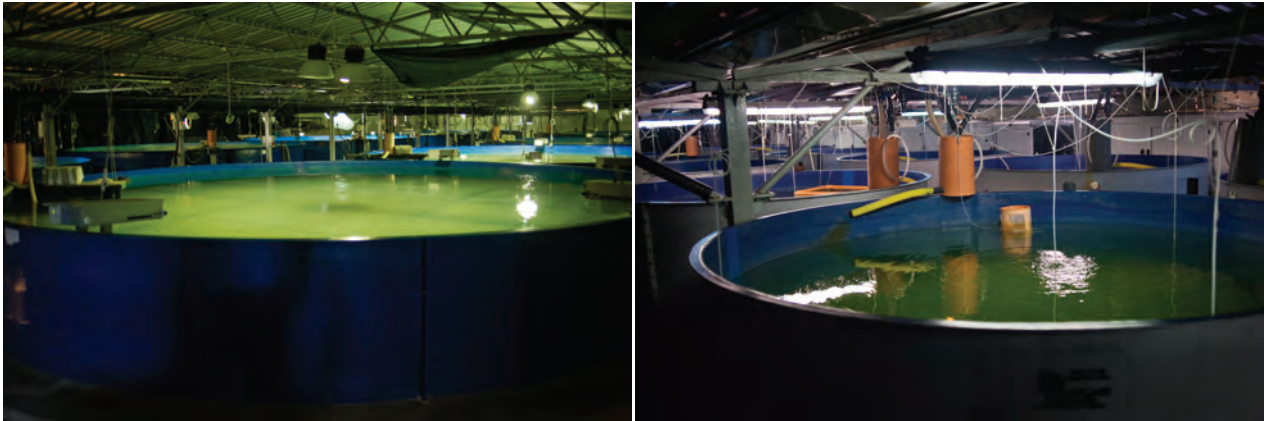




Università degli studi di Roma “Tor Vergata”  
Dipartimento di Biologia

**PRODUZIONI SEMINTENSIVE DI GIOVANILI DI SPECIE MARINE DA ACQUACOLTURA BIOLOGICA  
(Sparus aurata come caso di studio)**

**Acronimo: PROSEGAB  
Relazione finale**



Gennaio 2013

Prof. Stefano Cataudella  
Responsabile Scientifico

## ***Ringraziamenti***

*Un particolare ringraziamento va riservato all'Acquacoltura Lampedusa srl che, oltre le prestazioni rese nell'ambito del progetto, ha messo a disposizione la propria esperienza maturata nel corso degli anni nell'allevamento larvale in Grandi Volumi.*

## *Sommario*

<b>Partecipanti al programma di ricerca</b> .....	<b>4</b>
<b>Premessa</b> .....	<b>5</b>
<b>Breve sintesi del Programma di Ricerca</b> .....	<b>7</b>
<b>Relazione scientifica</b> .....	<b>10</b>
<b>WP1: Impostazione delle modalità sperimentali (Obiettivo A)</b> .....	<b>10</b>
<b>WP1.1 Ottenimento di uova da riproduttori biologici (obiettivo A.1)</b> .....	<b>10</b>
<b>WP1.2 Impostazione delle condizioni di allevamento larvale in condizioni biologiche (Obiettivo B.2)</b> .....	<b>11</b>
WP1.2.1 Razionale .....	11
WP1.2.2 Il contesto fisico.....	11
WP1.3 Proposta di un protocollo di allevamento larvale in condizioni biologiche.....	13
<b>WP2: Verifica dell'applicabilità di un protocollo di alimentazione biologica a riproduttori di specie ittiche marine eurialine (Obiettivo A)</b> .....	<b>16</b>
Riproduttori.....	16
<b>WP3: Contributo alla costruzione di un protocollo per avannotterie biologiche di specie ittiche marine eurialine (Obiettivo A)</b> .....	<b>17</b>
<b>WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci (Obiettivo B)</b> .....	<b>24</b>
<b>WP4.1 Messa a punto del monitoraggio "multidimensionale" di controllo</b> .....	<b>24</b>
WP4.1.1 Analisi degli effetti dell'alimentazione (biologica vs. convenzionale) dei riproduttori sulla qualità delle uova (attività B1).....	24
WP4.1.2 Analisi degli effetti dell'alimentazione (biologica vs. convenzionale) e delle condizioni di allevamento (biologiche vs intensive) sulla forma e anomalie scheletriche in larve e giovanili .....	28
WP4.1.3 Analisi degli effetti dell'alimentazione (biologica vs. convenzionale) e delle condizioni di allevamento (biologiche vs intensive) su alcuni parametri fisiologici .....	48
<b>WP4.2 Costruzione di un modello sintetico dei descrittori morfologici relativi allo sviluppo per l'identificazione/descrizione/sintesi di un protocollo di allevamento larvale "biologico" (Obiettivi A.3, B.4 e C)</b> .....	<b>64</b>
<b>WP4.3 Valutazione dei risultati ottenuti in conformità agli obiettivi del programma di ricerca</b> .	<b>70</b>
WP4.3.1 Valutazione del set di dati (obiettivo generale A).....	70
<b>Eventuali scostamenti tra gli obiettivi proposti e quelli conseguiti</b> .....	<b>83</b>
<b>Raccomandazioni che emergono dal programma di ricerca</b> .....	<b>85</b>
<b>Bibliografia citata</b> .....	<b>87</b>
<b>Allegato 1</b> .....	<b>91</b>
1.1) certificato ISO 22000 .....	91
1.2) certificato Global G.A.P. (Good Agricultural Practice) .....	92

1.3)	certificato di approvazione per le produzioni biologiche .....	93
1.4)	scheda tecnica del mangime Ecolife Pearl 864 .....	94
<b>Allegato 2</b>	.....	<b>95</b>
2.1:	Parametri chimici e fisici rilevati durante la fase di allevamento larvale .....	95
2.2:	Parametri chimici e fisici rilevati durante la fase di preingrasso .....	99
<b>Allegato 3</b>	.....	<b>101</b>
3.1:	Frequenze relative di anomalie osservate e di individui risultati affetti da ciascuna tipologia malformativa nella fase di avannotteria.....	101
3.2:	Frequenze relative di anomalie osservate e di individui risultati affetti da ciascuna tipologia malformativa nella fase di preingrasso.....	102

Partecipanti al programma di ricerca

COGNOME E NOME	TITOLO DI STUDIO	QUALIFICA PROFESSIONALE	ENTE DI APPARTENENZA	FUNZIONE NEL PROGRAMMA
Stefano CATAUDELLA	Laurea in Sc. Biologiche	Professore Ordinario Ecologia	Univ. 'Tor Vergata'	Responsabile Scientifico
Michele SCARDI	Laurea in Sc. Biologiche	Professore Associato Ecologia	Univ. 'Tor Vergata'	Analisi dei dati
Clara BOGLIONE	Laurea in Sc. Biologiche	Ricercatore Ecologia	Univ. 'Tor Vergata'	Coordinamento Analisi della qualità morfologica di uova, larve e giovanili
Irene FERRANTE	PhD in Biologia Evoluz. ed Ecologia	Vincitore assegno di ricerca PROSEGAB	Univ. 'Tor Vergata'	Indicatori stress ossidativo – valori ematici - valutazione del grado di immunocompetenza
Valerio VITALINI	Laurea Magistrale in Ecologia ed Evoluzione	Vincitore borsa di studio PROSEGAB	Univ. 'Tor Vergata'	Campionamenti - Assistenza durante la fase sperimentale
Riccardo CAPRIOLI	PhD in Biologia Evoluz. ed Ecologia	Tecnico laureato	Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise"G. Caporale"	<i>Campionamenti- Assistenza durante la fase sperimentale</i>
Domitilla PULCINI	PhD in Biologia Evoluz. ed Ecologia	Borsa di studio	Univ. 'Tor Vergata'	Analisi della forma
Tommaso RUSSO	PhD in Biologia Evoluz. ed Ecologia	Ricercatore TD	Univ. 'Tor Vergata'	Analisi dei dati
Loredana PRESTINICOLA	PhD in Biologia Evoluz. ed Ecologia	Assegno di ricerca	Univ. 'Tor Vergata'	Analisi della qualità morfologica (anomalie degli elementi scheletrici)
Alessandra FIANCHINI	Diploma	Tecnico di laboratorio	Univ. 'Tor Vergata'	Campionamenti; analisi di laboratorio
Maurizio FRAZIANO	Laurea in Medicina	Ricercatore Patologia Generale	Univ. 'Tor Vergata'	Valutazione del grado di immunocompetenza
Emanuela GRECO	PhD in Immunologia	Assegno di ricerca	Univ. 'Tor Vergata'	Valutazione del grado di immunocompetenza
Viviana MERCURI	Tesinista	Studentessa laurea triennale	Univ. 'Tor Vergata'	Analisi della qualità morfologica
Davide PESSOLANO	Tesista	Studente laura magistrale	Univ. 'Tor Vergata'	Analisi della qualità morfologica
Elena ORBAN	Laurea in Sc. Biologiche	Dirigente di ricerca	INRAN	Analisi della frazione lipidica nelle uova, larve e giovanili
Andrea CONSIGLIO	Diploma	Dirigente	Acquacoltura Lampedusa s.r.l.	Gestione della fase sperimentale
Marcello BRANCATO	Diploma	Segretario Amministrativo	Univ. 'Tor Vergata'	Assistenza amministrativa – rendicontazioni
Arteo CIANCARELLI	Diploma	Tecnico Amministrativo	Univ. 'Tor Vergata'	Evasione ordini
Giordana DI ERMENEGILDO	Diploma	Tecnico Amministrativo	Univ. 'Tor Vergata'	Rendicontazione finale

## Premessa

Il progetto riguarda la messa a punto di nuove tecnologie e strategie produttive per l'acquacoltura biologica, con particolare riferimento alla produzione di giovanili biologici di specie ittiche marine eurialine (specie tipo: *Sparus aurata*). In particolare, l'attività di ricerca è stata focalizzata sulla valutazione degli effetti delle densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili, della qualità dell'alimentazione dei riproduttori e l'identificazione di descrittori integrati, multidisciplinari in grado di descrivere in modo sintetico ma comprensivo il livello di qualità (morfologica, anatomica e fisiologica) di larve e giovanili.

Entrando più in dettaglio, il soggetto della ricerca si riferisce dunque all'argomento *a)* come definito nell'Art.1 del Decreto emesso dal Capo Dipartimento delle Politiche Competitive del Mondo Rurale e della Qualità relativamente a progetti scientifici, sperimentali e tecnici finalizzati alle produzioni biologiche e rispondenti alle priorità evidenziate nel "Programma di Azione nazionale per l'agricoltura biologica e i prodotti biologici per gli anni 2008-2009". Più in particolare, la ricerca era intesa alla produzione di attività di ricerca atte a sopperire le carenze di conoscenza nella materia che il programma vuole affrontare, con particolare riferimento al Regolamento CE 710/2009 che nelle considerazioni che lo contestualizzano al punto (9) riporta: *"Poiché la produzione di animali di acquacoltura biologica è appena agli esordi, non si dispone ancora di riproduttori biologici in quantità sufficiente. Si deve consentire, a determinate condizioni, l'introduzione di riproduttori e novellame non biologici."* e nell' Articolo 25 sexies (Origine e gestione degli animali di acquacoltura non biologici), comma 1 recita: *"A fini riproduttivi o per migliorare il patrimonio genetico e in mancanza di animali di acquacoltura biologici, possono essere introdotti in un'azienda animali selvatici catturati o animali di acquacoltura non biologici. Questi animali sono allevati in regime di produzione biologica per almeno tre mesi prima di essere utilizzati per la riproduzione."*

Inoltre, per quanto riguarda il settore avannotteria, gli unici elementi di regolazione della produzione di giovanili contenuti nel regolamento sono i seguenti:

*Articolo 25 sexies, comma 2:* A fini di ingrasso e in mancanza di novellame biologico, può essere introdotto in un'azienda del novellame non biologico. Almeno gli ultimi due terzi del ciclo di produzione si svolgono in regime di produzione biologica.

*comma 3:* La percentuale massima di novellame non biologico introdotto nell'allevamento è pari all'80 % entro il 31 dicembre 2011, al 50 % entro il 31 dicembre 2013 e allo 0 % entro il 31 dicembre 2015.

*comma 4:* La raccolta di novellame selvatico a fini di ingrasso è tassativamente limitata ai seguenti casi:

- a) immissione spontanea di larve e di avannotti di pesci o di crostacei al momento del riempimento degli stagni, degli impianti di contenimento e dei recinti;
- b) anguilla ceca europea, a condizione che sia stato approvato un piano di gestione dell'anguilla per il sito interessato e che la riproduzione artificiale dell'anguilla rimanga impraticabile.

Da quanto finora esposto, risulta necessario superare la fase pionieristica e mettere a punto, utilizzando le basi scientifiche disponibili, tecniche di allevamento dei giovanili che rispondano ai principi generali della produzione biologica, enunciati negli art. 4 e 5 del Reg. CE n.834/2007. Ciò, oltre a consentire una migliore risposta ai principi considerati, potrebbe restituire alle imprese, che avranno un atteggiamento proattivo, di disporre di strumenti competitivi ulteriori per rinforzare i propri sistemi di certificazione. Ad esempio, appare contraddittorio pensare ad un allevamento biologico che costringa i giovanili a densità elevatissime, a trattamenti continui con farmaci, che avvii all'ingrasso soggetti talvolta anomali come conseguenza di uno sviluppo (differenziamento e crescita) avvenuto in condizioni ambientali sostanzialmente differenti da

quelli in cui si svolgono i cicli naturali. Caratteristiche come la disponibilità di planctonti naturali e prede vive in generale, ambienti caratterizzati da forte idrodinamismo, l'aggregazione in branchi discreti sono alla base dell'ecologia di spigola ed orata nelle fasi giovanili precoci, naturalmente con le diversità specifiche ben note. L'allevamento intensivo nelle moderne avannotterie ha teso, nelle fasi pionieristiche, ad utilizzare piccoli volumi ed elevatissime densità, per logiche facilmente comprensibili ed economicamente giustificabili. Oggi si tende ad operare in volumi più grandi, anche se con densità elevate. Ciò perché si è evidenziata nel tempo la stretta relazione tra densità e qualità prodotta, naturalmente a parità di capacità gestionali.

Negli ultimi venti anni si è sviluppata una linea di pensiero che sotto l'etichetta di "acquacoltura ecologica" ha anticipato in parte i principi dell'acquacoltura biologica. L'esigenza nasceva dalla necessità di produrre giovanili da ripopolamento in ambienti di tipo naturale (Valli salse da pesca e lagune costiere), dove tradizionalmente si ripopolava (e lo si fa ancora in parte) con novellame raccolto stagionalmente in natura.

Per la produzione di tali giovanili sono stati messi a punto sistemi semi-intensivi in grandi volumi, dotati di idrodinamismo, con diete naturali integrative. Gli effetti di tali modalità di allevare sono stati monitorati utilizzando descrittori morfologici, genetici e comportamentali, permettendo così di disporre oggi di una modalità di caratterizzazione affidabile per identificare pesci allevati in grandi spazi "come selvatici". Va anche ricordato che nella prospettiva di recupero futuro di competitività, tali produzioni, con opportune ottimizzazioni nel controllo della diversità genetica, potrebbero essere utilizzate per il ripopolamento in mare, aprendo nuove prospettive, tutte naturalmente da valutare sul piano scientifico e normativo.

Con riferimento ai principi esposti nelle COM 2009/162 e COM 2009/163, acquacoltura e pesca dovranno affrontare una nuova fase di riforma verso la nuova Politica Comune della Pesca (PCP). Lo stato degli stock ittici e la sproporzione tra la crescita dell'acquacoltura europea rispetto a quella mondiale sono due indicatori di basso successo delle politiche attuate. Lo sviluppo dell'acquacoltura biologica nell'UE (Reg. CE 710/2009) può rappresentare una nuova opportunità competitiva per le produzioni ittiche: i consumatori europei, infatti, tendono a un crescente consumo di prodotti biologici. In particolare, le produzioni ittiche italiane che si caratterizzano per un'elevata qualità, e che quindi già spuntano migliori prezzi per qualità e per vicinanza ai mercati, possono trovare nel biologico un'altra nicchia di mercato. Nello specifico, la sperimentazione di protocolli per la produzione di giovanili di specie marine con tecniche semi-intensive e la costruzione di un sistema di indicatori sulla qualità dei giovanili prodotti può avere due ricadute positive attese, uno a livello delle politiche pubbliche, l'altro per la competitività delle imprese, come già considerato. Dal punto di vista pubblico, pesci allevati con tecniche più vicine alle esigenze della specie, con sistemi di misura che ne garantiscano le performances, hanno potenziali importanti per futuri programmi di ripopolamento e minori rischi in caso di fuga. Tra gli altri benefici, possiamo considerare gli effetti sul benessere e sulla salute animale lungo tutto il ciclo produttivo, partendo da giovanili realmente "biologici".

## Breve sintesi del Programma di Ricerca

Questo programma di ricerca, intitolato “*PRODUZIONI SEMINTENSIVE DI GIOVANILI DI SPECIE MARINE DA ACQUACOLTURA BIOLOGICA (Sparus aurata come caso di studio)*” ha visto la creazione di due gruppi di riproduttori di orata, dei quali uno è stato alimentato nei tre mesi precedenti la stagione riproduttiva con una dieta definita come “convenzionale” (OC1), fornita di routine ai riproduttori di orata nel periodo preriproduttivo, a base di gamberi ed alaccie congelate e sminuzzate, mentre all’altro gruppo, formato da riproduttori destinati al protocollo biologico (OB1), è stato somministrato un mangime commerciale certificato come biologico. Mancando in commercio mangimi biologici per riproduttori di orata, si è deciso di utilizzare un mangime biologico messo a punto per l’ingrasso. La dieta biologica, la cui composizione in acidi grassi, sia qualitativa che quantitativa, non è stata fornita dal produttore, è stata ben accettata dai riproduttori. La somministrazione delle due diete in parallelo è iniziata il 17 ottobre 2011 e fin dal 16 dicembre entrambi i lotti hanno iniziato a deporre uova fecondate.

L’analisi delle uova ha evidenziato tassi di schiusa, peso medio dell’uovo, diametro medio del tuorlo e larghezza dello spazio perivitellino inferiori nelle uova provenienti da genitori alimentati con dieta biologica. Le dimensioni ridotte delle uova biologiche sono dovute a una minore quantità di tuorlo in esse contenuta. Il tenore lipidico, la quantità di colesterolo (ingrediente essenziale della membrana cellulare di tutte le cellule animali dove svolge un ruolo attivo nella regolazione della permeabilità delle membrane, degli scambi di sostanze messaggere, della crescita e divisione cellulare, oltre a rappresentare la sostanza base per la sintesi degli ormoni steroidei e per la produzione di bile), di squalene (un idrocarburo e un triterpene presente in grosse quantità nell’olio di fegato degli squali ma anche nei vegetali come i semi di amaranto, crusca di riso, germe di grano e olive) e  $\alpha$ -tocoferolo (Vitamina E) è risultata più elevata nelle uova biologiche, mentre il tenore lipidico era maggiore nelle uova convenzionali.

L’analisi della composizione (%) in acidi grassi delle uova alla deposizione ha evidenziato porzioni maggiori di acido linoleico,  $\alpha$ -linolenico, eicosapentaenoico (EPA) e tassi maggiori EPA/ARA e EPA/DHA nelle uova biologiche. Le uova ottenute da riproduttori alimentati con diete convenzionali, a loro volta, esprimevano maggiori percentuali di acido oleico, arachidonico e docosaesaenoico (DHA). Nei pesci, come negli altri vertebrati, un normale sviluppo e crescita richiedono in particolare la presenza nella dieta fornita di acido docosaesaenoico (DHA, 22:6n-3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e arachidonico (ARA, 20:4n-6) le cui funzioni cellulari e fisiologiche cadono in due categorie principali: a) un ruolo generico nel mantenimento dell’integrità strutturale e funzionale delle membrane cellulari; b) un ruolo più specifico come precursori di eicosanoidi, un gruppo di ormoni paracrini altamente attivi biologicamente (Sargent et al. 1999). La dieta commerciale biologica offerta ai riproduttori biologici ha evidenziato alcune carenze nutrizionali, quindi, che hanno causato un minor accumulo di tuorlo, e quindi dimensioni inferiori, nelle uova biologiche. ***Pertanto, in relazione all’obiettivo A.2 del programma di ricerca, si è evidenziata la necessità di formulare diete commerciali biologiche più idonee per la fase pre-riproduttiva dell’orata, al fine di poter ottenere uova della stessa qualità morfologica e contenuto di acidi grassi insaturi essenziali delle uova ottenute con le diete tradizionali.***

Il 29 febbraio è stato dato l’avvio alla fase sperimentale seguente che prevedeva l’allevamento in condizioni ‘convenzionali’ e in condizioni sperimentali biologiche delle larve schiuse da entrambi i lotti di riproduttori. Il sistema di allevamento proposto è quello dei Grandi Volumi (*sensu* Cataudella et al., 2002). Si tratta di un sistema controllato, sviluppato per ricreare il più possibile le condizioni ambientali presenti nelle aree di nursery naturali, con particolare attenzione posta alle condizioni idrodinamiche ed alle densità. Questo approccio è basato sull’utilizzo di vasche circolari di grandi dimensioni (60 m<sup>3</sup> di volume, 8 m di diametro, 1.2 m in altezza), gestite con metodologia



semi-intensiva, a basse densità (*sensu* Shields, 2001). Il particolare idrodinamismo ricreato nelle vasche e le basse densità di allevamento rendono le vasche di allevamento dei mesocosmi ecologici (Beyers & Odum, 1993), nei quali le condizioni delle nursery naturali (idrodinamismo diversificato e le basse densità) vengono simulate, per quanto possibile in condizioni di confinamento (Boglione et al., 2001). Ovviamente, la somministrazione di prede vive ottenute da colture parallele di rotiferi (*Brachionus plicatilis*) e *Artemia sp.* (nauplii, metanauplii e adulti) viene comunemente effettuata, ad una concentrazione tale da mantenere la densità ottimale di prede per le larve. Di importanza strategica è la presenza di un idrodinamismo differenziale all'interno della vasca, che viene stabilito grazie all'utilizzo di particolari air-lifter o ossigenatori che assicurano l'aerazione dell'acqua e la generazione di flussi differenziali nell'ambiente di crescita delle larve (più veloci verso il centro della vasca, più lenti verso i bordi), in modo tale che le larve possano scegliere quello più idoneo alle loro condizioni ontogenetiche.

A partire dalla fine di aprile, inizio maggio 2012, le orate sono state quindi avviate alla fase di svezzamento al mangime artificiale, che si è completato il 20 giugno 2012 (ormai oltre la durata del progetto). Vista la ridotta quantità di tempo a disposizione del progetto (18 mesi) e le necessità produttive dell'azienda che ci ha ospitato (che hanno necessariamente limitato le operazioni sperimentali) si è ritenuto necessario non procedere con la fase di preingrasso (prevista dal progetto) ma di fermare la sperimentazione alla fase di svezzamento.

Sia le uova che le larve, provenienti da qualsiasi origine e tecnica di allevamento larvale applicata, sono state quindi oggetto di una serie di analisi produttive (tasso di schiusa, sopravvivenza, crescita), morfologiche (diametro e peso dell'uovo, diametro e spazio perivitellino; analisi della forma; incidenza e tipologia di anomalie scheletriche; variazioni nelle conte meristiche) e fisiologiche (livelli di ROI *Reactive Oxygen Intermediates*; alcuni indicatori ematici di stress; composizione in acidi grassi dei tessuti dei pesci) ed i risultati analizzati.

I campionamenti effettuati alla fine della fase di svezzamento mostrano che tutti i campioni che avevano sperimentato l'allevamento larvale biologico (Grandi Volumi) mostrano sempre valori di LS e peso molto maggiori di quelli allevati in condizioni intensive.

I risultati ottenuti in questo programma di ricerca hanno evidenziato livelli più elevati di trigliceridi nelle uova da genitori convenzionali, nelle orate allevate nella fase larvale in condizioni intensive (a prescindere della dieta fornita ai riproduttori) e campionate a 60 giorni e, a 111 gds, nei giovanili provenienti da uova biologiche e allevamento in Grandi Volumi e quelli da uova convenzionali ed allevati in intensivo durante la fase larvale. Il valore massimo (223,77 mg/dL) è stato osservato nel lotto di 60 gds da uova biologiche ed allevato in condizioni intensive, mentre quello più basso nei giovanili di 111 gds provenienti da genitori convenzionali ed allevati in Grandi Volumi. Notevole è la differenza osservata nel contenuto in trigliceridi nelle uova biologiche ed in quelle convenzionali, dove in queste ultime sono stati rilevati livelli due volte superiori (98,23 vs 202,28), confermando quanto osservato da Goto et al. in orata giapponese. L'andamento dei trigliceridi rilevato in questo studio ha evidenziato un aumento dei livelli alla fine della fase larvale in tutti i lotti (compresi quelli provenienti da uova biologiche, che raggiungono gli stessi livelli presenti nelle orate provenienti da uova convenzionali) per poi quasi dimezzarsi alla fine della fase di svezzamento al mangime artificiale.

Per quanto riguarda il glucosio, i dati relativi ai campioni all'uscita dall'avannotteria (i soli che mostravano valori superiori al limite di lettura dello strumento) non mostravano differenze sostanziali tranne per il lotto costituito da orate provenienti da uova convenzionali ed allevate in Grandi Volumi, che aveva il valore più basso misurato (29,62 vs  $\approx$  43 mg/dL degli altri lotti).

Il livello di proteine totali (g/dL) nel plasma è risultato più elevato alla fine della fase sperimentale (non essendo rilevabile negli stadi precedenti) in tutti i lotti che avevano sperimentato condizioni intensive larvali, a prescindere dalla tipologia delle uova da cui erano schiuse le larve.

L'andamento dei livelli di cortisolo rilevati non ha mostrato un chiaro trend: le uova biologiche ne presentavano un livello doppio di quello rilevato nelle convenzionali, ma questo effetto materno non è stato più osservato nelle larve o nei giovanili.

L'analisi delle anomalie scheletriche nei 4 lotti ha sempre evidenziato frequenze di individui con anomalie gravi (quelle cioè che alterano la forma esterna del pesce) quasi doppie nei lotti allevati in condizioni intensive nella fase larvale. Tale differenza si mantiene anche nella fase di svezzamento, dove l'effetto densità e volumi a disposizione delle orate non era più presente.

L'applicazione di tecniche di classificazione gerarchica di alcuni descrittori di stato e di processo che sono alla base della identificazione/descrizione/sintesi di un protocollo di allevamento larvale "biologico" hanno evidenziato come i descrittori morfologici siano quelli che rispondono maggiormente ed in modo univoco alle condizioni di allevamento (dieta dei riproduttori, modalità di allevamento larvale) ed ha permesso di identificare 4 su 42 tipologie malformative come quelle capaci di identificare i lotti con morfologia simile al selvatico.

## Relazione scientifica

Le attività svolte vengono di seguito riportate per ogni *Working Package* (WP) descritto nella proposta di finanziamento.

Per favorire la lettura, sotto ogni intestazione dei vari WP è stato riportato il rationale e gli obiettivi che lo sottintendevano (così come riportato nel programma approvato), in corsivo.

### WP1: Impostazione delle modalità sperimentali (Obiettivo A)

*Le attività previste sono di supporto al raggiungimento dell'obiettivo A, in particolare A.1 (ottenimento di uova da riproduttori biologici) e B.2 (allevamento larvale e dei giovanili in condizioni biologiche e intensive). A tal fine occorre predisporre le condizioni di allevamento per poter disporre di riproduttori definiti biologici secondo le norme contenuto nel Regolamento CE 710/2009 che prevedono un allevamento in regime di produzione biologica per almeno tre mesi prima dell'utilizzo per la riproduzione. Pertanto in questa fase, oltre ad aggiornare la ricerca bibliografica di riferimento, verranno individuati regimi alimentari biologici ottimali per riproduttori e giovanili di orata.*

#### **WP1.1 Ottenimento di uova da riproduttori biologici (obiettivo A.1)**

A partire dall'inizio di ottobre sono stati costituiti i due stock di riproduttori di orata (Fig. WP1.1.1) da destinare uno all'alimentazione biologica, l'altro a quella convenzionale, come previsto dal protocollo sperimentare.



Fig. WP1.1.1 Vasche di stoccaggio dei diversi lotti di riproduttori utilizzati per la fase sperimentale.

Un totale di 34 individui (peso medio 2 kg) è stato scelto ed immesso in ognuna di due vasche rettangolari (3mx7mx1,5m) identiche di cemento, con una disponibilità di volume di 30 m<sup>3</sup>, situate all'aperto, ad una densità stimata di 2,7 kg/m<sup>3</sup>, ben al di sotto rispetto al coefficiente di densità massimo pari a 15 kg/m<sup>3</sup> previsto dal regolamento CE 710/09. La *sex ratio* di 1:1 è stata ottenuta identificando i maschi e le femmine con parere esperto, basato sulle differenze di taglia tra i due sessi (l'orata è un ermafrodita proterandrico).

Il fotoperiodo applicato è stato naturale e il ricambio giornaliero con acqua di mare è stato maggiore del 100%. L'andamento della temperatura nelle due vasche ha seguito quello dell'acqua di mare, fino al primo evento di deposizione avvenuto il 16 dicembre. Da quella data, l'acqua di mare è stata miscelata con acqua di pozzo salina, con le stesse caratteristiche chimiche e fisiche dell'acqua di mare ma costantemente a 21°C, in quantità tale da mantenere un *range* termico compreso tra i 17,5° ed i 18°C (*range* di temperatura in cui si verifica la riproduzione naturale in orata).

L'ossigeno disciolto misurato è stato tra i 6 e gli 8 ppm.

Entrambe le vasche di riproduttori OC1 (convenzionale) e OB1 (biologico) hanno deposto in condizione di fotoperiodo naturale e temperatura controllata (compresa tra 17,0 e 18,5 °C) da metà dicembre fino a fine marzo. Il totale delle uova emesse è stato di 60 kg per OC1 e 48 kg per OB1.

## **WP1.2 Impostazione delle condizioni di allevamento larvale in condizioni biologiche (Obiettivo B.2)**

### *WP1.2.1 Razionale*

Con l'adozione per consenso del Codice di Condotta per una Pesca Responsabile (1995), da parte degli Stati che partecipano al sistema delle Nazioni Unite (membri del Comitato della Pesca della FAO), si è concluso il lungo processo di acquisizione di una forte responsabilità collettiva verso la conservazione delle risorse biologiche dei mari e degli ecosistemi acquatici continentali. Il ruolo della ricerca scientifica è considerato nel Codice al centro dell'attenzione degli Stati, come acceleratore di uno sviluppo sostenibile fondato su decisioni basate su conoscenze affidabili. L'acquacoltura, dopo una fase di entusiasmi per i suoi potenziali produttivi, basati sulle caratteristiche biologiche degli organismi acquatici, sugli spazi a disposizione, sulla forte domanda del mercato e sulle caratteristiche nutrizionali degli alimenti che può offrire, ha segnato, a partire dagli anni '90, dei punti negativi per la crescente consapevolezza degli impatti ambientali che può generare. Pertanto, il modello di sviluppo di questo comparto è stato attrezzato in maniera crescente di punti di forza che potessero contrastare le debolezze relative ai danni da esternalità negative, misurate e potenziali. Tra gli impatti oggi riconosciuti, meno evidente di quello dei reflui e dell'impatto di specie alloctone su ecosistemi caratterizzati da alte diversità, c'è l'effetto delle produzioni intensive di giovanili di Teleostei. L'intensificazione delle avannotterie ha seguito il modello economico tipico dei processi produttivi regolati da effetti di scala ma, finora, si è basato soltanto su procedure empiriche che hanno considerato la quantità e non la qualità del prodotto finale. La qualità di un giovanile può essere letta secondo due punti di vista: quello dell'impresa, che ricerca tecnologie per ridurre i costi di produzione ed aumentare i margini di profitto, e quello dell'interesse pubblico e collettivo, che richiede sicurezza in caso di fughe o ripopolamento deliberato e sicurezza alimentare per i consumatori. Non si tratta, cioè, di produrre solo le quantità ma di centrare un nuovo bersaglio, quello delle produzioni di quantità capaci di coniugare le due posizioni sopra esposte (pubblico e privato) secondo la logica di sviluppo sostenibile. Lo sviluppo di tecniche di acquacoltura biologica, basata cioè sull'imitazione e l'accelerazione di processi naturali senza apparentemente alterarne le dinamiche principali, ha quindi assunto crescente rilevanza.

### *WP1.2.2 Il contesto fisico*

La denominazione originale di "Grandi Volumi" riguardava, in letteratura, tecniche produttive basate sull'utilizzo di vasche per allevamento con dimensioni comprese tra 25 e 200 m<sup>3</sup>.

Attualmente, con questo nome si indica una tecnica che nasce dall'incontro delle esperienze fatte

negli ultimi 20 anni in fatto di larvicoltura, e che si pone come obiettivi un elevato standard del prodotto ed un vantaggio economico ed ambientale (rispetto alle tecniche intensive). Essa si avvale di vasche con una capacità di circa  $60 \text{ m}^3$ , tali cioè da rientrare nella categoria di grandi volumi. Un ciclo di allevamento prevede l'allestimento di vasche artificiali, composte con materiale sintetico facile da assemblare e, eventualmente, da rimuovere. Strutture di questo tipo, dunque, possono essere comodamente ospitate all'interno di serre agricole (Fig. WP1.2.2.1).



Fig. WP1.2.2.1 Serra agricola in cui sono ospitate le vasche per l'allevamento in Grandi Volumi (sensu Cataudella et al., 2002).

Le vasche sono di forma circolare, con diametro pari a 8 m ed altezza pari a 1,5 m (Fig. WP1.2.2.2-3).

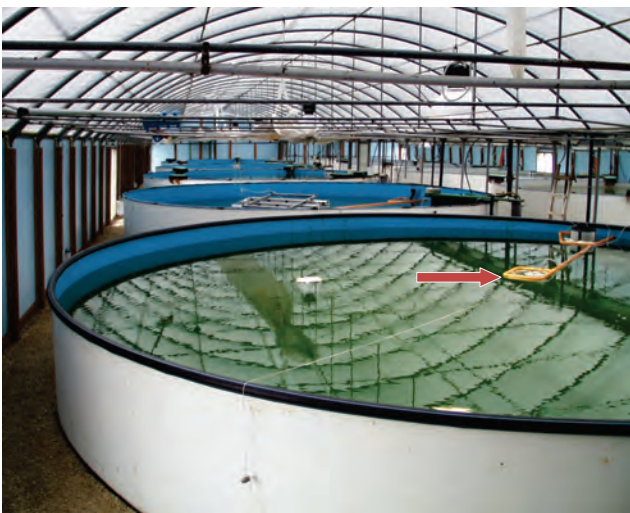


Fig. WP1.2.2.2 Vasche 'Grandi Volumi'. La freccia indica lo skimmer superficiale.



Fig. WP1.2.2.3 Sistema di vasche 'Grandi Volumi' localizzato in una serra di tipo agricolo. La freccia indica il posizionamento dell'air-lifter o ossigenatore.

Il fondo presenta una lieve pendenza verso uno scarico laterale.

All'interno delle vasche, in posizione radiale è presente un sistema di depurazione ad aria, denominato ossigenatore (Fig. WP1.2.2.4-5). Questo è formato da una struttura in PVC distinta in due porzioni di cui la prima (aeratore) è utilizzata per generare un flusso d'acqua e la seconda (schiumatore), galleggiante, serve per convogliare la schiuma formata dal violento gorgogliamento dell'aria in un cestello raccogliitore dal quale viene periodicamente rimossa.



Fig. WP1.2.2.4 Porzione dell'ossigenatore ('schiumatore') destinata a convogliare la schiuma formata dal violento gorgogliamento dell'aria in un cestello raccogliitore da dove viene rimossa manualmente.



Fig. WP4.1.2.2.5 Particolare della porzione superiore dell'ossigenatore ('aeratore'), priva dello schiumatore.

Studi condotti dall'ENEA (Ceccarelli et al., 1998) hanno permesso di stabilire che gli effetti di un sistema di questo tipo sono due:

- depurazione dell'acqua delle vasche, ad opera principalmente dello schiumatore. Questo effetto è massimo per le proteine (albumine) prodotte dal metabolismo delle microalghe;
- aerazione dell'acqua e generazione di flussi differenziali nell'ambiente di crescita delle larve. Queste ultime si trovano nella condizione di poter selezionare zone di riposo o di nuoto attivo, similmente a quanto avviene in condizioni di tropismo naturale.

Ciascuna vasca, inoltre, è equipaggiata con un sistema di ricambio formato da un tubo di entrata, che immette acqua, ed una uscita del tipo "troppo pieno", in corrispondenza della quale può essere apposto un filtro a maglia di dimensioni variabili. L'illuminazione è assicurata da una lampada, con potenza pari a 1000 lux, posta sopra la vasca stessa. Un sistema di questo tipo, quindi, è assimilabile ad un microcosmo per la ricerca ecologica. La procedura di innesco prevede che le vasche, dopo accurato lavaggio, vengono riempite con acqua di mare filtrata alla quale, alla fine del riempimento, viene aggiunto cloro per eliminare tutti gli organismi non trattenuti nel processo di filtrazione e rendere bassa il più possibile la carica microbica. Dopo un intervallo non inferiore a 24 ore, il cloro viene neutralizzato mediante l'aggiunta di tiosolfato in una proporzione pari a 1,5 rispetto al cloro, e le vasche diventano pronte per l'innesco "biologico".

### WP1.3 Proposta di un protocollo di allevamento larvale in condizioni biologiche

L'allevamento larvale in Grandi Volumi si avvale delle tecniche più moderne ed affidabili per l'alimentazione delle larve e la cura dell'ambiente nel quale queste si sviluppano. All'interno dell'avannotteria sono installate apposite strutture per la coltura di alghe unicellulari e rotiferi, nonché per la schiusa e l'arricchimento di nauplii e metanauplii di *A. salina* (Fig. WP1.2.3.1-2) e rotiferi, che sono gli organismi alla base dell'alimentazione delle larve.

Alla fine del processo di sterilizzazione, senza aggiunta di sali o altre sostanze fertilizzanti, le vasche vengono inoculate con una quantità di alghe pari al contenuto di diversi sacchi di coltura (del tipo utilizzato nelle colture parallele).



Fig. WP1.2.3.1 Sacchi in cui sono prodotti e arricchiti i rotiferi.



Fig. WP1.2.3.2 Strutture utilizzate per la schiusa e l'allevamento dell'*Artemia* sp.

Da questo momento, fino alla semina con le larve, le vasche vengono lasciate a maturare esattamente come i sacchi di coltura. Al loro interno, le popolazioni di alghe aumentano progressivamente, raggiungendo una concentrazione ottimale in corrispondenza dell'immissione delle larve provenienti dagli schiuditoi. In questo modo, le larve si trovano nella condizione di poter sfruttare al massimo i benefici offerti dalla presenza delle microalghe. Le larve arrivano ad una età che corrisponde al 3° o 4° giorno di vita. Il loro sacco vitellino è in fase di rapido riassorbimento, e la loro bocca è ancora chiusa. Il giorno seguente all'immissione delle larve nelle vasche o, comunque appena queste diventano in grado di alimentarsi grazie all'apertura della bocca, iniziano le somministrazioni di Rotiferi. Questi sono immessi nelle vasche in 3 aliquote giornaliere. Gli orari delle tre somministrazioni sono distribuiti in modo da dividere le ore di luce in tre porzioni uguali: se la durata del dì è 12 ore, la prima quota di alimento viene fornita subito dopo l'alba, la seconda dopo almeno 4 ore e l'ultima 4 ore dopo la seconda. In questo modo, si cerca di mantenere la concentrazione di alimento il più possibile costante durante tutto l'arco della giornata. Riguardo la quantità di rotiferi forniti ogni volta, questa è il risultato di una valutazione che nasce da una stima della quantità di rotiferi presenti in vasca prima della somministrazione. L'importanza di questa misura sta nel fatto che essa permette di valutare quale è stato lo sforzo di predazione esercitato dalle larve e di regolarsi circa la quantità necessaria per garantire disponibilità sufficienti nelle ore successive. Questo aspetto risulta importante tanto durante il giorno, in cui l'attività di caccia è particolarmente intensa, sia all'atto dell'ultima somministrazione, poiché si deve cercare di assicurare un nutrimento sufficiente fino alla dose della mattina seguente. Per quanto ridotta, infatti, la predazione può avvenire anche durante le ultime ore di luce e prima dell'alba. Secondo queste modalità, dunque, inizia il periodo di prima alimentazione, basato appunto sull'utilizzo di Rotiferi del genere *Brachionus*. Questa fase avrà una durata variabile a seconda della specie allevata (1 settimana nella Spigola, fino a 20 giorni nell'Orata) durante la quale all'interno delle vasche verranno immessi soltanto Rotiferi. Una modificazione nel sistema avviene in corrispondenza del crollo delle popolazioni di microalghe all'interno delle vasche di coltura. Questo evento può verificarsi dopo un tempo variabile dai 7 ai

15 giorni dalla data di immissione delle larve. La diminuzione del fitoplancton endogeno, quindi, rende necessario un rifornimento dall'esterno che, tuttavia, assume un carattere sporadico. Ad una età variabile a seconda della specie allevata e delle condizioni termiche presenti, avviene lo svezzamento progressivo da rotiferi a nauplii e metanauplii di *A. salina*. Questi, come i rotiferi, sono sottoposti ad un processo di incremento del loro contenuto in acidi grassi polinsaturi mediante un periodo di alimentazione con opportuni preparati disponibili in commercio (arricchitori).

Questo processo dura un tempo variabile tra le 16 e le 24 ore, al termine delle quali si verifica la somministrazione in vasca.

Il periodo di alimentazione ad *A. salina* ha pure esso una durata variabile ma, in genere, non oltrepassa i 45 giorni di età delle larve. A questo stadio, infatti, esse sono già in grado di alimentarsi con mangimi inerti, che costituiscono la loro fonte di alimento fino alla fine dell'allevamento all'interno delle vasche.

Durante tutto l'allevamento larvale, i pesci non sono mai sottoposti a trattamenti farmacologici. Eventuali patologie che possono verificarsi vengono in genere ben sopportate e non causano mortalità rilevanti che, comunque, allorché si verificano, assumono il significato di eventi selettivi, poiché rimuovono dalla popolazione individui "deboli" comunque inadeguati rispetto agli standard qualitativi dell'allevamento.



WP2: Verifica dell'applicabilità di un protocollo di alimentazione biologica a riproduttori di specie ittiche marine eurialine (Obiettivo A)

In questo WP sono comprese le attività finalizzate al raggiungimento dell'obiettivo A e le attività previste sono quelle definite come A.1 (ottenimento di uova da riproduttori biologici), A.2 (valutazione della qualità delle uova ottenute da riproduttori biologiche e confronto con quelle ottenute da riproduttori convenzionali) e A.3 (valutazione integrata dei dati produttivi, economici e biologici ottenuti ai fini della valutazione degli effetti del regime alimentare dei riproduttori sulla produttività economica e biologica in avannotteria): in pratica si predisporrà un modulo di allevamento sperimentale per riproduttori biologici e la qualità delle uova da essi ottenuta verrà confrontata con quella delle uova ottenute parallelamente da riproduttori alimentati con alimenti tradizionali nello stesso impianto.

La dieta *convenzionale* (OC1) per i riproduttori nel periodo pre-riproduttivo è a base di gamberi ed alaccie decongelati e sminuzzati, mentre ai riproduttori destinati al biologico (OB1) è stato somministrato un mangime certificato biologico commerciale. Non essendo attualmente presente in commercio un mangime biologico specifico per riproduttori di orata è stato utilizzato un mangime biologico specifico per l'ingrasso dell'orata: Ecolife Pearl 864 6,5 mm prodotto dalla Biomar. Tale mangime con certificazione biologica ISO, GLOBALG.A.P., e QUALITÀ-FRANCE. Nell'*allegato 1* sono riportate le certificazioni ottenute e i valori nutrizionali del mangime utilizzato. Purtroppo non è stata resa disponibile dalla ditta produttrice la composizione del mangime (attualmente fuori produzione).

In entrambe le vasche la quantità di alimento somministrato ha variato, in accordo con la temperatura, tra il 3 ed il 5 % della biomassa dei riproduttori.

*Riproduttori*

L'alimentazione con mangime biologico (OB1) e convenzionale (OC1) ha avuto inizio il 17/10/2011, in entrambe le vasche (Fig. WP2.1). Da quella data è stato quindi ottenuto un parco riproduttori biologico ed uno convenzionale. Entrambi i gruppi di riproduttori hanno iniziato a deporre spontaneamente e regolarmente sin dal 16 dicembre.



Fig. WP2.1 Vasche di stoccaggio dei riproduttori di orata utilizzati nel programma di ricerca.

Tab. WP2.1 Parametri chimici e fisici registrati nelle vasche dei riproduttori.

Parametro	ore 8:30		ore 15:30	
	OC1 (conv)	OB1 (bio)	OC1 (conv)	OB1
T °C	17,6	18,0	17,8	18,3
O <sub>2</sub> (mg/L)	7,8	7,6	7,4	7,6
pH	7,30	7,42	7,38	7,43
cond. ( mS/cm)	55,07	54,88	55,36	54,76
TDS* (mg/L)	50,03	49,8	50,11	49,8
Res. Fisso 180° (mg/L)	10,01	10,04	9,98	10,04
NaCl	35,34	35,28	35,15	35,27

\* TDS = solidi totali

I campionamenti sulle uova utilizzate nell'esperimento sono iniziati il 29 febbraio dopo 4 mesi di alimentazione con mangime biologico (OB1). Il pomeriggio di tale giorno sono state raccolte 2,2 kg di uova da OB1 (uova deposte a partire dalle ore 18 del giorno 28 febbraio) e 2,45 kg da OC1 (uova deposte a partire dalle ore 8 del 29 febbraio). In entrambi i casi, il tasso di fecondazione è stato del 100%.

I parametri chimici e fisici principali registrati nelle vasche dei riproduttori il giorno del campionamento (29/02/2012) sono riportati in Tab. WP2.1.

**WP3: Contributo alla costruzione di un protocollo per avannotterie biologiche di specie ittiche marine eurialine (Obiettivo A)**

Scopo di questo WP è chiarire, con un caso di studio, la possibilità di applicazione dei principi del biologico sulla produzione di novellame, capitolo ancora incerto del regolamento, suscettibile di evoluzioni nei prossimi anni (Obiettivo B – attività B.2). In particolare, le larve ottenute dalla schiusa da uova biologiche verranno allevate con la tecnica dei Grandi Volumi. Questo approccio si basa su un sistema controllato sviluppato per ricreare il più possibile le condizioni ambientali presenti nelle nursery naturali.



Appena raccolte, le uova sono state incubate in 4 embrioschioditori (Fig. WP3.1), dal volume di 520 litri ciascuno (1 per ogni condizione di semina: PV bio, PV con, GV bio, GV con).

Le tabelle seguenti (WP3.1) riportano i parametri chimici e fisici principali registrati in ogni schioditoio durante la fase di schiusa.

