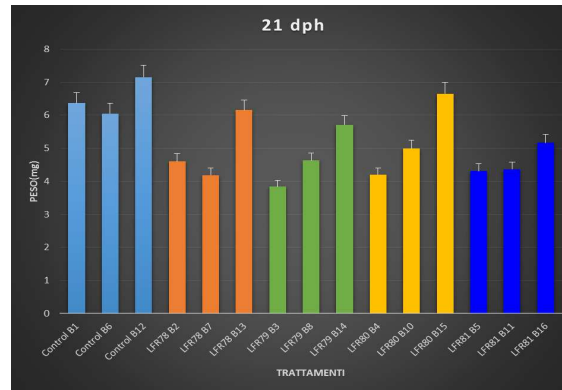
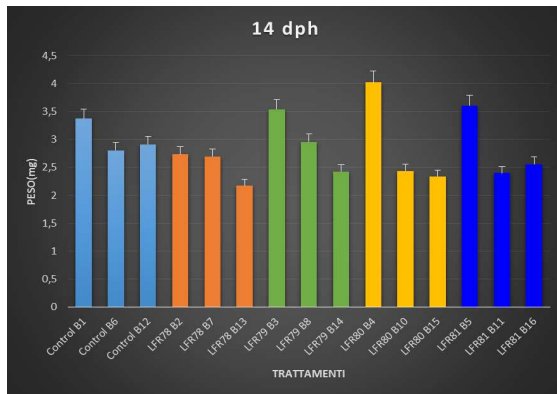
Si riscontra significatività a partire da 21 a 42 dph quindi si può affermare che le differenze tra le medie sono dovute ad un effetto del trattamento a cui sono sottoposte le vasche.

	SNK	P
14 dph	TR1=TR2=TR3=TR4=TR5	
21 dph	TR1>TR2=TR3=TR4=TR5	*
28 dph	TR1>TR2=TR3=TR4=TR5	**
35 dph	TR1>TR2=TR3=TR4=TR5	***
42 dph	TR1>TR2=TR3=TR4=TR=TR5	***

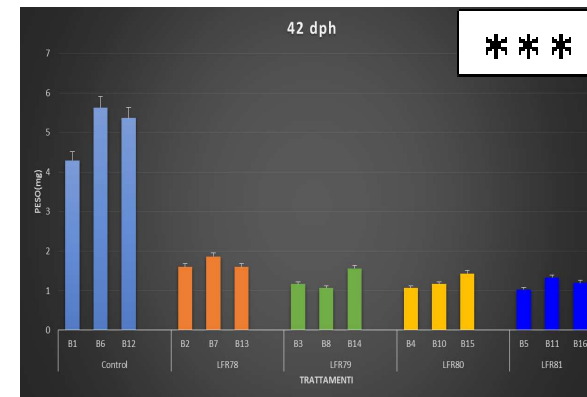
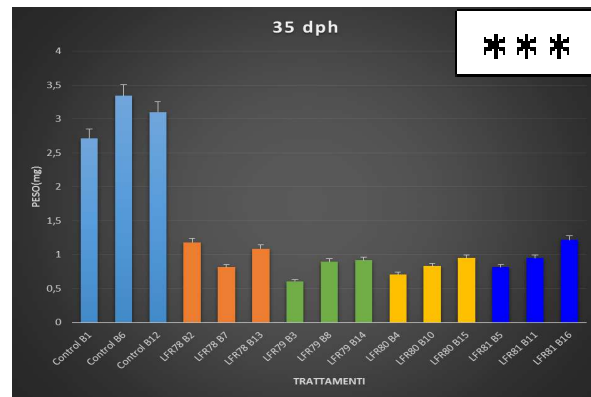
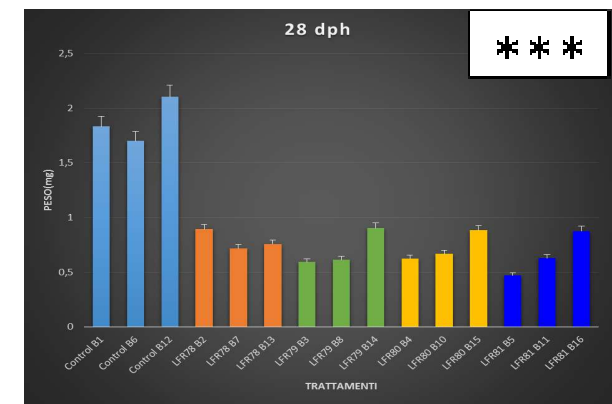
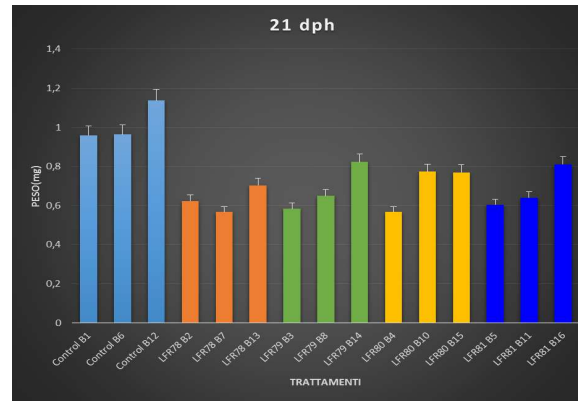
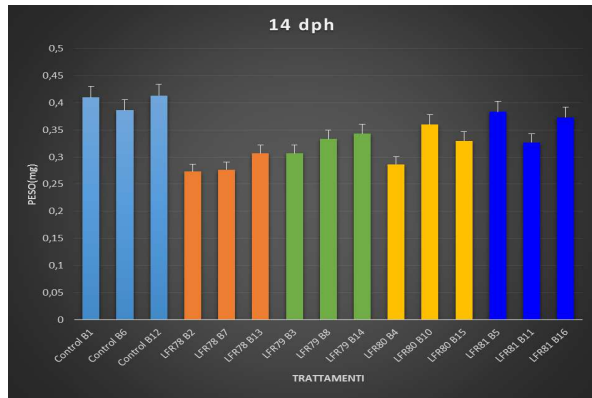
Tab. 3 – Risultati del test SNK (Livello di significatività: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

