

Università degli Studi di Napoli “Federico II”



“Allevamento intensivo, in un sistema a circuito chiuso, di copepodi Calanoidi autoctoni come dieta viva alternativa per larvicoltura di specie ittiche marine”

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro-Alimentari

Indirizzo: Acquacoltura

Ciclo *XXI*

Candidata

Maria Gabriella Malzone

a.a. 2007 - 2008

Relatore: Prof. *Giovanni Sansone* – Centro Interdipartimentale di ricerca per la gestione delle risorse idrobiologiche e per l’acquacoltura (CRIAcq), Università degli Studi di Napoli “Federico II”.

Correlatore: Dr. *Isabella Buttino* - Laboratorio di Ecologia Funzionale ed Evolutiva, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	16
1.1 Aspetti generali della biologia dei copepodi Calanoidi.....	23
1.1.1 <i>Temora stylifera</i>	26
1.1.2 <i>Centropages typicus</i>	28
2. STATO DELL'ARTE.....	31
3. SCOPO DELLA RICERCA.....	36
3.1 Piano sperimentale.	36
3.1.1 I FASE: Realizzazione, ottimizzazione e gestione del sistema a circuito chiuso – prove di stabulazione ed adattamento dei copepodi nell'impianto.....	36
3.1.2 II FASE: Sperimentazione di diete algali per i copepodi selezionati.	37
3.1.3 III FASE: Allevamento intensivo dei copepodi <i>Temora stylifera</i> e <i>Centropages typicus</i> nel sistema a circuito chiuso con l'impiego delle diete selezionate.....	37
3.1.4 IV FASE: Larvicoltura per prove di appetibilità con il copepode <i>T. stylifera</i>	37
4. MATERIALI E METODI	38
4.1 I FASE. SISTEMA PILOTA PER L'ALLEVAMENTO DI COPEPDI CALANOIDI	38

4.2	II FASE. SPERIMENTAZIONE DI DIVERSE DIETE ALGALI PER I COPEPODI	
	<i>TEMORA STYLIFERA</i> E <i>CENTROPAGES TYPICUS</i>	44
4.2.1	Alghe utilizzate per alimentazione di <i>Temora stylifera</i> e <i>Centropages typicus</i>	45
4.2.2	Miscele e concentrazioni algali utilizzate nella sperimentazione.	49
4.2.3	Analisi statistiche	53
4.3	III FASE: ALLEVAMENTO INTENSIVO DEI COPEPODI <i>TEMORA</i> <i>STYLIFERA</i> E <i>CENTROPAGES TYPICUS</i> NEL SISTEMA A CIRCUITO CHIUSO CON L'IMPIEGO DELLE DIETE SELEZIONATE.	55
4.4	IV FASE: TEST DI APPETIBILITÀ DEL COPEPODE <i>TEMORA STYLIFERA</i> SU LARVE DI ORATA <i>SPARUS AURATA</i> LINNAEUS, 1758.	58
4.4.1	Analisi degli acidi grassi polinsaturi (PUFA).	60
4.4.2	Metodi di campionamento.	60
4.4.3	Estrazione di lipidi ed analisi.	60
5.	ANALISI DEI RISULTATI	62
5.1	Diete algali.	62
5.2	<i>Temora stylifera</i>	64
5.2.1	Correlazione tra numero di uova deposte, schiuse e mangiate	78
5.3	<i>Centropages typicus</i>	79
5.3.1	Confronto delle 12 diete fino al 6° giorno.	79
5.3.2	Confronto di tutte le diete per l'intero periodo di sperimentazione con l'esclusione della dieta ad <i>Isochrysis</i>	

<i>galbana</i> (Dieta 10).....	92
5.3.3 Correlazione tra numero di uova deposte, schiuse e mangiate considerando solo la dieta ad <i>Isochrysis galbana</i> (Dieta 10).....	104
5.3.4 Correlazione tra numero di uova deposte, schiuse e mangiate considerando tutte le diete utilizzate con l'esclusione della dieta ad <i>Isochrysis galbana</i> (Dieta 10).	104
5.4 Allevamento intensivo di copepodi Calanoidi nell'impianto pilota. .	105
5.4.1 Densità in vasca della popolazione di <i>Temora stylifera</i>	106
5.4.2 Densità in vasca della popolazione di <i>Centropages typicus</i> . .	111
5.5 Sopravvivenza delle larve di orata e valutazione della qualità delle larve alimentate ad <i>Artemia</i> e con il copepode <i>Temora stylifera</i> : contenuto in acidi grassi polinsaturi (PUFA).	116
6. CONCLUSIONI	127
7. BIBLIOGRAFIA	130
8. RINGRAZIAMENTI	143

LISTA DELLE FIGURE

- Figura 1.** Anatomia di copepode Calanoide femmina.
- Figura 2.** Femmina di copepode Calanoide.
- Figura 3.** Maschio di copepode Calanoide.
- Figura 4.** Rappresentazione schematica del comportamento di accoppiamento di *Centropages typicus*.
- Figura 5.** Femmina, maschio e uova schiuse e non schiuse di *Temora stylifera*.
- Figura 6.** Femmina, maschio e uovo di *Centropages typicus*.
- Figura 7.** Lato sinistro (A) e destro (B) dell'impianto pilota a circuito chiuso per l'allevamento di copepodi Calanoidi.
- Figura 8.** Rappresentazione schematica delle diverse modalità di funzionamento dell'impianto.
- Figura 9.** Retino di Nansen.
- Figura 10.** Rappresentazione schematica della sperimentazione di diverse diete algali per i copepodi *Temora stylifera* e *Centropages typicus*.
- Figura 11.** Schema e parametri di allevamento delle larve di *Sparus aurata* L. per i test di appetibilità.
- Figura 12.** Numero di uova prodotte/femmina/giorno per ogni dieta testata (mono e pluri-algale) per l'intero periodo di sperimentazione. Il valore medio della produzione registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.
- Figura 13.** Produzione di pellet fecali/individuo/giorno per ogni dieta testata (mono e pluri-algale) per l'intero periodo di sperimentazione. Il valore

medio della produzione di pellet fecali registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

Figura 14. Percentuale di uova mangiate per ogni dieta testata (mono e pluri-algale) per l'intero periodo di sperimentazione. Il valore medio registrato è interpolato dalla linea nera.

Figura 15. Vitalità delle uova (% uove schiuse) per ogni dieta testata (mono e pluri-algale) per l'intero periodo di sperimentazione. Il valore medio della vitalità registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

Figura 16. Percentuale di adulti sopravvissuti per ogni dieta testata (mono e pluri-algale) per l'intero periodo di sperimentazione. Il valore medio registrato ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

Figura 17. Numero di uova prodotte/femmina/giorno per tutte le diete testate (mono e pluri-algali) durante i primi 6 giorni di sperimentazione. Il valore medio della produzione registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

Figura 18. Produzione di pellet fecali/individuo/giorno per tutte le diete testate (mono e pluri-algali) durante i primi 6 giorni di sperimentazione. Il valore medio della produzione di pellet fecali registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

Figura 19. Percentuale di adulti sopravvissuti per tutte le diete testate (mono e pluri-algali) durante i primi 6 giorni di sperimentazione. Il valore medio registrato ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

Figura 20. Vitalità delle uova (% uove schiuse) per tutte le diete testate (mono e pluri-algali) durante i primi 6 giorni di sperimentazione. Il valore

medio della vitalità registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

Figura 21. Percentuale di uova mangiate per tutte le diete testate (mono e pluri-
algali) durante i primi 6 giorni di sperimentazione. Il valore medio
registrato è interpolato dalla linea nera.

Figura 22. Numero di uova prodotte/femmina/giorno per le 11 diete testate
(esclusa dieta 10) per tutto il periodo di sperimentazione. Il valore
medio della produzione registrata ogni giorno è interpolato dalla linea
nera.

Figura 23. Numero di pellet fecali prodotti/individuo/giorno per le 11 diete
testate (esclusa dieta 10) per tutto il periodo di sperimentazione. Il
valore medio della produzione registrata ogni giorno è interpolato
dalla linea nera.

Figura 24. Vitalità delle uova (% uove schiuse) per le 11 diete testate (esclusa
dieta 10) durante tutto il periodo di sperimentazione Il valore medio
della vitalità registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

Figura 25. Percentuale di adulti sopravvissuti per le 11 diete testate (esclusa dieta
10) durante tutto il periodo di sperimentazione. Il valore medio
registrato ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

Figura 26. Percentuale di uova mangiate per le 11 diete testate (esclusa dieta 10)
durante tutto il periodo di sperimentazione. Il valore medio registrato
è interpolato dalla linea nera.

Figura 27 Censimento in vasca di *Temora stylifera*.

Figura 28. Concentrazione nauplii di *Temora stylifera*.

- Figura 29.** Confronto tra concentrazioni e censimenti dei nauplii di *Temora stylifera*.
- Figura 30.** Censimento in vasca di *Centropages typicus*.
- Figura 31.** Concentrazione nauplii di *Centropages typicus*.
- Figura 32.** Confronto tra concentrazioni e censimenti dei nauplii di *Centropages typicus*.
- Figura 33.** Percentuali di sopravvivenza delle larve di *Sparus aurata* L. alimentate rispettivamente ad *Artemia salina* e con il copepode *Temora stylifera* (media \pm ds).
- Figura 34.** Esvie di copepodi ritrovate nei pellet fecali delle larve di *Sparus aurata* L.
- Figura 35.** Larva alimentata a copepodi.
- Figura 36.** Percentuali relative di AA, EPA e DHA rispetto ai lipidi totali e rapporti EPA/AA ed EPA/DHA in larve di *Sparus aurata* alimentate con il copepode *Temora stylifera*.
- Figura 37.** Percentuali relative di AA, EPA e DHA rispetto ai lipidi totali e rapporti EPA/AA ed EPA/DHA in larve di *Sparus aurata* alimentate con *Artemia salina*.

LISTA DELLE TABELLE

- Tabella I.** Durata del ciclo vitale di *Temora stylifera*.
- Tabella II.** Durata del ciclo vitale di *Centropages typicus*.
- Tabella III.** Dimensioni (μm) delle alghe utilizzate.
- Tabella IV.** Valore nutrizionale delle alghe utilizzate.
- Tabella V.** Concentrazione delle diete monoalgali testate su adulti di *Temora stylifera* e *Centropages typicus* e rispettivo contenuto in C.
- Tabella VI.** Concentrazione delle diete plurialgali testate su adulti di *Temora stylifera* e rispettivo contenuto in C.
- Tabella VII.** Concentrazione delle diete plurialgali testate su adulti di *Centropages typicus* e rispettivo contenuto in C.
- Tabella VIII.** ANOVA per il parametro produzione di uova/femmina/giorno del copepode *Temora stylifera*.
- Tabella IX.** ANOVA per il parametro produzione di pellet fecali/individuo/giorno del copepode *Temora stylifera*.
- Tabella X.** ANOVA per il parametro percentuale di uova schiuse per giorno del copepode *Temora stylifera*.
- Tabella XI.** ANOVA per il parametro percentuale di uova mangiate per giorno dal copepode *Temora stylifera*.
- Tabella XII.** ANOVA per il parametro percentuale di adulti sopravvissuti per giorno del copepode *Temora stylifera*.

Tabella XIII No. uova prodotte/femmina/giorno per *Temora stylifera*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Tabella XIV No. pellet fecali/individuo/giorno per *Temora stylifera*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Tabella XV Percentuale uova mangiate da *Temora stylifera*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Tabella XVI Risultati delle diete mono e pluri-algali testate su *T. stylifera* (valore medio \pm ds) in termini di produzione di uova (uova/femmina), di pellet fecali (Pf/individuo), vitalità delle uova (% schiusa), percentuale di sopravvivenza degli individui e percentuale delle uova mangiate.

Tabella XVII ANOVA per il parametro produzione di uova/femmina/giorno del copepode *Centropages typicus* (tutte le diete fino al 6° giorno).

Tabella XVIII ANOVA per il parametro produzione di pellet fecali/individuo/giorno del copepode *Centropages typicus* (tutte le diete fino al 6° giorno).

Tabella XIX ANOVA per il parametro percentuale di uova schiuse al giorno del copepode *Centropages typicus* (tutte le diete fino al 6° giorno).

Tabella XX ANOVA per il parametro percentuale di uova mangiate al giorno dal copepode *Centropages typicus* (tutte le diete fino al 6° giorno).

Tabella XXI ANOVA per il parametro percentuale di sopravvivenza degli adulti per giorno del copepode *Centropages typicus* (tutte le diete fino al 6° giorno).

Tabella XXII No. uova prodotte/femmina/giorno per *Centropages typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Tabella XXIII No. pellet fecali/individuo/giorno per *C. typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Tabella XXIV Percentuale di sopravvivenza degli adulti di *C. typicus* (primi 6 giorni di sperimentazione): significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Tabella XXV Risultati delle 12 diete testate su *C. typicus* (valore medio \pm ds) fino al 6° giorno di sperimentazione in termini di produzione di uova (uova/femmina), di pellet fecali (Pf/individuo), vitalità delle uova (% di schiusa), percentuale di sopravvivenza degli adulti e percentuale delle uova mangiate.

Tabella XXVI ANOVA per il parametro produzione di uova/femmina/giorno del copepode *Centropages typicus*; (senza dieta ISO).

Tabella XXVII ANOVA per il parametro produzione di pellet fecali/individuo/giorno del copepode *Centropages typicus*; (senza dieta ISO).

Tabella XXVIII ANOVA per il parametro percentuale di uova schiuse al giorno del copepode *Centropages typicus*; (senza dieta ISO).

Tabella XXIX ANOVA per il parametro percentuale di uova mangiate al giorno dal copepode *Centropages typicus*; (senza dieta ISO).

Tabella XXX ANOVA per il parametro percentuale di sopravvivenza degli adulti per giorno del copepode *Centropages typicus*; (senza dieta ISO).

Tabella XXXI No. uova prodotte/femmina/giorno per *Centropages typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Tabella XXXII No. pellet fecali/individuo/giorno per *C. typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla

seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Tabella XXXIII Vitalità delle uova di *C. typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Tabella XXXIV Percentuale di adulti sopravvissuti di *C. typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Tabella XXXV Risultati delle 11 diete (esclusa Dieta 10) testate su *C. typicus* (valore medio \pm ds) per tutto il periodo di sperimentazione in termini di produzione di uova (uova/femmina), di pellet fecali (Pf/individuo), vitalità delle uova (% di schiusa), percentuale di sopravvivenza degli adulti e percentuale delle uova mangiate.

Tabella XXXVI. Confronti di produzioni di copepodi (copepodi/l/giorno) in sistemi di allevamento intensivo. Le densità rappresentano una produzione media naupliare per tutto il periodo di allevamento.

Tabella XXXVII. Composizione di acidi grassi nel copepode *Temora stylifera* (stadii NIII-CII) arricchito con *P. minimum* e *I. galbana*, nei nauplii di *Artemia salina* appena schiusi e nei metanauplii di *Artemia salina* arricchiti con *I. galbana* per 24 h.

Tabella XXXVIII. Composizione di acidi grassi di larve di *Sparus aurata* L. alimentate con il copepode *Temora stylifera* a differenti concentrazioni.

Tabella XXXIX. Composizione di acidi grassi di larve di *Sparus aurata* L. alimentate con *Artemia salina* a differenti concentrazioni.

ACRONIMI

C	Carbonio
SFA	Acidi grassi saturi
MUFA	Acidi grassi monoinsaturi
HUFA	Acidi grassi altamente insaturi
PUFA	Acidi grassi polinsaturi (≥ 2 doppi legami)
AA	Acido arachidonico, 20:4n-6
EPA	Acido eicosapentaenoico, 20:5n-3
DHA	Acido docosaesaenoico, 22:6n-3
GSL	Grande Lago Salato
ppm	parti per milioni
NI – NVI	Fasi naupliari (da I a VI)
CI – CV	Fasi di copepodite (da I a V)
PLC	Programmable Logic Control
HCIO	Ipoclorito
NH₃	Ammoniaca
NO₂⁻	Nitriti
NO₃⁻	Nitrati
FSW	Acqua di mare filtrata
ISO	<i>Isochrysis galbana</i>
PRO	<i>Prorocentrum minimum</i>
RHO	<i>Rhodomonas baltica</i>
TETRA	<i>Tetraselmis suecica</i>

1. INTRODUZIONE

Sin dallo sviluppo dei primi impianti di produzione acquacolturale verso la fine degli anni '70, la richiesta delle cisti di *Artemia* è gradualmente aumentata da poche tonnellate a circa 800 tonnellate all'anno, rappresentando circa il 40% della richiesta totale in acquacoltura per l'alimentazione dei primi stadi larvali di pesci. Durante gli scorsi 25 anni, il Grande Lago Salato (GSL), negli USA, è stato il fornitore principale di cisti di *Artemia* per il mercato mondiale dell'acquacoltura e soggetto a numerose speculazioni riguardo la sua capacità a sostenere questa crescente industria. (Lavens and Sorgeloos, 2000). Seri problemi nella produzione di *Artemia* sono iniziati dopo un intenso El Niño, nel periodo 1982–1984, causando pesanti slavine e scioglimenti di neve dalle montagne circostanti, risultando in un considerevole calo della salinità del lago. Il braccio nord del lago è rimasto separato dal braccio sud durante gli anni '50 a causa di un innalzamento del fondale e pertanto, essendo meno esposto alla diluizione si è potuto utilizzarlo come fonte principale delle cisti di *Artemia*. Dopo tale periodo, la salinità del braccio sud del lago è lentamente tornata a valori favorevoli per la produzione di cisti.

Ma con El Niño del 2001 il GLS ha nuovamente subito una diminuzione di salinità.

La salinità della parte sud del lago è ora in un range di 70–80 ppm, mentre la salinità ottimale per la produzione di *Artemia* dovrebbe essere intorno ai 100–150 ppm.

A causa di un'assenza di scambio di acqua con il braccio sud, quello nord, a sua volta, è rimasto confinato a livelli di saturazione. Con la continua diminuzione di salinità nel braccio sud, l'industria dell'*Artemia* si è trovata a fronteggiare un drastico declino, che nel periodo 1999–2000 ha raggiunto il minimo storico. Sebbene gli avvertimenti sul rischio di dipendere su un'unica naturale (e non prevedibile) risorsa

sono stati paventati in ripetute occasioni (Bengtson *et al.*, 1991), è stato solo nel 1994 che le compagnie di raccolta delle cisti di *Artemia* si sono rese conto del grave problema del GLS ed hanno incominciato a sfruttare nuovi siti di raccolta sparsi in tutto il mondo, con un conseguente aumento dei costi delle cisti. Nonostante lo sfruttamento dei nuovi siti, le fonti di *Artemia* rimangono scarse ed i fornitori a stento riescono a far fronte al costante aumento della richiesta di un'industria acquacolturale in rapida espansione.

Accanto a questa scarsità di cisti, c'è da tenere in considerazione che l'*Artemia*, così come i rotiferi (*Brachionus plicatilis* e/o *rotundiformis*), comunemente utilizzati come alimento vivo nei primi giorni di appastamento larvale di molte specie di pesci, non rappresentano l'alimento ideale per l'assenza o scarsità di alcuni nutrienti essenziali, soprattutto di acidi grassi polinsaturi (PUFA). Pertanto, un arricchimento pre-alimentazione risulta essere necessario per un trasferimento di tali composti a livelli trofici più alti (Lavens *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2002). Ricercatori inglesi, giapponesi e belgi hanno creato prodotti e procedure di arricchimento usando selezionate microalghe, prodotti micro-incapsulati, lievito, preparazioni emulsionate, concentrati auto-emulsionanti, singolarmente o in varie combinazioni (Léger *et al.*, 1986). L'importanza dei PUFA della serie ω -3 ed ω -6 nell'alimentazione larvale di pesci e crostacei, è stata ampiamente investigata durante gli scorsi 30 anni, in particolare dell'acido arachidonico 20:4(n-6) (AA), acido eicosapentaenoico 20:5(n-3) (EPA) ed acido docosaesaenoico 22:6(n-3) (DHA) (Yone and Fuji, 1975; Kanazawa *et al.*, 1979; Halver, 1980; Witt *et al.*, 1984; Fraser *et al.*, 1988; Watanabe, 1988; Rainuzzo *et al.*, 1992a; Navarro *et al.*, 1993; Lall, 2000). Nei pesci e nei vertebrati superiori i fosfolipidi dei tessuti neurali, in particolare del cervello e

della retina, sono ricchi in DHA e tale acido giocherebbe un ruolo specifico nelle membrane neurali (Sargent *et al.*, 1993). L'utilizzazione di DHA come fonte di energia, durante le prime fasi di embriogenesi, avviene nelle larve di molte specie di pesci marini (Falk-Petersen *et al.*, 1989; Rainuzzo *et al.*, 1992b), ma dopo l'assorbimento del sacco vitellino, le larve sono completamente dipendenti dalla cattura delle prede per sopperire alla richiesta di PUFA.

Il tuorlo delle uova di molti pesci marini contiene DHA ed EPA in un rapporto ≥ 2 e pertanto sembrerebbe appropriato che la dieta delle larve di pesci, a base di una qualunque preda viva, debba assicurare un rapporto DHA/EPA simile o addirittura superiore (Parrish *et al.*, 1994).

Deficienze nel contenuto di acidi grassi altamente insaturi (n-3) (HUFA) nelle diete larvali, sono state identificate come importanti fattori che influenzano negativamente la fecondazione, la vitalità ed il ritmo di schiusa delle uova di *Sparus aurata* (Mourente and Odriozola, 1990) ed anche una malpigmentazione dorsale, un'errata migrazione degli occhi e sviluppo della retina in *Hippoglossus hippoglossus* e *Scophthalmus maximus* (Naess *et al.*, 1995; Naess and Lie, 1998; McEvoy *et al.*, 1998a; Shields *et al.*, 1999). Il ritmo di crescita delle larve potrebbe essere inoltre influenzato dalla taglia delle prede e per alcuni pesci la distribuzione della taglia degli organismi preda appare essere più importante del numero totale di prede per unità di volume. La larghezza della preda è considerata la caratteristica dimensionale più importante per l'abilità della larva ad ingerire la preda: essendo le prede ingerite intere, l'apertura boccale della larva limiterebbe ciò che essa potrebbe catturare (Chesney, 2005).

Nonostante l'ampia gamma di arricchitori per *Artemia* e rotiferi commercialmente disponibili ed i miglioramenti nelle tecniche di allevamento, tali organismi non risultano ancora l'optimum per una corretta alimentazione larvale. Infatti, uno dei potenziali rischi nell'uso di *Artemia* arricchita con emulsioni di olio di pesce, arricchito a sua volta con n-3 HUFA, è la facilità con cui queste emulsioni sono propense all'auto-ossidazione (McEvoy *et al.*, 1995; Sargent *et al.*, 1997), dando luogo, quindi, a tutta una serie di reazioni con conseguente produzione di sostanze tossiche come le aldeidi. Questi HUFA, inoltre, tendono ad essere incorporati sottoforma di trigliceridi e non come fosfolipidi.

L'abilità dei fosfolipidi della dieta a migliorare la crescita e lo sviluppo delle larve di pesce è oramai ben affermata (Kanazawa *et al.*, 1985; Kanazawa, 1993; Geurden *et al.*, 1995) e potrebbe, in parte, spiegare le superiori performance dei nauplii di copepodi, che contengono il 50% in più di fosfolipidi, rispetto ad altre specie di prede (McEvoy *et al.*, 1998b). I fosfolipidi della dieta potrebbero riflettere la primitiva natura del sistema digerente delle larve di pesce che non risulta essere completamente funzionante, a causa della mancanza della secrezione di enzimi digestivi fino a completa metamorfosi (Munilla-Moran and Stark, 1989; Bisbal and Bengtson, 1995). Inoltre ci sono evidenze che i fosfolipidi della dieta possano contribuire al consumo del cibo in modo migliore (Koven *et al.*, 1998), agire come emulsionanti nell'intestino (Koven *et al.*, 1993), ridurre la perossidazione lipidica durante l'arricchimento e nell'intestino (McEvoy *et al.*, 1995; Murai *et al.*, 1988), e stimolare la sintesi delle proteine negli enterociti intestinali (Fontagne *et al.*, 1998; Geurden *et al.*, 1998). Le larve di pesce hanno un'assoluta necessità di fosfolipidi preformati, dovuta ad una incapacità a sintetizzare fosfolipi ex-novo in quantità

sufficienti ad incontrare le richieste di energia dovute alle continue metamorfosi (Teshima *et al.*, 1997). Tale incapacità è legata all'assenza nei pesci marini di enzimi "denaturanti", cioè di enzimi capaci di convertire acidi grassi monoinsaturi in acidi grassi a più lunga catena e con più doppi legami, come ad esempio AA (C20:4n-6), EPA (C20:5n-3) e DHA (C22:6n-3).

La superiorità nutrizionale dei copepodi nell'alimentazione delle larve di pesci marini, rispetto al tradizionale cibo vivo (*Artemia* e rotiferi) è ormai ben affermata.

Essi rappresentano una ricca fonte di fosfolipidi, di acidi grassi essenziali altamente insaturi, di antiossidanti naturali, di enzimi, oltre ad avere un range dimensionale che ben soddisfa le esigenze dei singoli stadi larvali dei pesci. I livelli quantitativi di acidi grassi in essi contenuti, dipendono dagli input della dieta (Græve *et al.*, 1994), spesso riflettono la composizione della dieta algale stessa (Sargent and Falk-Petersen, 1988), lo stadio di sviluppo della cultura algale (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989) e lo stadio di sviluppo del copepode (Sargent and Falk-Petersen, 1988).

Con oltre 24.000 specie conosciute, i copepodi rappresentano circa il 70% degli organismi zooplanctonici sia nei mari temperati che subtemperati e costituiscono la più ampia classe di crostacei negli ecosistemi acquatici. Nell'ambito della catena trofica, essi rappresentano l'anello di congiunzione tra il fitoplancton (produttori primari) ed i livelli trofici più elevati (consumatori secondari).

In aree con acque ad elevata produzione, i copepodi possono essere raccolti direttamente in mare e prontamente usati come cibo per pesci, oppure possono essere trasferiti in stagni con acque arricchite con alghe, permettendo così alle popolazioni di incrementare le densità per raccolte successive. Le difficoltà possono riguardare, in particolare, l'attendibilità delle raccolte naturali: le comunità naturali di

zooplancton fluttuano in termini di abbondanza, composizione di specie, stato di salute e nutrizionale e gli animali possono essere portatori di parassiti o di altre malattie. Allevamenti intensivi di copepodi, come alimento delle larve di pesci, rappresentano un'allettante alternativa alle catture naturali, se fossero economicamente vantaggiosi. Affinché un allevamento possa essere di successo, la qualità, quantità ed i tempi di produzione devono essere affidabili ed indirizzati verso le richieste delle larve di pesce da alimentare. Fino ad oggi, il numero di specie allevate su larga scala, rilevanti per l'alimentazione larvale, sono poche ed appartengono a tre dei dieci ordini di copepodi: Calanoidi, Harpacticoidi e Ciclopodi. Le specie dei Calanoidi sono le più abbondanti nell'ambiente pelagico delle acque costiere e pertanto hanno ricevuto la maggiore attenzione da parte dei ricercatori, come quelle appartenenti ai generi *Acartia*, *Calanus*, *Paracalanus*, *Pseudocalanus*, *Temora*. In acquacoltura le specie dei generi *Acartia*, *Centropages* ed *Eurytemora*, sono ampiamente utilizzate in mono culture o miscele di esse (Toledo *et al.*, 1997, 1999; Rønnestad *et al.*, 1998; Evjemo and Olsen, 1997; Evjemo *et al.*, 2003; Shields *et al.* 1999; Støttrup, 2000; Sipauba-Tavares *et al.*, 2001; Payne and Rippingale, 2001b; McKinnon *et al.*, 2003; Helland *et al.*, 2003; Olivotto *et al.*, 2008b; Bell *et al.*, 2003). Tra i copepodi Harpacticoidi, le specie appartenenti ai generi *Euterpina*, *Tigriopus* e *Tisbe* sono state tra i candidati preferiti in acquacoltura (Olivotto *et al.*, 2008a; Fukusho *et al.*, 1980; Drillet *et al.*, 2006). Solamente pochi Ciclopodi sono stati allevati in laboratorio, come *Oithona* spp. (Lipman *et al.*, 2001) e *Apocyclops* spp. (Marcus e Murray, 2001).

Sebbene i copepodi siano già impiegati con successo per l'allevamento di specie ittiche nei paesi subtropicali asiatici, dove forte è la tradizione acquacolturale

outdoor, le attuali conoscenze scientifiche per una produzione massiva di copepodi mediterranei sono ancora molto limitate. C'è da sottolineare, però, che le specie asiatiche hanno cicli vitali molto più brevi rispetto alle specie mediterranee: circa 4/6 giorni per completare lo sviluppo da nauplio ad adulto contro i 12-19 giorni dei copepodi delle acque temperate. Questo è un importante fattore da tenere in considerazione quando si propongono specie da allevare. Per questo la conoscenza di base dei processi fisiologici è un requisito essenziale prima di poter proporre l'allevamento massivo di copepodi da utilizzare, poi, come alimento alternativo per larve di pesci.

Il gruppo di Ecofisiologia del Laboratorio di Ecologia Funzionale ed Evolutiva della Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli, da tempo impegnato nello studio della fisiologia riproduttiva dei copepodi Calanoidi mediterranei, ha sviluppato il progetto dal titolo: "Processo di allevamento intensivo di copepodi (zooplankton) da utilizzare in sostituzione di *Artemia* quale dieta viva alternativa per larve di specie ittiche pregiate di interesse commerciale", finanziato dalla Regione Campania (D.G.R. n° 889 del 30/06/2006) e finalizzando il proprio background scientifico anche verso il settore dell'acquacoltura. I risultati di tale progetto, gettano una base informativa per future applicazioni in acquacoltura di copepodi dalla fisiologia complessa, nonché di diete pluri-algali che conferiscono ai copepodi stessi un elevato contenuto nutrizionale, che si tramuta, poi, in una maggiore sopravvivenza e qualità delle larve di pesce. La Stazione Zoologica di Napoli mediante tale progetto, che ha previsto la realizzazione di un sistema di allevamento a circuito chiuso, rientra in due dei settori di interesse del CRIAcq (Centro interdipartimentale di ricerca per la gestione delle risorse idrobiologiche e per l'acquacoltura), con il quale ha stipulato una

convenzione di collaborazione: “Tecnologie per l’allevamento di specie acquatiche” e “Qualità dei prodotti ittici”. Esso, inoltre, sposa quelle che sono le linee di condotta del CRIAcq: 1) *ecocompatibilità* del processo produttivo utilizzato, cioè capacità di non interferire con gli equilibri naturali; e 2) *ecosostenibilità*, cioè capacità di creare ricchezza senza alterare la rinnovabilità delle risorse biologiche.

3.1 Aspetti generali della biologia dei copepodi Calanoidi

I copepodi Calanoidi sono piccoli crostacei di forma allungata, il cui corpo è composto da un prosoma, comprendente la testa, e dal metasoma provvisto di segmenti toracici e di 5 paia di arti. Il corpo termina con l’urosoma, composto da cinque somiti addominali, e con la furca (Figura 1).

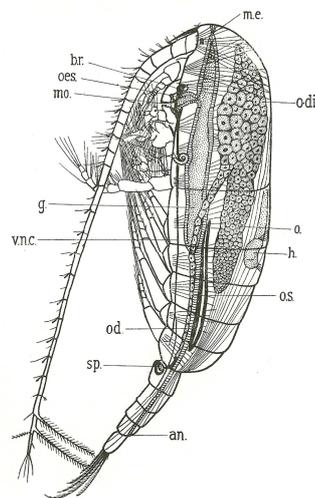


Figura 1. Anatomia di copepode Calanoide femmina (visione laterale). **an:** ano; **b.r.:** ganglio ventrale; **h:** cuore; **g:** intestino; **m.e.:** occhio mediano; **mo:** bocca; **o:** ovario; **od:** ovidotto; **o. di.:** diverticolo ovarico; **oes:** esofago; **os:** goccia lipidica; **sp.:** spermateca; **v.n.c.:** sistema nervoso ventrale (da Marshall and Orr, 1972).

Il capo porta anteriormente un primo paio di antenne, centralmente il secondo paio di antenne, le mandibole, le maxillule e le maxille: queste appendici, ricoperte di setole, costituiscono l'apparato filtratore. I copepodi sono generalmente erbivori e si cibano di microalghe. Le 4 paia di arti sul metasoma hanno funzione natatoria (piedi) mentre il quinto paio è modificato. Il tipico arto natatorio è provvisto di due articoli basali (basipodite) con un ramo esterno (esopodite) e uno interno (endopodite). L'addome o urosoma è formato da cinque segmenti il primo dei quali, nella femmina, è molto sviluppato e porta le aperture genitali. Presentano dimorfismo sessuale e la fecondazione avviene tramite copula. E' possibile distinguere il maschio dalla femmina con un'attenta analisi dell'anatomia estera. Nella femmina le prime antenne sono simmetriche (Figura 2) mentre nel maschio sono asimmetriche (Figura 3) e la più lunga, modificata ad uncino, svolge un'importante funzione nella fase di accoppiamento. Inoltre nella femmina, il primo segmento addominale è sempre più sviluppato rispetto a quello del maschio e sono visibili i due pori genitali. Il maschio presenta una delle due appendici toraciche dell'ultimo segmento modificate (P5) in modo da poter trasferire la spermatoforesca ai pori genitali femminili.

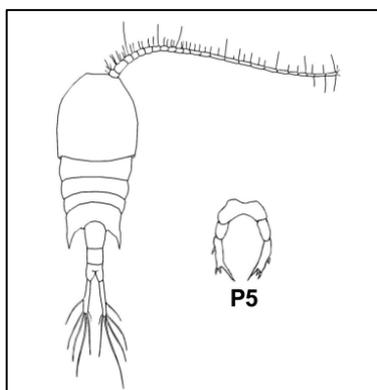


Figura 2. Femmina di copepode Calanoide

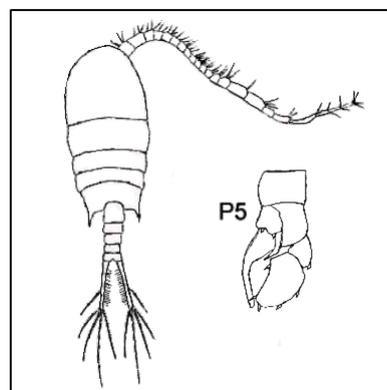


Figura 3. Maschio di copepode Calanoide

L'apparato riproduttivo del maschio è formato da un'unica gonade, in posizione dorsale, addossata alla parete del pericardio; dal testicolo parte un vaso deferente che porta nella vescicola seminale contenente spermatozoi e liquido seminale. Nella femmina è generalmente presente un unico ovario, posto dorsalmente, da cui prendono origine due ovidotti che corrono in posizione ventrale, parallelamente all'intestino ed anteriormente alla gonade. Durante la copula il maschio trattiene la femmina mediante l'antenna prensile modificata e trasferisce la spermatofora nel poro genitale femminile (Figura 4). L'attacco della spermatofora avviene mediante una sostanza vischiosa che a contatto con l'acqua si indurisce facilitando la fecondazione delle uova. Le uova vengono fecondate durante il passaggio attraverso i pori genitali prima di essere rilasciate in mare o deposte in sacchi ovigeri che restano attaccati alla femmina fino alla schiusa delle larve (nauplii), a seconda delle specie.