Fig. WP3.1 Embrioschioditori utilizzati per l'incubazione delle uova di orata (Acquacoltura Lampedusa).

Tab. WP3.1 Parametri chimici e fisici registrati negli embrioschioditori al momento della schiusa delle uova.

S5 (ore 11:30)	01/03/2012	02/03/2012	03/03/2012	04/03/2012
O <sub>2</sub> (mg/l)	7,5	7,3	7,2	7,1
O <sub>2</sub> (%)	96,0	96,0	94,0	94,0
T°	17,9	18,0	18,1	18,1
TDS	49,59	49,95	50,53	50,33
NaCl	35,12	34,63	34,96	34,82
cond.	54,50	54,92	55,53	55,42
res	10,02	10,02	9,92	9,92
Ph	7,82	7,63	7,64	7,73
mv	-41,00	-30,70	-29,80	-35,50

S6 (ore 11:30)	01/03/2012	02/03/2012	03/03/2012	04/03/2012
O <sub>2</sub> (mg/l)	7,7	7,6	7,6	7,4
O <sub>2</sub> (%)	98,0	100,0	98,0	98,0
T°	17,9	18,0	17,9	18,0
TDS	50,40	50,46	50,54	50,43
NaCl	35,51	34,92	35,54	34,88
cond.	54,98	55,48	55,59	55,42
res	9,92	9,92	9,98	9,92
Ph	7,82	7,71	7,68	7,78
mv	-42,00	-34,70	-35,50	-38,40

S7 (ore 11:30)	01/03/2012	02/03/2012	03/03/2012	04/03/2012
O <sub>2</sub> (mg/l)	7,4	7,3	7,4	7,3
O <sub>2</sub> (%)	95,0	96,0	97,0	97,0
T°	17,8	18,1	18,0	18,1
TDS	50,44	50,51	50,72	50,27
NaCl	35,57	35,03	35,02	34,76
cond.	55,47	55,51	55,33	55,33
res	9,91	9,99	9,96	9,94
Ph	7,81	7,74	7,72	7,77
mv	-41,60	-36,40	-35,30	-39,20

S8 (ore 11:30)	01/03/2012	02/03/2012	03/03/2012	04/03/2012
----------------	------------	------------	------------	------------

O <sub>2</sub> (mg/l)	7,6	7,3	7,3	7,4
O <sub>2</sub> (%)	97,0	96,0	93,0	96,0
T°	17,8	18,0	18,0	18,1
TDS	50,35	50,58	50,60	50,31
NaCl	35,60	34,91	35,02	34,39
cond.	55,51	55,61	54,64	55,45
Res	9,91	9,89	9,89	9,92
Ph	7,84	7,75	7,73	7,78
Mv	-41,90	-36,90	-35,90	-37,90

A causa del differente stadio di sviluppo, le uova hanno iniziato a schiudere la mattina del giorno 2 marzo mentre il 100% schiusa è stata osservata nella notte tra il 2 e 3 marzo.

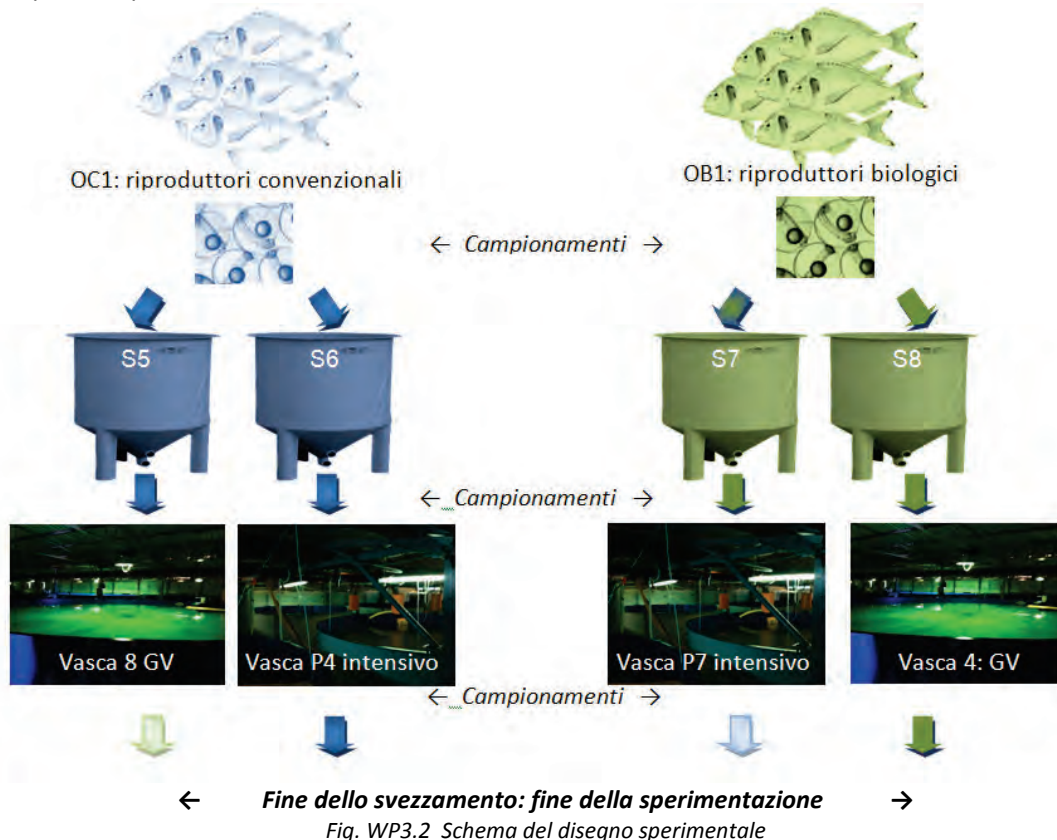
Per esigenze sperimentali il giorno 1 per tutte le larve è stato considerato il 2 marzo.

La Tab. WP3.2 riporta, per ciascun embrioschiuditoio, il quantitativo di uova incubate<sup>1</sup>, il quantitativo di uova morte (raccolte per spurgo), la percentuale di schiusa stimata (calcolata su base delle uova morte raccolte e il numero di larve stimate alla semina):

Tab. WP3.2 Dati relativi al periodo embrionale

schioditoio	origine	uova incubate (g)	uova morte (g)	n. larve stimate alla semina	% di schiusa
S5	conv	1300	160	1.497.000	87,7
S6	conv	900	100	1.086.000	88,9
S7	bio	1300	170	1.185.000	86,9
S8	bio	1150	170	1.398.000	85,2

Come si può osservare (celle evidenziate con il colore giallo nella tabella), la percentuale di schiusa è risultata inferiore, seppur di poco, nelle uova ottenute dai genitori alimentati con mangime biologico (S7 e S8).



<sup>1</sup> in impianto considerano 1.150.000 uova in 1 kg di uova di orata (1.150 in un grammo).

In Fig. WP3.2 viene sintetizzato graficamente il modello sperimentale utilizzato nelle fasi successive del programma di ricerca.

Il giorno 4 marzo sono state seminate con le larve le quattro vasche sperimentali (Fig. WP3.3). La Tab. WP3.3 riporta il nome della vasca, lo schiuditoio di origine, il volume e le densità di stoccaggio (stimate) utilizzate:



Fig. WP3.3 Vasche in cui è stato condotto l'allevamento sperimentale. A sinistra: vasca utilizzata per l'allevamento proposto per il protocollo biologico in Grandi Volumi. L'asterisco indica il posizionamento dell'air lift per l'idrodinamismo; a destra, vasca dove è stato condotto l'allevamento secondo le pratiche convenzionali, in intensivo (Acquacoltura Lampedusa)..

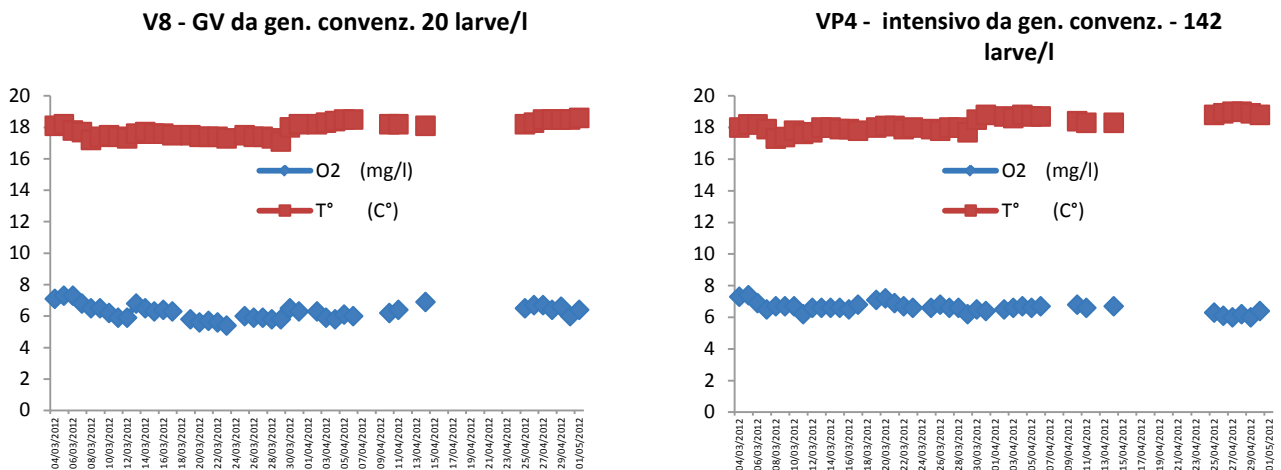
Tab. WP3.3 Dati relativi alla semina delle vasche sperimentali

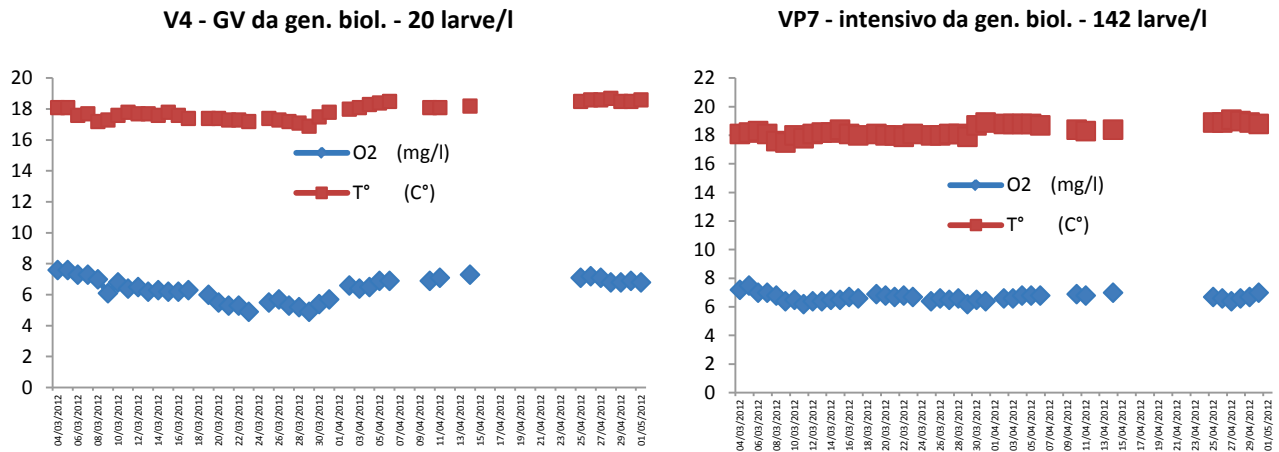
Vasca	Volume (m <sup>3</sup> )	Schiuditoio di origine	Densità (larve/litro)
V8	70	S5 (conv)	20
V4	70	S8 (bio)	20
VP4	8	S6 (conv)	142
VP7	8	S7 (bio)	142

L'allevamento larvale è stato svolto in acqua di pozzo (refrigerata), a salinità prossima a quella dell'acqua di mare.

I parametri chimici e fisici sono stati rilevati durante l'intera fase di allevamento larvale: in Fig. WP3.4 è mostrato l'andamento dei livelli di ossigeno e della temperatura nelle vasche, mentre gli altri parametri sono riportati nell'*Allegato 2*.

Fig. WP3.4 Grafici dell'andamento dei livelli di ossigeno e della temperatura nelle vasche sperimentali durante l'allevamento larvale, nelle diverse condizioni di allevamento.





Sia nei piccoli (condizioni intensive) che nei grandi volumi (protocollo biologico) la quantità di *Artemia* somministrata è stata leggermente maggiore per la condizione intensiva, a causa di una densità di pesci più elevata.

I rotiferi e l'*Artemia* (vedi Fig. WP3.4) arricchiti sono stati somministrati 3 volte al giorno (alle 8:30, alle 12 e alle 15).



In tutte le vasche dell'esperimento sono stati osservati copepodi selvatici, da colonizzazione naturale dei volumi di allevamento.

La Tab. WP3.4 riporta il numero dei pesci stimati presenti nelle diverse vasche alla fine della fase di allevamento larvale (fine aprile – inizio maggio):

Tab. WP3.4 Dati produttivi relativi alle prove sperimentali di allevamento larvale

Vasca		Numero pesci stimati	% di sopravvivenza (stima)
VP7	Genitori bio – condizioni intensive	3.000-4.000	15
VP4	Genitori convenzionali – condizioni intensive	5.000-6.000	14,36
V4	Genitori bio – condizioni biologiche (GV)	20.000-30.000	15,1
V8	Genitori convenzionali – condizioni biologiche (GV)	30.000-40.000	14,9

I pesci sono stati trasferiti in due *raceways* (Fig. WP3.5), per la fase di svezzamento al mangime artificiale, in condizione di fotoperiodo naturale: uno, più grande (60 m<sup>3</sup>), è stato suddiviso con

delimitazioni interne a formare 3 volumi separati, ognuno di 20 m<sup>3</sup> (*terra, centro, mare*); l'altro era di dimensioni inferiori (13 m<sup>3</sup>).



A



B



C

Fig. WP3.5 Vasche del tipo raceway utilizzate per la fase di svezzamento al mangime artificiale. A: raceways utilizzati per la suddivisione. B: porzione di raceway denominata SL6. C: raceway di minori dimensioni utilizzato come vasca SC8. (Acquacoltura Lampedusa)

Il ricambio idrico, maggiore del 100% die in tutte le quattro condizioni, è stato eseguito con acqua di pozzo. La Tab. WP3.5 riporta il nome della vasca, il volume e la densità iniziale (stimata):

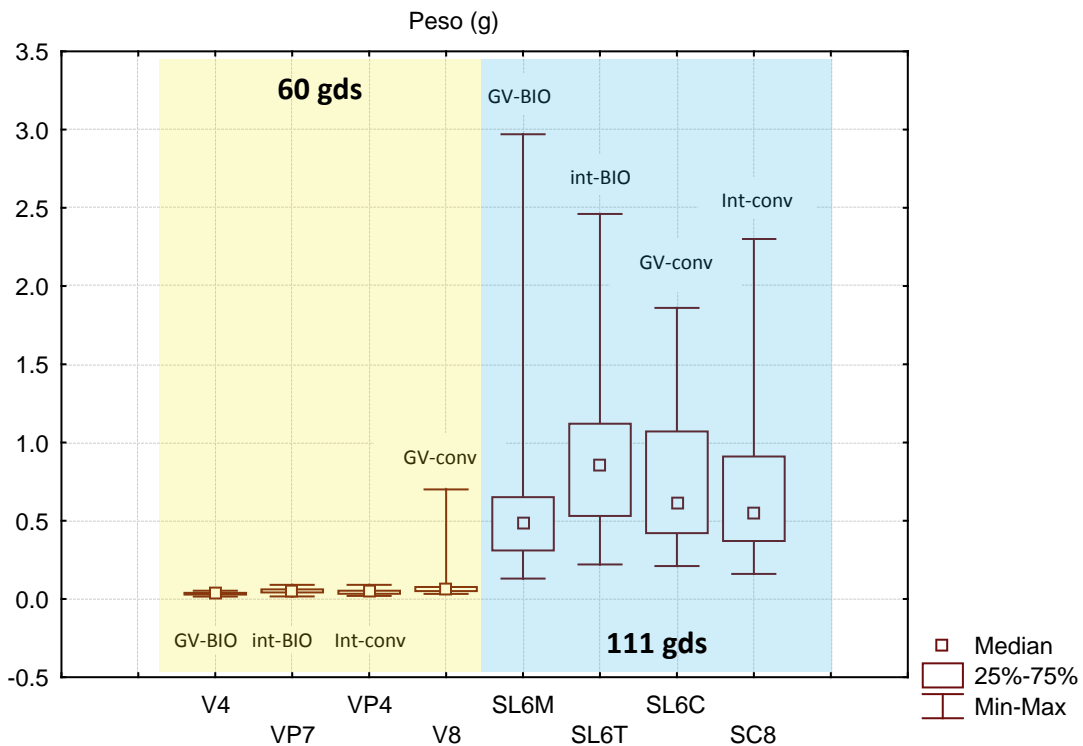
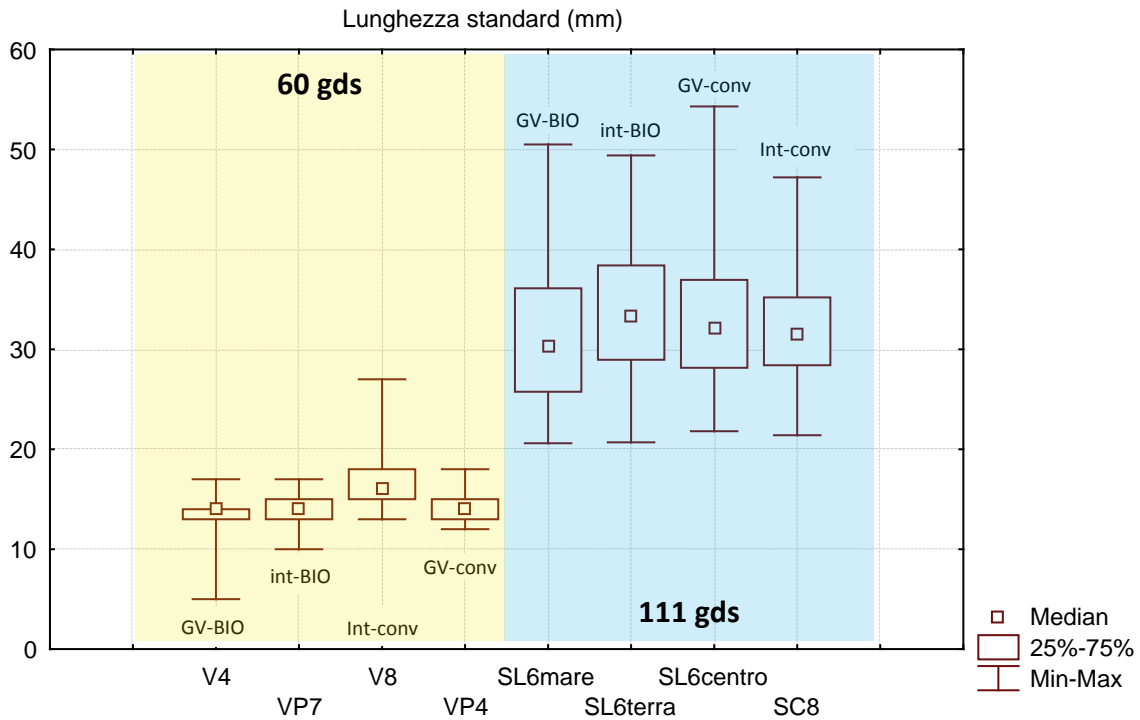
Tab. WP3.5 Dati produttivi relativi alla fine della fase di svezzamento.

Vasca	Volume (m <sup>3</sup> )	Origine	Densità stimata (pesci/litro)
SL6 terra	20	V8 (GV – gen. conv.)	0,3
SL6 centro	20	V4 (GV – gen. biol.)	0,3
SL6 mare	20	VP4 (intensivo – gen. conv.)	1,25
SC8	13	VP7 (intensivo – gen. biol.)	1,75

Il giorno 20 di giugno, fine del periodo di svezzamento al mangime artificiale, sono stati eseguiti i campionamenti finali e la sperimentazione considerata terminata.

Di seguito vengono riportati alcuni dati relativi alla crescita delle orate, a seconda della condizione di allevamento e del trattamento alimentare dei riproduttori.

Fig. WP3.5 Box & Whisker plots che rappresentano graficamente i valori di lunghezza standard (mm): mediana (quadrato centrale), distribuzione delle misure comprese tra il 25 ed il 75 percentile (percentile centrale; rettangolo) ed estensione del range dei valori (minimi e massimi; whiskers (le linee verticali)). Lo sfondo giallo evidenzia i dati relativi ai lotti campionati alla fine della avannotteria, quello azzurro alla fine dello svezzamento.



Tab. WP3.6 Dati relativi alla crescita .

		LS media (mm)	Peso medio (g)	Fattore di condizione K (medio) $K = (P/LS^3) \times 100$	Specific Growth Rate (Ricker, 1979) $SGR = [(lnw_t - lnw_0)/(t_t - t_0)] \times 100$	Absolute Growth Rate (Ricker, 1979) $AGR = [(w_t - w_0)/(t_t - t_0)] \times 100$
60 gds	gen BIO - GV	13,6±1,4	0,03±0,01 <sup>a</sup>	1,75 <sup>a</sup>		
	gen BIO - intens	13,9±1,3	0,05±0,02 <sup>b</sup>	1,89 <sup>b</sup>		
	gen conv - GV	17,2±1,7 <sup>a</sup>	0,08±0,1	2,82		
	gen conv - intens	14,4±1,3 <sup>b</sup>	0,04±0,01	1,80		
111 gds	gen BIO-GV	31,1±5,9	0,75±0,43	2,26 <sup>a</sup>	6,12	1,41
	gen BIO - intens	30,8±5,8	0,78±0,48	2,15 <sup>b</sup>	5,20	1,31
	gen conv - GV	32,9±5,6	0,88±0,45	2,27 <sup>a</sup>	4,62	1,57
	gds gen conv - intens	28,9±6,4	0,62±0,51	2,19 <sup>b</sup>	5,14	1,13

Lettere diverse indicano la presenza di differenze significative ( $p < 0.01$ ) in alcuni parametri tra coppie di lotti provenienti dallo stesso lotto di uova. E' stato prima condotto un test di Kolmogorov-Smirnov (one-sample test; Statistica 7 StatSoft, Inc.) per verificare la normalità della distribuzione. Al fine di verificare la significatività delle differenze osservate, quindi, ai dati con distribuzione normale è stato applicato il t-test per campioni indipendenti, mentre ai dati con distribuzione non parametrica il Mann-Whitney U test (Statistica 7 StatSoft, Inc.).



WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci (Obiettivo B)

WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci (Obiettivo B)

Questo WP riguarda le attività finalizzate al raggiungimento dell'obiettivo B: in particolare quelle inerenti le attività B.1 (analisi fisiologiche), B.3 (valutazione delle performance produttive del novellame biologico) e B.4 (applicazione di tecniche di intelligenza artificiale (SOMs) e costruzione di un modello globale, multi-approccio e dinamico, dei diversi descrittori di stato e di processo che sono alla base della identificazione/descrizione/sintesi di un protocollo di allevamento larvale "biologico").

**WP4.1 Messa a punto del monitoraggio "multidimensionale" di controllo**

**WP4.1.1 Analisi degli effetti dell'alimentazione (biologica vs. convenzionale) dei riproduttori sulla qualità delle uova (attività B1)**

Qualità morfologica

In Tab. WP4.1.1 sono riportati i campionamenti eseguiti sulle uova al momento della deposizione, mentre in Tab. WP4.1.2 è riportata la finalità per la quali i diversi campioni sono stati prelevati.

Tab. WP4.1.1 Campionamenti effettuati al momento della deposizione delle uova.

Codice campione	Ora	Origine	Fissazione	Peso campionato (g)
OL12_01-03	8.00	conv.	glutaraldeide 2,5%	≈ 1
OL12_04-05	8.00	conv.	liquido di bouin	≈ 1
OL12_06-08	15.30	bio	glutaraldeide 2,5%	≈ 1
OL12_09-10	15.30	bio	liquido di bouin	≈ 1
OL12_11	15.30	conv.	glutaraldeide 2,5%	≈ 1
OL12_012-14	16.00	conv.	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 3
OL12_15-17	16.00	bio	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 3

Tab. WP4.1.2 Finalità dei campionamenti di uova.

Tipo di fissazione	Analisi effettuate
liquido di bouin	Morfologiche (anomalie, numero delle gocce lipidiche; diametro dell'uovo e del tuorlo; spazio perivitellino)
glutaraldeide 2,5%	
ghiaccio secco (-80°C)	Qualità delle uova (quantificazione dei livelli di glucosio, proteine totali e trigliceridi e del profilo in acidi grassi, quest'ultimo in collaborazione con l'INRAN)

Nelle Tab. WP4.1.3-4 sono riportati i risultati concernenti l'analisi morfologica delle uova.

Tab. WP4.1.3 Dati morfometrici rilevati sulle uova.

Lotto broodstock	Peso medio uovo (mg)	Diametro medio uovo (mm)	Diametro medio tuorlo (mm)	Spazio perivitellino (media; mm)	Spazio perivitellino (err st; mm)
OC1	1,15	1,1	0,8	0,4	0,3
OB1	0,96	1,0	0,7	0,3	0,2

Tab. WP4.1.4 Dati relativi alle gocce lipidiche rilevate nei due lotti di uova esaminati.

Lotto broodstock	Mediana n. gocce	Media diametro maggiore goccia (mm)
Convenzionale (OC1)	1	0,2
Biologico (OB1)	1	0,2

Tab. WP4.1.5 Dati relativi allo stadio ontogenetico rilevato nei due lotti di uova esaminati

Lotto broodstock	Stadio non identificabile (%)	% blastula	% morula	% embriogenesi avanzata
Convenzionale (OC1)	27,1	0	71,2	1,7
Biologico (OB1)	10,1	30,3	23,2	37,4

Dai dati mostrati risulta evidente come le uova ottenute dal lotto di genitori biologici (OB1) siano di dimensioni e peso

inferiori di quelle ottenute dal lotto alimentato con la dieta utilizzata normalmente in acquacoltura nel periodo pre-riproduttivo. Nessun effetto del tipo di alimentazione somministrata invece è stato evidenziato sul numero e le dimensioni delle gocce lipidiche (Tab. WP4.1.4). Le uova nei due

lotti analizzati al momento della raccolta si trovavano a diversi stadi di sviluppo, come mostrato in Tab. WP4.1.5).

Qualità fisiologica

#### Misura del contenuto nelle uova di alcuni metaboliti principali

Sulle uova provenienti dai lotti oggetto della sperimentazione sono state condotte alcune analisi, finalizzate alla misura del contenuto di alcuni metaboliti principali, quali glucosio, proteine totali e trigliceridi.

A tale scopo un'aliquota di uova è stata omogenata in PBS per mezzo dell'omogenizzatore Ultra Turrax T8 e le analisi sono state condotte per spettrofotometria di riflettanza tramite l'analizzatore SPOTCHEM EZ SP-4430 - ARKRAY, Inc. (Kyoto, Japan). L'intervallo di lettura dello strumento è 20-450 mg/dL per il glucosio, 25-500 mg/dL per i trigliceridi e 2-11g/dL per le proteine totali. I risultati

ottenuti sono riportati in

Tab. WP4.1.6.

Come si può osservare i

valori di glucosio e proteine totali sono risultati in

Tab. WP4.1.6 Risultati dell'analisi dei metaboliti principali delle uova.

	Glucosio (mg/dL)	Trigliceridi (mg/dL)	Proteine totali (g/dL)
Convenzionale (OC1)	<20	202,28	<2.0
Biologico (OB1)	<20	98,23	<2.0

entrambi i casi più bassi del limite inferiore di lettura dello strumento, mentre i trigliceridi sono stati quantificati ed il contenuto è risultato più che doppio nelle uova provenienti da riproduttori di orata allevati in modo convenzionale.

#### Misura della frazione lipidica nelle uova

Sulle uova di orate provenienti da allevamento, piccolo volume, convenzionale e biologico, è stata studiata la frazione lipidica maggiormente influenzata dalla qualità e composizione lipidica dell'alimentazione del pesce.

I componenti della frazione lipidica insaponificabile (squalene, colesterolo,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferolo, ed all-trans retinolo) sono stati determinati cromatograficamente previa saponificazione come descritto da Orban et al (2000). La strumentazione utilizzata era un HPLC (Hewlett-Packard 1100 Series Liquid Chromatography) dotato di un rivelatore a serie di diodi, pompa quaternaria e sistema di degassaggio dei solventi. La separazione cromatografica è stata effettuata su colonna C18 Ultrasphere (5  $\mu$ m, 25 cm x 4,6 mm, Beckman) protetta da una precolonna Ultrasphere ODS (4,6 mm x 4,5 cm, 5  $\mu$ m, Beckman). Gli analiti erano identificati in base ai tempi di ritenzione ed agli spettri di assorbimento nella regione UV-visibile. I dati sono stati elaborati dal Software Chemstation della Hewlett Packard.

La caratterizzazione della composizione in acidi grassi dei lipidi totali è stata effettuata trasformando gli acidi grassi in metile steri, mediante l'impiego di trifluoruro di boro metanolico (14% P/V)-metanolo (1:1 V/V) ed analizzando questi mediante gas-cromatografia. È stato utilizzato un Gas Cromatografo (Hewlett Packard 6890 Series) dotato di rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) e di colonna capillare in silice fusa (30 m x 0,25 mm ID, spessore del film: 0,20  $\mu$ m). Gli acidi grassi determinati al FID sono identificati e confermati alla Gas-Massa (Varian 3900/Saturn 2100T GC/MS) usando una colonna con maggiore potere risolutivo (Crompack<sup>®</sup> CP-WAX 52 CB, 60 m x 0,32 mm ID, spessore del film: 0,5  $\mu$ m) e standards puri di tutti gli analiti.

Per quanto riguarda le uova di orate da allevamento convenzionale e biologico i risultati, limitatamente ai campioni esaminati, evidenziano una differenza nel contenuto lipidico, risultato più elevato per le uova di orate biologiche (Tab. WP4.1.7-12).

Tale differenza si ripercuote sui livelli di colesterolo, squalene ed  $\alpha$ -tocoferolo per 100 g di prodotto, che risultano di conseguenza più elevati nelle uova di origine biologica. Riportando invece i risultati per grammo di olio, si evince che dal punto di vista qualitativo la composizione degli olii estratti dalle uova di orate di diversa provenienza non differisce sia per quanto

riguarda la componente insaponificabile che le principali classi di acidi grassi (saturi, monoinsaturi, poliinsaturi). Si evidenziano invece differenze per alcuni singoli acidi grassi quali il monoinsaturo C22:1 n-11 (acido cetoleico) ed i poliinsaturi C18:2 n-6 (acido linoleico), C18:3 n-3 (acido alfa-linolenico) e C20:4 n-6 (acido arachidonico).

Tab. WP4.1.7 Lipidi totali della frazione lipidica (g/100 g) insaponificabile di uova di orate da genitori biologici.

	<b>Media</b>	<b>ds</b>
Lipidi totali	6,87	0,31

Tab. WP4.1.8 Composizione della frazione lipidica (mg/100 g) insaponificabile di uova di orate da genitori biologici.

	<b>Media</b>	<b>ds</b>
Colesterolo	375,55	3,69
Squalene	2,09	0,01
α - tocoferolo	5,70	0,02
γ - tocoferolo	0,00	0,00
δ - tocoferolo	0,00	0,00
<b>mg/g olio</b>		
Colesterolo	54,67	0,54
Squalene	0,30	0,00
α - tocoferolo	0,83	0,01
γ - tocoferolo	0,00	0,00
δ - tocoferolo	0,00	0,00

Tab. WP4.1.9 Profilo in acidi grassi (% degli acidi grassi totali) di lipidi in uova di orate genitori biologici.

	<b>Media</b>	<b>ds</b>
C 12:0	0,05	0,00
C 13:0	0,02	0,00
C 14:0	3,58	0,01
C 15:0	0,44	0,00
C 16:0	20,93	0,00
C 17:0	0,39	0,01
C 18:0	4,30	0,02
C 19:0	0,05	0,00
C 20:0	0,10	0,00
C 21:0	0,00	0,00
<b>Saturi totali</b>	<b>29,88</b>	<b>0,02</b>
C 14:1 n - 5	0,04	0,01
C 16:1 n - 7	8,17	0,00
C 18:1 n - 9	17,47	0,01
C 18:1 n - 7	3,53	0,01
C 20:1 n - 9	0,63	0,00
C 20:1 n - 11	0,20	0,01
C 22:1 n - 9	0,09	0,01
C 22:1 n - 11	0,14	0,00
C 24:1 n - 9	0,20	0,00
<b>Monoinsaturi tot</b>	<b>30,46</b>	<b>0,01</b>
C 16:2 n - 4	0,44	0,00
C 18:2 n - 6	4,93	0,00
C 18:3 n - 6	0,17	0,00
C 18:3 n - 3	0,73	0,00
C 18:4 n - 3	0,75	0,00
C 20:2 n - 6	0,14	0,00
C 20:4 n - 3	0,56	0,00
C 20:4 n - 6	0,96	0,00
C 20:5 n - 3	6,27	0,02
C 22:4 n - 6	0,12	0,00
C 22:5 n - 3	2,23	0,00
C 22:6 n - 3	17,31	0,00
<b>Polinsaturi totali</b>	<b>34,61</b>	<b>0,01</b>
somma n - 3	27,85	0,02
somma n - 6	6,32	0,01
n - 3 / n-6	4,41	0,01

WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci (Obiettivo B)

Tab. WP4.1.10 Lipidi totali in uova di orate da genitori alimentati con dieta convenzionale.

	g/100 g	
Lipidi totali	4,13	0,12

Tab. WP4.1.11 Composizione della frazione lipidica insaponificabile di uova di orate da genitori Alimentati con dieta convenzionale.

	mg/100 g	
	Media	ds
Colesterolo	229,05	5,59
Squalene	1,73	0,04
α - tocoferolo	3,01	0,08
γ - tocoferolo	0,00	0,00
δ - tocoferolo	0,00	0,00
	mg/g olio	
Colesterolo	55,46	1,35
Squalene	0,42	0,01
α - tocoferolo	0,73	0,02
γ - tocoferolo	0,00	0,00
δ - tocoferolo	0,00	0,00

Tab. WP4.1.12 Profilo degli acidi grassi (% degli acidi grassi totali) di lipidi di uova di orate da genitori alimentati con dieta convenzionale.

	Media	ds
C 12:0	0,07	0,00
C 13:0	0,00	0,00
C 14:0	3,38	0,03
C 15:0	0,48	0,00
C 16:0	21,54	0,07
C 17:0	0,44	0,00
C 18:0	4,31	0,02
C 19:0	0,08	0,00
C 20:0	0,17	0,03
C 21:0	0,00	0,00
<b>Saturi totali</b>	<b>30,47</b>	<b>0,15</b>
C 14:1 n - 5	0,05	0,01
C 16:1 n - 7	8,21	0,04
C 18:1 n - 9	18,02	0,01
C 18:1 n - 7	3,32	0,00
C 20:1 n - 9	0,55	0,02
C 20:1 n - 11	0,23	0,04
C 22:1 n - 9	0,06	0,01
C 22:1 n - 11	0,08	0,00
C 24:1 n - 9	0,20	0,01
<b>Monoinsaturi tot</b>	<b>30,72</b>	<b>0,03</b>
C 16:2 n - 4	0,35	0,00
C 18:2 n - 6	3,86	0,00
C 18:3 n - 6	0,14	0,00
C 18:3 n - 3	0,58	0,00
C 18:4 n - 3	0,55	0,01
C 20:2 n - 6	0,15	0,01
C 20:4 n - 3	0,49	0,00
C 20:4 n - 6	1,41	0,01
C 20:5 n - 3	5,62	0,03
C 22:4 n - 6	0,10	0,02
C 22:5 n - 3	2,29	0,01
C 22:6 n - 3	18,22	0,06
<b>Polinsaturi totali</b>	<b>33,76</b>	<b>0,12</b>
somma n - 3	27,75	0,10
somma n - 6	5,66	0,03
n - 3 / n-6	4,91	0,01

**WP4.1.2 Analisi degli effetti dell'alimentazione (biologica vs. convenzionale) e delle condizioni di allevamento (biologiche vs intensive) sulla forma e anomalie scheletriche in larve e giovanili**

**WP4.1.2.2 Materiali e Metodi**

Sono stati analizzati 644 giovanili selvatici di orata, da utilizzare come riferimento qualitativo per analizzare i giovanili prodotti durante la sperimentazione oggetto di studio (Tab. WP4.1.2.1).

Tab. WP4.1.2.1 Numero di individui e lunghezza standard (mm) dei lotti selvatici analizzati

Codice identificativo	wild1	wild2	wild3	wild4	wild5	wild6	wild7
n. individui	72	88	41	60	16	316	51
media	19,9	19,8	38,1	58,1	20,1	19,3	17,9
min	9,5	11,5	25	52	17	16	16
max	49	44	43	70	22	30	20
err. st.	8,06	7,17	3,52	4,10	1,59	1,92	1,08

Durante il programma di ricerca, è stato svolto un primo campionamento al termine della fase di allevamento larvale, nelle modalità illustrate in Tab. WP4.1.2.2.

Tab. WP4.1.2.2 Caratteristiche dei campionamenti effettuati al termine della fase di allevamento larvale.

Codice	Data	Vasca	Giorni dalla schiusa	Tipo di fissazione	n. individui
OL12_30-32	30/04/2012	VP4 (intensivo – gen. conv)	60	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 150
OL12_33				formalina 5%	≈ 200
OL12_34				liquido di bouin	≈ 20
OL12_35				glutaraldeide 2,5 %	≈ 20
OL12_36-38	30/04/2012	VP7 (intensivo – gen. biol.)	60	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 150
OL12_39				formalina 5%	≈ 200
OL12_40				glutaraldeide 2,5 %	≈ 20
OL12_41				liquido di bouin	≈ 20
OL12_42-44	01/05/2012	V4 (GV – gen. biol.)	61	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 150
OL12_45				formalina 5%	≈ 200
OL12_46				glutaraldeide 2,5 %	≈ 20
OL12_47				liquido di bouin	≈ 20
OL12_48-50	01/05/2012	V8 (GV – gen. conv.)	61	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 150
OL12_51				formalina 5%	≈ 200
OL12_52				glutaraldeide 2,5 %	≈ 20
OL12_53				liquido di bouin	≈ 20

Il giorno 20 di giugno, al termine della fase di svezzamento, è stato effettuato il campionamento finale (vedi Tab. WP4.1.2.3).

Tab. WP4.1.2.3 Caratteristiche dei campionamenti effettuati al termine della fase di svezzamento.

Codice campione	Origine	Giorni dalla schiusa	Tipo di fissazione	N. individui
OL12_54-56	SL6 terra	111	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 90
OL12_57			glutaraldeide 2,5	≈ 20
OL12_58			liquido di bouin	≈ 20
OL12_59			formalina 5%	≈ 200
OL12-60-62	SL6 centro	111	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 90
OL12_63			glutaraldeide 2,5	≈ 20
OL12_64			liquido di bouin	≈ 20
OL12_65			formalina 5%	≈ 200
OL12-66-68	SL6 mare	111	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 90
OL12_69			glutaraldeide 2,5	≈ 20
OL12_70			liquido di bouin	≈ 20
OL12_71			formalina 5%	≈ 200
OL12-72-74	SC8	111	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 90
OL12_75			glutaraldeide 2,5	≈ 20
OL12_76			liquido di bouin	≈ 20

OL12_77			formalina 5%	≈ 200
---------	--	--	--------------	-------

I campioni così prelevati sono stati destinati alle analisi indicate in Tab. WP4.1.2.4.

Tab. WP4.1.2.4 Analisi effettuate sui diversi campioni di giovanili.

Tipo di fissazione	Analisi effettuate
formalina 5%; liquido di bouin; glutaraldeide 2,5%	Morfologiche (studio della forma, monitoraggio delle anomalie scheletriche)
ghiaccio secco (-80°C)	Fisiologiche (cortisolo, osmolarità, contenuto in glucosio, proteine totali e trigliceridi, profilo in acidi grassi)

Per quanto riguarda i campioni destinati alle analisi morfologiche, tutti gli individui campionati sono stati trattati come segue:

- ciascun individuo, precedentemente fissato in formalina al 5-10% (in tampone fosfato 0,1M, pH 7,5), è stato fotografato in aspetto laterale sinistro per mezzo di una Nikon D3X montata su uno stativo di precisione, ed etichettato;
- su ciascun individuo sono state rilevate la lunghezza totale (LT) e standard (LS);
- ciascun esemplare è stato diafanizzato e sottoposto a colorazione selettiva per osso e cartilagine, secondo il metodo di Park e Kim (1984) modificato.

L'analisi della forma, eseguita sulle immagini digitali relative ai lotti PV4 (Piccoli volumi – genitori alimentati con protocollo convenzionale), PV7 (Piccoli volumi – genitori alimentati con protocollo biologico), V4 (Grandi volumi – genitori alimentati con protocollo biologico) e V8 (Grandi volumi – genitori alimentati con protocollo convenzionale), SL6 Mare (Piccoli volumi – alimentati con protocollo convenzionale), SL6 Centro (Grandi volumi – alimentati con protocollo biologico), SL6 Terra (Grandi volumi – alimentati con protocollo convenzionale), ed SC8 (Piccoli volumi – alimentati con protocollo biologico) ha previsto il rilevamento di 15 *landmarks* omologhi di I e II tipo (Bookstein, 1991) mediante il programma TpsDig 2.10 (Rohlf, 2006) su un totale di 285 individui.

Il modello utilizzato per il rilevamento dei *landmarks* nei giovanili di orata analizzati è rappresentato nella Fig. WP4.1.2.1. La pinna pettorale non è stata considerata in quanto non chiaramente individuabile in tutti gli individui.

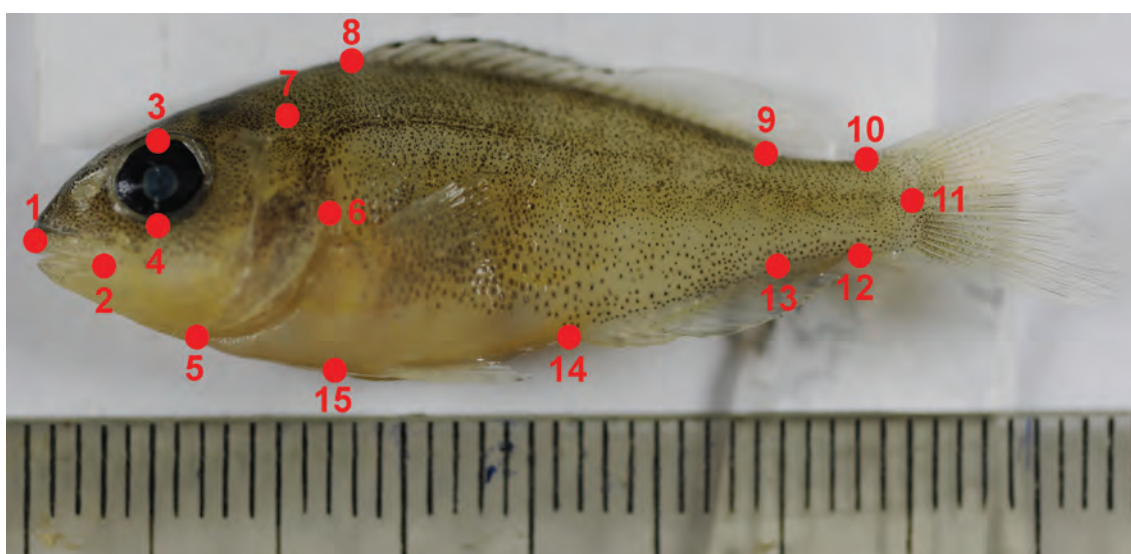


Fig. WP4.1.2.1 Modello dei 15 landmarks utilizzato per la descrizione della variazione della forma nei giovanili di orata. 1: apice rostrale; 2: estremità posteriore del premascellare; 3-4: diametro dell'occhio; 5: intersezione tra l'opercolo e il profilo ventrale del corpo; 6: punto di maggiore estensione laterale dell'opercolo; 7: estremità superiore dell'opercolo; 8-9: punti di inserzione anteriore e posteriore della pinna dorsale; 10 e 12: punti di inserzione superiore ed inferiore della pinna caudale; 11: estremità posteriore del peduncolo; 13-14: punti di inserzione posteriore ed anteriore della pinna anale; 15: punto di inserzione della pinna pelvica.

I landmarks successivamente sono stati convertiti in coordinate della forma mediante una procedura iterativa detta *General Procrustes Superimposition* (Rohlf e Slice, 1990). Le tecniche di *superimposition* realizzano una sovrapposizione iterativa ottimale di ogni individuo (*target*) su un altro individuo considerato di riferimento, in modo che i loro rispettivi landmarks si allineino il più possibile. I residui sono poi analizzati con la funzione di interpolazione *thin plate spline* (TPS) (Bookstein, 1991), una tecnica di deformazione parsimoniosa che predice le differenze di forma tra la configurazione di riferimento e la configurazione target. Questa funzione minimizza l'energia richiesta per la deformazione (energia di curvatura o *bending energy*). L'energia ideale richiesta per tale deformazione viene espressa mediante la matrice di energia di curvatura (*bending energy matrix*), generata invertendo una matrice ottenuta dalle distanze tra i punti e le coordinate dell'oggetto di riferimento. L'analisi spettrale della matrice di energia fornisce vettori ortogonali (le deformazioni principali o *principal warps*), ovvero costrutti matematici analoghi alle componenti principali. Dalle deformazioni principali vengono derivati i punteggi di deformazione parziale, o *partial warp scores*. Questi punteggi vengono riassunti in un vettore di lunghezza e quindi organizzati nella cosiddetta *Weight matrix* (W), sulla quale è possibile eseguire le varie tecniche di analisi multivariata.

Tab. WP4.1.2.5 Centroid sizes dei lotti sperimentali.

Lotto	n	CS <sup>1</sup> (media±Dev.St.)
PV4	64	1.95±0.16
PV7	66	1.99±0.16
V4	74	2.22±0.14
V8	81	2.35±0.12

<sup>1</sup>Centroid size o taglia centroide (spiegazioni nel testo)

Nonostante tutti gli individui analizzati abbiano la stessa età, poiché campionati 60 e 111 giorni dopo la schiusa, permangono differenze di taglia tra gli individui, come verificato mediante il test di Kruskal-Wallis (individui campionati a 60 gg:  $H = 60.99$ ,  $p < 0.001$ ; individui campionati a 111 gg:  $H = 10.18$ ,  $p < 0.05$ ) eseguito sulle taglie centroidi (CS; vedi Tab.

