

Università degli Studi di Napoli Federico II



Dottorato di Ricerca

in

Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro-Alimentari

Valutazione di tollerabilità, profilo nutrizionale e stress ossidativo di organismi acquatici alimentati con diete alternative a base di vegetali

Ciclo XXIII

Coordinatore:

Prof. Giancarlo Barbieri

Tutor:

Prof. Vincenzo Fogliano

Candidata:

Dott.ssa Marianna Ioviero

a.a. 2009 – 2010

Sommario

1	Scopo della ricerca	6
2.	Le reti trofiche negli ambienti acquatici.....	9
2.1	La catena alimentare standard in acquacoltura	12
3.	Alimentazione e nutrizione in acquacoltura	15
3.1	Fabbisogni nutrizionali dei pesci	18
3.1.1	Proteine e amminoacidi.....	18
3.1.2	Lipidi.....	21
3.1.3	Carboidrati	24
3.1.4	Micronutrienti.....	25
4.	Qualità e salubrità dei prodotti ittici	28
4.1	Profilo nutrizionale del pesce nell'alimentazione umana	28
4.2	Igiene e sicurezza	32
5.	Sostenibilità: luci e ombre dell'acquacoltura.....	39
5.1	Il benessere animale.....	44
5.2	L'impatto ambientale.....	47
5.3	I mangimi e le farine di pesce.....	50
6.	Arricchimento di <i>Artemia salina</i> L. con antiossidanti di origine vegetale e acidi grassi polinsaturi: valutazione della sopravvivenza e del profilo nutrizionale dei nauplii.....	54
6.1	Introduzione	54
6.2	Arricchimento di <i>Artemia salina</i> L. con antiossidanti di origine vegetale in aggiunta ad emulsioni commerciali di acidi grassi polinsaturi	57
6.2.1	Materiali e metodi.....	58
6.2.2	Risultati e discussione	63
6.3	Valutazione del profilo nutrizionale di nauplii di <i>Artemia Salina</i> L. alimentati con dieta inerte a base di spinacio	66
6.3.1	Materiali e metodi	67

6.3.2	Risultati e discussione	70
6.4	Conclusioni	72
7.	Utilizzo di una dieta vegetale in sostituzione alle alghe per le crescita controllata di <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lmk.	74
7.1	Introduzione	74
7.2	Materiali e metodi	77
7.3	Risultati e Discussione.....	78
7.4	Conclusioni	82
8.	Valutazione dell'aggiunta di vegetali alla dieta tradizionale di <i>Sparus aurata</i> L. in fase di ingrasso.....	83
8.1	Introduzione	83
8.2	Materiali e metodi	85
8.3	Risultati e discussione	88
8.4	Conclusioni	91
9.	Conclusioni	92
10.	Bibliografia.....	94

1 Scopo della ricerca

L'acquacoltura è il settore zootecnico che recentemente ha raggiunto i più elevati livelli di espansione, con un tasso di crescita medio annuo del 9,2%. La Fao le riconosce un ruolo di primaria importanza nel soddisfare le esigenze alimentari della popolazione mondiale, in particolare nei Paesi in via di sviluppo che producono il 90% del pesce con questa modalità. Potrebbe essere una soluzione al disastroso impatto ecologico sugli ecosistemi marini provocato dall'eccessivo sforzo di pesca (overfishing), causa di enormi perdite di specie vertebrate e invertebrate in termini di biomassa e biodiversità.

Anche per l'acquacoltura, come per tutte le attività produttive, è necessario valutare i parametri coinvolti a livello gestionale al fine di ottenere un equilibrio tra mercato, ambiente e qualità. Attualmente gli organi internazionali preposti, quali FAO, ONU e UE¹, individuano nell'acquacoltura l'unica possibilità di soddisfare la crescente domanda di pesce del mercato senza stressare ulteriormente gli ecosistemi. Tale aspettativa è realizzabile, però, solo nell'ottica di uno sviluppo sostenibile dell'acquacoltura, ovvero ponendo come obiettivi delle politiche internazionali e comunitarie, il benessere animale, la riduzione dell'impatto ambientale e la qualità dei prodotti ittici.

In quest'ottica risulta fondamentale l'aspetto nutrizionale delle produzioni ittiche e, dunque, la corretta gestione dell'alimentazione degli organismi acquatici, sia dal punto di vista tecnico che economico, attraverso l'utilizzo di risorse alternative, migliorando il profilo nutrizionale degli alimenti somministrati, aumentando la resistenza agli stress e alle malattie e riducendo l'impatto delle deiezioni e dei reflui zootecnici. (FAO, 2008)

Lo scopo della ricerca mira testare diete alternative per l'alimentazione diretta e indiretta di specie marine, sostituendo in parte o completamente, i mangimi tradizionali con vegetali che hanno un basso costo, possono essere recuperati da scarti di produzione per l'alimentazione umana e sono facilmente reperibili sul

¹ FAO - Food and Agriculture Organization; ONU - Organizzazione delle Nazioni Unite; UE - Unione Europea

mercato. Inoltre l'uso dei vegetali, ricchi in antiossidanti, potrebbe rivelarsi una soluzione valida e naturale per aumentare la resistenza agli stress, e dunque alle malattie, per ottenere una maggiore qualità dei prodotti attraverso la riduzione della perossidazione lipidica, e per ridurre la percentuale delle farine di pesce presenti nei mangimi tradizionali..