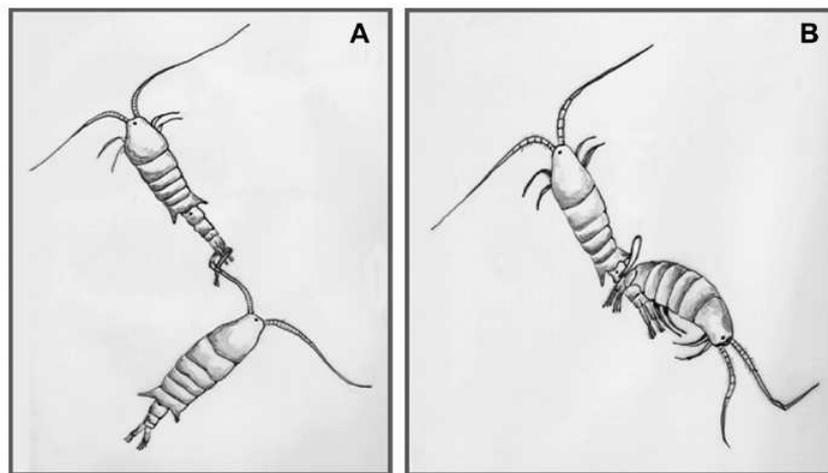


Figura 4. Rappresentazione schematica del comportamento di accoppiamento di *Centropages typicus*. (A) Fase di pre-accoppiamento durante la quale il maschio usa l'antennula genicolata destra per afferrare le setole caudali della femmina. (B) Fase di accoppiamento durante la quale il maschio pone mediante la quinta appendice la spermatofora sui pori genitali femminili.

I copepodi Calanoidi presentano un ciclo vitale complesso con 13 fasi morfologicamente differenti (uovo, 6 fasi naupliari [NI-NVI], 5 fasi di copepodite [CI-CV], adulto). Nel caso delle due specie oggetto di studio (*Temora stylifera* e *Centropages typicus*) le uova (in realtà sono embrioni) vengono deposte singolarmente e rilasciate in acqua; dopo circa 48 ore e alla temperatura di 20°C, schiude il primo stadio di nauplio. Lo sviluppo avviene attraverso metamorfosi. Tutti gli stadi naupliari sono planctonici: durante i primi stadi (NI-NII), che sono alquanto brevi, l'organismo non si alimenta e consuma il sacco ovigero. Dallo stadio NIII, il nauplio inizia ad alimentarsi e la durata di tali fasi è relativamente lunga rispetto alle altre fasi naupliari probabilmente per la necessità dell'organismo di riprendere il peso perso durante le fasi di pre-alimentazione. Tra le fasi di copepodite, quella che va da CV ad adulto è generalmente la più lunga per i mutamenti fisiologici dovuti alla maturazione sessuale, che è comunque più breve nei maschi (Ianora, 2005).

3.1.1 *Temora stylifera*

Temora stylifera è una specie di acque calde-temperate, ristretta alle aree costiere dell'Oceano Atlantico da 40°N a 35°S, incluso il Mediterraneo (Arcos and Fleminger, 1991). Nel nord-ovest del Mediterraneo, *T. stylifera* contribuisce al numero totale di copepodi tra il 5 e il 25% (Seguin, 1981; Ianora *et al.*, 1989). Nel Golfo di Napoli è presente per tutto l'anno, con un tipico pattern stagionale caratterizzato da un aumento della popolazione alla fine di giugno-luglio, con un picco in autunno ed un forte declino in inverno (Mazzocchi and Ribera d'Alcalà, 1995). Presenta dimorfismo sessuale (Figura 5), come già ampiamente descritto

precedentemente. Le uova sono perfettamente sferiche, con superficie liscia ed un diametro di circa 80-100 μ m.

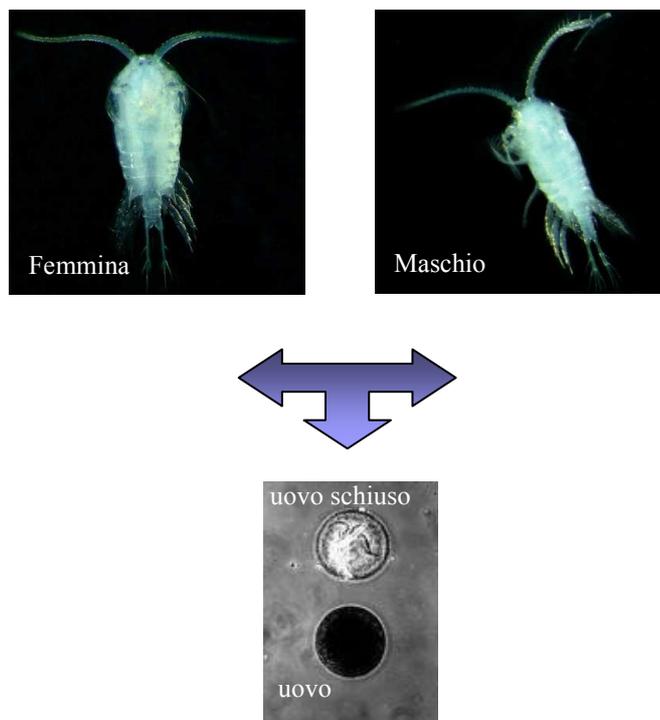
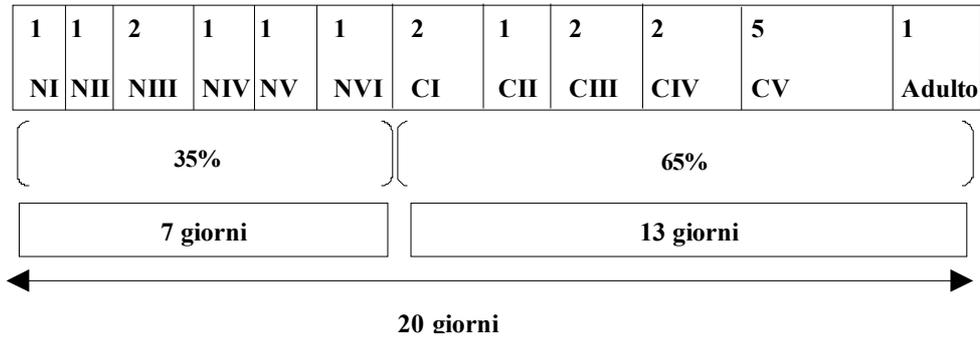


Figura 5. Femmina, maschio e uova schiuse e non schiuse di *Temora stylifera*

T. stylifera sembra essere preferenzialmente un copepode erbivoro, in base al suo nuoto regolare associato alla creazione di “correnti alimentari”, che gli permettono di catturare efficientemente cellule di fitoplancton (Paffenhöfer, 1998). Tuttavia, i ciliati rappresentano una componente rilevante della sua dieta naturale (Broglia *et al.*, 2004). Diversi autori hanno dimostrato che il tipo di cibo influenza significativamente il tempo di sviluppo dei copepodi (Ianora *et al.*, 1989; Klein Breteler *et al.*, 1990; Huntley *et al.*, 1987). In Tabella I sono riportate la durata del ciclo vitale e le dimensioni dei diversi stadi di sviluppo.

Tabella I. Durata del ciclo vitale di *Temora stylifera* (Carotenuto, 1999).



Stadi naupliari	Lunghezza (µm)
NI	111
NII	129
NIII	152
NIV	192
NV	230
NVI	269

Stadi copepoditi/adulti	Lunghezza fino ultimo segmento urosoma (µm)
CI	460
CII	480
CIII	720
CIV	820
CV femmina	1100
CV maschio	1000
ADULTO f.	1300
ADULTO m.	1200

3.1.2 *Centropages typicus*

Centropages typicus è un copepode Calanoide con un'ampia distribuzione nel Nord Atlantico e nel Mar Mediterraneo, generalmente confinato nelle regioni più interne della piattaforma continentale ma si ritrova anche in estuari poco profondi così come in aree ad elevata salinità. La sua presenza nel Mediterraneo aumenta con temperature comprese tra i 13°C e i 20°C, diminuendo a temperature al di fuori di tale intervallo. Presenta picchi di abbondanza in primavera-estate (Carlotti and Harris, 2007) ed il suo contributo al numero totale di specie di copepodi è compreso

tra il 10 ed il 50% (Seguin, 1981; Ianora *et al.*, 1989; Ianora and Buttino, 1990).

Anche *C. typicus* presenta dimorfismo sessuale (Figura 6).

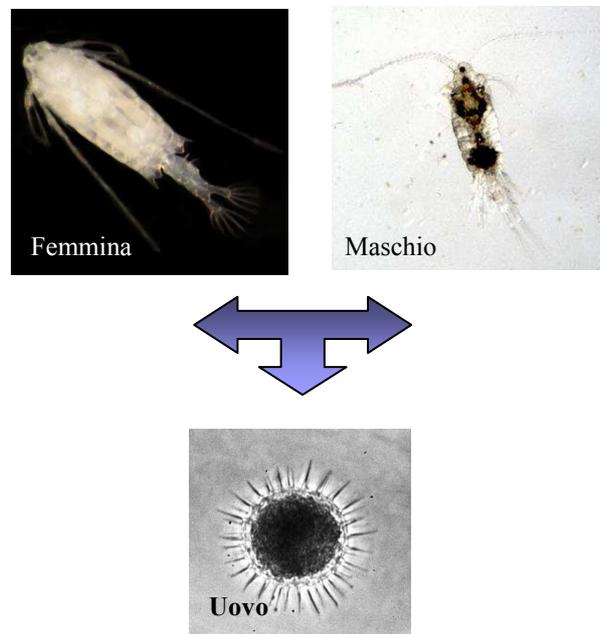
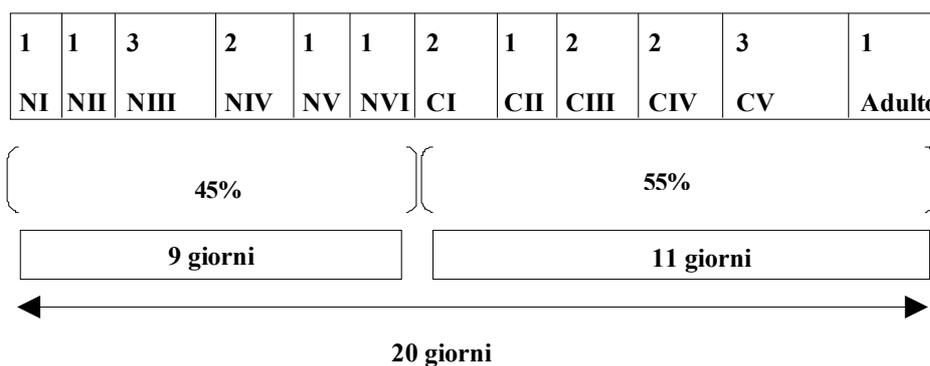


Figura 6. Femmina, maschio e uovo di *Centropages typicus*.

L'uovo è sferico, con un diametro di circa 70 μm , e presenta protuberanze e piccole spine di 5-20 μm di lunghezza. Talvolta sono state ritrovate anche uova con superficie liscia e non perfettamente sferiche. E' stato ipotizzato che tali uova potrebbero essere in "diapausa" o "dormienti", anche se a tutt'oggi non ci sono evidenze di produzione di tali uova per questa specie (Ianora *et al.*, 2007) Solamente alcune di queste uova sono risultate vitali. Tale copepode è principalmente carnivoro od onnivoro, alimentandosi su un ampio spettro di prede sia di fitoplancton, da piccole cellule algali dal diametro di 3-4 μm come *Isochrysis galbana* a grandi diatomee, che di ciliati, uova di altri copepodi, sacco vitellino delle larve di pesci, mostrando, però, una preferenza selettiva per prede mobili di grandi dimensioni (Cabelt *et al.*, 2007). I meccanismi del nuoto cambiano radicalmente durante lo

sviluppo, soprattutto nel passaggio tra stadi naupliari e quello di primo copepodite CI: i nauplii non producono “correnti alimentari”, a differenza dei copepoditi. Gli adulti trascorrono la maggior parte del tempo in lenti nuotate ed interruzioni di riposo, con occasionali e brevi rapidi nuotate ed eventi di accoppiamento (Alcaraz *et al.*, 2007). La temperatura è un fattore che influenza il ritmo di sviluppo, mentre il tipo di cibo, sia in termini di quantità che qualità, ne influenza il ritmo di crescita (Carlotti *et al.*, 2007). In Tabella II sono riportate la durata del ciclo vitale e le dimensioni dei diversi stadi di sviluppo.

Tabella II. Durata del ciclo vitale di *Centropages typicus* (Lawson and Grice, 1970).



Stadi naupliari	Lunghezza (µm)
NI	110
NII	150
NIII	180
NIV	220
NV	270
NVI	310

Stadi copepoditi/adulti	Lunghezza (µm)
CI	410
CII	480
CIII	568
CIV	780
CV femmina	1078
CV maschio	1058
ADULTO f.	1300
ADULTO m.	1260

2. STATO DELL'ARTE

Tradizionalmente l'industria dell'acquacoltura utilizza rotiferi e nauplii di *Artemia* come prede vive per gli stadi larvali di pesci. Nonostante l'elevato costo delle cisti e la loro sempre più difficile presenza sul mercato a causa di un impoverimento delle risorse naturali, l'*Artemia* presenta delle caratteristiche che la rendono ancora di grande valore: ciclo di vita breve, elevate fecondità, elevate produzione di uova e di schiusa, elevata percentuale di sopravvivenza, elevata tolleranza ad ampi cambiamenti di temperatura e salinità, ottimo sviluppo in colture di elevate densità. Tuttavia, però, questi organismi non rappresentano l'alimento ideale per tutte le larve di pesce. Ciò è dovuto al fatto che sono poveri in acidi grassi (Bell *et al.*, 2003), o talvolta sono troppo grandi per le prime fasi di alimentazione di alcune specie di pesce (Pepin and Penney, 1997), o non stimolano una corretta risposta alimentare (Buskey *et al.*, 1993; von Herbing and Gallagher, 2000). Pertanto, grande interesse è stato recentemente rivolto verso l'identificazione di diete vive alternative che potessero non solo sostituire le classiche diete, ma anche aumentare la sopravvivenza di specie ittiche allevabili. Diversi studi hanno testato l'effettivo impiego di plancton ricco di copepodi come alimento per le larve di pesce (Kraul *et al.*, 1992; Doi *et al.*, 1997; Støttrup and Norsker, 1997; Nanton and Castell, 1998; Støttrup, 2000; McKinnon *et al.*, 2003) ed i risultati in laboratorio hanno generalmente mostrato una buona crescita ed un'ottima percentuale di sopravvivenza delle larve. I copepodi hanno una composizione biochimica che corrisponde alle richieste nutrizionali delle larve di pesce, con particolare attenzione agli acidi grassi. Infatti, le popolazioni naturali di pesci contengono nei loro tessuti elevati livelli di acidi grassi altamente

insaturi (HUFA), come l'acido arachidonico 20:4n-6 (AA), l'acido eicosapentaenoico 20:5n-3 (EPA) e l'acido docosaesaenoico 22:6n-3 (DHA).

AA, EPA e DHA sono sintetizzati a partire da un acido precursore, l'acido linolenico (18:3n-3), mediante l'intervento di enzimi detti "denaturanti" ($\Delta 5$). La perdita dell'attività denaturante $\Delta 5$ da parte dei pesci marini carnivori, durante la loro evoluzione, potrebbe essere legata ad una dieta ricca di PUFA C20 e C22 preformati, rendendo l'attività denaturante $\Delta 5$ conseguentemente ridondante. In contrasto, molti pesci di acqua dolce, compresi salmoni, tilapie e carpe, hanno conservato l'attività denaturante $\Delta 5$ e, pertanto, riescono prontamente a convertire C18 in PUFA C20 e C22, grazie anche ad una dieta ricca di alghe e di invertebrati che, a loro volta, si nutrono di alghe (Takeuchi and Watanabe, 1977; Kanazawa *et al.*, 1979; Olsen *et al.*, 1990). Inoltre, le larve sembrerebbero essere molto più dipendenti da una dieta ricca in HUFA rispetto agli adulti, in quanto il loro ritmo di crescita somatica non può essere soddisfatto dalla incapacità di conversione degli acidi grassi. E' noto che gli acidi grassi rappresentano non solo una fonte di energia, ma sono necessari per aumentare la fluidità delle membrane plasmatiche ed intervengono in una serie di processi fisiologici come la produzione di uova e la loro schiusa, la mediazione nelle risposte immunologiche ad infezioni, la regolazione del flusso di acqua e di ioni attraverso le membrane ed infine permettono un normale sviluppo e funzionamento delle attività cerebrali e dei tessuti visivi ed aumentano la resistenza agli stress ambientali come freddo, caldo, ipossia, stimolazione acustica e visiva, stress da confinamento (Brett and Muller-Navarra, 1997).

I benefici riportati in letteratura per l'impiego di copepodi come dieta larvale alternativa, includono:

1. Valore nutrizionale superiore risultante in un normale sviluppo e pigmentazione con conseguente eliminazione di impiego di arricchitori (Norsker and Støttrup, 1994; Heath and Moore, 1997; Næss and Lie, 1998);
2. Contenuto ottimale lipidi/proteine (Conceição, 1997);
3. Aumento della resistenza allo stress (Kraul *et al.*, 1993) ed alle malattie;
4. Disponibilità di fasi larvali con taglia perfetta per la primissima alimentazione delle larve (Tito de Moraes and Bodiou, 1984);
5. Stimolo al comportamento di predazione (Støttrup and Norsker, 1997);
6. Sorgente di enzimi digestivi esogeni che migliorerebbero la digestione della preda nei primi stadi di sviluppo larvale in cui l'apparato digerente non è ancora completamente funzionante (Munilla-Moran *et al.*, 1990);
7. Aiuto nel mantenere in sospensione le colture algali nei sistemi di allevamento in acque verdi (Støttrup *et al.*, 1995).

Rotiferi ed *Artemia*, presentando un basso contenuto in HUFA, devono essere arricchiti prima di essere forniti come alimento alle larve. Arricchitori commercialmente disponibili sono molto esosi, il che determina un generale aumento dei costi di produzione e conseguentemente del prodotto finale. L'impiego di copepodi non prevede l'uso di particolari arricchitori, ma semplicemente l'utilizzo di microalghe, che sono poi l'alimento naturale di questi organismi. Molte sono le alghe utilizzate in acquacoltura, come *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis oculata*, *Dunaliella tertiolecta*, *Pavlova lutheri*, *Rhodomonas*

baltica, ecc., ognuna di esse con uno specifico contenuto in acidi grassi. Essendo le alghe un alimento a basso costo, facili da produrre e da mantenere, ne consegue che anche i costi di alimentazione e/o mantenimento dei copepodi sono inferiori a quelli calcolati per *Artemia*. L'importanza delle alghe come fonte di PUFA è stata recentemente rivisitata (Patil *et al.*, 2005). Le microalghe possono avere una stabilità lipidica superiore se comparate con i tradizionali PUFA, in quanto esse sono naturalmente ricche in carotenoidi, antiossidanti e vitamine e perché i lipidi sono bioincapsulati dalla parete cellulare algale.

La velocità di accrescimento dei copepodi è un importante fattore da tenere in considerazione quando si propongono le specie da allevare per scopi acquacolturali: gli organismi devono essere prodotti rapidamente e ad elevate densità. Per questo la conoscenza di base dei processi fisiologici è un requisito essenziale prima di poter proporre l'allevamento massivo di copepodi da utilizzare, poi, come alimento vivo alternativo per larve di pesci. Le vasche *outdoor*, comunemente utilizzate nei paesi asiatici, richiedono notevoli spazi e manca, inoltre, la possibilità di effettuare precisi controlli sul cibo e sulla qualità dell'acqua e ciò si riflette in una variazione nella produzione dei copepodi (Ogle, 1979; Ohno and Okamura, 1988; Sue *et al.*, 2005).

I sistemi a circuito chiuso, al contrario, permettono un controllo costante della qualità dell'acqua di allevamento, della quantità e qualità di alimento da fornire; il ricorso ad un continuo approvvigionamento d'acqua è limitato; la quantità di materiale organico immesso nell'ambiente è molto ridotta e gli organismi possono essere allevati anche al di fuori della loro stagionalità.

Il gruppo di Ecofisiologia del Laboratorio di Ecologia Funzionale ed Evolutiva della Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli, avvalendosi della collaborazione del

CRIAcq, si è fatto promotore di un progetto per l'allevamento intensivo di copepodi Calanoidi mediterranei da impiegare come dieta viva alternativa per la larvicoltura di specie ittiche marine. E' questo un esempio concreto di come la ricerca scientifica di base può avere una ricaduta importante in settori produttivi, rappresentando, in questo caso, la base informativa per future applicazioni in acquacoltura.

3. SCOPO DELLA RICERCA

L'obiettivo generale del progetto è stato quello di sperimentare l'allevamento intensivo di due specie di copepodi Calanoidi autoctoni, *Temora stylifera* e *Centropages typicus*, utilizzando un impianto pilota a circuito chiuso e di impiegare le fasi larvali dei copepodi allevati come alimento vivo alternativo per larve di specie ittiche di interesse commerciale in sostituzione della dieta classica ad *Artemia*.

3.1 Piano sperimentale

Il piano sperimentale si è articolato nelle seguenti fasi:

3.1.1 I FASE: Realizzazione, ottimizzazione e gestione del sistema a circuito chiuso – prove di stabulazione ed adattamento dei copepodi nell'impianto.

In tale fase si è proceduto alla realizzazione e messa a punto di un impianto pilota a circuito chiuso per l'allevamento intensivo di due specie di copepodi rappresentative dello zooplancton marino mediterraneo *Temora stylifera* e *Centropages typicus* che in natura presentano picchi di abbondanza alternati, con *T. stylifera* maggiormente rappresentata in autunno e *C. typicus* in primavera. L'impianto ha la caratteristica di poter raccogliere in automatico gli embrioni e gli stadi larvali dei copepodi in modo da essere selezionati per taglia. Prima di procedere all'allevamento vero e proprio, sono state effettuate delle prove di adattamento dei copepodi nell'impianto.

3.1.2 II FASE: Sperimentazione di diete algali per i copepodi selezionati.

Al fine di migliorare le condizioni di allevamento massivo ed ottenere un'elevata vitalità di uova, nauplii e copepoditi, con elevato valore nutrizionale, prove di alimentazione algale (diete mono e pluri-algali) sono state effettuate in piccoli volumi, sia su *T. stylifera* (10 diete) che su *C. typicus* (12 diete).

La dieta impiegata per i copepodi nell'impianto a circuito chiuso è derivata da una combinazione di tutte quelle che hanno dato i migliori risultati in termini di produzione di uova/femmina/giorno, produzione di pellet fecali/individuo/giorno, maggiore percentuale di uova schiuse, minore percentuale di uova mangiate e maggiore percentuale di adulti sopravvissuti.

3.1.3 III FASE: Allevamento intensivo dei copepodi *Temora stylifera* e *Centropages typicus* nel sistema a circuito chiuso con l'impiego delle diete selezionate.

Grazie ad un sistema di allevamento condizionato e controllato e ad una dieta algale ben precisa, è stato possibile allevare due specie di copepodi mediterranei, dalla fisiologia molto complessa, anche al di fuori della loro stagionalità.

3.1.4 IV FASE: Larvicoltura per prove di appetibilità con il copepode *T. stylifera*.

Test di appetibilità del copepode *Temora stylifera* sono stati condotti su larve di orata *Sparus aurata* L. Successive analisi biochimiche sul contenuto in acidi grassi polinsaturi delle larve hanno permesso di valutare la qualità dei copepodi e dell'*Artemia* come alimento per la specie *S. aurata*.

4. MATERIALI E METODI

4.1 I FASE. SISTEMA PILOTA PER L'ALLEVAMENTO DI COPEPODI CALANOIDI.

L'impianto per l'allevamento e la produzione massiva di due specie di copepodi Calanoidi mediterranei (*Temora stylifera* e *Centropages typicus*) è stato sviluppato sulla base di ampi studi della biologia ed ecologia degli animali, sia in laboratorio che nell'ambiente naturale. Tale allevamento è basato su un'attenta comprensione delle richieste degli organismi ed ha inoltre permesso di valutare praticamente i costi delle attrezzature, dello spazio e della mano d'opera.

L'impianto pilota è così costituito (Figura 7):

- 2 vasche di allevamento da 500 litri ciascuna, entrambe dotate di una pre-vasca. In ogni vasca sono presenti due filtri da 55 μm e 150/300 μm , per evitare rispettivamente il passaggio delle uova e dei copepodi nell'intero sistema e per la separazione dei nauplii/copepoditi durante il processo di separazione/concentrazione;
- 2 vasche di raccolta da 200 litri, avente ciascuna un filtro da 55 μm per la concentrazione dei nauplii/copepoditi;
- 1 modulo di filtrazione e purificazione dell'acqua costituito da una vasca di ripresa-accumulo da 400 litri, da un filtro biologico percolatore nel quale sono alloggiati le sfere di *bioring*, da uno schiumatoio e da una lampada U.V.;
- 3 climatizzatori per la termoregolazione dell'acqua delle due vasche di allevamento e della vasca di accumulo;

- 1 quadro elettrico completo dotato di PLC (Programmable Logic Control) per l'impostazione automatica degli orari di circolazione totale e parziale, nonché per l'avvio dei cicli di separazione/concentrazione, il tutto gestito mediante un programma dedicato ed un Personal Computer.



Figura 7. Lato sinistro (A) e destro (B) dell'impianto pilota a circuito chiuso per l'allevamento di copepodi Calanoidi.

L'impianto ha le seguenti modalità di funzionamento (Figura 8):

1. Circolazione totale;
2. Circolazione parziale;
3. Circolazione totale + filtrazione/separazione dei nauplii;
4. Circolazione parziale + concentrazione dei nauplii.

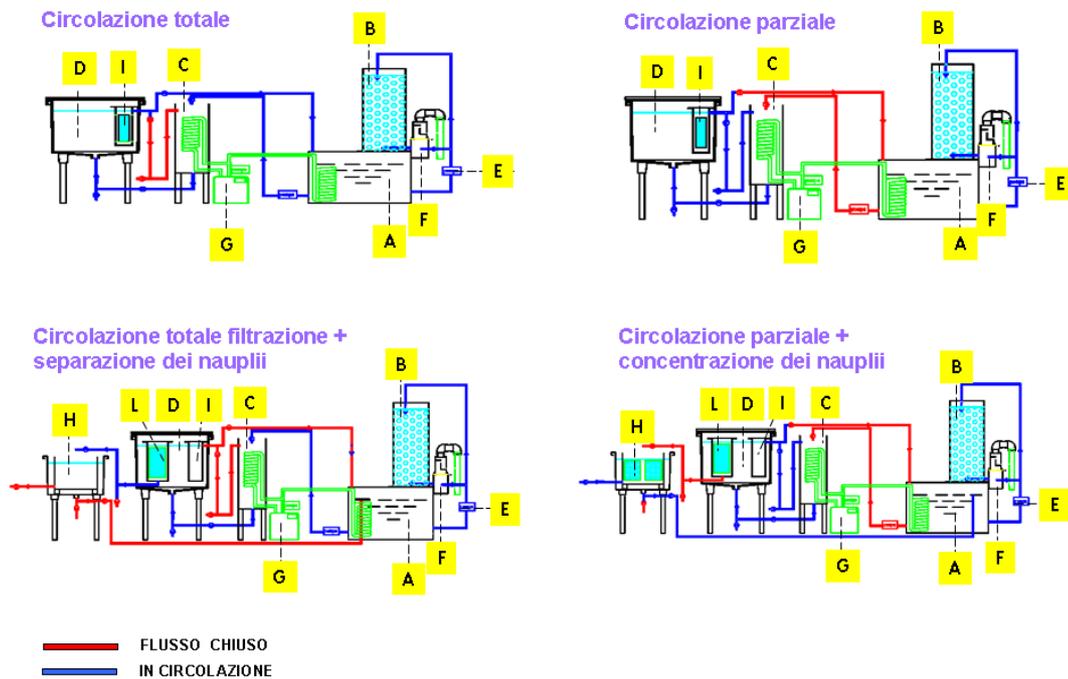


Figura 8. Rappresentazione schematica delle diverse modalità di funzionamento dell'impianto (vedi testo).

1) Circolazione totale

La circolazione totale consente il ricircolo dell'acqua dalla vasca di ripresa-accumulo (A), al modulo di filtrazione (B), al climatizzatore (G), alla pre-vasca (C) e alla vasca di allevamento (D). Il percorso dell'acqua nell'intero sistema a circuito chiuso è il seguente: dalla vasca di ripresa-accumulo l'acqua passa dapprima attraverso la lampada U.V (E). Una piccola parte dell'acqua così sterilizzata è convogliata allo schiumatolo (F), per l'eliminazione di particelle quali proteine, amminoacidi, ecc.; la maggior parte dell'acqua, invece, passa attraverso il filtro biologico per una purificazione biologica ad opera di batteri. L'acqua ritorna quindi alla vasca di ripresa-accumulo e da qui è convogliata prima al sistema di termoregolazione

(climatizzatori) (G), poi alla pre-vasca (C) ed, infine, alla vasca di allevamento (D). Il circolo si conclude con il ritorno dell'acqua alla vasca di ripresa-accumulo (A). La durata minima prevista è di 4 ore al giorno e consente di rinnovare almeno il 35-40% del volume d'acqua di ciascuna vasca di allevamento. Le 4 ore sono state suddivise in due periodi di due ore ed in momenti diversi della giornata. Questo processo comporta l'eliminazione parziale o totale delle alghe e del materiale di rifiuto in sospensione nell'acqua, ma non dei nauplii e delle uova grazie al filtro con maglie da 55 μm (I).

2) Circolazione parziale

Con "circolazione parziale" s'intende il circolo dell'acqua tra la pre-vasca (C) e la vasca di allevamento (D), passando anche per i climatizzatori (G). Questo processo garantisce il mantenimento dell'acqua in un range di temperatura ben definito e non comporta l'eliminazione delle alghe in sospensione nell'acqua. Durante la circolazione parziale si ha anche il circolo dell'acqua dalla vasca di ripresa-accumulo (A), alla lampada U.V. (E), al filtro biologico (B) e poi di nuovo alla vasca di ripresa-accumulo.

3) Circolazione totale + filtrazione/separazione dei nauplii

Con questo processo si ha il trasferimento simultaneo di acqua purificata dalla vasca di ripresa-accumulo (A) a quella di allevamento (D) e di nauplii dalla vasca di allevamento (D), presenti nella porzione delimitata da filtri a maglie di 150/300 μm (L), a quella di raccolta da 200 litri (H). La separazione dei nauplii può quindi essere effettuata soltanto in modalità di circolazione totale.

4) Circolazione parziale + concentrazione dei nauplii

Con questo processo s'intende il trasferimento dell'acqua dalla vasca di raccolta da 200 litri (H) alla vasca di ripresa-accumulo (A) e la conseguente concentrazione dei nauplii in un volume di circa 15 litri. Questa operazione di trasferimento dei nauplii può essere effettuata sia in modalità di circolazione parziale che totale.

Dopo la disinfezione dell'intero impianto con ipoclorito (HClO) e conseguente abbondante risciacquo con acqua dolce, i moduli sono stati riempiti con acqua di mare filtrata a 1 μ m (grazie ad una batteria di filtri con maglie di diverse dimensioni: 100 μ m, carboni attivi, 10 μ m e 1 μ m). Al fine di accelerare la formazione del biofilm di batteri (nitrificanti e nitrosanti) sulla superficie dei *bioring*, e quindi la maturazione del filtro stesso, al filtro biologico sono stati aggiunti due cucchiaini di inoculo batterico in polvere (BIO START – Prodac International: 20 milioni batteri/gr). Si sono verificati quindi i livelli idraulici di equilibrio dei moduli e definiti i flussi per garantire un ricambio giornaliero totale di acqua di circa il 35-40%. Il flusso dell'acqua che dalla pre-vasca s'immette nella vasca di allevamento, è stato regolato ad una portata di 0,8 l/min. Il programma del sistema è stato impostato con 5 ore di circolazione totale giornaliera che, successivamente, sono state ridotte a 4 per garantire una maggiore permanenza delle alghe nella vasca di allevamento per esigenze di alimentazione. Con cadenza giornaliera sono stati puliti i filtri all'interno delle vasche (55, 150/300 μ m) e rilevati i parametri chimico-fisici (temperatura, ossigeno disciolto e salinità) dell'acqua di allevamento, e periodicamente i valori di ammoniaca, nitriti e nitrati. Prima dell'allevamento vero e proprio, sono state

effettuate delle prove di stabulazione e di adattamento dei copepodi in vasca, in base ai parametri chimico-fisici registrati nell'impianto, in base ai flussi e ai ricambi d'acqua e in base ai quantitativi di cibo da fornire. Tali prove sono servite anche a testare l'efficienza del sistema stesso.

4.2 II FASE. SPERIMENTAZIONE DI DIVERSE DIETE ALGALI PER I COPEPODI

TEMORA STYLIFERA E *CENTROPAGES TYPICUS*



Figura 9. Retino Nansen

Lo zooplancton è stato raccolto nell'area costiera del golfo di Napoli, mediante un retino di tipo Nansen (Figura 9) con diametro di apertura di 1m e maglie di 200 μm . Lo zooplancton raccolto è stato poi prontamente trasportato alla Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli ed esaminato allo stereomicroscopio per il riconoscimento delle specie (*Temora stylifera*/*Centropages typicus*) e per la selezione di individui sessualmente maturi. I test per la valutazione della migliore dieta algale, in termini di maggiore produzione e vitalità delle uova dei copepodi Calanoidi oggetto di studio, sono stati effettuati utilizzando bottiglie di vetro Pyrex da 300 ml (Figura 10). In ogni bottiglia sono stati collocati 3 femmine e 2 maschi per *T. stylifera* e 2 femmine e 1 maschio per *C. typicus*. Ogni dieta è stata testata in triplicato e per tre volte. Il primo giorno gli individui sono stati posti in acqua di mare filtrata a 50 μm , contenente quindi fitoplancton naturale, ed incubati a 20°C con fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Dopo 24 ore, gli individui sono stati trasferiti in nuove bottiglie riempite con acqua di mare filtrata (Filtered Sea Water, FSW) a 0,22 μm ed alimentati con le microalghe scelte per i test. I rimanenti 100 ml contenuti nel fondo delle bottiglie sono stati versati in cristallizzatori ed osservati al microscopio per valutare la produzione di uova e di pellet fecali.

I cristallizzatori sono stati poi incubati per ulteriori 48 ore a 20°C per valutare la vitalità delle uova (% uova schiuse). La conta delle uova schiuse è stata effettuata

previa fissazione con alcol etilico. Tali operazioni sono state ripetute giornalmente per 15 giorni.

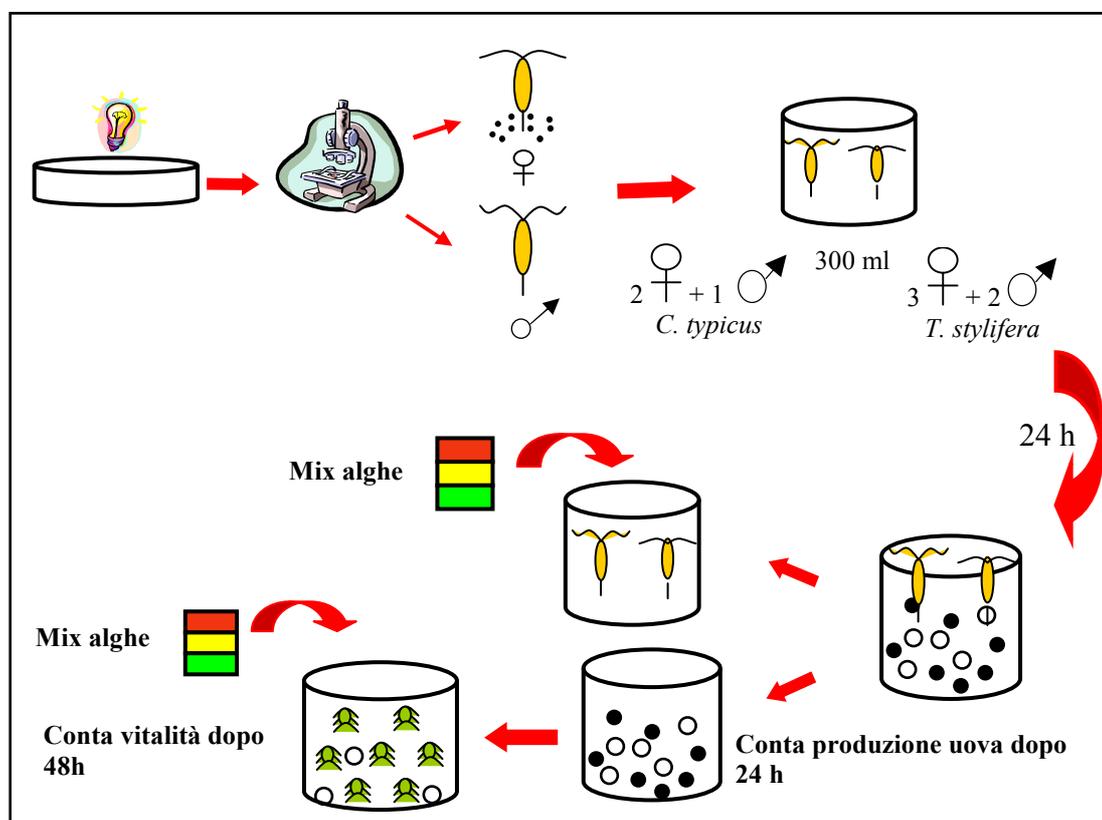


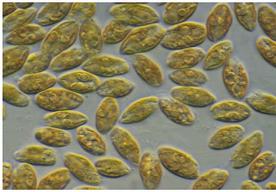
Figura 10. Rappresentazione schematica della sperimentazione di diverse diete algali per i copepodi *Temora stylifera* e *Centropages typicus*.