WP4.1.2.5). Tali differenze di taglia possono tradursi in differenze di forma non imputabili alle modalità di allevamento di interesse nel presente progetto, quanto piuttosto al differente grado di sviluppo degli individui. Per questo motivo, si è voluto procedere eliminando dai dati di partenza le differenze di forma dovute ad allometria mediante una regressione multivariata. Le analisi sono state quindi eseguite sui residui della regressione multivariata della forma sulla taglia centroide (CS - Bookstein, 1991), al fine di rimuovere l'effetto dell'allometria (Viscosi e Cardini, 2011). Sui residui della regressione sono state eseguite le seguenti analisi statistiche:

- *Analisi delle Componenti Principali* (PCA), al fine di visualizzare il morfospazio e la ripartizione dei lotti analizzati nello stesso, per poter estrarre le configurazioni caratteristiche delle differenti modalità di allevamento (allevamento biologico (Grandi Volumi) vs allevamento convenzionale (intensivo o Piccoli Volumi) – Broodstock Biologico vs Convenzionale);
- *Analisi delle Variate Canoniche* (CVA), al fine di ottenere la migliore separazione dei quattro lotti analizzati sulla base del dato morfometrico e di validare statisticamente il risultato ottenuto nella PCA;
- *Analisi Discriminante* (DA), eseguita sui lotti ripartiti in due categorie (Grandi Volumi e Piccoli Volumi – Convenzionale e Biologico), corredata da *leave on out cross-validation* (Weiss e Kulikowski, 1991).

Per realizzare un confronto tra la forma degli individui allevati con quella dei selvatici sono stati selezionati gli individui ( $n = 36$ ) di taglia più simile a quella dei lotti selvatici considerati nel presente progetto. Su un nuovo set di dati comprendente i suddetti individui selvatici è stata effettuata un'Analisi delle Variate Canoniche.

Tutte le analisi sono state eseguite con il software MorphoJ (Klingenberg, 2007).

Gli stessi individui fotografati sono stati quindi colorati *in toto* con coloranti specifici per il tessuto osseo (rosso alizarina) e cartilagineo (blu Alcian) e diafanizzati, secondo il protocollo di Dingerkus e Uhler, 1977, e quindi sottoposti alla conta dei caratteri meristici e all'analisi delle anomalie scheletriche. L'osservazione è stata condotta ad uno stereo microscopio WILD, su entrambi i lati del corpo e da 2 operatori diversi.

I caratteri meristici considerati sono: le vertebre (incluso l'urostilo), gli elementi di sostegno interno delle pinne (epurali, ipurali, paraipurale, pterigiofori, radiali); i raggi delle pinne impari (dorsale, anale e caudale) e pari (pettorali e pelviche). I raggi duri o spine e i raggi morbidi della pinna dorsale sono stati contati separatamente, mentre quelli della pinna anale sono stati contati insieme; per i raggi della pinna caudale sono stati considerati i raggi principali superiori ed inferiori. Nelle conte meristiche sono state considerate anche le ossa predorsali. Per ogni carattere meristico sono stati calcolati i valori di mediana, moda, deviazione standard e range (valori minimo e massimo osservati); i dati sono stati presentati in tabelle.

Le diverse tipologie malformative sono state registrate utilizzando un riferimento dicotomico (vedi Tab. WP4.1.2.5), nel quale la lettera indica la regione del corpo affetta da anomalie (dalla A ad L), mentre il numero indica il tipo di anomalia (da 1 a 29).

Le anomalie considerate gravi sono quelle la cui presenza altera la forma esterna del pesce e che possono comprometterne le performances (alimentazione, nuoto) o anomalie, come la presenza di calcoli nei dotti urinari, riportate in letteratura come letali.

Dalla matrice ottenuta dai dati ottenuti dall'analisi delle anomalie scheletriche sono state calcolate le seguenti variabili derivate:

- la frequenza totale (%) di individui malformati;
- l'indice malformativo totale ( $n^\circ$  di anomalie osservate/ $n^\circ$  di individui malformati)
- la frequenza (%) di individui con anomalie gravi;
- l'incidenza delle anomalie gravi sul totale delle anomalie osservate ( $n^\circ$  anomalie gravi/ $n^\circ$  anomalie totali osservate);
- l'indice di anomalie gravi ( $n^\circ$  di anomalie gravi/ $n^\circ$  di individui con anomalie gravi);
- le frequenze (%) di ogni tipo di anomalia sul totale delle anomalie osservate;
- le frequenze (%) di anomalie per regione sul totale delle anomalie osservate.



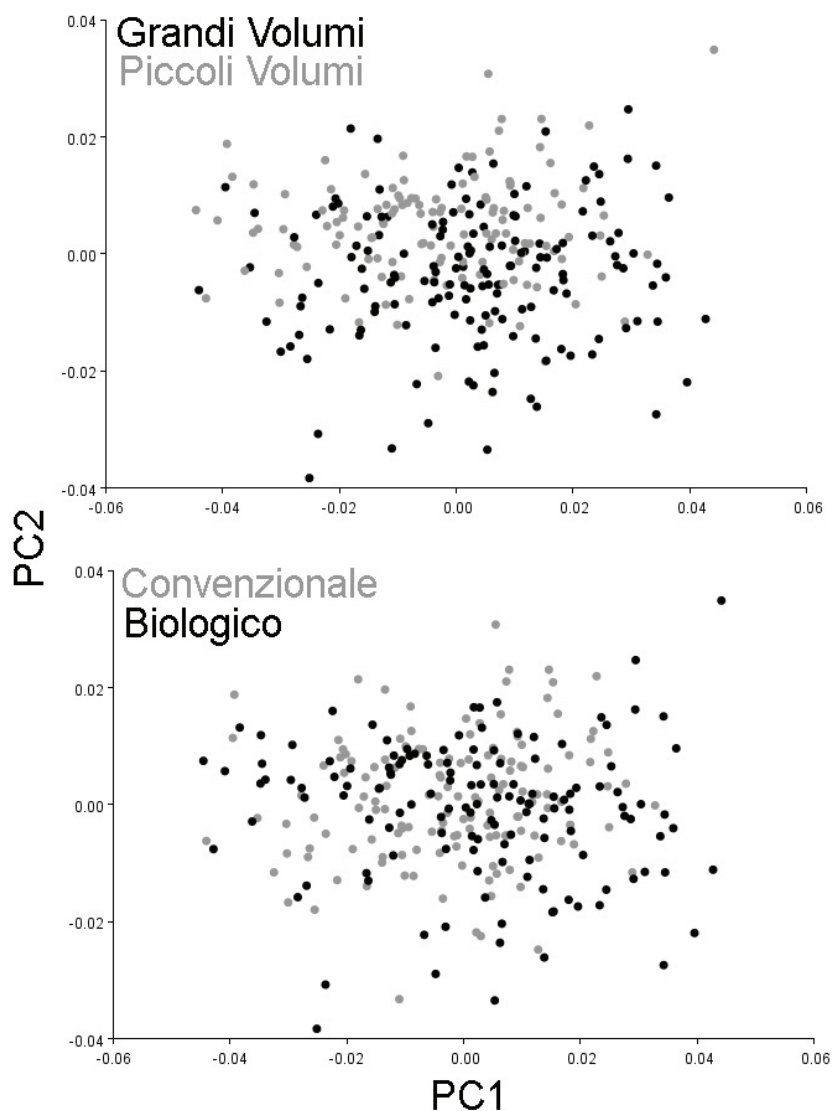
Tab. WP4.1.2.5 Legenda delle anomalie considerate. In grassetto sono evidenziate le anomalie considerate gravi

REGIONE	A	Vertebre cefaliche (con coste epipleurali)
	B	Vertebre pre-emali (con coste epipleurali e pleurali e con arco emale aperto, senza emaspina)
	C	Vertebre emali (con arco emale chiuso da emaspina)
	D	Vertebre caudali (con spine modificate in palette natatorie)
	E	Pinna pettorale
	F	Pinna anale
	G	Pinna caudale
	H	Regione dei raggi duri (spine) della pinna dorsale
	I	Regione dei raggi morbidi (lepidotrichi) della pinna dorsale
	L	Pinna pelvica
	TIPO	S
1		Lordosi
2		Cifosi
3		Parziale fusione vertebrale
3*		Fusione vertebrale completa
4		Deformazione corpo vertebrale
5		Arco neurale e/o neurospina anomala
5*		Arco neurale e/o neurospina soprannumeraria
6		Arco emale e/o emaspina anomalo/a
6*		Arco emale e/o emaspina soprannumeraria
7		Costa pleurale deformata
7*		Costa pleurale soprannumeraria
7		Raggio anomalo (deformato, assente, fuso, soprannumerario)
8		Pterigioforo deformato (assente, fuso, soprannumerario)
9		Ipurale anomalo (deformato, assente, fuso, soprannumerario)
9*		Paraipurale anomalo o fuso oppure spezzato e fuso con ipurale o con emaspina
10		Epurale anomalo (deformato, assente, fuso, soprannumerario)
11		Raggio anomalo(deformato, assente, fuso, soprannumerario)
12		Assenza di vescica natatoria
14		Mascellare o premaxillare anomalo
15		Dentale anomalo
16		Altre anomalie craniali (glossoiale/neurocranio)
17sx		Opercolo sinistro deformato o ridotto
17dx		Opercolo destro deformato o ridotto
17*sx		Raggi branchiostegi di sinistra deformati, assenti o fusi
17*dx		Raggi branchiostegi di destra deformati, assenti o fusi
18		Osso predorsale anomalo
19		Ipurale con decalcificazioni
20		Pterigiofori con decalcificazioni
21		Setto intercostale
22		Spine miosettali dorsali anomale
23		Spine miosettali ventrali anomale
24sx		Piastra opercolare sinistra con decalcificazioni
24dx		Piastra opercolare destra con decalcificazioni
25		Epurale decalcificato
26		Ossificazione soprannumeraria
27	Urostilo decalcificato	
28	Difetti di ossificazione di vertebre	
29	Post cleitro deformato	
Cl sx	Cleitro sinistro anomalo	
Cl dx	Cleitro destro anomalo	
Cor sx	Coracoide sinistro anomalo	
Cor dx	Coracoide destro anomalo	

#### WP4.1.2.1 Risultati del monitoraggio della qualità larvale: l'analisi della forma

L'analisi in componenti principali (PCA) non ha separato chiaramente i quattro lotti analizzati alla fine della fase di avannotteria sulla base del dato morfometrico (Fig. WP4.1.2.2). Questi ultimi risultano infatti ampiamente sovrapposti nello spazio dell'ordinamento. Tuttavia, se i lotti vengono ripartiti in relazione alla tipologia di allevamento (Grandi Volumi vs Piccoli Volumi), si osserva una tendenza dei lotti a separarsi sul secondo asse dell'ordinamento (PC2 – 10,8%). Gli individui allevati in grandi volumi si collocano preferenzialmente nel semiasse negativo, mentre quelli allevati in piccoli volumi nel semiasse positivo. Al contrario, questa differenziazione non è evidente nel caso in cui si prenda in considerazione la seconda categoria: genitori convenzionali vs. genitori biologici.

Fig. WP4.1.2.2 Analisi in Componenti Principali che mostra la ripartizione nello spazio dell'ordinamento degli individui di orata analizzati in relazione alle quattro categorie considerate: Grandi Volumi (avannotteria biologica) vs. Piccoli Volumi (avannotteria convenzionale; grafico in alto) e Genitori alimentati con alimento convenzionali vs. Genitori alimentati con mangime biologico (in basso).

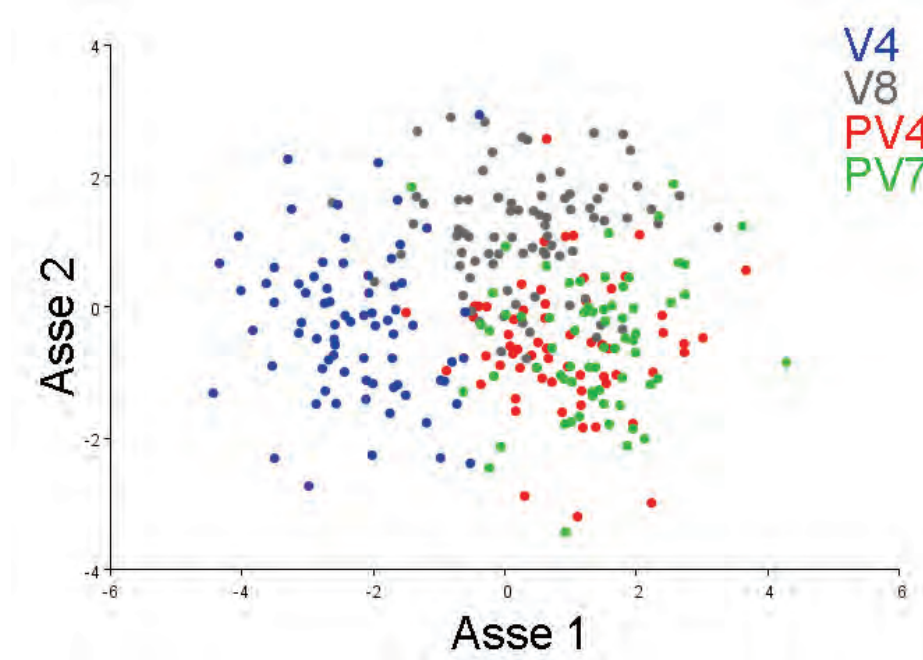


L'Analisi delle Variate Canoniche (CVA; Fig. WP4.1.2.3) separa i lotti sostanzialmente in due cluster sul primo asse, che spiega il 73% della varianza: V4 risulta isolato nel semiasse negativo rispetto ad un cluster formato dai restanti tre lotti. Sul secondo asse invece, che spiega il 19,4% della varianza, il lotto V8 si separa da un cluster costituito dai lotti allevati in piccoli volumi, che risultano essere

WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci (Obiettivo B)

ampiamente sovrapposti, indipendentemente dall'origine dei riproduttori (convenzionali o biologici).

Fig. WP4.1.2.3 Ordinamento ottenuto dall'Analisi delle Variate Canoniche eseguita sugli individui di orata ripartiti in lotti. V4: Grandi Volumi – genitori Biologici; V8: Grandi Volumi – genitori Convenzionali; PV4: Piccoli Volumi – genitori Convenzionali; VP7: Piccoli Volumi – genitori Biologici.



Il peso maggiore esercitato dalla densità di allevamento sulla modulazione della forma esterna del corpo rispetto al tipo di alimentazione fornita ai riproduttori (convenzionale o biologica) è evidente dall'osservazione dei risultati dell'Analisi Discriminante (DA; Fig. WP4.1.2.4).

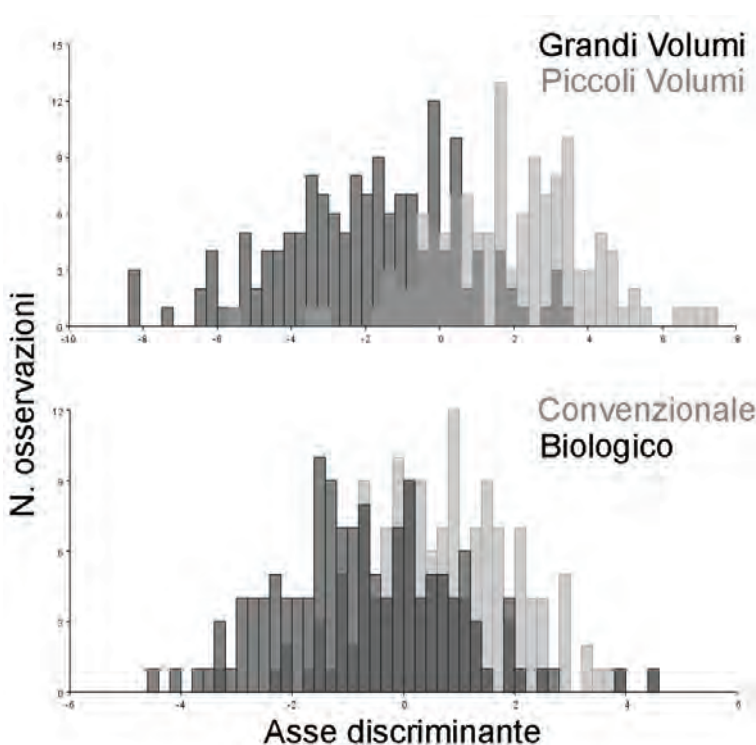


Fig. WP4.1.2.4 I grafici a lato riportano i risultati dell'Analisi Discriminante eseguita ripartendo i lotti in quattro categorie: Grandi Volumi vs. Piccoli Volumi e genitori a dieta convenzionale vs. genitori a dieta biologica.

Come si osserva dagli istogrammi concernenti i punteggi degli individui sull'asse discriminante, anche questa analisi evidenzia il maggior potere discriminante da attribuire alla densità di allevamento, mentre nel caso della categoria alimentazione dei riproduttori convenzionale/biologica la sovrapposizione tra gli individui è molto marcata. Questo è stato ulteriormente confermato dai risultati della validazione incrociata, riportati nella tabella che segue, in cui si osserva come le percentuali di corretta attribuzione siano più alte nel

caso di lotti ripartiti tra grandi e piccoli volumi (percentuali superiori all'80%).

Tab. WP4.1.2.5 Risultati della validazione incrociata tra lotti allevati in diverse condizioni indipendentemente dalla dieta dei genitori: percentuali di corretta attribuzione.

	Attribuito a		% corretta
	Grandi Volumi	Piccoli Volumi	
Grandi Volumi	128	27	82,6
Piccoli Volumi	17	113	86,9

Tab. WP4.1.2.6 Risultati della validazione incrociata tra lotti provenienti da genitori alimentati con diete diverse: percentuali di corretta attribuzione.

	Attribuito a		% corretta
	Genitori Convenzionali	Genitori Biologici	
Genitori Convenzionali	94	46	67,1
Genitori Biologici	46	99	68,3

Dagli splines relativi ai due estremi del secondo asse della PCA (PC2; Fig. WP4.1.2.5) si osserva come le differenze di forma siano principalmente relative al profilo del corpo, più alto, soprattutto in corrispondenza della regione cefalica, negli individui allevati in grandi volumi. L'occhio appare in questi ultimi di maggiori dimensioni e l'orientamento della bocca più terminale. La base di inserzione della pinna anale è più corta con il punto di inserzione posteriore più distante dalla pinna caudale. Infine, il peduncolo caudale risulta più stretto.

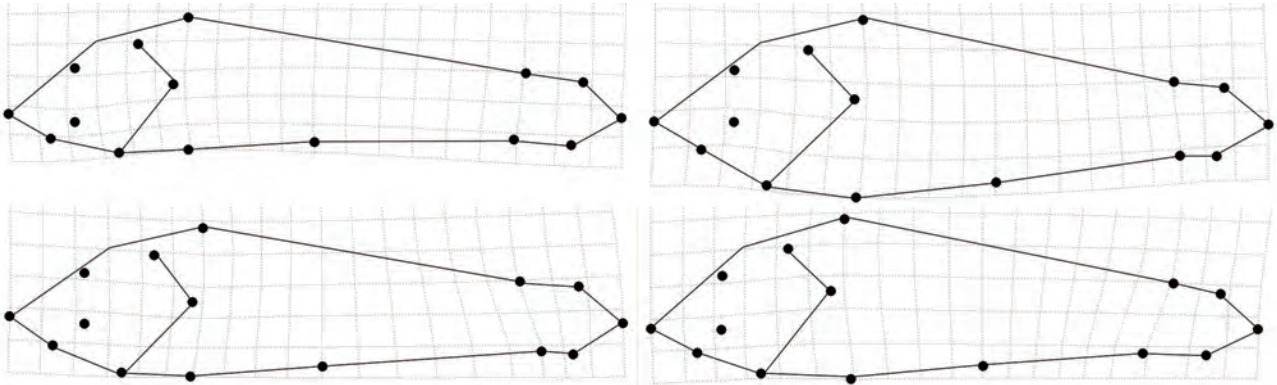


Fig. WP4.1.2.5 Splines relativi agli estremi dei primi due assi della PCA: a sinistra quelli relativi al PC1, a destra quelli relativi al PC2.

Gli individui selvatici utilizzati come riferimento si collocano in posizione separata dagli individui allevati lungo il primo asse dell'Analisi delle Variate Canoniche (86,2%; Fig. WP4.1.2.6), con una parziale sovrapposizione al lotto V4, che risulta quindi caratterizzato dalla forma più simile al selvatico e le cui condizioni di allevamento sono da considerare le più adeguate allo sviluppo della

specie in esame, almeno fino a questo stadio di sviluppo.

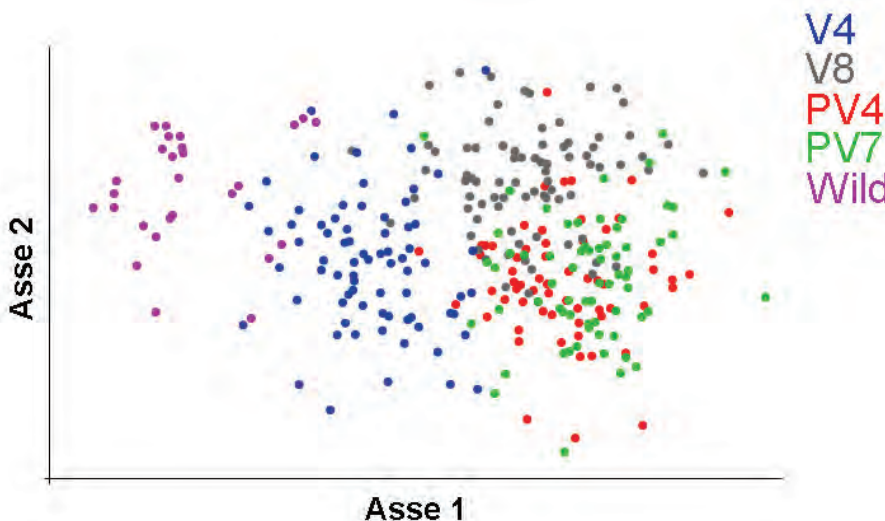
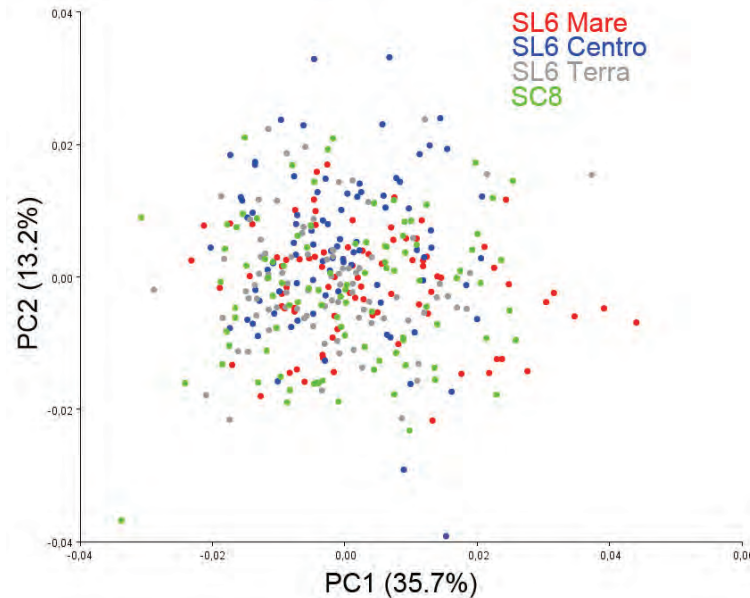


Fig. WP4.1.2.6 Ordinamento ottenuto dall'Analisi delle Variate Canoniche eseguita sugli individui di orata allevati (V4: Grande Volume – genitori Biologici; V8: Grande Volume – genitori Convenzionali; PV4: Piccolo Volume – genitori Convenzionali; PV7: Piccolo Volume – genitori Biologici) e selvatici (Wild).

### Individui campionati 111 giorni dopo la schiusa

Come nel caso degli individui campionati 60 giorni dopo la schiusa, l'Analisi in Componenti Principali non separa i lotti nello spazio dell'ordinamento (Fig. WP4.1.2.7), i quali si presentano ampiamente sovrapposti.

Fig. WP4.1.2.7 Analisi in Componenti Principali che mostra la ripartizione nello spazio dell'ordinamento degli individui di orata campionati a 111 giorni.



Se ripartiti in relazione alla tipologia di allevamento (Grandi Volumi vs Piccoli Volumi), si osserva anche in questo caso una tendenza dei lotti a separarsi sul secondo asse dell'ordinamento (PC2 – 13,2%) (Fig. WP4.1.2.8). L'ordinamento ricalca sostanzialmente quello osservato nel caso degli individui campionati a 60 giorni, indicando che la variazione di forma si è mantenuta costante nel tempo. Gli individui allevati in grandi volumi si collocano preferenzialmente nel semiasse negativo, mentre quelli allevati in piccoli volumi nel semiasse positivo. Al contrario, questa differenziazione non è evidente nel caso in cui si prenda in considerazione la seconda categoria: genitori convenzionali vs. genitori biologici. Tuttavia, ancora una volta, non c'è differenziazione dei lotti in relazione all'alimentazione dei genitori (figura non riportata).

L'Analisi delle Variate Canoniche (CVA; Fig. WP4.1.2.9) separa i lotti sostanzialmente in tre cluster sul primo asse, che spiega il 65.18% della varianza: un primo cluster costituito da SL6 Mare e SL6 Terra, nella porzione negativa dell'asse, un secondo cluster costituito da SL6 Centro, ed un terzo cluster costituito da SC8, nella porzione positiva dell'asse. Sul secondo asse (26.93%), il lotto SL6 Centro è isolato rispetto ad un cluster costituito dai restanti tre lotti.

WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci (Obiettivo B)

Fig. WP4.1.2.8 Analisi in Componenti Principali che mostra la ripartizione nello spazio dell'ordinamento degli individui di orata campionati a 111 giorni in relazione alla tipologia di allevamento Grandi Volumi (avannotteria biologica) vs. Piccoli Volumi (avannotteria convenzionale).

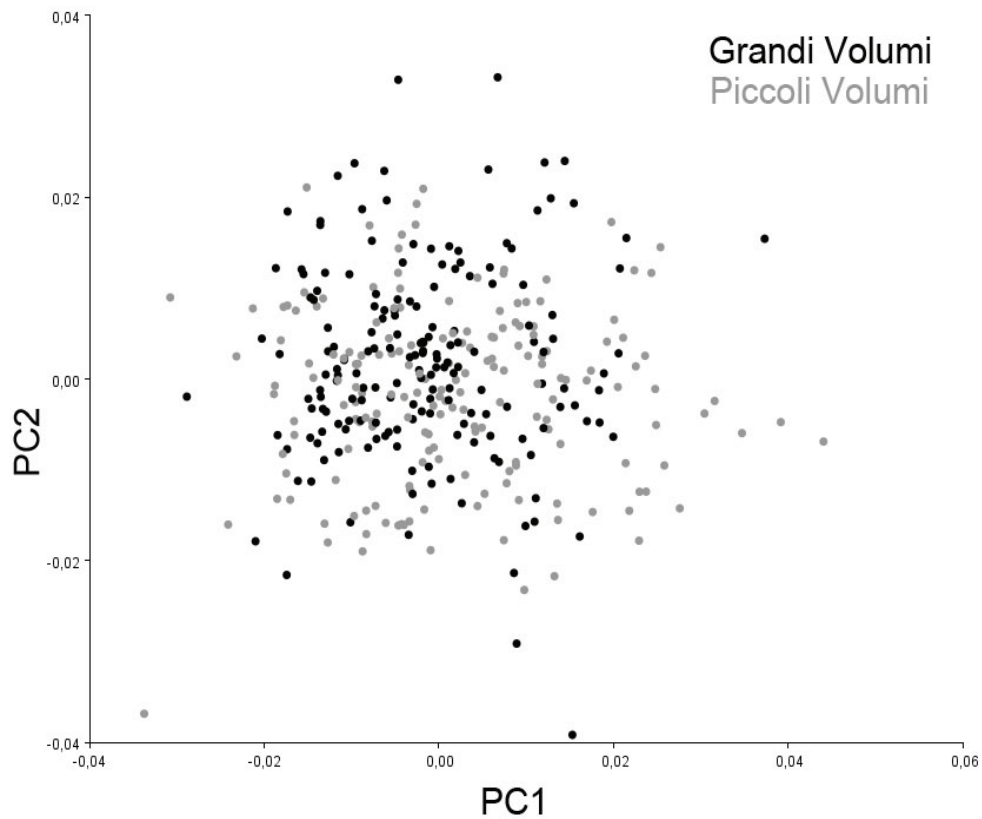
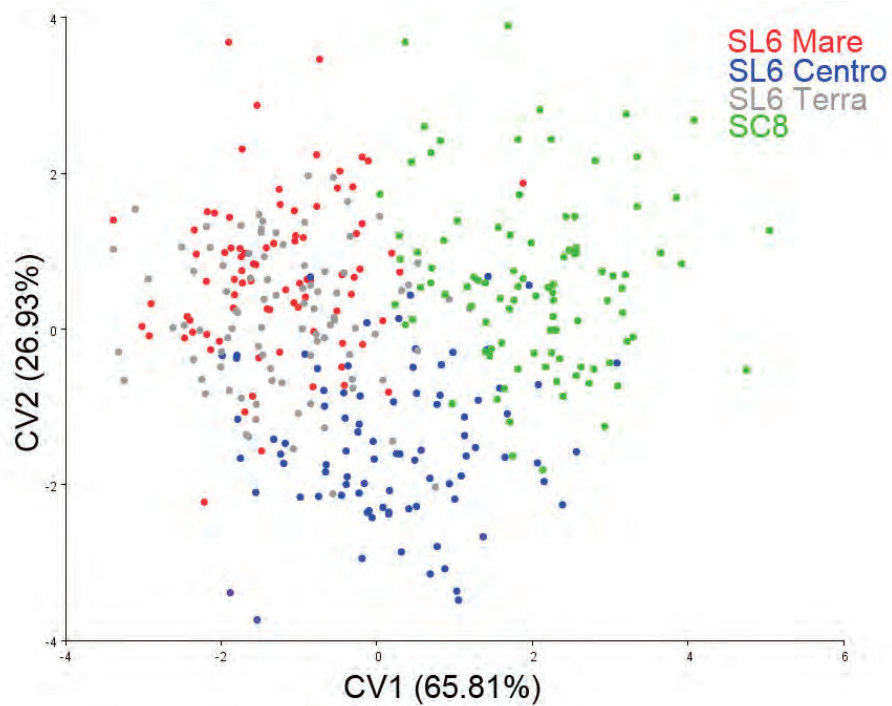


Fig. WP4.1.2.9 Ordinamento ottenuto dall'Analisi delle Variate Canoniche eseguita sugli individui di orata campionati a 111 giorni (SL6 Mare: Piccolo Volume – genitori Convenzionali; SL6 Centro: Grande Volume – genitori Biologici; SL6 Terra: Grande Volume – genitori Convenzionali; SC8: Piccolo Volume – genitori Biologici).

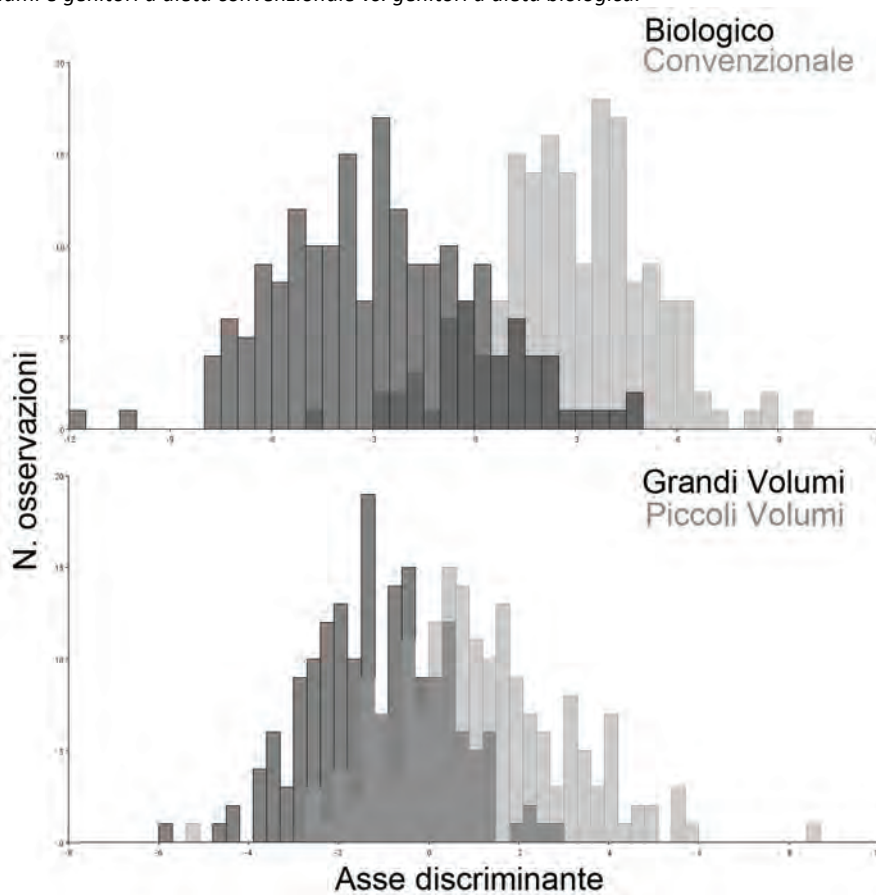


I risultati dell'Analisi Discriminante sono coerenti con quanto osservato nella PCA e nei lotti campionati a 60 giorni. Come si osserva dagli istogrammi concernenti i punteggi degli individui sull'asse discriminante (Fig. WP4.1.2.10), maggior potere discriminante è da attribuire alla densità di allevamento, mentre nel caso della categoria alimentazione dei riproduttori convenzionale/biologica la sovrapposizione tra gli individui è più marcata. I risultati della validazione incrociata, riportati nella tabella WP4.1.2.7, mostrano come le percentuali di corretta attribuzione siano più alte nel caso di lotti ripartiti tra grandi e piccoli volumi (percentuali superiori all'80%).

Tab. WP4.1.2.7 Risultati della validazione incrociata tra lotti allevati in diverse condizioni (Grandi o Piccoli Volumi/Genitori alimentati con mangime convenzionale o biologico): percentuali di corretta attribuzione.

	Attribuito a		% corretta
	Biologico	Convenzionale	
<b>Biologico</b>	135	43	76,8
<b>Convenzionale</b>	48	133	73,5
	Grandi Volumi	Piccoli Volumi	
<b>Grandi Volumi</b>	152	33	82,2
<b>Piccoli Volumi</b>	22	152	87,4

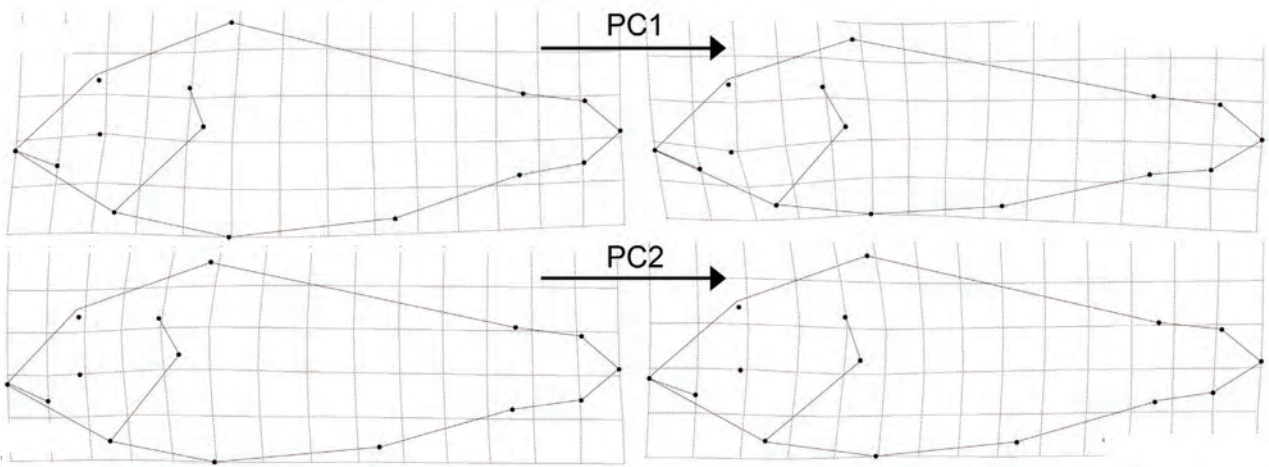
Fig. WP4.1.2.10 Risultati dell'Analisi Discriminante eseguita ripartendo i lotti campionati 111 gds in quattro categorie: Grandi Volumi vs. Piccoli Volumi e genitori a dieta convenzionale vs. genitori a dieta biologica.



Dagli splines relativi ai due estremi del primo asse della PCA (PC1; Fig. WP4.1.2.8) si osserva come le differenze di forma tra individui allevati in grandi e piccoli volumi siano principalmente relative al profilo del corpo, più alto, soprattutto in corrispondenza della regione cefalica, negli individui allevati in grandi volumi. Le differenze di forma si accentuano con la crescita: rispetto ai lotti campionati 60 gds, infatti, le differenze risultano più evidenti. Una bocca più corta e terminale, un

occhio di minori dimensioni, ed un peduncolo caudale più alto e corto caratterizzano gli individui allevati in grandi volumi.

Fig. WP4.1.2.11 Splines relativi agli estremi dei primi due assi della PCA (in alto PC1, in basso PC2) eseguita sui lotti campionati 111 dgs.





WP4.1.2.3 Risultati del monitoraggio della qualità larvale: le anomalie dello scheletro

Le conte meristiche e l'analisi delle anomalie scheletriche sono state condotte su un totale di 800 orate, 400 campionate alla fine della fase di allevamento larvale (60-61 giorni dalla schiusa, gds) e 400 alla fine del svezzamento (111 gds).

I risultati delle conte meristiche sono riportati nelle Tab. WP4.1.2.7 e 8.

Tab. WP4.1.2.7 Risultati riassuntivi delle conte meristiche effettuate su postlarve di orata sperimentali alla fine della fase di avannotteria (60/61 gds). Le conte in grassetto evidenziano differenze tra lotti fratelli in qualsiasi dei valori; le celle gialle indicano differenze nei valori di mediana.

	Valori	Vertebre	Pinna caudale				Pinna anale		Pinna dorsale					Pinna pettorale				Pinna pelvica		
			Ipurali	Epurali	Raggi caud. Sup.	Raggi caud. Inf.	Pterig.	Raggi	Ossa predorsali	Pterig. I dorsale	Raggi I dorsale	Pterig. II dorsale	Raggi II dorsale	Raggi pettorali sx	Raggi pettorali dx	Radiali sx	Radiali dx	Raggi sx	Raggi dx	
BIOLOGICO	V4 (GV - gen bio)	Mediana	24	6	<b>4</b>	9	8	13	15	3	10	11	13	14	<b>15</b>	<b>15</b>	4	4	6	6
		Min	23	4	3	8	7	<b>12</b>	14	3	<b>9</b>	<b>10</b>	12	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	4	<b>5</b>	<b>5</b>
		Max	25	6	<b>5</b>	9	9	<b>15</b>	<b>17</b>	3	<b>12</b>	<b>13</b>	14	15	16	<b>16</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	6	6
	VP7 (intensivo - gen bio)	Mediana	24	6	<b>5</b>	9	8	13	15	3	10	11	13	14	<b>14</b>	<b>14</b>	4	4	6	6
		Min	23	4	3	8	7	<b>13</b>	14	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	12	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	4	4	<b>6</b>	<b>6</b>
		Max	25	6	<b>6</b>	9	9	<b>14</b>	<b>16</b>	3	<b>11</b>	<b>12</b>	14	15	16	<b>15</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	6	6
CONVENZIONALE	V8 (GV - gen conv)	Mediana	<b>24</b>	6	<b>5</b>	9	8	<b>13</b>	<b>15</b>	3	10	11	<b>12</b>	14	15	15	4	4	6	<b>6</b>
		Min	23	4	3	<b>9</b>	7	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	4	4	<b>5</b>	<b>5</b>
		Max	25	6	6	<b>10</b>	9	15	17	4	<b>11</b>	11	<b>14</b>	16	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	6	6
	VP4 (intensivo - gen conv)	Mediana	<b>25</b>	6	<b>4</b>	9	8	<b>14</b>	<b>16</b>	3	10	11	<b>13</b>	14	15	15	4	4	6	6
		Min	23	4	3	<b>8</b>	7	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	14	<b>14</b>	4	4	6	<b>5</b>
		Max	25	6	6	<b>9</b>	9	15	17	4	<b>10</b>	11	<b>15</b>	16	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>6</b>

Tab. WP4.1.2.8 Risultati riassuntivi delle conte meristiche effettuate su postlarve di orata sperimentali alla fine della fase di fine svezzamento (111 gds). Le conte in grassetto evidenziano differenze tra lotti fratelli in qualsiasi dei valori; le celle gialle indicano differenze nei valori di mediana.

	Valori	Vertebre	Pinna caudale				Pinna anale		Pinna dorsale					Pinna pettorale				Pinna pelvica		
			Ipurali	Epurali	Raggi caud. Sup.	Raggi caud. Inf.	Pterig.	Raggi	Ossa predorsali	Pterig. I dorsale	Raggi I dorsale	Pterig. II dorsale	Raggi II dorsale	Raggi pettorali sx	Raggi pettorali dx	Radiali sx	Radiali dx	Raggi sx	Raggi dx	
BIOLOGICO	SC8 (intensivo - gen bio)	Mediana	24	6	<b>3</b>	9	8	13	15	3	10	11	13	14	15	15	4	4	6	6
		Min	23	4	2	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	15	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	12	13	<b>14</b>	14	4	<b>3</b>	6	6
		Max	25	7	<b>5</b>	9	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	14	15	16	16	4	4	6	6
	SC8 (intensivo - gen bio)	Mediana	24	6	<b>4</b>	9	8	13	15	3	10	11	13	14	15	15	4	4	6	6
		Min	23	4	2	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	15	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	12	13	<b>13</b>	14	4	<b>4</b>	6	6
		Max	25	7	<b>6</b>	9	9	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	14	15	16	16	4	4	6	6
CONVENZIONALE	SL6T (GV - gen conv)	Mediana	24	6	4	9	8	<b>13</b>	<b>15</b>	3	10	11	13	14	15	15	4	4	6	6
		Min	<b>23</b>	4	2	8	<b>7</b>	13	14	3	9	10	<b>11</b>	13	14	14	<b>3</b>	<b>3</b>	6	6
		Max	25	6	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	17	3	11	<b>12</b>	14	15	16	16	4	4	<b>6</b>	6
	SL6M (intensivo - gen conv)	Mediana	24	6	4	9	8	<b>14</b>	<b>16</b>	3	10	11	13	14	15	15	4	4	6	6
		Min	<b>24</b>	4	2	8	<b>8</b>	13	14	3	9	10	<b>12</b>	13	14	14	<b>4</b>	<b>4</b>	6	6
		Max	25	6	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	3	11	<b>13</b>	14	15	16	16	4	4	<b>8</b>	6

Come evidenziato dalla colorazione dello sfondo di alcune celle e dal tipo di carattere dei valori nelle tabelle, si osserva la presenza di variazioni nelle conte meristiche indotte dalle condizioni di allevamento larvale. Mentre nei campioni al termine della fase di allevamento larvale tutti i caratteri meristici considerati, tranne il numero dei raggi caudali inferiori e degli ipurali, presentano variazioni nelle conte, e ben sette caratteri riportano variazioni nel valore della mediana, nei giovanili alla fine della fase di svezzamento gli ipurali, il numero dei raggi della pinna pettorale destra e della pinna pelvica destra non mostrano nessuna variazione e solo 3 caratteri (il numero degli epurali, dei pterigiofori e raggi anali) mostrano differenze nei valori di mediana. I risultati generali ottenuti dall'analisi delle anomalie nella forma degli elementi scheletrici sono riportati nelle Tab. WP4.1.2.9-10, dove in giallo sono state evidenziate le differenze tra lotti fratelli (provenienti dallo stesso gruppo di genitori):

WP4.1.2.9 Risultati generali del monitoraggio delle anomalie nella forma degli elementi scheletrici nei lotti oggetto di studio. Dati relativi alle orate campionate alla fine dell'allevamento larvale (60/61 gds)

	Broodstock Biologico		Broodstock Convenzionale	
	V4 (GV - gen bio)	VP7 (int - gen bio)	V8 (GV - gen conv)	VP4 (int - gen conv)
Individui osservati	100	100	100	100
% Individui malformati	65	79	58	75
Indice malformativo	1,9	2,1	2,1	2,7
Numero tipologie osservate	22	21	20	23
Anomalie gravi/Anomalie totali	0,2	0,2	0,2	0,4
% individui con anomalie gravi	17	31	16	47
Indice anomalie gravi	1,7	1,3	1,4	1,9

WP4.1.2.10 Risultati generali del monitoraggio delle anomalie nella forma degli elementi scheletrici nei lotti oggetto di studio. Dati relativi alle orate campionate alla fine della fase di svezzamento (111 gds).