Lo spinacio, il pomodoro, l'origano, il cranberry, l'oliva e l'uva sono stati aggiunti o sostituiti ai mangimi tradizionali per l'alimentazione di organismi marini appartenenti a diversi livelli della catena trofica e a diversi phylum marini: crostacei (*Artemia salina* L.), molluschi (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) e pesci (*Sparus aurata* L.).

In particolare per *Artemia salina*, sono stati predisposti due esperimenti: nel primo sono stati testati estratti e vegetali tal quali (polifenoli dell'uva e dell'oliva, origano e cranberry) in aggiunta ai tradizionali protocolli di arricchimento in acidi grassi altamente insaturi (HUFA) con emulsioni commerciali (DHA Selco), al fine di valutare le capacità di metabolizzazione, assimilazione e bioaccumulo dei composti antiossidanti e l'effettiva azione protettiva contro la perossidazione lipidica; nel secondo si è invece valutato l'effetto della completa sostituzione della tipica dieta microalgale con liofilizzato di spinacio su sopravvivenza, crescita e profilo nutrizionale delle artemie, al fine di ottenere produzioni di organismi vivi "indoor" indipendenti dalla disponibilità naturale e a basso costo. Anche per *Mytilus galloprovincialis* si è testata la capacità di metabolizzazione dello spinacio e di assorbimento e bioaccumulo degli antiossidanti presenti in questo vegetale in modo da ottenere un alimento fresco, sicuro e funzionale contro lo stress ossidativo per l'alimentazione di riproduttori di pesci eurialini e stabulare riproduttori di mitili per la produzione di seme da ingrassare offshore. Infine, per *Sparus aurata* le diete alternative prevedevano la sostituzione parziale della farina di pesce con pomodoro e spinacio liofilizzato al fine di valutare l'azione antiossidante dei carotenoidi e la tollerabilità della specie alla matrice vegetale.

E' evidente che la somministrazione delle diete test ai livelli inferiori della catena trofica, permette di ipotizzare un notevole abbattimento dei costi di approvvigionamento e produzione di organismi vivi/freschi per l'alimentazione degli avannotti e dei riproduttori, noti come gli stadi di sviluppo più delicati, per

cui è necessaria una dieta con specifiche caratteristiche nutrizionali che, spesso, incide notevolmente sulla gestione economica delle aziende. Inoltre l'utilizzo dei vegetali nelle formulazioni dei mangimi permette la riduzione della percentuale di farine di pesce per l'alimentazione dei pesci e permette di ipotizzare colture in continuo dello zooplancton attivando l'intero ciclo vitale degli organismi e, dunque, riducendo al minimo l'approvvigionamento delle cisti in natura.

2. Le reti trofiche negli ambienti acquatici

Sono numerose le relazioni esistenti tra gli organismi in natura, e per poterli studiare e capire bisogna analizzare la struttura trofica dell'ecosistema, ovvero com'è scambiata l'energia tra i vari livelli.

Confrontando l'ecosistema marino e l'ecosistema terrestre, una differenza evidente è data dalla taglia dei produttori primari. Nell'ambiente marino, il fitoplancton (cellule di taglia nell'ordine di pochi micron) costituisce il produttore principale (anche se macroalghe e fanerogame marine possono avere un ruolo importante in determinati habitat), mentre la vegetazione terrestre, di dimensioni molto maggiori, è caratterizzata da strutture di sostegno e da rapporti produzione/biomassa (P/B)

molto più bassi. La differenza tra produzione primaria e secondaria nel confronto tra oceani e terre emerse deve essere quindi cercata nella più elevata efficienza di conversione della materia tra produttori e consumatori nell'ambiente marino. Il materiale vegetale in ambiente marino è infatti molto più appetibile e ricco di proteine di quello dell'ambiente terrestre