4.2.1 Alge utilizzate per l'alimentazione di *Temora stylifera* e *Centropages typicus*.

L'alimento offerto ai copepodi è stato scelto in base alle quantità di carbonio, proteine, acidi grassi saturi e polinsaturi, aminoacidi essenziali e altri elementi nutritivi da fornire a tali organismi. Inoltre, sono stati considerati i risultati ottenuti in diversi lavori di ricerca per le specie di copepodi Calanoidi oggetto di studio.

I copepodi Calanoidi richiedono nella loro dieta circa 10 aminoacidi essenziali e non sono capaci di produrre una serie di acidi grassi richiesti per lo sviluppo embrionale. Inoltre è stato osservato che il carbonio sequestrato fino allo stadio CIV è utilizzato per la sintesi proteica (accrescimento somatico); dallo stadio CV, i maschi continuano a sintetizzare proteine, mentre le femmine si preparano a produrre uova e utilizzano il carbonio per la sintesi lipidica (Kleppel *et al.*, 2005). La dimensione e la digeribilità delle microalghe gioca un ruolo importante nell'accrescimento dei nauplii e dei copepoditi e nella produzione di uova vitali da parte dei copepodi adulti.

Le alghe devono avere dimensioni predabili in relazione allo stadio di sviluppo dell'organismo. Fryd e collaboratori (1991) indicano come rapporto ottimale di taglia predatore/preda: $18 \pm 4 \mu\text{m}$ per i nauplii e $22 \pm 1 \mu\text{m}$ per i copepoditi. Da ciò si deduce che per i nauplii le dimensioni della preda devono essere tra 5.8 e 15.4 μm , mentre per i copepoditi tra 18.5 e 60.8 μm . Le alghe impiegate nella sperimentazione sono state gentilmente fornite dal Dott. Francesco Esposito, del gruppo di Ecofisiologia del Laboratorio di Ecologia Funzionale ed Evolutiva della SZN: *Rhodomonas baltica* (RHO; codice FE 202), *Isochrysis galbana* (ISO; codice FE 204), *Tetraselmis suecica* (TETRA; codice FE 205) e *Prorocentrum minimum* (PRO; codice FE 100).



• *Rhodomonas baltica* Karsten *sensu* Zimmerman 1925

Divisione: Chromophyta

Classe: Cryptophyceae

Ordine: Cryptomonadales

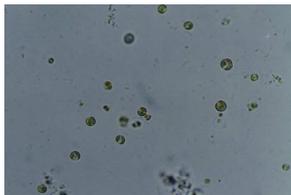
Famiglia: Cryptomonadaceae

Distribuzione: costiero, oceanico; Baltico, Atlantico.

Flagella: 2 leggermente più corti della cellula.

Cloroplasti: 1 o 2, lobati, rosso o giallo oliva.

Sinonimi: *Cryptomonas baltica* (Karsten) Butcher;
Cryptomonas pseudobaltica Butcher.



• *Isochrysis galbana* M. Parke 1949

Divisione: Haptophyta

Classe: Prymnesiophyceae

Ordine: Isochrysidales

Famiglia: Isochrysidaceae

Flagella: 2 lunghi flagelli che emergono da una struttura simile a un esofago.



• *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher, 1959

Divisione: Chlorophyta

Classe: Prasinophyceae

Ordine: Chlorodendrales

Famiglia: Chlorodendraceae

Distribuzione: costiero, oceanico; Baltico, Atlantico.

Flagella: 4 flagelli inseriti in una tasca apicale.

Cloroplasti: 1, ampio a forma di coppa.

Sinonimi: *Platimonas suecica*, Klin 1935



• *Prorocentrum minimum* (J. Pavillard, 1916), J. Schiller 1931-1937

Divisione: Myzozoa

Classe: Dinophyceae

Ordine: Prorocentrales

Famiglia: Prorocentraceae

Distribuzione: Cosmopolita – comunemente lungo la costa occidentale degli USA, Giappone, Messico, lungo le coste europee e nel Mediterraneo.

Flagella: 2 flagelli

Morfologia esterna: La teca è cosparsa di spinette con grandi pori alla base delle spinette e piccoli pori distribuiti su tutta la superficie della teca.

Sinonimi: *Prorocentrum mariae-lebouriae* Parke and Ballantine, *Exuviella mariae-lebouriae* Parke and Ballantine, *Prorocentrum triangulatum* Martin.

Le dimensioni e le principali caratteristiche nutrizionali di tali alghe sono riportate nelle Tabelle III e IV. E' importante sottolineare le differenze dimensionali.

Tabella III. Dimensioni (μm) delle alghe utilizzate.

Dimensioni (μm)	<i>I. galbana</i>	<i>R. baltica</i>	<i>T. suecica</i>	<i>P. minimum</i>
Volume cellulare	63	459	298	1340
Lunghezza	4-6	14.26	10-15	14-22
Larghezza	4.7	8.21	6-8	10-15
Diametro	3-6	7.53	8.3	16

Tabella IV. Valore nutrizionale delle alghe utilizzate.

Valore nutrizionale	<i>I. galbana</i>	<i>R. baltica</i>	<i>T. suecica</i>	<i>P. minimum</i>
$\mu\text{g C l}^{-1}$	1000 ($1.6 \cdot 10^4$ cell/ml)	1000 ($1.6 \cdot 10^4$ cell/ml)	1000 ($2.2 \cdot 10^4$ cell/ml)	1000 ($5.5 \cdot 10^3$ cell/ml)
Proteine (% peso secco)	23-29	57	20-54.36	56
SFA (% acidi grassi totali)	30.3	84.1	21.7-24.7	26
MUFA	11.3	54.3	12.9-16.5	7
PUFA	56.4	33.7	60.5-52.5	66
$\Sigma \omega 3$	46.9	211.8	55	59
$\Sigma \omega 6$	7.1	16.4	6.2	4
EPA 20:5(n-3)	0.9	65.4	4.3	2
DHA 22:6(n-3)	9.9	33.6	0.1	18
Bibliografia	Renaud <i>et al.</i> , 1999	John <i>et al.</i> , 2001; Patil <i>et al.</i> , 2007	Renaud <i>et al.</i> , 1999	Laabir <i>et al.</i> , 2001 ; Beserra I., 2004

Le alghe sono state coltivate secondo procedure standard di salinità (36‰), temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e intensità luminosa (5000 lux) in terreno di coltura f/2 Guillard (Guillard, 1975) e sottoposte ad agitazione mediante aerazione per assicurare una buona omogeneità del mezzo e una continua esposizione alla luce di tutte le cellule. Le colture madri di tutte le alghe e le colture da 2 e 10 l di *P. minimum*, sono state mantenute in una camera termostata alla temperatura di $21 \pm 1^\circ\text{C}$, al fine di assicurare condizioni di crescita stabili.

4.2.2 Miscela e concentrazioni algali utilizzate nella sperimentazione.

La concentrazione di alghe da fornire giornalmente ai copepodi, sia allo stadio adulto che di nauplio, è stata scelta sapendo che il fabbisogno giornaliero di C per i copepodi Calanoidi è di circa 1 mg/l (Ianora and Poulet, 1993). Alcune diete

sperimentate hanno fornito agli organismi una quantità di C esattamente pari ad 1 mg/l, altre hanno superato questa quantità sovra alimentando i copepodi . In Tabella V sono riportate le concentrazioni (cell/ml) delle diete monoalgali testate su *Temora stylifera* e *Centropages typicus*.

Tabella V. Concentrazione delle diete monoalgali testate su adulti di *Temora stylifera* e *Centropages typicus* e rispettivo contenuto in C.

Specie	Concentrazione (cell/ml)	Contenuto in C (mg/l)
<i>Isochrysis galbana</i>	$1.6 \cdot 10^4$	1
<i>Rhodomonas baltica</i>	$3.3 \cdot 10^4$	2
<i>Tetraselmis suecica</i>	$2.5 \cdot 10^4$	1
<i>Prorocentrum minimum</i>	$5.5 \cdot 10^3$	1

Nelle diete plurialgali, le concentrazioni delle alghe utilizzate sono state scelte o in base alle loro dimensioni rapportate al volume cellulare di *P. minimum* - che in letteratura rappresenta il miglior alimento - o aumentando le concentrazioni fino a livelli massimi per valutare un allevamento in condizioni di eccesso di microalghe.

Per *Temora stylifera* (Tabella VI), nella miscela A (MIX A) si è fornito agli animali 1 mg di C/l somministrando *P. minimum* e l'alimentazione è stata arricchita con 5,6 mg di C/l somministrando un eccesso di *I. galbana*. Il totale di C contenuto in MIX A era, quindi, di 6,6 mg C/l. Nella miscela B (MIX B) le concentrazioni di ISO e PRO sono state aumentate di un fattore 10 rispetto a MIX A, fino a fornire una quantità di 66 mg di C/l. Nella miscela C (MIX C) si è fornito agli animali 1 mg di C/l utilizzando *P. minimum* e, tenendo conto che l'alga *T. suecica* è 4,5 volte più piccola di *P. minimum*, l'alimentazione è stata arricchita con una quantità di *T.*

suecica tale da conferire un ulteriore mg/l di C alla miscela. Nella miscela D (MIX D) sono state utilizzate uguali quantità di *P. minimum* ed *I. galbana*, fino a raggiungere 1 mg di C totale. Alla miscela MIX A, è stato poi aggiunto un ulteriore mg di C/l somministrando *T. suecica* (MIX A+T), e 2 mg di C/l somministrando *R. baltica* (MIX A+R).

Tabella VI. Concentrazione delle diete plurialgali testate su adulti di *Temora stylifera* e rispettivo contenuto in C.

Dieta	Specie	Concentrazione (cell/ml)	Contenuto in C (mg/l)
MIX A	<i>Isochrysis galbana</i>	$9 \cdot 10^4$	6.6
	<i>Prorocentrum minimum</i>	$5.5 \cdot 10^3$	
MIX B	<i>Isochrysis galbana</i>	$9 \cdot 10^5$	66
	<i>Prorocentrum minimum</i>	$5.5 \cdot 10^4$	
MIX C	<i>Tetraselmis suecica</i>	$2.5 \cdot 10^4$	2
	<i>Prorocentrum minimum</i>	$5.5 \cdot 10^3$	
MIX D	<i>Isochrysis galbana</i>	$4.2 \cdot 10^3$	1
	<i>Prorocentrum minimum</i>	$4.2 \cdot 10^3$	
MIX A+T	<i>Isochrysis galbana</i>	$9 \cdot 10^4$	7.6
	<i>Prorocentrum minimum</i>	$5.5 \cdot 10^3$	
	<i>Tetraselmis suecica</i>	$2.5 \cdot 10^4$	
MIX A+R	<i>Isochrysis galbana</i>	$9 \cdot 10^4$	8.6
	<i>Prorocentrum minimum</i>	$5.5 \cdot 10^3$	
	<i>Rhodomonas baltica</i>	$3.3 \cdot 10^4$	

Per *Centropages typicus* (Tabella VII), nella miscela 1 (MIX 1) si è fornito agli animali 1 mg di C/l utilizzando *P. minimum* e l'alimentazione è stata arricchita con una uguale quantità di C/l con *R. baltica*. Nelle miscele 2 e 3 (MIX 2 e MIX 3), *T. suecica* è stata utilizzata come arricchitore, accanto a *P. minimum* e *R. baltica*, aumentando la quantità di C da fornire agli organismi di 0,5 mg C/l e 1 mg C/l rispettivamente. Nella miscela 4 (MIX 4), il C fornito è 1,5 volte superiore al normale

e precisamente: 1 mg C/l da parte di *P. minimum*, 1 mg C/l da parte di *R. baltica* e 0,5 mg C/l da parte di *T. suecica*. Nella miscela 5 (MIX 5), *P. minimum* e *I. galbana* sono state impiegate nelle stesse quantità fornendo agli organismi esattamente 1 mg C/l. La miscela 6 (MIX 6) è esattamente uguale alla MIX A per *T. stylifera*. La miscela 7 (MIX 7) fornisce ancora un quantitativo totale di C pari a 2,5 mg C/l, ma questa volta il C in eccesso è fornito da *T. suecica* (0,5 mg C/l) e da *R. baltica* (2 mg C/l). Infine nella miscela 8 (MIX 8), si è fornito agli animali 1 mg di C/l utilizzando *P. minimum* e l'alimentazione è stata arricchita con 2 mg C/l utilizzando *R. baltica*, per un totale di 3 mg C/l.

Tabella VII. Concentrazione delle diete pluri-algali testate su adulti di *Centropages typicus* e rispettivo contenuto in C.

Dieta	Specie	Concentrazione (cell/ml)	Contenuto in C (mg/l)
MIX 1	<i>Rhodomonas baltica</i>	$1.7 \cdot 10^4$	2
	<i>Prorocentrum minimum</i>	$5.5 \cdot 10^3$	
MIX 2	<i>Tetraselmis suecica</i>	$1.25 \cdot 10^4$	1.5
	<i>Prorocentrum minimum</i>	$5.5 \cdot 10^3$	
MIX 3	<i>Tetraselmis suecica</i>	$2.5 \cdot 10^4$	2
	<i>Rhodomonas baltica</i>	$1.7 \cdot 10^4$	
MIX 4	<i>Prorocentrum minimum</i>	$5.5 \cdot 10^3$	2.5
	<i>Tetraselmis suecica</i>	$1.25 \cdot 10^4$	
	<i>Rhodomonas baltica</i>	$1.7 \cdot 10^4$	
MIX 5	<i>Isochrysis galbana</i>	$4.2 \cdot 10^3$	1
	<i>Prorocentrum minimum</i>	$4.2 \cdot 10^3$	
MIX 6	<i>Isochrysis galbana</i>	$9 \cdot 10^4$	6.6
	<i>Prorocentrum minimum</i>	$5.5 \cdot 10^3$	
MIX 7	<i>Rhodomonas baltica</i>	$3.3 \cdot 10^4$	2.5
	<i>Tetraselmis suecica</i>	$1.25 \cdot 10^4$	
MIX 8	<i>Rhodomonas baltica</i>	$3.3 \cdot 10^4$	3
	<i>Prorocentrum minimum</i>	$5.5 \cdot 10^3$	

La somministrazione di diete monospecifiche e plurispecifiche di alghe marine unicellulari (*P. minimum*, *R. baltica*, *I. galbana*, *T. suecica*), ad entrambe le specie di copepodi, è avvenuta in triplicato per tre volte.

4.2.3 Analisi statistiche

Per analizzare l'effetto della qualità dell'alimento (effetto dieta) sul numero di uova deposte/femmina/giorno, sul numero di pellet fecali prodotti dagli individui per giorno, sulla percentuale di uova schiuse, sulla percentuale di uova mangiate e sulla percentuale di sopravvivenza degli adulti, è stato utilizzato il test statistico ANOVA. Per *Temora stylifera*, l'analisi della varianza è stata effettuata considerando tutte e 10 le diete (mono + pluri-algali: Dieta 1=MIX A, Dieta 2= MIX B, Dieta 3= MIX C, Dieta 4= MIX D, Dieta 5= MIX A+T, Dieta 6= MIX A+R, Dieta 7= PRO, Dieta 8= ISO, Dieta 9= RHO, Dieta 10= TETRA).

Per *Centropages typicus*, invece, l'analisi della varianza è stata condotta su due gruppi di dati: in un primo gruppo sono state prese in esame tutte e dodici le diete utilizzate (mono e pluri-algali: Dieta 1= MIX 1, Dieta 2= MIX 2, Dieta 3= MIX 3, Dieta 4= MIX 4, Dieta 5= MIX 5, Dieta 6= MIX 6, Dieta 7= MIX 7, Dieta 8= MIX 8, Dieta 9= PRO, Dieta 10= ISO, Dieta 11=RHO, Dieta 12= TETRA) fino al sesto giorno di alimentazione, e in un secondo gruppo si è considerato l'intero periodo di alimentazione (15 giorni), escludendo però la dieta con *I. galbana* (Dieta 10). Questa suddivisione si è resa necessaria per una incompletezza dei dati ottenuti proprio con tale dieta. E' stato applicato il procedimento GLM (General Linear Model) del SAS (SAS Institute, 2003), dove i fattori, giorno e dieta e la relativa interazione, sono stati considerati fissi. La significatività dei confronti tra i valori medi stimati è stata

verificata con il t di Student. E' stata inoltre effettuata la correlazione (proc CORR) del numero di uova prodotte con la percentuale di uova schiuse e con il numero di uova mangiate sia per *T. stylifera* che per *C. typicus*.

4.3 III FASE: ALLEVAMENTO INTENSIVO DEI COPEPODI *TEMORA STYLIFERA* E *CENTROPAGES TYPICUS* NEL SISTEMA A CIRCUITO CHIUSO CON L'IMPIEGO DELLE DIETE SELEZIONATE.

L'inoculo in vasca di *Temora stylifera* è consistito in 760 adulti, 250 copepoditi e 450 nauplii inizialmente allevati in becker da 5 litri.

In base ai risultati della fecondità e vitalità dei copepodi ottenuti con i test di alimentazione effettuati in piccoli volumi, per l'allevamento intensivo di *T. stylifera* nell'impianto pilota a circuito chiuso si è deciso di utilizzare la seguente dieta: *Prorocentrum minimum* ad una concentrazione di $5,5 \cdot 10^3$ cell/ml ed *Isochrysis galbana* ad una concentrazione di $9 \cdot 10^4$ cell/ml, e successivamente modificata (vedi Analisi dei risultati).

L'inoculo in vasca di *Centropages typicus*, invece, è stato effettuato con circa 970 adulti, 620 copepoditi e 7.500 nauplii, sempre allevati dapprima in becker. Per *C. typicus*, invece, è stata utilizzata una dieta trialgale, composta cioè da: *Tetraselmis suecica* ad una concentrazione di $1,25 \cdot 10^4$ cell/ml, da *Prorocentrum minimum* ad una concentrazione di $5,5 \cdot 10^3$ cell/ml ed *Isochrysis galbana* ad una concentrazione di $3,4 \cdot 10^4$ cell/ml.

Con cadenza giornaliera sono stati rilevati i parametri chimico-fisici (temperatura, ossigeno disciolto e salinità) dell'acqua di allevamento. La temperatura non ha subito variazioni di rilievo nel corso della sperimentazione, mantenendosi intorno ad un valore medio di $20 \pm 1^\circ\text{C}$ per *T. stylifera* e $17 \pm 1^\circ\text{C}$ per *C. typicus*, grazie ai tre climatizzatori impostati a 20°C e a 17°C per le rispettive specie. Anche la temperatura ambiente impostata a $18-20^\circ\text{C}$ ha garantito il buon mantenimento della

temperatura dell'acqua in vasca. L'ossigeno si è mantenuto intorno ad un valore di $5,7 \pm 0,09$ ppm e per la salinità si è rilevato un valore medio di $38,6 \pm 0,13$ mg/l per tutto il periodo di monitoraggio. I valori registrati per ammoniaca, nitriti e nitrati nel corso della sperimentazione sono stati di circa 0,03 mg/l per ammoniaca (NH_3), 0,03 per nitriti (NO_2^-) e 0,2 per nitrati (NO_3^-), valori accettabili per la fisiologia dei copepodi allevati. Per entrambe le specie allevate è stato applicato un fotoperiodo di ore luce:buio di 12:12.

Giornalmente si è proceduto ad una stima della quantità di alghe presenti in vasca, prima e dopo la circolazione totale, per valutare rispettivamente la quantità di alghe ingerite dai copepodi e per calcolare la quantità di alghe da integrare. A giorni alterni si è proceduto alla sifonatura del fondo della vasca di allevamento: ciò ha consentito l'allontanamento di individui morti e di pellet fecali che, essendo materiale organico, avrebbero potuto innalzare i valori di NH_3 in vasca. L'acqua sifonata è stata filtrata a $30 \mu\text{m}$ per consentire il recupero delle uova precipitate sul fondo della vasca, mediante successive decantazioni in becker. Le uova così recuperate, sono state poste in boccioni da 10 litri e fatte schiudere.

Dopo 48 ore, i nauplii sono stati raccolti e nuovamente immessi nella vasca di allevamento. Periodicamente è stato effettuato un censimento degli individui in vasca, con una stima approssimativa del numero di adulti, copepoditi e nauplii nel seguente modo: in due punti opposti della vasca (denominati "emisfero sud" in prossimità dell'operatore ed "emisfero nord" lontano dall'operatore) sono stati prelevati, nell'intera colonna d'acqua, rispettivamente 10 litri di acqua. Tale acqua è stata poi filtrata a $40 \mu\text{m}$ per recuperare tutte le taglie di copepodi. Contando il numero di individui raccolti e con i dovuti calcoli, si è ottenuto il valore complessivo

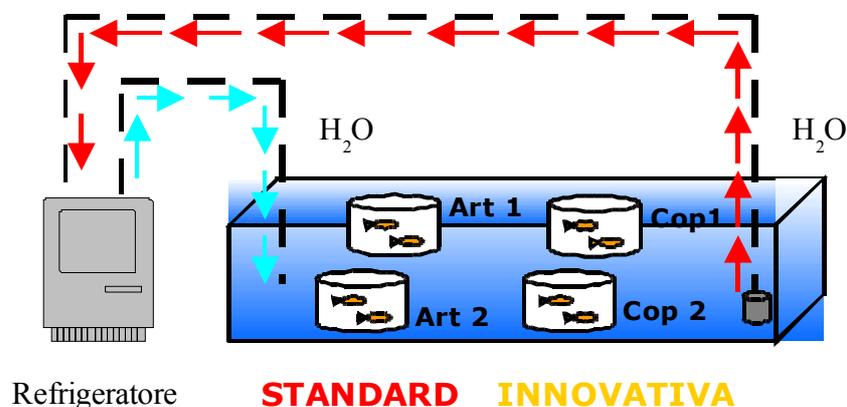
degli animali nella vasca da 500 litri. Settimanalmente è stata effettuata la concentrazione e separazione automatica dei nauplii: 24 ore prima di tale operazione è stata accesa la luce ad immersione all'interno del filtro da 155 μm nella vasca di allevamento, per sfruttare la fototassia dei nauplii ed attirarli nel filtro. Con la separazione, i nauplii sono stati trasferiti nella vasca di raccolta da 200 litri e con la concentrazione sono stati concentrati in un piccolo volume sul fondo del filtro, corrispondente a circa 15 litri. Tale volume è stato raccolto manualmente in un becker e filtrato a 40 μm . Il filtrato è stato poi portato ad un volume di 100 ml e la conta è stata effettuata su 5 ml distribuiti in gocce su una piastra di plexiglass ed osservate allo stereomicroscopio. Sono stati contati i nauplii presenti in ogni singola goccia ed il numero totale è stato moltiplicato per 20. Il valore così ottenuto, ha rappresentato il totale dei nauplii raccolti con la concentrazione.

4.4 IV FASE: TEST DI APPETIBILITÀ DEL COPEPODE *TEMORA STYLIFERA* SU LARVE DI ORATA *SPARUS AURATA* LINNAEUS, 1758.

I test di appetibilità su larve di orata *Sparus aurata* L., hanno visto l'impiego di nauplii e copepoditi di *Temora stylifera*, allevati in un impianto a circuito chiuso. Il passo successivo è stato quello di analizzare il contenuto in acidi grassi non solo di tali larve, ma anche di quelle alimentate ad *Artemia*, del copepode *T. stylifera* e di *Artemia salina* e confrontare i valori tra di loro.

Larve di orata di 34 giorni di età sono state gentilmente fornite dalla Società Panittica Pugliese di Torre Canne di Fasano (BR). Appena giunte in laboratorio, le larve sono state poste in due vaschette a circuito aperto di 15 litri ciascuna con acqua filtrata ad 1 µm. Dopo circa 12 ore di acclimatazione, dalle due vaschette si sono raccolte in modo random 12 larve di 35 giorni di età e poste in 2 cristallizzatori da 200 ml (6 larve per cristallizzatore), nei quali si sono effettuati i test di appetibilità: alimentazione standard (*Artemia salina*) vs alimentazione a copepodi (*Temora stylifera*) (Figura 11).

Figura 11. Schema e parametri di allevamento delle larve di *Sparus aurata* L. per i test di appetibilità.



O ₂ disciolto: 6 ppm	Densità larvale 6/200 ml
Salinità: 35±1 ‰	Densità di preda: 30 prede/ml (Artemia: nauplii/metanauplii; Copepodi NIII-CII)
Temperatura: 17-19°C	
Ricambio d'acqua giornaliero: 50%	Dal 45°gg: 10% micropellettato

La sperimentazione ha avuto una durata di 20 giorni ed il rapporto iniziale di ore di luce:buio è stato di 17:7. Parametri, quali ossigeno e temperatura sono stati misurati giornalmente, effettuando anche una sifonatura del cristallizzatore per eliminare i pellet fecali ed eventuali larve morte ed osservando il comportamento delle larve stesse durante la predazione. Le *Artemia* sono state fornite sia come nauplii (AF-type, INVE, Belgium), cioè immediatamente dopo la schiusa, che sottoforma di metanauplii arricchiti in *Isochrysis galbana*. Per l'alimentazione delle larve a copepodi, sono stati utilizzati copepodi agli stadi di NIII-CII, in sostituzione dei nauplii/metanauplii di *Artemia*. Per entrambe le diete è stata utilizzata una concentrazione di 30 prede/ml per due volte al giorno, fino a completo svezzamento con pellettato (54° giorno).

Dal 45° giorno di vita è iniziato lo svezzamento con micropellettato in una concentrazione crescente del 10%. Al 45°, 47°, 49° e 51° giorno è stata prelevata una larva da ciascun cristallizzatore, pesata, fotografata, congelata a -80 °C e liofilizzata per successive analisi degli acidi grassi polinsaturi. Tutte le larve sopravvissute fino al termine della sperimentazione (54° giorno), sono state congelate e liofilizzate per le stesse analisi

4.4.1 Analisi degli acidi grassi polinsaturi (PUFA)

Analisi del contenuto in acidi grassi polinsaturi sono state condotte su nauplii e metanauplii di *Artemia*, su *Temora stylifera* allo stadio di NIII-CII e su larve di orata alimentate ad *Artemia* e a copepodi.

4.4.2 Metodi di campionamento

I nauplii di *Artemia*, appena schiusi, sono stati concentrati su un filtro di 40 µm, risciacquati con acqua di mare filtrata a 1 µm, raccolti con una pipetta di plastica e trasferiti in una Falcon.

I copepodi ottenuti dalla concentrazione automatica del sistema di allevamento, sono stati concentrati su un filtro di 40 µm e trasferiti in un cristallizzatore. Mediante l'ausilio di un microscopio invertito e di una pipetta Pasteur, i copepodi sono stati contati singolarmente e traferiti in una Falcon da 15 ml immersa in ghiaccio. Ciò ha consentito l'anestetizzazione dei copepodi, che si sono concentrati sul fondo della Falcon, permettendo così l'allontanamento di quasi tutto il surnatante. Tutti i campioni utilizzati per le analisi degli acidi grassi sono stati prontamente congelati a -80 °C e liofilizzati (Edwards FREEZE DRYER "Modulyo").

4.4.3 Estrazione di lipidi ed analisi

I campioni liofilizzati sono stati dapprima triturati, poi sospesi in una soluzione di cloroformio-metanolo (2:1 v/v, 3 x 0,5 mL) ed i lipidi totali estratti mediante il metodo di Folch *et al.* (1957) modificato. I campioni in eppendorf sono stati sonicati per 1 min, centrifugati per 1 min a 3000 rpm ed il surnatante trasferito in una nuova eppendorf. Le fasi organiche ricombinate sono state quindi concentrate in corrente di

azoto: gli estratti grezzi così ottenuti sono stati ripresi con etere etilico e metilati con diazometano (CH_2N_2) per 60 min a r.t.. Al termine della reazione il solvente è stato allontanato sotto azoto ed i residui sospesi in *n*-esano per le analisi mediante gascromatografo/spettrometro di massa (GC-MS; Focus GC-Polaris Q, Thermo), dotato di una colonna 30 m x 0.25mm ID x 0.25 μm microfilm (5%.diphenyl/95% dimethyl polysiloxane). Il gradiente di temperatura seguito prevedeva i seguenti step: temperatura iniziale 50°C, mantenuta per 2,5 min, seguiva un gradiente di temperatura di 10°C min⁻¹ fino a 100°C e di 5°C min⁻¹ fino a 290°C, mantenendo la temperatura finale per ulteriori di 5 min.

I picchi sono stati integrati mediante il software Xcalibur ed identificati tramite comparazione con i tempi di ritenzione e degli spettri di massa dei singoli acidi grassi metilati contenuti nella miscela standard PUFA-1 Marine Source (SUPELCO #47033).

5. ANALISI DEI RISULTATI

5.1 Diete algali

Nella seconda metà degli anni ottanta, nuove prospettive hanno indirizzato la ricerca sulla composizione biochimica del plancton. Tale interesse proveniva da studi sull'acquacoltura e sulla necessità di determinare la qualità nutrizionale delle alghe per organismi acquatici (Walne, 1974; Webb and Chu, 1982; Whyte, 1987; Sicko-Goad and Andersen, 1991; Brown and Jeffrey, 1992). Nella maggior parte di tali studi, il valore alimentare del fitoplancton era valutato attraverso il ritmo di crescita e la percentuale di sopravvivenza delle larve di pesce, la produzione di larve di molluschi e il loro successo di colonizzazione. E' stato suggerito che le varie specie di alghe che compongono il fitoplancton, variano in termini di valore nutrizionale e che una dieta algale composta da due o più specie rappresenta una migliore risorsa di cibo rispetto ad una dieta monoalgale (Epifanio, 1979; Chu *et al.* 1982; Brown, 1991; Brown and Jeffrey, 1992). L'importanza della qualità dei lipidi nella dieta fu scoperta nell'allevamento acquacolturale dei pesci. In particolare, gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena (PUFA) della serie $\omega 3$ e $\omega 6$, come l'acido arachidonico (AA), l'acido eicosapentaenoico (EPA), e l'acido docosaesaenoico (DHA), risultarono essere cruciali per la crescita e la sopravvivenza dei primi stadi larvali di molte specie di pesci e molluschi bivalvi (Watanabe *et al.*, 1983). Questi PUFA a lunga catena sono dei componenti vitali delle membrane cellulari e svolgono importanti funzioni regolatorie in tutte le cellule, soprattutto nella riproduzione (Ahlgren *et al.*, 1997).

Nel presente studio è stato riscontrato che sia le diete mono-algali a base di *P. minimum* e *R. baltica*, che trattamenti con miscele di alghe determinano un effetto

positivo sulla riproduzione e sopravvivenza di *Temora stylifera* e *Centropages typicus*. Sebbene sia risaputo che molte specie di copepodi in mare si nutrono di diatomee, tali alghe sono state escluse dalla nostra ricerca. Infatti, numerosi studi hanno riportato che alcune specie di diatomee inducono la mortalità delle uova bloccando l'embriogenesi (Poulet *et al.*, 1995; Ianora *et al.*, 1996; Uye, 1996; Ban *et al.* 1997). Il gruppo di lavoro della dottoressa Ianora ha riscontrato che le diatomee producono metabolici tossici (aldeidi), i quali causano mortalità e/o inibiscono la riproduzione dei copepodi (Ianora *et al.*, 2003). L'effetto negativo delle diatomee sul successo di schiusa dei copepodi, però, potrebbe essere annullato o ridotto se si fornisce una dieta a non diatomee. Tuttavia, recenti studi (Buttino *et al.*, 2008; Ceballos and Ianora, 2003) hanno mostrato che le diatomee influiscono anche sulla vitalità degli adulti di copepodi. Miralto e collaboratori (1999) riportano che in *T. stylifera* selvatica, una successione di alta e bassa vitalità delle uova di tale copepode coincideva con una alta e bassa biomassa di diatomee in mare. La quantità di evidenze sull'impatto negativo delle diatomee sulla biologia riproduttiva dei copepodi (Poulet *et al.*, 1995; Ban *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999, Ianora *et al.*, 2004) indica chiaramente che è tempo di rielaborare la classica visione sull'interazione diatomee-copepodi.

Kjørboe e collaboratori (1985) hanno suggerito che i lipidi sono importanti per la produzione di uova, mentre le proteine sono importanti per la crescita somatica dei nauplii e copepoditi. La produzione di uova è energeticamente dispendiosa. Le femmine devono sintetizzare materiale genetico ed oociti e fornire un tuorlo nutrizionalmente adeguato. L'embrione deve ricavare tutto il suo nutrimento dal tuorlo stesso. Un'alimentazione adeguata è essenziale affinché le femmine possano

sopperire alle crescenti richieste energetiche per la produzione di uova (Harrison, 1990; Jónasdóttir, 1994). Tale adeguatezza si riferisce specialmente alla composizione in acidi grassi delle alghe, espressi come $\omega 3$ e $\omega 6$ e come rapporto di acidi grassi C20:C22. Specie algali con bassi livelli di PUFA frequentemente hanno dimostrato di essere inadeguate come diete unialgali, laddove specie con elevate concentrazioni di PUFA hanno dimostrato di essere una media/buona fonte di cibo se usate singolarmente (Enright *et al.*, 1986; Sargent *et al.*, 1987; Desvillettes *et al.*, 1997; Reus and Poulsen, 2002).

La presentazione dei risultati per la valutazione della migliore dieta algale nella crescita dei copepodi *Temora stylifera* e *Centropages typicus* in termini di produzione e vitalità delle uova, produzione di pellet fecali, percentuale di uova mangiate e percentuale di adulti sopravvissuti, è di seguito riportata separatamente per le due specie.

5.2 *Temora stylifera*.

Dai risultati dell'analisi della varianza riportati nelle Tabelle VIII-XII si evince la presenza di una interazione significativa giorno*dieta per i parametri: uova prodotte, pellet fecali e uova mangiate, indicando che tali parametri sono influenzati dal tipo di dieta somministrata in misura diversa a seconda del giorno. I singoli fattori, giorno e dieta, risultano influenzare in maniera altamente significativa tutti i parametri considerati.

Tabella VIII. ANOVA per il parametro produzione di uova/femmina/giorno del copepode *Temora stylifera*.

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	13	29937.08	2302.85	5.46	<.0001
Dieta	9	33509.82	3723.31	8.83	<.0001
Giorno*Dieta	117	64549.31	551.70	1.31	0.0433
Errore residuo	233	98269.56	421.76		

Tabella IX. ANOVA per il parametro produzione pellet fecali/individuo/giorno del copepode *Temora stylifera*.

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	13	29022.61	2232.51	7.55	<.0001
Dieta	9	68516.13	7612.90	25.73	<.0001
Giorno*Dieta	117	81497.04	696.55	2.35	<.0001
Errore residuo	233	68942.08	295.88		

Tabella X. ANOVA per il parametro percentuale di uova schiuse per giorno del copepode *Temora stylifera*.

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	13	44901.80	3453.98	3.07	0.0003
Dieta	9	32637.64	3626.40	3.22	0.0011
Giorno*Dieta	117	135979.15	1162.21	1.03	0.4136
Errore residuo	233	262231.48	1125.46		

Tabella XI. ANOVA per il parametro percentuale di uova mangiate per giorno dal copepode *Temora stylifera*.