È stato effettuato il test di Student-Newman-Keuls (SNK) per verificare la significatività delle differenze tra coppie di trattamenti. Dai risultati si evince che a 14 dph non vi è alcuna differenza significativa tra tutti i trattamenti. Mentre da 21 a 42 dph si osserva che il trattamento di controllo (TR1), che segue una dieta standard, risulta essere significativamente maggiore rispetto a tutti i trattamenti sperimentali, inoltre non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra i vari trattamenti sperimentali (TR2=TR3=TR4=TR5 a 14, 21,28, 35 e 42 dph).

4.3. Peso umido e secco individuale



Grafici- Peso medio umido individuale (WW) ricavati durante tutti i campionamenti. Gli asterischi indicano il livello di significatività dell'analisi della varianza (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).



Grafici- Peso medio secco individuale (DW) ricavati durante tutti i campionamenti. Gli asterischi indicano il livello di significatività dell'analisi della varianza (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Anche in questo caso l'analisi della varianza è stata effettuata per testare l'effetto del trattamento nell'arco temporale che va da 14 a 42 dph. I risultati mostrano che, sia per i pesi umidi che per i pesi secchi, a 14 e 21 dph non emerge un effetto significativo del trattamento, mentre da 28 a 42 dph risulta essere altamente significativo (* * * $P < 0.001$).

	14dph		21dph		28dph		35dph		42dph	
	WW	DW	WW	DW	WW	DW	WW	DW	WW	DW
TR1	3,02mg	0,403mg	6,52mg	1,020mg	12,55mg	1,879mg	25,01mg	3,052mg	31mg	6,112mg
TR2	2,53mg	0,286mg	4,98mg	0,631mg	8,69mg	0,789mg	8,17mg	1,027mg	10,32mg	1,989mg
TR3	2,97mg	0,328mg	4,72mg	0,686mg	6,23mg	0,703mg	7,48mg	0,805mg	7,48mg	1,736mg
TR4	2,93mg	0,326mg	5,28mg	0,703mg	6,34mg	0,724mg	8,02mg	0,828mg	7,50mg	1,821mg
TR5	2,85mg	0,361mg	4,61mg	0,684mg	6,32mg	0,658mg	7,98mg	0,993mg	6,44mg	1,890mg

Tab. 4- Pesì medi individuali umidi (WW) e secchi (DW) ricavati dalle misure settimanali.

I risultati mostrano lo stesso andamento delle lunghezze standard, mostrando quindi che sia i pesi umidi che secchi dei trattamenti di controllo hanno valori maggiori rispetto ai trattamenti che non prevedevano l'assunzione di *Artemia salina*.