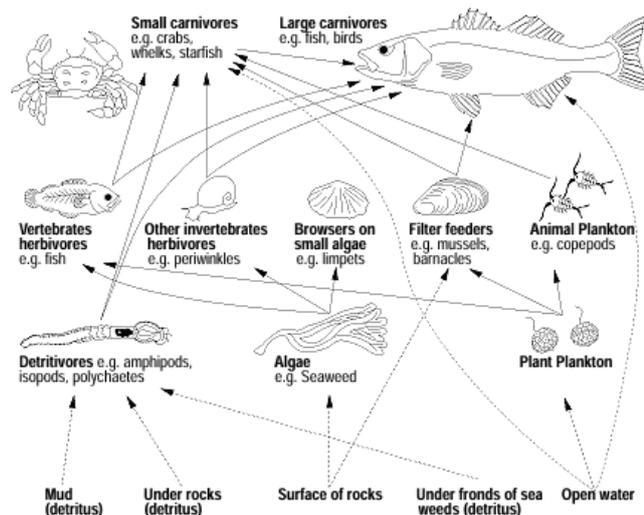


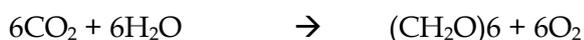
Figura 1. Rete trofica marina

dove cellulosa e carboidrati strutturali (che servono a sorreggere la pianta) costituiscono la frazione dominante della biomassa e la rendono indigeribile o difficilmente assimilabile. Ne deriva che gli erbivori nell'ambiente marino hanno a disposizione un alimento (fitoplancton e macroalghe) facilmente digeribile e assimilabile. Inoltre la sostanza organica disciolta nell'acqua può essere efficacemente utilizzata come fonte alimentare da parte di molti organismi. Un ulteriore vantaggio energetico che hanno gli organismi marini, rispetto a quelli terrestri, è che la sospensione e la locomozione nel mezzo fluido comportano un minore dispendio di energie e minori strutture di sostegno rese necessarie dalla

gravità. Tale risparmio energetico può essere così incanalato nella crescita e nella riproduzione. (Della Croce et al., 1997)

Benché tra le reti trofiche terrestri e marine esistano delle differenze, i passaggi di materia avvengono allo stesso modo partendo da un'unica fonte inesauribile e a disposizione di tutti gli esseri viventi, il sole. (Guadagnino, 2010)

La produzione primaria è operata dagli organismi autotrofi, cioè capaci di utilizzare l'energia del sole ed, attraverso il processo di fotosintesi, trasformare la materia inorganica in composti organici ad alto contenuto energetico, come ad esempio gli zuccheri.



Tale processo è basilare per la vita ed in ambiente marino è in larghissima misura operato da alghe microscopiche (fitoplancton) sospese nella parte superficiale della colonna d'acqua, ovvero quella più illuminata. L'entità della trasformazione dipende dalla quantità di luce e dalla concentrazione dei sali nutritivi, soprattutto

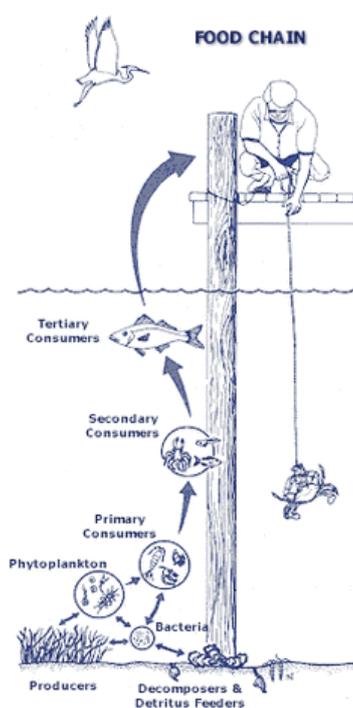


Figura 2. Catena alimentare

quelli di azoto e di fosforo; essa varia quindi in funzione della profondità, delle caratteristiche idrologiche e dei movimenti dell'acqua. In genere, la fotosintesi è condizionata dalla trasparenza dell'acqua, ma, anche in situazioni ottimali, non interessa che uno strato rappresentato dai primi 100 - 150 m di profondità. (Cataudella e Carrada, 2001.)

La sostanza organica, prodotta dai vegetali (fitoplancton e piante bentoniche) e dai batteri fotosintetici e chemiosintetici (produzione primaria), viene utilizzata dagli animali erbivori per la formazione di tessuto animale: a questo fenomeno si dà il nome di produzione secondaria. Analogamente si distingue una biomassa secondaria spesso indicata come biomassa zooplanctonica. A loro volta gli animali erbivori sono predati da una prima serie di

animali carnivori che sono però predati da altri animali carnivori e così via, per cui si ha tutta una serie di livelli trofici, la cosiddetta catena alimentare. Il processo però

è più complesso perché gli anelli della catena alimentare possono in vario modo collegarsi fra di loro fino a formare un'intricata rete alimentare. Inoltre, bisogna tenere presente che non tutto il materiale prodotto a ciascun livello trofico nella catena alimentare viene utilizzato