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	13	20110.77	1546.98	5.04	<.0001
Dieta	9	54494.54	6054.95	19.72	<.0001
Giorno*Dieta	117	86347.71	738.014	2.40	<.0001
Errore residuo	233	71538.41	307.03		

Tabella XII. ANOVA per il parametro percentuale di adulti sopravvissuti per giorno del copepode *Temora stylifera*.

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	13	88243.03	6787.92	19.23	<.0001
Dieta	9	107605.45	11956.16	33.87	<.0001
Giorno*Dieta	117	51070.43	436.49	1.24	0.0876
Errore residuo	233	82240.99	352.96		

L'interazione giorno*dieta per il parametro numero uova prodotte/femmina/giorno può essere spiegata principalmente attraverso la diversa risposta determinata dalla Dieta 6 (MIX A+R) nel periodo sperimentale considerato. Dalla Figura 12 e dalla Tabella XIII , infatti, si evidenzia che al 3° giorno la Dieta 6 determina un valore di uova prodotte estremamente basso rispetto alle altre diete ($P<0,01\div 0,001$). Dal 4° giorno l'andamento si inverte raggiungendo, all'8° giorno, il valore significativamente più elevato nei confronti delle altre diete ($P<0,05\div 0,001$).

Figura 12. Numero di uova prodotte/femmina/giorno per ogni dieta testata (mono e pluri-algale) per l'intero periodo di sperimentazione. Il valore medio della produzione registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

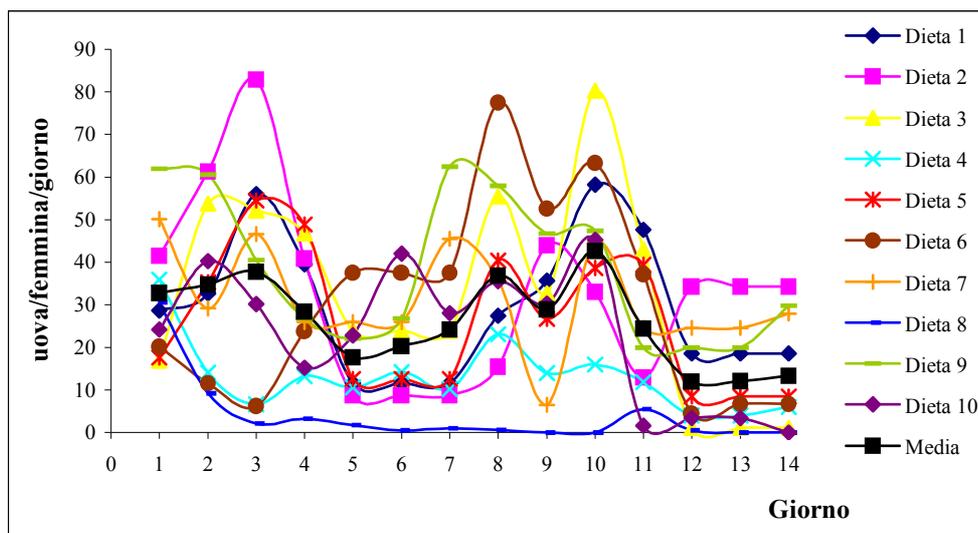


Tabella XIII. No. uova prodotte/femmina/giorno per *Temora stylifera*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e - indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Confronto tra diete	Giorno													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1-4			++							+				
1-6			++					-						
1-7							-							
1-8			++	+					+	+++				
1-9	-													
1-10											+			
2-3								-						
2-4		++	+++											
2-6		++	+++					-						
2-7			+				-							
2-8		++	+++	+					+					
2-9			+				--	-						
2-10			++											
3-4		+	++	+						++				
3-5										+				
3-6		+	++											
3-8		+	++	+				++		+++				
3-9	---						--							
4-5			--	-										
4-6								-		-				
4-7			--				-							
4-9		--	--				--	-						
5-6			++					-						
5-8			++	++				+		+				
5-9	--						--							
5-10							-				+			
6-7			--					+						
6-8					+	+	+	+++		++				
6-9		--	--											
6-10								+						
7-8			++				++	+		++				
8-9			-				---	---		--				
8-10										--				
9-10	-													

Anche il numero di pellet fecali/individuo/giorno prodotti da *T. stylifera* in risposta alla Dieta 6 (MIX A+R) nei 15 giorni di sperimentazione manifesta lo stesso andamento del numero di uova deposte: il valore più basso si registra al 3° giorno e quello più elevato all'8°.

Inoltre, un comportamento particolare è determinato anche dalla Dieta 5 (MIX A+T) che, soprattutto nei primi giorni di somministrazione induce una produzione di pellet inferiore rispetto a quasi tutte le altre diete ($P < 0,01 \div 0,001$). Il picco massimo di produzione si registra solo all'8° giorno (Figura 13 e Tabella XIV).

Figura 13. Produzione di pellet fecali/individuo/giorno per ogni dieta testata (mono e pluri-algale) per l'intero periodo di sperimentazione. Il valore medio della produzione di pellet fecali registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

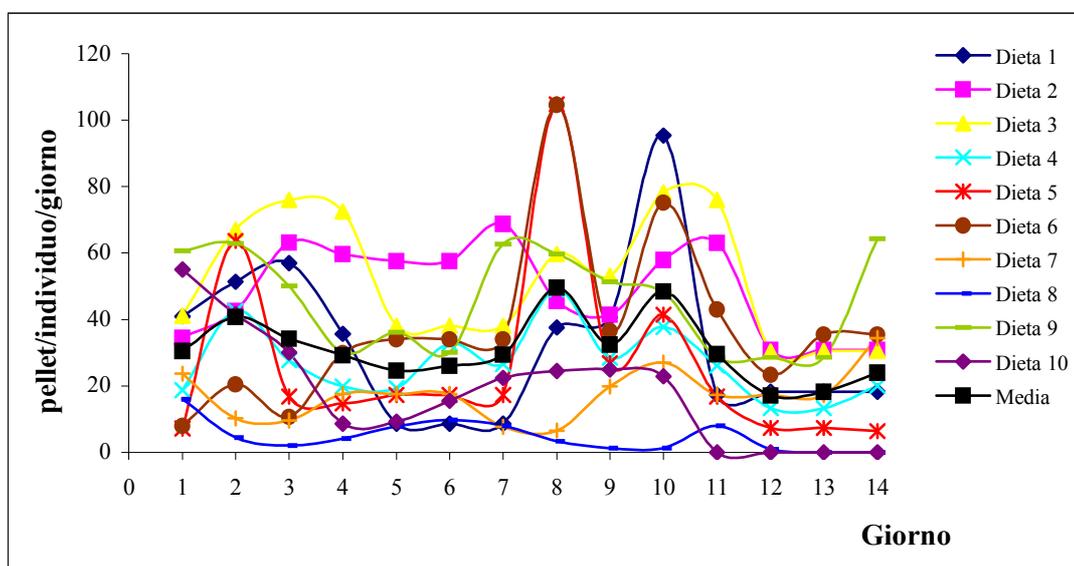


Tabella XIV. No. pellet fecali/individuo/giorno per *Temora stylifera*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e - indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Confronto tra diete	Giorno													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1-2					--	--	---				-			
1-3				-		-	-				--			
1-4										++				
1-5	+		++					---		++				
1-6	+	+	++					---						
1-7		++	++					+		+++				
1-8		++	++					+	+	+++				
1-9							--			+				-
1-10										+				
2-3							+							
2-4			+	++	++		+							
2-5			++	++	++	+	++	---			+			
2-6			++				+	---						
2-7		+	++	++	++	+	+++	++			+			
2-8		++	+++	++	++	++	+++	++	+	+	+			
2-9				+			++							
2-10			+	++	++	+					+			
3-4			++	+						+	+			
3-5	+		+++	+++				-		+	++			
3-6	+	++	+++	+				-			+			
3-7		+++	+++	++			+	++	+	+	++			
3-8		+++	+++	+++	+		+	+++	++	+++	++			
3-9				++							+			-
3-10			+	+++				+		+	+++			
4-5								---						
4-6								---		-				
4-7		+						+						
4-8		++						+		+				
4-9	--						-							-
4-10	--													
5-6		++								-				
5-7		++						+++						-
5-8		+++						+++		+				
5-9	--		-				--	+						---
5-10	--							+++						
6-7								+++		++				
6-8								+++	+	+++	+			
6-9	--	--	-				-	+						
6-10	--							+++		+	+			
7-9	-	--	--				--	-	-					-
7-10	-	-												
8-9	--	---	--				--	---	--	-				-
8-10	--	--	-											
9-10							-	+						+

L'interazione giorno*dieta per il parametro percentuale di uova mangiate è da imputare principalmente alla Dieta 1 (MIX A) e alla Dieta 8 (ISO).

La Dieta 1 fa rilevare un numero di uova mangiate significativamente elevato ($P < 0,001$) al 5°, 6° e 7° giorno di somministrazione, al contrario delle altre diete che non evidenziano grandi cambiamenti rispetto ai giorni precedenti ($P < 0,05 \div 0,01$). Inoltre, la Dieta 8 che al 4° e 5° giorno fa registrare il 64-65 % di uova mangiate, al 9° e al 10° giorno sembra soddisfare a pieno le richieste nutritive di *T. stylifera* (no. di uova mangiate= 0) E' da evidenziare, infine, che la Dieta 2 (MIX B) nell'ultimo periodo di sperimentazione (10° e 11° giorno), ha determinato valori più elevati rispetto alle altre (Figura 14 e Tabella XV).

Figura 14. Percentuale di uova mangiate per ogni dieta testata (mono e pluri-algale) per l'intero periodo di sperimentazione. Il valore medio registrato è interpolato dalla linea nera.

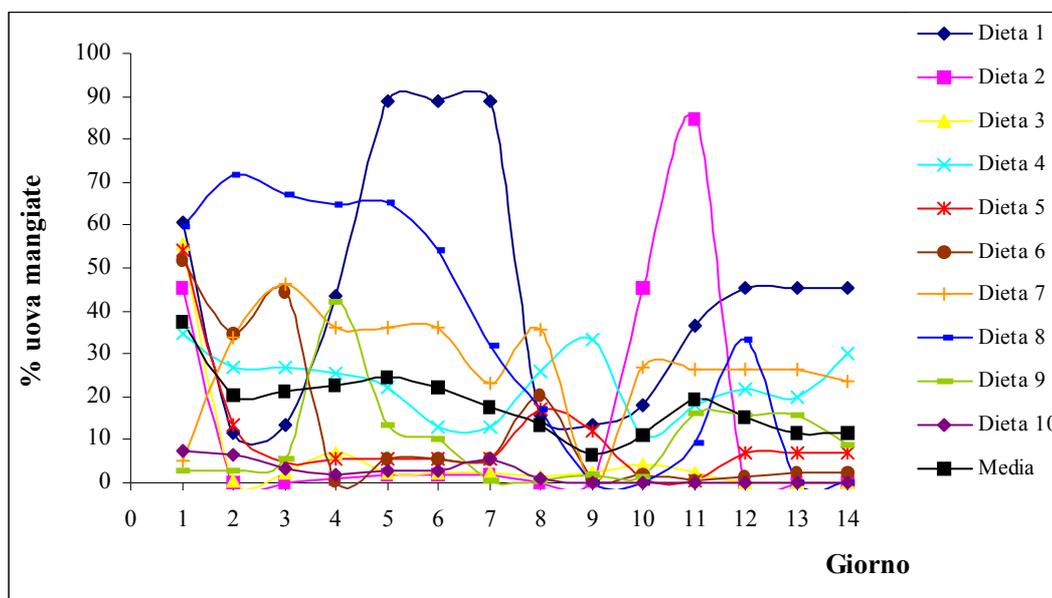


Tabella XV. Percentuale di uova mangiate da *Temora stylifera*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e - indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Confronto tra diete	Giorno													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1-2				+	+++	+++	+++				-	+	+	+
1-3				+	+++	+++	+++					+	+	+
1-4					+++	+++	+++							
1-5				+	+++	+++	+++				+	+	+	+
1-6			-	+	+++	+++	+++				+	+	+	+
1-7	++		-		+++	+++	+++							
1-8		---	--			+	+++						+	+
1-9	+++				+++	+++	+++							+
1-10	++			+	+++	+++					+	+	+	+
2-3											++			
2-4											+			
2-5										+	+++			
2-6		-	-							+	+++			
2-7	+	-	-	-	-	-		-			+			
2-8			---	---	---	--	-			+	+			
2-9	+			-						+	++			
2-10	+									+	++			
3-4									-					
3-6			-											
3-7	++		-	-	-	-		-						
3-8		---	---	---	---	--	-							
3-9	++			-										
3-10	++													
4-6									+					
4-7									+					
4-8		-	-	-	-	-			+					
4-9	+								+					
4-10									+					
5-6			-											
5-7	+		-	-	-	-								
5-8		---	---	---	---	--								
5-9	++			-										
5-10	+													
6-7	+			-	-	-								
6-8		-		---	---	--						-		
6-9	++	+	+	-										
6-10	+	+	+											
7-8	-	-		-	-									
7-9		+	+					+						
7-10			+	+	+	+								
8-9	+++	+++	+++		+	+	+							
8-10	++	+++	+++	+++	++	+								
9-10				+										

L'andamento dei parametri vitalità delle uova e percentuale di adulti sopravvissuti è riportato nelle Figure 15 e 16.

Figura 15. Vitalità delle uova (% uove schiuse) per ogni dieta testata (mono e pluri-algale) per l'intero periodo di sperimentazione. Il valore medio della vitalità registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

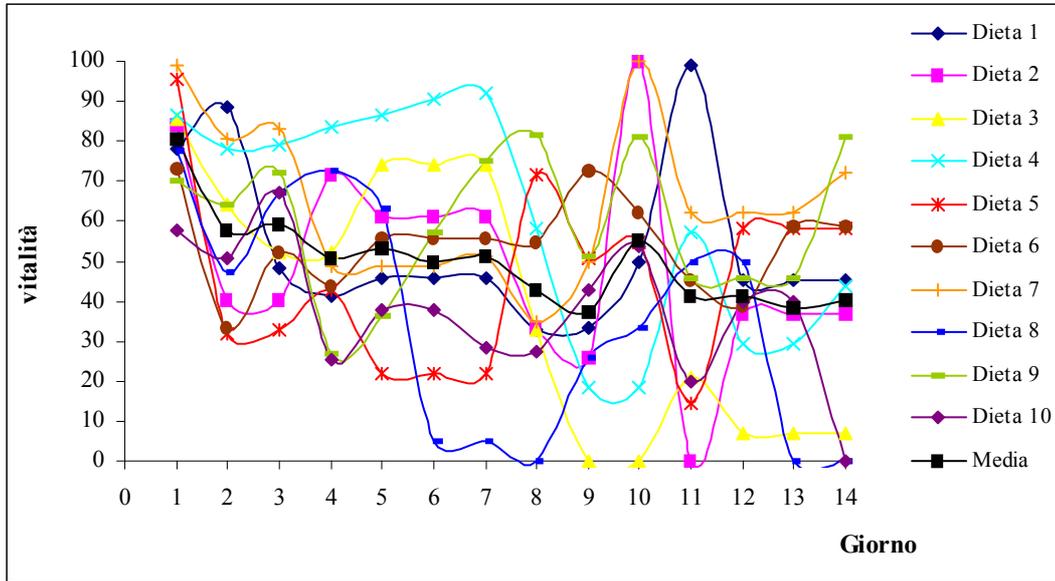
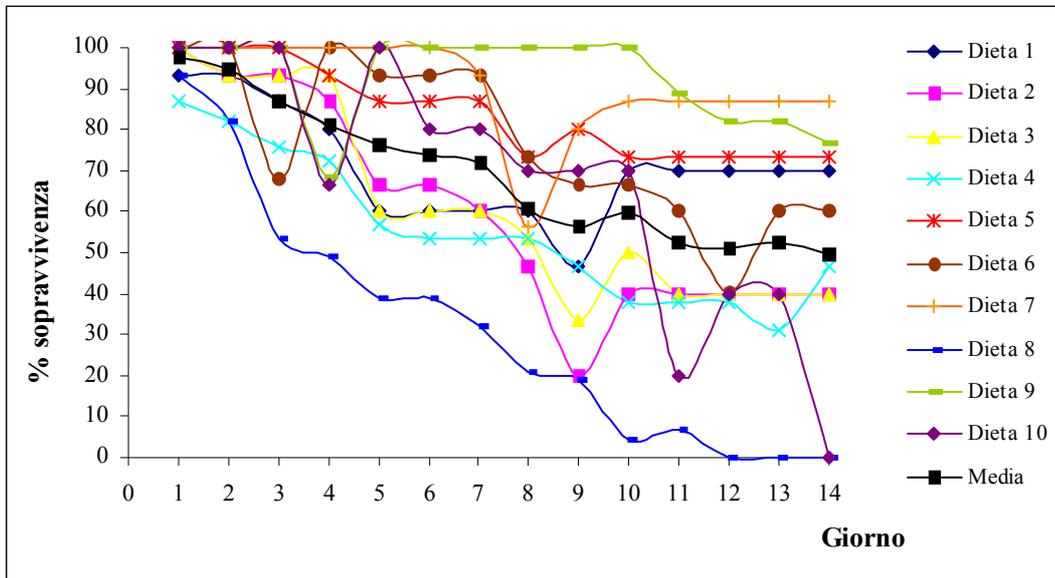


Figura 16. Percentuale di adulti sopravvissuti per ogni dieta testata (mono e pluri-algale) per l'intero periodo di sperimentazione. Il valore medio registrato ogni giorno è interpolato dalla linea nera.



In Tabella XVI sono riportati i valori medi stimati e la deviazione standard dei parametri produzione di uova, vitalità delle stesse (% schiusa), sopravvivenza degli adulti, produzione di pellet fecali e percentuale delle uova mangiate come risultato delle diete mono e pluri-algali testate su adulti di *T. stylifera*, indipendentemente dal giorno.

Tabella XVI. Risultati delle diete mono e pluri-algali testate su *T. stylifera* (valore medio \pm ds) in termini di produzione di uova (uova/femmina), di pellet fecali (Pf/individuo), vitalità delle uova (% schiusa), percentuale di sopravvivenza degli individui e percentuale delle uova mangiate.

Dieta 1= MIX A (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + ISO $9 \cdot 10^4$); **Dieta 2**= MIX B (PRO $5.5 \cdot 10^4$ + ISO $9 \cdot 10^5$); **Dieta 3**= MIX C (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + TETRA $2.5 \cdot 10^4$); **Dieta 4**= MIX D (PRO $4.2 \cdot 10^3$ + ISO $4.3 \cdot 10^3$); **Dieta 5**= MIX A+T (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + ISO $9 \cdot 10^4$ + TETRA $2.5 \cdot 10^4$); **Dieta 6**= MIX A+R (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + ISO $9 \cdot 10^4$ + RHO $3.3 \cdot 10^4$); **Dieta 7**= PRO $5.5 \cdot 10^3$; **Dieta 8**= ISO $1.6 \cdot 10^4$; **Dieta 9**= RHO $3.3 \cdot 10^4$; **Dieta 10**= TETRA $2.5 \cdot 10^4$.

<i>Parametri</i>	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
Uova/femmina	32,68 \pm 16,93	36,71 \pm 25,14	34,01 \pm 22,50
Pf/individuo	37 \pm 27	54,80 \pm 21,51	57,12 \pm 13,78
Vitalità	84,08 \pm 13,18	64,12 \pm 23,02	77,24 \pm 23
% sopravvissuti	61,33 \pm 18,03	47,11 \pm 35,41	54,22 \pm 28,60
% uova mangiate	28,32 \pm 14,80	8,87 \pm 16,8	6,02 \pm 13,89

<i>Parametri</i>	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6
Uova/femmina	17,30 \pm 8,86	26,53 \pm 16,43	34,88 \pm 25,47
Pf/individuo	28,47 \pm 12,08	28,46 \pm 28,08	41,31 \pm 26,42
Vitalità	82 \pm 11,43	55 \pm 30	64,24 \pm 21,01
% sopravvissuti	50,66 \pm 20,16	82,67 \pm 11,49	73,33 \pm 24,56
% uova mangiate	26,2 \pm 8,7	9,78 \pm 13,1	10,82 \pm 15

<i>Parametri</i>	Dieta 7	Dieta 8	Dieta 9	Dieta 10
uova/femmina	31,27 \pm 11,92	3,93 \pm 8,09	38,77 \pm 17,05	22,99 \pm 15,83
P.f./individuo	17,41 \pm 7,60	4,79 \pm 4,58	45,85 \pm 14,83	18,19 \pm 16,82
Vitalità	64,54 \pm 19,93	35,52 \pm 29,47	59,64 \pm 18,02	37,78 \pm 17,12
% sopravvissuti	90,21 \pm 12,08	31,34 \pm 30,22	92,73 \pm 10,97	66,90 \pm 31,47
% uova mangiate	27,39 \pm 12,36	33,87 \pm 29,09	9,89 \pm 11,13	2,18 \pm 2,58

Dalla Tabella XVI si evince che tra le diete monoalgali (Dieta 7, 8, 9, 10) testate su *T. stylifera*, quelle con *P. minimum* (Dieta 7) e *R. baltica* (Dieta 9) risultano le migliori in termini di produzione di uova, vitalità delle stesse, produzione di pellet fecali e sopravvivenza degli adulti ($P < 0,01$); tra le due non si osserva differenza significativa. *Prorocentrum minimum* è l'alga ottimale nella fase adulta per *T. stylifera*, come testimoniano anche i risultati ottenuti in numerosi lavori di ricerca (Ianora *et al.*, 1996, 2003; Ianora and Poulet, 1993; Carotenuto *et al.*, 2002; Lacoste *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2001; Ceballos and Ianora, 2003; Miralto *et al.*, 1995; Laabir *et al.*, 2001), dove la produzione di uova registrata è stata di circa 40 ± 20 uova/femmina/giorno, con un tasso di vitalità (% di schiusa) del $78 \pm 20\%$. Nel presente studio, le percentuali di schiusa per *T. stylifera* alimentata con *P. minimum* si attestano intorno a dei valori pari a $64,54 \pm 19,93$.

Solo Carotenuto e collaboratori (2002) hanno utilizzato *P. minimum* nella fase naupliare di *T. stylifera* registrando il raggiungimento dello stadio adulto dopo 22-28 giorni e una vitalità naupliare finale variabile in base all'alimentazione dei genitori.

L'elevato contenuto in EPA dell'alga *Rhodomonas baltica*, potrebbe essere il motivo dei soddisfacenti risultati ottenuti mediante il suo impiego, così come riscontrato anche da Støttrup e collaboratori (1999) i quali hanno esaminato gli effetti della dieta su *Acartia tonsa*, alimentando tale copepode per almeno una generazione.

Isochrysis galbana è stata utilizzata per la fase naupliare nella gran parte dei lavori consultati (Carotenuto, 1999; Bonnet and Carlotti, 2001; Carotenuto *et al.*, 2002) a concentrazioni variabili (10^4 - 10^6 cell/ml), dando degli ottimi risultati per *T. stylifera* (sopravvivenza naupliare del 70-80% e raggiungimento della fase adulta in 19 giorni). *I. galbana*, nel nostro studio, è risultata presentare dimensioni non adatte alla

predazione da parte degli organismi test adulti, come dimostra la scarsa produzione di uova/femmina/giorno (~4 uova) e di pellet fecali (~5), l'elevata percentuale di uova mangiate (~34%) e l'elevata mortalità degli adulti registrata (~69%). Tali risultati trovano supporto in un lavoro condotto da Lacoste ed collaboratori (2001): essi hanno sperimentato l'utilizzo di tale alga su femmine mature di *Calanus helgolandicus*, osservando una scarsa produzione di pellet fecali e una produzione media di uova pari a 20 uova/femmina/giorno per 16 giorni. Per ingerire una quantità adeguata di alimento, probabilmente le piccole dimensioni dell'alga ($63\mu\text{m}^3$) inducono una elevata attività filtratoria da parte dei copepodi causando, di conseguenza, un grosso dispendio energetico (Davis and Alatalo, 1992).

In generale, *I. galbana* ha determinato le performance peggiori per i cinque parametri considerati negli animali test.

Sebbene la percentuale di sopravvivenza degli adulti alimentati con *T. suecica* sia stata discreta (67%), l'impiego di tale alga in questo studio ha fatto registrare valori appena sufficienti per tutte le altre grandezze considerate, quando fornita come dieta monoalgale. *T. suecica* è stata usata come dieta monolagale anche da Knuckey e collaboratori (2005) per *Acartia sinjiensis*: i nauplii sviluppavano velocemente, ma non procedevano oltre lo stadio di copepodite CI, dimostrando che tale alga è importante nello sviluppo naupliare ma che comunque presenta delle limitazioni se utilizzata come unica fonte alimentare.

Schipp e collaboratori (1999), invece, hanno fornito *Tetraselmis suecica*, in combinazione con altre alghe, ad *Acartia clausi* allevata in un piccolo sistema di produzione. Tale miscela algale ha permesso di mantenere colture produttive di

Acartia per più di 6 mesi, la quale, a sua volta, è stata utilizzata come alimento per larve di *Lutjanus johnii*.

La composizione delle diete plurialgali è stata scelta in base ai risultati registrati dalle diete monoalgali e al contenuto di carbonio. Anche se dai risultati ottenuti dalle diete monoalgali *I. galbana* (Dieta 8) ha fatto registrare la peggiore performance nella produzione di uova ($P < 0,001$) e nella sopravvivenza degli adulti ($P < 0,001$), si è deciso di utilizzarla come arricchitore nella Dieta 1 (MIX A), Dieta 2 (MIX B) e Dieta 4 (MIX D) insieme a *P. minimum* a diverse concentrazioni (Tabella VI), in quanto la sua ricchezza in DHA sembra influenzare positivamente la schiusa delle uova. Una buona qualità delle uova, dalle quali scaturiscono nauplii vigorosi, determina una variabilità nella percentuale di reclutamento delle popolazioni naturali (Ianora and Poulet, 1993) ed incrementa la capacità di sopravvivenza nei primi stadi di sviluppo naupliare (Laabir *et al.*, 1995 a,b). Essa, inoltre, influenza indirettamente il reclutamento dei pesci, essendo i primi stadi naupliari dei copepodi delle prede molto importanti per le larve di pesci (Laabir *et al.*, 1995 a,b). Ianora e Poulet (1993) affermano che in condizioni di scarsità di cibo (una dieta a diatomee vs una dieta a dinoflagellati), *T. stylifera* può massimizzare la produzione di uova ma non la percentuale di vitalità (% di schiusa).

Nei nostri test, la peggiore produzione di uova/femmina/giorno è stata registrata solamente con la somministrazione della Dieta 4 (MIX D = $17,30 \pm 8,86$) ($P < 0,01$) (Tabella XVI). Nonostante tale dieta fosse composta da *P. minimum* e *I. galbana*, probabilmente la concentrazione algale non era tale da soddisfare quantitativamente le esigenze nutrizionali. Tutte le altre diete plurialgali, invece, determinano buone

produzioni di uova. Ciò è a conferma di quanto evidenziato precedentemente per le diete mono-algali e cioè che, *P. minimum* e *I. galbana* sono fondamentali nella dieta dei copepodi e che *T. suecica* apporta un contributo positivo quando, a determinate concentrazioni, è in combinazione con altre alghe.

La maggiore e significativa ($P < 0,001$) produzione di pellet fecali si ha con la Dieta 2 (MIX B= $54,80 \pm 21,51$) e con la Dieta 3 (MIX C= $57,12 \pm 13,78$), che risultano essere anche le diete per le quali si registrano le più basse percentuali di uova mangiate ($8,87 \pm 16,8$ e $6,02 \pm 13,89$ rispettivamente). Questi due parametri, numero di pellet fecali e percentuale di uova mangiate, sono in relazione tra di loro e sono indicativi di quanto una dieta sia ben gradita e soddisfi le esigenze nutrizionali (qualitative e quantitative) degli animali. Un elevato numero di pellet fecali indica che gli organismi hanno mangiato quantità adeguate di cibo e pertanto non devono ricorrere all'ingestione delle uova (cannibalismo) per soddisfare le loro esigenze nutrizionali. Le uova se ingerite, si ritroveranno, poi, come “gusci vuoti”, all'interno delle feci. L'alimentazione onnivora è molto comune nei copepodi planctonici: essi ingeriscono sia fitoplancton che zooplancton, i cui resti si ritrovano poi nei pellet fecali (Turner, 1984; Turner *et al.*, 1985).

Le miscele MIX A (Dieta 1), MIX C (Dieta 3) e MIX D (Dieta 4) sono le migliori in termini di vitalità delle uova ($84,08 \pm 13,18$ per MIX A; $77,24 \pm 23$ per MIX C e $82 \pm 11,43$ per MIX D). La Dieta 4 (MIX D) ha, inoltre, un effetto significativo nei confronti delle Diete 3 e 5 ($P < 0,05$).

Una buona dieta deve determinare non solo una buona produzione di uova e una buona percentuale di schiusa, ma anche un'elevata sopravvivenza dei primi stadi naupliari che portano, poi, ad una sopravvivenza degli adulti. Nel nostro studio

miscele trialgali, MIX A+T (Dieta 5= 83%) e MIX A+R (Dieta 6= 73%), rappresentano le diete per le quali si registra la più elevata sopravvivenza degli adulti ($P < 0,001$).

Anche per le miscele algali è vero quanto riportato precedentemente per le diete mono-algali, cioè di come le caratteristiche nutrizionali delle alghe influenzano la fisiologia e lo “stato di salute” del copepode, ma è vero anche che la combinazione quantitativa di tali alghe è fondamentale per le performance dei copepodi. Una dieta troppo ricca o troppo povera, sia qualitativamente che quantitativamente, non farebbe altro che “appesantire” o “mal nutrire” l’organismo riducendone la produzione di uova e relativa vitalità. Così come, un disequilibrio tra i vari elementi nutritivi di una dieta influenzano le capacità riproduttive se non addirittura la sopravvivenza degli organismi stessi.

5.2.1 Correlazione tra numero di uova deposte, schiuse e mangiate.

Tra tutte le diete testate sul copepode *Temora stylifera*, si è riscontrata una correlazione positiva tra il numero di uova deposte ed il numero di uova schiuse per la Dieta 8 (ISO) ($r=0,40$, $P < 0,01$), la Dieta 9 (RHO) ($r=0,35$, $P < 0,05$) e la Dieta 10 (TETRA) ($r=0,43$, $P < 0,01$). Cioè, maggiore è il numero di uova deposte, maggiore è la percentuale di uova schiuse. Una correlazione negativa, invece, esiste tra il numero di uova deposte ed il numero di uova mangiate per la Dieta 1 (MIX A) ($r= -0,49$, $P < 0,001$) e la Dieta 9 (RHO) ($r= -0,38$, $P < 0,01$). Questa correlazione è l’ulteriore conferma che le diete MIX A e RHO soddisfano nutrizionalmente i copepodi tanto da evitare i fenomeni di cannibalismo. Una correlazione positiva tra uova prodotte e uova mangiate esiste però per la Dieta 8 (ISO). Ciò può essere spiegato considerando

che l'alga *Isochrysis galbana* è ricca di DHA, l'acido grasso polinsaturo che risulta fondamentale per la produzione e schiusa delle uova. La dieta mono-algale ad *I. galbana*, però, non è sufficiente a sopperire le esigenze alimentari dei copepodi che pertanto si cibano delle uova deposte. Quindi più uova sono deposte, più uova sono mangiate.

5.3 *Centropages typicus*.

Come esplicitato in materiali e metodi, i dati relativi a *C. typicus* sono stati elaborati considerando due gruppi di dati, i cui risultati sono riportati nelle Tabelle XVII - XXXV.

5.3.1 Confronto delle 12 diete fino al 6° giorno

L'interazione giorno*dieta risulta significativa per i parametri: uova prodotte, pellet fecali e percentuale di sopravvivenza degli adulti. Mentre per *T. stylifera* l'effetto dei singoli fattori, giorno e dieta, risultava significativo per tutti i parametri considerati, per *C. typicus* si riscontra una situazione leggermente diversa: l'effetto del fattore giorno risulta significativo per tutti i parametri considerati tranne che per la produzione di pellet fecali; l'effetto del fattore dieta risulta altamente significativo per tutti i parametri considerati, tranne che per il numero di uova mangiate (Tabelle XVII-XXI).

Tabella XVII. ANOVA per il parametro produzione di uova/femmina/giorno del copepode *Centropages typicus* (tutte le diete fino al 6° giorno).

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	5	5832.15	1166.43	3.95	0.0027
Dieta	11	54665.08	4969.55	16.83	<.0001
Giorno*Dieta	55	41228.96	749.62	2.54	<.0001
Errore residuo	93	27459.87	295.26		

Tabella XVIII. ANOVA per il parametro produzione di pellet fecali/individuo/giorno del copepode *Centropages typicus* (tutte le diete fino al 6° giorno).

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	5	1139.71	227.94	2.03	0.0822
Dieta	11	66399.87	6036.35	53.63	<.0001
Giorno*Dieta	55	30121.41	547.66	4.87	<.0001
Errore residuo	93	10468.29	112.56		

Tabella XIX. ANOVA per il parametro percentuale di uova schiuse al giorno del copepode *Centropages typicus* (tutte le diete fino al 6° giorno).

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	5	5948.83	1189.76	2.69	0.0258
Dieta	11	29485.93	2680.54	6.06	<.0001
Giorno*Dieta	55	34422.89	625.87	1.41	0.0704
Errore residuo	93	41170.28	442.69		

Tabella XX. ANOVA per il parametro percentuale di uova mangiate al giorno dal copepode *Centropages typicus* (tutte le diete fino al 6° giorno).

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	5	5283.15	1056.63	3.60	0.0051
Dieta	11	4279.28	389.02	1.33	0.2229
Giorno*Dieta	55	15842.15	288.04	0.98	0.5226
Errore residuo	93	27292.77	293.47		

Tabella XXI. ANOVA per il parametro percentuale di sopravvivenza degli adulti per giorno del copepode *Centropages typicus* (tutte le diete fino al 6° giorno).

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	5	1398.56	279.71	4.99	0.0004
Dieta	11	2118.91	192.63	3.43	0.0005
Giorno*Dieta	55	10420.26	189.46	3.38	<.0001
Errore residuo	93	5218.20	56.11		

L'interazione giorno*dieta per il parametro numero uova prodotte/femmina/giorno per *C. typicus* nei primi 6 giorni di sperimentazione è da imputare principalmente alla Dieta 8 (MIX 8). Tale dieta infatti, fa registrare un numero di uova deposte che aumenta significativamente dal 1° al 2° giorno di somministrazione ($P < 0,05 \div 0,001$) mentre si osserva una diminuzione in tutte le altre diete (Figura 17 e Tabella XXII). Nei successivi 3 giorni la Dieta 8 fa incrementare in maniera altamente significativa il numero di uova deposte rispetto alle altre diete ($P < 0,001$), che si mantengono invece su livelli pressochè simili.