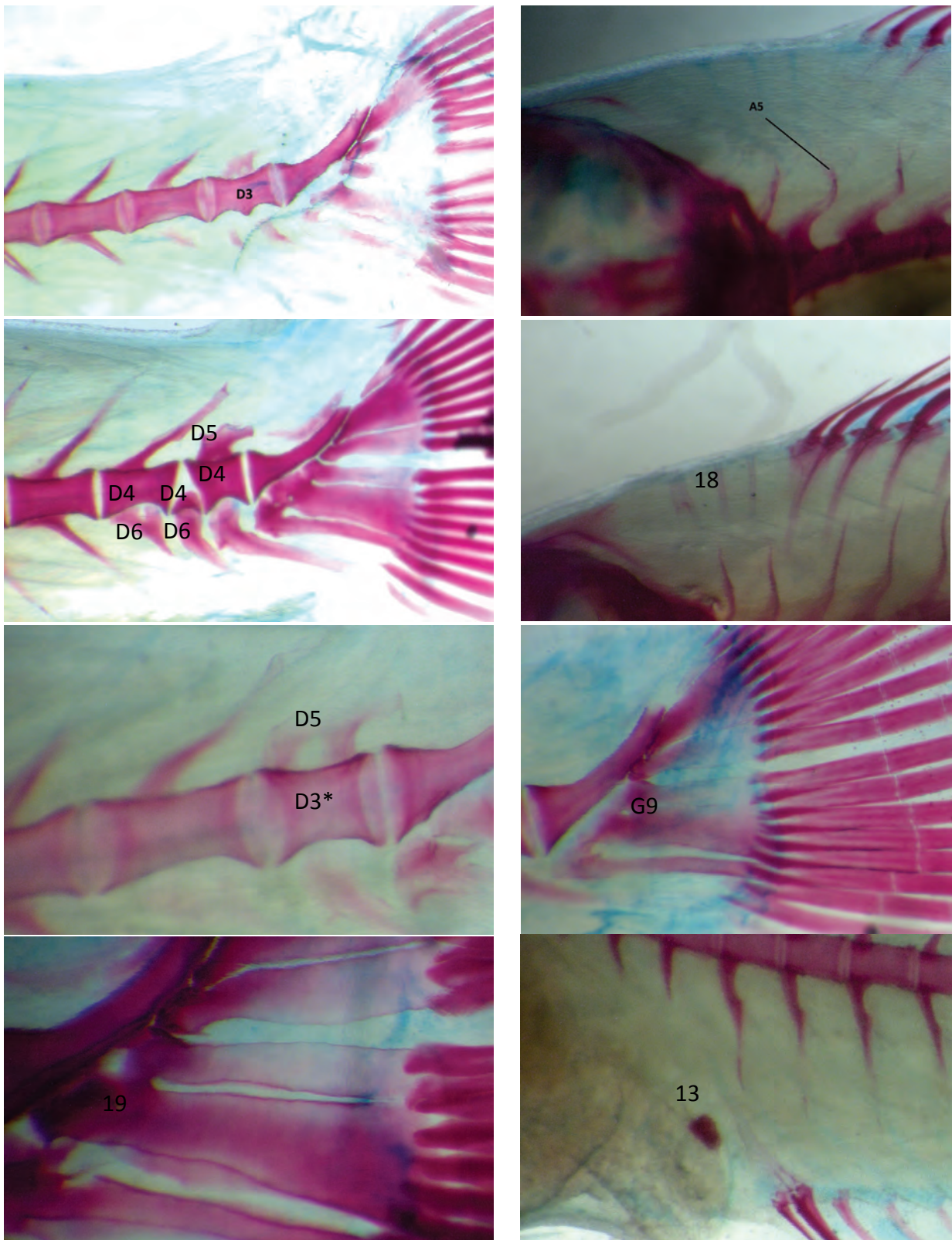
	Broodstock Biologico		Broodstock Convenzionale	
	SL6C (GV - gen bio)	SC8 (intensivo - gen bio)	SL6T (GV - gen conv)	SL6M (intensivo - gen conv)
Individui osservati	100	100	100	100
% Individui malformati	92	94	89	99
Indice malformativo	4,2	3,6	3,9	5,8
Numero tipologie osservate	30	27	27	33
Anomalie gravi/Anomalie totali	0,05	0,1	0,04	0,1
% individui con anomalie gravi	13	22	11	34
Indice anomalie gravi	1,5	1,9	1,2	1,5

Come evidente dalle tabelle, al termine di entrambe le fasi di allevamento, i lotti allevati in grandi volumi mostrano sempre frequenze inferiori di individui con anomalie gravi rispetto ai lotti fratelli allevati in intensivo, a prescindere dal regime alimentare fornito ai riproduttori. Va comunque evidenziato come le differenze riscontrate tra i lotti ottenuti da genitori alimentati con dieta convenzionale mostrino praticamente tutti (celle in giallo nelle tabelle) valori delle variabili derivate più bassi nei lotti allevati in Grandi Volumi, a prescindere dall'età.

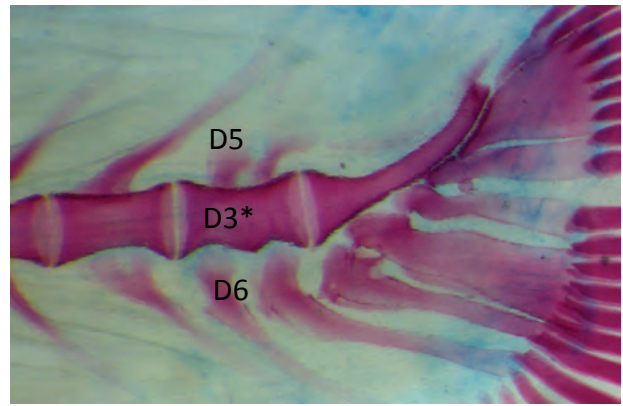
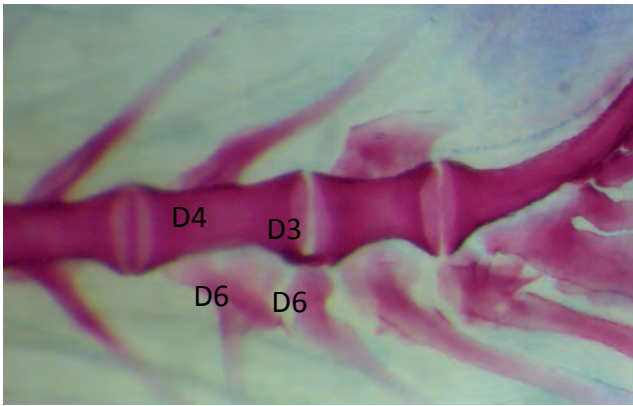
Per quanto riguarda un'analisi più dettagliata delle anomalie scheletriche, di seguito sono mostrate alcune fotografie di qualche anomalia scheletrica rilevata (Fig. WP4.1.2.7) e i grafici (sotto forma di istogrammi: Fig. WP4.1.2.8 e 9) relativi all'incidenza delle anomalie (percentuale sul totale delle anomalie osservate in ogni lotto) nelle varie regioni del corpo, nei diversi lotti.

WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci (Obiettivo B)

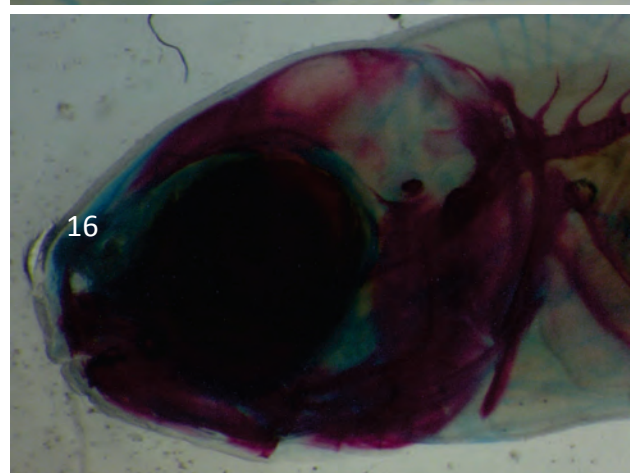
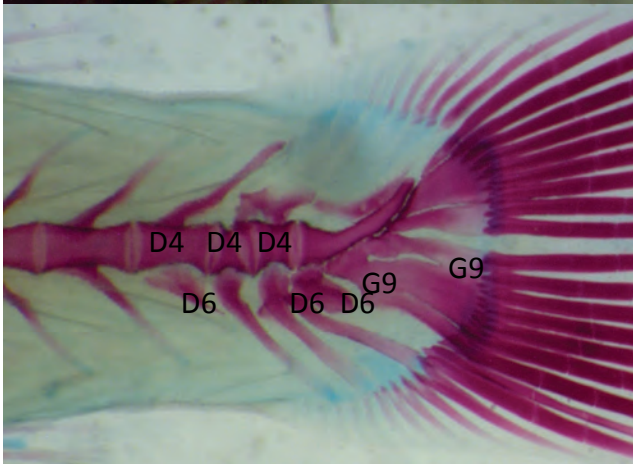
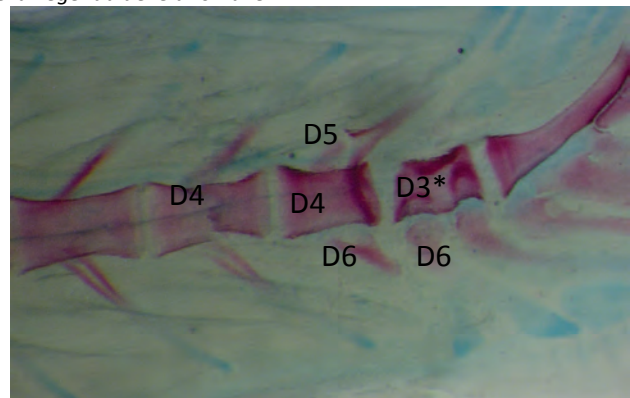
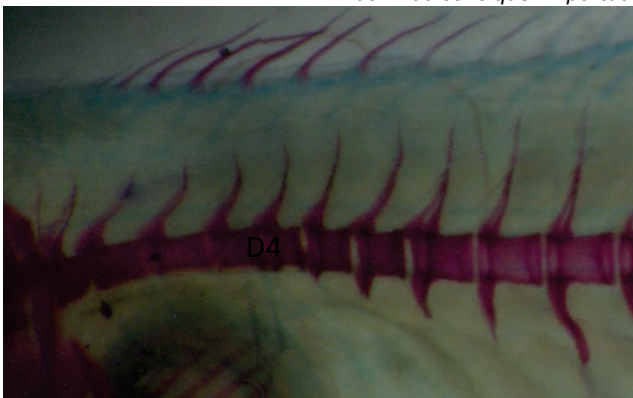
Fig. WP4.1.2.7 Esempi di anomalie scheletriche osservate negli individui appartenenti al lotto V8 (GV – gen conv). I codici utilizzati sono quelli riportati nella Legenda delle anomalie.



WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci (Obiettivo B)



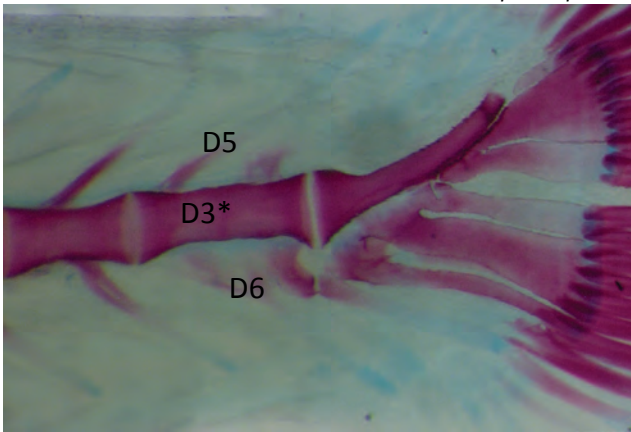
(Fig. WP4.1.2.7 segue) Esempi di anomalie scheletriche osservate negli individui appartenenti al lotto VP4 (GV - gen bio). I codici utilizzati sono quelli riportati nella Legenda delle anomalie.



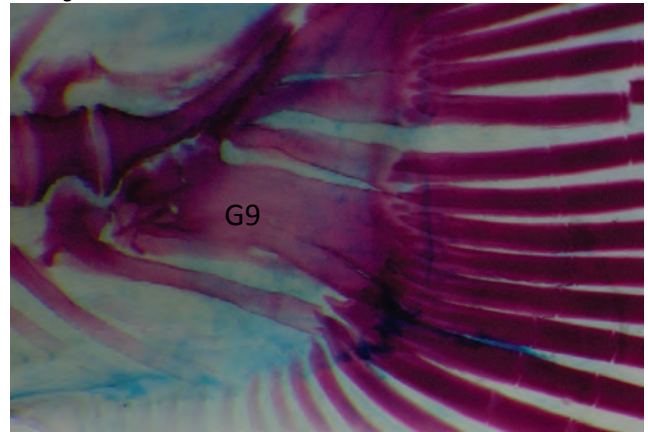
Esempio di anomalia a carico della regione del mesetmoide (anomalia 16).

WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci (Obiettivo B)

(Fig. WP4.1.2.7 segue) Esempi di anomalie scheletriche osservate negli individui appartenenti al lotto VP7(int – gen bio). I codici utilizzati sono quelli riportati nella Legenda delle anomalie.



Le fusioni che si osservano all'estremità prossimale degli ipurali non sono da considerarsi anomale, in quanto si tratta di uno stadio del normale processo di differenziamento degli ipurali, in questa specie.



Le fusioni tra ipurali qui mostrate sono anomale (anomalia G9).

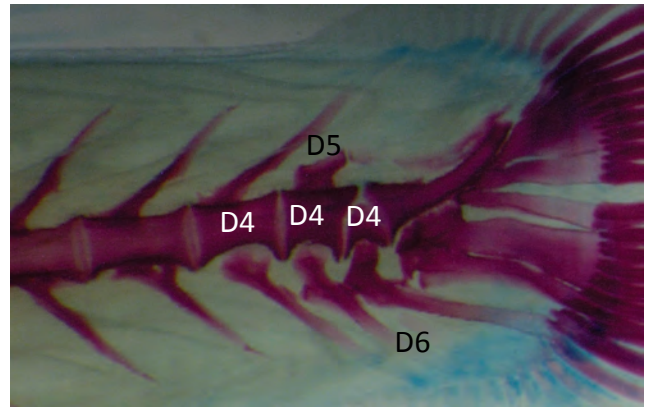
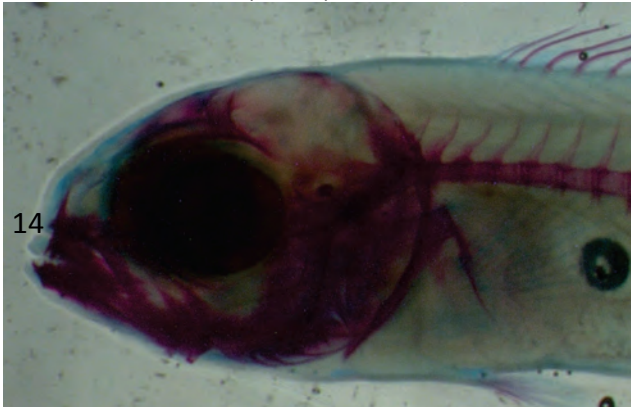
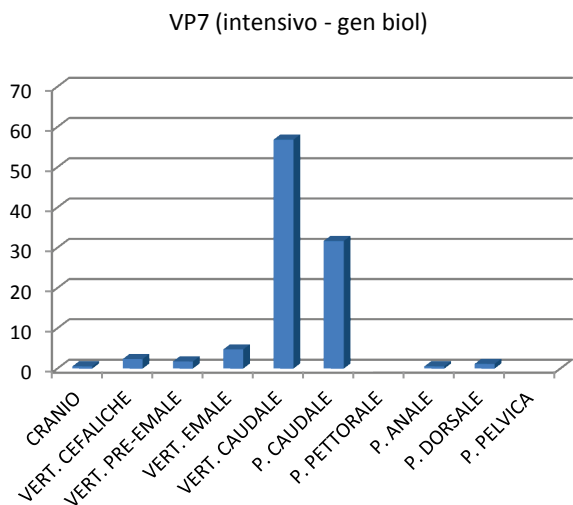
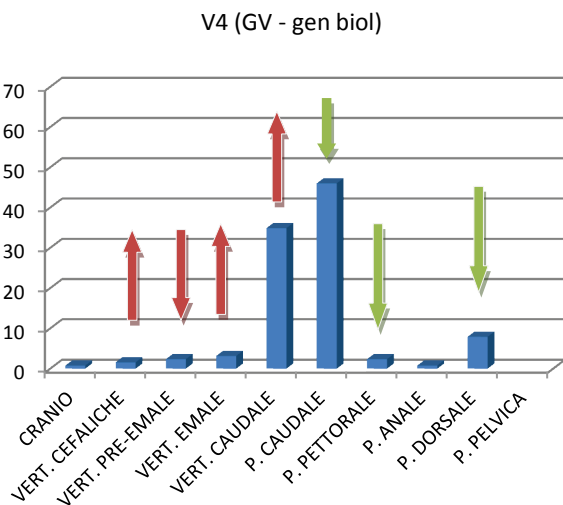


Fig. WP4.1.2.8 Istogrammi della frequenza relativa di comparsa di anomalie scheletriche nelle diverse regioni del corpo, nei lotti oggetto di studio campionati al termine della fase di allevamento larvale (60-61 gds). Le frecce presenti nei grafici a sinistra evidenziano le differenze principali rispetto al lotto fratello: il color rosso indica anomalie considerate gravi, il verde le lievi.



WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci (Obiettivo B)

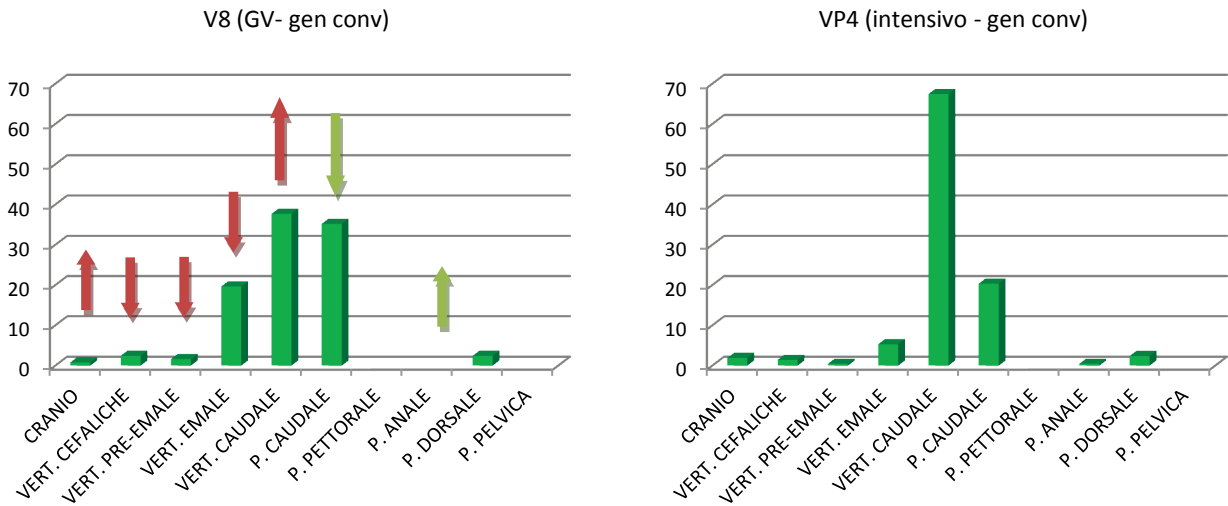
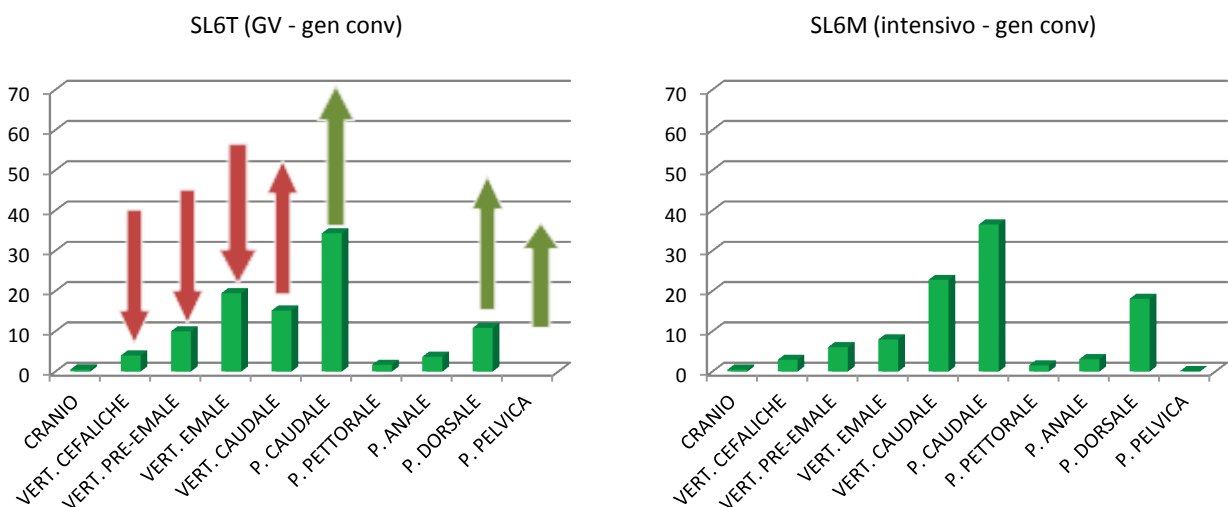
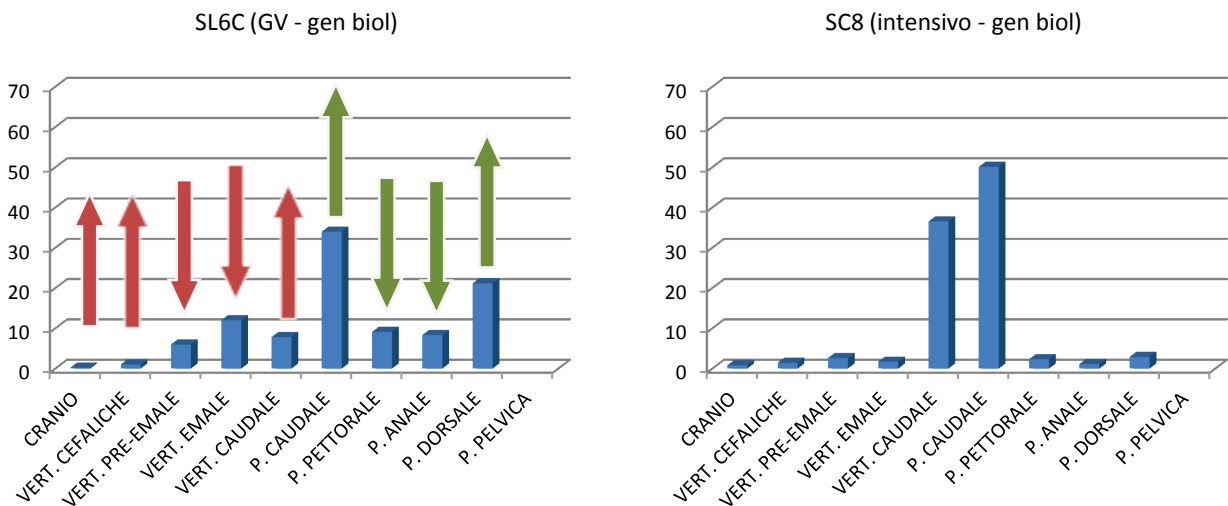
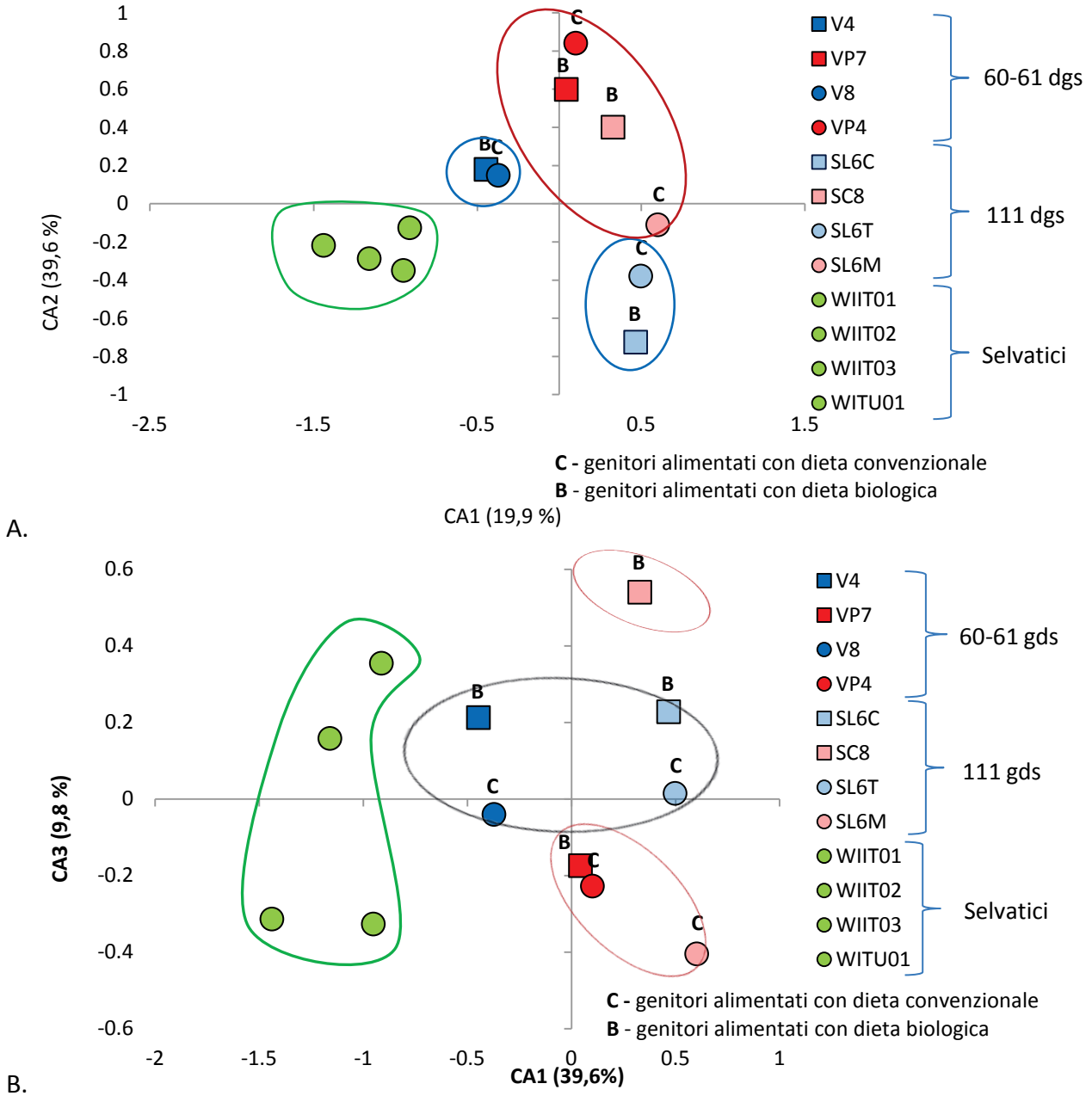


Fig. WP4.1.2.9 Istogrammi della frequenza relativa di comparsa di anomalie scheletriche nelle diverse regioni del corpo, nei lotti oggetto di studio campionati al termine della fase di svezzamento (111 gds). Le frecce presenti nei grafici a sinistra evidenziano le differenze principali rispetto al lotto fratello: il color rosso indica anomalie considerate gravi, il verde le lievi.



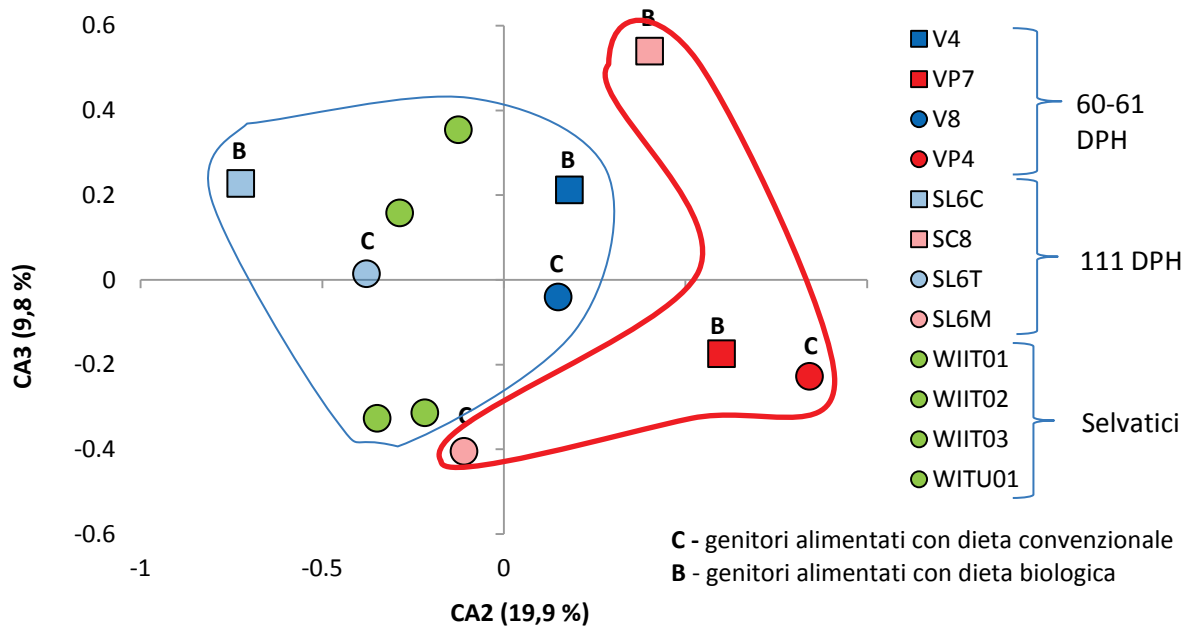
Come si può osservare, tutti i lotti allevati in grandi volumi, a prescindere dal tipo di alimentazione somministrato ai genitori e del momento del campionamento (fine avannotteria o fine svezzamento) presentano una cospicua diminuzione dell'incidenza delle anomalie a carico delle vertebre caudali (-20% alla fine dell'avannotteria; - 9% alla fine dello svezzamento). Le anomalie cefaliche o rimangono inalterate nell'incidenza o aumentano in condizioni intensive mentre le anomalie a carico delle vertebre pre-emali diminuiscono sempre in condizioni intensive. In *Allegato 3* sono state riportate le frequenze relative di comparsa di ogni tipologia malformativa osservata e di individui risultati affetti da ciascuna delle tipologie malformative. L'analisi delle corrispondenze (AC) è stata applicata alla matrice [individui x anomalie] delle frequenze di individui risultati affetti da ogni tipo di anomalia, per lotto. La matrice comprendeva sia i dati relativi ai lotti oggetto della ricerca sia i dati relativi ai 4 lotti di giovanili selvatici, da utilizzare come riferimento di qualità. Alla matrice è stata quindi aggiunta una variabile fittizia "assenza di anomalie" (ABS) a quegli individui che non presentavano anomalie; la variabile ha valore 1 negli individui sani e valore 0 in quelli che presentavano almeno un'anomalia. L'aggiunta di questa variabile si è resa necessaria per rappresentare correttamente la frequenza degli individui privi di anomalie nella normalizzazione dei vettori dell'Analisi delle Corrispondenze. La matrice finale era composta da 12 lotti x 50 descrittori. Gli ordinamenti relativi ai primi tre assi delle corrispondenze, risultati dall'AC, sono presentati in Fig. WP4.1.2.9. La varianza esibita dai primi tre assi è pari al 69,3%. L'ordinamento emerso dall'applicazione dell'AC evidenzia innanzitutto come sul primo e secondo asse delle corrispondenze (CA) (Fig. WP4.1.2.9 grafico A), che esibiscono complessivamente una varianza del 59,5%, l'effetto 'dieta dei riproduttori' non sembra esercitare alcun contributo all'ordinamento (tranne per il solo lotto SL6M, come di seguito evidenziato) che, invece, sembra maggiormente condizionato dall'origine (selvatici vs allevati), dalle condizioni di allevamento e, in parte minima, dall'età al momento del campionamento. Infatti, i lotti selvatici si differenziano da tutti gli altri lotti, essendo gli unici a occupare il 3° quadrante (costituito dal semipiano negativo di CA1 e CA2), in posizione completamente opposta ai lotti allevati in condizioni intensive, a prescindere dall'età dei campioni o dalla loro origine. Per quanto riguarda i lotti allevati nella fase larvale in Grandi Volumi, si può osservare come questi si dispongano sulla base dell'età piuttosto che secondo la loro origine (genitori convenzionali o biologici) e come siano quelli più vicini ai selvatici, occupando una posizione intermedia tra questi e i lotti allevati in condizioni intensive. Questi ultimi si dispongono, invece, tutti in prossimità del 1° quadrante, con una posizione eccentrica occupata dal solo lotto SL6M. I modelli di ordinamento relativi agli altri assi forniscono più o meno la stessa disposizione, ma con una minore varianza spiegata.

Fig. WP4.1.2.9 Risultati dell'Analisi delle Corrispondenze (AC): ordinamento dei lotti relativo ai primi tre assi delle corrispondenze. Forme uguali degli indicatori segnalano l'appartenenza allo stesso lotto di uova (forme quadrate: genitori alimentati con dieta biologica; forma rotonda: genitori alimentati con dieta convenzionale); i 4 lotti di giovanili selvatici sono gli unici ad essere rappresentati con indicatori di colore verde. Gli indicatori rossi indicano condizioni di allevamento larvale intensive (piccoli volumi o convenzionali: rosso scuro; magenta scuro: allevamento larvale biologico o grandi volumi) mentre le gradazioni dello stesso colore distinguono i lotti campionati alla fine dell'avannotteria (gradazione più scura) da quelli campionati alla fine dello svezzamento (gradazione più chiara).





WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci (Obiettivo B)



C.

#### WP4.1.3 Analisi degli effetti dell'alimentazione (biologica vs. convenzionale) e delle condizioni di allevamento (biologiche vs intensive) su alcuni parametri fisiologici

WP4.1.3.1. Messa a punto del sistema di valutazione dello stato di immunocompetenza acquisito da orate alla fine della fase di allevamento larvale

Il programma prevedeva la valutazione dello stato di immunocompetenza utilizzando una RT-PCR per evidenziare i geni dell'immunità innata. Nel corso del primo anno di attività ci si è resi conto, però, che sarebbe stato molto più utile ed indicativo della ricerca di differenze nell'immunità innata tra larve di orata allevate in Grandi Volumi e quelle allevate in intensivo, andare ad esaminare la presenza di differenze nell'attivazione dei geni dell'immunità innata, più che la presenza o meno dei geni stessi. Per questo motivo, si è deciso di analizzare i livelli di ROI (*Reactive Oxygen Intermediates*), che vengono normalmente prodotti durante i processi infiammatori, infezioni batteriche o virali o in condizioni di stress ossidativo. Uno dei limiti che presenta questo tipo di approccio è che le analisi vanno effettuate su cellule vive, e quindi risulta necessario



Fig. 4.1.3.1.1 Postazione creata presso l'Impianto Acquacoltura Lampedusa per l'analisi del livello di ROI.

effettuare le analisi subito, appena catturati i pesci. Per questo motivo, si è deciso l'acquisto di un fluorimetro, lo strumento che legge i livelli di ROI, portatile (Jenway 6280) ed effettuare le analisi direttamente nell'impianto di Lampedusa (Fig. 4.1.3.1.1). Il vantaggio risiede nel fatto che la lettura dei livelli di ROI non richiede protocolli sofisticati e quindi risulta facilmente praticabile in impianto. La metodica però, messa a punto su sangue umano, ha dovuto essere adattata e verificata su larve e giovanili di pesci. A questo scopo, nel periodo dicembre 2011-gennaio 2012 sono state effettuate una serie di misurazioni

comparative utilizzando sullo stesso campione sia il fluorimetro portatile sia uno non portatile

presente nella nostra Università, al fine di verificare l'attendibilità delle misurazioni effettuate con lo strumento portatile. Una volta accertata la possibilità di utilizzare lo strumento direttamente *in situ*, sono state avviate una serie di prove per accertare la capacità di lettura dello strumento portatile su quantità molto ridotte di materiale al fine di individuare la taglia minima dei campioni per poter essere analizzati. Sono stati quindi effettuati una serie di prelievi di sangue da individui di tilapia (*Oreochromis niloticus*) di taglia via via decrescente e di omogeneizzati di pool di larve e giovanili di diversa taglia di cefali (*Mugil cephalus*), di cui abbiamo ampia disponibilità nel nostro Laboratorio. I risultati ottenuti hanno dimostrato la possibilità di misurare i ROI sia su quantità di sangue ridotte che su omogenati di pool di larve.

Le analisi sono state quindi condotte su singoli individui provenienti dalle 4 condizioni di allevamento, alla fine della fase di allevamento larvale e della fase di svezzamento. Sono stati esaminati un totale di 172 pesci, dei quali 40 esemplari per vasca di allevamento, per un totale di 160 individui a 60 gg dalla schiusa, e 28 individui per vasca a 111 gg (totale 112 individui). La metodologia utilizzata presso l'impianto Acquacoltura Lampedusa in due momenti dell'allevamento di orata, dopo 60 e 111 giorni dalla schiusa e sui quattro lotti sperimentali, composti da individui provenienti da riproduttori biologici e allevati durante la fase larvale in intensivo e in grandi volumi (Bio, intens. e Bio, GV) e da individui provenienti da riproduttori convenzionali e allevati in intensivo e grandi volumi (Conv, PV e Conv, GV), è stata la seguente. Il lavoro è stato condotto dopo avere allestito una postazione di lavoro in un'area dell'impianto dedicata. Per ogni lotto sono stati catturati con un coppo gli esemplari da sacrificare per la ricerca e trasferiti in un secchio, in cui sono rimasti vivi fino all'esecuzione dell'analisi. Ogni esemplare è stato trasferito sul bancone con un retino, asciugato, pesato con bilancia di precisione, sacrificato e omogenizzato *in toto* in 0,5 mL di PBS se di 60 giorni, altrimenti negli individui di 111 gds è stata prelevata una porzione del filetto laterale. Il peso medio degli esemplari esaminati in questo periodo è stato di 0,045 g. L'omogenato è stato filtrato con filtri BD Falcon con maglia di 100  $\mu$ m e opportunamente diluito prima di essere trasferito in piastre multipozzetto. Sono state impiegate piastre da 3x4 pozzetti, avendo destinato 3 pozzetti a ciascun individuo. In ogni pozzetto è stato introdotto 1 mL di omogenato, allo scopo di trattare l'aliquota del primo pozzetto con il DCF, il secondo con DCF e stimolo (rappresentato da LPS) e il terzo con il controllo positivo, rappresentato dal DCF e dal perossido di idrogeno. La metodica richiede infatti che le cellule vive presenti nell'omogenato vengano dapprima trattate con il DCF, più precisamente H<sub>2</sub>DCFDA – diclorodidrossifluoresceina diacetato (Molecular Probes), una forma ridotta della fluoresceina che permea le cellule e che viene impiegata come indicatore della presenza di specie reattive dell'ossigeno: in presenza di ossidazione il H<sub>2</sub>DCFDA non fluorescente si trasforma nella 2',7'-diclorofluoresceina (DCF), che è altamente fluorescente. La quantità di H<sub>2</sub>DCFDA introdotta in ogni pozzetto è stata di 24  $\mu$ L/mL. In questo primo pozzetto le specie reattive dell'ossigeno misurate poi attraverso la lettura con il fluorimetro sono quelle presenti nel campione. Nel secondo pozzetto, oltre al H<sub>2</sub>DCFDA, viene aggiunto uno stimolo ossidativo, rappresentato dall'LPS, ovvero lipopolisaccaride da *E.coli* O111:B4 (Sigma). Il contenuto in endotossine di questi polisaccaridi è estremamente elevato e non inferiore alle 500.000 EU/mg e vengono pertanto impiegati per l'induzione di una risposta antinfiammatoria e dello stress ossidativo che ne consegue. L'uso impiegato è stato pari a 100 ng/mL. Nel terzo pozzetto si aggiunge invece il perossido di idrogeno, in ragione di 1  $\mu$ l in 2 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, come controllo positivo (stimolo massimo all'ossidazione). L'attivazione della risposta indotta dall'LPS richiede 80' di incubazione al buio a temperatura ambiente, il perossido di idrogeno 20'.

Le letture al fluorimetro sono state eseguite immediatamente e in successione per i 4 individui analizzati in ogni piastra. Le letture dei campioni sono state precedute dal controllo negativo, ovvero il solo terreno, in questo caso il PBS.

I risultati ottenuti sono riportati per brevità e significatività in termini di incremento di produzione di ROI osservato per ciascun individuo tra l'attivazione indotta dal solo H<sub>2</sub>DCFDA e quella osservata nel caso di stimolo massimo all'ossidazione, ottenuto dall'aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dopo aver verificato se le misure effettuate avessero tutte, in ciascuno dei 4 lotti, una distribuzione normale, la matrice ottenuta è stata testata per mezzo di un'ANOVA (Past v.2.17b) e l'output ottenuto è riportato nelle Fig. WP4.1.3.2a (60 gds) e b (111 gds).

Per quanto riguarda le analisi relative ai 60 gds, le differenze inter-gruppo sono risultate maggiori rispetto a quelle infra-gruppo ( $F=8,55$ ,  $p=2,748 \cdot 10^{-5}$ ). Pertanto i risultati inerenti i quattro gruppi possono essere descritti in forma di *box & whisker plots*, come riportato in Fig. WP4.1.3.1.2a. Per ogni lotto, è stata riportata la mediana come linea orizzontale nel box, il quale rappresenta la distribuzione delle misure comprese tra il 25 ed il 75 percentile (percentile centrale); i whiskers (le linee verticali) indicano invece l'estensione del range dei valori (minimi e massimi) misurati

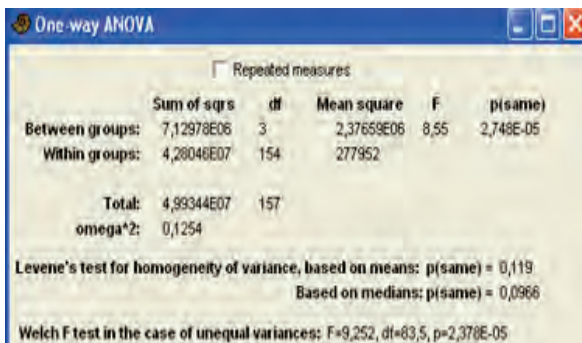
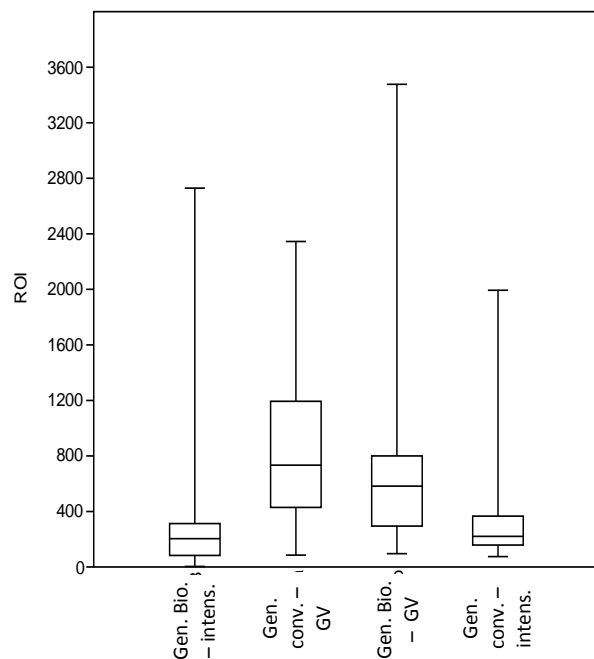


Fig. WP4.1.3.1.2a Qui sopra è riportato l'output dell'applicazione del test ANOVA ottenuto con Past v. 2.17b, applicato alle orate di 60 giorni. Il grafico a destra riporta i box and whisker plot che illustra l'incremento di produzione di ROI osservato per ciascun individuo di 60 giorni, tra l'attivazione indotta dal solo H<sub>2</sub>DCFDA e quella osservata nel caso di stimolo massimo all'ossidazione, ottenuto dall'aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Per ogni lotto, è stata riportata la mediana (come linea orizzontale all'interno del box), il percentile centrale (distribuzione delle misure comprese tra il 25 ed il 75 percentile, raffigurato dal box) ed il range di valori (minimi e massimi) misurati all'interno di ciascun lotto (whiskers).



all'interno di ciascun lotto.

Dai confronti a coppie valutati attraverso un test *post hoc* (Tukey's) è emerso che il contenuto in ROI è risultato significativamente più elevato ( $p<0.05$ ) nel gruppo di giovanili allevati con la tecnica dei grandi volumi e provenienti da riproduttori biologici (*gen. bio. - GV*) rispetto a quelli allevati in intensivo e provenienti dai medesimi riproduttori (*gen. bio. - Int.*). Similmente, nei due lotti provenienti da riproduttori convenzionali, i giovanili allevati con la tecnica dei grandi volumi hanno mostrato valori significativamente più elevati ( $GV - gen. conv. vs Int. - gen. conv. = p<0.0005$ ). Non sono state osservate differenze significative tra i livelli di ROI nei due lotti allevati in condizioni intensive, nei quali si osservano i valori più bassi, sia che provengano da riproduttori biologici che convenzionali. Analogamente, non sono state riscontrate differenze tra i due lotti allevati con la tecnica dei grandi volumi, quali che fossero i riproduttori. Inoltre, gli esemplari del lotto *gen. bio. - GV* hanno mostrato valori di ROI significativamente più bassi degli individui del lotto *gen. conv. - GV* ( $p<0.0005$ ), come pure il lotto *gen. bio. - GV* mostra valori più alti di quello *gen. conv. - intens.* ( $p<0.05$ ). I risultati ottenuti consentono pertanto già 60 giorni dopo la schiusa di discriminare in

base alla tipologia di allevamento (intensivo vs grandi volumi) sia tra individui provenienti da riproduttori convenzionali che provenienti da riproduttori biologici. Non si osservano differenze significative in base all'alimentazione fornita ai riproduttori.

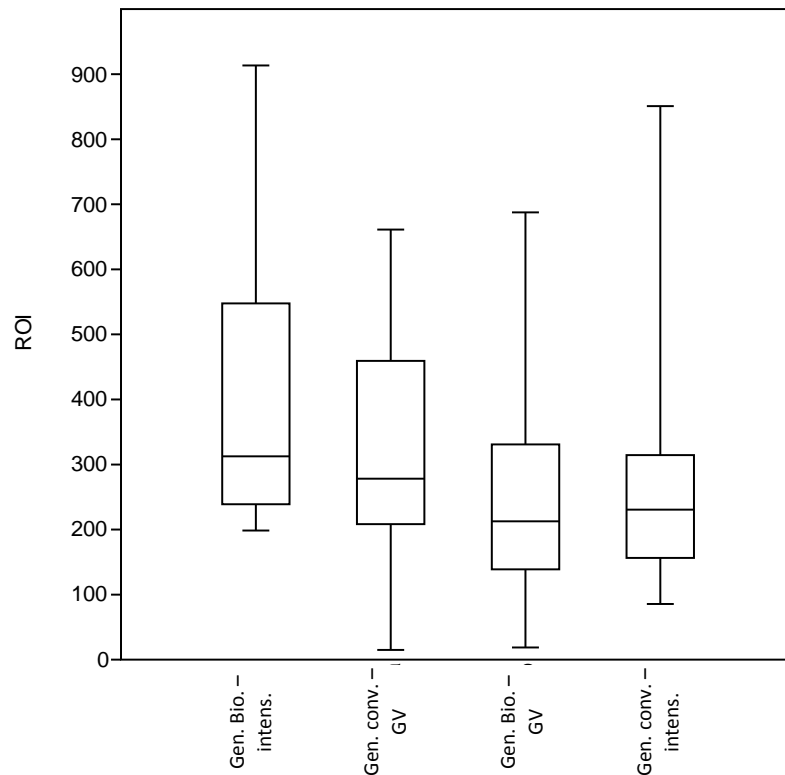
Per quanto riguarda le analisi relative ai 111 gds, le differenze inter-gruppo sono risultate maggiori rispetto a quelle intra-gruppo ( $F=3,96$ ,  $p=9,92 \cdot 10^{-3}$ ). Pertanto i risultati inerenti i quattro gruppi possono essere descritti in forma di *box & whisker plots*, come riportato in Fig. WP4.1.3.1.2b.

Fig. WP4.1.3.1.2b A destra, in alto, è riportato l'output dell'applicazione del test ANOVA ottenuto con Past v. 2.17b applicato ai giovanili di 111 giorni. Il grafico in basso mostra il box and whisker plot che illustra l'incremento di produzione di ROI osservato per ciascun individuo di 111 giorni, tra l'attivazione indotta dal solo  $H_2DCFDA$  e quella osservata nel caso di stimolo massimo all'ossidazione, ottenuto dall'aggiunta di  $H_2O_2$ . Per ogni lotto, è stata riportata la mediana (come linea orizzontale all'interno del box), il percentile centrale (distribuzione delle misure comprese tra il 25 ed il 75 percentile, raffigurato dal box) ed il range di valori (minimi e massimi) misurati all'interno di ciascun lotto (whiskers).