4.4 Deformità

Deformità	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5
% Prognatism	23,6	23,3	30,6	23,6	30
% Spinal def.	0,30	1,81	2,72	2,42	5,15
% Fish without def.	76,01	74,85	66,67	73,94	64,85

Tab.5-Percentuali delle malformazioni rilevate nelle larve durante le biometrie (14, 21, 28, 35, 42 dph)

È stata stimata la percentuale degli individui affetti dalle deformità riscontrate durante i controlli biometrici nella fase di pre-svezzamento. Sono state individuate malformazioni dell'arco mandibolare (prognatismo) e sporadici casi di malformazioni della spina dorsale (lordosi e cifosi). Dai campioni prelevati sono emersi i risultati riportati nella Tabella 5, dove si evince che, per le larve affette da prognatismo, vi è una differenza trascurabile tra i trattamenti 1 (controlli), 2 (LFR78, no *Artemia*) e 4 (LFR80, no *Artemia*), mentre è leggermente più alta la percentuale nei trattamenti 3 (LFR79, no *Artemia*) e 5 (LFR81, no *Artemia*), mentre i dati relativi alle malformazioni della spina dorsale sono trascurabili in quanto il numero riscontrato è decisamente basso.

4.5 Sopravvivenza

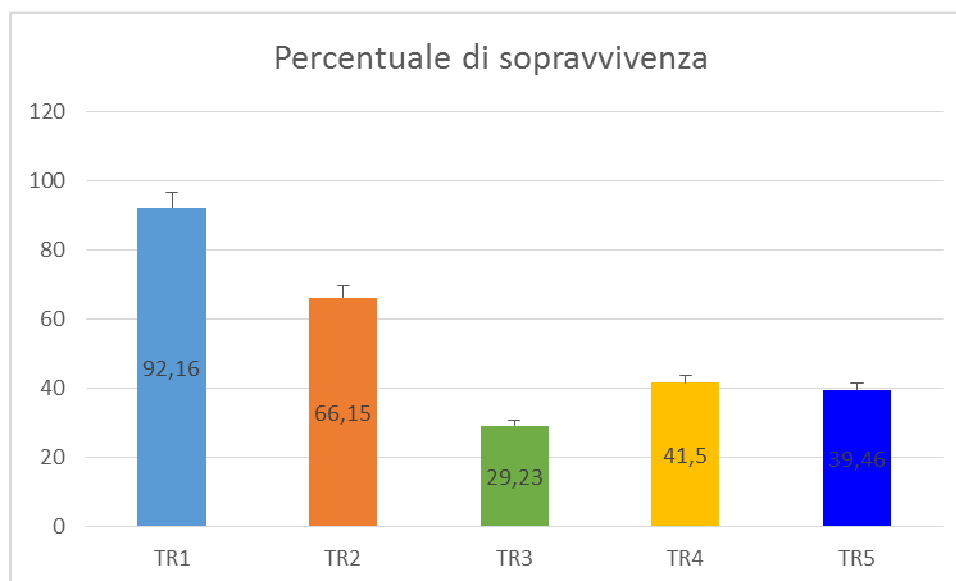
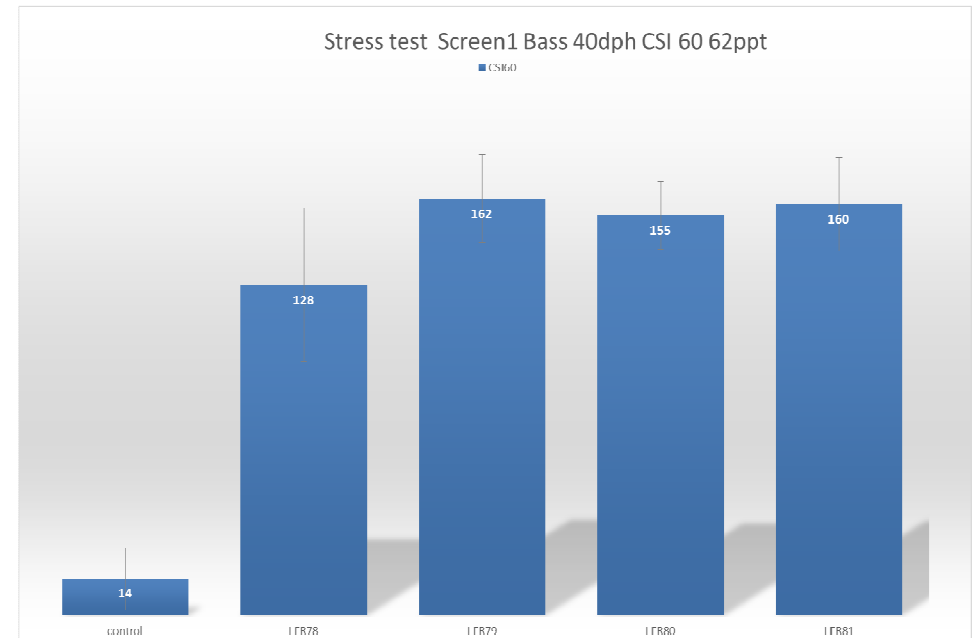
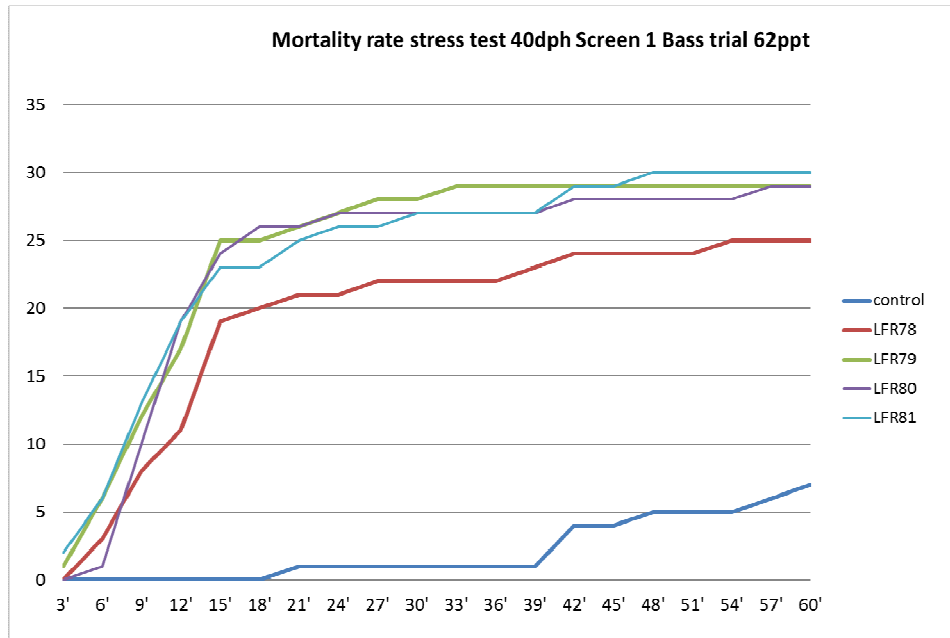