Figura 17. Numero di uova prodotte/femmina/giorno per tutte le diete testate (mono e pluri-algali) durante i primi 6 giorni di sperimentazione. Il valore medio della produzione registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

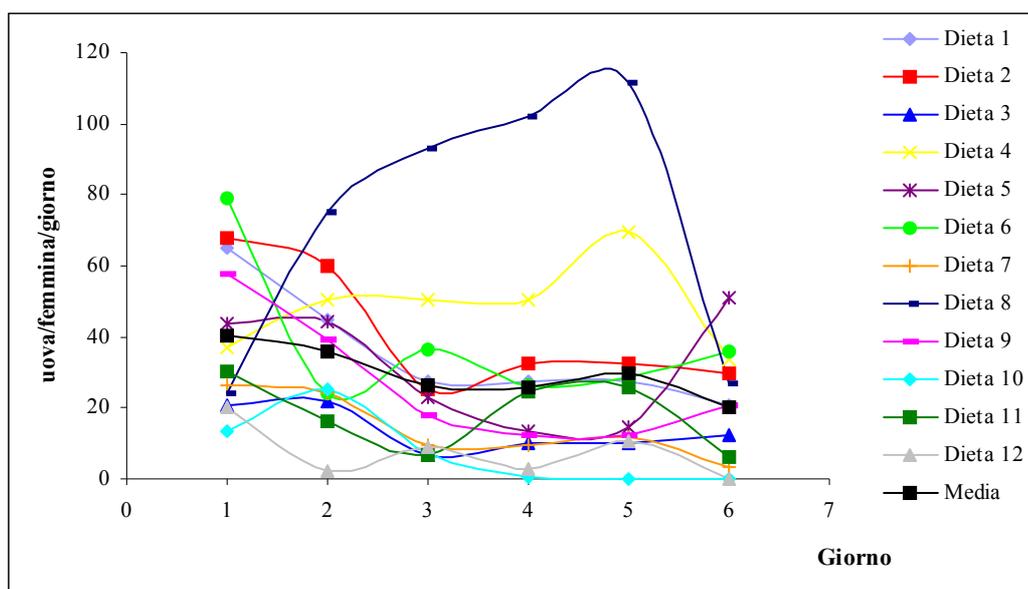


Tabella XXII. No. uova prodotte/femmina/giorno per *Centropages typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Confronto tra diete	Giorno					
	1	2	3	4	5	6
1-3	+					
1-4					-	
1-5						-
1-7	+					
1-8	+	-	---	---	---	
1-9						
1-10	+					
1-12	+	+				
2-3	+	+				
2-4	+				-	
2-6		+				
2-7	+	+				
2-8	+		---	---	---	
2-10	+					
2-11		+				
2-12	+	+				
3-4		-	-	-	-	
3-5						-
3-6	---		-			
3-8		-	---	---	---	
4-5				+	+	
4-6	-				+	
4-7			+	+	+++	+
4-8			-	--	-	
4-9					+	
4-10			+	+	++	
4-11			+		+	
4-12		+	+	+	+	
5-6	-					
5-7						+
5-8		-	---	---	---	
5-10		-				+
5-11						+
5-12						+
6-7	++					+
6-8	++	-	---	---	---	
6-10	+					
6-11	+					
6-12	+					
7-8		--	---	---	---	
8-9		++	++	+++	+++	
8-10		++	+++		+++	
8-11		+	+++		+++	
8-12		+	+++		+++	

Anche il numero di pellet fecali prodotti/individuo/giorno è influenzato dalla Dieta 8 (MIX 8) che dal 3° giorno in poi fa registrare il numero più alto di pellet ($P < 0,001$), differenziandosi nettamente dalle altre diete che presentano invece un andamento simile tra di loro (Figura 18 e Tabella XXIII).

Figura 18. Produzione di pellet fecali/individuo/giorno per tutte le diete testate (mono e pluri-algali) durante i primi 6 giorni di sperimentazione. Il valore medio della produzione di pellet fecali registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

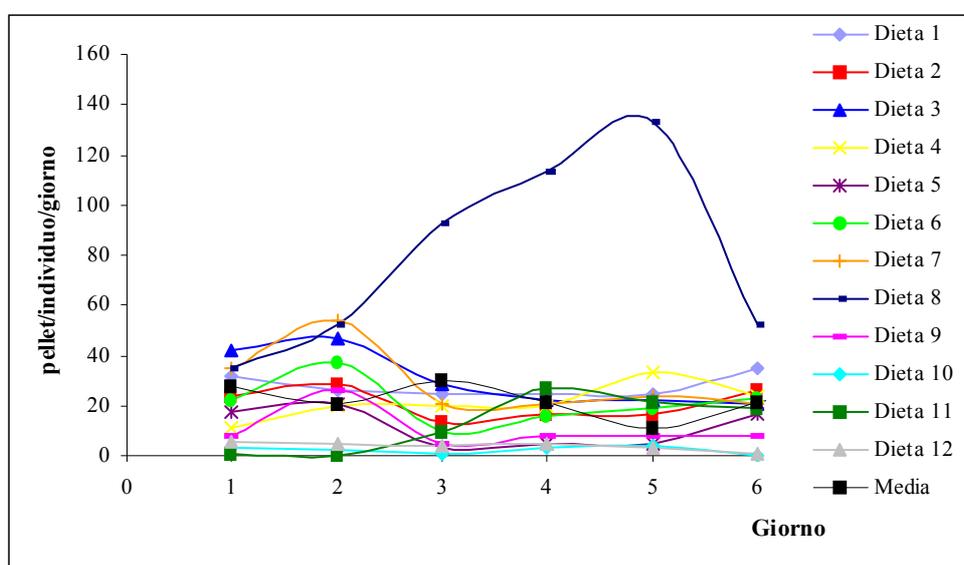


Tabella XXIII. No. pellet fecali/individuo/giorno per *C. typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e - indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Confronto tra diete	Giorno					
	1	2	3	4	5	6
1-3		-				
1-4	+					
1-5			+	+	+	+
1-7		-				
1-8		-	---	---	---	-
1-9						+
1-10	+					+
1-11	+	+				
1-12						+
2-3	+	-				
2-7		-				
2-8		-	---	---	---	-
2-9						
2-10		+				+
2-11		+				
2-12						+
3-4	+	+				
3-5	+	+	+			
3-6	+		+			
3-8			---	---	---	-
3-9	+					
3-10	+	++	+			
3-11	+	++				
3-12	+	+	+			
4-5					+	
4-7	-	--				
4-8	-	--	---	---	---	-
4-9					+	
4-10					+	
4-12					+	
5-7	-	--	-		-	
5-8	-	--	---	---	---	---
6-8			---	---	---	-
6-10		+				
6-11		+				
6-12		+				
7-8			---	---	---	-
7-9	+	+				
7-10	+	+++				
7-11	+	+++				
7-12	+	++				
8-9	+	+	+++	+++	+++	++
8-10	+	++	+++	+++	+++	+++
8-11	+	+++	+++	+++	+++	+
8-12	+	++	+++	+++	+++	+++

L'alta significatività ($P < 0,01 \div 0,001$) dell'interazione relativa al parametro percentuale di sopravvivenza degli adulti di *C. typicus* potrebbe essere imputata alle Diete 3 e 10. Tutte le diete contribuiscono più o meno in egual misura, tranne la Dieta 3 (MIX 3) al 3° giorno e la Dieta 10 (ISO) al 6° giorno che si distaccano dall'andamento generale abbassando significativamente la percentuale di sopravvivenza (Figura 19 e Tabella XXIV).

Figura 19. Percentuale di adulti sopravvissuti per tutte le diete testate (mono e pluri-algali) durante i primi 6 giorni di sperimentazione. Il valore medio registrato ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

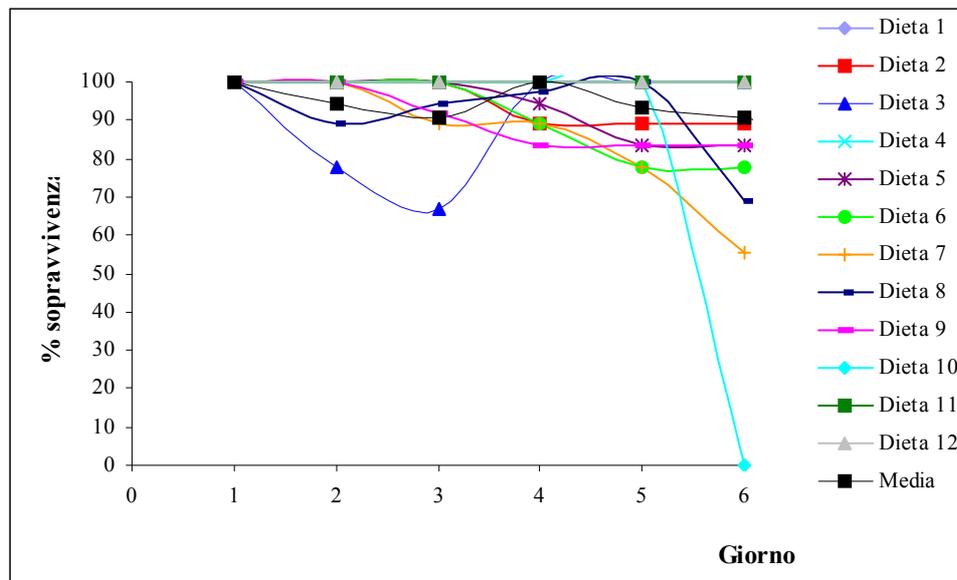


Tabella XXIV. Percentuale di sopravvivenza degli adulti di *C. typicus* (primi 6 giorni di sperimentazione): significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Confronto tra diete	Giorno					
	1	2	3	4	5	6
1-3			+			
1-7						+
1-8						+
1-10						+++
2-3			+			
2-7						+
2-10						+++
3-4			-			
3-5			-			
3-6			-			
3-7						+
3-10						+++
4-7						+
4-8						+
4-10						+++
5-10						+++
6-10						+++
7-10						+
7-11						-
7-12						-
8-10						++
9-10						++
10-11						---
10-12						---

L'assenza di interazione giorno*dieta per i parametri vitalità e percentuale di uova mangiate indica che tutte le diete hanno un comportamento simile nel periodo considerato. L'andamento di questi due parametri è comunque riportato nelle Figure 20 e 21.

Figura 20. Vitalità delle uova (% uove schiuse) per tutte le diete testate (mono e pluri-algali) durante i primi 6 giorni di sperimentazione. Il valore medio della vitalità registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

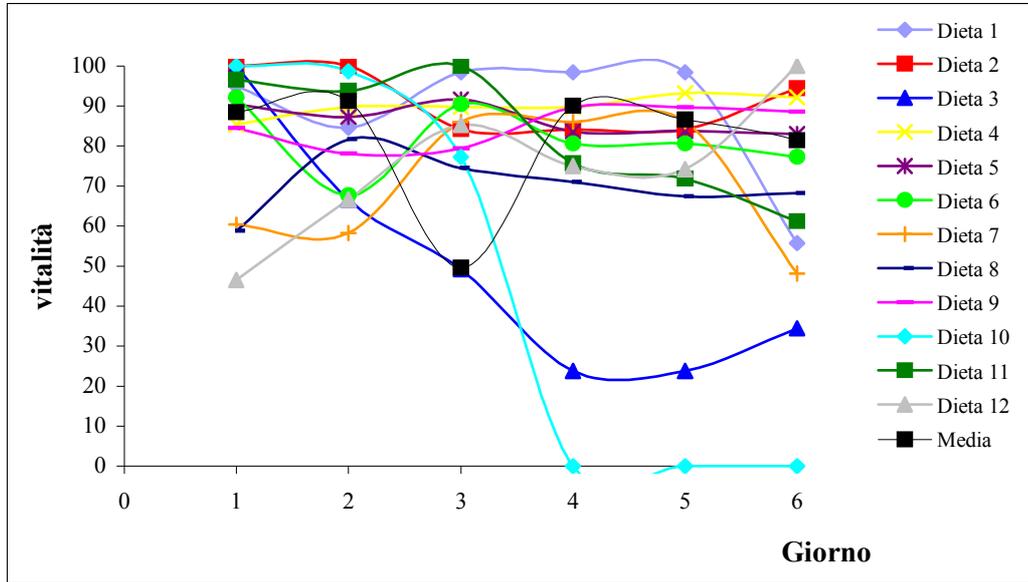
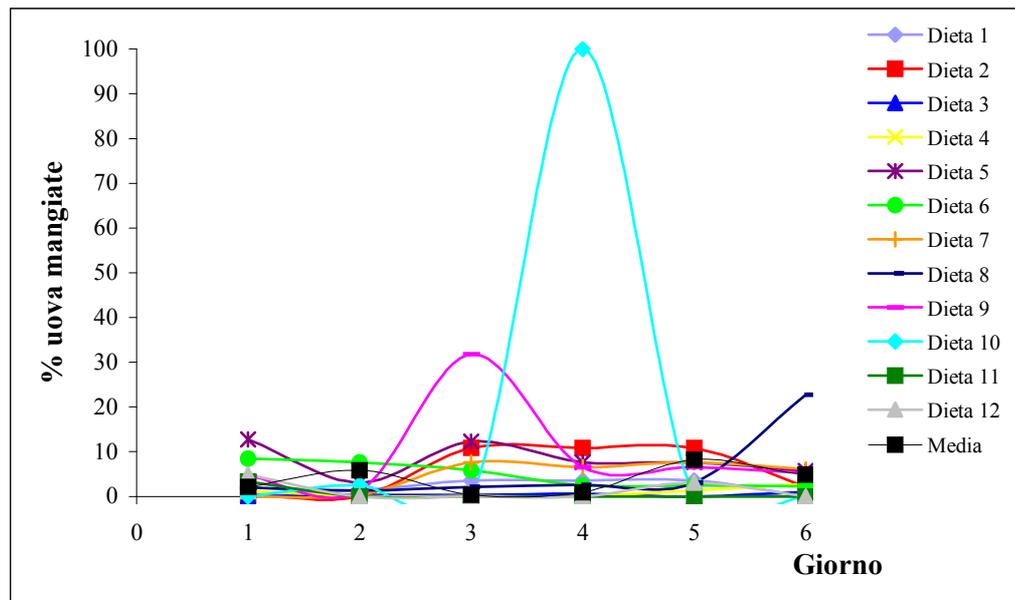


Figura 21. Percentuale uova mangiate per tutte le diete testate (mono e pluri-algali) durante i primi 6 giorni di sperimentazione. Il valore medio registrato è interpolato dalla linea nera.



I risultati ottenuti dalle diete mono e pluri-algali testate su *C. typicus*, in termini di valori medi \pm deviazione standard (ds) per produzione di uova, di pellet fecali, vitalità delle uova (% di schiusa), sopravvivenza degli adulti e percentuale di uova mangiate sono riportati in Tabella XXV, indipendentemente dal giorno.

Tabella XXV. Risultati delle 12 diete testate su *C. typicus* (valore medio \pm ds) fino al 6° giorno di sperimentazione in termini di produzione di uova (uova/femmina), di pellet fecali (Pf/individuo), vitalità delle uova (% di schiusa), percentuale di sopravvivenza degli adulti e percentuale delle uova mangiate.

Dieta 1= MIX 1 (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + RHO $1.7 \cdot 10^4$); **Dieta 2**= MIX 2 (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + TETRA $1.25 \cdot 10^4$); **Dieta 3**= MIX 3 (RHO $1.7 \cdot 10^4$ + TETRA $2.5 \cdot 10^4$); **Dieta 4**= MIX 4 (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + RHO $1.7 \cdot 10^4$ + TETRA $1.25 \cdot 10^4$); **Dieta 5**= MIX 5 (PRO $4.2 \cdot 10^3$ + ISO $4.2 \cdot 10^3$); **Dieta 6**= MIX 6 (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + ISO $9 \cdot 10^4$); **Dieta 7**= MIX 7 (RHO $3.3 \cdot 10^4$ + TETRA $1.25 \cdot 10^4$); **Dieta 8**= MIX 8 (RHO $3.3 \cdot 10^4$ + PRO $5.5 \cdot 10^3$); **Dieta 9**= PRO $5.5 \cdot 10^3$; **Dieta 10**= ISO $1.6 \cdot 10^4$; **Dieta 11**= RHO $3.3 \cdot 10^4$; **Dieta 12**= TETRA $2.5 \cdot 10^4$.

Parametri	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
Uova/femmina	35,42 \pm 16,6	41,31 \pm 17,96	13,77 \pm 6,27	48,61 \pm 12,65
Pf/ind	27,74 \pm 4,52	20,92 \pm 6,17	30,31 \pm 11,15	21,43 \pm 7,02
Vitalità	88,38 \pm 16,86	91,19 \pm 7,88	49,63 \pm 29,65	90,04 \pm 2,71
% sopravvissuti	100 \pm 0	94,44 \pm 6,08	90,74 \pm 14,77	100 \pm 0
% uova mangiate	2,12 \pm 1,66	5,84 \pm 5,55	0,41 \pm 0,40	0,96 \pm 1,09

Parametri	Dieta 5	Dieta 6	Dieta 7	Dieta 8
Uova/femmina	31,66 \pm 16,51	38,42 \pm 20,60	14,26 \pm 9,16	72,23 \pm 38,01
Pf/ind	11,12 \pm 7,76	21,06 \pm 9,31	29,22 \pm 13,16	79,69 \pm 39,21
Vitalità	86,58 \pm 3,71	81,45 \pm 9	70,78 \pm 7,62	70,25 \pm 7,62
% sopravvissuti	93,52 \pm 8,18	90,74 \pm 10,92	85,18 \pm 16,72	91,59 \pm 11,82
% uova mangiate	8,18 \pm 3,72	4,85 \pm 2,82	4,69 \pm 3,54	5,66 \pm 8,39

Parametri	Dieta 9	Dieta 10	Dieta 11	Dieta 12
Uova/femmina	26,62 \pm 18,14	7,72 \pm 9,99	18,28 \pm 10,36	7,48 \pm 7,53
Pf/ind	10,36 \pm 7,99	2,17 \pm 1,45	12,86 \pm 11,25	3,85 \pm 1,82
Vitalità	84,95 \pm 5,22	45,98 \pm 51,01	83,15 \pm 15,79	74,59 \pm 17,93
% sopravvissuti	90,28 \pm 8,19	83,33 \pm 40,82	100 \pm 0	100 \pm 0
% uova mangiate	9,32 \pm 11,17	17,11 \pm 40,62	0,55 \pm 1,34	1,34 \pm 2,15

I risultati ottenuti con la dieta monoalgale *P. minimum* (Dieta 9), ottimale tra quelle testate in termini di produzione di uova/femmina/giorno ($26,62 \pm 18,14$), sono simili a quelli riportati in letteratura (Ianora *et al.*, 1996; Miralto *et al.*, 1995), confermando che *C. typicus* tendenzialmente preferisce alghe di maggiori dimensioni (Gaudy, 1974). La preferenza per grandi fitoplanctonti potrebbe essere semplicemente legata alla distanza tra le setole delle maxillule (Tomasini and Mazza, 1979). Anche i risultati delle analisi condotte da Turner (1987) sul contenuto dei pellet fecali di *Centropages velificatus*, dimostrano che *Centropages* è un genere di copepode principalmente onnivoro, che si alimenta frequentemente di altri zooplanctonti e di grandi cellule fitoplanctoniche, anche se fragili flagellati ingeriti sicuramente non risulteranno essere una componente identificabile nelle feci. Le diete a base di *P. minimum* (Dieta 9= $10,36 \pm 7,99$) e *R. baltica* (Dieta 11= $12,86 \pm 11,25$) hanno fatto registrare un maggior numero di pellet fecali rispetto alle Diete 10 e 12, anche se le differenze risultano statisticamente non significative. *R. baltica* mostra anche la più bassa percentuale di uova mangiate per i primi 6 giorni di sperimentazione ($0,55 \pm 1,34$). Pertanto, tali alghe sono ben gradite e sono qualitativamente soddisfacenti anche per *C. typicus*.

Smith e Lane (1985) riportano che quando il flagellato *I. galbana* veniva offerto a *C. typicus*, la produzione di uova e di pellet fecali era quasi del tutto assente. Ciò è quanto riscontrato anche in questo studio: pochissime uova prodotte ($7,72 \pm 9,99$) e pellet fecali scarsi ($2,17 \pm 1,45$), estremamente compatti e sottili.

I più alti successi di schiusa si ottengono con le diete a base del dinoflagellato *P. minimum* (Dieta 9= $84,95 \pm 5,22$) e *R. baltica* (Dieta 11= $83,15 \pm 15,79$), così come registrato negli studi condotti rispettivamente da Miralto e collaboratori (1995) e da

Van der Lugt, (2008). Alla dieta a base di *I. galbana* (Dieta 10), invece, è legata la più bassa percentuale di vitalità delle uova ($45,98 \pm 51,01$; $P < 0,001$), anche rispetto alle diete pluri-algali, sebbene sia riconosciuta la sua importanza nei processi di schiusa. Infatti, anche se sappiamo che il successo di schiusa è legato alla presenza di determinati componenti nella dieta, come ad esempio i PUFA, questo aspetto della riproduzione è stato scarsamente investigato nei copepodi. Tuttavia sembrerebbe più opportuno indirizzare il problema verso la produzione di uova di buona qualità anziché verso la produzione di grandi quantità di uova, dato che solamente le prime rientrano nei livelli trofici più alti. Presenza di composti tossici nelle diatomee (Poulet *et al.*, 1994, Ianora *et al.*, 1995), deficienze in acidi grassi essenziali, vitamine, minerali e proteine nella dieta, sono solo alcuni dei fattori che potrebbero influenzare la vitalità delle uova. Miralto e collaboratori (1995) hanno dimostrato che in *C. typicus* la qualità delle uova, e quindi il successo di schiusa, dipende anche dall'età delle femmine (aspetto da noi non considerato).

Il 100% di sopravvivenza di adulti si registra con le Diete 11 (RHO) e 12 (TETRA). L'impiego di *Rhodomonas* sp., in una concentrazione compresa tra 3 e $5 \cdot 10^4$ cell/ml, nell'allevamento intensivo del copepode Calanoide *Bestiolina similis*, ha determinato i più alti valori di sopravvivenza di adulti rispetto alle altre due diete impiegate (*I. galbana* e *Chaetoceros neogracille*) (Van der Lugt, 2008).

Dalla tabella XXV si evince che: le diete pluri-algali che hanno indotto una migliore performance in termini di produzione di uova/femmina/giorno sono: Dieta 2 (MIX 2= $41,31 \pm 17,96$), Dieta 4 (MIX 4= $48,61 \pm 12,65$) e Dieta 6 (MIX 6= $38,42 \pm 20,60$). Esse sono altamente significative nei confronti delle Diete 3, 7 e 8 ($P < 0,001$).

La dieta 8, in particolare, oltre a mostrare il maggior valore di uova prodotte ($72,23 \pm 38,01$; $P < 0,001$), fa registrare anche la maggiore produzione di pellet fecali/individuo/giorno ($79,69 \pm 39,21$; $P < 0,001$). Tutte le diete determinano valori abbastanza elevati in termini di vitalità delle uova (70-90%), tranne che la Dieta 3 (MIX 3= ~50%; $P < 0,001$). In tutte le diete si registrano elevate percentuali di sopravvivenza degli adulti nei primi 6 giorni di sperimentazione, con il 100% di sopravvivenza per Dieta 1 (MIX 1) e Dieta 4 (MIX 4). Le più basse percentuali di uova mangiate si riscontrano dopo somministrazione delle Diete 3 (MIX 3) e 4 (MIX 4), con valori al di sotto dell'1%. Statisticamente il confronto di tali valori raggiunge il limite di significatività ($P < 0,05$) quando il numero di uova mangiate è superiore a 5 (Tabella XXV). Per tutte le altre diete i valori restano comunque trascurabili. Sulla base dei valori assunti dalle cinque grandezze considerate, ed in particolare produzione di uova, percentuale di schiusa e percentuale di adulti sopravvissuti, la dieta migliore è risultata essere la dieta MIX 4, una dieta trialgale (PRO+RHO+TETRA). TETRA è un'alga ben gradita da *C. typicus*, probabilmente per le sue dimensioni.

5.3.2 Confronto di tutte le diete per l'intero periodo di sperimentazione con l'esclusione della dieta ad *Isochrysis galbana* (Dieta 10).

L'interazione giorno*dieta risulta significativa per tutti i parametri considerati, tranne che per la percentuale di uova mangiate. L'effetto dei singoli fattori, giorno e dieta, risulta altamente significativa per tutti i parametri considerati (Tabelle XXVI-XXX).

Tabella XXVI. ANOVA per il parametro produzione di uova/femmina/giorno del copepode *Centropages typicus* (senza dieta ISO).

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	12	20163.80	1680.32	6.45	<.0001
Dieta	10	56124.32	5612.43	21.56	<.0001
Giorno*Dieta	120	58998.25	491.65	1.89	<.0001
Errore residuo	179	46603.08	260.35		

Tabella XXVII. ANOVA per il parametro produzione di pellet fecali/individuo/giorno del copepode *Centropages typicus* (senza dieta ISO).

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	12	3135.46	261.28	2.29	0.0098
Dieta	10	166073.38	16607.33	145.66	<.0001
Giorno*Dieta	120	66417.39	553.47	4.85	<.0001
Errore residuo	179	20408.02	114.01		

Tabella XXVIII. ANOVA per il parametro percentuale di uova schiuse al giorno del copepode *Centropages typicus* (senza dieta ISO).

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	12	45062.88	3755.24	7.66	<.0001
Dieta	10	83883.42	8388.34	17.11	<.0001
Giorno*Dieta	120	78027.57	650.23	1.33	0.0432
Errore residuo	179	87735.18	490.14		

Tabella XXIX. ANOVA per il parametro percentuale di uova mangiate al giorno dal copepode *Centropages typicus* (gl = gradi di libertà; F = variabilità; F = F-Test); (senza dieta ISO).

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	12	43906.20	3658.85	10.22	<.0001
Dieta	10	36409.30	3640.93	10.17	<.0001
Giorno*Dieta	120	44181.88	368.18	1.03	0.4297
Errore residuo	179	64100.68	358.10		

Tabella XXX. ANOVA per il parametro percentuale di sopravvivenza degli adulti per giorno del copepode *Centropages typicus* (senza dieta ISO).

Fattore	gl	Devianza	Varianza	F	Pr > F
Giorno	12	3834.12	319.51	3.15	0.0004
Dieta	10	4530.15	453.015	4.46	<.0001
Giorno*Dieta	120	22267.25	185.56	1.83	0.0001
Errore residuo	179	18175.25	101.54		

La significatività dell'interazione giorno*dieta per il parametro numero di uova prodotte/femmina/giorno è da imputarsi essenzialmente alla Dieta 8 (MIX 8), che, mentre il primo giorno si comporta come le altre diete, dal 2° al 5° giorno determina i valori più elevati, facendo registrare un brusco calo al 6° giorno e ritornando ad avere un effetto altamente positivo dal 9° al 12° giorno ($P < 0,01 = 0,01$) (Figura 22 e Tabella XXXI).

Figura 22. Numero di uova prodotte/femmina/giorno per le 11 diete testate (esclusa dieta 10) per tutto il periodo di sperimentazione. Il valore medio della produzione registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

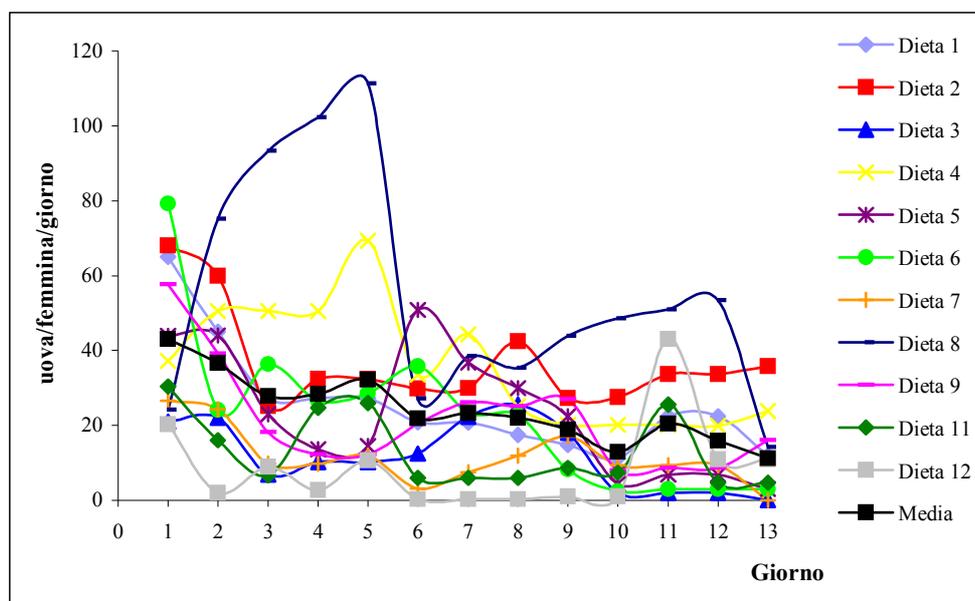


Tabella XXXI. No. uova prodotte/femmina/giorno per *Centropages typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e - indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Confronto tra diete	Giorno												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1-3	+												
1-4	+				-								
1-7	+												
1-8	+	-	---	---	---					-		-	
1-12	+	+											
2-3	++	+									+	+	+
2-4	+				-								
2-5											+	+	+
2-6		+									+	+	+
2-7	+	+				+	+	+					
2-8	+		---	---	---								
2-11	+	+											
2-12	+	+					+	+					
3-4		-	-	-	---								
3-5						-							
3-6	---		-										
3-8		---	---	---	---					-	-	--	
3-12											-		
4-5			+	+	+++								
4-6	-	+			+								
4-7		+	+	+	+++	+	+						
4-8			-	--	-					-	-	-	
4-9				+	+								
4-11			+		+		+						
4-12		+	+	+	+		+						
5-6	-												
5-7						+	+						
5-8		-	---	---	---					-	-	--	
5-11						+							
5-12		+				+							
6-7	+++		+			+							
6-8	+++	--	---	---	---					-	--	--	--
6-11	+												
6-12	+										-		
7-8		--	---	---	---					-	-	-	
8-9			+++	+++	+++					+	+	+	
8-11		+	+++	+++	+++					+		+	
8-12		+	+++	+++	+++				-	+		+	

La Dieta 8 (MIX 8) è responsabile anche della significatività dell'interazione giorno*dieta per il parametro pellet fecali prodotti/individuo/giorno ($P < 0,01 \div 0,001$). Tale dieta determina la maggior produzione di pellet fecali per quasi tutto il periodo di sperimentazione, con valori minimi al 6° giorno, contrariamente all'andamento delle altre diete che proprio al 6° giorno determinano un aumento dei pellet fecali (Figura 23 e Tabella XXXII).

Figura 23. Numero di pellet fecali prodotti /individuo/giorno per le 11 diete testate (esclusa dieta 10) per tutto il periodo di sperimentazione. Il valore medio della produzione registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

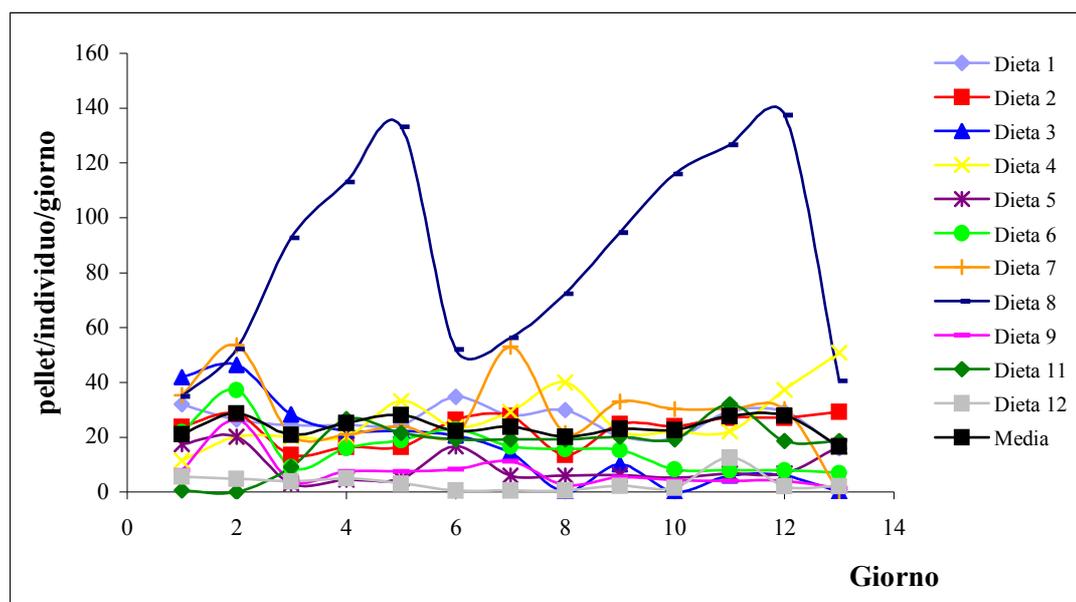


Tabella XXXII. No. pellet fecali/individuo/giorno per *C. typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e - indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Confronto tra diete	Giorno												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1-3		-						+			+	+	
1-4	+												-
1-5			+	+	+	+	+	+			+	+	
1-6											+	+	
1-7		-					-						
1-8		-	---	---	---		-	---	---	---	---	---	-
1-9						+		+					
1-11	+	+											
1-12	+					+	+	+				+	
2-3	-	-									+	+	+
2-4								-					-
2-5							+		+	+	+	+	
2-6											+	+	+
2-7		-					-						+
2-8		-	---	---	---	-	-	---	---	---	---	---	
2-9													+
2-11		+											
2-12						+	+					+	+
3-4	++	+						-				-	---
3-5	+	+	+										
3-6	+		+										
3-7							--			-			
3-8			---	---	---	-	--	---	---	---	---	---	---
3-9	+												
3-11	+	++									-		
3-12	+	++	+										
4-5					+		+	++				++	++
4-6								+				+	+++
4-7	-	--					-						+++
4-8	-	--	---	---	---	-	-	--	---	---	---	---	
4-9					+			+				+	+++
4-11													+
4-12					+		+	+				+	++
5-7	-	--	-		-		---		-	-			
5-8	-		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-
5-9		--											
5-11											-		
6-7							--						
6-8			---	---	---	-	---	---	---	---	---	---	--
6-11		+											
6-12		+											
7-8			---	---	---	-		---	---	---	---	---	-
7-9	+	+					+						
7-11	+	+++					+						
7-12	+	++					+++		+				
8-9	+	+	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+
8-11	+	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	
8-12	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+

Risulta complessa la risposta alle diete nei 13 giorni di sperimentazione in termini di vitalità delle uova per *C. typicus* ($P < 0,05$). La Dieta 3 che il 1° giorno di alimentazione determina elevata percentuale di vitalità nei confronti delle Diete 7, 8 e 11 ($P < 0,05$), inverte tale andamento dal 3° giorno in poi ($P < 0,05$) (Figura 24 e Tabella XXXIII).

Figura 24. Vitalità delle uova (% uove schiuse) per le 11 diete testate (esclusa dieta 10) durante tutto il periodo di sperimentazione. Il valore medio della vitalità registrata ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

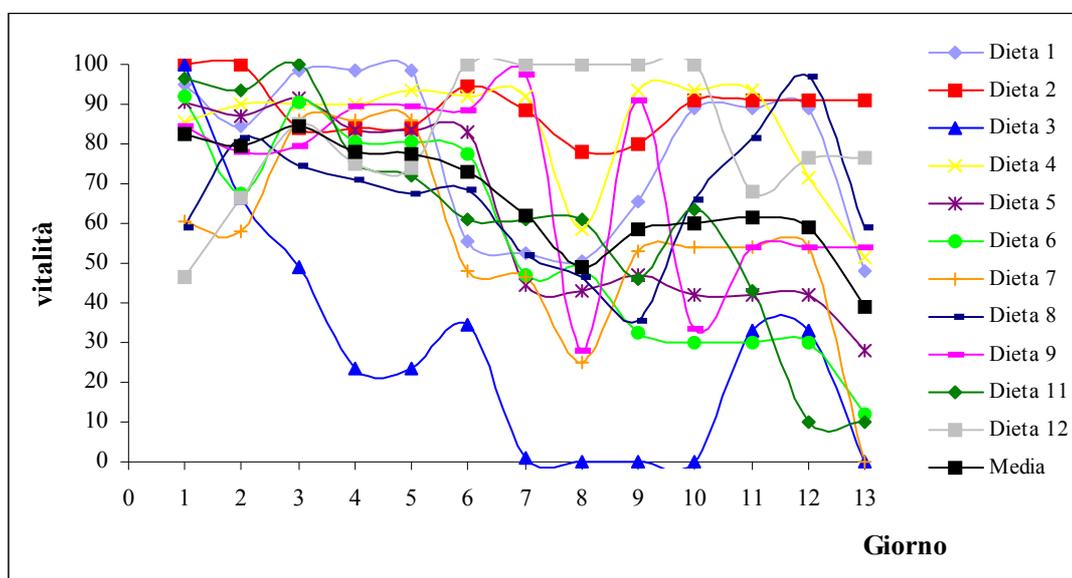


Tabella XXXIII. Vitalità delle uova di *C. typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e – indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Confronto tra diete	Giorno												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1-2						-	-						-
1-3			+	++	++		+	+	++	+	+	+	+
1-4						-	-						
1-5									+	+	+	+	
1-6									+	+	+	+	
1-8	+								+				
1-9										+			
1-11												+	
2-3				+	+	+	+++	+	++	++	+	+	+++
2-4													+
2-5							+			+	+	+	++
2-6							+		+	++	++	++	+++
2-7	+	+				+	+						++
2-8	+							+	+				
2-9										+			
2-11	+											+	+
3-4			-	-	--	-	---		---	--	-		-
3-5			-	-	-	-	-		-				
3-6			-	-	-	-	-						
3-7	+		-	-	-	-	-						
3-8	+		-	-	-	-	-			-	-	-	-
3-9							--		--				-
3-11	+		-				-		-				
3-12						-	--	-	--	-			-
4-5							+		+	+	+		
4-6							+		+	+	+	+	+
4-7						+	+						+
4-8							+		+				
4-9										+			
4-11												+	
5-8							-	-	-	-	-	-	
5-12													
6-8										-	-	--	-
6-9							-		-				
6-12							-	-	-	-			-
7-8													-
7-12						-		-					-
8-9									-				
8-11												+	
8-12								-	-				
9-12								-					
11-12												-	-

L'interazione giorno*dieta per il parametro percentuale di sopravvivenza degli adulti di *C. typicus* ($P<0,05$) è da imputare al diverso comportamento delle Diete 3, 5 e 6. Infatti al 3°, al 9° e al 13° giorno di somministrazione la Dieta 3 determina basse percentuali di sopravvivenza rispetto alle diete 5 e 6, mentre all'8° giorno ne induce la più elevata percentuale ($P<0,05$) (Figura 25 e Tabella XXXIV).