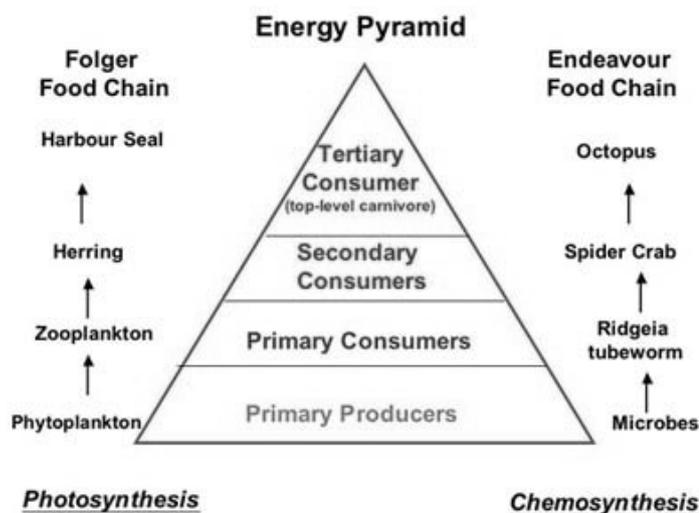


Figura 3. Piramide dell'energia

dagli animali del livello successivo. Vi sono infatti perdite di materiale organico dovute a diverse cause quali, ad esempio, la morte degli organismi e la loro successiva decomposizione a opera dei batteri. A parte ciò, non tutto il materiale ingerito viene assimilato, ma viene eliminato parzialmente con le feci; quello assimilato, poi, non è completamente utilizzato per formare nuova materia organica ma in parte viene demolito dai processi catabolici. L'efficienza del trasporto del materiale organico da un livello all'altro è molto varia ma in genere si considera che occorrono circa 100 g di cibo vegetale per formare 10 g di tessuto animale, con una resa quindi soltanto del 10% nel passaggio da ogni livello trofico al successivo. Pertanto, la biomassa degli organismi in una catena alimentare si distribuisce secondo una piramide alimentare, la cui base è rappresentata dai vegetali e i gradini successivi dagli animali dei diversi livelli trofici: ogni gradino è circa dieci volte più ampio di quello che lo segue andando verso la sommità. In definitiva, semplificando al massimo, 100 g di fitoplancton possono produrre 10 g di copepodi planctonici che a loro volta si trasformeranno in 1 g di tessuto di sardina, e poi in 0,1 g di squalo. Poiché inoltre la successione dei diversi predatori implica un graduale aumento di mole dell'animale passando da un livello trofico al successivo, ancora più drastica è la riduzione del numero di individui di una specie lungo la serie dei livelli trofici. (Cognetti et al., 2002)

Appare evidente che, dopo alcuni trasferimenti (in genere meno di sei), l'energia disponibile non è più sufficiente a sostenere ulteriori livelli trofici.

Quantitativamente, ci sono più acciughe che tonni ed è importante tener presente che l'abbondanza di una specie è determinante per la sopravvivenza di altre, anche se molto distanti nella rete trofica.

2.1 La catena alimentare standard in acquacoltura

La catena alimentare in acquacoltura è semplicemente una riproduzione di quella esistente in natura con l'unica differenza di essere più breve e più efficiente nell'ottica della massima resa con la minima spesa. Inoltre la scelta degli organismi intermedi e delle modalità di produzione, avviene in funzione del livello finale.

Tale concetto si esplica fundamentalmente nell'allevamento delle larve di pesci che richiedono tecniche e metodologie molto accurate, in quanto l'uso dell'alimento vivo ha comunque costi molto maggiori rispetto all'alimento inerte somministrato a partire dalle fasi giovanili.

L'alimentazione, in particolare, rappresenta un aspetto molto importante e delicato durante il primo periodo di sviluppo, poiché le larve di molte specie ittiche, alla nascita, sono di dimensioni ridotte, con organi di senso e apparato digerente non completamente sviluppati. Di conseguenza il tipo di alimentazione dovrà essere sia appetibile e digeribile, sia di dimensioni ridotte in proporzione alle dimensioni della bocca.



Figura 4. Catena trofica in acquacoltura: *Tetraselmis suecica* L.; *Brachionus plicatilis* M., *Artemia salina* L.

Il tentativo di impiegare esclusivamente mangimi nella prima fase di sviluppo di molte specie ittiche ha dato, per ora, risultati insoddisfacenti sulla sopravvivenza e sulla crescita. Ciò è probabilmente da attribuire alla bassa digeribilità e appetibilità del prodotto. Inoltre la ridotta apertura boccale (100-200 micron), le limitate capacità

di riconoscimento e assunzione di particelle inerti (diete artificiali) e il lento sviluppo dell'apparato digerente, accompagnato da un corredo enzimatico scarso o poco attivo, rappresentano gli ostacoli principali alla determinazione dei fabbisogni nutritivi e quindi alla formulazione di diete bilanciate in grado di garantire prestazioni produttive, quantitative (accrescimento e sopravvivenza) e qualitative (assenza di malformazioni, vescica natatoria, ecc.), ottimali e soprattutto costanti.