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
<b>Between groups:</b>	329974	3	109991	3,98	0,009917
<b>Within groups:</b>	2,90147E06	105	27633,1		
<b>Total:</b>	3,23145E06	108			
<b>omega<sup>2</sup>:</b>	0,07581				

Levene's test for homogeneity of variance, based on means: p(same) = 0,2579  
Based on medians: p(same) = 0,5849

Welch F test in the case of unequal variances: F=3,598, df=57,47, p=0,01878



all'interno di ciascun lotto.

Dai confronti a coppie valutati attraverso un test *post hoc* (Tukey's) è emerso che il contenuto in ROI è risultato significativamente più elevato nel gruppo di giovanili allevati con la tecnica intensiva e provenienti da riproduttori biologici (*gen. bio. - intens.*) rispetto a quelli allevati in grandi volumi e provenienti dai medesimi riproduttori ( $p<0.01$ ; *gen. bio. - GV.*) e a quelli allevati nelle medesime condizioni durante il periodo larvale (intensivo) e provenienti da riproduttori convenzionali ( $p<0,05$ ; *gen. conv.- intens.*). Interessante notare che i livelli di ROI diminuiscono alla fine della fase di svezzamento in tutti i lotti (particolarmente il lotto composto da giovanili allevati in grandi volumi e che provenivano da uova convenzionali che passa da un livello medio di ROI di 838,14 a 268,16), con la sola eccezione del lotto rappresentato da orate provenienti da

genitori biologici ed allevati durante il periodo larvale in condizioni intensive che aumentano, come valore medio, seppur di poco, a 111 giorni.

#### WP4.1.3.2 Valutazione dello stato fisiologico delle larve e giovanili

Analogamente a quanto effettuato sulle uova di orata, anche sui giovanili a 60 e 111 giorni dopo la schiusa sono state condotte le misurazioni relative ai metaboliti principali.

In questo caso sono stati dissezionati alcuni esemplari decongelati per ciascun lotto, sfilettati e omogenizzati in PBS. Sull'omogenato si è proceduto in maniera analoga a quanto descritto per le uova.

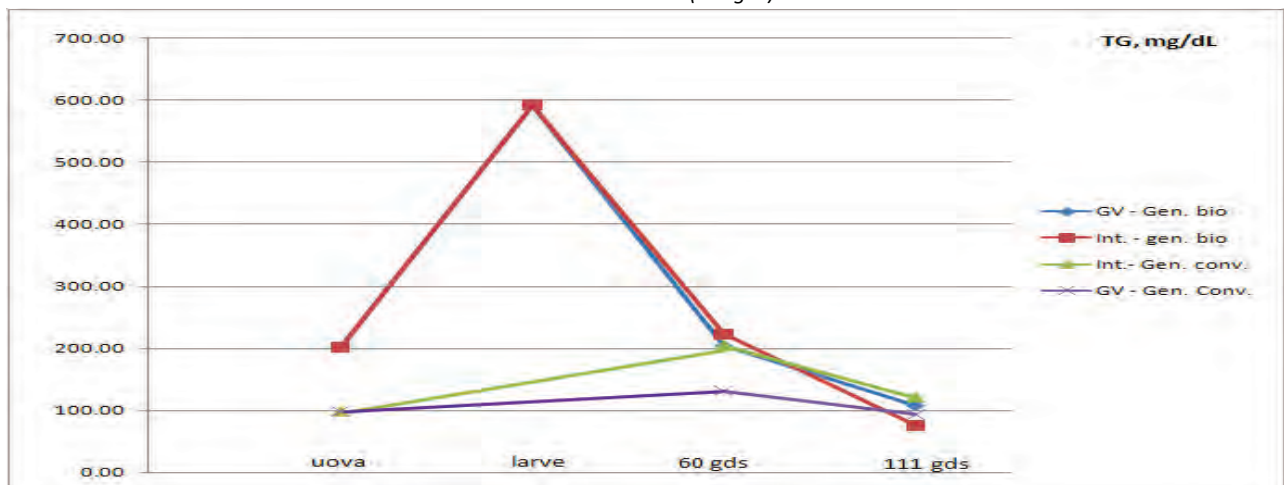
Di seguito (Fig. WP4.1.3.2.1) sono riportati tre grafici, relativi a ciascun gruppo di metaboliti. Per facilità di lettura sono riportati sulla linea di base i valori che alla misura erano risultati più bassi del limite inferiore di lettura. Per rendere più chiare le tendenze, i grafici contengono anche le misure condotte sui campioni di uova, già forniti nei paragrafi precedenti.

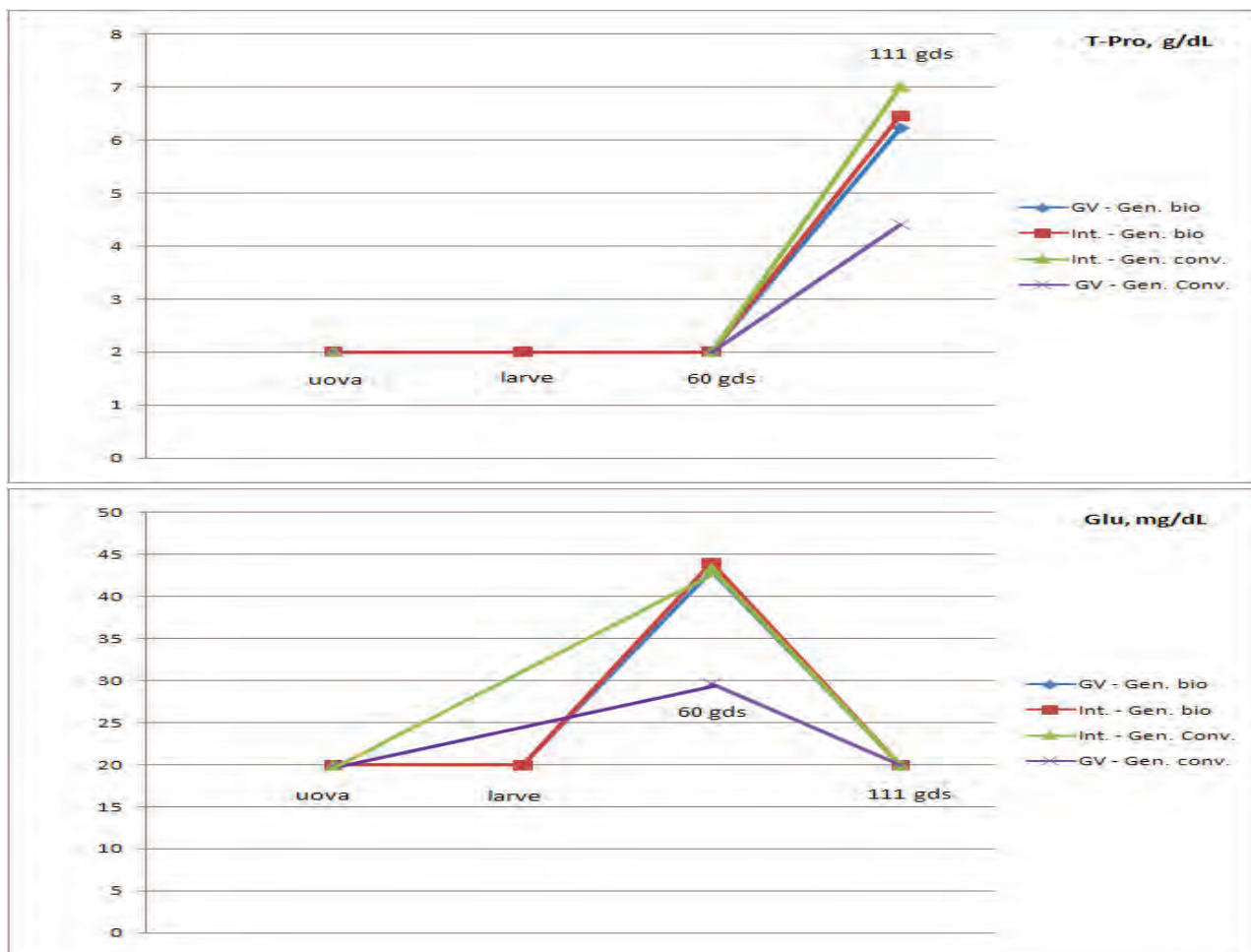
Per questi indicatori, le analisi sono state condotte su pool di individui e sono pertanto state ottenute 2 misure per ogni lotto oggetto di studio (alla fine della fase di avannotteria e di svezzamento). Non è stato pertanto possibile condurre alcuna analisi statistica.

Come si può osservare per i trigliceridi, che rappresentano il solo parametro le cui misure sono sempre rientrate nei limiti di lettura dello strumento, sono ben evidenti le differenze tra i due lotti provenienti da riproduttori alimentati con regime biologico, rispetto a quelli provenienti da riproduttori a regime convenzionale.

Per quanto riguarda il glucosio, il trend relativo al lotto *GV – gen. conv.* è risultato diverso dagli altri, essendo gli altri 3 molto simili tra loro. Un risultato simile potrebbe essere ravvisato per le proteine totali, ma solo per quanto riguarda la misura effettuata a 111 gds, essendo tutte le precedenti al di sotto del limite inferiore di lettura e pertanto non confrontabili.

Fig. WP4.1.3.2.1 Risultati delle misurazioni concernenti i metaboliti principali nelle orate oggetto di studio a diversi stadi di sviluppo (uova : campionate al momento della deposizione; larve: orate campionate al termine della fase di avannotteria (60 gds o dph) o dello svezzamento (111gds).





#### Misura della frazione lipidica nei giovanili sperimentali

Sui giovanili di orate ottenuti dalla sperimentazione è stata studiata la frazione lipidica maggiormente influenzata dalla qualità e composizione lipidica dell'alimentazione del pesce durante le due fasi di allevamento.

I lipidi dei giovanili sono stati ottenuti mediante estrazione dall'omogenato del campione *in toto*, senza allontanamento di visceri e pelle, procedura impossibile data la piccola taglia delle orate oggetto di studio. La metodica di determinazione è la stessa descritta per le uova.

Campioni a 60 giorni dalla schiusa allevate in avannotteria convenzionale da uova convenzionali (Tab. WP4.1.3.1 - 3) e da uova biologiche (Tab. WP4.1.3.4 - 6): non si evidenziano differenze significative sia per tenore lipidico che per composizione lipidica della frazione insaponificabile fra le due tipologie. Si evidenzia una buona presenza di vitamina E ( $\alpha$  tocoferolo) per grammo di lipidi. Per quanto riguarda il profilo degli acidi grassi, il campione da regime biologico presenta una percentuale maggiore (21,05 vs 17,35 % degli acidi grassi totali) di acido oleico (C 18:1 n-9), differenza che si ripercuote sul dato dei monoinsaturi totali. Fra i polinsaturi si evidenzia una percentuale leggermente inferiore di acido docosaesaenoico (C22:6 n-3) nelle oratine biologiche rispetto a quelle convenzionali (6,77 vs 7,85 % acidi grassi totali). C'è da rilevare una elevata presenza di acido linolenico (C 18:3 N-3) solitamente non così elevato in orate allevate di taglia preingrasso e commerciale. Nel complesso, entrambe le tipologie presentano una prevalenza di polinsaturi rispetto a saturi e monoinsaturi, parametro molto influenzato anche dalla presenza dei visceri nel campione di analisi.

Tab. WP4.1.3.1 Tenore lipidico in orate campionate a 60 dgs, allevate in avannotteria convenzionale da uova convenzionali.

	Media	ds
Lipidi totali (g/100 g)	3,71	0,14

Tab. WP4.1.3.3 Acidi grassi di orate (% degli acidi grassi totali) campionate a 60 dgs ed allevate in avannotteria convenzionale da uova convenzionali.

	Media	ds
C 12:0	0,02	0,00
C 13:0	0,00	0,00
C 14:0	1,03	0,01
C 15:0	0,22	0,01
C 16:0	13,18	0,14
C 17:0	0,56	0,00
C 18:0	7,63	0,00
C 19:0	0,00	0,00
C 20:0	0,18	0,02
C 21:0	0,05	0,00
<b>Saturi totali</b>	<b>22,87</b>	<b>0,10</b>
C 14:1 n - 5	0,02	0,00
C 16:1 n - 7	2,88	0,02
C 18:1 n - 9	17,35	0,05
C 18:1 n - 7	5,12	0,01
C 20:1 n - 9	0,76	0,04
C 20:1 n - 11	0,08	0,03
C 22:1 n - 9	0,19	0,01
C 22:1 n - 11	0,13	0,01
C 24:1 n - 9	0,17	0,02
<b>Monoinsaturi tot</b>	<b>26,68</b>	<b>0,01</b>
C 16:2 n - 4	0,73	0,01
C 18:2 n - 6	5,22	0,02
C 18:3 n - 6	0,55	0,00
C 18:3 n - 3	17,35	0,02
C 18:4 n - 3	3,19	0,01
C 20:2 n - 6	0,31	0,01
C 20:4 n - 3	1,14	0,01
C 20:4 n - 6	1,89	0,00
C 20:5 n - 3	5,19	0,02
C 22:4 n - 6	0,64	0,01
C 22:5 n - 3	1,28	0,01
C 22:6 n - 3	7,85	0,03
<b>Polinsaturi totali</b>	<b>45,33</b>	<b>0,09</b>
somma n - 3	36,00	0,09
somma n - 6	8,60	0,01
n - 3 / n-6	4,19	0,02

Tab. WP4.1.3.2 Profilo della frazione lipidica insaponificabile in orate campionate a 60 dgs ed allevate in avannotteria convenzionale da uova convenzionali.

	mg/100 g	
	Media	ds
Colesterolo	278,44	5,64
Squalene	1,64	0,07
α - tocoferolo	1,26	0,15
γ - tocoferolo	0,00	0,00
δ - tocoferolo	0,00	0,00
7-DeidroColesterolo	0,42	0,01
	mg/g olio	
	Media	ds
Colesterolo	75,05	1,52
Squalene	0,44	0,02
α - tocoferolo	0,34	0,04
γ - tocoferolo	0,00	0,00
δ - tocoferolo	0,00	0,00
7-DeidroColesterolo	0,11	0,00

Tab. WP4.1.3.4 Tenore lipidico in orate campionate a 60 dgs ed allevate in avannotteria convenzionale da uova biologiche.

	media	ds
Lipidi totali (g/100 g)	3,64	0,06

Tab. WP4.1.3.5 Profilo della frazione lipidica insaponificabile in orate campionate a 60 dgs ed allevate in avannotteria convenzionale da uova biologiche.

	mg/100 g	
	Media	ds
Colesterolo	263,42	0,58
Squalene	1,28	0,01
α - tocoferolo	1,36	0,04
γ - tocoferolo	0,00	0,00
δ - tocoferolo	0,00	0,00
7-DeidroColesterolo	0,33	0,00
	mg/g olio	
	Media	ds
Colesterolo	72,37	0,16
Squalene	0,35	0,00
α - tocoferolo	0,37	0,01
γ - tocoferolo	0,00	0,00
δ - tocoferolo	0,00	0,00
7-DeidroColesterolo	0,09	0,00

Tab. WP4.1.3.6 Acidi grassi di orate (% degli acidi grassi totali) campionate a 60 dgs ed allevate in avannotteria convenzionale da uova biologiche.

	<b>Media</b>	<b>ds</b>
C 12:0	0,03	0,00
C 13:0	0,00	0,00
C 14:0	0,83	0,00
C 15:0	0,18	0,01
C 16:0	12,66	0,01
C 17:0	0,58	0,01
C 18:0	7,38	0,02
C 19:0	0,00	0,00
C 20:0	0,16	0,01
C 21:0	0,05	0,01
<b>Saturi totali</b>	<b>21,86</b>	<b>0,03</b>
C 14:1 n - 5	0,03	0,00
C 16:1 n - 7	2,58	0,01
C 18:1 n - 9	21,05	0,02
C 18:1 n - 7	5,32	0,00
C 20:1 n - 9	0,81	0,00
C 20:1 n - 11	0,08	0,00
C 22:1 n - 9	0,18	0,00
C 22:1 n - 11	0,11	0,01
C 24:1 n - 9	0,14	0,00
<b>Monoinsaturi tot</b>	<b>30,30</b>	<b>0,01</b>
C 16:2 n - 4	0,67	0,00
C 18:2 n - 6	4,97	0,00
C 18:3 n - 6	0,46	0,00
C 18:3 n - 3	16,66	0,02
C 18:4 n - 3	2,80	0,01
C 20:2 n - 6	0,36	0,00
C 20:4 n - 3	1,07	0,00
C 20:4 n - 6	2,08	0,01
C 20:5 n - 3	5,12	0,02
C 22:4 n - 6	0,70	0,08
C 22:5 n - 3	1,08	0,01
C 22:6 n - 3	6,77	0,03
<b>Polinsaturi totali</b>	<b>42,73</b>	<b>0,05</b>
somma n - 3	33,48	0,01
somma n - 6	8,57	0,06
n - 3 / n-6	3,91	0,03

Campioni a 60 giorni dalla schiusa allevate in Grandi Volumi da uova convenzionali (Tab. WP4.1.3.7 - 9) e da uova biologiche (Tab. WP4.1.3.10 - 12): in condizioni di allevamento larvale in Grandi Volumi, non si evidenziano differenze significative sia per tenore lipidico che per composizione lipidica della frazione insaponificabile fra le due tipologie di uova. Si conferma la buona presenza di vitamina E ( $\alpha$  tocoferolo) per grammo di lipidi, che risulta anche in questo confronto leggermente superiore nelle larve provenienti da uova biologiche. Per quanto riguarda il profilo degli acidi grassi, è il campione proveniente da uova convenzionali a presentare, a differenza di quanto osservato nel confronto precedente, una percentuale maggiore (21,5 vs 17,25 % degli acidi grassi totali) di acido oleico (C 18:1 n-9), differenza che però, a differenza di quanto sopra descritto per l'allevamento intensivo, non si ripercuote sul dato dei monoinsaturi totali che risulta maggiore in Grandi Volumi, per la presenza di maggiori percentuali di acido palmitoleico (C16:1 n-7: 2,72 vs 1,8%) e cetoleico (C22:1 n-11: 0,49 vs 0,23%). La composizione in MUFA (*Mono Unsaturated Fatty Acids*) totali risulta leggermente maggiore nelle orate ottenute da uova biologiche ed allevate in Grandi Volumi. Fra i polinsaturi si evidenzia una percentuale leggermente superiore di acido linoleico (C18:2 n-6), arachidonico (ARA - C20:4 n-6), eicosapentaenoico (EPA - C20:5 n-3), docosapentaenoico (DPA - C22:5 n-3) e docosaesaenoico (DHA: C22:6 n-3) nelle oratine biologiche allevate in Grandi Volumi rispetto a quelle allevate in intensivo (6,77 vs 7,85 % acidi grassi totali). Nel complesso, anche in questo confronto le due

tipologie presentano una prevalenza di polinsaturi rispetto a saturi e monoinsaturi, parametro molto influenzato anche dalla presenza dei visceri nel campione di analisi.

Tab. WP4.1.3.7 Tenore lipidico in orate campionate a 60 dgs, allevate in avannotteria Grandi Volumi da uova convenzionali.

	<i>media</i>	<i>ds</i>
	g/100 g	
Lipidi totali	3.44	0.00



Tab. WP4.1.3.9 Acidi grassi di orate (% degli acidi grassi totali) campionate a 60 dgs ed allevate in avannotteria Grandi Volumi da uova convenzionali.

	Media	ds
C 12:0	0.01	0.00
C 13:0	0.00	0.00
C 14:0	0.55	0.01
C 15:0	0.12	0.00
C 16:0	11.26	0.14
C 17:0	0.57	0.00
C 18:0	7.46	0.05
C 19:0	0.00	0.00
C 20:0	0.16	0.00
C 21:0	0.04	0.01
<b>Saturi totali</b>	<b>20.18</b>	<b>0.18</b>
C 14:1 n - 5	0.01	0.00
C 16:1 n - 7	1.80	0.03
C 18:1 n - 9	18.54	0.08
C 18:1 n - 7	5.18	0.03
C 20:1 n - 9	0.81	0.01
C 20:1 n - 11	0.08	0.00
C 22:1 n - 9	0.18	0.00
C 22:1 n - 11	0.23	0.00
C 24:1 n - 9	0.13	0.01
<b>Monoinsaturi tot</b>	<b>26.97</b>	<b>0.12</b>
C 16:2 n - 4	0.70	0.00
C 18:2 n - 6	5.73	0.00
C 18:3 n - 6	0.55	0.00
C 18:3 n - 3	19.29	0.06
C 18:4 n - 3	3.27	0.03
C 20:2 n - 6	0.33	0.01
C 20:4 n - 3	1.21	0.02
C 20:4 n - 6	1.79	0.04
C 20:5 n - 3	5.33	0.03
C 22:4 n - 6	0.10	0.00
C 22:5 n - 3	1.07	0.00
C 22:6 n - 3	8.38	0.17
<b>Polinsaturi totali</b>	<b>47.74</b>	<b>0.31</b>
somma n - 3	38.55	0.27
somma n - 6	8.49	0.04
n - 3 / n-6	4.54	0.01

Tab. WP4.1.3.8 Acidi grassi di orate (% degli acidi grassi totali) campionate a 60 dgs ed allevate in avannotteria Grandi Volumi da uova convenzionali.

	mg/100 g	
	Media	ds
Colesterolo	256.21	3.07
Squalene	1.11	0.00
$\alpha$ - tocoferolo	1.36	0.00
$\gamma$ - tocoferolo + $\beta$ -tocof.	0.00	0.00
$\delta$ - tocoferolo	0.00	0.00
7-Deidrocolesterolo	0.45	0.01
	<b>mg/g olio</b>	
Colesterolo	74.48	0.89
Squalene	0.32	0.00
$\alpha$ - tocoferolo	0.39	0.00
$\gamma$ - tocoferolo + $\beta$ -tocof.	0.00	0.00
$\delta$ - tocoferolo	0.00	0.00
7-Deidrocolesterolo	0.13	0.00

Tab. WP4.1.3.10 Tenore lipidico in orate campionate a 60 dgs, allevate in avannotteria Grandi Volumi da uova biologiche.

	media	ds
	g/100 g	
Lipidi totali	3.65	0.02

Tab. WP4.1.3.12 Acidi grassi di orate (% degli acidi grassi totali) campionate a 60 dgs ed allevate in avannotteria Grandi Volumi da uova biologiche.

	Media	ds
C 12:0	0.02	0.00
C 13:0	0.00	0.00
C 14:0	1.26	0.00
C 15:0	0.20	0.00
C 16:0	13.58	0.07
C 17:0	0.59	0.00
C 18:0	7.22	0.04
C 19:0	0.00	0.00
C 20:0	0.16	0.00
C 21:0	0.03	0.01
<b>Saturi totali</b>	<b>23.07</b>	<b>0.10</b>
C 14:1 n - 5	0.03	0.00
C 16:1 n - 7	2.72	0.02
C 18:1 n - 9	17.25	0.08
C 18:1 n - 7	5.04	0.01
C 20:1 n - 9	0.99	0.00
C 20:1 n - 11	0.10	0.00
C 22:1 n - 9	0.19	0.00
C 22:1 n - 11	0.49	0.01
C 24:1 n - 9	0.19	0.01
<b>Monoinsaturi tot</b>	<b>27.01</b>	<b>0.11</b>
C 16:2 n - 4	0.69	0.01
C 18:2 n - 6	6.41	0.02
C 18:3 n - 6	0.50	0.00
C 18:3 n - 3	13.75	0.01
C 18:4 n - 3	2.50	0.01
C 20:2 n - 6	0.32	0.00
C 20:4 n - 3	1.03	0.02
C 20:4 n - 6	1.84	0.02
C 20:5 n - 3	6.50	0.07
C 22:4 n - 6	0.10	0.00
C 22:5 n - 3	1.31	0.02
C 22:6 n - 3	9.88	0.10
<b>Polinsaturi totali</b>	<b>44.83</b>	<b>0.21</b>
somma n - 3	34.96	0.17
somma n - 6	9.18	0.05
n - 3 / n-6	3.81	0.00

Tab. WP4.1.3.11 Acidi grassi di orate (% degli acidi grassi totali) campionate a 60 dgs ed allevate in avannotteria Grandi Volumi da uova biologiche.

	mg/100 g	
	Media	ds
Colesterolo	275.52	1.61
Squalene	1.22	0.03
$\alpha$ - tocoferolo	1.68	0.06
$\gamma$ - tocoferolo + $\beta$ -tocof.	0.00	0.00
$\delta$ - tocoferolo	0.00	0.00
7-Deidrocolesterolo	0.36	0.00
	<b>mg/g olio</b>	
Colesterolo	75.48	0.44
Squalene	0.33	0.01
$\alpha$ - tocoferolo	0.46	0.02
$\gamma$ - tocoferolo + $\beta$ -tocof.	0.00	0.00
$\delta$ - tocoferolo	0.00	0.00
7-Deidrocolesterolo	0.10	0.00

Tab. WP4.1.3.13 Tenore lipidico in orate campionate a 111 dgs, allevate in avannotteria convenzionale da uova convenzionali.

	<b>media</b>	<b>ds</b>
<b>Lipidi totali (g/100 g)</b>	4,80	0,03

Tab. WP4.1.3.15 Acidi grassi di orate (% degli acidi grassi totali) campionate a 111 dgs ed allevate in avannotteria convenzionale da uova convenzionali.

	<b>Media</b>	<b>ds</b>
<b>C 12:0</b>	0,04	0,00
<b>C 13:0</b>	0,02	0,00
<b>C 14:0</b>	3,49	0,02
<b>C 15:0</b>	0,36	0,00
<b>C 16:0</b>	17,07	0,02
<b>C 17:0</b>	0,44	0,00
<b>C 18:0</b>	5,61	0,03
<b>C 19:0</b>	0,11	0,00
<b>C 20:0</b>	0,22	0,00
<b>C 21:0</b>	0,03	0,00
<b>Saturi totali</b>	<b>27,38</b>	<b>0,04</b>
<b>C 14:1 n - 5</b>	0,03	0,00
<b>C 16:1 n - 7</b>	5,53	0,03
<b>C 18:1 n - 9</b>	14,04	0,04
<b>C 18:1 n - 7</b>	3,71	0,00
<b>C 20:1 n - 9</b>	1,20	0,01
<b>C 20:1 n - 11</b>	0,21	0,00
<b>C 22:1 n - 9</b>	0,24	0,01
<b>C 22:1 n - 11</b>	0,94	0,02
<b>C 24:1 n - 9</b>	0,39	0,01
<b>Monoinsaturi tot</b>	<b>26,31</b>	<b>0,03</b>
<b>C 16:2 n - 4</b>	0,58	0,01
<b>C 18:2 n - 6</b>	10,38	0,03
<b>C 18:3 n - 6</b>	0,91	0,00
<b>C 18:3 n - 3</b>	1,41	0,01
<b>C 18:4 n - 3</b>	1,48	0,02
<b>C 20:2 n - 6</b>	0,20	0,00
<b>C 20:4 n - 3</b>	0,61	0,00
<b>C 20:4 n - 6</b>	1,12	0,11
<b>C 20:5 n - 3</b>	8,67	0,04
<b>C 22:4 n - 6</b>	0,18	0,01
<b>C 22:5 n - 3</b>	2,19	0,02
<b>C 22:6 n - 3</b>	13,53	0,10
<b>Polinsaturi totali</b>	<b>41,26</b>	<b>0,07</b>
<b>somma n - 3</b>	27,89	0,17
<b>somma n - 6</b>	12,79	0,08
<b>n - 3 / n-6</b>	2,18	0,03

Tab. WP4.1.3.14 Profilo della frazione lipidica insaponificabile in orate campionate a 111 dgs ed allevate in avannotteria convenzionale da uova convenzionali.

	<b>mg/100 g</b>	
	<b>Media</b>	<b>ds</b>
<b>Colesterolo</b>	209,47	0,27
<b>Squalene</b>	1,18	0,01
<b>α - tocoferolo</b>	4,99	0,02
<b>γ - tocoferolo</b>	0,00	0,00
<b>δ - tocoferolo</b>	0,00	0,00
	<b>mg/g olio</b>	
<b>Colesterolo</b>	43,64	0,06
<b>Squalene</b>	0,25	0,00
<b>α - tocoferolo</b>	1,04	0,00
<b>γ - tocoferolo</b>	0,00	0,00
<b>δ - tocoferolo</b>	0,00	0,00

Campioni a 111 giorni dalla schiusa provenienti da avannotteria convenzionale e da uova convenzionali (Tab. WP4.1.3.13 - 15) e da uova biologiche (Tab. WP4.1.3.16 - 18): i campioni analizzati non evidenziano differenze di rilievo. Il tenore lipidico lievemente superiore del campione convenzionale non può essere considerato di per sé significativo. I profili della frazione lipidica saponificabile e insaponificabile sono sovrapponibili fra le due tipologie di campione. A differenza dei giovanili a 80 giorni, nei giovanili a 111 giorni si rileva una presenza elevata di acido linoleico (C 18:2 n-6) e di EPA (C 20:5 n-3) e DHA (22:6 n-3), nel profilo in acidi grassi, che denoterebbe un cambio di alimentazione. Nella frazione insaponificabile c'è un elevato livello di Vitamina E per grammo di olio molto più elevata rispetto ai giovanili di 60 giorni.

Si può presumere che tali differenze siano il risultato di una diversa composizione delle diete somministrate alle orate. Tuttavia, non avendo dati sulla composizione delle diete,

non possiamo fornire interpretazioni sulle differenze qualitative e quantitative emerse dalla comparazione dei campioni.

Tab. WP4.1.3.16 Tenore lipidico in orate campionate a 111 dgs, allevate in avannotteria convenzionale da uova biologiche.

	media	ds
Lipidi totali (g/100 g)	4,59	0,02

Tab. WP4.1.3.18 Acidi grassi di orate (% degli acidi grassi totali) campionate a 111 dgs ed allevate in avannotteria convenzionale da uova biologiche.

	Media	ds
C 12:0	0,04	0,00
C 13:0	0,02	0,00
C 14:0	3,28	0,03
C 15:0	0,35	0,00
C 16:0	16,42	0,18
C 17:0	0,45	0,00
C 18:0	5,42	0,00
C 19:0	0,11	0,00
C 20:0	0,20	0,01
C 21:0	0,03	0,00
<b>Saturi totali</b>	<b>26,32</b>	<b>0,20</b>
C 14:1 n - 5	0,03	0,00
C 16:1 n - 7	5,64	0,08
C 18:1 n - 9	14,23	0,00
C 18:1 n - 7	3,80	0,02
C 20:1 n - 9	0,98	0,01
C 20:1 n - 11	0,16	0,00
C 22:1 n - 9	0,21	0,00
C 22:1 n - 11	0,65	0,00
C 24:1 n - 9	0,37	0,01
<b>Monoinsaturi tot</b>	<b>26,06</b>	<b>0,05</b>
C 16:2 n - 4	0,57	0,01
C 18:2 n - 6	10,50	0,00
C 18:3 n - 6	0,71	0,01
C 18:3 n - 3	2,35	0,01
C 18:4 n - 3	1,54	0,00
C 20:2 n - 6	0,21	0,00
C 20:4 n - 3	0,68	0,00
C 20:4 n - 6	1,14	0,01
C 20:5 n - 3	8,21	0,06
C 22:4 n - 6	0,21	0,00
C 22:5 n - 3	2,26	0,01
C 22:6 n - 3	14,21	0,19
<b>Polinsaturi totali</b>	<b>42,57</b>	<b>0,25</b>
<b>somma n - 3</b>	<b>29,23</b>	<b>0,26</b>
<b>somma n - 6</b>	<b>12,76</b>	<b>0,00</b>
<b>n - 3 / n-6</b>	<b>2,29</b>	<b>0,02</b>

Tab. WP4.1.3.17 Profilo della frazione lipidica insaponificabile in orate campionate a 111 dgs ed allevate in avannotteria convenzionale da uova biologiche.

mg/100 g		
	Media	ds
Colesterolo	198,67	0,30
Squalene	1,13	0,01
α - tocoferolo	4,88	0,00
γ - tocoferolo	0,00	0,00
δ - tocoferolo	0,00	0,00
	mg/g olio	
Colesterolo	43,28	0,07
Squalene	0,25	0,00
α - tocoferolo	1,06	0,00
γ - tocoferolo	0,00	0,00
δ - tocoferolo	0,00	0,00

Al fine di valutare le condizioni di stress nei diversi lotti di giovanili, nelle larve e nelle uova è stato quantificato il livello di **cortisolo**, quale indicatore primario di stress.

Per la determinazione quantitativa del cortisolo nel siero è stato utilizzato un lettore automatico per micropiastre e il kit per l'immunodosaggio enzimatico Oxford Biomedical Research.

Il principio del metodo è il seguente: il cortisolo (antigene) presente nel campione compete con l'antigene marcato con perossidasi (perossidasi coniugata del cortisolo di rafano) nei confronti dell'anticorpo anti-Cortisolo adsorbito su micropiastro (fase solida). La separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di antigene marcato e quindi inversamente proporzionale alla concentrazione del cortisolo presente nel campione.

In accordo con quanto riportato in letteratura (De Jesus, 1991) e con la metodica stessa del kit, i campioni sono stati estratti con etil etere 2 volte prima di essere processati.

Per questo indicatore le analisi sono state condotte su pool di individui e sono pertanto state ottenute 2 misure

per ogni lotto analizzato. Non è stato pertanto possibile condurre alcuna analisi statistica.

I risultati sono quindi riportati su grafici (Fig. WP4.1.3.4 – 5), con il punto misura ripetuto 2 volte per ciascuno step di allevamento. Nei primi 2 grafici si riportano i dati relativi ai lotti provenienti da riproduttori alimentati con dieta biologica, mentre nei secondi 2 quelli relativi ai riproduttori alimentati con dieta convenzionale.

In tutti i casi sembra possibile identificare il punto di insorgenza della capacità di produrre cortisolo endogeno dopo i 60 giorni dalla schiusa, essendo sempre i valori decisamente più elevati che nelle larve. I valori sono comunque tutti molto bassi e non permettono di ipotizzare la presenza di una condizione di stress in nessuno dei lotti esaminati. Sono stati inoltre riportati altri

2 grafici (Fig. WP4.1.3.2.2-3 ) che mettono a confronto i risultati ottenuti nei quattro lotti a 60 giorni dopo la schiusa e poi a 111 giorni.

Mentre a 60 giorni dalla schiusa i valori sono risultati più bassi nei 2 lotti provenienti dai riproduttori alimentati con dieta biologica, indipendentemente dalle modalità di allevamento (intensivo o grandi volumi), a 111 giorni dalla schiusa nessun trend (né in funzione dei riproduttori di origine, né dell'allevamento in piccoli o grandi volumi) risulta evidente.

Fig. WP4.1.3.2.2 Livello di cortisolo: nei 2 grafici in alto si riportano i dati relativi ai lotti provenienti da riproduttori alimentati con dieta biologica, mentre nei 2 in basso quelli relativi ai riproduttori alimentati con dieta convenzionale. Un errore identifica in questi grafici i giovanili a 111 gds come 80 dph.

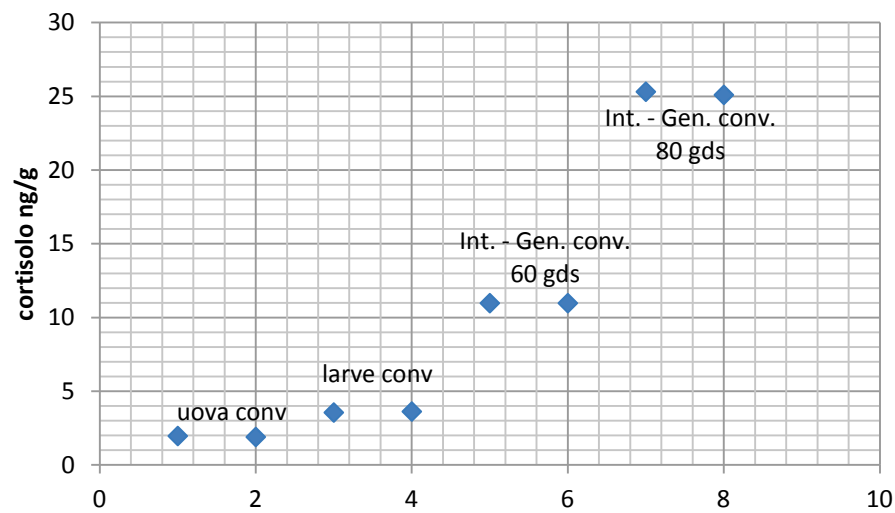
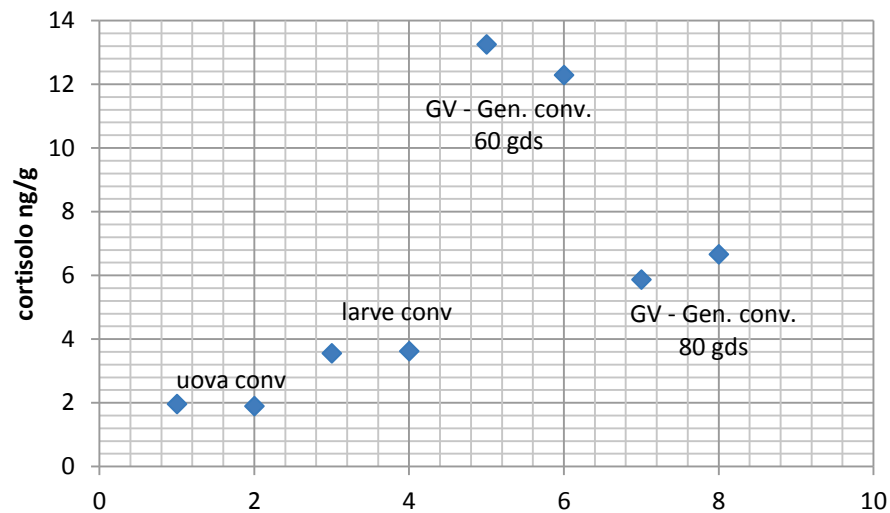
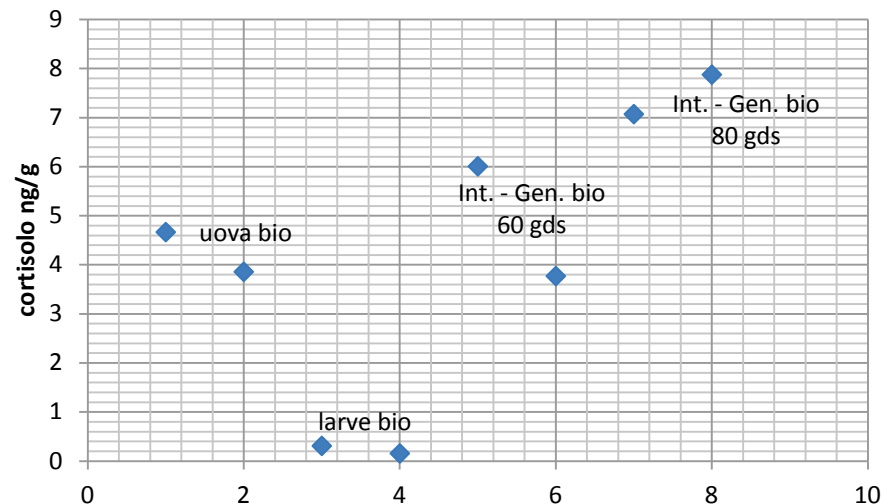
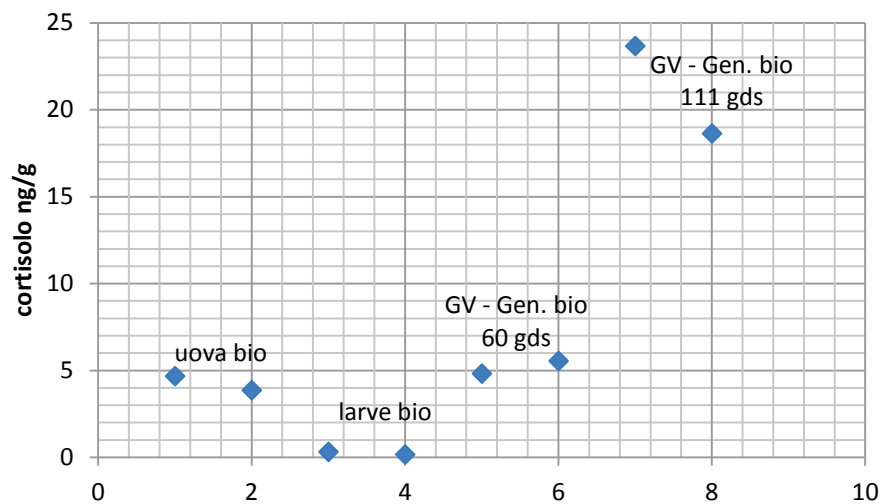
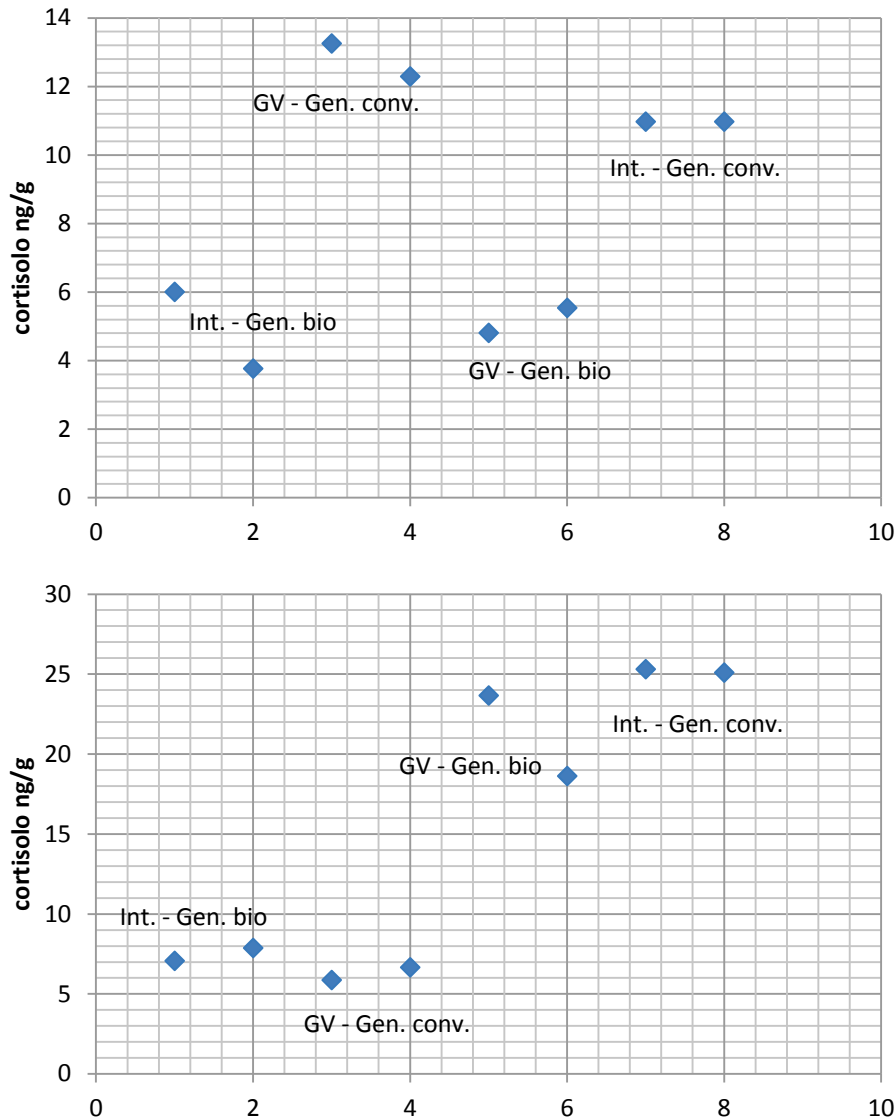


Fig. WP4.1.3.2.3 Livelli di cortisolo: il grafico in alto è riferito alle orate campionate a 80 dgs; quello in basso a 111 dgs.

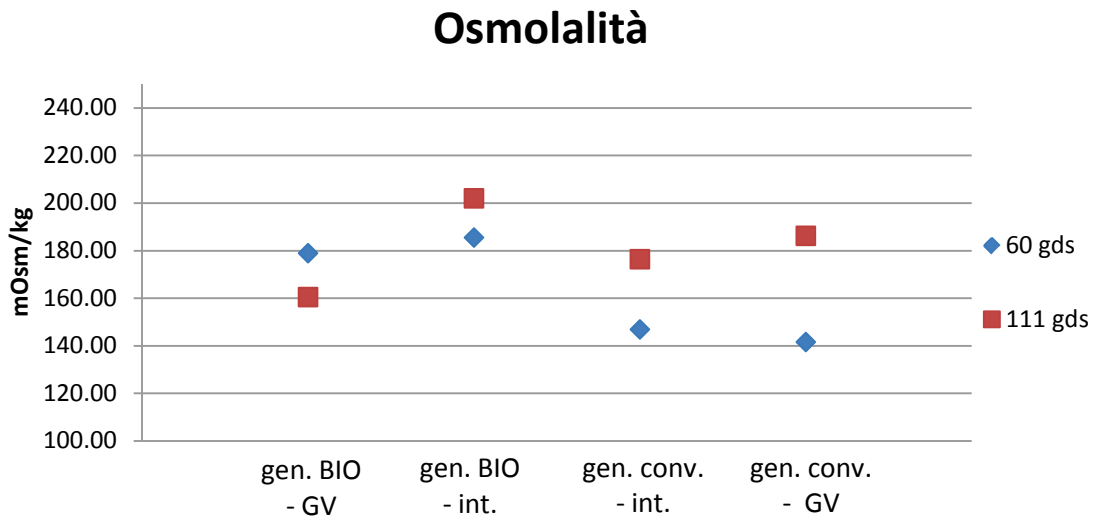


Infine, per arricchire le informazioni concernenti le condizioni di stress nei quattro lotti di giovanili è stata effettuata anche la misura dell'**osmolalità**. In questo caso l'omogenato è stato fatto in acqua distillata e la concentrazione totale delle sostanze osmoticamente attive (espressa in milliosmoli per kg di solvente) nel siero viene misurata utilizzando il Fiske Micro-Osmometer Model 210, Fiske Associates (Norwood, Massachusetts, USA). Il metodo crioscopico si basa sulla depressione del punto di congelamento per la misurazione, essendo l'abbassamento crioscopico direttamente proporzionale alla concentrazione molecolare delle sostanze disciolte. Il range di lettura dello strumento va da 0 a 2000 mOsm/kg, la ripetibilità è di  $\pm 2$  mOsm/kg.