Figura 25. Percentuale di adulti sopravvissuti per le 11 diete testate (esclusa dieta 10) durante tutto il periodo di sperimentazione. Il valore medio registrato ogni giorno è interpolato dalla linea nera.

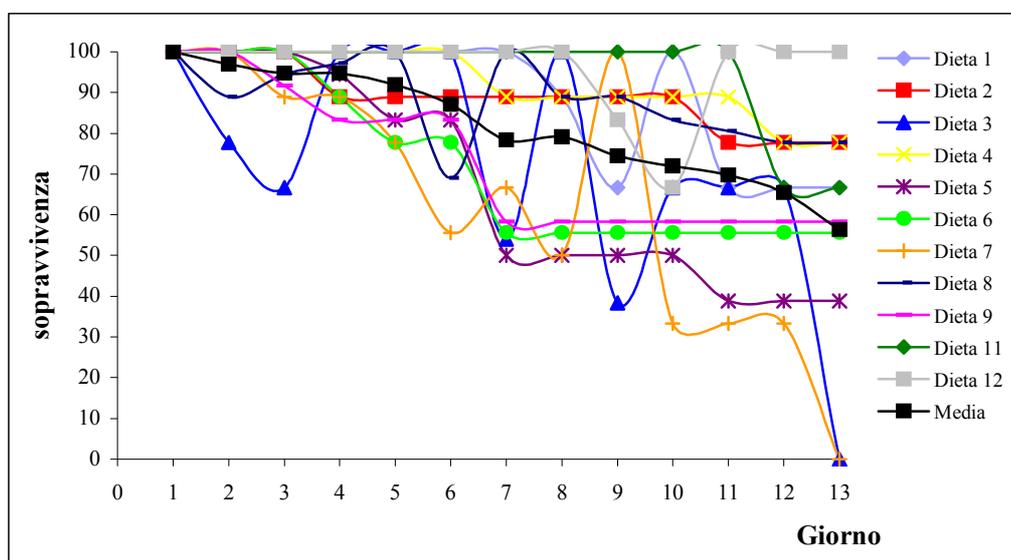
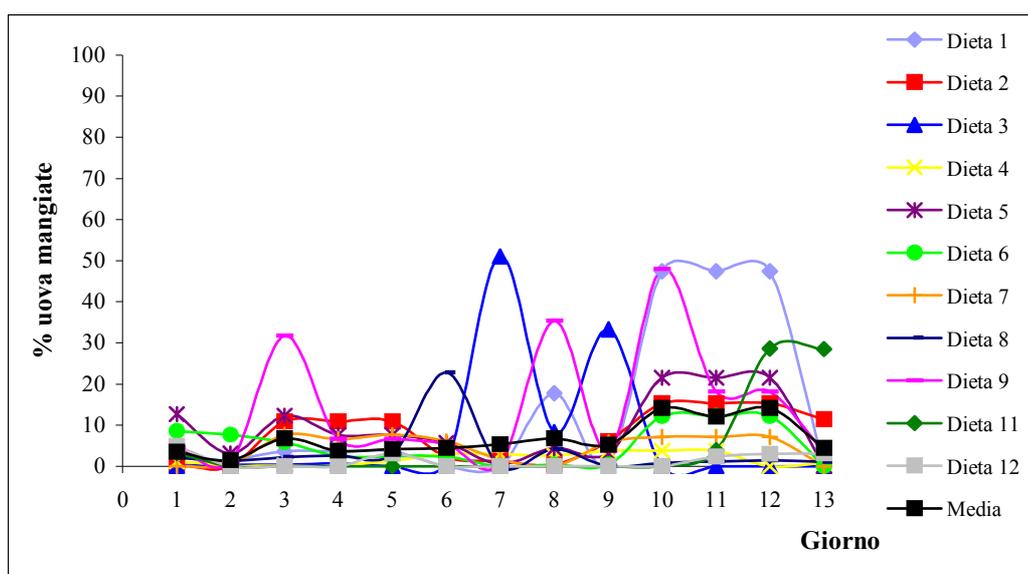


Tabella XXXIV. Percentuale di adulti sopravvissuti di *C. typicus*: significatività dei confronti tra diete distintamente per giorno. I segni + e - indicano che la significatività è da attribuirsi rispettivamente alla prima o alla seconda dieta del confronto. I confronti non significativi per tutto il periodo sono stati esclusi dalla tabella.

Confronto tra diete	Giorno												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1-3			+						+				++
1-5							+	+	+	+			
1-6							+	+	+	+			
1-7						+		+		+			+
1-8						+							
2-3			+				+		+				+++
2-5							+	+	+	+	+	+	+
2-6							+	+	+	+			
2-7						+		+		+	+	+	++
3-4			-				-		-				---
3-5			-					+					-
3-6			-					+					-
3-7						+		+	-				
3-8							-		-				---
3-9													-
3-11							-		-				-
3-12							-						---
4-5							+	+	+	+	+	+	+
4-6							+	+	+	+	+		
4-7						+		+		+	+	+	+
4-8						+							
5-7									-				
5-8							-	-	-	-	-	-	-
5-11							-	-	-	-	-	-	-
5-12							-	-			-	-	-
6-7									-				+
6-8							-	-	-				
6-11							-	-	-	-	-	-	-
6-12							-	-			-	-	-
7-8								-		-	-	-	--
7-9													-
7-11						-		-		-	-	-	-
7-12						-		-			-	-	-

L'assenza di interazione significativa giorno*dieta per il parametro percentuale di uova mangiate, evidenzia il comportamento simile di tutte le diete nell'intero periodo sperimentale testato (Figura 26).

Figura 26. Percentuale di uova mangiate per le 11 diete testate (esclusa dieta 10) durante tutto il periodo di sperimentazione. Il valore medio registrato è interpolato da una linea.



I valori medi e la deviazione standard delle 11 diete mono e pluri-algali testate su adulti di *C. typicus*, somministrate per un periodo di sperimentazione di 15 giorni, sono riportati in Tabella XXXV.

Tabella XXXV. Risultati delle 11 diete (esclusa Dieta 10) testate su *C. typicus* (valore medio \pm ds) per tutto il periodo di sperimentazione in termini di produzione di uova (uova/femmina), di pellet fecali (Pf/individuo), vitalità delle uova (% di schiusa), percentuale di sopravvivenza degli adulti e percentuale delle uova mangiate.

Dieta 1= MIX 1 (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + RHO $1.7 \cdot 10^4$); **Dieta 2**= MIX 2 (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + TETRA $1.25 \cdot 10^4$); **Dieta 3**= MIX 3 (RHO $1.7 \cdot 10^4$ + TETRA $2.5 \cdot 10^4$); **Dieta 4**= MIX 4 (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + RHO $1.7 \cdot 10^4$ + TETRA $1.25 \cdot 10^4$); **Dieta 5**= MIX 5 (PRO $4.2 \cdot 10^3$ + ISO $4.2 \cdot 10^3$); **Dieta 6**= MIX 6 (PRO $5.5 \cdot 10^3$ + ISO $9 \cdot 10^4$); **Dieta 7**= MIX 7 (RHO $3.3 \cdot 10^4$ + TETRA $1.25 \cdot 10^4$); **Dieta 8**= MIX 8 (RHO $3.3 \cdot 10^4$ + PRO $5.5 \cdot 10^3$); **Dieta 9**= PRO $5.5 \cdot 10^3$; **Dieta 11**= RHO $3.3 \cdot 10^4$; **Dieta 12**= TETRA $2.5 \cdot 10^4$.

Parametri	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
Uova/femmina	25,67 \pm 14,65	36,78 \pm 12,94	11,87 \pm 9,05	35,80 \pm 16,06
Pf/ind	26,04 \pm 5,27	23,01 \pm 5,82	16,78 \pm 15,41	27,09 \pm 10,58
Vitalità	77,96 \pm 20,17	89,03 \pm 6,81	28,11 \pm 30,43	84,11 \pm 14,25
% sopravvissuti	88,89 \pm 15,71	88,89 \pm 7,86	72,06 \pm 29,87	92,31 \pm 8,34
% uova mangiate	13,34 \pm 19,98	7,71 \pm 6,19	7,31 \pm 16,03	1,79 \pm 1,50

Parametri	Dieta 5	Dieta 6	Dieta 7	Dieta 8
Uova/femmina	23,07 \pm 16,65	22,76 \pm 21,22	11,54 \pm 7,40	55,24 \pm 30,97
Pf/ind	9,25 \pm 6,02	15,81 \pm 8,45	28,75 \pm 14,02	86,33 \pm 36,88
Vitalità	62,17 \pm 24,04	55,36 \pm 27,21	54,68 \pm 24,1	66,08 \pm 16,16
% sopravvissuti	67,52 \pm 25,94	71,79 \pm 19,57	63,67 \pm 32,28	88,21 \pm 10,03
% uova mangiate	9,35 \pm 7,88	5,10 \pm 4,88	4,38 \pm 3,33	3,26 \pm 5,97

Parametri	Dieta 9	Dieta 11	Dieta 12
Uova/femmina	21,50 \pm 14,16	13,27 \pm 9,77	8,64 \pm 12,05
Pf/ind	7,33 \pm 6,33	17,24 \pm 9,08	3,47 \pm 3,25
Vitalità	70,87 \pm 23,4	61,05 \pm 28,82	82,19 \pm 17,05
% sopravvissuti	77,07 \pm 17,39	94,87 \pm 12,52	96,15 \pm 9,98
% uova mangiate	14,1 \pm 15,25	4,95 \pm 10,56	1,26 \pm 1,76

Dalla Tabella XXXV si rileva che tra le diete mono-algali (Dieta 9, 11 e 12) testate su *C. typicus*, quella a base di *P. minimum* (Dieta 9) fa registrare la maggiore quantità di uova prodotte (21,50 \pm 14,16; $P < 0,05$). *R. baltica* (Dieta 11) determina il più alto numero di pellet fecali prodotti (17,24 \pm 9,08; $P < 0,001$) ed una percentuale di uova mangiate relativamente bassa (4,95 \pm 10,56) intermedia tra quella determinata dalla Dieta 9 e dalla Dieta 12. Questo è in accordo con i risultati ottenuti dall'analisi del primo gruppo di dati (tutte le diete fino al 6° giorno). La maggiore percentuale di adulti sopravvissuti si riscontra nella Dieta 12 (TETRA= 96,15 \pm 9,98), così come

registrato nel trattamento del primo gruppo di dati. *T. suecica* determina anche la maggiore percentuale di schiusa delle uova ($82,19 \pm 17,05$), anche se tale parametro, però, presenta valori abbastanza elevati anche per le altre due diete. La Dieta 12 è la dieta per la quale si ha anche la più bassa percentuale di uova mangiate ($1,26 \pm 1,76$; $P < 0,01$). Tali risultati sono ad ulteriore conferma che l'alga *Tetraselmis suecica* è un'alga che ben soddisfa le esigenze nutrizionali di *C. typicus*.

Per le diete pluri-algali (Dieta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) testate su *C. typicus*, la Dieta 8 (MIX 8) risulta essere la migliore in termini di produzione di uova ($55,24 \pm 30,97$; $P < 0,001$) seguita dalle Diete 2 e 4 che, rispetto a tutte le altre, determinano un valore significativo di uova ($P < 0,001$). Le Diete 2, 4 e 8 contengono in diverse combinazioni e a diverse concentrazioni le alghe PRO, RHO e TETRA e ciò conferma ulteriormente l'importanza di tali alghe nell'alimentazione di *C. typicus*.

Il parametro numero di pellet fecali/individuo/giorno è parimenti più elevato nella Dieta 8 ($86,33 \pm 36,88$; $P < 0,001$) ed evidenzia i valori significativamente più bassi nelle Diete 5 e 6 ($P < 0,001$). Elevate percentuali di vitalità delle uova (% di schiusa) si registrano nelle Diete 2 (MIX 2= $89,03 \pm 6,81$; $P < 0,01$) e 4 (MIX 4= $84,11 \pm 14,25$; $P < 0,01$), mentre le percentuali di sopravvivenza degli adulti si attestano intorno a dei valori abbastanza elevati in quasi tutte le diete utilizzate. La Dieta 1 (MIX 1) fa registrare la più alta percentuale di uova mangiate ($13,34 \pm 19,98$; $P < 0,05 \div 0,01$), la Dieta 4 (MIX 4) la più bassa ($1,79 \pm 1,50$; $P < 0,05$). In generale possiamo dire che, le performance peggiori sono state registrate per Dieta 3 (MIX 3) e Dieta 7 (MIX 7), cioè le diete nelle quali manca *P. minimum*, sottolineando che tale alga risulta essere ottimale nella dieta di *T. styliifera* e *C. typicus* in termini di dimensioni, contenuto

nutrizionale e digeribilità. Le performance migliori per quel che riguarda tutti e cinque gli aspetti di *C. typicus* considerati, sono da attribuirsi alle Diete 2 (MIX 2= PRO + TETRA), 4 (MIX 4= RHO + TETRA) e 8 (MIX 8= RHO + PRO).

5.3.3 Correlazione tra numero di uova deposte, schiuse e mangiate considerando solo la dieta ad *Isochrysis galbana* (Dieta 10).

L'alimentazione del copepode *C. typicus* con l'alga *I. galbana*, determina una correlazione positiva tra il numero di uova deposte ed il numero di uova schiuse ($r=0,87$, $P<0,05$), confermando quanto già riportato in letteratura dell'importanza del contenuto in DHA di tale alga per la schiusa delle uova. Il numero di uova deposte ed il numero di uova mangiate, invece, tendono ad essere negativamente correlati ($r= -0,32$). Ciò è in contrasto con quanto ci saremmo aspettati dall'impiego, come dieta, della sola alga *I. galbana*. Essendo tale alga insoddisfacente per l'alimentazione degli adulti di copepodi, avremmo dovuto assistere a maggiori fenomeni di cannibalismo e quindi ad una correlazione positiva tra numero di uova deposte e quelle mangiate.

5.3.4 Correlazione tra numero di uova deposte, schiuse e mangiate considerando tutte le diete utilizzate con l'esclusione della dieta ad *Isochrysis galbana* (Dieta 10).

Il numero di uova deposte da *C. typicus* è risultato positivamente e significativamente correlato al numero di uova schiuse per la Dieta 2 (MIX 2) ($r=0,52$, $P<0,0001$), la Dieta 4 (MIX 4) ($r=0,35$, $P<0,05$), la Dieta 5 (MIX 5) ($r=0,40$, $P<0,01$), la Dieta 6 (MIX 6) ($r=0,70$, $P<0,0001$), la Dieta 7 (MIX 7) ($r=0,47$, $P<0,01$) e per la Dieta 8 (MIX 8) ($r=0,35$, $P<0,05$). Una correlazione negativa, invece, esiste

tra il numero di uova deposte ed il numero di uova mangiate per la Dieta 2 (MIX 2) ($r = -0,43$, $P < 0,01$) e la Dieta 4 (MIX 4) ($r = -0,32$, $P < 0,05$), indicando che tali diete soddisfano nutrizionalmente i copepodi ed evitando, così, fenomeni di cannibalismo.

5.4 Allevamento intensivo di copepodi Calanoidi nell'impianto pilota

In un efficiente sistema di allevamento, risulta necessario ottimizzare sia la sopravvivenza degli adulti che la loro riproduzione (elevato numero di uova ed elevata percentuale di schiusa). Dalle indagini in piccoli volumi condotte in questo studio, la percentuale di sopravvivenza degli adulti di *Temora stylifera* è stata ottimizzata con *Prorocentrum minimum* e *Rhodomonas baltica*. Queste due alghe ottimizzano anche la produzione di uova e la loro vitalità. La dieta iniziale per *T. stylifera*, come già riportato precedentemente, era costituita da *Prorocentrum minimum* ad una concentrazione di $5,5 \cdot 10^3$ cell/ml ed *Isochrysis galbana* ad una concentrazione di $9 \cdot 10^4$ cell/ml. La concentrazione di *I. galbana* è stata poi modificata a $3,4 \cdot 10^4$ cell/ml. La scelta di tale concentrazione è scaturita dal fatto che l'iniziale concentrazione di *I. galbana* rendeva l'acqua di allevamento estremamente torbida, il conteggio algale in vasca anche dopo 24 ore risultava essere molto alto e gli animali adulti mostravano un evidente appesantimento con scarsa motilità.

Per *Centropages typicus*, invece, la sopravvivenza degli adulti è stata ottimizzata con l'impiego delle alghe *R. baltica* e *Tetraselmis suecica*, la produzione di uova con *P. minimum* ed infine, la vitalità con l'utilizzo di *P. minimum*, *R. baltica* e *T. suecica*.

T. suecica, pertanto, risulta un'alga molto importante nella dieta di questo copepode Calanoide. Ricordiamo che per *C. typicus*, la dieta era costituita da *Tetraselmis*

suecica ad una concentrazione di $1,25 \cdot 10^4$ cell/ml, *Prorocentrum minimum* ad una concentrazione di $5,5 \cdot 10^3$ cell/ml ed *Isochrysis galbana* ad una concentrazione di $3,4 \cdot 10^4$ cell/ml. Nelle diete di entrambe le specie di copepodi si è voluto comunque includere *I. galbana* perché quest'alga risulta avere dimensioni ottimali per la predazione da parte dei nauplii e per l'alto contenuto in DHA che influenza positivamente la schiusa delle uova. L'alga *Rhodomonas baltica* è stata utilizzata ad una concentrazione di $3,3 \cdot 10^4$ cell/ml in aggiunta a *P. minimum* quando la densità di questa coltura non era sufficiente a coprire il fabbisogno alimentare, essendo queste due alghe simili come rapporto DHA/EPA.

Miglioramenti nei risultati, in termini di allevamenti in grandi volumi e a lungo termine per *T. stylifera* e *C. typicus*, si possono ottenere continuando a testare miscele di alghe sui copepodi oggetto di studio.

Gli andamenti in vasca per le due specie di copepodi allevati nell'impianto pilota a circuito chiuso ed alimentati con miscele di alghe unicellulari che hanno determinato i migliori risultati per la produzione di uova/femmina/giorno, maggiore produzione di pellet fecali/individuo/giorno, maggiore percentuale di uova schiuse, maggiore percentuale di adulti sopravvissuti e minore percentuale di uova mangiate, sono di seguito riportati.

5.4.1 Densità in vasca della popolazione di *Temora stylifera*

In seguito all'inoculo in vasca di nauplii, copepoditi ed adulti ottenuti dall'allevamento in becker, si è avuto un progressivo aumento dell'intera popolazione fino a raggiungere un valore massimo nel mese di aprile (No. individui= 55250) (Figura 27). Dopo tale periodo si è assistito ad un lento declino del numero di

organismi fino ad un minimo (300) intorno alla metà di giugno, dovuto a contaminazioni e ad una crescente presenza di una specie di copepodi bentonici infestanti, gli Harpacticoidi. Contaminazioni delle colture di copepodi hanno rappresentato un problema abbastanza importante per questo studio. Fallimenti di alcune colture di copepodi a raggiungere lo stadio di produzione di nauplii, sono stati dovuti probabilmente ad una proliferazione di batteri in colture algali e conseguentemente nelle colture di copepodi. Clorinizzazione/declorinizzazione dell'acqua di allevamento dei copepodi prima di essere utilizzata, come effettuato in questo studio e in Schipp *et al.* (1999), ha permesso di migliorare efficacemente l'igiene delle colture algali e prevenire il bloom batterico. Le infestazioni da Harpacticoidi, che hanno influenzato l'andamento di crescita in vasca della popolazione di *T. stylifera* per alcuni periodi della sperimentazione, si sarebbero potuti prevenire utilizzando un apparato più spinto di filtrazione dell'acqua di riempimento del sistema, accanto ad una sterilizzazione con U.V.A. Per combattere tali infestazioni si è deciso, pertanto, di svuotare, disinfettare l'intero impianto e riempirlo con acqua di mare pulita e filtrata a 1 µm. Trascorso il periodo necessario per la maturazione del filtro, in agosto si è reso necessario un nuovo inoculo di *T. stylifera* da popolazione selvatica riallevata dapprima in becker, ma il problema degli Harpacticoidi sembrava persistere anche se di entità molto minore. In settembre, quando il problema Harpacticoidi sembrava essere scemato del tutto, si è effettuato un ulteriore inoculo di *T. stylifera* consistente in circa 1000 adulti, 1000 copepoditi e 26.300 nauplii. Da questo momento in poi, il sistema è entrato a regime con una popolazione di copepodi in continua crescita.

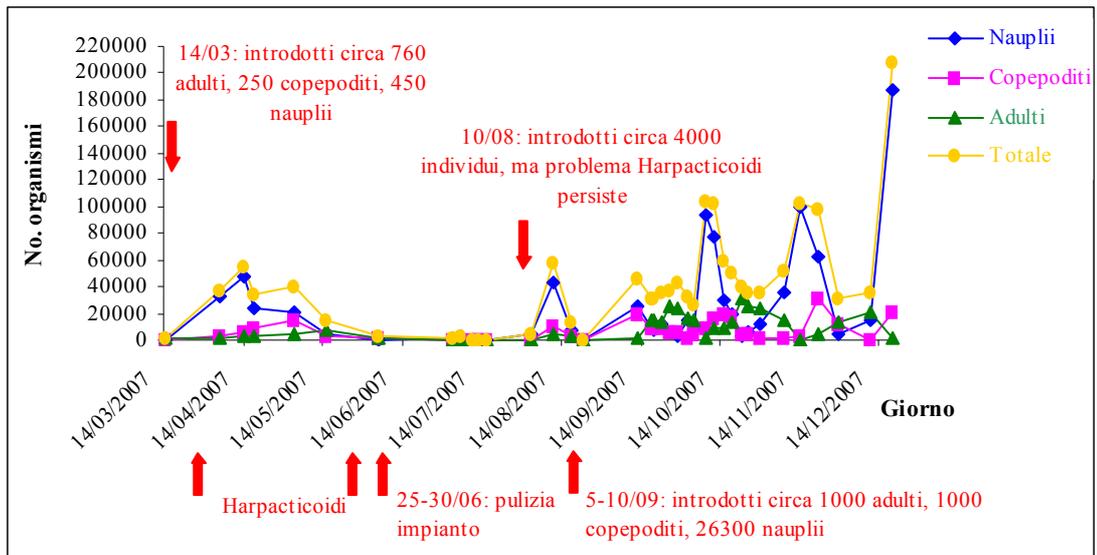


Figura 27. Censimento in vasca di *Temora stylifera*

Il 19 dicembre 2007, giorno dell'ultimo censimento, sono stati rilevati: 186.750 nauplii, 20.148 copepoditi e 1.494 adulti, per un totale di 208.662 individui (pari ad una densità di 0,42 ind/ml).

Conte su 500 ml di campione d'acqua sono state condotte contemporaneamente sia fuori che dentro il filtro, in presenza ed in assenza di luce nel filtro stesso, per verificare se i nauplii fossero fotoattratti. Tali conte hanno dimostrato che gli animali effettivamente si concentravano maggiormente nel filtro in presenza di luce. Il numero più alto di nauplii concentrati è stato di 54.200 (Figura 28).

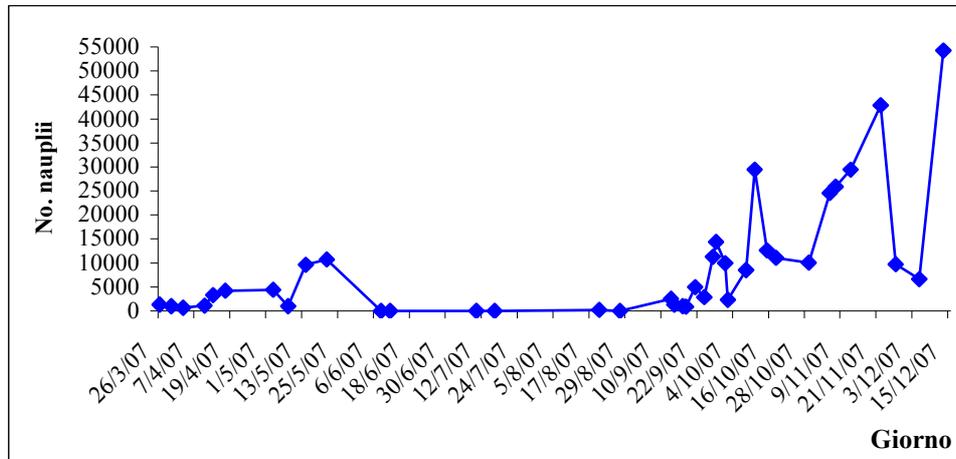


Figura 28. Concentrazione nauplii di *Temora stylifera*.

Da un confronto dei grafici della concentrazione e censimento dei nauplii (Figura 29), si osserva che entrambi hanno un andamento simile ma che il numero dei nauplii censiti è nettamente superiore a quelli concentrati. La differenza numerica che si riscontra tra i nauplii (e copepoditi) censiti e concentrati sia di *T. stylifera* che di *C. typicus*, potrebbe essere legata a diversi fattori come: 1) il tempo che intercorre tra l'accensione della luce all'interno del filtro e la concentrazione dei nauplii, è troppo breve affinché i nauplii si possano tutti trasferire nel filtro; 2) un solo ciclo di concentrazione non è probabilmente sufficiente a concentrare tutti i nauplii presenti in vasca; 3) le alghe in sospensione, col passare delle ore, potrebbero ostruire le maglie del filtro impedendo l'ingresso dei nauplii nel filtro stesso; 4) il sistema di concentrazione non è efficace e pertanto necessita di revisione.

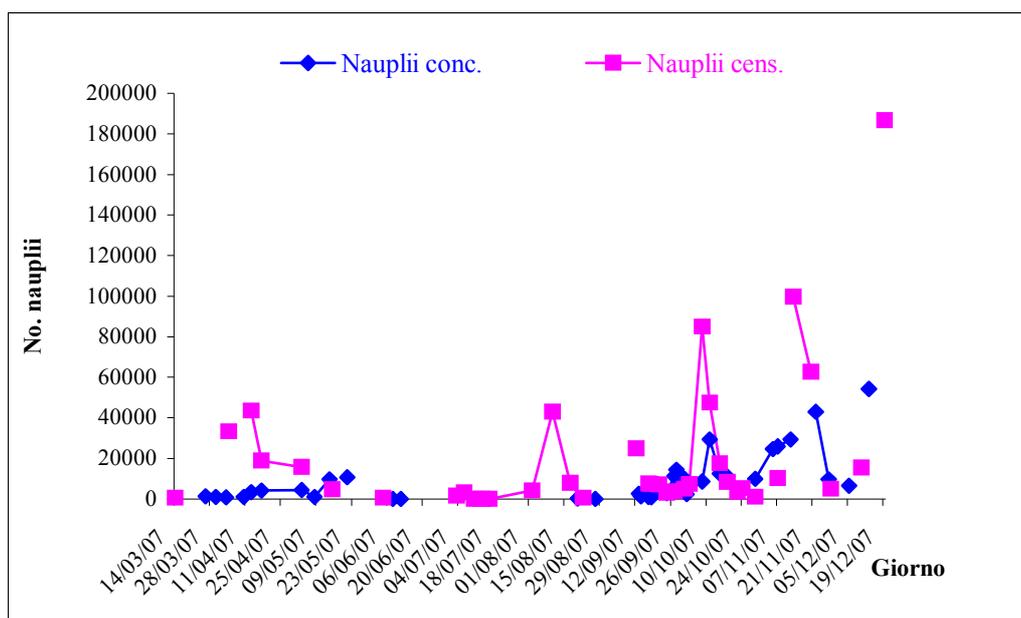


Figura 29. Confronto tra concentrazioni e censimenti dei nauplii di *Temora stylifera*.

Ammoniacca, nitriti e nitrati nell'acqua di allevamento si sono attestati, nel corso della sperimentazione, intorno a dei valori ben al di sotto (0.03 mg/l per NH_3 , 0.03 per NO_2^- e 0.2 per NO_3^-) di quelli registrati da Buttino (1994), per i quali concentrazioni di ammoniacca pari a 0.12 ppm ridurrebbero la produzione di uova e la percentuale di schiusa in *Acartia clausi*. Ciò sta ad indicare che l'impianto riesce a sopportare bene il carico organico immesso e/o prodotto, ed in particolare il filtro biologico abbatte efficacemente l'ammoniacca prodotta dai copepodi in nitriti, nitrati ed infine in azoto gassoso, ad opera di colonie batteriche specifiche che si sono insediate sul materiale filtrante (*bioring*). La raccolta di pellet fecali dalle vasche si sarebbe potuta migliorare e/o facilitare, realizzando dei filtri spugnosi immersi in prossimità del fondo vasca, così come proposto nell'impianto di Payne & Rippingale (2001a).

5.4.2 Densità in vasca della popolazione di *Centropages typicus*.

L'allevamento in vasca del copepode *Centropages typicus* è stato possibile effettuarlo solamente dal mese di gennaio 2008. Tale impossibilità è stata legata al fatto che la presenza di adulti di *C. typicus* nel Golfo di Napoli da novembre 2006 a novembre 2007, era scarsa. Femmine adulte di *C. typicus* sono generalmente abbondanti tra febbraio e maggio, ma la fecondità è ristretta ad un più breve periodo mostrando una preferenza per le basse temperature (Carotenuto *et al.*, 2006). Probabilmente l'insolito caldo dell'inverno 2006-2007 ha inciso sulla presenza in mare di *C. typicus*. In seguito all'inoculo in vasca di adulti, copepoditi e nauplii di *C. typicus* (Figura 30), la densità di popolazione è notevolmente incrementata per tutto il mese di gennaio, seguita però, da un improvviso crollo all'inizio di febbraio. Tale crollo è stato causato da un repentino aumento della temperatura dell'acqua in vasca a causa di un blocco dei climatizzatori. Infatti, non appena ristabilito il normale range di temperatura, la popolazione ha ripreso ad aumentare nuovamente in maniera esponenziale, raggiungendo il 28 febbraio 2008 un numero totale di individui pari a 120.030 (valore più alto registrato durante tutto il periodo di monitoraggio). Per quasi tutto il mese di marzo si è assistito ad un lento declino della popolazione in vasca, dovuto ad un continuo prelievo di nauplii per prove di alimentazione larvale di *Amphiprion clarkii* (Olivotto *et al.*, 2008b). Probabilmente il tempo che intercorreva tra la deposizione delle uova e la loro schiusa ed il prelievo dei nauplii era troppo breve affinché le raccolte potessero essere numericamente soddisfacenti. Non appena si è cessato il prelievo, la popolazione ha ripreso nuovamente ad aumentare. Il censimento di *C. typicus* è stato condotto esattamente allo stesso modo di *T. stylifera*.

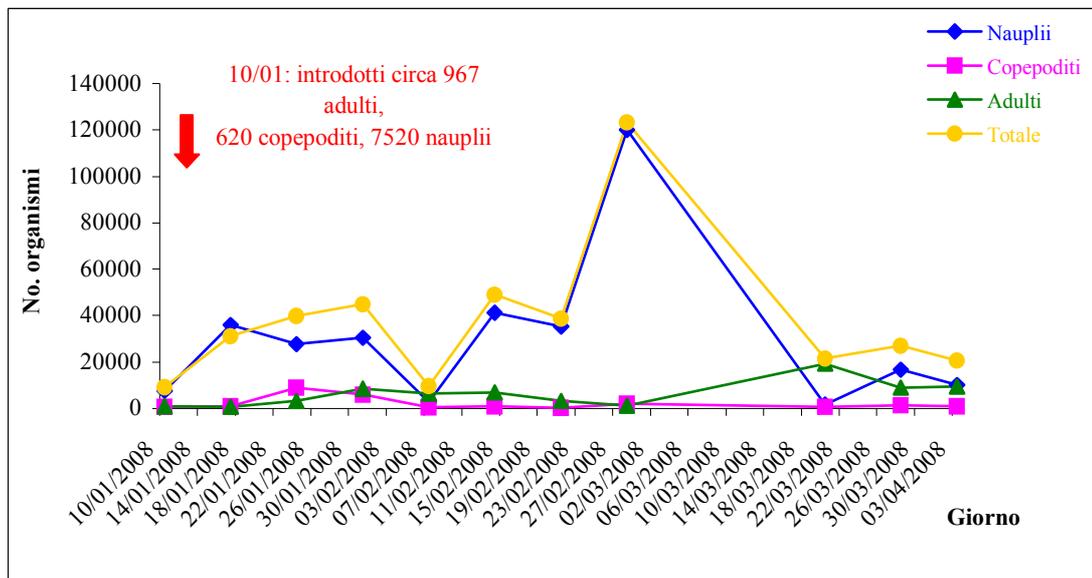


Figura 30. Censimento in vasca di *Centropages typicus*.

Anche nel caso dei nauplii di *C. typicus* le concentrazioni sono state effettuate con l'impiego della lampada ad immersione posizionata all'interno del filtro e con un procedimento esattamente identico a quello usato per *T. stylifera*. Il numero più alto di nauplii concentrati è stato di 16.240 (Figura 31).

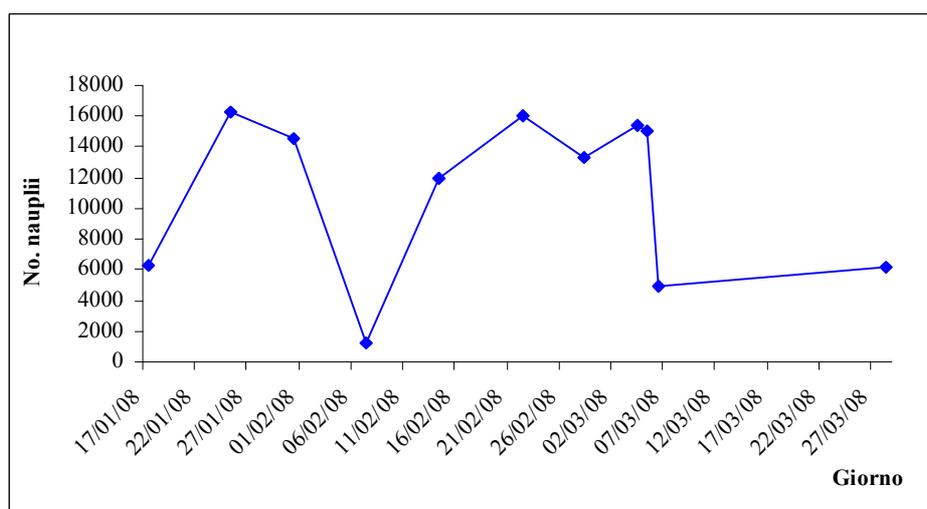


Figura 31. Concentrazione nauplii di *Centropages typicus*

Da un confronto dei grafici della concentrazione e censimento dei nauplii (Figura 32), anche nel caso di *C. typicus* si osserva che entrambi gli andamenti sono simili e che il numero dei nauplii censiti è superiore a quelli concentrati. Anche per le concentrazioni di *C. typicus* potrebbero essere valide le motivazioni paventate per *T. stylifera*.