Anche se sono in atto sforzi per produrre mangimi più efficienti ed efficaci, attualmente gli unici alimenti utilizzabili sono gli zooplantoni *Brachionus plicatilis* M., in minor quantità il crostaceo *Artenia salina* L.; ed in alcune occasioni anche del fitoplacton (vedi figura 4). Questi oltre ad essere di piccole dimensioni e facilmente digeribili, si muovono in continuazione stimolando in tal modo le larve ad alimentarsi. Inoltre il movimento di questi organismi nella vasca assicura una omogenea distribuzione nella colonna d'acqua, facilitando incontri più frequenti tra larva e preda. Mentre le diete artificiali vengono inserite nel programma alimentare solo a partire dalla V - VI settimana dalla schiusa.

D'altro canto l'uso di alimento vivo pone diversi problemi: dalla necessità di fornire costantemente un numero di prede molto elevato (per esempio per allevare una larva di branzino in 30 giorni sono necessari fino a 17.500 nauplii), alla conoscenza delle qualità nutrizionali della preda, affinché sia bilanciata rispetto ai fabbisogni della larva. A questo proposito, i Rotiferi e le Artemie vengono arricchiti di proteine ed acidi grassi polinsaturi (EPA, DHA), sostanze necessarie allo sviluppo della larva e dell'avannotto, con l'uso di particolari integratori disciolti nell'acqua.

Il cibo utilizzato dagli allevatori per alimentare questi piccoli metazoi è molto spesso costituito da alghe unicellulari. La scelta della specie algale più idonea dipende da diversi fattori: dalle caratteristiche dell'acqua di mare utilizzata, dalle tecnologie applicate e, soprattutto, dalla composizione nutrizionale dell'alimento.

L'inizio dell'assunzione di cibo esogeno si ha al termine del riassorbimento del sacco vitellino (5-7 giorni), da questo momento i Rotiferi rappresentano l'alimento più utilizzato. Il successo dell'impiego dei Rotiferi, in particolare della specie *Brachionus plicatilis* M., può essere spiegato dalle sue piccole dimensioni (100 - 400 micron), dal suo lento movimento natatorio che favorisce l'attività predatoria delle larve, dalla sua diffusione e dalla relativa facilità di allevamento e, non ultima, dalla

sua plasticità fisiologica che ha permesso, con il progredire delle tecniche, di migliorarne il valore nutritivo.

Per sostenere lo sviluppo e la crescita dei Rotiferi sono usati diversi alimenti, tra cui le microalghe (*Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis* sp., ecc.), e il lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*), con cui si ottengono elevate densità colturali. (Saroglia e Ingle, 1992) Le ricerche fino ad ora condotte sul valore nutritivo dei Rotiferi hanno evidenziato, quale fattore principale che condiziona lo sviluppo delle larve, il contenuto in acidi grassi essenziali, ed in particolare la frazione degli acidi grassi altamente insaturi della serie ω -3. Il contenuto di acidi grassi dei Rotiferi è nettamente influenzato dal tipo di alimento che viene loro somministrato, per cui la finalità di molte ricerche è stata quella di definire come le diverse fonti incidano sul valore nutritivo di questi organismi (Ando et al., 2003, Blair et al., 2003). Molto spesso si prediligono le alghe ai lieviti come alimento poiché sono più ricche di acidi grassi, anche se i lieviti risultano un buon substrato per la crescita dei Rotiferi.

Il piccolo crostaceo *Artemia salina* L. (350-500 micron) rappresenta, nella catena trofica delle larve dei pesci marini, la tappa successiva ai Rotiferi: costituisce l'anello di collegamento con le diete inerti (mangimi secchi o umidi). Schematicamente i nauplii di *Artemia* coprono, sovrapponendosi ai Rotiferi, il periodo che va dal 12° al 20° giorno di età delle larve (di branzino), giorno in cui viene sospesa la somministrazione di *Brachionus plicatilis*. L'*Artemia salina* viene somministrata in genere fino al 55°- 60° giorno, ma già dopo il 35° giorno inizia il periodo di adattamento delle larve ai mangimi artificiali. Generalmente nell'alimentazione delle larve si utilizzano nauplii di *Artemia salina* appena schiusi, in quanto essi hanno un valore nutritivo del 28% superiore rispetto agli adulti, ma ultimamente si sta valutando la possibilità di somministrare l'*Artemia* in stadi giovanili. Una delle fasi critiche dell'allevamento delle larve è il periodo di adattamento al mangime artificiale o svezzamento. A seconda della precocità della specie, questo periodo inizia a 35-40 giorni di età, per terminare in genere intorno ai 60 giorni, in corrispondenza della fine della metamorfosi delle larve. (Cataudella S. e Bronzi P, 2001)

3. Alimentazione e nutrizione in acquacoltura

La nutrizione e l'alimentazione in acquacoltura risultano di notevole importanza dal punto di vista sia tecnico che economico, soprattutto negli impianti di piscicoltura di tipo intensivo dove le elevate densità di allevamento riducono le performance di crescita ed aumentano il rischio di patologie.