Grafico- Percentuali di sopravvivenza per ogni vasca dei 5 trattamenti e medie per ogni trattamento.

La sopravvivenza è stata calcolata sottraendo al numero iniziale di larve presenti in vasca il numero delle mortalità ricavato grazie al metodo della sifonatura eseguito durante i controlli giornalieri (vedi capitolo 3 paragrafo 5). Questi valori espressi in percentuale di sopravvivenza media per ogni trattamento (Grafico in alto), mostrano una percentuale molto più elevata nel trattamento standard (92,16%) rispetto agli altri trattamenti che non hanno ricevuto *Artemia*, e si nota che le larve del trattamento 2 (LFR78, no *Artemia*) hanno una sopravvivenza maggiore rispetto alle larve dei trattamenti 3, 4 e 5.

4.6 Risultati del Salinity stress test



I due grafici mostrano il tasso di mortalità e il numero complessivo di individui morti durante il salinity stress test, evidenziando una maggiore resistenza da parte degli individui sottoposti alla dieta standard, mentre gli individui sottoposti alla dieta sperimentale mostrano una resistenza piuttosto bassa.

5. Discussione e conclusioni

Dall'analisi dei dati si evince che il protocollo, che prevede una dieta standard (rotiferi, *Artemia*, O.range), risulta essere il più efficace.

Le vasche, sottoposte a questo trattamento, infatti hanno prodotto individui di maggior lunghezza e peso, nonché con un maggior tasso di sopravvivenza, rispetto a quelle sottoposte ai trattamenti sperimentali. Prendendo in considerazione le differenze osservate, alla fine della sperimentazione, si evince che la lunghezza standard (SL) e il peso umido (WW) e secco (DW) delle larve del trattamento di controllo sono significativamente maggiori rispetto a quella dei trattamenti che prevedevano una dieta sperimentale; per cui si può tranquillamente sostenere che una dieta alimentare standard che si basa sull'utilizzo di alimento vivo e inerte (O.range), è ancora quella più efficace per la produzione larvale di *Dicentrarchus labrax*.

Dall'analisi della varianza ANOVA per le lunghezze si evince la non significatività dei risultati solo a 14 dph, probabilmente perché le larve sottoposte ai trattamenti sperimentali (TR2, TR3, TR4, TR5) riescano a digerire gli alimenti grazie allo stimolo enzimatico indotto dalla fornitura dei rotiferi, che è avvenuta fino a 20 dph; infatti quando termina la fornitura di rotiferi, aumentano le differenze tra controlli e trattamenti.

Anche per quanto riguarda il peso si evince lo stesso andamento visto per le lunghezze standard (SL), quindi con valori più alti per il trattamento di controllo rispetto ai trattamenti sperimentali che non hanno fra loro differenze significative.