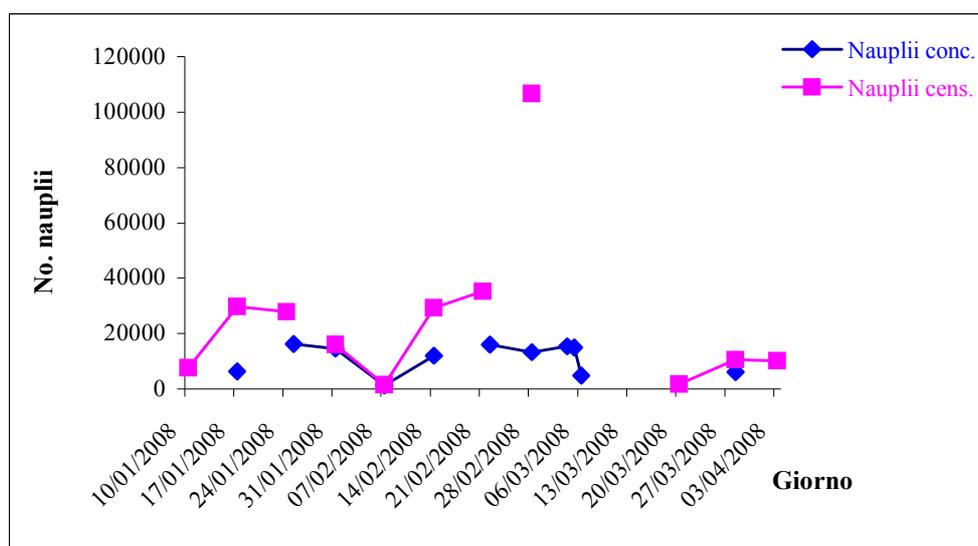


Figura 32. Confronto tra concentrazioni e censimenti dei nauplii di *Centropages typicus*

Le produzioni di nauplii e/o copepoditi di *T. stylifera* e *C. typicus* nelle vasche di allevamento di 500 l, sono state condotte per periodi di tempo non molto lunghi (circa 280 giorni e 85 giorni per le rispettive specie). Se si confrontano tali valori di produzione con quelli ottenuti da altri autori, appare evidente come la nostra produzione di copepodi risulta essere piuttosto bassa (Tabella XXXVI).

Tabella XXXVI. Confronti di produzioni di copepodi (copepodi/l/giorno) in sistemi di allevamento intensivo. Le densità rappresentano una produzione media naupliare/copepodite per tutto il periodo di allevamento.

Specie di copepodi	Durata dell'allevamento (giorni)	Produzione di copepodi (cop/l/giorno)	Referenze
Calanoidi			
<i>Acartia tonsa</i>	16	91 (tutti gli stadi)	Ogle (1979)
<i>A. tonsa</i>	~ 28	213 (nauplii)	Støttrup <i>et al.</i> (1986)
<i>Gladioferens imparipes</i>	420	878 (nauplii)	Payne and Rippingale (2001)
<i>Temora stylifera</i>	280	57 (nauplii e copepoditi)	Questo studio
<i>Centropages typicus</i>	85	47 (nauplii e copepoditi)	Questo studio
Harpacticoidi			
<i>Amphiascoides atopus</i>	49	1144 (tutti gli stadi)	Sun and Fleeger (1995)
<i>Tisbe holothuriae</i>	43	3333 (nauplii e copepoditi)	Støttrup and Norsker (1997)

Le differenze numeriche di tali confronti possono essere spiegate tenendo presente che le densità di adulti nelle colture di Calanoidi sono inferiori rispetto agli Harpacticoidi, a parità di volume di allevamento. Pertanto, produzioni di nauplii, provenienti da allevamenti intensivi di copepodi Harpacticoidi, sono generalmente più elevate per i Calanoidi. Ciò sembrerebbe essere legato alla differente ecologia delle due classi di copepodi: gli Harpacticoidi sono generalmente epibentonici detritivori, mentre i Calanoidi sono planctonici sospensivori.

In condizioni di allevamento, la densità di popolazione degli Harpacticoidi è limitata dall'area della superficie interna, laddove la densità di popolazione dei Calanoidi è limitata dal volume d'acqua. L'area della superficie interna in piccole vasche di allevamento, può essere incrementata aggiungendo substrato rappresentato da biglie di plastica (Støttrup and Norsker, 1997). Per incrementare la popolazione di

Calanoidi, invece, si richiedono vasche di allevamento di grandi volumi, con conseguente richiesta di maggiori spazi e fornitura d'acqua. L'elevato numero di nauplii di *Gladioferens imparipes* ottenuto dallo studio di Payne e Rippingale (2001), potrebbe essere parzialmente spiegato da un pattern comportamentale che è inusuale per i Calanoidi. Come gli Harpacticoidi, stadi ultimi di copepoditi ed adulti di *G. imparipes* restano attaccati con il dorso alle superfici interne delle vasche di allevamento, o dei substrati, continuando, così, ad alimentarsi nella colonna d'acqua ed investendo l'energia acquisita in crescita e riproduzione anziché in un dispendio per il nuoto. Inoltre, la maggiore quantità di copepodi registrata da Ogle (1979) per *A. tonsa* e da Payne e Rippingale (2001) per *G. imparipes*, è da attribuirsi al fatto che questi due copepodi Calanoidi sono specie di aree sub-temperate con tempi generazionali molto veloci, a differenza dei Calanoidi di acque temperate che hanno cicli vitali più lunghi riducendo la possibilità di ottenere elevate biomasse in brevi periodi di tempo (Carotenuto *et al.*, 2002).

Sulla base del numero di giorni di allevamento in vasca, appare evidente che il numero di nauplii e copepoditi di *Temora stylifera* e *Centropages typicus* prodotti nell'impianto pilota a circuito chiuso non risulterebbe sufficiente a soddisfare le quantità di cibo vivo richieste in protocolli di alimentazione standard, generalmente applicati negli impianti di produzione acquacolturale (<http://www.fao.org>). Periodi di allevamento più lunghi, associati ad ulteriori test algali per una continua ottimizzazione della riproduzione e vitalità di questi due copepodi, potrebbero portare a dei risultati di sicura applicazione acquacolturale.

Se si considera il protocollo di alimentazione adottato da Olivotto e collaboratori (2008b) per larve di *Amphiprion clarkii* alimentate con il copepode *C. typicus*

prodotto nel nostro impianto, ed i risultati da loro ottenuti, si può affermare che la produzione di copepodi in tale impianto risulterà sufficiente per l'alimentazione di pesci ornamentali.

Una ulteriore applicazione di tale impianto è quella di poter allevare *T. stylifera* e *C. typicus* come animali modello per lo studio di processi ecologici in ambienti marini, come la valutazione dell'impatto ambientale di composti chimici o di nutrienti, gli effetti di stressori ambientali, ecc.

5.5 Sopravvivenza delle larve di orata e valutazione della qualità delle larve alimentate ad *Artemia* e con il copepode *Temora stylifera*: contenuto in acidi grassi polinsaturi (PUFA).

La produzione globale di acquacoltura è stata di 547 milioni di tonnellate nel 2003 (FAO, 2006), ed è aumentata annualmente di circa il 9% (Naylor and Burke, 2005), con il risultato di un incremento della richiesta del pesce come cibo. L'alimentazione rappresenta il costo di produzione più elevato per l'industria acquacolturale, cosicché miglioramenti dell'efficienza alimentare in sistemi di produzione ha un'elevata priorità. Inoltre, il prezzo del pesce è notevolmente aumentato negli ultimi trent'anni e la tendenza è quella di ulteriori aumenti legati ad una sempre più crescente richiesta da parte del mercato. Il pesce è una risorsa in rapido declino e ci sono serie conseguenze ambientali legate al continuo sfruttamento degli stock naturali. Pertanto, per sopperire a tale sfruttamento e per far fronte ad un mercato in continua espansione, nuove tecniche acquacolturali stanno diventando altamente ricercate (Patil *et al.*, 2007). Molti dei pesci marini, come quelli appartenenti alla famiglia

degli Sparidae, hanno larve che sono facilmente accresciute utilizzando i rotiferi come cibo. Altri pesci, come quelli delle famiglie dei Lutjanidae e Serranidae, risultano essere molto più problematici per l'allevamento e la maggiore difficoltà risiede proprio nella fornitura di cibo appropriato per le larve. In natura, molti pesci marini dipendono dai copepodi come primo alimento, ma solamente poche specie di copepodi marini sono stati allevati con successo, su di una scala, però, che non è adatta per l'impiego in acquacoltura (Rippingale and Payne, 2001).

Studi condotti sul contenuto stomacale di larve selvatiche di pesci hanno mostrato l'importanza di includere i copepodi nella loro dieta: essi migliorano la resistenza allo stress, la pigmentazione della pelle e la percentuale di sopravvivenza delle larve durante lo sviluppo (Stottrup and Norsker, 1997). Inoltre, i copepodi sono digeriti dalle larve molto più facilmente rispetto all'*Artemia* (Luizi *et al.*, 1999).

Nel presente studio, percentuali di sopravvivenza delle larve di *Sparus aurata* sono state calcolate per le diete a *Temora stylifera* e ad *Artemia*, e riportate nella Figura 33.

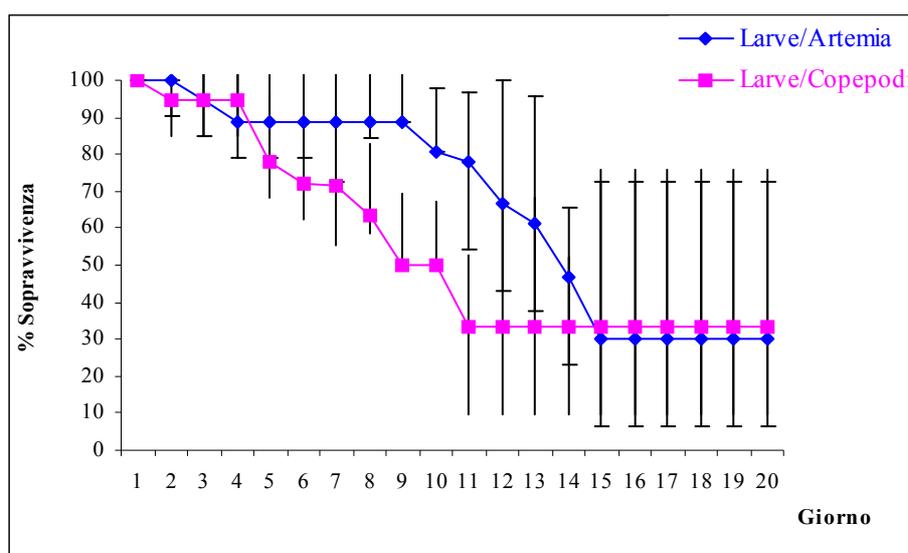


Figura 33. Percentuali di sopravvivenza delle larve di *Sparus aurata* L. alimentate rispettivamente ad *Artemia salina* e con il copepode *Temora stylifera* (media \pm ds).

Le larve alimentate ad *Artemia* hanno presentato una sopravvivenza del 100% solamente nei primi due giorni di sperimentazione. Tale sopravvivenza è scesa a circa l'88%, mantenendosi a tale valore fino al 9° giorno, per poi decrescere gradatamente fino ad un valore del 30% al 15° giorno. Tale valore si è mantenuto costante fino alla fine della sperimentazione. Nel caso delle larve alimentate con il copepode *Temora stylifera*, la sopravvivenza è lentamente diminuita dal 2° all'11° giorno fino ad un valore del 33%. Tale valore si è mantenuto costante fino alla fine della sperimentazione ed è simile a quello registrato per le larve alimentate ad *Artemia*.

La mortalità delle larve potrebbe essere stata causata da stress da confinamento. La scelta di effettuare i test di appetibilità del copepode *T. stylifera* su larve di pesce in cristallizzatori da 200 ml, si è resa necessaria in base alla quantità di alimento da fornire alle larve. Cristallizzatori, o comunque vaschette di volume maggiore, avrebbero previsto una fornitura di prede vive, in termini quantitativi, maggiore rispetto a quanto effettivamente si riusciva a somministrare. In altre parole, la produzione di nauplii/copepoditi di *T. stylifera* nell'impianto a circuito chiuso non era sufficiente a soddisfare il numero di prede per larva per giorno richiesto in un protocollo di alimentazione standard.

Le larve nei cristallizzatori hanno mostrato un attivo comportamento di predazione in presenza di entrambe le fonti di cibo. Molti pellet fecali ed esuvie di copepodi erano presenti sul fondo dei cristallizzatori a dimostrazione di un'avvenuta ingestione/digestione delle prede (Figura 34).

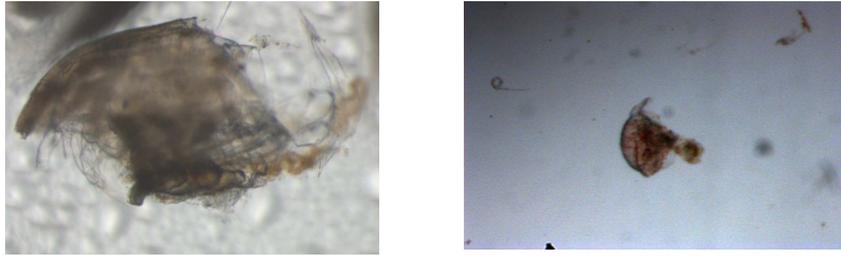


Figura 34. Esuvie di copepodi ritrovate nei pellet fecali delle larve di *Sparus aurata* L.

La predazione dei copepodi da parte delle larve è stata ulteriormente confermata da filmati ottenuti mediante un sistema di video-registrazione gentilmente messo a disposizione dalla Dott.ssa Mazzocchi e dal Dr. Giuseppe Bianco (SZN). Anche il contenuto stomacale ha confermato l'avvenuta ingestione dei copepodi, come evidenziato nella Figura 35.

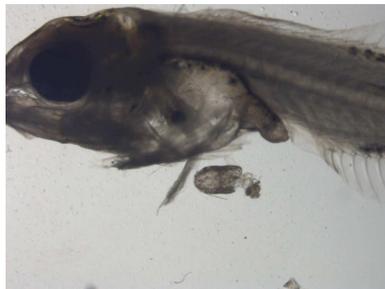


Figura 35. Larva alimentata a copepodi

La composizione delle principali classi di acidi grassi del copepode *Temora styliфера* (stadii NIII-CII) alimentato con *P. minimum* ed *I. galbana*, dei nauplii di *Artemia salina* appena schiusi e dei metanauplii di *Artemia salina* arricchiti con *Isochrysis galbana* per 24 h, è riportata nella tabella XXXVII, mentre quella relativa alle larve di *Sparus aurata* L. alimentate con il copepode *Temora styliфера* ed *Artemia* a differenti concentrazioni è riportata nelle Tabelle XXXVIII e XXXIX.

Tabella XXXVII. Composizione di acidi grassi del copepode *Temora stylifera* (stadii NIII-CII) arricchito con *P. minimum* e *I. galbana*, dei nauplii di *Artemia salina* appena schiusi e dei metanauplii di *Artemia salina* arricchiti con *I. galbana* per 24 h (-: non rilevato).

Acidi grassi	NIII-CII	Nauplii	Metanauplii
	<i>Temora stylifera</i>	<i>Artemia salina</i>	<i>Artemia salina</i> + <i>I. galbana</i>
C12:0	6,9	1,6	-
C13:0	-	0,8	-
C14:1	-	0,9	-
C14:0	3,8	3,9	5,0
C15:0	0,3	-	-
C16:1	2,7	11,2	4,9
C16:0	20,4	9,8	12,9
C17:1	1,1	-	-
C17:0	0,98	-	-
C:18 ins	28,2	19,6	27,4
C18:0	10,9	4,4	5,8
C19:1	-	-	-
C20:4 n-6 (AA)	2,01	10	0,7
C20:5 n-3 (EPA)	5,2	11,3	2,9
C20:2	-	-	-
C20:1	-	-	-
C22:6 n-3 (DHA)	26,4	9,9	0,9
C22:5	-	1,2	-
C22:1 / C22:2	5,3	5,7	-
C22:0	2,5	1,0	-
EPA/AA	2,5	1,1	4,1
DHA/EPA	5,1	0,9	0,3

I valori rappresentano le percentuali relative di ciascun acido grasso sul totale degli acidi grassi.

Tabella XXXVIII. Composizione di acidi grassi di larve di *Sparus aurata* L. alimentate con il copepode *Temora stylifera* a differenti concentrazioni (41gg: 100% copepodi; 45gg: 90% cop – 10% pellet; 47gg: 70% cop – 30% pellet; 49gg: 50% cop – 50% pellet; 50gg: 40% cop – 60% pellet; 54gg: 100% pellet) (-: non rilevato).

Acidi grassi	Larve 41 gg	Larve 45 gg	Larve 47 gg	Larve 49 gg	Larve 50 gg	Larve 54 gg
C14:0	0,7	-	1,9	1,3	-	1,1
C15:0	1,6	0,9	0,4	0,6	0,7	0,3
C16:1	4,9	2,9	4,1	2,3	1,7	5,3
C16:0	8,2	12,2	10	12,5	15,7	10,8
iso/anteiso C17	-	9,2	-	-	2,8	-
C17:1	10,7	1,5	1,6	2,1	1,8	0,7
C17:0	3,4	1,1	0,5	1	1,5	0,9
C:18 ins	39,4	15,7	38,5	23,5	16	31,7
C18:0	6,6	15,2	5,8	10,1	23,5	6,8
C19:1	2,3	10,3	-	0,6	-	-
AA C20:4	5,8	5,8	5,5	8,3	7,1	6
EPA C20:5	8,2	5,6	9,6	8,1	6,6	11,5
C20:2	-	-	0,9	-	-	-
C20:1	-	-	1,3	-	-	-
DHA C22:6	6,5	19,9	15,1	29,7	22,6	21,1
C22:5	1,8	-	-	-	-	3,7
C22:1 / C22:2	-	-	2,5	-	-	-
C22:0	-	-	2,4	-	-	-
EPA/AA	1,4	0,96	1,8	0,97	0,93	1,9
DHA/EPA	0,8	3,6	1,6	3,7	3,5	1,8

I valori rappresentano le percentuali relative di ciascun acido grasso sul totale degli acidi grassi.

Tabella XXXIX. Composizione di acidi grassi di larve di *Sparus aurata* L. alimentate con *Artemia salina* a differenti concentrazioni (45gg: 90% Art. – 10% pellet; 47gg: 70% Art. – 30% pellet; 49gg: 50% Art. – 50% pellet; 51gg: 30% Art. – 70% pellet; 54gg: 100% pellet) (-: non rilevato).

Acidi grassi	Larve 45 gg	Larve 47 gg	Larve 49 gg	Larve 51 gg	Larve 54 gg
C14:0	0,5	0,3	0,5	-	0,8
C15:0	1,5	1	1,1	0,96	0,6
C16:1	4,4	3,3	2,1	2,5	1,8
C16:0	8,2	7,3	9	14,4	9,9
C17:1	8,7	7,5	7,9	6,5	4,8
C17:0	3,1	2,7	2,6	3,1	2,3
C:18 ins	37,1	39,7	31,6	29,9	34,5
C18:0	6,7	7,4	9,9	15,1	8,5
C20:1	-	-	-	6,3	-
C19:1	2,0	1,9	2,2	1,7	-
AA C20:4	8,5	6,8	10	4,7	8,5
EPA C20:5	8,5	8,9	11,1	6,5	9,6
C20:2	-	0,8	-	-	-
C20:1	-	0,3	-	-	-
DHA C22:6	8,2	8	12,1	8,2	14,6
C22:5	2,5	-	-	-	4
C22:1 / C22:2	-	0,9	-	-	-
C22:0	-	3,2	-	-	-
EPA/AA	1	1,3	1,1	1,4	1,1
DHA/EPA	0,96	0,9	1,1	1,3	1,5

I valori rappresentano le percentuali relative di ciascun acido grasso sul totale degli acidi grassi.

Una significativa percentuale di acidi grassi saturi, come il miristico (C14:0), il palmitico (C16:0) e lo stearico (C18:0), sono presenti nei nauplii/copepoditi di *T. styliifera* (Tabella XXXVII) e nelle larve alimentate con questo copepode (Tabella XXXVIII), rispetto ai nauplii e metanauplii di *Artemia* (Tabella XXXVII) e alle larve alimentate con *Artemia* (Tabella XXXIX). Il gruppo dei C18-insaturi, è rappresentato in cospicue percentuali in tutti gli organismi considerati.

Gli acidi grassi saturi e soprattutto quelli mono-insaturi presentano un elevato contenuto calorico e pertanto vengono utilizzati come una sorgente o una forma di riserva di energia in tutti gli stadi di sviluppo.

Il contenuto di AA, EPA e DHA nel gruppo di larve alimentate con *T. stylifera* è andato via via aumentando durante il corso della sperimentazione, al termine del quale AA rappresentava il 6%, EPA l'11% e DHA il 21%, rispetto al totale degli acidi grassi. Gli stadi di *T. stylifera* (NIII-CII), impiegati come alimento vivo, contenevano il 2% di AA, il 5% di EPA e il 26% di DHA, rispetto al totale degli acidi grassi (Tabella XXXVII).

Invece, il gruppo di larve alimentate con nauplii e metanauplii di *Artemia salina* presentano un contenuto in EPA (9.6%) e DHA (14.6%) (Tabella XXXIX) inferiore rispetto alle larve del primo gruppo (Tabella XXXVIII). Dalla Tabella XXXVII risulta evidente che in *Artemia salina* vi è una diminuzione di EPA e DHA nel passaggio da nauplio (EPA 11%, DHA 9.9%) a metanauplio (EPA 2.9%, DHA 0.9%), sebbene quest'ultimo sia stato arricchito con *I. galbana*.

In pratica, il contenuto in percentuale di AA, EPA e DHA della larva, sia alimentata a copepodi che ad *Artemia*, era una conseguenza del contenuto in percentuale di AA, EPA e DHA dell'organismo impiegato come alimento vivo. Quello con il più alto contenuto in DHA (*T. stylifera*), darebbe il più alto contenuto in DHA nelle larve.

I livelli relativi ed assoluti di AA, EPA e DHA nella dieta delle larve di pesci marini, hanno ricevuto una considerevole attenzione negli ultimi anni (Castell *et al.*, 1994; Reitan *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1996, Sargent *et al.*, 1997). AA ed EPA sono rispettivamente coinvolti nella produzione e modulazione degli acidi grassi "eicosanoidi", mentre il DHA è responsabile del normale sviluppo neurale e della retina, della pigmentazione (Estevez and Kanazawa, 1996), del raggruppamento degli adulti in banchi (Masuda *et al.*, 1998), nonché del corretto mantenimento di tutte le funzioni fisiologiche (Brett & Muller-Navarra, 1997). Le percentuali relative

di AA, EPA e DHA rispetto ai lipidi totali ed i rapporti EPA:AA e DHA:EPA nelle larve di orata alimentate rispettivamente a copepodi e ad *Artemia*, rilevate nel presente studio, sono riportate nelle Figure 36 e 37.

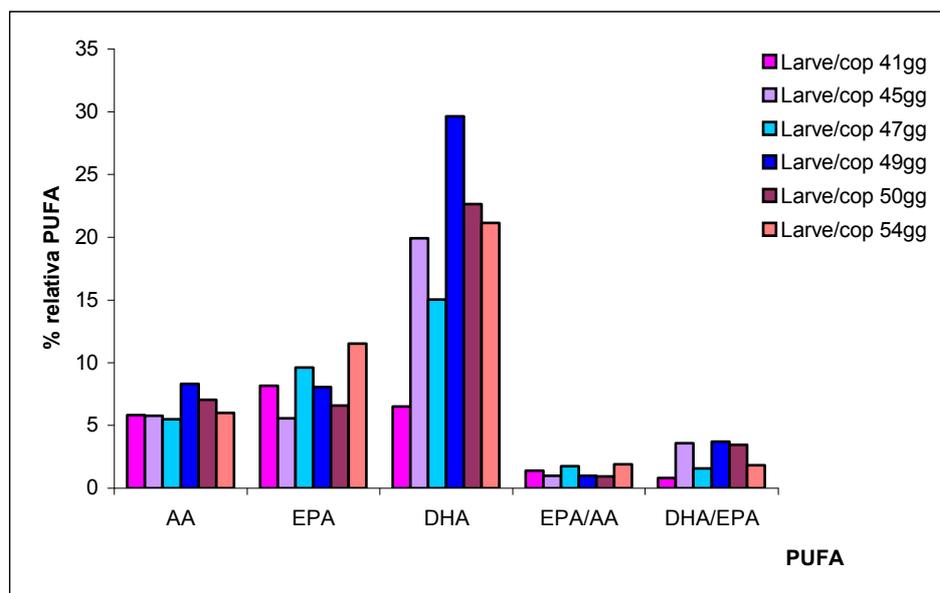


Figura 36. Percentuali relative di AA, EPA e DHA rispetto ai lipidi totali e rapporti EPA/AA ed EPA/DHA in larve di *Sparus aurata* alimentate con il copepode *Temora stylifera*.

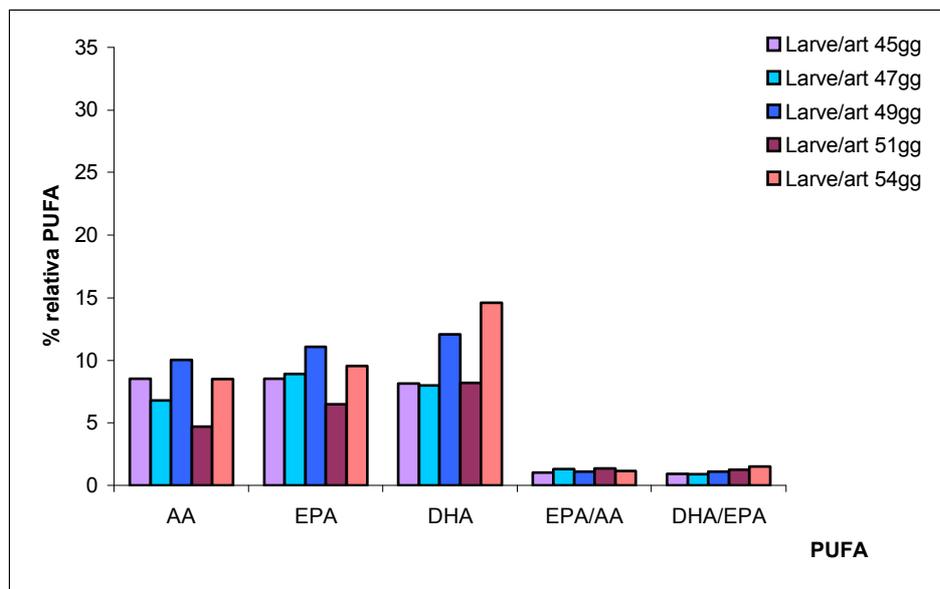


Figura 37. Percentuali relative di AA, EPA e DHA rispetto ai lipidi totali e rapporti EPA/AA ed EPA/DHA in larve di *Sparus aurata* alimentate con *Artemia salina*.

In letteratura si riporta che diete contenenti DHA ed EPA in un rapporto approssimativamente pari a 2:1, sono altamente raccomandate per un corretto sviluppo larvale (Sargent, 1995; Sargent *et al.*, 1997, Rainuzzo *et al.*, 1997) e che qualunque variazione nel contenuto in PUFA, che porti ad un allontanamento da tale rapporto, causerebbe gravi conseguenze al normale sviluppo larvale.

Grandi quantità di EPA rispetto a DHA, però, potrebbero creare un disequilibrio nella composizione strutturale dei fosfolipidi di membrana, che a sua volta, potrebbe influenzare la normale crescita e sviluppo della larva. Watanabe (1993) ha suggerito che tale disequilibrio potrebbe risultare in una scarsa vitalità larvale, sebbene non sia ancora chiaro come EPA possa disturbare la struttura delle membrane. Al contrario, alti livelli di DHA rispetto ad EPA, sono positivamente correlati al successo di pigmentazione delle larve di rombo (Rainuzzo *et al.*, 1994; Reitan *et al.*, 1994), di crescita e sopravvivenza nelle larve di orata (Rodriguez, 1994). Bell e collaboratori (1985) hanno sperimentato che incrementando il rapporto DHA:EPA da 0.1 a 0.5 nella dieta delle larve di rombo, la sopravvivenza delle larve aumentava marcatamente.

Nel presente studio le analisi biochimiche hanno rilevato che nelle larve alimentate ad *Artemia* il contenuto di EPA non si discosta molto da quello del DHA (Tabella IXL), e di conseguenza il rapporto DHA/EPA risulta essere inferiore o leggermente superiore a 1, a seconda del giorno di alimentazione considerato. L'*Artemia*, quando confrontata con i copepodi, sintetizza od incorpora significativamente meno DHA ed il suo rapporto DHA/EPA risulta essere più basso anche quando alimentata con diete ricche in DHA (McEvoy *et al.*, 1995). Nelle larve alimentate con il copepode *T. stylifera* si ha, invece, una predominanza di DHA su EPA, con un conseguente

rapporto DHA/EPA ≥ 2 , tranne per le larve del 41° gg (Tabella XXXVIII). I dati provenienti da studi su larve selvatiche (Pickova *et al.* 1997) ed allevate (Navas *et al.* 1997; Furuita *et al.* 2000) supportano l'idea che il successo di schiusa delle uova e di sopravvivenza delle larve sia fortemente dipendente dalla quantità di DHA nelle uova. DHA è trasferito ed accumulato dal pesce madre nell'uovo, proprio come gli esseri umani accumulano DHA nel feto attraverso la placenta. La quantità di DHA che il pesce madre può allocare nel tuorlo d'uovo dipende dalla quantità di DHA presente nella dieta (rivisitato da Izquierdo *et al.*, 2001). In letteratura si riporta che il tuorlo delle uova di molti pesci marini contiene DHA ed EPA in un rapporto ≥ 2 e pertanto sembrerebbe appropriato che la dieta delle larve di pesci, a base di una qualunque preda viva, debba assicurare un rapporto DHA/EPA simile o addirittura superiore (Parrish *et al.*, 1994). E', pertanto, pratica comune fornire ai pesci diete con elevati livelli di DHA durante il periodo dell'accoppiamento.

Sulla base delle condizioni sperimentali di tale studio, la densità di 30 nauplii/copepoditi di *Temora stylifera* per ml (2 volte al dì), risulta appropriata per le prime fasi di svezzamento larvale. Gli stadi NIII/CII sono ben graditi dalle larve e presentato un contenuto nutrizionale maggiore rispetto ad *Artemia*. Sebbene la sopravvivenza dei due gruppi di larve alimentate rispettivamente ad *Artemia* e a *T. stylifera* sia pressoché simile (probabilmente per le condizioni di sperimentazione), la composizione in acidi grassi insaturi delle larve alimentate a copepoditi risulta nettamente superiore, soprattutto per l'elevato contenuto in EPA e DHA.

6. CONCLUSIONI

- In questo studio, per la prima volta, sono state testate una serie di diete mono e pluri-algali per l'alimentazione dei copepodi *Temora stylifera* (10 diete) e *Centropages typicus* (12 diete), utilizzando alghe in concentrazioni e combinazioni variabili. I risultati hanno messo in evidenza che elevate concentrazioni di alghe non determinano un corrispondente incremento della biomassa di copepodi, che è invece influenzata maggiormente dalla qualità delle alghe, in termini di composizione biochimica e dalle loro dimensioni.

Per *T. stylifera*, la dieta mono-algale a base di *R. baltica*, ha fornito degli ottimi risultati per i cinque caratteri fisiologici presi in esame: produzione di uova/femmina/giorno, produzione pellet fecali/individuo/giorno, percentuale di uova schiuse, percentuale di adulti sopravvissuti e percentuale di uova mangiate. Tuttavia, miscele di alghe si rendono necessarie sia per non dipendere da un'unica alga che potrebbe non raggiungere le concentrazioni richieste per l'alimentazione, sia perchè negli allevamenti massivi coesistono diversi stadi larvali che necessitano di alghe di diverse dimensioni, come ad esempio *I. galbana* importante per gli stadi naupliari, ma soprattutto perchè una buona dieta è determinata da un buon rapporto dei vari elementi nutritivi, come minerali (Urabe and Watanabe, 1992), acidi grassi altamente insaturi (HUFAs) (Müller-Navarra *et al.*, 2000), steroli (Klein Breteler *et al.*, 1999) ed aminoacidi (Kleppel *et al.*, 1998).

I test algali condotti in questo studio hanno notevolmente contribuito alla conoscenza e al miglioramento della fisiologia riproduttiva di *Temora stylifera* e *Centropages typicus*. Ne emerge, pertanto, la necessità di

comprendere la fisiologia degli organismi che si vogliono allevare, prima di procedere all'allevamento su vasta scala.

- Con tale progetto è stato possibile allevare, per la prima volta, generazioni di copepodi Calanoidi mediterranei in un impianto pilota a circuito chiuso ottenendo densità di 0.42 individui/ml per *Temora stylifera* e di 0.24 individui/ml per *Centropages typicus*. In particolare, durante il progetto sono state allevate 22 generazioni di *T. stylifera* e 7 generazioni di *C. typicus*.

I risultati sono sicuramente incoraggianti se si pensa che tali specie hanno una fisiologia molto complessa rispetto ai copepodi di acque tropicali, e che i 280 giorni per l'allevamento in vasca di *T. stylifera* e 85 giorni per *C. typicus* sono intervalli di tempo troppo brevi per poter affermare che queste due specie non possono raggiungere concentrazioni tali da poter essere proposte per un allevamento massivo a scopi acquacolturali. Tuttavia, le quantità raggiunte sono risultate adeguate per l'alimentazione di pesci ornamentali.

Una ulteriore applicazione di tale sistema è quella di poter utilizzare i copepodi, in esso prodotti, per successivi esperimenti ed allevarli anche al di fuori della loro stagionalità.

L'impianto a circuito chiuso necessita di modifiche e migliorie (come già discusso nei paragrafi 5.4.1 e 5.4.2), non solo per la gestione da parte degli operatori ma soprattutto se si pensa di allevare copepodi su larga scala. Nel complesso l'impianto è risultato essere un buon prototipo.

- Nei test di appetibilità effettuati con nauplii di *T. stylifera* si è evidenziata un'attiva predazione da parte delle larve di orata con una sopravvivenza simile a quella registrata per le larve alimentate ad *Artemia*, ma

qualitativamente superiori se si considera la composizione in acidi grassi polinsaturi. Infatti, l'analisi delle larve alimentate con il copepode *T. stylifera* rivelano un contenuto in acidi grassi a favore del DHA. Il rapporto DHA>EPA>AA, raccomandato nelle diete e necessario per un corretto sviluppo ed un'elevata sopravvivenza delle larve, si è ritrovato nelle diete a base di copepodi a conferma che questi organismi sono qualitativamente superiori rispetto alle *Artemie*.