Sebbene le conoscenze sui fabbisogni dei pesci non abbiano ancora raggiunto un livello paragonabile a quello conseguito nella zootecnica terrestre, i dati acquisiti finora appaiono sufficienti a garantire più che soddisfacenti risultati, assicurando ottime prestazioni, elevata resistenza agli stress e alle malattie, contenimento dell'impatto ambientale e ottima qualità del prodotto. E' importante considerare anche gli aspetti gestionali relativi alla distribuzione dei mangimi per evitare spreco di alimento che aumenterebbe l'inquinamento e inciderebbe negativamente sull'economia dell'azienda. (Cataudella S. e Bronzi P., 2001)

Si è già accennato che, per un adeguato sviluppo larvale dei pesci, è necessario somministrare alimenti vivi come rotiferi e artemie. Questi organismi, a loro volta, devono essere alimentati in maniera adeguata in modo da ottenere un profilo nutrizionale utile alla crescita e allo sviluppo larvale: pertanto negli impianti è prevista anche la produzione di fitoplancton costituito da microalghe appartenenti a diverse specie e con specifiche peculiarità nutrizionali (Tabella 1).

Alimento 100 g	Peso Secco % (DW)	Acqua %	Calorie Kcal	Proteine % DW	Lipidi totali % DW	Carboidrati % DW
<i>Nannochloropsis sp.</i>	18.4	81.6	44.8	52.11	16.7	16
<i>Tetraselmis sp.</i>	9	91	48.2	54.66	14.27	18.31
<i>Pavlova sp.</i>	9	91	45	51.60	19.56	22-24
<i>Isochrysis</i>	9	91	45.5	46.69	17.07	24.15
<i>Thalassiosira sp.</i>	9	91	22	50	27.4	-

Tabella 1. Profilo nutrizionale microalghe (Reed Mariculture)

Risulta dunque necessario approfondire non solo le modalità di accrescimento dei pesci, consumatori finali, ma anche le capacità metaboliche degli organismi intermedi.

Le artemie vengono definite filtratori continui non selettivi e si cibano prevalentemente di batteri, protozoi, microalghe e detriti (*Provasoli e Shiraishi, 1959; Reeve, 1963b; D'Agostino, 1980;*) Iniziano a ingerire cibo nella fase di metanauplii attraverso le ciglia delle antenne larvali (*Barlow e Sleight, 1980*). Durante lo sviluppo post-embrionale la funzione di predazione passa gradualmente ai toracopodi² (*Schrehardt, 1987*), che sono pienamente sviluppati nella fase pre-adulta (*Blanchard, 1987*): questi creano correnti d'acqua che convogliano il cibo verso la bocca.

I molluschi bivalvi, essendo animali sedentari o sessili, non possono muoversi alla ricerca del cibo, ma devono captare tutto ciò che è trasportato dai movimenti della massa d'acqua. Tale meccanismo di presa del cibo viene efficientemente compiuto dalla filtrazione attraverso le branchie poste nella cavità del mantello. I materiali presenti nell'acqua, come alghe unicellulari (fitoplancton), piccoli animali planctonici (zooplancton) e particelle di sostanza organica inerte, vengono opportunamente filtrati e trasportati alla bocca. Il meccanismo della filtrazione è particolarmente efficiente sia dal punto di vista volumetrico che dimensionale: un bivalve può, infatti, filtrare un volume d'acqua da 30 a 60 volte il volume del suo corpo in un'ora!

I pesci possono alimentarsi con modalità di ricerca e presa del cibo molto diverse. Vi sono pesci predatori, succhiatori, raschiatori, filtratori. La maggior parte dei pesci sono carnivori, poche specie erbivore, altri onnivori. Alcune specie sono monofaghe o stenofaghe, cioè si alimentano con una sola o poche categorie alimentari, ma la maggior parte dei pesci è eurifaga. Questa versatilità è necessaria dato il verificarsi di naturali fluttuazioni, sia quantitative che qualitative, del cibo di cui dispongono. I pesci che si nutrono di crostacei o comunque di organismi duri da frantumare

² Coppie di arti del torace

hanno denti modificati in vere e proprie piastre trituratrici: l'orata, ad esempio, si ciba prevalentemente di mitili staccandoli dagli scogli con colpi di testa e triturando le valve calcaree con i denti. (Cognetti et al., 2002)

La quantità di alimento ingerita dipende da molteplici fattori classificati come intrinseci ed estrinseci. Quelli intrinseci sono distinti a loro volta in meccanismi a breve termine (sotto controllo ipotalamico), ed a lungo termine, legati al livello di adiposità dell'organismo. Essi dipendono poi dall'età, dalla taglia e dallo stato fisiologico dell'animale.