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti, essendo anche in questo caso il dato ottenuto da pool di individui provenienti dal medesimo lotto. Come si osserva dai grafici (Fig. WP4.1.3.2.4), il trend riscontrato nei livelli di osmolarità nei 4 lotti risulta diverso secondo l'età (o fase di allevamento). Mentre a 60 dgs, infatti, vengono osservati valori più elevati e molto simili tra loro nei due lotti ottenuti da riproduttori alimentati con dieta biologica, questo trend si perde nei campioni di 111 dgs dove i lotti provenienti dai riproduttori alimentati con dieta biologica mostrano i valori più elevati (gen. Bio – intensivo/PV) e più bassi (gen. Bio – GV). I lotti provenienti da genitori

alimentati in modo convenzionale mostrano un trend opposto (valori intermedi tra i lotti da genitori biologici, più alti per quelli allevati in grande volume).

Fig. WP4.1.3.2.4 Valori di osmolarità rilevati nei lotti oggetto di studio.





#### WP4.2 Costruzione di un modello sintetico dei descrittori morfologici relativi allo sviluppo per l'identificazione/descrizione/sintesi di un protocollo di allevamento larvale "biologico" (Obiettivi A.3, B.4 e C)

**Obiettivo A.3:** applicazione di tecniche di analisi multivariata e di intelligenza artificiale per la valutazione integrata dei dati produttivi e biologici ottenuti ai fini della valutazione degli effetti del regime alimentare dei riproduttori sulla produttività economica e biologica in avannotteria.

**Obiettivo B.4:** Applicazione di tecniche di intelligenza artificiale insieme ad altri strumenti di nuova generazione, volta alla costruzione di un modello globale, multi-approccio e dinamico, dei diversi descrittori di stato e di processo che sono alla base della identificazione/descrizione/sintesi di un protocollo di allevamento larvale "biologico".

**Obiettivo generale e finale C:** Contribuire alla costruzione di un protocollo per le avannotterie biologiche di specie ittiche marine. Questo obiettivo verrà perseguito attraverso la costruzione di un modello basato su un approccio multidimensionale che integra dati produttivi, fisiologici e morfologici ottenuti su orata in questo programma di ricerca.

Il numero dei campioni sui quali sono state ottenute informazioni multidimensionali si è rivelato troppo esiguo per applicare tecniche di intelligenza artificiale basate su dati quantitativi (ad esempio le SOMs). Pertanto, si è deciso di utilizzare la metodologia degli **alberi di classificazione** (*Classification Tree*), come di seguito illustrato in dettaglio.

Materiali & Metodi

##### Gli alberi di classificazione e regressione

Ai fini della costruzione di un protocollo sintetico per l'utilizzo dei descrittori morfologici relativi allo sviluppo larvale e post-larvale e per la previsione della qualità dei lotti (basata, appunto, sull'osservazione quantitativa di un set ristretto di descrittori) è stata utilizzata la metodologia degli **alberi di classificazione** (*Classification Tree*). Gli alberi di classificazione costituiscono il modo più semplice di ripartire degli "oggetti", in questo caso delle osservazioni (lotti di orata), in un numero finito di classi distribuite lungo una scala ordinale o non. La costruzione di un albero procede suddividendo ripetutamente le osservazioni in sottoinsiemi omogenei rispetto alla variabile risposta. La suddivisione produce una gerarchia (convenientemente rappresentabile con una struttura ad albero che ben si adatta a visualizzare l'uso progressivo dei criteri dicotomici individuati), dove i sottoinsiemi (di osservazioni) sono chiamati **nodi** e quelli finali **foglie**. In particolare, i nodi sono etichettati con il nome degli attributi, gli archi (i rami dell'albero) sono etichettati con i possibili valori dell'attributo soprastante, mentre le foglie dell'albero sono etichettate con le differenti modalità dell'attributo classe che descrivono le classi di appartenenza. Un oggetto è classificato seguendo un percorso lungo l'albero che porti dalla radice ad una foglia. Tra i principali vantaggi di questo approccio c'è il fatto che l'interpretazione di un albero di classificazione è "trasparente": verificando le condizioni (nodi) ci si muove verso il basso nella direzione indicata a seconda del risultato della verifica, passando così dal nodo genitore a un nodo figlio, e procedendo da genitore a figlio sino a che ci si trova in un nodo terminale (foglia), che è associato ad un elemento della partizione. La procedura per la determinazione delle regole di classificazione rappresentate dall'albero consiste nell'eseguire suddivisioni successive dei dati a disposizione, creando quindi successive partizioni nidificate, in modo da costruire l'insieme completo di regole un nodo alla volta. Il problema della costruzione di un albero si articola in tre fasi: (1) la scelta, per ciascun nodo, della suddivisione ovvero (a) scelta della variabile da considerare; (b) scelta della regola di suddivisione; (2) la decisione se un nodo debba essere considerato terminale (foglia); (3) l'assegnazione di una classe a ciascuna foglia (nodo terminale). Chiaramente, queste scelte sono fatte in base ai dati, l'albero viene cioè stimato in base al campione: come avviene per molti metodi di stima il criterio è di far sì che l'albero descriva bene i dati, cioè classifichi bene le osservazioni campionarie. Un aspetto critico di questa procedura occorre quando, arrivati a un nodo, si deve stabilire se esso sia terminale o se possa essere

ulteriore genitore, si deve cioè scegliere il miglior albero tra alberi di diversa complessità. Una soluzione semplice e generalmente molto utilizzata è quella di fissare un valore soglia: un nodo è terminale se in esso vi sono meno di un fissato numero di osservazioni. Essendo il nostro obiettivo individuare una regola di allocazione dei lotti allevati rispetto ad una scala ordinale di **classi di qualità** (a loro volta basate sull'incidenza assoluta di anomalie gravi nei lotti analizzati), appare naturale la possibilità di valutare la bontà di un albero sulla base dell'errore di classificazione. La questione rientra tra i problemi di bilanciamento tra complessità e precisione di un modello (distorsione-varianza, in altre parole): al massimo della complessità otteniamo un albero che ha per ciascun nodo terminale una sola osservazione e che quindi comporta zero errori di classificazione riferendosi al campione di apprendimento ma, presumibilmente, un elevato errore di classificazione su una generica unità non compresa nel campione. Per affrontare questo problema ed ottenere alberi quanto più è possibile affidabili ma "generalisti" (ovvero capaci di classificare correttamente nuove osservazioni non comprese nei dati di partenza) è possibile utilizzare il metodo del *pruning* (potatura). La logica della potatura è che, anziché partire da zero e rendere via via più complesso l'albero, è preferibile partire da un albero complesso e semplificarlo. Si parte allora da un albero 'massimale', costruito con un criterio molto semplice, ad esempio che un nodo sia finale se ha meno di H osservazioni con H piccolo (relativamente al problema). Quindi, scelto un nodo dell'albero, si elimina quello e tutti i nodi figli. Dell'albero così potato si calcola l'errore apparente di classificazione. Tra gli alberi ottenibili a partire da quello massimale per potatura, vogliamo dunque scegliere "il migliore" bilanciando errore di classificazione e semplificazione dell'albero. Per tenere conto della semplificazione e dunque delle differenti dimensioni degli alberi si usa la dimensione dell'albero, data dal numero di foglie dell'albero. Si confrontano dunque gli alberi sulla base della funzione di costo/complessità usando un parametro  $\alpha$ , non negativo, come indice dei gradi di complessità, che quantifica la penalizzazione subita da un albero più grande, sicché se  $\alpha = 0$  il confronto è basato sul solo errore apparente, mentre al crescere di  $\alpha$  si scelgono tendenzialmente alberi più spogli se l'albero più ramificato fa guadagnare poco. Alla fine si seleziona, tra gli alberi, quello che realizza il minor valore di costo/complessità. Preso questo come punto di partenza, si itera la procedura, ottenendo alla fine una sequenza di alberi nidificati (di complessità decrescente). Si procede allora, per gli alberi della sequenza, a stimare l'errore di classificazione sul campione di validazione (o mediante convalida incrociata) e si usa tal errore come guida per la scelta dell'albero ottimale (salvo scegliere non l'albero caratterizzato dal minimo errore di classificazione ma generalmente un albero con errore di poco superiore al minimo).

E' necessario sottolineare che esistono diverse tipologie di algoritmi per la crescita e ramificazione degli alberi di classificazione. Quello utilizzato nel presente programma di ricerca è il (molto comune) metodo CHAID (*Chi-square Automatic Interaction Detection*), che permette ramificazioni multiple ma utilizza solo predittori qualitativi ovvero quantitativi riclassificati in categorie. Questo algoritmo procede in modo tale che, in corrispondenza di un nodo o sottogruppo di osservazioni, i dati (osservazioni/lotti) sono divisi nel modo seguente:

- 1) per ciascuna variabile antecedente si individua iterativamente la migliore aggregazione di categorie, ovvero quella che riproduce meglio la classificazione ottenuta con la variabile risposta. Per fare questo si utilizzano ricorsivamente test diversi a seconda del tipo di variabile risposta:
  - risposta continua test F;
  - risposta ordinale Likelihood Ratio Test (LRT);
  - risposta nominale test chi-quadrato;

corrispondenza con la classificazione ottenuta tramite la risposta;

3) si sceglie la variabile antecedente maggiormente significativa e si divide il sottogruppo analizzato sulla base del raggruppamento di categorie ottimizzato;

4) se nessuna variabile fosse significativa non si effettua alcuno split.

Successivamente si ritorna alla fase 1) e si analizzano i gruppi ottenuti. La procedura continua finché verifica la regola di arresto 4) per tutti i gruppi ottenuti.

### Il caso di studio

Questa metodologia è stata applicata ad un insieme di dati (lotti) comprendenti quelli prodotti durante l'attività sperimentale del presente programma di ricerca e, inoltre, quelli appartenenti al database storico del Laboratorio di Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura (LESA) dell'Università di Roma "Tor Vergata". Questa fusione dei due gruppi di dati è stata motivata dalla necessità di avere a disposizione un insieme di dati più grande e, quindi, in grado di supportare analisi più solide. Infatti, a partire dagli 8 lotti allevati nell'ambito del presente programma di ricerca, è stato possibile arrivare a 87 lotti. L'utilizzo di un database allargato, tuttavia, ha comportato il restringimento della presente analisi ai soli descrittori morfologici relativi alle anomalie scheletriche ed alla loro frequenza per lotto. Infatti, le altre tipologie di descrittori (forma mediante morfometria geometrica e fisiologia tramite parametri ematici), non sono disponibili in maniera omogenea e coerente per tutti i lotti del database storico del LESA. Si è ritenuto opportuno utilizzare comunque questo approccio al fine di indagare in maniera approfondita le potenzialità come descrittori morfologici delle anomalie scheletriche.

Sul piano applicativo non va dimenticato che una classificazione delle anomalie scheletriche più vistose è più facilmente trasferibile ai laboratori di controllo sulla qualità dei giovanili.

L'albero di classificazione è stato addestrato in modo da ripartire i lotti rispetto a 3 classi di qualità ordinate (bassa, media, alta) e corrispondenti alle caratteristiche di cui alla tabella seguente.

CLASSE DI QUALITA'	CRITERIO (FREQUENZA % ANOMALIE GRAVI)
BASSA	< 5%
MEDIA	5-40%
ALTA	>40%

L'albero è stato addestrato con il metodo CHAID e sottoposto a potatura con un valore soglia pari a 5. La capacità dell'albero di prevedere la classe di qualità di un nuovo lotto non utilizzato per la procedura di stime è stata calcolata mediante validazione incrociata (*cross-validation*), realizzata addestrando l'albero in maniera iterativa sull'80% dei lotti disponibili e, quindi, effettuando la predizione sul restante 20%.

### RISULTATI

Dalla tabella seguente è possibile osservare come, a partire dalle 42 diverse anomalie scheletriche descritte almeno una volta in uno degli 87 lotti, l'albero addestrato ne utilizzi soltanto 4. In particolare, le sole anomalie *D6 (archi emali anomali nella regione delle vertebre caudali)*, *G10 (epurali anomali)*, *X16 (altre anomalie craniali del glossoiale o del neurocranio)*, *X17 (opercolo anomalo)* sono sufficienti per una classificazione e/o predizione del livello globale di anomalie scheletriche caratterizzanti un lotto di orata.

**Riepilogo del modello**

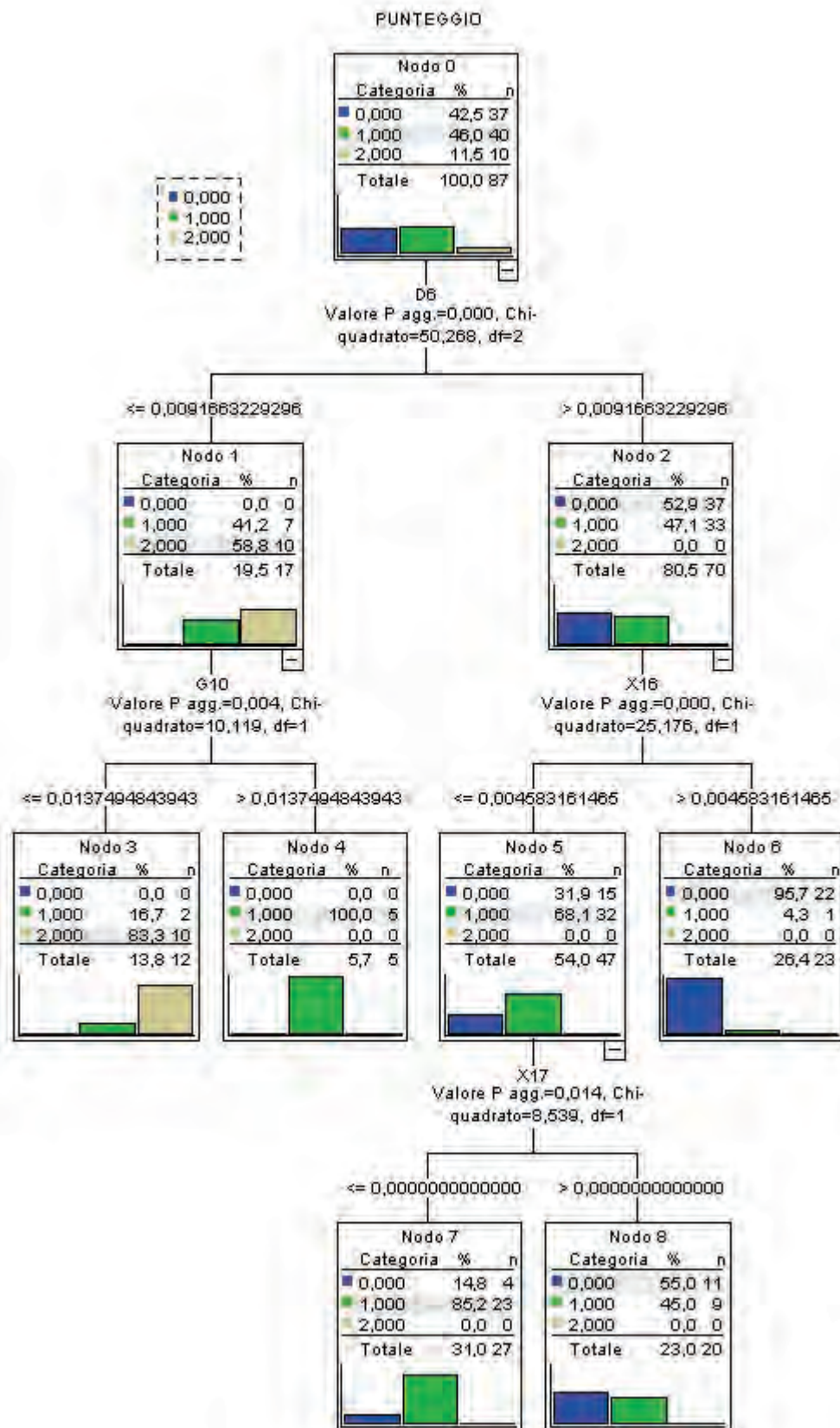
<b>Specifiche</b>	<i>Metodo di espansione</i>	CHAID
	<i>Variabile dipendente</i>	PUNTEGGIO
	<i>Variabili indipendenti</i>	A1, A2, A3, A4, A5, BS/SDB, B1, B2, B3, B4, B5, C1, C2, C3, C4, C5, C6, DS, D1, D2, D3, D4, D5, D6, E8, E11, F11, F8, G11, G9, G10, H11, H8, I11, I8, L11, X12, X13, X14, X15, X16, X17
	<i>Convalida</i>	Convalida incrociata
	<i>Massima profondità albero</i>	3
	<i>Numero minimo di casi nel nodo padre</i>	5
	<i>Numero minimo di casi nel nodo figlio</i>	5
<b>Risultati</b>	<i>Variabili indipendenti incluse</i>	D6, G10, X16, X17
	<i>Numero di nodi</i>	9
	<i>Numero di nodi terminali</i>	5
	<i>Profondità</i>	3

La tabella seguente, invece, riporta una descrizione schematica delle caratteristiche “medie” dei lotti, raggruppati per tipologia di allevamento, rispetto alle 4 anomalie scheletriche utilizzate dall’albero di classificazione.

Nome	D6	G10	X16	X17
<b>MediaINT</b>	0.11	0.15	0.02	0.03
<b>MediaLV</b>	0.15	0.15	0.01	0.04
<b>MediaME</b>	0.01	0.10	0.00	0.00
<b>MediaW</b>	0.00	0.01	0.00	0.00

L’albero ottenuto è rappresentato nella figura seguente. E’ possibile osservare la disposizione relativa delle 4 anomalie di cui sopra come criteri dei nodi di vario livello. Inizialmente l’albero esamina la frequenza di incidenza dell’anomalia D6. Questo porta alla suddivisione delle osservazioni in due blocchi. Il primo blocco, contenente lotti con una bassa incidenza dell’anomalia D6, è ulteriormente analizzato rispetto all’incidenza dell’anomalia G10: una bassa incidenza di quest’ultima caratterizza per l’83% lotti di elevata qualità (e dunque con una bassa incidenza globale di anomalie scheletriche gravi) e per il restante 17% lotti di qualità media; il secondo blocco, contenente lotti con un’alta incidenza dell’anomalia D6, è ulteriormente suddiviso sulla base dell’incidenza dell’anomalia X16: un’elevata incidenza di quest’anomalia corrisponde quasi esclusivamente a lotti di qualità bassa, mentre una bassa incidenza comporta la suddivisione ulteriore rispetto all’ultimo criterio, ovvero l’incidenza dell’anomalia X17, che indipendentemente dalla sua incidenza discrimina, con percentuali diverse, lotti di qualità media e lotti di qualità bassa: un alto livello di incidenza caratterizza il 45% di lotti di qualità media e il 55% di quelli di qualità bassa, mentre un livello basso contraddistingue circa il 15% dei lotti di qualità media e

l'85% dei lotti di qualità bassa. Un'analisi della struttura descritta dall'albero, alla luce delle conoscenze relative alle anomalie scheletriche, permette di interpretare tale struttura nel modo seguente.



Tutte le 4 anomalie considerate hanno una bassissima incidenza (o totale assenza) nei lotti di elevata qualità (selvatici). D'altronde, esse sono caratterizzate da livelli di frequenza medio-bassa anche nei lotti allevati in cattività (media del numero di individui affetti mai superiore al 15% degli individui). Tuttavia l'albero mostra come dopo una prima distinzione sulla base dell'incidenza dell'anomalia D6, le anomalie che discriminano i lotti di livello medio-basso sono entrambi anomalie gravi, mentre quella che discrimina tra lotti di livello alto e medio è un'anomalia non grave.

Se da una parte è evidente che l'albero non consente di arrivare ad una caratterizzazione esclusiva dei lotti (infatti anche alcuni nodi terminali contengono due classi di qualità), è anche possibile dedurre che, nel complesso, le altre 37 anomalie non utilizzate dall'albero, non forniscono un supporto diagnostico utile ai fini della classificazione, così come concepita in questa fase pilota.

La stima della capacità predittiva dell'albero, effettuata mediante validazione incrociata, ha permesso di ottenere i risultati presentati nella tabella seguente.

Osservato	Previsto			Percentuale corretta
	0	1	2	
0	33	4	0	89,2%
1	10	28	2	70,0%
2	0	0	10	100,0%
<b>Percentuale globale</b>	49,4%	36,8%	13,8%	81,6%

Metodo di espansione: CHAID

Variabile dipendente: PUNTEGGIO

La misura di accordo calcolato come Kappa di Cohen restituisce un valore di 0.745, che può essere considerato più che accettabile.

### WP4.3 Valutazione dei risultati ottenuti in conformità agli obiettivi del programma di ricerca

#### WP4.3.1 Valutazione del set di dati (obiettivo generale A)

**Obiettivo generale A:** Disporre di un set di dati relativi al confronto di allevamenti intensivi e semi-intensivi di giovanili di orata di origine nota al fine di valutare gli effetti della densità e dell'alimentazione biologica nelle prime fasi della filiera ("dall'uovo al giovanile").

L'individuazione di indicatori precoci dell'idoneità delle condizioni di allevamento utilizzate e della qualità del pesce prodotto è uno dei temi che vedono gli acquacoltori particolarmente interessati: risulta evidente il vantaggio economico che può derivare dalla possibilità di identificare il più precocemente possibile la qualità di un lotto di pesci in allevamento, permettendo di abbassare la perdita economica derivante dal portare fino alla taglia commerciale lotti contraddistinti da una frequenza troppo elevata di individui dall'aspetto anomalo. Tutti i pesci che presentano, per esempio, anomalie scheletriche devono essere eliminati dal mercato, infatti, per non danneggiare l'immagine del prodotto da acquacoltura.

La disponibilità di avere una serie di indicatori precoci della qualità è ancor più apprezzata quando nuove specie o nuove metodiche di allevamento vengono introdotte nei processi produttivi in acquacoltura, dato che permettere di poter individuare precocemente situazioni di allevamento troppo 'stressanti' per la specie o lo stadio in allevamento.

Purtroppo, l'identificazione di indicatori predittivi della qualità (morfologica, organolettica, nutraceutica, sanitaria, ecc.) sono tanti quanti i settori scientifici della biologia, essendo il concetto stesso di qualità definibile in modo diverso a seconda dei differenti campi scientifici, non solo biologici: per un produttore di giovanili, una elevata qualità dei lotti in allevamento significa elevati tassi di sopravvivenza (essendo i giovanili venduti su base unitaria), mentre per un proprietario di gabbie galleggianti, e che quindi si occupa esclusivamente della fase di ingrasso, un lotto di alta qualità è quello di un lotto di giovanili caratterizzato da un elevato tasso di crescita e che arrivino in numero elevato alla taglia commerciale e senza presentare anomalie.

Un buon descrittore della qualità dovrebbe essere in grado di descrivere e, ancor più desiderato, predire il più accuratamente possibile l'evoluzione nel corso della crescita di alcune caratteristiche specifiche, come la sopravvivenza, la crescita o le proprietà organolettiche dei filetti. I parametri maggiormente utilizzati finora appartengono a tre categorie, quella degli indicatori etologici, morfologici e fisiologici.

*Gli indicatori etologici* (o comportamentali) sono principalmente rappresentati da specifici comportamenti natatori, dalla distribuzione spaziale delle larve/pesci nella vasca e da comportamenti alimentari specifici. Si tratta di parametri molto informativi che permettono l'individuazione immediata di situazioni anomale, essendo il comportamento delle larve soggette a stress il test più comunemente applicato per la predizione della capacità di sopravvivenza delle larve. Il comportamento infatti è altamente influenzato dallo stato di salute degli individui stessi, rappresentando la massima espressione delle condizioni vitali delle larve, dove tutte (positive e negative) le esperienze pregresse si integrano. Possono quindi essere considerati come una fonte importante di informazione della qualità dei processi con capacità istantanee e predittive. Lo svantaggio maggiore derivante dall'utilizzo di descrittori etologici è la necessità di rifarsi a comportamenti standard difficilmente definibili e che quindi si basano su giudizi di esperti che implicano l'utilizzo di 'sensazioni' o esperienze pregresse, difficilmente quantificabili o da tramandare a personale ancora privo di esperienza. Inoltre, le interazioni tra vari fattori ambientali ed intrinseci e la competenza genetica delle larve spesso oscurano i pattern comportamentali in condizioni di allevamento. Per questo motivo non sono stati considerati in questa ricerca.

Gli indicatori morfologici possono essere divisi in morfometrici e anatomici. Quelli morfometrici si dividono, a loro volta, in quelli che analizzano le variazioni di forma (ed utilizzano tecniche di Morfologia Geometrica per l'analisi della forma) e quelli che considerano le variazioni che si osservano, nel corso dell'allevamento, in alcuni parametri, come il peso o la lunghezza, che possono, a loro volta, essere analizzati da soli, nel corso del tempo o in finestre di tempo prestabilite, o essere aggregati tra di loro a formare degli indici (fattore di condizione, AGR, SGR,...). L'andamento della crescita in lunghezza o nel peso è sempre controllato di routine nelle avannotterie. I parametri morfometrici, in genere, sono particolarmente utili perché la natura dei dati si presta ad essere utilizzata per le analisi statistiche. In genere, offrono un'ottima stima della eterogeneità morfometrica dello stock in allevamento (che risulta maggiore in condizioni di allevamento non idonee per la specie o lo stadio in coltura), dando quindi un quadro abbastanza reale dell'adeguatezza della tecnologia di allevamento.

Gli indicatori anatomici si basano sulla cronologia e sulla conformità dello sviluppo ontogenico. La presenza di una vescica natatoria attivata o l'assenza di individui con anomalie dello scheletro sono di per sé degli ottimi descrittori dell'idoneità delle condizioni in cui si svolge l'allevamento. Gli indicatori morfologici permettono una buona valutazione istantanea della qualità ma alcuni di loro mostrano uno scarso potere predittivo (Chatain, 1994). Ad esempio, un elevato tasso di crescita nella fase larvale non implica la garanzia di elevate performances di crescita nella fase successiva di ingrasso. Roo et al. (2009) hanno evidenziato come pagri Mediterranei (*Pagrus pagrus*, uno Sparide come l'orata) provenienti dallo stesso batch di uova e caratterizzati da tassi di crescita larvale simili, presentavano differenze nel tasso di individui con anomalie gravi (46,5% vs 16,3%).

Gli indicatori fisiologici sono probabilmente quelli più numerosi, basandosi sul concetto che i livelli o la qualità di alcuni composti fisiologicamente attivi (ormoni, proteine, lipidi, glucidi, minerali, vitamine, pigmenti, enzimi, DNA, RNA, RNA/DNA, ...) possono essere utilizzati potenzialmente come indicatori di disfunzioni fisiologiche. Riferendosi ad attività metaboliche, dovrebbero essere degli ottimi indicatori per valutare e predire la qualità dei lotti prodotti. Tuttavia, lo stato attuale delle conoscenze sui processi fisiologici nei pesci fa sì che i valori forniti da alcuni di questi (soprattutto quelli di nuova generazione) siano difficilmente correlabili a precisi quadri metabolici, risultando così solo raramente rilevanti o decisivi per la gestione produttiva. Inoltre esigono apparecchiature analitiche spesso sofisticate e costose, spesso non sono disponibili standard di riferimento e si riscontra un'elevata variabilità nei risultati delle analisi.

Nella Tab. WP5.1 è riportato un ricapitolo dei dati relativi ad alcuni degli indicatori utilizzati in questa ricerca, scelti perché, sulla base dei dati disponibili in letteratura, dotati di un chiaro significato biologico o produttivo, come di seguito evidenziato.

### **Descrittori della qualità delle uova**

La scarsa qualità delle uova è uno dei limiti maggiori che l'acquacoltura delle specie ittiche marine e di acqua dolce si trova ad affrontare (Brooks et al., 1997). In itticoltura, le uova di buona qualità sono quelle che esibiscono basse mortalità alla fecondazione, allo stadio di vescicole ottiche, alla schiusa e all'inizio dell'alimentazione esotrofica (Bromage et al., 1992).

*Peso medio e diametro medio dell'uovo* rilevato al momento della deposizione: questi valori riflettono principalmente la quantità di tuorlo presente nelle uova. In genere, larve di dimensioni maggiori schiudono dalle uova più grandi, anche all'interno della stessa specie, ma il vantaggio iniziale delle maggiori dimensioni delle larve viene presto mascherato da altri determinanti ambientali della crescita (Brooks et al., 1997). Pertanto, l'ipotesi che le larve più grandi schiuse dalle uova di maggior dimensioni abbiano migliori probabilità di sopravvivenza nei primi giorni di



vita, in quanto dotate di maggiori riserve di tuorlo, non sembra verificarsi in condizioni di acquacoltura. In letteratura (Moretti et al., 1999) è riportato che le uova di orata mediterranea sono sferiche, con un diametro che varia tra 0,94 e 0,99 mm. In questa ricerca, il diametro ed il peso medio dell'uovo sono risultati inferiori nelle uova ottenute da riproduttori biologici. Le uova da riproduttori convenzionali mostravano un diametro medio superiore al range indicato in letteratura, contrariamente a quelle da riproduttori biologici. Quindi la dieta sembra aver esercitato degli effetti sulla quantità di tuorlo disponibile per l'embriogenesi e per la fase endotrofica (quando, cioè, la larva, nei primissimi giorni di vita, non ha ancora l'apparato digerente differenziato e si alimenta a spese del residuo del tuorlo).

*Diametro medio del tuorlo (mm)* al momento della deposizione: la quantità di tuorlo presente nelle uova al momento della deposizione, per quanto sopra riportato, assume una considerevole importanza come indicatore del tasso di sopravvivenza nelle primissime fasi di sviluppo larvale. Come tuorlo, si intende tutto il materiale depositato in un oocita che servirà per nutrire l'embrione (Wiegand, 1996). Nei pesci, contiene principalmente lipoproteine, fosfoproteine e, spesso, come nel caso dell'orata, delle piccole inclusioni oleose (gocce lipidiche, vedere più avanti). Poiché la composizione in lipidi del tuorlo è influenzata da molti fattori, compresa la dieta fornita al riproduttore femmina (Wiegand, 1996), la presenza di differenze nel diametro medio delle uova ottenute dai due gruppi di riproduttori di questo studio assume particolare importanza. In particolare, l'esame della composizione in lipidi delle uova (riportata nei dati fisiologici) riflette quella della dieta fornita alle femmine in vitello genesi: saranno quindi particolarmente ricche in acido linoleico 18:2(n-6) se la dieta conteneva olii di origine vegetale, o in acido docosaesaenoico 22:6(n-3) (DHA), se di origine animale. I risultati inerenti questo descrittore sono commentati insieme ai successivi.

*Spazio perivitellino medio (mm±err. st.)* al momento della schiusa. Lo spazio perivitellino si forma a seguito dell'exocytosi degli alveoli corticali (reazione corticale) nello strettissimo spazio tra chorion (il guscio dell'uovo) ed il vitello, al momento della fertilizzazione. Durante la reazione corticale, il contenuto dei granuli corticali interagisce con il chorion creando una barriera all'ingresso di altri spermatozoi (bloccando così la possibilità di una polispermia). Inoltre, a causa dell'impermeabilità del rivestimento vitellino a sostanze ad elevata massa molecolare, queste rimangono confinate nello spazio perivitellino e provocano l'assunzione dal mezzo esterno di acqua e piccoli ioni attraverso il rivestimento dell'uovo. Interviene quindi anche nel mantenere il giusto grado di idratazione della cellula uovo, prevenendo la perdita d'acqua creando una barriera idrofobica (Podrabsky et al., 2001). Il 70% dello spazio perivitellino è costituito da acqua, il 20% sono proteine, il 5% da lipidi, ed il restante polisaccaridi, mucopolisaccaridi e polisialoglicoproteine. E' noto per possedere proprietà colloidali che si pensa siano responsabili per l'accumulo di una notevole pressione idrostatica interna (turgore dell'uovo). Inoltre, il fluido perivitellino ammortizza i danni meccanici all'embrione.

*Numero e diametro delle gocce lipidiche:* il numero e la posizione delle goccioline lipidiche presenti nella massa del tuorlo delle uova dei pesci ha carattere tassonomico. In orata mediterranea è presente solitamente una sola goccia lipidica (Moretti et al., 1999), disposta solitamente in posizione ventrale al sacco del tuorlo. La funzione delle gocce lipidiche sembra essere non tanto quella di favorire il galleggiamento delle uova demersali (in quanto questa funzione deriva dall'elevato contenuto in acqua delle uova) quanto quella di fornire elevata energia in una forma compatta: il contenuto calorico delle gocce lipidiche è infatti molto più elevato di quello del tuorlo (9291 vs 6917 calorie/gm) (Eldridge et al., 1977). Si tratta di una riserva di elevata energia che

l'embrione utilizza in caso di ristretta disponibilità di cibo nei primi giorni di alimentazione exotrofica o per crescere rapidamente in condizioni di offerta trofica adeguata (Wiegand, 1996). La presenza di un numero maggiore di gocce lipidiche di quello specie-specifico è segnale di una dieta inadeguata fornita alle femmine in riproduzione o di uova sovra mature o di condizioni particolarmente stressanti per i riproduttori.

I dati ottenuti in questo programma di ricerca hanno evidenziato come le uova OB (provenienti dai riproduttori biologici) siano caratterizzate da valori inferiori del peso medio dell'uovo, del diametro medio dell'uovo e del tuorlo e dell'ampiezza dello spazio perivitellino delle uova ottenute dai riproduttori alimentati con dieta convenzionale, mentre il numero e il diametro medio delle gocce lipidiche non risulta alterato. Il rapporto tra diametro medio dell'uovo/diametro medio del tuorlo evidenzia un rapporto più elevato (1,4 vs 1,3) nelle uova biologiche, indicazione di un tuorlo di dimensioni relativamente inferiori rispetto alle uova da riproduttori convenzionali. Da questi dati, quindi, si evidenzia una diminuzione quantitativa del tuorlo a disposizione degli embrioni biologici, come conseguenza della dieta materna.

*Tasso (%) di schiusa:* un elevato tasso di schiusa è indice di un'ottima qualità (in sostanze nutritive) delle uova, dell'efficacia della fecondazione e delle condizioni in cui si è svolto lo sviluppo embrionale. Il tasso di sopravvivenza delle uova e di schiusa è considerato in letteratura come la misurazione massima della qualità delle uova (Brooks et al. 1997). A titolo di esempio, agli inizi dell'acquacoltura mediterranea, le percentuali di schiusa in orata si aggiravano generalmente intorno al 10±15% delle uova deposte e fecondate (Carrillo et al., 1989) mentre in questa ricerca sono variate tra un minimo dell'85 ed un massimo dell'88,9 %.

Pur non essendo un indicatore con potenzialità predittive solide, rappresenta un ottimo indicatore istantaneo della qualità delle uova prodotte, conseguenza della dieta e delle condizioni di allevamento dei riproduttori. Essendo i due gruppi di riproduttori utilizzati in questo programma di ricerca diversificati solo in base alla dieta ad essi fornita durante i tre mesi precedenti l'evento riproduttivo, il tasso di schiusa assume in questo studio un chiaro e univoco indicatore della qualità delle uova prodotte nelle condizioni sperimentali. Il tasso di schiusa è risultato inferiore di circa 2 punti percentuale nelle uova ottenute da riproduttori in regime biologico, che comunque era compreso tra l'85,2 e l'86,9 %.

Dai dati ottenuti dall'analisi della qualità delle uova, risulta ben visibile come la dieta biologica offerta ai riproduttori abbia prodotto uova di minori dimensioni e peso e con minore quantità di tuorlo.

### ***Dati di accrescimento***

Questi valori morfometrici danno un'indicazione sullo stato di salute delle larve. I dati relativi alla lunghezza standard (LS) e peso sono stati rilevati lungo le due fasi di allevamento oggetto di studio mentre gli indici sono stati necessariamente calcolati per valutare l'accrescimento nella fase di svezzamento, al fine di valutare gli effetti a lungo termine della dieta fornita ai riproduttori (se ancora presenti) e, soprattutto, dell'allevamento larvale in Grandi Volumi (modello di avannotteria marina biologica proposto). Inoltre, l'andamento della crescita dei pesci in allevamento è (o dovrebbe essere) seguito di routine in impianto in quanto un'eventuale riduzione della crescita è generalmente considerato un buon indicatore di stress cronico, come osservato in molte specie ittiche allevate ad elevate densità (Procarione et al., 1999; Irwin et al., 1999; Kristiansen et al., 2004; Schram et al., 2006).

*Lunghezza standard (LS) e peso medio:* Alla fine della fase di allevamento larvale sono individuabili due trend diversi:

- 1) le postlarve ottenute da uova biologiche ed allevate in grandi volumi mostrano dimensioni e peso molto simili a quelle allevate in intensivo: non si osserva quindi un effetto della densità e dei volumi di allevamento;
- 2) le postlarve ottenute da uova convenzionali crescono in lunghezza e peso maggiormente in condizioni di allevamento biologico (grandi volumi): è presente quindi un effetto densità e volumi sulla capacità di crescita delle larve, che risulta maggiore in condizioni di densità più basse e di volumi a disposizione più ampi.

Tab. WP4.3.1: Sintesi riassuntiva dei dati relativi ad alcuni dei descrittori utilizzati<sup>11</sup> alla deposizione.

fase	deposizione		fine avannotteria				fine svezzamento			
codice lotto	OB1	OC1	V4	VP7	V8	VP4	SL6C	SC8	SL6T	SL6M
condizione sperimentale	uova da gen bio	uova da gen conv	60 gds gen BIO-GV	60 gds gen BIO - intens	60 gds gen conv - GV	60 gds gen conv - intens	111 gds gen BIO-GV	111 gds gen BIO - intens	111 gds gen conv - GV	111 gds gen conv - intens
<b>QUALITÀ DELLE UOVA</b>										
peso medio dell'uovo (mg) <sup>1</sup>	0.96	1.15								
diametro medio dell'uovo (mm) <sup>1</sup>	1.00	1.10								
diametro medio del tuorlo (mm) <sup>1</sup>	0.70	0.80								
spazio perivitellino medio (mm±err. st.) <sup>1</sup>	0.3±0.2	0.4±0.3								
numero e diametro (mm) gocce lipidiche <sup>1</sup>	1-0.2	1-0.2								
tasso (%) di schiusa	86.05	88.30								
<b>DATI DI ACCRESCIMENTO</b>										
LS media mm			13.65±1.4	13.9±1.3	17.2±1.7	14.4±1.3	31.1±5.9	30.8±5.8	32.9±5.6	28.9±6.4
peso medio g			0.033±0.00	0.051±0.01	0.084±0.11	0.045±0.01	0.75±0.43	0.78±0.48	0.88±0.45	0.62±0.51
fattore K di Fulton MEDIO K = $(P / Ls^3) \times 100$			1.75	1.89	2.09	1.8	2.26	2.15	2.27	2.19
Specific Growth Rate = $[(\ln w_t - \ln w_0) / (t_t - t_0)] * 100$							6.12	5.20	4.62	5.14
Absolute Growth Rate = $[(w_t - w_0) / (t_t - t_0)] * 100$							1.41	1.31	1.57	1.13
<b>MONITORAGGIO DELLE ANOMALIE SCHELETRICHE</b>										
% individui con anomalie gravi			17.00	31.00	16.00	47.00	13.00	22.00	11.00	34.00
<b>DATI FISIOLGICI</b>										
Immunocompetenza:			a; b	signific. < a	a; b	signific. < b	x	signific. > x		x
<b>Indicatori di stress:</b>										
Trigliceridi (mg/dL)	98.23	202.28	203.99	223.77	131.43	205.16	107.63	76.68	93.68	121.19
Glucosio (mg/dL)	<20	<20	43.04	43.99	29.62	43.29	<20	<20	<20	<20
proteine totali (g/dL)	<2	<2	<2	<2	<2	<2	43.04	43.99	29.62	43.29
cortisolo (ng/g)	4.26	1.93	5.17	10.97	12.77	10.97	21.14	7.47	6.27	25.20
<b>Analisi della componente lipidica:</b>										
Tenore lipidico (g/100 g)	6.87±0.31	4.13±0.12	3.65±0.02	3.64±0.1	3.44±0.00	3.71±0.14	nr		nr	
Frazione lipidica insaponificabile (mg/100 g)										
colesterolo	375.55±3.	229.05±5.5	275.52±1.6	263.42±0.5	256.21±3.0	278.44±5.6	nr		nr	
squalene	2.09±0.01	1.73±0.04	1.22±0.03	1.28±0.01	1.11±0.00	1.64±0.1	nr		nr	
Vitam. E (α-tocoferolo)	5.70±0.02	3.01±0.08	1.68±0.06	1.36±0.04	1.36±0.00	1.26±0.1	nr		nr	
Composizione (%) acidi grassi										
C18:1 n-9 (acido oleico, OA)	17.47±0.0	18.02±0.01	17.25±0.08	21.5±0.02	18.54±0.08	17.35±0.05	nr		nr	
C18:2 n-6 (acido linoleico)	4.93±0.00	3.86±0.00	6.41±0.02	4.97±0.0	5.73±0.00	5.22±0.0	nr		nr	
C18:3 n-3 (acido alfa-linolenico)	0.73±0.00	0.58±0.00	13.75±0.01	16.66±0.02	19.29±0.06	17.35±0.02	nr		nr	
C20:4 n-6 (acido arachidonico)	0.96±0.00	1.41± 0.01	1.86±0.00	2.08±0.01	1.79±0.04	1.89±0.0	nr		nr	
C20:5 n-3 (EPA)	6.27±0.02	5.62±0.03	6.50±0.07	5.12±0.02	5.33±0.03	5.19±0.02	nr		nr	
C22:6 n-3 (DHA)	17.31±0.0	18.22±0.06	9.88±0.10	6.77±0.03	8.38±0.17	7.85±0.03	nr		nr	
n-3/n-6	4.41±0.01	4.91±0.01	3.81±0.00	3.91±0.03	4.54±0.01	4.019±0.02	nr		nr	
EPA/ARA	6.53	3.99	3.49	2.5	2.98	2.7	nr		nr	
EPA/DHA	0.36	0.31	0.66	0.9	0.64	0.7	nr		nr	

Durante la fase di allevamento larvale, la qualità delle uova ha un effetto maggiore sulla crescita delle larve della modalità di allevamento. Il motivo per il quale l'effetto ambientale venga nascosto dall'effetto materno solo nelle orate provenienti da uova biologiche è difficile da individuare e meriterebbe ulteriori studi a questo dedicati. Bisognerebbe infatti disporre della composizione qualitativa e quantitativa esatta del mangime fornito ai riproduttori biologici, che non ci è stata resa disponibile dal fornitore, che, oltre tutto, ha interrotto la produzione di mangimi per acquacoltura biologica.

I campionamenti effettuati alla fine della fase di svezzamento mostrano invece la scomparsa di qualsiasi effetto materno e tutti i campioni che avevano sperimentato l'allevamento larvale biologico (Grandi Volumi) mostrano sempre valori di LS e peso molto maggiori di quelli allevati in condizioni intensive. In letteratura, una crescita ridotta è generalmente considerato un buon indicatore di stress cronico ed è stata riportata in diverse specie ittiche allevate ad elevate densità (Procarione et al., 1999; Irwin et al., 1999; Kristiansen et al., 2004; Schram et al., 2006).

*Indici di accrescimento: fattore K, SGR, AGR.* Si tratta di indici utili per valutare il tasso di accrescimento (SGR e AGR) o come crescono (fattore K) i pesci in allevamento. In particolare, il fattore K, che mette in relazione il peso con la lunghezza, fornisce anche un'idea della 'rotondità' del corpo, che appare meno filiforme negli individui con un fattore K maggiore. Per quanto riguarda l'SGR, i dati rilevati nel corso di questa ricerca sono molto maggiori di quelli reperiti in letteratura su orata che comunque si riferiscono alla fase di ingrasso, dove raramente superano un  $K=2$ . L'SGR maggiore in assoluto è stato rilevato nei giovanili che provenivano da uova biologiche ed erano stati allevati in grandi volumi. L'altro lotto allevato in grandi volumi ma proveniente da uova convenzionali mostra invece un SGR inferiore e un AGR superiore a quello osservato nel lotto fratello allevato in intensivo.

### ***Dati morfologici***

*Frequenza di individui con anomalie gravi:* L'analisi delle anomalie nel numero e nella forma degli elementi dello scheletro risulta particolarmente interessante, oltre che per la sua evidente utilità pratica, la facile applicazione e l'economicità dei costi, anche perché si basa sul presupposto che tanto più le condizioni di allevamento si discostano da quelle considerate ottimali per quella determinata specie, tanto maggiore sarà la frequenza e la tipologia delle anomalie nel lotto allevato. Variazioni nelle conte meristiche, presenza di asimmetrie nel numero degli elementi presenti in coppia (come i raggi delle pinne pettorali, per esempio) e di anomalie scheletriche sono tutte indicazioni della presenza di un '*developmental noise*', di instabilità di sviluppo nelle condizioni di allevamento sperimentate. Durante l'ontogenesi, infatti, l'espressione di un fenotipo geneticamente predeterminato è modulata dall'omeostasi di sviluppo, che interviene per contrastare eventuali disturbi genetici o ambientali. Quando questi ultimi prevalgono (come in condizioni di stress elevato, tipiche degli allevamenti intensivi), l'efficienza dei normali processi di differenziamento diminuisce e possono così insorgere anomalie morfologiche di vario genere. Inoltre, questo metodo di valutazione prevede il confronto dei dati raccolti su giovanili allevati con quelli ricavati da identica analisi condotta su conspecifici selvatici, ed allo stesso range di taglie, che vengono considerati lo standard di riferimento qualitativo. In questo modo, tutti gli individui che presentano morfologie simili al selvatico potranno essere considerati come quelli di qualità migliore e quindi contribuire a migliorare l'immagine dell'acquacoltura presso i consumatori. L'analisi delle anomalie scheletriche può quindi essere considerata anche una misurazione indiretta del benessere sperimentato dalle larve durante l'allevamento. È interessante ricordare che proprio la problematica del benessere degli animali fu presa in considerazione per la prima volta dal Brambell Report nel 1965, in cui venne fornita una delle prime definizioni dello stato di

salute degli animali e definite le 5 "libertà" per gli animali allevati, quindi anche per i pesci di acquacoltura:

- libertà dalla sete, dalla fame, dalla malnutrizione;
- libertà da stress termici e fisici;
- libertà da malattie e lesioni;
- libertà di esprimere l'etogramma specie-specifico;
- libertà dalla paura.

L'analisi delle anomalie scheletriche nei 4 lotti ha sempre evidenziato frequenze di individui con anomalie gravi (quelle cioè che alterano la forma esterna del pesce) quasi doppie nei lotti allevati in condizioni intensive nella fase larvale. Tale differenza si mantiene anche nella fase di svezzamento, dove l'effetto densità e volumi a disposizione delle orate non era più presente. Quindi, la dieta fornita ai riproduttori non sembra esercitare influenze apprezzabili sull'ontogenesi scheletrica di orata, mentre la densità e i volumi rappresentano i veri drivers della scheletogenesi. La limitatezza del tempo a disposizione del progetto ha impedito indagini più approfondite per il rilevamento di eventuali effetti materni 'nascosti' sulla scheletogenesi in orata.

### ***Dati fisiologici***

*Immunocompetenza - Reactive Oxygen Intermediates (ROIs)*: si tratta di molecole o ioni formati dall'incompleta riduzione di un elettrone dell'ossigeno (reazioni di ossido-riduzione).

Comprendono ossigeno singoletto, superossidi, perossidi, radicali idrossilici e acido ipocloroso. Sono coinvolti nell'attività microbica dei fagociti, nella regolazione della trasduzione del segnale e dell'espressione genica e nel danno ossidativo agli acidi nucleici, proteine e lipidi.