Si auspica che i risultati ottenuti da questo progetto possano costituire un punto di partenza per sviluppi futuri di carattere applicativo e per indirizzare le aziende del settore acquacolturale verso una produzione di copepodi con elevato valore nutrizionale su larga scala e a costi più contenuti.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alcaraz, M., Saiz, E. and Calbet, A. 2007. *Centropages* behaviour: Swimming and vertical migration. *Progress in Oceanography*, **72**: 121-136.
- Ahlgren, G., Goedkoop, W., Markensten, H., Sonesten, L. and Boberg, M. 1997. Seasonal variations in food quality for pelagic and benthic invertebrates in lake Erken – the role of fatty acids. *Freshwater Biology*, **38**: 555-570.
- Arcos, F. and Fleminger, A. 1991. Morphological criteria for the separation of the late copepodid stages of *Temora stylifera* and *T. discaudata* (Copepoda, Calanoida). *J. Plankton Res.* **13**: 1177-1186.
- Ban, S., Burns, C., Castel, J., Chaudron, Y., Christou, E., Escibano, R., Umami, S. F., Gasparini, S., Ruiz, F. G., Hoffmeyer, M., Ianora, A., Kang, H., Laabir, M., Lacoste, A., Miralto, A., Ning, X., Poulet, S., Rodriguez, V., Runge, J., Shi, J. and Starr, M. 1997. The paradox of diatom-copepod interactions. *Marine Ecology Progress Series.*, **157**: 287-293.
- Bell, M.V., Henderson, R.J., Sargent, J.R. 1985. Changes in the fatty acid composition of phospholipids from turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies. *Comp. Biochem. Physiol.* **B 81**: 193–198.
- Bell, J.G., Mc Evoj, L.A., Estevez, A., Shields, R.J. and Sargent, J.R. 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, **227**: 211-220.
- Bengtson, D.A., Leger, P. and Sorgeloos, P. 1991. Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. In: Browne, R.A., Sorgeloos, P., Trotman, C.N.A. (Eds.), *Artemia Biology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 255–285.
- Beserra Galvão, I. 2004. Effect of food quality (taxonomy and biochemical composition of microalgae) on the reproduction and survival of the copepod *A. tonsa*, from the Kiel Bight. PhD Thesis. Leibniz-Institut für Meereswissenschaften der Christian-Albrechts Universität zu Kiel. 95 pp.
- Bisbal, G.A. and Bengtson, D.A. 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *J. Fish Biol.*, **47**: 277–291.
- Bonnet, D. and Carlotti, F. 2001. Development and egg production in *Centropages typicus* (Copepoda: Calanoida) fed different food types: a laboratory study. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **224**: 133-148.
- Brett, M.T. and Muller-Navarra, D.C. 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology*, **38**: 483-499.
- Broglio, E., Saiz, E., Calbet, A., Trepal, I. and Alcaraz, M. 2004. Trophic impact and prey selection by crustacean zooplankton on the microbial communities of an oligotrophic coastal area (NW Mediterranean Sea). *Aquat. Microb. Ecol.* **35**: 65-78.
- Brown, M. R. 1991. The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, **145**: 79-99.

- Brown, M. R. and Jeffrey, S. W. 1992. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **161**: 91 - 113.
- Buskey, E.J., Coulter, C. and Strom, S. 1993. Locomotory patterns of microzooplankton: potential effects on food selectivity of larval fish. *Bull. Mar. Sci.*, **53**: 29 – 43.
- Buttino, I. 1994. The effect of low concentrations of phenol and ammonia on egg production rates, fecal pellet, production and egg viability of the calanoid copepod *Acartia clause*. *Marine Biology*, **119** (4): 629 – 634.
- Buttino, I., Giuseppe De Rosa, Ylenia Carotenuto, Marialuisa Mazzella, Adrianna Ianora, Francesco Esposito, Valentina Vitiello, Fabiana Quaglia, Maria Immacolata La Rotonda and Antonio Miralto. 2008. Aldehyde-encapsulating liposomes impair marine grazer survivorship. *J. Exp. Biol.*, **211**: 1426 – 1433.
- Cabelt, A., Carlotti, F. and Gaudy, R. 2007. The feeding ecology of the copepod *Centropages typicus* (Kröyer). *Progress in Oceanography*, **72**: 137-150
- Carlotti, F. and Harris, R. 2007. The biology and ecology of *Centropages typicus*: An introduction. *Progress in Oceanography*, **72**: 117-120.
- Carlotti, F., Bonnet, D. and Halsband-Lenk, C. 2007. Development and growth rates of *Centropages typicus*. *Progress in Oceanography*, **72**: 164-194.
- Carotenuto, Y. 1999. Morphological analysis of larval stages of *Temora stylifera* (Copepoda, Calanoida) from the Mediterranean Sea. *Journal of Plankton Research*, **21** (9): 1613-1632.
- Carotenuto, Y., Ianora, A., Buttino, I., Romano, G. and Miralto, A. 2002. “Is postembryonic development in the copepod *Temora stylifera* negatively affected by diatom diets?”. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **276**: 49:66.
- Carotenuto, Y., Ianora, A., Di Pinto, M., Sarno, D. and Miralto, A. 2006. Annual cycle of early developmental stage survival and recruitment in the copepods *Temora stylifera* and *Centropages typicus*. *Marine Ecology Progress Series*, **314**: 227-238.
- Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1994. Effects of purified diets containing different combination of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, **128**: 315–333.
- Ceballos, S. and Ianora, A. 2003. Different diatoms induce contrasting effects on the reproductive success of the copepod *Temora stylifera*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **294**: 193-202.
- Chesney, E.J. 2005. Estimating the food requirements of striped bass larvae *Morone saxatilis*: effects of light, turbidity and turbulence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **53**: 191-200.
- Chu, F. E., Dupuy, J. L. and Webb, K. L. 1982. Polysaccharide composition of five algal species used as food larvae of the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, **29**: 241-252.
- Conceição, L.E.C. 1997. Growth in early life stages of fish: an explanatory model. PhD Thesis. Dept of Fish Culture and Fisheries, Wageningen Agricultural University, Netherlands.

- Davis, C.S. and Alatalo, P. 1992. Effects of constant and intermittent food supply on life-history parameters in a marine copepod. *Limnol. Oceanogr.*, **37**: 1618 – 1639.
- Desvillettes, C. H., Bourdier, G., Amblard, C. H. and Barth, B. 1997. Use of fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoans and microalgae. *Freshw. Biol.*, **38**: 629-637.
- Doi, M., Toledo, J.D., Golez, Ma.S., Santos, M.d.I. and Ohno, A. 1997. Preliminary investigation of feeding performance of larvae of early red-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, reared with mixed zooplankton. *Hydrobiologia*, **358**: 259-263.
- Drillet, G., Jørgensen, N.O.G., Sørensen, T.F., Ramløv, H. and Hansen, B.W. 2006. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. *Aquacult. Res.*, **37**: 756-772.
- Enright, C. T., Newkirk, G. F., Craigie, J. S. and Castell, J. D. 1986. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **96**: 1 -13.
- Epifanio, C. E. 1979. Growth in bivalve mollusks: nutritional effects of two more species of algae in diets fed to the american oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture*, **18**: 1 - 12.
- Estevez, A. and Kanazawa, A. 1996. Fatty acid composition of neural tissues of normal pigmented and unpigmented juveniles of Japanese flounder using rotifer and *Artemia* enriched in n-3 HUFA. *Fish. Sci.*, **62**: 88–93.
- Evjemo, J.O. and Olsen, Y. 1997. Lipid and fatty acid content in cultivated live feed organisms compared to marine copepods. *Hydrobiol.*, **358**: 159-162.
- Evjemo, J.O., Retain, K.I. and Olsen, Y. 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, **227**: 191-210.
- Falk-Petersen, S., Sargent, J.R., Fox, C., Falk-Petersen, I.B., Haug, T. and Kjørsvik, E. 1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Mar. Biol.*, **101**: 553-556.
- FAO. 2006. Fishery Information, Data and Statistics Unit (FIDI). c2002. Fishery Statistical Collections. FIGIS Data Collection. FAO, Rome. <http://www.fao.org:80/figis/servlet/static?dom=collection&xml=global-aquaculture-production.xml>
- Fernández-Reiriz, M.J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J., Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, **83**: 17-37.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.J. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **266**: 497-509.

- Fontagne, S., Geurden, I., Escaffre, A.M. and Bergot, P. 1998. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp larvae. *Aquaculture*, **161**: 213–223.
- Fraser, A.J., Gamble, J.C. and Sargent, J.R. 1988. Changes in lipid content, lipid class and fatty acid composition of developing eggs and unfed larvae of cod (*Gadus morhua*). *Mar. Biol.*, **99**: 307-313.
- Fryd, M., Haslund, O.H. and Wohegemuth, O. 1991. Development, growth and egg production of the two copepod species *Centropages hamatus* and *Centropages typicus* in the laboratory. *Journal of Plankton Research*, **13**: 683-689.
- Fukusho, K., Arakawa, T. and Watanabe, T. 1980. Food value of a copepod, *Tigriopus japonicus*, cultured with a ω -yeast for larvae and juveniles of mud dab *Limanda yokohamae*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **46**: 499-503.
- Furuita, H., H. Tanaka, T. Yamamoto, M. Shiraishi, and T. Takeuchi. 2000. Effects of *n*-3 HUFA levels in broodstock diet on the reproductive performance and egg and larval quality of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **187**: 387-398.
- Gaudy, R. 1974. Feeding four species of pelagic copepods under experimental conditions. *Mar. Biol.*, **25**: 125 – 141.
- Geurden, I., Radunz-Neto, J. and Bergot, P. 1995. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*, **131**: 303– 314.
- Geurden, I., Bergot, L., Schwartz, L. and Sorgeloos, P. 1998. Relationship between dietary phospholipid classes and neutral lipid absorption in newly-weaned turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.*, **19**: 217–228.
- Græve, M., Kattner, G., Hagen, W. 1994. Diet-induced changes in the fatty acid composition of Arctic Herbivorous copepods: experimental evidence of trophic markers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **182**: 97-100.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum, New York, pp. 29–60.
- Halver, J.E. 1980. Lipids and Fatty acids. In *Fish Feed Technology*. Lectures presented at the FAO/UNDP Training Course in Fish Feed Technology, held at the College of Fisheries, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A., 9 October–15 December 1978. United Nations Development Programme, FAO, Rome, chapter 4.
- Harel, M., Gavasso, S., Leshin, J., Gubematis, A. and Place, A.R. 2001. The effect of tissue docosahexaenoic and arachidonic acids levels on hypersaline tolerance and leucocyte composition in striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* **24**: 113–123.
- Harrison, K. E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *J. Shellfish Res.*, **9**: 1 - 28.

- Heath, L.P. and Moore, C.G. 1997. Rearing Dover sole larvae on *Tisbe* and *Artemia* diets. *Aquaculture International*, **5**: 29–39.
- Helland, S., Terjesen, B.F., and Berg, L. 2003. Free amino acid and protein content in the planktonic copepod *Temora longicornis* compared to *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, **215**: 213-228.
<http://www.fao.org> – 3.4 Larval rearing.
- Huntley, M.E., Ciminiello, P. and Lopez, M.D.G. 1987. Importance of food quality in determining development and survival of *Calanus pacificus* (Copepoda, Calanoida). *Mar. Biol.* **95**: 103-113.
- Ianora, A., Scotto di Carlo, B. and Mascellaro, P. 1989. Reproductive biology of the planktonic copepod *T. stylifera*. *Mar. Biol.*, **101**: 187-194.
- Ianora, A. and Buttino, I. 1990. Seasonal cycles in population abundances and egg production rates in the planktonic copepods *Centropages typicus* and *Acartia clausi*. *J. Plankton Res.*, **12**: 473-481.
- Ianora, A. and Poulet, S.S. 1993. Egg viability in the copepod *Temora stylifera*. *Limnol. Oceanogr.*, **38**: 1615-1626.
- Ianora, A., Poulet, S.A. and Miralto, A. 1995. A comparative study of the inhibitory effect of diatoms on the reproductive biology of the copepod *Temora stylifera*. *Mar. Biol.*, **121**: 533 – 539.
- Ianora, A., Poulet, S.A., Miralto, A. and Grottoli, R. 1996. The diatom *Thalassiosira rotula* affects reproductive success biology of the copepod *Temora stylifera*. *Mar. Biol.*, **121**: 533-539.
- Ianora, A., Poulet, S.A. and Miralto, A. 2003. The effects of diatoms on copepod reproduction: a review. *Phycologia*, **42** (4): 351-363.
- Ianora, A., Miralto, A., Poulet, S.A., Carotenuto, Y., Buttino, I., Romano, G., Casotti, R., Pohnert, G., Wichard, T., Colucci D'Amato, L., Terrazzano, G. and Smetacek, V. 2004. Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. *Nature*, **429**: 403-407
- Ianora, A. 2005. Birth control effects of diatoms on copepod reproduction: implications for aquaculture studies. In: *Copepods Aquaculture*. Eds Cheng-Sheng Lee, Patricia J. O'Bryen, Nancy H. Marcus. Blackwell Publishing. Cap 4, pp.31-48.
- Ianora, A., Miralto, A. and Halsband-Lenk, C. 2007. Reproduction, hatching success, and early naupliar survival in *Centropages typicus*. *Progress in Oceanography*, **72**: 195–213.
- Izquierdo, M.S., H., Fernández-Palacios, and A.G.J., Tacon. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, **197**: 25-42.
- John, M.A.St., Clemmesen, C., Lund, T. and Köster, T. 2001. Diatom production in the marine environment: implications for larval fish growth and condition. *ICES Journal of Marine Science*, **58**: 1106-1113.
- Jónasdóttir, S. H. 1994. Effects of food quality on the reproductive success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*: laboratory observations. *Marine Biology*, **121**: 67 - 81.

- Kanazawa, A., Teshima, S.-I. and Ono, K. 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **63B**: 295–298.
- Kanazawa, A., Teshima, S. and Sakamoto, M. 1985. Effects of dietary bonito egg phospholipids and some phospholipids on growth and survival of larval ayu, *Plecoglossus altivelis*. *J. Appl. Ichthyol.*, **1**: 165–170.
- Kanazawa, A. 1993. Essential phospholipids of fish and crustaceans. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), *Fish Nutrition in Practice. Les Colloques*, vol. 61. INRA, Paris, pp. 519–530.
- Kiorboe, T., Mohlenberg, F., Hamburger, K. 1985. Bioenergetics of a planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **26**: 85-97.
- Klein Breteler, W.C.M., Schogt, N. and Gonzales, S.R. 1990. On the role of food quality in grazing and development of life stages and genetic change of body size during cultivation of pelagic copepods. *J. Exp. Mar. Biol.* **135**: 177-189.
- Kleppel, G.S., Hazzard, S.E. and Burkart, C.A. 2005. Maximizing the nutritional values of copepods in aquaculture: managed versus balanced nutrition. In: *Copepods Aquaculture*. Eds Cheng-Sheng Lee, Patricia J. O'Bryen, Nancy H. Marcus. Blackwell Publishing. Cap 5, pp.49-58.
- Knuckey, R.M., Semmens, G.L., Mayer, R.J. and Rimmer, M.A. 2005. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinyiensis*: Effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture*, **249** (1-4): 339-351.
- Koven, W.M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.Wm. and Sklan, D. 1993. The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, **10**: 357–364.
- Koven, W.M., Parra, G., Kolkovski, S. and Tandler, A. 1998. The effect of dietary phosphatidylcholine and its constituent fatty acids on microdiet ingestion and fatty acid absorption rate in gilthead sea bream, *Sparus aurata*, larvae. *Aquac. Nutr.*, **4**: 39–45.
- Kraul, S., Nelson, A., Brittain, K., Ako, H. and Ogasawara, A. 1992. Evaluation of live feeds for larval and postlarval Mahimahi *Coryphaena hipparus*. *J. World Aquacult. Soc.*, **23**: 299-307.
- Kraul, S., Brittain, k., Cantress, R., Nagao, T., Ako, H., Ogasawara, A. and Kitagawa H. 1993. Nutritional factors affecting stress resistance in the larval mahimahi *Coryphaena hippurus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **24**: 186 – 193.
- Laabir, M., Poulet, S. A., Ianora, A., Miralto, A., Cueff, A. 1995a. Reproductive response of *Calanus helgolandicus*. II. In situ inhibition of embryonic development. *Marine Ecology Progress Series*, **129**: 97-105.
- Laabir, M., Poulet, S. A., Ianora, A. 1995b. Measuring production and viability of eggs in *Calanus helgolandicus*. *J. Plankton Res.*, **17**: 1125-1142.

- Laabir, M., Buttino, I., Ianora, A., Kattner, G., Poulet, S.A., Romano, G., Carotenuto, Y. and Miralto, A. 2001. Effect of specific dinoflagellate and diatom diets on gamete ultrastructure and fatty acid profiles of the copepod *Temora stylifera*. *Mar. Biol.*, **138**: 1241-1250.
- Lacoste, A., Poulet, S.A., Cueff, A., Kattner, G., Ianora, A. and Laabir, M. 2001. New evidence of copepod maternal food effects on reproduction. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **259**: 85-107.
- Lall, S.P. 2000. Nutrition and health of fish. In Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera- Cerecedo R (eds), Avances en Nutricion Acuicola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola, 19–22 Noviembre 2000. Merida, Yucatan Mexico, pp. 13–23.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P. 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*, **181**: 397 - 403.
- Lavens, P., Thongrod, S. and Sorgeloos, P. 2000. Larval prawn feeds and the dietary importance of *Artemia*. In New MB, Valenti WC (eds), Freshwater Prawn Culture. The Farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Blackwell Sciences, Oxford, UK, pp. 91–111.
- Lawson, T.J. and Grice G. D. 1970. The developmental stages of *Centropages typicus* Krøyer (Copepoda, Calanoida). *Crustaceana*, **18**: 187-208.
- Lee, H. W., Ban, S., Ando, Y., Ohta, T. and Ikeda, T. 1999. Deleterious effect of diatom diets on egg production and hatching success in the marine copepod *Pseudocalanus newmani*. *Plankton Biol. Ecol.*, **46** (2): 123-345.
- Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L. and Sorgeloos, P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol.* **24**: 521–623.
- Lipman, E.E., Kao, K.R. and Phelps, R.P. 2001. Production of the copepod *Oithona* sp. under hatchery conditions. In: Book of Abstract. Aquaculture, Lake Buena Vista, Florida, USA
- Luizi, F.S., B. Gara, R.J. Shield, & N.R. Bromage. 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepods and *Artemia* prey.– *Aquaculture* 176: 101-116.
- Marcus, N.H. and Murray, M. 2001. Copepod diapause eggs: a potential source of nauplii for aquaculture. *Aquaculture*, **201**: 107-115.
- Masuda, R., Takeuchi, T., Ishizaki, Y., Kanematsu, M. and Imaizumi, K. 1998. Critical involvement of dietary docosahexaenoic acid in the ontogeny of schooling behavior in the yellowtail. *J. Fish Biol.*, **53**: 471–484.
- Mazzocchi, M.G. and Ribera d'Alcala', M. 1995. Recurrent patterns in zooplankton structure and succession in a variable coastal environment. *ICES J. Mar. Sci.* **52**: 679-691.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Bell, J.G. and Sargent, J.R. 1995. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture*, **134**: 101–112.
- McEvoy, L.A., Estevez, A., Bell, J.G., Shields, R.J., Gara, B. and Sargent, J.R. 1998a. Influence of dietary levels of eicosapentaenoic and arachidonic acids on the pigmentation success of

- Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Bull. - Aquac. Assoc. Can.*, **98**(4): 17– 20.
- McEvoy, L.A., Naess, T., Bell, J.G., Lie, Ø. 1998b. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. *Aquaculture*, **163**: 237– 250.
- McKinnon, A.D., Duggan, S., Nichols, P.D., Rimmer, M.A., Semmens, G. and Robino, B. 2003. The potential of tropical paracalanoid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture*, **223**: 89 – 106.
- Miralto, A., Ianora, A. and Poulet, S.A. 1995. Food type induces different reproductive responses in the copepod *Centropages typicus*. *Journal of Plankton Research*, **17** (7): 1521-1534.
- Miralto A, Barone G, Romano G, Poulet SA, Ianora A, Russo GL, Buttino I, Mazzarella G, Laabir M, Cabrini M, Giacobbe MG. 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, **402**: 173-176
- Mourente, G. and Odriozola, J.M. 1990. Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, **8**: 93-101.
- Munilla-Moran, R. and Stark, J.R. 1989. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture*, **81**: 315–327.
- Munilla-Moran, R., Stark, J.R. and Barbour, A. 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, **88**: 337–350.
- Murai, T., Akiyama, T., Ogata, H. and Suzuki, T. 1988. Interaction of dietary oxidised fish oil and glutathione of fingerling yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **54**: 145– 149.
- Naess, T., Germain-Henry, M. and Naas, K.E. 1995. First feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using different combinations of *Artemia* and wild zooplankton. *Aquaculture*, **130**: 235–250.
- Næss, T. and Lie, Ø. 1998. A sensitive period during first feeding for the determination of pigmentation pattern in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. juveniles: the role of a diet. *Aquaculture Research*, **29**: 925-934.
- Nanton, D.A. and Castell, J.D. 1998. The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture*, **163**: 251-261.
- Navarro, J.C., Batty, R.S., Bell, M.V. and Sargent, J.L. 1993. Effects of two *Artemia* diets with different content of polyunsaturated fatty acids on the lipid composition of larvae of Atlantic herring (*Clupea harengus*). *J. Fish Biol.*, **43**: 503-515.
- Navas, J.M., M., Bruce, M., Thrush, B.M., Farndale, N., Bromage, S., Zanuy, M., Carrillo, J.G., Bell and J., Ramos. 1997. The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *J. Fish Biol.*, **51**: 760-773.

- Naylor, R.L. and Burke, M. 2005. Aquaculture and ocean resources: raising tigers of the sea. *Ann. Rev. Environ. Res.* **30**:185–218.
- Norsker, N.H. and Støttrup, J.G. 1994. The importance of dietary HUFAs for fecundity and HUFA content in harpacticoid *Tisbe holothuriae*, Humes. *Aquaculture*, **125**: 155 – 166.
- Ohno, A. and Okamura, Y. 1988. Propagation of the calanoid copepod, *Acartia tsuensis*, in outdoor tanks. *Aquaculture* **70**, 39–51.
- Ogle, J. 1979. Adaptation of a brown water culture technique to the mass culture of the copepod *Acartia tonsa*. *Gulf Research Reports*, **6**: 291-292.
- Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, A.M., Vitiello, V., Maradonna, F., Carnevali, O. 2008a. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: Effects on larval survival and growth. *Aquaculture*, **274**: 347-352.
- Olivotto, I., Buttino, I., Borroni, M., Piccinetti, C.C., Malzone, M.G. and Carnevali, O. 2008b. The use of the Mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in Yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkia*) larviculture. *Aquaculture*, **284** (1-4) : 211 – 216.
- Olsen R. E., Henderson R. J. and McAndrew, B. J. 1990. The conversion of linoleic acid and linolenic acid to longer chain polyunsaturated fatty acids by *Tilapia (Oreochromis) nilotica* in vivo. *Fish Physiology and Biochemistry* **8**: 261–270.
- Paffenhöfer, G.-A. 1998. On the relation of structure, perception and activity in marine planktonic copepods. *J. Mar. Syst.* **15**: 457-473.
- Parrish, C.C., Castell, J.D., Brown, J.A., Boston, L., Strickland, J.S. and Somerton, D.C. 1994. Fatty acid composition of Atlantic halibut eggs in relation to fertilization. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.*, **94**(2): 36–38.
- Patil, V., Reitan, K.I., Knutsen, G., Mortensen, L.M., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gilserød, H.R. 2005. Microalgae as source of polyunsaturated fatty acids for aquaculture. *Curr. Topics Plant Biol.*, **6**: 57 – 65.
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G. and Gislerød, H.R. 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquacult. Int.*, **15**: 1-9.
- Payne, M.F. and Rippingale R.J. 2001a. Intensive cultivation of the copepod calanoid *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture*, **201**: 329-342.
- Payne, M.F. and Rippingale R.J. 2001b. Effects of salinity, cold storage and enrichment on the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture*, **201**: 251-262.
- Pepin, P. and Penney, R.W. 1997. Patterns of prey size and taxonomic composition in larval fish: are there general size dependent models? *J. Fish Biol.*, **51**: 84 – 100 (Supplement A).
- Pickova, J., P.C. Dutta, P.-O., Larsson and A., Kiessling. 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success, and egg-lipid fatty acid composition: comparison between two cod (*Gadus morhua*) stocks. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **54**: 2410-2416.
- Poulet, S.A., Ianora, A., Miralto, A. and Meijer, L. 1994. Do diatoms arrest embryonic development in copepods? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **111**: 79 – 86.

- Poulet, S.A., Laabir, M., Ianora, A and Miralto, A 1995. Reproductive response of *Calanus helgolandicus*. I. Abnormal embryonic and naupliar development. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **129**: 85-95.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I. and Jørgensen, L. 1992a. Comparative study on the fatty acid and lipid composition of four marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103B**: 21-26.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Jørgensen, L. and Olsen, Y. 1992b. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **107A**: 699-710.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I. and Olsen, Y. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, **155**: 103-115.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. and Olsen, Y. 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquacult. Int.*, **2**: 33-48.
- Renaud, S.M., Thinh, L.V. and Parry, L.D. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of Tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, **170**: 147-159.
- Reus, N. and Poulsen, L. K. 2002. Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland. *Marine Biology*, **141**: 423-434.
- Rippingale, R.J. and Payne, M.F. 2001. Intensive cultivation of a calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. A guide to procedures. Publisher: Perth, W.A. – Dept. of Environmental Biology, Curtin University of Technology, 61 pp.
- Rodriguez, C.G. 1994. Estudio de los requerimientos de acidos grasos esenciales de la dorada europea (*Sparus aurata* L.) durante las dos primeras semanas de alimentacion. PhD Thesis, Facultad de Biologia, Universidad de la Laguna, Spain, 284 pp.
- Rønnestad, I., Helland, S., and Lie. Ø. 1998. Feeding *Artemia* to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. *Aquaculture*, **165**: 159-164.
- Sargent, J. R., Parkes, R. J., Mueller-Harvey, I. and Henderson, R. J. 1987. Lipid biomarkers in marine ecology. In: Sleight, M. A (ed) *Microbes in the sea*. Harwoo. Chichester. pp 119-138.
- Sargent, J.R., Falk-Petersen, S. 1988. The lipid biochemistry of calanoid copepods. *Hydrobiologia*, **167/168**: 101-114.
- Sargent, J.R., Bell, M.V. and Tocher, D.R. 1993. Docosahexaenoic acid and the development of brain and retina in marine fish. In: Devron, C.A., Baksaas, I., Krokan, H.E., (Eds.). *Omega-3 Fatty acids: Metabolism and Biological Effects*. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, pp. 139-149.
- Sargent, J.R., 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: Bromage, N.R., Roberts (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell, Oxford, pp. 353-372.

- Sargent, J.R., McEvoy, L.A. and Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, **155**: 127–177.
- Schipp, G.R., Bosmans, J.M.P. and Marshall, A.J. 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, **174**: 81-88.
- Seguin, G. 1981. Cycle annuel des copepods pélegiques en rade de Villefranche-sur-Mer a partir de prélèvements quotidiens (année 1972) (Bilan quantitatif, qualitatif et écologique). *Bull. Ecol.*, **12**: 29-60.
- Shields, R.J., Bell, J.G., Luizi, F.S., Gara, B., Bromage, N.R. and Sargent, J.R. 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *J. Nutr.*, **129**: 1186-1194.
- Sicko-Goad, L. and Andersen, N. A. 1991. Effects of growth and light/dark cycles on the diatom lipid content and composition. *J. Phycol.*, **27**: 710 - 718.
- Sipaùba-Tavares, L.H., Bachion, M.A. and de Souza Braga, F.M. 2001. Effects of food quality on growth and biochemical composition of a calanoid copepod, *Argyrodiaptomus furcatus*, and its importance as a natural food source for larvae of two tropical fishes. *Hydrobiol.*, **453/454**: 393-401.
- Smith, S.L. and Lane, P.V.Z. 1985. Laboratory studies on the marine copepod *Centropages typicus*: egg production and development rate. *Mar. Biol.*, **85**: 153 – 162.
- Støttrup, J.G., Richardson, K., Kirkegaard, E., Pihl, N.J. 1986. The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture* **52**: 87 – 96.
- Støttrup, J.G., Gravningen, K. and Norsker, N.H. 1995. The role of different microalgae on the growth and survival of turbot larvae in intensive cultivation systems. *ICES Marine Science Symposium Series.*, **201**: 173 – 186.
- Støttrup, J.G. and Norsker, N.H. 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture*, **155**: 231 – 247.
- Støttrup, J.G., Bell, J.G. and Sargent, J.R. 1999. The fate of lipids during development and cold-storage of eggs in the laboratory-reared calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana, and in response to different algal diets. *Aquaculture*, **176**: 257-269.
- Støttrup, J.G. 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Res.*, **31**: 703 – 711.
- Sue, H-M., Cheng, S-H, Chen, T-I. and Su, M-S. 2005. Culture of copepods and applications to marine finfish larval rearing in Taiwan. In: Copepods in aquaculture. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 183-194.
- Sun, B. and Fleeger, J.W. 1995. Sustained mass culture of *Amphiascoides atopus* a marine harpacticoid copepod in a recirculating system. *Aquaculture*, **136**: 313 – 321.

- Takeuchi, T., Watanabe, T. and Nose, T. 1979. Requirement for essential fatty acids of chinook salmon (*Oncorhynchus keta*) in freshwater environment. *Bulletin of the Japanese Society for Scientific Fisheries* **45**, 1319–1323.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Horinouchi, K., Yamasaki, S. and Hirata, H. 1997. Phospholipids of the rotifer, prawn and larval fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**: 609– 615.
- Tito de Moraes, L. and Bodiou, J.Y. 1984. Predation on meiofauna by juvenile fish in a Western Mediterranean flatfish nursery ground. *Mar. Biol.*, **82**: 209 – 215.
- Toledo, J.D., Golez, S.N., Doi, M. and Ohno, A. 1997. Food selection of early grouper, *Epinephelus coioides*, larvae reared by the semi-intensive methods. *SUISANZOSHOKU*, **45** (3): 327-337.
- Toledo, J.D., Golez, S.N., Doi, M. and Ohno, A. 1999. Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephalus coioides*. *Fish. Sci.* **65** (3): 390 – 397.
- Tomasini, J.A. and Mazza, J. 1979. Feeding behaviour of *Centropages typicus* (Copepoda, Calanoida) in nutritive media containing two algae, and in the presence of nauplii of *Artemia* sp. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, **38**: 293-307.
- Turner, J. T. 1984. The feeding ecology of some zooplankters that are important prey items of larval fish. *NOAA Tech. Rept. NMFS 7*: 28 pp.
- Turner, J. T, P.A. Tester and W. F., Hetfler. 1985. Zooplankton feeding ecology. A laboratory study of predation on fish eggs and larvae by the copepods *Anomalocera ornate* and *Centropages typicus*. *Mar. Biol.*, **90**: 1-8
- Turner, J.T. 1987. Zooplankton feeding ecology: contents of fecal pellets of the copepod *Centropages velificatus* from waters near the mouth of the Mississippi river. *Biol. Bullet.*, **173**: 377 – 386.
- Turner, J.T., Ianora, A., Miralto, A., Laabir, M. and Esposito, F. 2001. Decoupling of copepod grazing rates, fecundity, and egg-hatching success on mixed and alternating diatom and dinoflagellate diets. *Mar. Ecol. Progr. Series*, **220**: 187-199.
- Uye, S. 1996. Induction of reproductive failure in the planktonic copepod *Calanus pacificus* by diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **133**: 89-97.
- Van der Lugt, K. 2008. Intensive cultivation of the Calanoid copepod *Bestiolina similis*. *The Journal of Young Investigators*, Vol. 19, Issue 5.
- Von Herbing, H. and Gallagher, S. 2000. Foraging behaviour in early Atlantic cod larvae (*Gadhus morhua*) feeding on protozoan (*Balanion* sp.) and a copepod nauplius (*Pseudodiaptomus* sp.). *Mar. Biol.*, **136**: 591 – 602.
- Walne, P. R. 1974. Culture of bivalve molluscs. 50 years of experience at Conway. Fishing News (Books) Ltd. Surrey, Great Britain. 173 pp.
- Watanabe, T., Kitajima, C. and Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, **34**: 115-143.
- Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquacul. Soc.*, **24**: 152-161.

- Webb, K. L. and Chu, F.-L. E. 1982. Phytoplankton as a food for bivalve larvae. In: G. D. Pruder, C. J. Langdon, D. E. Conklin (Editors). Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Louisiana State University Press. Baton Rouge, LA. pp.272 - 291.
- Whyte, J. N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, **60**: 231 - 241.
- Witt, U., Quantz, G., Kuhlmann, D. and Kattner, G. 1984. Survival and growth of turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. reared on different food organisms with special regard to long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquacult. Eng.*, **3**: 177-190.
- Yone, Y. and Fuji, M. 1975. Studies on the nutrition of reared sea bream-XI. Effect of ω -3 fatty acid supplement in a corn oil diet on growth rate and feed efficiency. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **41**: 73-77.
- Zheng, F., Takeuchi, T., Yoseda, K., Kobayashi, M., Hirokawa, J. and Watanabe, T., 1996. Requirement of larval cod for arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, and docosahexaenoic acid using enriched *Artemia* nauplii. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **62**: 669-676.

8. RINGRAZIAMENTI

I miei più fervidi e profondi ringraziamenti vanno:

- Alla Regione Campania per aver finanziato il progetto.
- All'Università degli Studi di Napoli "Federico II" per il personale sostegno economico.
- Al Prof. Giovanni Sansone del Centro Interdipartimentale per la gestione delle risorse idrobiologiche e per l'acquacoltura (CRIAcq) - Università degli Studi di Napoli, e alla Dott.ssa Isabella Buttino della Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli, che mi hanno supervisionato la tesi, dandomi l'opportunità di conoscere i copepodi e il loro importante ruolo nell'acquacoltura.
- Alle mie colleghe nonché amiche, Dott.ssa Silvia Buono, Dott.ssa Valentina Vitello, Dott.ssa Cira Rico e Dott.ssa Francesca Rinna. Grazie per il vostro ineguagliabile aiuto e per i lunghi e gioiosi giorni trascorsi nel "tugurio".
- Al Prof. Aldo Bordi e alla Dott.ssa Anna Martello del CRIAcq per avermi dato la possibilità di raggiungere questo traguardo.
- Alla Prof.ssa Carmela Maria Assunta Barone del CRIAcq per il costante supporto morale e per avermi guidata nell'analisi statistica dei dati.
- Alla Dott.ssa Adele Cutignano del CNR-ICB di Pozzuoli per le analisi dei PUFA e l'interpretazione di tali risultati.
- Al Prof. Raffaele Romano e alla Dott.ssa Ilaria Borriello del Dipartimento di Scienze degli Alimenti della Facoltà di Agraria di Portici (NA) per le analisi preliminari dei PUFA.
- A tutti gli afferenti del gruppo di Ecologia Funzionale ed Evolutiva della Stazione Zoologica di Napoli Anton Dohrn (SZN): Prof. Antonio Miralto, Dott.ssa

Adrianna Ianora, Dott.ssa Ylenia Carotenuto, Dott.ssa Giovanna Romano, Dott. Francesco Esposito, Dott.ssa Raffaella Casotti, per avermi accolto nel loro gruppo di lavoro.

- Un particolare ringraziamento al mio collega ed amico Mario Di Pinto (SZN) per essere stato sempre disponibile ad aiutarmi e a farmi sorridere.
- Alla Dott.ssa Maria Grazia Mazzocchi e il Dott. Giuseppe Bianco (SZN) per aver filmato le larve durante la predazione.
- All'azienda Panittica Pugliese di Torre Canne (BR) per aver gentilmente fornito le larve.
- Al Dott. Antonio Luca Langellotti per aver trasportato le larve per centinaia di chilometri in tempi brevissimi e per l'enorme aiuto tecnico e sostegno durante la fase di sperimentazione dello svezzamento larvale.
- All'azienda INNOVAQUA per aver fornito l'impianto e per il supporto tecnico.
- Al Dott. Ike Olivotto dell'Università Politecnica delle Marche per la sua preziosa collaborazione in due lavori di ricerca.
- Alla mia famiglia che mi ha dato la forza durante il dottorato, per tutto il loro amore, amicizia, supporto e comprensione.
- A mio marito Massimo per avermi pazientemente supportato (...e sopportato!) durante questi 3 anni di dottorato.
- A me stessa per averci continuato a credere nonostante le mille difficoltà, sacrifici e privazioni.