Altri, definiti estrinseci, sono legati alle caratteristiche dell'alimento e alle condizioni ambientali, come la temperatura dell'acqua, l'ossigeno disciolto, il fotoperiodo e l'intensità di luce. Tra i fattori intrinseci più importanti si segnala il peso vivo del pesce poiché la quantità di alimento ingerita, in percentuale del peso vivo, diminuisce al crescere della taglia. Inoltre, tra i fattori estrinseci, si ricordano le caratteristiche dell'alimento, quali il suo livello di energia, la presenza di quantità elevate di proteine vegetali o di sostanze anti-nutrizionali e le dimensioni dei bocconi.

Molti di questi fattori vengono considerati dai produttori di mangimi nelle specifiche tabelle di razionamento individuando le quantità idonee in funzione della specie, della taglia del pesce e della temperatura dell'acqua.

Per il calcolo delle quantità da distribuire è, dunque, necessario conoscere la taglia media dei pesci e la biomassa totale in vasca, ricorrendo a periodici campionamenti. La raccolta periodica di questi dati permette di calcolare il tasso di accrescimento specifico in percentuale giorno

$$\{TAS = [(\ln (\text{peso finale, g}) - \ln (\text{peso iniziale, g})) / \text{numero giorni}] \times 100 \}$$

e di stimare così anche il peso che verrà raggiunto dopo un periodo di giorni "t". Infatti il peso finale (Pt) sarà uguale a $P_t = P_o \times e^{(TAS \times t/100)}$ dove P_o è il peso iniziale ed "e" è il numero di Nepero. I dati ottenuti consentono anche di calcolare l'indice di conversione

$$\{IC = (\text{alimento distribuito, kg} / \text{accrescimento realizzato, kg})\}$$

parametro questo che dà subito un'idea della precisione del razionamento.

Se il tasso di razionamento (R) è espresso in percentuale del peso vivo, l'indice di conversione può essere calcolato dal rapporto ($IC = R/TAS$). D'altra parte, conoscendo l'indice di conversione e il valore di (R), si può calcolare il valore del TAS.

L'energia è tutt'ora considerata il fattore principale che regola l'ingestione, ma altrettanto importante è la disponibilità di specifici nutrienti essenziali: amminoacidi, vitamine e minerali. La carenza di un solo nutriente essenziale, ridurrà l'ingestione del cibo nei pesci.

Quando sono somministrate diete carenti in nutrienti essenziali, si possono verificare due opposte situazioni: un incremento dell'ingestione, al fine di provvedere alla ricerca del nutriente mancante, se tale carenza è leggera, oppure, il pesce, di fronte ad una grave carenza, diminuisce drasticamente l'ingestione. Una possibile spiegazione a quest'ultima evenienza è in termini di risparmio metabolico: i pesci preferiscono ridurre l'ingestione invece di forzare il loro metabolismo verso un esagerato consumo di diete scarsamente bilanciate.

Fattori stimolanti l'alimentazione possono essere usati per aumentare la palatabilità dei mangimi e l'accettabilità di fonti alternative di proteine. Specifici componenti influenzano direttamente l'ingestione e l'assorbimento, come ad esempio i D-aminoacidi (es. prolina), alcune combinazioni di aminoacidi (es. taurina, alanina ed arginina), i fattori antinutrizionali presenti nella soia e le aflatossine. (*Cataudella S. e Bronzi P., 2001*)

3.1 Fabbisogni nutrizionali dei pesci

3.1.1 Proteine e amminoacidi

Le proteine rappresentano una quota rilevante della dieta dei pesci. Gli amminoacidi della dieta si sommano a quelli riciclati dalle proteine corporee, soggette ad un continuo turnover di rinnovamento delle cellule, per essere insieme utilizzati nella sintesi di nuova massa proteica (accrescimento) e di altri composti azotati bioattivi.

Rispetto al pollo o al suino, il riciclo di amminoacidi (aa.) dai tessuti corporei è quantitativamente minore nei pesci, rendendoli molto dipendenti dalla dieta per la

copertura dei fabbisogni proteico - amminoacidici. Dei 20 aa. costitutivi delle proteine, alcuni non sono sintetizzabili dagli animali e tale mancanza deve essere sopperita con il mangime.

La proteina ingerita non è completamente utilizzata dai pesci per la crescita: dal 5 al 15% si perde nelle feci e parte degli amminoacidi assorbiti sono metabolizzati per ottenere energia vitale, specialmente nei carnivori. Questo processo origina "scorie azotate" formate in prevalenza da ammoniaca eliminata attraverso le branchie che, insieme alle feci, contribuisce ad elevare il carico inquinante dell'allevamento. La variabilità del livello proteico ottimale dipende in misura modesta da fattori quali la taglia del pesce, temperatura e salinità dell'acqua.