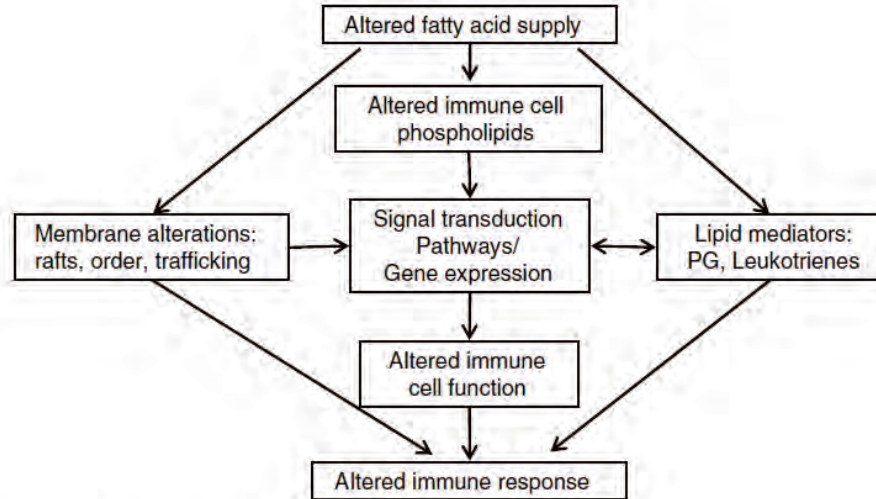
Gli effetti dei ROI sono dose-dipendenti: livelli elevati di queste molecole altamente reattive esercitano uno stress ossidativo sulle cellule e provocano profondi cambiamenti nell'espressione genica. Lo stress ossidativo è uno stato di ossidazione sbilanciata del tessuto, che coinvolge la produzione di ROI intra- ed extracellulare, per ossidazione dei lipidi, delle proteine e del DNA e spesso causa un disturbo generale del bilancio redox cellulare (Abele e Puntarulo, 2004).

Condizioni prolungate di stress ossidativo risulteranno in danni ossidativi cumulati al DNA, al RNA e alle proteine intracellulari (Dowling e Simmons, 2009). Diversi studi hanno identificato come i ROI siano coinvolti nei costi energetici per la riproduzione, dimostrando come un aumento nello sforzo riproduttivo risulti in un aumento della suscettibilità allo stress ossidativo. Inoltre, quando i fagociti inglobano microbi patogeni producono ROI in modo rapido e per via non-mitochondriale, che vengono utilizzati per uccidere gli invasori. La produzione di questi ROI assume quindi una caratteristica benefica, mediata principalmente dall'NADPH ossidasi, benché altri complessi come (la xantine-ossidasi, la glucosio-ossidasi e) gli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'acido arachidonico sembrano anch'essi contribuirvi (Dowling e Simmons, 2009).

Si è deciso di rilevare questo indicatore perché sia la sostituzione di grassi di origine animale con olii di origine vegetale (come richiesto dal regolamento CE per l'acquacoltura biologica) contenenti livelli elevati di acidi grassi n-6 può indurre degli squilibri nella risposta immunitaria nei pesci, abbassandone il potenziale di risposta ad infezioni (Montero et al., 2010). I ROI sono prodotti da tutti gli agenti attivatori di NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B), in quanto richiesti per la loro attivazione (Bonizzi et al., 1999) e è stato osservato che un eccesso di acido linoleico osservato in diete che prevedono la sostituzione degli olii animali con olio di soia provoca una potente attivazione di NF- $\kappa$ B tramite la fosforilazione di I $\kappa$ B (proteine inibitrici di NF- $\kappa$ B), un processo che promuove i processi infiammatori (Montero et al., 2010). In particolare in orata, Sitjà-Bobadilla et al. (2005) hanno dimostrato che la sostituzione di farine di pesce con livelli diversi di un misto di

proteine vegetali può provocare effetti nell'immunità innata (Fig. WP5.1) (innalzamento dello scoppio ossidativo, con produzione di ROS, con una sostituzione del 75% delle farine di pesce).

Fig. WP4.3.1 Effetti nei pesci dello squilibrio nella composizione in acidi grassi nell'alimento (ripreso da Sitjà-Bobadilla et al., 2005).



Caballero et al. (2005) hanno evidenziato come un aumento di acidi grassi della serie n-6 (soprattutto di acido linoleico) producono in orate di 85 gr alterazioni istologiche nel fegato. Inoltre, elevati livelli di acido linoleico non sembrano influenzare le funzioni dei macrofagi ma provocano livelli basali significativamente più elevati di cortisolo plasmatico e determinano una forte risposta in caso di stress da elevate densità.

Montero et al. (2003), sempre in orata mediterranea, hanno osservato come l'orata sopporti senza danni alla salute la sostituzione fino al 60% dell'olio di pesce nella dieta con una miscela di oli vegetali diversi, mentre la sostituzione del 60% con una sola tipologia di olio vegetale provoca effetti dannosi sull'immunosoppressione e la resistenza allo stress: l'olio di semi di colza (caratterizzato da livelli più elevati di acido oleico) danneggia l'attività dei macrofagi del rene cefalico, quello di soia (acido linoleico) l'attività della via alternativa del siero e l'olio di semi di lino (il cui componente principale è l'acido  $\alpha$ -linolenico) la risposta allo stress.

Dai risultati ottenuti in questo programma di ricerca, emergono due diversi quadri relativi ai livelli di ROI ottenuti a 60 e 111 giorni dalla schiusa. Mentre nelle orate alla fine della fase larvale è evidente un effetto "condizioni di allevamento" (o "effetto ambientale") significativamente sovrastante sull'effetto "dieta dei genitori" (o "effetto materno") per cui i lotti allevati in condizioni intensive esprimono un livello di ROI sempre significativamente inferiore a quello rilevato nelle orate allevate in grandi volumi, a prescindere dalla dieta dei riproduttori, a 111 gds solo il lotto che aveva sperimentato l'allevamento larvale in condizioni intensive e che proveniva da uova biologiche ha mostrato valori significativamente superiori alle orate sorelle allevate in grandi volumi e alle orate allevate nella fase larvale in intensivo e provenienti da riproduttori convenzionali. Questo lotto, comunque, è stato quello con i livelli maggiori di ROI espressi a 111 gds. È la prima volta, a nostra conoscenza, che viene effettuato questo tipo di analisi su pesci allevati e a due stadi ontogenetici abbastanza precoci, rendendo così impossibile qualsiasi confronto con dati relativi a questa o ad altre specie allevate che avrebbe aiutato ad interpretare questo risultato.

*Indicatori di stress – livelli ematici di trigliceridi, glucosio, proteine totali, cortisolo.*

I livelli ematici di questi composti sono normalmente monitorati per la valutazione dello stato di benessere animale. In particolare, i livelli di cortisolo (e catecolammine) sono indicatori primari e rappresentano la prima risposta dell'organismo a condizioni di stress acuto, mentre i livelli ematici di glucosio e di proteine totali rappresentano delle risposte secondarie, presenti a elevati livelli in condizioni di stress cronico (Wendelaar Bonga, 1997). Inoltre, la letteratura (Sandnes et al., 1988) evidenzia un effetto della dieta sul livello nel siero di trigliceridi e colesterolo. Queste proteine del siero svolgono una serie di funzioni, tra le quali particolarmente importante è quella della regolazione idrica nel pesce (Wedemeyer e Yasutake, 1977). Le proteine totali del siero hanno diversa origine: il fegato gioca un ruolo principale nel metabolismo dei trigliceridi e del colesterolo e, poiché i livelli nel siero di questi composti può variare indipendentemente, entrambi sono determinati per uso diagnostico.

Molte lipoproteine di mammiferi e pesci contengono trigliceridi, colesterolo e fosfolipidi che sono altamente suscettibili di ossidazione (Nakano et al., 1999). Le alterazioni indotte dall'ossidazione nelle lipoproteine provocano profondi cambiamenti alle cellule endoteliali dei vasi sanguigni, seguiti da disturbi nel sistema circolatorio sanguigno.

La concentrazione dei lipidi nel siero è nota per essere sotto l'influenza sia dello stato fisiologico sia delle condizioni ambientali, per esempio età, dieta, temperatura, densità, ecc.. In particolare, le sostanze ingerite oralmente sembrano essere i fattori più influenti (Nakano et al., 1999).

Un'elevata densità di allevamento è considerata un fattore di stress fisico, o chimico o sociale cronico, che si manifesta con meccanismi solo parzialmente compresi e che sembrano di natura specie-specifica (Mommsen et al., 1999; Barton, 2002). Il primo effetto è un aumento sostanziale del cortisolo plasmatico (Barton e Iwama, 1991; Wedemeyer, 1997), al quale il pesce può acclimatarsi attraverso la down-regulation dell'asse HPI (Hypothalamic-Pituitary-Interrenal) sotto il controllo di meccanismi a feedback negativo controllati dal cortisolo (Pickering e Stewart, 1984; Procarione et al., 1999; Barton, 2002): orate in fase di ingrasso allevate ad una densità di 40 kg/m<sup>3</sup> per 15 settimane mostravano livelli di cortisolo ematico significativamente maggiori di quelli riscontrati in orate stoccate a 10 kg/m<sup>3</sup> (Montero et al., 1999).

Inoltre, alcuni studi evidenziano come elevate densità di allevamento inducano mobilitazione dei lipidi, ossidazione degli acidi grassi tissutali e l'indirizzamento del glicerolo verso la gluconeogenesi (Moon, 1988; Vijayan et al., 1990; Montero et al., 2001). I livelli di trigliceridi, (NEFA *Nonesterified Fatty Acids*) e cortisolo sono negativamente correlati ai livelli ematici di glucosio (Di Marco et al., 2008) in subadulti di spigola (*Dicentrarchus labrax*) sottoposti a stress da densità elevata. In questo programma di ricerca, la presenza di una correlazione negativa tra livelli di trigliceridi e cortisolo e quelli di glucosio non è stata confermata.

In generale, la concentrazione delle proteine nel plasma diminuisce in presenza di elevate densità, come osservato in orata giapponese *Pagrus major* (Biswas et al., 2006). Si ritiene che questi cambiamenti siano la conseguenza di una proteolisi periferica in risposta ad ipercortisolemia (Mommsen et al., 1999).

I trigliceridi, insieme ai fosfolipidi, rappresentano la fonte più importante di energia per le larve di specie ittiche marine. Riproduttori maschi di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) alimentati con una dieta a base di oli vegetali (arachide e soia) presentano valori significativamente più alti, tra l'altro, di trigliceridi (4,40 mmol/l e 4,65 mmol/l) rispetto ai valori rinvenuti nei pesci trattati con olio di fegato di merluzzo (trigliceridi 3,45 mmol/l). Sia l'olio di arachide sia l'olio di soia sono caratterizzati da un basso rapporto n-3/n-6 e da valori particolarmente bassi di EPA+DHA se confrontati con l'olio di fegato di merluzzo. Questo fatto probabilmente ha determinato un differente metabolismo a livello epatico che si è evidenziato con un aumento di trigliceridi nel sangue.



In orata giapponese (260 gr), l'alimentazione con diete contenenti sostituti di origine vegetale (soia e glutine di grano) di proteine animali provoca una riduzione dei livelli plasmatici di trigliceridi e colesterolo. Queste diminuzioni sono state attribuite ad una inibizione dell'assorbimento dei lipidi della dieta e dei sali biliari dall'intestino (Goto et al., 2001). I risultati ottenuti in questo programma di ricerca hanno evidenziato livelli più elevati di trigliceridi nelle uova da genitori convenzionali, nelle orate allevate nella fase larvale in condizioni intensive (a prescindere della dieta fornita ai riproduttori) e campionate a 60 giorni e, a 111 gds, nei giovanili provenienti da uova biologiche e allevamento in Grandi Volumi e quelli da uova convenzionali ed allevati in intensivo durante la fase larvale. Il valore massimo (223,77 mg/dL) è stato osservato nel lotto di 60 gds da uova biologiche ed allevato in condizioni intensive, mentre quello più basso nei giovanili di 111 gds provenienti da genitori convenzionali ed allevati in Grandi Volumi. Notevole è la differenza osservata nel contenuto in trigliceridi nelle uova biologiche ed in quelle convenzionali, dove in queste ultime sono stati rilevati livelli due volte superiori (98,23 vs 202,28), confermando quanto osservato da Goto et al. in orata giapponese. L'andamento dei trigliceridi rilevato in questo studio ha evidenziato un aumento dei livelli alla fine della fase larvale in tutti i lotti (compresi quelli provenienti da uova biologiche, che raggiungono gli stessi livelli presenti nelle orate provenienti da uova convenzionali) per poi quasi dimezzarsi alla fine della fase di svezzamento al mangime artificiale.

Per quanto riguarda il glucosio, i dati relativi ai campioni all'uscita dall'avannotteria (i soli che mostravano valori superiori al limite di lettura dello strumento) non mostravano differenze sostanziali tranne per il lotto costituito da orate provenienti da uova convenzionali ed allevate in Grandi Volumi, che aveva il valore più basso misurato (29,62 vs  $\approx$  43 mg/dL degli altri lotti). Il livello di proteine totali (g/dL) nel plasma è risultato più elevato alla fine della fase sperimentale (non essendo rilevabile negli stadi precedenti) in tutti i lotti che avevano sperimentato condizioni intensive larvali, a prescindere dalla tipologia delle uova da cui erano schiuse le larve. L'andamento dei livelli di cortisolo rilevati non ha mostrato un chiaro trend: le uova biologiche ne presentavano un livello doppio di quello rilevato nelle convenzionali, ma questo effetto materno non è stato più osservato nelle larve o nei giovanili.

*Analisi della componente lipidica:* nelle uova, questa componente è conseguenza diretta dell'alimentazione riservata ai riproduttori. Ciò è soprattutto vero per quanto riguarda la composizione in acidi grassi insaturi (HUFA, Highly Unsaturated Fatty Acids), come osservato anche in orata mediterranea (Mourente e Odriozola, 1990), perché i pesci non sono in grado di sintetizzare *de novo* n-3 HUFA. E' ormai noto che l'orata richieda n-3HUFA per un corretto sviluppo e i livelli minimi di questi acidi nella dieta sono tra lo 0,6 e l'1,5% della dieta (DW) per le larve (Koven et al. 1990; Rodríguez 1994) e l'1% per i giovanili fino a 40 gr (Koven et al. 1990; Rodríguez 1994, Ibeas et al. 1994, 1996). Non è nota la richiesta in n-3 HUFA per i riproduttori di orata (Rodríguez et al., 1998) ma viene comunque raccomandato almeno un livello pari all'1,6% (Fernández-Palacios et al., 1995). Nei pesci, come negli altri vertebrati, un normale sviluppo e crescita richiedono in particolare la presenza nella dieta fornita di acido docosaesaenoico (DHA, 22:6n-3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e arachidonico (ARA, 20:4n-6) le cui funzioni cellulari e fisiologiche cadono in due categorie principali: a) un ruolo generico nel mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale delle membrane cellulari; b) un ruolo più specifico come precursori di eicosanoidi, un gruppo di ormoni paracrini altamente attivi biologicamente (Sargent et al. 1999).

Per quanto riguarda le uova di orata, secondo Izquierdo (1996), gli acidi grassi più importanti per un corretto sviluppo sono il DHA, l'acido palmitico, l'EPA e l'acido oleico, con i primi due molto più

importanti degli altri. EPA e DHA sono considerati gli acidi grassi essenziali (EFA) per i pesci marini. In orata, gli n-3 HUFA sono preferenzialmente conservati durante lo sviluppo embrionale e larvale, mentre quelli saturi e monoinsaturi (MUFA) vengono catabolizzati (Mourente e Odriozola, 1990). Durante i primi giorni di sviluppo, le larve di orata utilizzano gli acidi grassi secondo questo ordine preferenziale: saturi, n-9, n-6 ed, infine, gli n-3 (Rodríguez 1994). L'acido arachinoico (ARA) della famiglia n-6 e il DHA (famiglia n-3) vengono preferenzialmente conservati, anche in condizioni di digiuno prolungato. Pertanto, la loro composizione nei tessuti non riflette quella della dieta fornita ai pesci. Gli acidi palmitico (saturato) e oleico (MUFA) sono considerati delle fonti importanti di energia durante lo sviluppo larvale di specie ittiche marine (van der Meeren et al., 1991). In tutti i gruppi ittici studiati, l'acido docosapentaenoico (DPA) è presente in alti livelli, e in orata mediterranea è stato dimostrato avvenire per allungamento della catena dell'EPA a formare DPA (Mourente e Tocher, 1993). Una ridotta attività battericida è stata osservata in orata come effetto di una dieta povera di PUFA a lunga catena, contrariamente a quanto osservato in pesci di acqua dolce (Montero et al., 2010).

Il livello di n-3 HUFA nel cibo offerto (rotiferi, artemia, o diete) alle larve e ai giovanili è direttamente correlato con il tasso di accrescimento e di sopravvivenza larvale.

Una deficienza nei livelli di n-3 HUFA nelle larve può provocare una maggiore sensibilità a stress di tipo fisico (dovuta ad una ridotta permeabilità della membrana delle cellule ed una capacità minore di assumere ossigeno dovuta al contenuto ridotto di DHA nelle branchie), una maggiore fragilità eritrocitica, una diminuita attività dei neutrofili, diminuzione del tasso di attivazione della vescica natatoria (Izquierdo 1996). Inoltre, la presenza di alti livelli di a-tocoferolo presenti in micro diete somministrate a larve di orata significativamente riduce la sopravvivenza larvale (Izquierdo, 1996).

Per quanto riguarda la sostituzione di oli e farine animali nell'alimento con oli vegetali, è stato osservato in orate di 35 gr (Montero et al., 2010) che la completa sostituzione provoca una riduzione della crescita mentre la sostituzione fino al 70% non influisce su questo parametro ma riduce la capacità battericida a seguito di inoculazioni di patogeni (Montero et al., 2010). Se gli oli sostituiti contengono alti livelli di n-6HUFA allora si assiste ad alterazioni della risposta immunitaria con conseguente minor potenziale di risposta alle infezioni. In particolare, una riduzione del 70% dell'olio di alice porta a una riduzione dell'espressione genica basale mentre la sostituzione totale induce una sovraespressione di due citochine pro-infiammatorie (TNF $\alpha$  Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  e interleuchine IL-1 $\beta$ ). Sempre in orata, è stato osservato che un basso contenuto in n-6HUFA determina una migliore capacità battericida del siero dopo infezione e una dieta prolungata ricca in n-3PUFA provoca un chiaro effetto antinfiammatorio, probabilmente a causa della correlazione negativa individuata in leucociti umani tra contenuto cellulare in EPA e la produzione di citochine proinfiammatorie (Montero et al., 2010).

Gli oli vegetali terrestri presentano una maggiore presenza di n-6PUFA che porta a un basso rapporto n-3/n-6 (circa 0,3-1), sono ricchi in acidi grassi C18, soprattutto di acido linoleico (AL),  $\alpha$ -linolenico (ALA) e oleico (OA), ma sono carenti di PUFA a lunga catena come l'acido arachidonico (ARA), EPA e DHA. Gli oli animali ottenuti da organismi selvatici marini sono caratterizzati da un elevato rapporto n-3/n-6, pari a circa 8:1 (Montero et al., 2010), valore molto superiore a quelli rilevati nel corso di questo programma di ricerca. Un rapporto n-3/n-6 ben bilanciato migliora il funzionamento e la struttura delle cellule immunitarie, la segnalazione cellulare, la produzione di eicosanoidi (come le prostaglandine, i.e., il cui precursore principale è l'ARA, e sono coinvolti in molti processi biologici, incluso il metabolismo dello scheletro) e la risposta immunitaria.

L'EPA svolge un'inibizione competitiva con l'ARA tramite un effetto soppressivo della produzione di eicosanoidi (TXA<sub>2</sub>) che promuovono a loro volta la produzione di TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . La sostituzione

con oli vegetali, provoca una diminuzione del livello di EPA nella dieta e, come già riportato in precedenza, un eccesso di acido linoleico nella dieta provoca una potente attivazione di NFκB (Montero et al., 2010). Tutti gli agenti che attivano l'NFκB, a loro volta, inducono la produzione di ROI (in quanto richiesti per l'attivazione dell'NFκB). Anche l'IL-1β induce la produzione di ROI che a loro volta permettono l'attivazione di NFκB nelle cellule linfoidi.

### Eventuali scostamenti tra gli obiettivi proposti e quelli conseguiti

**Obiettivo generale A:** *Disporre di un set di dati relativi al confronto di allevamenti intensivi e semi-intensivi di giovanili di orata di origine nota (sono utilizzati in allevamento sia popolazioni di origine atlantica sia popolazioni di origine mediterranea sia ibridi) al fine di valutare gli effetti della densità e dell'alimentazione biologica nelle prime fasi della filiera ("dall'uovo al giovanile"). Le attività finalizzate al raggiungimento di questo obiettivo sono suddivise in tre gruppi (A.1, A.2 e A.3):*

**A.1:** *ricerca bibliografica di riferimento; individuazione regimi alimentari biologici più idonei; alimentazione differenziata dei riproduttori; riproduzione in condizioni biologiche e non; monitoraggio quotidiano delle condizioni chimiche e fisiche dei volumi di allevamento;*

**A.2:** *analisi della qualità delle uova ottenute da riproduttori "biologici" e non, tramite il rilevamento di dati biometrici (volume tuorlo, diametro uova, numero gocce lipidiche), relativi alla qualità morfologica (tasso di fecondazione, tasso di mortalità, tasso e tipologia di anomalie embrionali) e biochimica (proteine totali, trigliceridi e acidi grassi liberi);*

**A.3:** *applicazione di tecniche di analisi multivariata e di intelligenza artificiale per la valutazione integrata dei dati produttivi e biologici ottenuti ai fini della valutazione degli effetti del regime alimentare dei riproduttori sulla produttività economica e biologica in avannotteria.*

Non sono stati effettuati scostamenti dagli obiettivi proposti, anzi sono state fornite dati relativi alla composizione dei lipidi nelle uova ottenute dai due diversi gruppi di riproduttori, non previste nella proposta iniziale.

**Obiettivo generale e finale B:** *Chiarire, con un caso di studio, l'applicazione dei principi del biologico sulla produzione di novellame, capitolo ancora incerto del regolamento, suscettibile di evoluzioni nei prossimi anni. Le attività finalizzate al raggiungimento di questo obiettivo sono le seguenti:*

**B.1:** *Analisi fisiologiche - Messa a punto del sistema di estrazione ed analisi delle concentrazioni ematiche di cortisolo, osmolalità, elettroliti, glicemia, contenuto ematico di proteine totali, trigliceridi e acidi grassi liberi, emoglobina ed ematocrito, livelli tissutali di specie reattive all'ossigeno in postlarve di orata. Confronto tra i dati ottenuti da postlarve di orate biologiche e convenzionali. Messa a punto del sistema di valutazione dello stato di immunocompetenza (RT-PCR di geni dell'immunità innata) acquisito da orate alla fine della fase di allevamento larvale.*

Non sono stati effettuati scostamenti dagli obiettivi proposti, anzi sono state fornite dati relativi alla composizione dei lipidi nelle larve ottenute dai due diversi gruppi di riproduttori, non previste nella proposta iniziale.

Il programma prevedeva la valutazione dello stato di immunocompetenza utilizzando una RT-PCR per evidenziare i geni dell'immunità innata. Nel corso del primo anno di attività ci si è resi conto, però, che sarebbe stato molto più utile ed indicativo della ricerca di differenze nell'immunità innata tra larve di orata allevate in Grandi Volumi e quelle allevate in intensivo, andare ad esaminare la presenza di differenze nell'attivazione dei geni dell'immunità innata, più che la presenza o meno dei geni stessi. Per questo motivo, si è deciso di analizzare i livelli di ROI (*Reactive Oxygen Intermediates*), che vengono normalmente prodotti durante i processi infiammatori, infezioni batteriche o virali o in condizioni di stress ossidativo.

**B.2:** *Produzione di novellame biologico - allevamento larvale fino alla fase di svezzamento in condizioni biologiche e intensive (larve in condizioni biologiche e convenzionali in 3 repliche per ciascuna condizione di allevamento); preingrasso dei giovanili fino al raggiungimento di una taglia di 30 gr circa in condizioni identiche per giovanili biologici e convenzionali; monitoraggio quotidiano delle condizioni chimiche e fisiche dei volumi di allevamento.*

La scelta di effettuare le attività del programma di ricerca in un impianto commerciale produttivo, invece di un impianto sperimentale, e la ridotta durata del progetto hanno comportato delle limitazioni nella possibilità di effettuare il preingrasso fino al raggiungimento della taglia di 30 gr circa prevista dal progetto. E' stato comunque possibile analizzare i campioni fino alla fine della fase di svezzamento/inizio pre-ingrasso, per osservare l'effetto dell'alimentazione fornita ai riproduttori e delle condizioni di allevamento larvale a medio termine, un dato completamente

assente in letteratura e che sarà oggetto di una prossima pubblicazione scientifica su rivista internazionale.

**B.3:** *Valutazione delle performance produttive del novellame biologico - campionamento alla fine della fase di avannotteria e di preingrasso al fine del rilevamento dello stato di stress, di immunocompetenza e di qualità morfologica al termine della fase di svezzamento e dello stato di stress e di qualità morfologica al termine della fase di preingrasso.*

**B.4:** *Applicazione di tecniche di intelligenza artificiale (SOMs) insieme ad altri strumenti di nuova generazione, volta alla costruzione di un modello globale, multi-approccio e dinamico, dei diversi descrittori di stato e di processo che sono alla base della identificazione/descrizione/sintesi di un protocollo di allevamento larvale "biologico".*

**Obiettivo generale e finale C:** *Contribuire alla costruzione di un protocollo per le avannotterie biologiche di specie ittiche marine. Questo obiettivo verrà perseguito attraverso la costruzione di un modello basato su un approccio multidimensionale che integra dati produttivi, fisiologici e morfologici ottenuti su orata in questo programma di ricerca.*

Le tecniche di intelligenza artificiale che possono trattare dati multiparametrici richiedono un numero di individui molto elevato (migliaia di individui), per poter istruire il sistema di analisi. I dati multiparametrici raccolti nel corso di questo programma di ricerca sono un contributo completamente originale e per questo limitato agli individui campionati in questo programma di ricerca, rendendo così impossibile utilizzare i dati presenti nel database storico di questo Laboratorio. Pertanto siamo stati costretti ad utilizzare solo i dati relativi alle anomalie scheletriche per poter utilizzare il numero massimo di campioni (5.865 del database storico ai quali vanno aggiunti quelli campionati in questo programma di ricerca).

Raccomandazioni che emergono dal programma di ricerca

**“Ruolo delle produzioni semintensive nella revisione del sistema di regolazione della acquacoltura biologica europea”.**

Per quanto riguarda l'inquadramento dei risultati della ricerca alla “costruzione di una posizione italiana” per la revisione dei regolamenti di settore, emergono una serie di considerazioni che i decisori e la amministrazione competente potranno esaminare.

Per inquadrare sinteticamente il problema va ricordato che :

- il regolamento 1'834/2007 reca i principi dell'agricoltura biologica. Poi ci sono i regolamenti con le norme attuative: l'889/2008 che riguarda l'agricoltura biologica e il 710/2009 (in forma di emendamento all'889/2009)che riguarda l'acquacoltura biologica;
- per un'analisi più esaustiva vanno esaminati il Reg.889, il Reg. 710 e anche alcuni (più modesti) emendamenti successivi. Un ulteriore regolamento uscito recentemente (Reg. 56/2013) riguarda la riammissione dell'utilizzo di PAP (*Processed Animal Protein*) ottenute da non ruminanti, per l'integrazione di mangimi in acquacoltura. Il Regolamento riguarda l'acquacoltura convenzionale, ma da parte di molti sarebbe considerato di grande utilità anche per l'acquacoltura biologica se venisse ammesso a tale scopo;
- attualmente la Commissione sta raccogliendo ( o ha terminato di raccogliere) le proposte di modifica al Regolamento 710 provenienti dagli Stati Membri per valutare se avviare la procedura di revisione che, nel caso, passerebbe attraverso una riunione di EGTOP da convocare appositamente in Ottobre. A quanto sembra fino ad oggi, 9 Paesi hanno già richiesto ufficialmente l'avvio della procedura di revisione (compresa l'Italia).

In questo quadro è possibile pensare che le produzioni in avannotteria potrebbero essere oggetto di attenzione nella fase di revisione dei regolamenti.

E' di fatto molto complesso dare una lettura scientifica, con approccio sistemico, alle differenze tra prodotti convenzionali e biologici in acquacoltura.

Naturalmente se criteri e principi dell'acquacoltura biologica dovessero essere applicati a tutta la filiera produttiva, almeno per quanto riguarda il ciclo biologico di nostro interesse, le prime fasi di vita, dello sviluppo, del primo accrescimento se studiate ed approfondite su base scientifica ed empirica, potrebbero evidenziare forzanti capaci di determinare successivamente la traiettoria produttiva nel ciclo vitale. E' come dire che partendo da un seme “di qualità” si potrebbero ovviare ad alcuni colli di bottiglia che prevedono, per essere superati, ad esempio l'uso di farmaci, alcuni dei quali non consentiti dai protocolli biologici.

Gli studi da noi condotti per oltre venti anni (vedi bibliografia della presente relazione) sulle produzioni di larve, postlarve e giovanili in avannotterie, usando criteri morfologici (anatomia scheletrica, forma, aspetto esterno riferito alle pinne, ecc..) ci hanno permesso di evidenziare correlazioni significative tra ambiente di allevamento (pratiche gestionali, ecc..) e qualità intesa come differenza dei campioni allevati dal selvatico, considerato come standard di riferimento. Nel caso del presente programma di ricerca si è operato un confronto tra soggetti, ancora non sottoposti a programmi di selezione artificiale volontaria, ed il selvatico è stato ritenuto un riferimento morfologico che ha subito gli effetti delle pressioni selettive in natura (ad esempio pochi malformati perché in ogni caso caratterizzati da bassa sopravvivenza in natura).

Dagli esperimenti compiuti presso l'Acquacoltura Lampedusa appaiono confermati alcuni risultati, ed emergono stimoli per ulteriori considerazioni, sulla natura dei regolamenti da emendare, per rendere più credibili e competitive le produzioni da acquacoltura biologica.

Ciò premesso, le basi tecnico-scientifiche necessarie per la revisione dei regolamenti dovrebbero riguardare almeno, secondo rilevanza:

- A) *Densità e condizioni fisiche dell'allevamento larvale e post larvale.* Per l'allevamento biologico di specie marine eurialine è necessario garantire "metodi biologici" lungo tutta la filiera "dalla culla alla tomba"; pertanto, l'allevamento biologico inizia con la riproduzione controllata basata sulla produzione di gameti di qualità. Le larve e le post larve debbono essere allevate in grandi volumi dotati di idrodinamismo al fine di garantire ripartizione spaziale e attività motoria continua alle larve, con modalità che ricordano quelle naturali (*dalla gabbia al cortile*). Il nuoto attivo è indispensabile nei pesci reofili fin dalle prime fasi vitali. Va, infatti, ricordato che giovanili di spigola e di orata, e di altre specie con ecologia simile in altre latitudini, migrano dal mare verso gli estuari e le foci lagunari risalendo i fili di corrente generati dai flussi dovuti ad apporti continentali o da basculaggi da marea, o anche attratti dall'idrodinamismo del moto ondoso che rende accessibili piccole prede fossorie o concentrazioni di prede pelagiche per effetti dei vortici. Tutti i lavori scientifici depongono a favore di un giovanile di qualità risultato dello sviluppo di una post-larva cresciuta in un ambiente con medio e/o forte idrodinamismo. Anche i risultati di questa ricerca confermano la tendenza generale osservata che c'è un rapporto tra qualità morfologica del giovanile e volume di allevamento, che nel nostro caso è dotato di idrodinamismo. La raccomandazione sarebbe quella di imporre un protocollo che consideri una densità larvale massima (ad esempio, max 25 larve litro su volume da circa 60 m<sup>3</sup>), in presenza di idrodinamismo. Comunque data la natura delle basi tecniche del biologico in acquacoltura, ancora fragili, sarebbe il caso di inserire almeno i principi per superare la fase transitoria ed entrare in una fase di biologico "di fatto".
- B) *Alimentazione dei genitori.* L'alimentazione dei genitori è un tema da considerare con molta attenzione: se da un lato l'uso di prodotti freschi (pesci, molluschi, crostacei) è la pratica spesso usata dagli impianti per avere migliori risultati, dall'altro l'uso di mangimi biologici (per altro la cui messa a punto per le esigenze dei genitori è oggetto di discussione) coerente con i principi di tale allevamento pone molti limiti oggettivi. La dieta dei genitori dovrebbe prevedere, da protocollo, almeno il 50% di alimenti freschi, di origine naturale, certificati (origine, norme igienico sanitarie, natura della conservazione, ecc..). E' anche conosciuta la relazione tra capacità di emissione spontanea delle uova e condizioni ambientali e dieta ottimale per i genitori. Pertanto, al biologico dovrebbero andare solo uova da emissione spontanea, almeno per l'orata (come di fatto avviene in gran parte delle attività produttive). Non va dimenticato che l'emissione spontanea dei gameti è un indice integrato delle condizioni dei genitori in cattività.
- C) *Obbligo di monitoraggio morfologico larvale, prima della selezione dei malformati.* Il monitoraggio larvale, basato su descrittori morfologici (scheletro, forma, ad esempio) dovrebbe accompagnare il ciclo produttivo biologico poiché fornisce un'informazione integrata delle condizioni di allevamento. Tale monitoraggio dovrebbe essere effettuato da strutture indipendenti, con campionamenti che precedono la selezione morfologica dei malformati.

Tali raccomandazioni possono supportare una posizione delle delegazioni del MPAAF, con una base scientifica di supporto.

Bibliografia citata

- Abele D., Puntarulo S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Volume 138, Issue 4, 405-415.
- Barton B., Iwama G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1, 3–26.
- Beyers R.J., Odum H.T., 1993. *Ecological Microcosms*. New York: Springer.
- Biswas A.K., Seoka M., Tanaka Y., Takii K., Kumai H., 2006. Effect of photoperiod manipulation on the growth performance and stress response of juvenile red sea bream (*Pagrus major*). *Aquaculture* 258, 350–356.
- Boglione C., Gagliardi F., Scardi M., Cataudella S., 2001. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture* 192, 1–22.
- Bonizzi G., Piette J., Schoonbroodt S., Greimers R., Havard L., Merville M.P., Bours V., 1999. Reactive oxygen intermediate-dependent NF-kappaB activation by interleukin-1beta requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Mol. Cell. Biol.*, 19:1950–60.
- Bookstein F.L. (1991) *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bromage N.R., Jones J., Randall C., Thrush M., Davies B., Springate J., Duston J., Barker G., 1992 Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100, 141-166.
- Brooks S., Tyler C.R., Sumpter J.P. , 1997 Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7(4): 387-416.
- Caballero M.J., Izquierdo M., Kalinowski T., Montero D., Obach A, Robaina L., Tort L., 2005. Effect of dietary vegetable lipid sources in gilthead seabream (*Sparus aurata*) immune status and stress resistance. In: Montero D. (ed.) , Basurco B. (ed.) , Nengas I. (ed.) , Alexis M. (ed.) , Izquierdo M. (ed.) . *Mediterranean fish nutrition Zaragoza : CIHEAM Cahiers Options Méditerranéennes*; n. 63, 103- 112.
- Carrillo M., Bromage N., Zanuy S., Serrano R., Prat F., 1989 The effect of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 81, 351-365.
- Cataudella S., Russo T., Lubrano P., De Marzi P., Spanò A., Fusari A., Boglione C. (2002) An ecological approach to produce “wild like” juveniles of sea bass and sea bream: trophic ecology in semi-intensive hatchery conditions, in: *Seafarming today and tomorrow. Extended abstracts and short communications. Presented at the Aquaculture Europe 2002, Trieste, Italy, October 16-19. pp. 177-178.*
- Chatain B., 1994 Quality Assessment of Marine Fish Larvae and Juveniles. In: Kestemont, P., Muir, J., Sevilla, F., Williot, P. (Eds.), *Measure for success – Metrology and Instrumentation in Aquaculture Management*. Cemagref, Edition., 181-183.
- De Jesus, E.G., Hirano, T., Inui, Y., 1991 Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82, 369–376.
- Di Marco P., Priori A., Finioia M.G., Massari A., Mandich A., Marino G., 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture*, 275(1–4), 319-328.
- Dingerkus, G.; Uhler, L. D. 1977. Enzyme clearing of Alcian blue stained whole small vertebrates, for demonstration of cartilage. *STAIN TECHNOL.*, 52(4): 229-232.



- Dowling D.K., Simmons L.W., 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. R. Soc. B* 22, vol. 276 no. 1663, 1737-1745.
- Eldridge M.B., King D.J., Bowers M.J., 1977 Role of the oil globule in survival and growth of striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *Proceedings of the Annual Conference Western Association of Game and Fish Commissioners* 57:303-313.
- Fernández-Palacios H., Izquierdo M., Robaina L., Valencia A., Salhi M., Vergara J.M., 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 132:325-337.
- Goto T., Takagi S., Ichiki T., Sakai T., Endo M., Yoshida T., Ukawa M., Murata H., 2001. Studies on the green liver in cultured red sea bream fed low level and non-fish meal diets: Relationship between hepatic taurine and biliverdin levels. *Fisheries Science*, 67: 58-63. doi: 10.1046/j.1444-2906.2001.00199.x
- Ibeas C., Izquierdo M.S., Lorenzo A., 1994. Effect of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 127:177-188.
- Ibeas C., Cejas J.R., Gómez T., Jerez S., Lorenzo A., 1996. Influence of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids levels on juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth and tissue fatty acid composition. *Aquaculture* 142:221-235.
- Irwin S., O'Halloran J., FitzGerald R.D., 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture* 178, 77-88.
- Izquierdo M. S., 1996 Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, 2: 183-191.
- Klingenberg C.P. (2007) MorphoJ. UK: Faculty of Life Sciences, University of Manchester.
- Koven W.M., Tandler A., Kissil G.W., Sklan D., Friezlander O., Harel M., 1990. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 91:131-141.
- Kristiansen T.S., Ferno A., Holm J.C., Privitera L., Bakke S., Fosseidengen J.E., 2004. Swimming behaviour as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities. *Aquaculture* 230, 137-151.
- Lele S., Richtsmeier J.T. (1995) Euclidian Distance Matrix Analysis: Confidence intervals for form and growth differences. *American Journal of Physical Anthropology* 98(1), 73-86.
- Lele S., Richtsmeier J.T. (2001) An invariant approach to statistical analysis of shapes. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton.
- Mommsen T.P., Vijayan M.M., Moon T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211-268.
- Montero D., Izquierdo M.S., Tort L., Robaina L., Vergara J.M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 53-60.
- Montero D., Kalinowski T., Obach A., Robaina L., Tort L., Caballero M.J., Izquierdo M.S., 2003 Vegetable lipid sources for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: effects on fish health. *Aquaculture* 225,353-370.
- Montero D., Mathlouthi F., Tort L., Afonso J.M., Torrecillas S., Fernández-Vaquero A., Negrin D., Izquierdo M.S., 2010 Replacement of dietary fish oil by vegetable oils affects humoral immunity and expression of pro-inflammatory cytokines genes in gilthead sea bream *Sparus aurata*, *Fish & Shellfish Immunology*, 29(6), 1073-1081.
- Moon T.W., 1988. Adaptation, constraint, and the function of the gluconeogenic pathway. *Can. J. Zool.* 66, 1059-1068.

- Moretti A., Pedini Fernandez-Criado M., Cittolin G., Guidastrì R., 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. Volume 1. Rome, FAO. 194 p.
- Mourente G., Odriozola J.M., 1990. Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid compositions in eggs of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Physiol. Biochem. 8:93–101.
- Mourente G., Tocher D.R., 1993 Incorporation and metabolism of <sup>14</sup>C-labelled polyunsaturated fatty acids in juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *in vivo*. Fish Physiol. Biochem., 10,443-453.
- Nakano T., Kanmuri T., Sato M., Takeuchi M., 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1426(1), 119-125.
- Orban E., Di Lena G., Ricelli A., Paoletti F., Casini I., Gambelli L., Caproni R., 2000 Quality characteristics of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) from different intensive rearing systems. Food Chem. 70, 27-32
- Park E., Kim D., 1984. A procedure for staining cartilage and bone of whole vertebrate larvae while rendering all other tissues transparent. Stain Techn., 59(5): 269-72.
- Perez S.I., Bernal V. & Gonzalez P.N. (2006) Differences between sliding semilandmark methods in geometric morphometrics, with an application to human craniofacial and dental variation. Journal of Anatomy 208(6), 769-784.
- Pickering A.D., Stewart A., 1984. Acclimation of the interregional tissue of the brown trout, *Salmo trutta* L., to chronic crowding stress. J. Fish Biol. 24, 731–740.
- Podrabsky J.E., Carpenter J.F., Hand S.C., 2001 Survival of water stress in annual fish embryos: Dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 280 (1 49-1), pp. R123-R131.
- Procarione L.S., Barry T.P., Malison J.A., 1999. Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. N. Am. J. Aquac. 61, 91–96.
- Rodríguez C., Pérez J.A., Lorenzo A., Izquierdo M.S., Cejas J.R., 1994. n-3 HUFA requirement of larval gilthead seabream *Sparus aurata* when using high levels of eicosapentaenoic acid. Comp. Biochem. Physiol. 4:693–698.
- Rodríguez C., Cejas J.R., Martín M.V., Badía P., Samper M., Lorenzo A., 1998 Influence of n-3 highly unsaturated fatty acid deficiency on the lipid composition of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and on egg quality. Fish Physiology and Biochemistry 18: 177-187.
- Rohlf F.J. (2006) TpsDig Ver. 2.10, Digitalized Landmarks and Outlines. Department of Ecology and Evolution, Stony Brook, State University of New York.
- Rohlf F.J., Slice D. (1990). Extension of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. Syst. Zool. 39, 40–59.
- Roo F.J., Hernandez-Cruz C.M., Socorro J.A., Fernández-Palacios H., Montero D., Izquierdo M.S., 2009 Effect of DHA content in rotifers on the occurrence of skeletal deformities in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). Aquaculture 287: 84–93.
- Sandnes K., Lie Ø., Waagbø R., 1988 Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. Journal of Fish Biology, 32: 129–136. doi: 10.1111/j.1095-8649.1988.tb05341.x
- Sargent J., Bell G., McEvoy L., Tocher D., Estevez A., 1999 Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Aquaculture 177(1–4): 191-199.
- Schram E., Van der Heul J.W., Kamstra A., Verdegem M.C.J., 2006. Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*). Aquaculture 252, 339–347.
- Sitjà-Bobadilla A., Peña-Llopis S., Gómez-Requeni P., Médale F., Kaushik S., Pérez-Sánchez J., 2005 Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defense mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 249,387-400.

- Shields R.J. 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture* 200, 55–88.
- van der Meeren T., Klungsoyr J., Wilhelmssen S., Kvenseseth P.G., 1991 Fatty acid composition of unfed and growing cod larvae, *Gadus morhua* L., feeding on natural plankton in large enclosures. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development* (Walther, B.T., & Fyhn, H.J. eds), pp. 34-35. Univ. of Bergen, Bergen, Norway.
- Vijayan M.M., Ballantyne J.S., Leatherland J.F., 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* 88, 371–381.
- Viscosi V., Cardini A., 2011. Leaf Morphology, Taxonomy and Geometric Morphometrics: A Simplified Protocol for Beginners. *PLoS ONE* 6(10): e25630. doi:10.1371/journal.pone.0025630.
- Wedemeyer G. A., Yasutake W. T., 1977. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. Tech. Pap, US. Fish Wildl. Serv. 89.
- Weiss S.M., Kulikowski C.A., 1991 *Computer Systems that Learn*. Morgan Kaufmann, San Mateo, CA.
- Wendelaar Bonga SE., 1997 The stress response in fish. *Physiol Rev.* 77(3):591-625.
- Wiegand M.D., 1996 Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6, 259-286.
- Zelditch M.L., Swiderki D.L., Sheets H. D. & Fink W.L. (2004) *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Elsevier, Academic Press, San Diego, CA.

# **Allegato 1**

- 1.1) certificato ISO 22000
- 1.2) certificato Global G.A.P. (Good Agricultural Practice)
- 1.3) certificato di approvazione per le produzioni biologiche
- 1.4) scheda tecnica del mangime Ecolife Pearl 864

**BUREAU VERITAS**  
Certification



## Certification

Attribuée à

**BIOMAR SAS**

**Zone industrielle - 60, rue Pierre-Georges Debouchaud  
16440 NERSAC**

Bureau Veritas Certification certifie que le système de Management de la sécurité des aliments de l'entreprise susmentionnée a été évalué et jugé conforme aux exigences de la norme :

---

# NF EN ISO 22 000 : 2005

Domaine d'activité

---

***PRODUCTION D'ALIMENTS COMPLETS ET D'ALIMENTS MEDICAMENTEUX  
POUR L'AQUACULTURE, DE LA SELECTION DES MATIERES PREMIERES  
A LA LIVRAISON DES PRODUITS FINIS.***

***PRODUCTION OF COMPLETE FISHFEED AND MEDICATED FISHFEED, FROM  
THE SELECTION OF RAW MATERIALS TO THE DELIVERY OF  
FINISHED PRODUCTS.***

Date de certification originale : *19 juin 2007*

Sous réserve du fonctionnement continu et satisfaisant du système de management de la qualité de l'entreprise, ce certificat est valable jusqu'au : **13 mars 2013**

Pour vérifier la validité du certificat appelez au 01 41 97 00 60

Tout éclaircissement sur cette certification peut être obtenu auprès de l'entreprise certifiée.

Date : 12 mai 2010  
Numéro d'affaire : 2080164

**Bruno LABARRE**  
Directeur Général



**BUREAU VERITAS**  
Certification



## Certificate of Conformity

Awarded to

# BIOMAR SAS

NERSAC - FRANCE

60 RUE PIERRE-GEORGES DEBOUCHAUD, ZONE INDUSTRIELLE - 16440

GGN: **4050373589684**

REGISTRATION NUMBER: **BVC-E FR10002**

Bureau Veritas Certification declares that the production of the products mentioned on this non accredited certificate have been found to be compliant according to

STANDARD

**GLOBALG.A.P (EUREPGAP®) General Regulations  
Control Points and Compliance Criteria COMPOUND FEED  
MANUFACTURING  
VERSION 2.0\_Mar10  
Option 1**

*PRODUCT SCOPE: COMPOUND FEED MANUFACTURING*

PRODUCTS	PRODUCT QUANTITY (Tons)
COMPOUND FEED FOR AQUACULTURE	32,000

### PRODUCE MANUFACTURING CENTRES

NAME	ADDRESS	PRODUCTS
BIOMAR SAS	60 RUE PIERRE-GEORGES DEBOUCHAUD, ZONE INDUSTRIELLE - 16440 NERSAC, FRANCE	COMPOUND FEED FOR AQUACULTURE

Valid from: **14<sup>th</sup> January 2011**

Subject to the continued satisfactory operation of the organisation's Good Agricultural Practices, this certificate is valid until: **13<sup>th</sup> January 2012**

Further clarification regarding the scope of this certificate and the applicability of the management system requirements may be obtained by consulting the organisation.