Le percentuali di deformità rilevate, non mostrano differenze significative tra i trattamenti, tali da far supporre che le cause possano essere attribuite alle differenze della dieta a cui sono state sottoposte le larve; per tanto le cause, probabilmente,

andrebbero ricercate in altri fattori come lo stress ambientale o attribuite a fattori genetici.

I dati relativi alla sopravvivenza mostrano una maggiore percentuale nelle larve sottoposte al TR1 (92,16%), una sopravvivenza intermedia per le larve del TR2 (62,15%) e decisamente più bassa nelle larve dei TR 3, 4 e 5 (29,23%, 41,5% e 39,46%). Tale differenza mostra evidentemente la maggior efficacia, anche in termini di sopravvivenza, del trattamento standard rispetto ai trattamenti che non hanno ricevuto *Artemia*.

I risultati del Salinity Stress Test indicano un'ottima resistenza delle larve sottoposte al trattamento di controllo a differenza di quelle sottoposte ai trattamenti sperimentali, che hanno una resistenza molto simile fra loro, a prova del fatto che un regime alimentare standard fornisca una resistenza maggiore agli stress. Questi risultati potrebbero suggerire che una dieta basata su un tipo di alimento artificiale non favorirebbe un corretto sviluppo a causa della mancanza di elementi fondamentali, causando quindi un'elevata mortalità oltre che una bassa resistenza agli stress.

Probabilmente la causa è da attribuire all'incapacità delle larve di digerire correttamente l'alimento inerte prima che lo stomaco avesse ultimato un corretto sviluppo, per cui questa sperimentazione conferma il fatto che una sostituzione totale di alimento vivo con uno inerte non è ancora possibile.

Sono necessari ulteriori miglioramenti nella tecnologia delle diete inerti per poter raggiungere dei risultati più soddisfacenti. Sono stati condotti numerosi studi in tale ambito, che però non hanno prodotto risultati eccellenti. È però possibile ottenere

buoni risultati dalla somministrazione in contemporanea di alimento vivo e inerte come per i controlli di questa sperimentazione.

In parallelo è stato condotto uno studio che testa la riduzione della somministrazione di *Artemia salina* nell'allevamento larvale di *Sparus aurata*, dallo studente della facoltà di Biologia marina dell'università di Pisa Mario Cuomo con la Tesi "Riduzione della somministrazione di *Artemia salina* nell'ambito dell'allevamento larvale di *Sparus aurata*".

Anche questo studio è stato portato avanti presso l'impianto "Maricoltura di Rosignano solvay, (Li) INVE aquaculture testing center",

In particolare l'obiettivo era quello di testare una somministrazione ridotta al 5% di *Artemia salina*, rispetto a circa il 40% utilizzato normalmente in una dieta standard, in due fasi di sviluppo: una precoce (da 18 a 33 dph) ed una successiva (da 28 a 37 dph).

Dai risultati si evince che il protocollo standard risulta essere il miglior regime alimentare per le larve di *S.aurata*, tuttavia le larve sottoposte alla riduzione di *Artemia* hanno mostrato un adeguato accrescimento rispetto alle percentuali assunte. Per cui potrebbe essere una potenziale via alternativa ad una dieta standard, facendo però le giuste valutazioni economiche, poiché si avrebbe sicuramente un minor costo di produzione di *Artemia* ma resta da capire se si possa comunque ottenere una produzione numerosa di larve che risulti essere anche di ottima qualità.

Mentre in uno studio condotto da Shansudin, Lokman, et al. "The potential of certain indigenous copepod species as live food for commercial fish larval rearing" si valutava la possibilità di utilizzare come alimento per le larve una specie alternativa ad *Artemia salina*, in particolare si valutava l'utilizzo di zooplancton che risultasse

essere facilmente reperibile e che avesse valori nutrizionali preferibili rispetto ad *Artemia*. Una specie di copepodi soddisfaceva tali requisiti, la specie *Oithona* sp., che infatti mostrava una facile reperibilità ed un ottimo rapporto di n-3 ed n-6 PUFA, rapporto che viene utilizzato come riferimento per poter classificare un alimento come potenziale mangime in acquacoltura ad alto valore nutrizionale, ed inoltre le dimensioni di tale specie sono molto simili ad *Artemia salina*.