Certificate Number: **ES029351**

Decision date: **14<sup>th</sup> January 2011**

Managing office: Bureau Veritas Certification SA  
Issuing office: Bureau Veritas Certification SA  
C/ Valporillo Primera, 22-24  
Edif. Caoba - P.L. Graña  
28108 Alcobendas - Madrid (España)  
jacobo.novoa@es.bureauveritas.com

Authorized by: **E CASAL**





Ref : A-E28-1-10

Page 1 sur 1

## CERTIFICAT N° AB- 5190 / 13760

Document justificatif à fournir à l'opérateur conformément  
à l'article 29, paragraphe 1 du règlement (CE) n°834/2007

**(2) Nom et adresse de l'opérateur :**

**BIOMAR SAS**  
60 RUE PIERRE-GEORGES DEBOUCHAUD  
ZI BP 1  
16440 NERSAC

**(3) Nom, adresse de l'organisme de contrôle :**

**QUALITÉ-FRANCE SAS**  
Le Guillaumet  
92046 PARIS LA DEFENSE CEDEX

Agrément de l'INAO n° **FR-BIO 10**  
Accréditation COFRAC n° 5-0056 (\*)

Activité principale : Transformateur

(4) (5)

**Produit issu de l'agriculture biologique**

Aliments pour animaux	Aliments pour animaux	Aliment poisson Ecolife Pearl 864 N° 3
Aliments pour animaux	Aliments pour animaux	Aliment poisson Ecolife Pearl 864 N° 1,9
Aliments pour animaux	Aliments pour animaux	Aliment poisson Ecolife Pearl 864 N° 4,5
Aliments pour animaux	Aliments pour animaux	Aliment poisson Ecolife Pearl 864 N° 6,5

**(6) Validité : du 26/05/2010 au 31/12/2011**

**(7) Date du dernier contrôle : 28/05/2010**

(8) Le présent document a été délivré sur la base de l'article 29, paragraphe 1, du règlement (CE) n° 834/2007 et des dispositions du règlement (CE) n°889/2008 et le cas échéant du cahier des charges français homologué par arrêté du 05/01/2010. L'opérateur a soumis ses activités à contrôle et respecte les exigences établies aux règlements précités.

Ce certificat est la propriété de Qualité-France SAS et doit lui être restitué sur simple demande. Seul l'original signé de ce certificat est valable.

(\*) Accréditation COFRAC n° 5-0056, Certification de produits agricoles et alimentaires, Portée disponible sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Pour tout renseignement :  
ZAC Atalante Champeaux  
CS 63901  
35039 RENNES CEDEX  
Tel : 02 99 23 30 69 - Fax : 02 23 46 73 52

Le Responsable du Marché Bio  
Philippe Nourrit

Fait à Rennes, le 29/09/2010

QUALITÉ-FRANCE SAS

Immeuble « Le Guillaumet » - 60, avenue du Général de Gaulle - 92046 PARIS LA DEFENSE CEDEX - Tél. : 01 41 97 00 74 - Fax : 01 41 97 08 32

Société par Actions Simplifiée au capital de 93 000 € - R.C.S. NANTERRE B 440 332 786 - SIRET 440 332 286 00010 - Code APE : 7120 B



2011/1

**ECOLIFE Pearl**

**864**

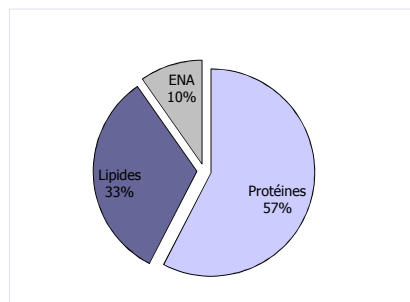
**DAURADE BIOLOGIQUE**

DECLARATION	1.9 mm	3.0 mm	4.5mm	6.5mm
Protéines brutes (%)	48,0	48,0	46,0	46,0
Lipides bruts (%)	15,0	15,0	15,0	15,0
Extrait non azoté (%)	14,5	14,5	17,0	17,0
Cellulose brute (%)	1,4	1,4	1,4	1,4
Cendres (%)	12,2	12,2	11,6	11,6
Phosphore total (%)	1,7	1,7	1,6	1,6
Energie brute (MJ/kg)	19,8	19,8	19,7	19,7
Energie digestible (MJ/kg)*	17,1	17,1	17,0	17,0
Protéines Digestibles/Energie Digestible (g/MJ)	25,3	25,3	24,3	24,3
Vitamine A - ajoutée (U.I./kg)	7500	7500	7500	7500
Vitamine D3 - ajoutée (U.I./kg)	1500	1500	1500	1500
Vitamine E - ajoutée (mg/kg)	270	270	270	270
Vitamine C - ajoutée (mg/kg)	530	530	530	530
Nombre de granulés par kg - indicatif	125000	35000	12500	4200

\*ED calculée sur protéines, lipides et amidon

**Caractéristiques produit: 4.5mm**

**Distribution énergie digestible**

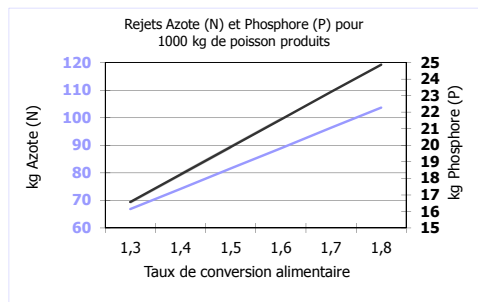


**Composition**

Farine de poisson  
 Pois biologique  
 Tourteau de soja bio  
 Huile de poisson  
 Vitamines et minéraux

**OGM inférieurs à 0.9%**

**Déclaration écologique**



En fonction de l'usine de production et des variations naturelles dans les matières premières, les informations sur les hydrates de carbone, les fibres, les cendres et la composition peuvent varier. Conserver dans un endroit abrité, frais et sec. **Voir l'étiquette pour plus d'information et composition exacte**

Cet aliment est certifié conforme aux Règlements Européens (EC) no. 834/2007 et 889/2008 et règlements liés, par QUALITE FRANCE (FR-BIO 10)

**Table de Nourrissage Indicative (kg aliment par jour pour 100 kg de poisson)**

Taille des poissons grammes	Granulés mm	°C										
			12	14	16	18	20	22	24	26	28	
10	20	1,9	1,40	1,76	2,18	2,66	3,16	3,64	3,99	4,03	3,43	
20	50	3	1,04	1,31	1,62	1,97	2,35	2,71	2,97	3,00	2,55	
50	100	4,5	0,83	1,04	1,29	1,58	1,88	2,17	2,38	2,40	2,04	
100	150	4,5	0,70	0,88	1,09	1,33	1,58	1,83	2,01	2,02	1,72	
150	200	4,5	0,62	0,78	0,96	1,17	1,40	1,61	1,77	1,79	1,52	
200	350	4,5	0,51	0,64	0,79	0,97	1,15	1,33	1,46	1,47	1,25	
350	500	6,5	0,41	0,51	0,64	0,78	0,93	1,07	1,18	1,19	1,01	
500	600	6,5	0,35	0,43	0,54	0,66	0,78	0,90	0,99	1,00	0,85	

Conserver dans un endroit frais et sec, à l'abri du soleil et des intempéries.

Date limite d'utilisation et garanties vitaminiques: voir étiquette

BioMar SAS - 60 Rue Pierre Georges Debouchaud - FR- 16440 Nersac - Tel.: +33 5 45 90 35 00 - biomar@biomar.fr - www.biomar.fr



Allegato 2

2.1: Parametri chimici e fisici rilevati durante la fase di allevamento larvale

Vasca V8	giorni dalla schiusa	O <sub>2</sub> (mg/l)	T° (C°)	COND. (ms)	TDS (ppt)	NaCl (ppt)	RES (Ω)	PH (ph)	MV (mv)	rot (rot/ml)	art (art/ml)	ricambio idrico(%)
04/03/2012	3	7.1	18.1	55.10	50.17	34.99	9.98	7.76	41.4	-	-	10 (notturmo)
05/03/2012	4	7.3	18.2	55.29	50.29	34.97	9.94	7.83	-41.80	15	-	10 (notturmo)
06/03/2012	5	7.3	17.8	55.00	50.03	35.25	9.99	7.67	-42.30	15-25	-	10 (notturmo)
07/03/2012	6	6.8	17.7	55.34	50.25	35.16	9.96	7.73	-44.00	15-25	-	10 (notturmo)
08/03/2012	7	6.5	17.2	55.00	50.03	34.67	9.99	7.57	-39.60	15-25	-	10 (notturmo)
09/03/2012	8	6.5	17.4	55.04	50.06	34.89	9.98	7.55	-38.30	15-25	-	10 (notturmo)
10/03/2012	9	6.2	17.5	54.34	49.37	34.45	10.12	7.44	-32.20	15-25	-	10 (notturmo)
11/03/2012	10	5.9	17.4	55.13	50.90	34.92	9.98	7.45	-32.50	15-25	-	10 (notturmo)
12/03/2012	11	5.9	17.3	55.30	50.25	35.04	9.92	7.53	-37.00	15-25	-	10 (notturmo)
13/03/2012	12	6.8	17.6	55.27	50.25	35.20	9.96	7.58	-39.60	15-25	-	10 (notturmo)
14/03/2012	13	6.5	17.7	55.28	50.22	35.30	9.96	7.58	-39.80	15-25	-	10 (notturmo)
15/03/2012	14	6.3	17.6	55.12	50.08	35.19	9.96	7.60	-40.50	15-25	-	10 (notturmo)
16/03/2012	15	6.4	17.6	54.90	50.00	35.13	10.00	7.60	-40.70	15-25	-	10 (notturmo)
17/03/2012	16	6.3	17.5	54.98	50.07	35.09	9.96	7.52	-36.40	15-25	-	10 (notturmo)
18/03/2012	17	-	-	-	-	-	-	-	-	15-25	-	10 (notturmo)
19/03/2012	18	5.8	17.5	55.05	50.26	35.14	9.95	7.46	-33.10	15-25	-	10 (notturmo)
20/03/2012	19	5.6	17.4	55.29	50.36	35.13	9.93	7.43	-31.50	15-25	-	10 (notturmo)
21/03/2012	20	5.7	17.4	55.35	50.29	35.07	9.94	7.45	-32.70	15-25	-	10 (notturmo)
22/03/2012	21	5.6	17.4	55.28	50.33	35.10	9.93	7.44	-32.20	15-25	-	10 (notturmo)
23/03/2012	22	5.4	17.3	55.32	50.26	35.05	9.92	7.44	-32.10	15-25	0,1-0,3 (AF)	15 (notturmo)
24/03/2012	23	-	-	-	-	-	-	-	-	15-25	0,1-0,5 (AF)	15 (notturmo)
25/03/2012	24	6.0	17.5	55.13	50.09	35.11	9.96	7.49	-34.80	15-25	0,1-0,5 (AF)	15 (notturmo)
26/03/2012	25	5.9	17.4	54.88	49.99	34.93	9.98	7.50	-35.40	15-25	0,1-0,5 (AF)	15 (notturmo)
27/03/2012	26	5.9	17.4	55.19	50.14	34.96	9.97	7.53	-36.60	15-25	0,1-0,3 (AF) 0,1-0,3(AG)	15 (notturmo)
28/03/2012	27	5.8	17.3	55.34	50.28	34.96	9.94	7.52	-36.40	15-25	0,1-0,3 (AF) 0,1-0,3(AG)	15 (notturmo)
29/03/2012	28	5.8	17.1	55.27	50.21	34.71	9.96	7.42	-30.60	15-25	0,1-0,3 (AF) 0,1-0,3(AG)	15 (notturmo)
30/03/2012	29	6.5	18.0	54.79	49.91	34.49	10.02	7.46	-33.10	-	0,1-0,4 (AG)	20 (notturmo)
31/03/2012	30	6.3	18.2	54.89	49.88	34.76	10.00	7.50	-35.20	-	0,1-0,4 (AG)	20 (notturmo)
01/04/2012	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	20 (notturmo)
02/04/2012	32	6.3	18.2	54.79	49.90	34.68	10.02	7.52	-36.70	-	0,1-0,4 (AG)	20 (notturmo)
03/04/2012	33	5.9	18.3	54.78	49.89	34.76	10.02	7.54	-37.50	-	0,1-0,4 (AG)	20 (notturmo)
04/04/2012	34	5.8	18.4	54.53	49.67	34.79	10.06	7.52	-36.40	-	0,1-0,4 (AG)	20 (notturmo)
05/04/2012	35	6.1	18.5	54.70	49.82	35.00	10.01	7.52	-36.40	-	0,1-0,4 (AG)	20 (notturmo)
06/04/2012	36	6.0	18.5	54.80	49.91	35.06	9.99	7.55	-38.00	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
07/04/2012	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
08/04/2012	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
09/04/2012	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
10/04/2012	40	6.2	18.2	54.84	49.95	34.80	9.99	7.56	-38.50	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
11/04/2012	41	6.4	18.2	54.81	49.93	34.70	10.01	7.49	-33.60	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
12/04/2012	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
13/04/2012	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
14/04/2012	44	6.9	18.1	54.60	49.89	34.57	10.02	7.58	-39.50	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
15/04/2012	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
16/04/2012	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
17/04/2012	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
18/04/2012	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
19/04/2012	49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
20/04/2012	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
21/04/2012	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
22/04/2012	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
23/04/2012	53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
24/04/2012	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
25/04/2012	55	6.5	18.2	54.66	49.79	34.69	10.02	7.63	-39.10	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
26/04/2012	56	6.7	18.3	54.68	49.68	34.69	10.04	7.66	-39.20	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
27/04/2012	57	6.7	18.5	54.06	49.35	34.72	10.11	7.66	-41.00	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
28/04/2012	58	6.4	18.5	54.25	49.47	34.72	10.11	7.58	-36.50	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
29/04/2012	59	6.6	18.5	54.97	49.95	35.09	9.99	7.61	-38.00	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
30/04/2012	60	6.0	18.5	54.95	50.05	35.08	9.99	7.62	-38.90	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)
01/05/2012	61	6.4	18.6	54.70	49.70	35.00	10.03	7.65	-40.20	-	0,1-0,4 (AG)	40 (continuato)

Allegato 2

Vasca VP4	giorni dalla schiusa	O <sub>2</sub> (mg/l)	T° (C°)	COND. (ms)	TDS (ppt)	NaCl (ppt)	RES (Ω)	pH	MV (mv)	algh (cell/ml)	rot (rot/ml)	art (art/ml)	ricambio idrico(%)
04/03/2012	3	7.3	18.0	55.11	50.11	34.98	9.98	7.64	-37.67	500000-700000	-	-	50 (notturno)
05/03/2012	4	7.4	18.2	55.25	50.25	35.04	9.95	7.77	-38.00	500000-700000	20	-	50 (notturno)
06/03/2012	5	6.9	18.2	55.14	50.03	34.87	9.97	7.59	-37.30	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
07/03/2012	6	6.5	17.9	55.39	50.38	35.53	9.95	7.61	-37.30	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
08/03/2012	7	6.7	17.3	55.12	50.13	34.85	9.97	7.52	-37.10	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
09/03/2012	8	6.7	17.4	55.22	50.23	35.02	9.95	7.56	-38.40	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
10/03/2012	9	6.7	17.8	54.49	49.51	34.84	10.10	7.46	-34.70	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
11/03/2012	10	6.2	17.6	55.26	50.21	35.10	9.98	7.49	-34.80	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
12/03/2012	11	6.6	17.7	55.30	50.25	35.33	9.95	7.57	-39.00	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
13/03/2012	12	6.6	18.0	54.68	49.90	34.49	10.01	7.58	-39.50	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
14/03/2012	13	6.6	18.0	55.23	50.18	34.71	9.96	7.60	-40.60	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
15/03/2012	14	6.6	17.9	55.18	50.15	34.68	9.97	7.60	-40.70	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
16/03/2012	15	6.5	17.9	55.02	50.11	35.41	9.98	7.61	-41.20	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
17/03/2012	16	6.8	17.8	55.04	50.13	35.34	9.97	7.56	-38.80	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
18/03/2012	17	-	-	-	-	-	-	-	-	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
19/03/2012	18	7.1	18.0	55.14	50.22	34.73	9.96	7.60	-40.50	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
20/03/2012	19	7.2	18.1	55.33	50.27	34.87	9.95	7.61	-41.30	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
21/03/2012	20	6.9	18.1	55.24	50.19	34.80	9.96	7.63	-42.10	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
22/03/2012	21	6.7	17.9	55.26	50.21	35.59	9.93	7.62	-41.50	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
23/03/2012	22	6.6	18.0	55.31	50.25	34.76	9.95	7.61	-41.30	500000-700000	20-30	0,3-0,5 (AF)	70 (notturno)
24/03/2012	23	-	-	-	-	-	-	-	-	500000-700000	20-30	0,3-0,5 (AF)	70 (notturno)
25/03/2012	24	6.6	17.9	55.15	50.23	35.51	9.95	7.60	-40.80	500000-700000	20-30	0,5-1 (AF)	70 (notturno)
26/03/2012	25	6.8	17.8	54.79	49.78	35.16	10.02	7.63	-42.30	200000-500000	20-30	0,5-1 (AF)	70 (notturno)
27/03/2012	26	6.6	18.0	55.12	50.08	34.62	9.98	7.63	-42.50	200000-500000	20-30	0,3-0,5 (AF) 0,3-0,5(AG)	70 (notturno)
28/03/2012	27	6.6	18.0	55.21	50.16	34.69	9.97	7.63	-42.50	200000-500000	20-30	0,3-0,5 (AF) 0,3-0,5(AG)	70 (notturno)
29/03/2012	28	6.2	17.7	55.22	50.17	35.26	9.97	7.55	-37.90	200000-500000	20-30	0,3-0,5 (AF) 0,3-0,5(AG)	70 (notturno)
30/03/2012	29	6.5	18.5	54.79	49.91	34.97	10.02	7.54	-37.80	200000-500000	-	0,5-1 (AG)	100 (notturno)
31/03/2012	30	6.4	18.8	54.77	49.79	35.25	10.02	7.57	-39.50	200000-500000	-	0,5-1 (AG)	100 (notturno)
01/04/2012	31	-	-	-	-	-	-	-	-	200000-500000	-	0,5-1 (AG)	100 (notturno)
02/04/2012	32	6.5	18.7	54.89	49.87	35.12	10.03	7.59	-40.40	200000-500000	-	0,5-1 (AG)	100 (notturno)
03/04/2012	33	6.6	18.6	54.77	49.86	35.04	10.02	7.55	-37.90	200000-500000	-	0,5-1 (AG)	100 (notturno)
04/04/2012	34	6.7	18.8	54.80	49.79	35.16	10.04	7.61	-41.40	200000-500000	-	0,5-1 (AG)	100 (notturno)
05/04/2012	35	6.6	18.7	54.93	49.91	35.25	9.99	7.63	-42.20	200000-500000	-	0,5-1 (AG)	100 (notturno)
06/04/2012	36	6.7	18.7	54.90	50.01	35.24	10.00	7.65	-43.10	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
07/04/2012	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
08/04/2012	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
09/04/2012	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
10/04/2012	40	6.8	18.4	54.98	50.07	35.1	9.99	7.64	-43.7	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
11/04/2012	41	6.6	18.3	55.05	50.02	34.86	10	7.56	-38.3	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
12/04/2012	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
13/04/2012	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
14/04/2012	44	6.7	18.3	54.88	49.86	34.74	10.03	7.57	-38.8	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
15/04/2012	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
16/04/2012	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
17/04/2012	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
18/04/2012	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
19/04/2012	49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
20/04/2012	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
21/04/2012	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
22/04/2012	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
23/04/2012	53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
24/04/2012	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
25/04/2012	55	6.3	18.8	54.55	49.68	35.27	10.04	7.55	-35	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
26/04/2012	56	6.1	18.9	54.39	49.54	34.4	10.07	7.57	-36.3	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
27/04/2012	57	6.0	19.0	54.38	49.53	34.4	10.07	7.57	-35.7	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
28/04/2012	58	6.2	19.0	54.25	49.47	34.72	10.11	7.58	-36.5	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
29/04/2012	59	6.0	18.9	54.73	49.85	34.55	10.01	7.56	-35.2	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)
30/04/2012	60	6.4	18.8	54.83	49.94	35.27	10.01	7.6	-37.9	-	-	0,5-1 (AG)	150 (continuato)

Allegato 2

Vasca V4	giorni dalla schiusa	O <sub>2</sub> (mg/l)	T° (C°)	COND. (ms)	TDS (ppt)	NaCl (ppt)	RES (Ω)	pH	MV (mv)	alghe (cell/ml)	rot (rot/ml)	art (art/ml)	ricambio idrico(%)
04/03/2012	3	7.6	18.1	54.97	49.81	34.91	10.01	7.68	40.7	500000-700000	-	-	10 (notturmo)
05/03/2012	4	7.6	18.1	54.80	49.87	34.59	9.99	7.78	-40.2	500000-700000	15	-	10 (notturmo)
06/03/2012	5	7.3	17.6	54.50	49.51	34.73	10.07	7.67	-40.6	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
07/03/2012	6	7.3	17.7	55.39	50.25	35.14	9.97	7.70	-42.50	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
08/03/2012	7	7.0	17.2	54.85	49.90	34.58	10.02	7.54	-38.20	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
09/03/2012	8	6.1	17.3	55.23	49.91	34.68	10.01	7.24	-38.80	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
10/03/2012	9	6.8	17.6	54.03	48.96	34.27	10.19	7.43	-31.50	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
11/03/2012	10	6.4	17.8	54.95	48.94	35.11	10.03	7.44	-31.90	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
12/03/2012	11	6.5	17.7	55.40	50.33	35.38	9.94	7.54	-37.20	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
13/03/2012	12	6.2	17.7	55.33	50.27	35.34	9.95	7.55	-38.00	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
14/03/2012	13	6.3	17.6	55.21	50.16	35.26	9.97	7.56	-38.30	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
15/03/2012	14	6.2	17.8	55.01	49.98	35.32	9.98	7.58	-39.90	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
16/03/2012	15	6.2	17.6	55	49.98	35.03	10	7.62	-42	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
17/03/2012	16	6.3	17.4	55.07	50.04	34.97	9.97	7.51	-35.9	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
18/03/2012	17	-	-	-	-	-	-	-	-	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
19/03/2012	18	6.0	17.4	55.33	50.28	35.05	9.95	7.45	-32.60	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
20/03/2012	19	5.5	17.4	55.32	50.27	35.14	9.92	7.43	-31.50	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
21/03/2012	20	5.3	17.3	55.27	50.23	35.02	9.95	7.45	-32.60	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
22/03/2012	21	5.3	17.3	55.23	50.32	35.09	9.94	7.44	-31.90	500000-700000	15-25	-	10 (notturmo)
23/03/2012	22	4.9	17.2	55.17	50.25	34.94	9.95	7.44	-32.00	500000-700000	15-25	0,1-0,3 (AF)	15 (notturmo)
24/03/2012	23	-	-	-	-	-	-	-	-	500000-700000	15-25	0,1-0,5 (AF)	15 (notturmo)
25/03/2012	24	5.5	17.4	55.12	50.09	34.91	9.98	7.46	-32.80	500000-700000	15-25	0,1-0,5 (AF)	15 (notturmo)
26/03/2012	25	5.7	17.3	54.83	49.96	34.81	9.98	7.47	-33.70	200000-500000	15-25	0,1-0,5 (AF)	15 (notturmo)
27/03/2012	26	5.3	17.2	54.86	49.99	34.73	9.97	7.49	-34.30	200000-500001	15-25	0,1-0,3 (AF) 0,1-0,3(AG)	15 (notturmo)
28/03/2012	27	5.2	17.1	55.08	50.18	34.78	9.94	7.48	-34.20	200000-500002	15-25	0,1-0,3 (AF) 0,1-0,3(AG)	15 (notturmo)
29/03/2012	28	4.9	16.9	55.00	50.10	34.56	9.98	7.34	-26.50	200000-500003	15-25	0,1-0,3 (AF) 0,1-0,3(AG)	15 (notturmo)
30/03/2012	29	5.4	17.5	54.83	49.82	30.90	10.01	7.38	-28.50	200000-500004	-	0,1-0,5 (AG)	20 (notturmo)
31/03/2012	30	5.7	17.8	54.59	49.60	35.01	10.05	7.43	-31.50	200000-500005	-	0,1-0,5 (AG)	20 (notturmo)
01/04/2012	31	-	-	-	-	-	-	-	-	200000-500006	-	0,1-0,5 (AG)	20 (notturmo)
02/04/2012	32	6.6	18.0	54.59	49.73	34.44	10.03	7.51	-35.50	200000-500007	-	0,1-0,5 (AG)	20 (notturmo)
03/04/2012	33	6.4	18.1	54.73	49.73	34.54	10.03	7.53	-37.20	200000-500008	-	0,1-0,5 (AG)	20 (notturmo)
04/04/2012	34	6.5	18.3	54.56	49.57	34.61	10.09	7.55	-37.90	200000-500009	-	0,1-0,5 (AG)	20 (notturmo)
05/04/2012	35	6.9	18.4	54.92	49.89	34.95	10.02	7.57	-39.10	200000-500010	-	0,1-0,5 (AG)	20 (notturmo)
06/04/2012	36	6.9	18.5	54.73	49.85	35.02	10.00	7.60	-40.80	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
07/04/2012	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
08/04/2012	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
09/04/2012	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
10/04/2012	40	6.9	18.1	54.92	50.03	34.68	9.99	7.60	-40.90	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
11/04/2012	41	7.1	18.1	54.79	49.78	34.58	10.02	7.48	-34.3	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
12/04/2012	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
13/04/2012	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
14/04/2012	44	7.3	18.2	54.65	49.67	34.5	10.06	7.55	-38.2	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
15/04/2012	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
16/04/2012	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
17/04/2012	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
18/04/2012	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
19/04/2012	49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
20/04/2012	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
21/04/2012	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
22/04/2012	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
23/04/2012	53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
24/04/2012	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
25/04/2012	55	7.1	18.5	53.53	48.78	34.23	10.21	7.59	-37.30	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
26/04/2012	56	7.2	18.6	53.61	48.87	34.36	10.20	7.66	-40.01	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
27/04/2012	57	7.1	18.6	53.66	48.91	34.29	10.22	7.67	-41.50	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
28/04/2012	58	6.8	18.7	53.48	48.75	34.26	10.25	7.59	-37.10	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
29/04/2012	59	6.8	18.5	54.70	49.83	35.10	10.01	7.63	-38.00	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
30/04/2012	60	6.9	18.5	54.78	49.79	34.97	10.04	7.65	-40.40	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)
01/05/2012	61	6.8	18.6	54.26	49.45	34.74	10.01	7.70	-39.40	-	-	0,1-0,5 (AG)	40 (continuato)

Allegato 2

Vasca VP7	giorni dalla schiusa	O <sub>2</sub> (mg/l)	T° (C°)	COND. (ms)	TDS (ppt)	NaCl (ppt)	RES (Ω)	pH	MV (mv)	alghe (cell/ml)	rot (rot/ml)	art (art/ml)	ricambio idrico(%)
04/03/2012	3	7.2	18.1	55.08	50.12	34.92	9.97	7.59	-37.84	500000-700000	-	-	50 (notturno)
05/03/2012	4	7.5	18.2	55.18	50.31	34.98	9.94	7.78	-38.6	500000-700000	20	-	50 (notturno)
06/03/2012	5	7.0	18.3	54.99	50.01	34.95	9.97	7.65	-34.4	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
07/03/2012	6	7.0	18.1	55.48	50.33	34.86	9.94	7.65	-40.4	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
08/03/2012	7	6.8	17.6	55.14	50.16	35.16	9.97	7.55	-38.8	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
09/03/2012	8	6.4	17.5	55.24	50.24	35.13	9.95	7.54	-38.3	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
10/03/2012	9	6.5	18.0	54.58	49.59	34.25	10.08	7.45	-34.2	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
11/03/2012	10	6.2	17.8	55.05	50.14	35.33	9.97	7.48	-34.2	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
12/03/2012	11	6.4	18.1	55.11	50.21	34.82	9.96	7.56	-38.8	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
13/03/2012	12	6.4	18.2	55.02	50.11	34.84	9.98	7.59	-39.9	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
14/03/2012	13	6.5	18.2	55.01	50.11	34.84	9.98	7.6	-40.8	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
15/03/2012	14	6.5	18.4	54.91	50	35.04	9.98	7.6	-40.8	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
16/03/2012	15	6.7	18.1	54.93	50.03	34.68	9.99	7.62	-42.2	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
17/03/2012	16	6.6	18.0	55.02	50.11	34.64	9.98	7.58	-39.5	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
18/03/2012	17	-	-	-	-	-	-	-	-	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
19/03/2012	18	6.9	18.1	55.03	50.12	34.84	9.98	7.6	-40.9	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
20/03/2012	19	6.8	18.0	55.21	50.17	34.79	9.94	7.63	42.4	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
21/03/2012	20	6.7	18.0	55.14	50.22	34.73	9.96	7.65	-43.6	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
22/03/2012	21	6.8	17.9	55.26	50.21	35.59	9.93	7.63	-42.3	500000-700000	20-30	-	50 (notturno)
23/03/2012	22	6.7	18.1	55.17	50.25	34.85	9.95	7.62	-41.9	500000-700000	20-30	0,3-0,5 (AF)	70 (notturno)
24/03/2012	23	-	-	-	-	-	-	-	-	500000-700000	20-30	0,3-0,5 (AF)	70 (notturno)
25/03/2012	24	6.4	18.0	55.12	50.21	34.72	9.96	7.59	-40.1	500000-700000	20-30	0,5-1 (AF)	70 (notturno)
26/03/2012	25	6.6	18.0	55.12	50.08	34.62	9.98	7.61	-41.2	200000-500000	20-30	0,5-1 (AF)	70 (notturno)
27/03/2012	26	6.5	18.1	55.09	50.05	34.7	9.99	7.6	-40.9	200000-500001	20-30	0,3-0,5 (AF) 0,3-0,5(AG)	70 (notturno)
28/03/2012	27	6.6	18.1	54.82	50.15	34.77	9.97	7.61	-41.3	200000-500002	20-30	0,3-0,5 (AF) 0,3-0,5(AG)	70 (notturno)
29/03/2012	28	6.2	17.9	54.93	50.03	35.39	9.98	7.52	-36.2	200000-500003	20-30	0,3-0,5 (AF) 0,3-0,5(AG)	70 (notturno)
30/03/2012	29	6.5	18.7	54.64	49.76	35.13	10.03	7.54	-37.8	200000-500004	-	0,5-0,8 (AG)	100 (notturno)
31/03/2012	30	6.4	18.9	54.71	49.83	34.53	10.01	7.55	-38.20	200000-500005	-	0,5-0,8 (AG)	100 (notturno)
01/04/2012	31	-	-	-	-	-	-	-	-	200000-500006	-	0,5-0,8 (AG)	100 (notturno)
02/04/2012	32	6.6	18.8	54.78	49.76	35.22	10.03	7.6	-40.9	200000-500007	-	0,5-0,8 (AG)	100 (notturno)
03/04/2012	33	6.6	18.8	54.81	49.8	35.26	10.02	7.63	-42.4	200000-500008	-	0,5-0,8 (AG)	100 (notturno)
04/04/2012	34	6.8	18.8	54.64	49.76	35.23	10.05	7.63	-42.5	200000-500009	-	0,5-0,8 (AG)	100 (notturno)
05/04/2012	35	6.8	18.8	54.88	49.86	35.31	10	7.64	-42.8	200000-500010	-	0,5-0,8 (AG)	100 (notturno)
06/04/2012	36	6.8	18.7	54.82	49.93	35.28	9.99	7.66	-43.8	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
07/04/2012	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
08/04/2012	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
09/04/2012	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
10/04/2012	40	6.9	18.4	54.81	49.92	35.07	9.99	7.65	-43.7	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
11/04/2012	41	6.8	18.3	54.85	49.96	34.91	10.01	7.58	-39.6	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
12/04/2012	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
13/04/2012	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
14/04/2012	44	7	18.4	54.91	49.89	34.86	10.02	7.59	-40.5	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
15/04/2012	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
16/04/2012	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
17/04/2012	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
18/04/2012	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
19/04/2012	49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
20/04/2012	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
21/04/2012	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
22/04/2012	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
23/04/2012	53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
24/04/2012	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
25/04/2012	55	6.7	18.9	54.64	49.77	35.33	10.02	7.6	-37.9	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
26/04/2012	56	6.6	18.9	54.38	49.53	34.4	10.07	7.63	-39.4	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
27/04/2012	57	6.4	19.1	54.4	49.54	34.49	10.07	7.62	-39	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
28/04/2012	58	6.6	19.0	54.37	49.52	34.47	10.07	7.55	-35.1	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
29/04/2012	59	6.7	18.9	54.62	49.74	34.55	10.03	7.62	-38.6	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)
30/04/2012	60	7.0	18.8	54.85	49.96	35.3	10.01	7.67	-41.3	-	-	0,5-0,8 (AG)	150 (continuato)

## 2.2: Parametri chimici e fisici rilevati durante la fase di preingrasso

SL6	DPH	O <sub>2</sub> (mg/l)	T° (C°)	COND. (ms)	TDS (ppt)	NaCl (ppt)	RES (Ω)	pH	MV (mv)
30/04/2012	60	11.2	19.8	54.60	49.45	34.74	10.01	7.70	-39.40
01/05/2012	61	13.2	19.8	54.33	49.48	35.00	10.11	7.56	-35.60
02/05/2012	62	11.9	19.6	54.46	49.49	34.82	10.01	7.50	-32.40
03/05/2012	63	11.6	19.4	54.78	49.77	34.77	10.07	7.55	-34.50
04/05/2012	64	10.4	19.3	54.20	49.37	34.54	10.13	7.34	-23.20
05/05/2012	65	11.2	19.4	54.22	49.39	34.74	10.10	7.14	-11.50
06/05/2012	66	15.7	19.7	54.24	49.39	35.01	10.10	7.43	-28.10
07/05/2012	67	10.1	19.6	54.84	49.83	35.09	10.03	7.53	-34.30
08/05/2012	68	9.8	19.4	53.69	48.83	34.22	10.21	7.38	-25.50
09/05/2012	69								
10/05/2012	70								
11/05/2012	71								
12/05/2012	72								
13/05/2012	73								
14/05/2012	74								
15/05/2012	75	10.8	19.6	54.00	49.20	34.69	10.13	7.47	-30.50
16/05/2012	76								
17/05/2012	77								
18/05/2012	78								
19/05/2012	79								
20/05/2012	80								
21/05/2012	81	12.1	19.3	54.87	49.74	34.74	10.05	7.48	-31.30
22/05/2012	82								
23/05/2012	83	11.5	19.4	54.80	49.59	34.90	10.06	7.35	-23.10
24/05/2012	84	12.2	19.5	54.39	49.48	34.81	10.08	7.35	-23.60
25/05/2012	85								
26/05/2012	86	11.6	19.6	54.69	49.75	35.21	10.03	7.33	-22.70
27/05/2012	87								
28/05/2012	88	11.5	19.7	53.84	48.98	34.69	10.18	7.28	-20.00
29/05/2012	89	10.1	19.7	54.31	49.46	34.98	10.09	7.33	-22.80
30/05/2012	90	9.2	19.7	54.44	49.46	34.98	10.09	7.33	-22.80
31/05/2012	91								
01/06/2012	92	13.5	19.8	54.05	49.23	34.88	10.15	7.35	-23.40
02/06/2012	93								
03/06/2012	94								
04/06/2012	95	12.9	19.6	54.40	49.53	35.03	10.07	7.39	-25.90
05/06/2012	96								
06/06/2012	97	12.8	19.8	51.23	46.67	32.87	10.68	7.30	-21.20
07/06/2012	98	12.4	19.9	54.03	49.22	34.90	10.14	7.31	-21.40
08/06/2012	99								
09/06/2012	100								
10/06/2012	101								
11/06/2012	102								
12/06/2012	103								
13/06/2012	104	12.1	19.8	54.04	49.32	34.97	10.11	7.30	16.40
14/06/2012	105	12.5	19.7	60.35	49.51	35.11	10.10	7.29	-20.30
15/06/2012	106								
16/06/2012	107	11.7	19.7	59.77	49.25	34.90	10.11	7.28	-19.90
17/06/2012	108								
18/06/2012	109								
19/06/2012	110	11.8	19.7	58.83	48.49	34.40	10.26	7.45	-28.90
20/06/2012	111	11.2	19.7	59.24	48.70	34.01	10.22	7.45	-29.40
21/06/2012	112	10.8	19.6	59.55	49.31	34.77	10.14	7.46	-29.7
22/06/2012	113	11.3	19.9	60.35	48.4	34.37	10.12	7.25	-17.9
23/06/2012	114								
24/06/2012	115								
25/06/2012	116	10.7	19.8	59.65	48.18	34.95	10.14	7.32	-21.7
26/06/2012	117								
27/06/2012	118	11.2	19.8	58.8	48.72	34.61	10.23	7.33	-22.8
28/06/2012	119								
29/06/2012	120	11.8	19.8	58.77	48.27	34.15	10.33	7.39	2.61

Allegato 2

Vasca SC8	DPH	O <sub>2</sub> (mg/l)	T° (C°)	COND. (ms)	TDS (ppt)	NaCl (ppt)	RES (Ω)	pH	MV (mv)
30/04/2012	60	6.7	19.0	54.63	49.77	34.58	10.05	7.71	-43.90
01/05/2012	61	6.6	18.9	54.60	49.61	34.37	10.08	7.72	-44.00
02/05/2012	62	6.5	18.9	53.96	49.16	34.05	10.13	7.67	-41.60
03/05/2012	63	6.1	18.8	54.30	49.52	35.13	10.07	7.62	-38.80
04/05/2012	64	6.4	18.9	54.08	49.31	34.13	10.14	7.61	-38.10
05/05/2012	65	6.3	19.0	54.28	48.86	34.09	10.17	7.57	-35.90
06/05/2012	66	8.9	19.1	53.58	49.05	34.47	10.13	7.55	-34.60
07/05/2012	67	6.0	18.9	54.55	49.81	34.62	10.01	7.61	-37.60
08/05/2012	68	6.4	18.8	54.18	49.39	34.28	10.10	7.52	-33.10
09/05/2012	69								
10/05/2012	70								
11/05/2012	71								
12/05/2012	72								
13/05/2012	73								
14/05/2012	74								
15/05/2012	75	5.8	19.6	54.68	49.69	35.09	10.06	7.47	-30.70
16/05/2012	76								
17/05/2012	77								
18/05/2012	78								
19/05/2012	79								
20/05/2012	80								
21/05/2012	81	5.3	19.3	54.53	49.69	34.80	10.03	7.41	-27.50
22/05/2012	82								
23/05/2012	83	5.8	19.3	54.81	49.92	34.98	9.99	7.31	-21.50
24/05/2012	84	5.5	19.3	54.76	49.86	34.93	9.99	7.30	-21.10
25/05/2012	85								
26/05/2012	86	5.8	19.3	54.83	49.93	34.98	10.01	7.38	-25.50
27/05/2012	87								
28/05/2012	88	5.8	19.5	54.40	49.43	34.77	10.09	7.38	-25.90
29/05/2012	89	5.7	19.5	54.91	49.89	35.14	10.00	7.40	-26.40
30/05/2012	90	5.5	19.4	54.46	49.72	35.01	10.01	7.41	-27.20
31/05/2012	91								
01/06/2012	92	6.1	19.5	54.93	50.02	35.14	10.00	7.37	-25.90
02/06/2012	93								
03/06/2012	94								
04/06/2012	95	6.3	19.2	54.79	49.91	34.89	10.01	7.46	-29.80
05/06/2012	96								
06/06/2012	97	6.4	19.3	54.97	49.94	34.90	10.01	7.43	-28.00
07/06/2012	98	6.0	19.4	54.39	49.59	34.90	10.06	7.39	-25.90
08/06/2012	99								
09/06/2012	100								
10/06/2012	101								
11/06/2012	102								
12/06/2012	103								
13/06/2012	104	6.7	19.5	52.51	47.96	33.41	10.40	7.18	15.50
14/06/2012	105	6.9	19.4	60.23	49.56	34.70	10.06	7.41	-27.20
15/06/2012	106								
16/06/2012	107	6.8	19.3	59.55	49.15	34.39	10.14	7.44	-28.80
17/06/2012	108								
18/06/2012	109								
19/06/2012	110	6.7	19.5	60.41	49.67	35.06	10.04	7.46	-29.90
20/06/2012	111	6.9	19.6	57.18	47.93	33.54	10.32	7.55	-34.7
21/06/2012	112	6.7	19.5	58.54	48.17	34.07	10.30	7.56	-35.50
22/06/2012	113	6.7	19.3	59.36	48.88	34.44	10.19	7.5	-32.3
23/06/2012	114								
24/06/2012	115								
25/06/2012	116	6.9	19.4	58.83	48.45	34.11	10.28	7.47	-30
26/06/2012	117								

Allegato 3

3.1: Frequenze relative di anomalie osservate e di individui risultati affetti da ciascuna tipologia malformativa nella fase di avannotteria

	Fine della fase di avannotteria (60/61 gds). In rosso sono evidenziate le anomalie gravi; il fondo giallo evidenzia differenze important tra lotti fratelli.							
	Freq. % anomalie				Freq. % individui			
	Broodstock biologico		Broodstock convenzionale		Broodstock biologico		Broodstock convenzionale	
	V4 (GV - gen bio)	VP7 ( (intensivo - gen biol)	V8 (GV - gen conv)	VP4 (intensivo - gen conv)	V4 (GV - gen bio)	VP7 ( (intensivo - gen biol)	V8 (GV - gen conv)	VP4 (intensivo - gen conv)
A4			0.5				1.0	
A5	1.6	1.8	2.4	1.0	2.0	3.0	2.0	
A6		0.6				1.0		
B3	0.8				1.0			
B4	0.8		0.8		1.0		1.0	
B5		1.8	0.8	0.5		3.0	1.0	
B5*	0.8				1.0			
C4			0.8	1.4			1.0	2.0
C5	0.8	3.6	8.1	2.4	1.0	5.0	8.0	2.0
C6	2.4	1.2	10.6	1.4	3.0	2.0	10.0	3.0
D3	2.4	4.8	3.3	3.4	3.0	8.0	4.0	7.0
D3*	0.8	1.8	0.8	5.3	1.0	3.0	1.0	11.0
D4	17.5	17.3	11.4	30.0	10.0	19.0	9.0	31.0
D5	0.8	2.4	2.4	1.0	1.0	4.0	3.0	2.0
D5*	0.8	1.2	2.4	0.5	1.0	2.0	3.0	1.0
D6	7.9	6.0	9.8	7.2	10.0	9.0	10.0	15.0
D6*		3.0	0.8	1.4		5.0	1.0	3.0
D26	4.8	20.2	6.5	18.4	6.0	33.0	7.0	36.0
E8sx	2.4				2.0			
F8	0.8	0.6		0.5	1.0	1.0		1.0
G9	34.9	20.8	23.6	9.2	39.0	33.0	24.0	18.0
G9*		2.4	1.6	6.3		4.0	2.0	13.0
G10	0.8			1.0	1.0			2.0
G19	10.3	6.0	9.8	3.9	13.0	10.0	12.0	8.0
G26		2.4				4.0		
H8	3.2				3.0			
H11		0.6		0.5		1.0		1.0
I8	1.6				2.0			
I11			1.6				1.0	
I26				1.0				1.0
14	0.8	0.6	0.8	1.9	1.0	1.0	1.0	4.0
18	3.2	0.6	0.8	1.0	4.0	1.0	1.0	2.0

3.2: Frequenze relative di anomalie osservate e di individui risultati affetti da ciascuna tipologia malformativa nella fase di preingrasso

	Fine della fase di preingrasso (111 gds). In rosso sono evidenziate le anomalie gravi; il fondo giallo evidenzia differenze important tra lotti fratelli							
	Freq. % anomalie				Freq. % individui			
	Broodstock biologico		Broodstock convenzionale		Broodstock biologico		Broodstock convenzionale	
	SL6C (GV – gen bio)	SC8 (intensivo – gen bio)	SL6T (GV – gen conv)	SL6M (intensivo – gen conv)	SL6C (GV – gen bio)	SC8 (intensivo – gen bio)	SL6T (GV – gen conv)	SL6M (intensivo – gen conv)
A5	0.9	1.5	3.6	2.8	4.0	5.0	10.0	13.0
B1				0.2				1.0
B4	1.2			0.3	2.0			1.0
B5	3.3	2.1	8.5	5.4	8.0	4.0	13.0	14.0
B7sx	0.9	0.6	0.5		3.0	2.0	1.0	
C2	0.5				2.0			
C4	1.6		0.3	0.2	4.0		1.0	1.0
C5	4.0	0.9	8.5	2.3	8.0	2.0	22.0	11.0
C6	4.7	0.9	8.2	5.2	14.0	3.0	20.0	22.0
C6*			0.5				2.0	
D3	0.2	1.2	0.3	2.0	1.0	2.0	1.0	12.0
D3*	0.5	0.6		0.7	2.0	2.0		4.0
D4	2.1	9.1	2.6	4.5	5.0	15.0	7.0	15.0
D5		2.1	1.5	1.2		6.0	6.0	7.0
D5*	0.5	0.3	0.8		2.0	1.0	3.0	
D6	3.1	9.7	2.6	3.0	11.0	29.0	9.0	17.0
D6*		1.5	0.3	1.2		5.0	1.0	7.0
D26	0.7	12.1	5.6	9.4	3.0	39.0	22.0	49.0
E8sx	0.5		0.3		2.0		1.0	
E11sx	3.1	2.4	1.0	0.5	7.0	6.0	1.0	3.0
E11dx	4.7		0.3	1.0	13.0		1.0	4.0
F8	1.2	1.2	0.5	1.2	5.0	4.0	2.0	7.0
F11	6.3		2.8	1.8	9.0		5.0	4.0
G9	13.6	21.2	13.8	6.7	53.0	64.0	49.0	35.0
G9*	0.7	8.6		0.5	3.0	29.0		3.0
G10	6.6	15.3	10.0	7.4	26.0	45.0	38.0	41.0
G11	8.9	0.3	4.9	14.5	11.0	1.0	9.0	30.0
G19	0.7	4.7	2.1	3.3	3.0	16.0	8.0	19.0
G26				2.7				15.0
H8	1.6	0.9	0.3	2.5	4.0	2.0	1.0	5.0
H11	7.7		7.4	5.9	17.0		19.0	17.0
H26	0.2	0.3			1.0	1.0		
I8	2.8	1.2		1.7	7.0	4.0		7.0
I11	6.6		2.1	6.9	14.0		5.0	17.0
I26				0.2				1.0
L11sx				0.2				1.0
SDB		0.3		0.2		1.0		1.0
14	0.2	0.6	0.5	0.5	1.0	2.0	2.0	3.0
17dx		0.3				1.0		
18		0.3		0.2		1.0		1.0