L'utilizzo di copepodi come alimento vivo ridurrebbe inoltre la frequenza di deformità scheletriche e aumenterebbe la pigmentazione, la sopravvivenza ed il tasso di crescita durante il periodo di pre-svezzamento (Øiestad et al., 1985, Næss et al., 1995, Shields et al., 1999, Payne and Rippingale, 2000, Støttrup, 2000, Finn et al., 2002, Imsland et al., 2006, Koedijk et al., 2010, Liu and Xu, 2009, Busch et al., 2010 and Barroso et al., 2013). Rispetto all'alimento vivo più comunemente utilizzato, come rotiferi (*Brachionus* sp.) e *Artemia*, i copepodi sono superiori per quanto riguarda il contenuto di nutrienti essenziali (Watanabe et al., 1983 Witt et al., 1984 Evjemo et al., 2003, van der Meeren et al., 2008 e Hamre et al., 2013). Per questo motivo, vi è stato recentemente un crescente interesse nell'applicazione dei copepodi nell'allevamento delle larve di pesce.

Quindi sarebbe opportuno valutare se la produzione e l'utilizzo di copepodi nella dieta delle larve in ambito di allevamento risulterebbe essere economicamente vantaggioso rispetto al comune utilizzo di rotiferi e *Artemia*. Ad oggi nessuna coltura massiva di copepodi è stata portata a scala industriale, sono possibili solo piccole colture che non sono in grado di poter sostenere quantitativamente il fabbisogno produttivo di un impianto commerciale. Per questo ad oggi la sola coltura sostenibile qualitativamente e quantitativamente e a livello produttivo è quella di *Artemia*.

In definitiva serve una conoscenza più approfondita sul fabbisogno nutrizionale delle larve e sui metodi di produzione di alimento inerte o comunque di un alimento vivo che possa ridurre i costi attuali di produzione garantendo ugualmente una resa ottimale in termini di crescita, sopravvivenza e qualità.

6. Bibliografía

I. Abdel, E. Abellán, O. López-Albors, P. Valdés, M.J. Nortes, A. García-Alcázar,

“Abnormalities in the juvenile stage of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) reared at different temperatures: types, prevalence and effect on growth”

“Aquaculture International” November 2004, Volume 12, Issue 6, pp 523–538.

Boglione, C.; Marino, G.; Bertolini, B.; Rossi, A.; Ferreri, F.; Cataudella, S.

“Larval and postlarval monitoring in sea bass: morphological approach to evaluate finfish seed quality”, EAS Special Publication, (1993), 18: pp. 189-204.

Boglione C., Marino G., Fusari A., Ferreri F., Finoia M. G., Cataudella S. “Skeletal anomalies in *Dicentrarchus labrax* juveniles selected for functional swimbladder.” In ICES Marine Science Symposium 201, (1995): 163-169.

C. Boglione, C. Costa, P. Di Dato, G. Ferzini, M. Scardi, S. Cataudella.

“Skeletal quality assessment of reared and wild sharpsnout sea bream and pandora juveniles”, “Aquaculture” Volume 227, Issues 1–4, 10 November (2003), 373–394.

Cahu, C. L., & Zambonino-Infante, J.L. “Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109(2), (1994): 213-222.

Cahu C.L. & Zambonino-Infante J.L., “Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae” *Aquaculture* 200, (2001): 161-180.b

Chantal Cahu, José Zambonino Infante, Toshio Takeuchi. "Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae", *Aquaculture* Volume 227, Issues 1–4, (2003), 245–258.

Chatain B. "The swim bladder in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus auratus*, morphological aspects of development." *Aquaculture* (Netherlands), 53 (1986): 303-311

Chatain, B. (Station Experimentale d'Aquaculture IFREMER, Palavas-les-Flots (France), "The swimbladder in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus auratus*. II. Influence of development anomalies on larval growth. (1987)

Chatain B., Dewavrin G., "The effects of abnormalities in the development of the swim bladder on the mortality of *Dicentrarchus labrax* during weaning", *Aquaculture* Volume 78, Issue 1, (1989), 55-61.

Chatain B., Ounais-Guschemann N., "Improved rate of initial swimbladder inflation in intensively reared *Sparus aurata*." *Aquaculture* 84, (1990): 345–353.

Chatain B., "Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*)". *Aquaculture* 97, (1994): 169–180.

Conceição, L. E., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., & Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41(5), 613-640.

Coutteau P., I. Geurden, M.R. Camara, P. Bergot, P. Sorgeloos, “Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture”, *Aquaculture* Volume 155, Issues 1–4, (1997), 149-164.

Dabrowski K., “Ontogenetical aspects of nutritional requirements in fish” *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* Volume 85, Issue 4, (1986), 639-655.

Dhert P., Lavens P., Sorgeloos P., “Stress evaluation: a tool for quality control of hatchery-produced shrimp and fish fry” *Aquaculture Europe* 17(2), (1992): 6-10.

Divanach P., Boglione C., Menu M., Kounoundouros G., Kentouri M., Cataudella S., “Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions.” *Sea bass and Sea bream culture: problems and prospects* (1996): 45-66.

Divanach P., N. Papandroulakis, P. Anastasiadis, G. Koumoundouros, M. Kentouri, “Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase”, *Aquaculture* Volume 156, Issues 1–2, (1997), 145-155.

Ferrari, I., & Chierigato, A. R. “Feeding habits of juvenile stages of *Sparus auratus* L., *Dicentrarchus labrax* L. and *Mugilidae* in a brackish embayment of the Po River delta.” *Aquaculture*, 25(2), (1981): 243-257.

Geurden, I., P. Coutteau, and P. Sorgeloos. "Dietary phospholipids for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during first on-growing." *Larvi* 95 (1995): 175-178.

Govoni J.J., Boehlert G.W. & Watanabe Y., "The physiology of digestion in fish larvae." *Environmental Biology of Fishes* 16 (1986): 59-77.

Izquierdo, Maria S., et al. "Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids." *日本水産学会誌* 55.5 (1989): 859-867.

Johnson, D. W., and I. Katavic. "Mortality, growth and swim bladder stress syndrome of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae under varied environmental conditions." *Aquaculture* 38.1 (1984): 67-78.

Kanazawa A., "Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish." *Journal of the World Aquaculture Society* 24 (1993): 162–166.

Kihara, Minoru, et al. "Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity." *Aquaculture* 212.1 (2002): 149-158.

Kingsford, Michael J., Iain M. Suthers, and Charles A. Gray. "Exposure to sewage plumes and the incidence of deformities in larval fishes." *Marine Pollution Bulletin* 33.7 (1996): 201-212.

Koumoundouros G., Oran G., Divanach P., Stefanakis S., Kentouri M. "The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description." *Aquaculture*, 156(1), (1997a): 165-177.

Koumoundouros G., Gagliardi F., Divanach P., Boglione C., Cataudella S., Kentouri M. "Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry." *Aquaculture*, 149(3), (1997b): 215-226.

Koumoundouros G., Pavlidis M., Anezaki L., Kokkari C., Sterioti A., Divanach P., Kentouri M. "Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*: critical sensitive ontogenetic phase." *Journal of Experimental Zoology*, 292(6), (2002): 573-579.

Koumoundouros, G., et al. "The rearing of common dentex *Dentex dentex* (L.) during the hatchery and on-growing phases." *Aquaculture* 240.1 (2004): 165-173.

Koven, W. M., et al. "The association of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the main phospholipids of different-age *Sparus aurata* larvae with growth." *Aquaculture* 116.1 (1993): 71-82.

Koven W.M., Kolkovski S., Hadas E., Gamsiz K., Tandler A. "Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review." *Aquaculture* 194(1) (2001a): 107-121.

Kužir, S., Kozarić, Z., Nejedli, S. (2004). Development of mandibular arch in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) from the "Cenmar" hatchery, Croatia.. *Veterinarski arhiv*, 74(5), 321-330.

Langdon, J. S. "Spinal curvatures and an encephalotropic myxosporean, *Triangula percae* sp. nov.(Myxozoa: Ortholineidae), enzootic in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., in Australia." *Journal of Fish Diseases* 10.6 (1987): 425-434.

Lavens, Patrick, and Patrick Sorgeloos. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. No. 361. Food and Agriculture Organization (FAO)., 1996.

Lazo, Juan P., et al. "Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*)." *Aquaculture* 188.3 (2000): 339-351.

Lemly, A. Dennis. "Metabolic stress during winter increases the toxicity of selenium to fish." *Aquatic Toxicology* 27.1 (1993): 133-158.

Lom, J., and I. Dyková. "Scanning electron microscopic revision of common species of the genus *Chloromyxum* (Myxozoa: Myxosporea) infecting European freshwater fishes." *Folia Parasitologica* 40 (1993): 161-161.

Mahajan, C. L., and N. K. Agrawal. "The role of vitamin C in calcium uptake by fish." *Aquaculture* 19.3 (1980): 287-294.

Makridis, P., Reitan, K. I., & Olsen, Y. (1997). Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 153(1), 103-122.

Makridis, P., & Olsen, Y. (1999). Protein depletion of the rotifer *Brachionus plicatilis* during starvation. *Aquaculture*, 174(3), 343-353.

Mazurais, D., Glynatsi, N., Darias, M. J., Christodouloupoulou, S., Cahu, C. L., Zambonino-Infante, J. L., & Koumoundouros, G. (2009). Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. *Aquaculture*, 294(3), 262-270.

Moffatt, Nancy M. "Survival and growth of northern anchovy larvae on low zooplankton densities as affected by the presence of a *Chlorella* bloom." *RappP-VRéunConsint Explor* 178 (1981): 475-480.

Morretti, Alessandro. *Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream*. Vol. 1. Food & Agriculture Org., 1999.

Muramoto, S. (1981). Vertebral column damage and decrease of calcium concentration in fish exposed experimentally to cadmium. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 24(2), 125-133.

Naas K., Huse I., Iglesias J., "Illumination in first feeding tanks for marine fish larvae." *Aquacultural Engineering* 15 (4), (1996): 291–300.

Naas, K. E., Næss, T., & Harboe, T. (1992). Enhanced first feeding of halibut larvae. *Hippoglossus hippoglossus*.

Nicolàs J.L., Robic E., Ansquer D., "Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival." *Aquaculture* 83 (1989): 237–248.

Olsen, R. E., R. J. Henderson, and T. Pedersen. "The influence of dietary lipid classes on the fatty acid composition of small cod *Gadus morhua* L. juveniles reared in an enclosure in northern Norway." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 148.1 (1991): 59-76.

Olsen, A. I., Olsen, Y., Attramadal, Y., Christie, K., Birkbeck, T. H., Skjermo, J., & Vadstein, O. (2000). Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, 190(1), 11-25.

Péres A., Cahu C., Zambonino-Infante J.L., Le Gall M.M., Quazuguel P., "Amylase and trypsin response to dietary carbohydrate and protein level depends on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae." *Fish Physiology and Biochemistry*, 15 (1996): 237-242.

Person-Le Ruyet J., Alexandre J.C., Thpbaud L., Mugnier C., “Marine fish larvae feeding. Formulated diets or live prey?” *Journal of the World Aquaculture Society* 24, (1993): 211 –224.

Planas, M., & Cunha, I. (1999). Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177(1), 171-190.

Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Øie, G., & Olsen, Y. (1997). A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155(1), 207-221.

Rønnestad, Ivar, Anders Thorsen, and Roderick Nigel Finn. "Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids." *Aquaculture* 177.1 (1999): 201-216.

Salhi, M., Hernández-Cruz, C. M., Bessonart, M., Izquierdo, M. S., & Fernández-Palacios, H. (1999). Effect of different dietary polar lipid levels and different n- 3 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 179(1), 253-263.

Sargent, J. R., Bell, J. G., Bell, M. V., Henderson, R. J., & Tocher, D. R. (1993). The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. *Aquaculture: Fundamental and Applied Research*, 103-124.

Sargent J., Bell G., McEvoy L., Tocher D. & Estevez A. “ Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish.” *Aquaculture* 177, (1999): 191–199.

Sfakianakis D.G., Koumoundouros G., Divanach P., Kentouri M. "Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities." *Aquaculture*, 232(1), (2004): 407-424.

Sfakianakis D.G., Georgakopoulou E., Papadakis I.E., Divanach P., Kentouri M., Koumoundouros G., "Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)." *Aquaculture* 254.1 (2006): 54-64.

Sheridan, Mark A. "Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 90.4 (1988): 679-690.

Skjermo, Jorunn, and Olav Vadstein. "Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae." *Aquaculture* 177.1 (1999): 333-343.

Underwood A. J. *Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance*. Cambridge University Press, (1997).

Van Leeuwen, C. J., A. Espeldoorn, and F. Mol. "Aquatic toxicological aspects of dithiocarbamates and related compounds. III. Embryolarval studies with rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." *Aquatic toxicology* 9.2-3 (1986): 129-145.

Vetter, R. D., Hodson, R. E., & Arnold, C. (1983). Energy metabolism in a rapidly developing marine fish egg, the red drum (*Sciaenops ocellata*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(5), 627-634.

Villeneuve L., Gisbert E., Zambonino-Infante J.L., Quazuguel P., Cahu C.L. "Effect of nature of dietary lipids on European sea bass morphogenesis: implication of retinoid receptors." *British journal of nutrition*,94(06), (2005a): 877-884.

Villeneuve L., Gisbert E., Delliou H.L., Cahu C.L., Zambonino-Infante J.L. "Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae." *British Journal of Nutrition*, 93(6), (2005b): 791-802.

Watanabe, T., & Kiron, V. (1994). Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture*, 124(1), 223-251.

Woolley, Lindsey D., and Jian G. Qin. "Swimbladder inflation and its implication to the culture of marine finfish larvae." *Reviews in Aquaculture* 2.4 (2010): 181-190.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Peres, A., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., "Sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae fed different *Artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions." *Aquaculture* 139, (1996): 129–138.

Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., Peres, A. "Partial substitution of native protein by di- and tripeptides in diet improves sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development." *The Journal of Nutrition*, 127 (1997): 608-614.

Zambonino-Infante J.L. & Cahu C.L. "Effect of nutrition on marine fish development and quality" *Recent Advances in Aquaculture Research* (2010): 103-124.