Molto più influenti sono i fattori alimentari ed, in primo luogo, il razionamento adottato: questo, se troppo restrittivo, richiede un aumento del livello proteico del mangime per assicurare la crescita attesa. Il livello proteico ottimale è inoltre condizionato dal contenuto energetico del mangime ed in particolare dall'apporto calorico delle frazioni lipidica e glucidica. Un corretto rapporto tra proteina ed energia digeribili (PD/ED), realizzato bilanciando i macronutrienti nella dieta, favorisce un maggior utilizzo di "carburanti" non proteici per sostenere il costo calorico del pesce facendo "risparmiare" amminoacidi dietetici, altrimenti catabolizzati per produrre energia.

Anche la qualità della proteina condiziona il livello ottimale nel mangime: ingredienti proteici poco digeribili e con composizione in aa. limitante rispetto ai fabbisogni del pesce, portano ad elevare il livello proteico del mangime a discapito di una efficiente conversione proteica.

Per l'elevato tenore proteico, l'ottimo profilo amminoacidico, l'alta digeribilità ed appetibilità, la farina di pesce, purché ottenuta con idonei processi industriali a partire da pescato fresco e privo di contaminanti, rappresenta la fonte proteica ideale nei mangimi per l'acquacoltura.

Un'alternativa alle farine di pesce è data dalle proteine d'origine vegetale. Si tratta di alimenti diversificati per origine e processo tecnologico di produzione; molto spesso, però, presentano minor titolo proteico, ridotta digeribilità ed appetibilità, profilo amminoacidico carente o sbilanciato, presenza di fattori antinutrizionali. (Tufarelli et al., 2006)

Tra questi i legumi sono stati i primi ad essere individuati come possibile alternativa alla farina di pesce, grazie al loro elevato contenuto di proteine.

I fattori antinutrizionali dei semi delle leguminose possono essere parzialmente o totalmente inattivati mediante il calore, come avviene nel processo di produzione del mangime per estrusione. Come parziali sostitutivi nei mangimi per l'orata sono stati testati diversi legumi quali i piselli, i ceci e i fagioli faba. L'accrescimento e l'utilizzazione dei diversi mangimi a base di legumi sono stati soddisfacenti, e solo i piselli sembrano influenzare negativamente il fattore di conversione: i legumi possano essere inclusi nella dieta senza problemi fino ad una percentuale del 35%, come già è stato verificato in studi precedenti per il branzino alimentato con la farina di semi di pisello.(*Adamidou et al, 2008*)

La sostituzione della farina di pesce nella dieta di branzini (*D. labrax*) e orata (*S. aurata*) risulta particolarmente interessante per l'acquacoltura data la loro diffusione e importanza commerciale. Una sostituzione del 25-30% con farina di soia non provoca effetti negativi sulla crescita, la conversione del cibo, l'efficienza e la ritenzione proteica di queste specie. Si è visto, inoltre, che si può sostituire fino al 50% di farina di pesce con farina di soia bilanciata con l'aggiunta di un integratore amminoacidico sintetico a lento rilascio, e che è possibile una riduzione delle proteine fino al 40-46% senza che vengano ridotte le prestazioni dei pesci.(*Kotzamanis et al., 2008*)

Negli ultimi anni è stata presa in considerazione la farina di semi di cotone come sostituto della farina di soia, a sua volta sostituto della farina di pesce. Questa farina è un residuo della produzione del cotone, ottenuto dopo che le fibre sono state prelevate e i semi macinati per estrarne l'olio. In Iran è stato testato come sostituto parziale o totale della soia nella dieta della trota iridea (*O. mykiss*): le prove hanno indicato che questa varietà di farina di cotone non influenza negativamente l'accrescimento, anche quando sostituisce la soia al 100%, producendo accrescimenti simili, e suggerendo che può essere presente nella formulazione della dieta della trota fino al 30%. Ha inoltre un prezzo inferiore a quello della soia. (*Dagdar et al., 2008*)

Un'altra promettente risorsa proteica vegetale è il lupino bianco, *Lupinus albus*, una pianta annuale, ampiamente distribuita nella regione mediterranea, dai Balcani alla

Sicilia e alla Sardegna, nel mar Egeo, in Israele, Palestina e nella Turchia occidentale. Ha un elevato contenuto proteico ed un basso livello di fattori antinutrizionali. È stato testato come sostituto parziale della farina di pesce nella dieta estrusa della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Anche in questo caso è stato verificato che l'inclusione di elevati livelli di lupino bianco (30-50%) nei mangimi, non ha influenzato le prestazioni dei principali parametri produttivi, primo l'accrescimento; inoltre l'inclusione di lupino bianco fino al 50% non altera la qualità nutrizionale del muscolo della trota iridea. (Bòrguez et al., 2008)

Anche la farina di nocciole è stata utilizzata come possibile sostituto della farina di soia nella dieta di trote iridee: questa non ha prodotto differenze nell'accrescimento e nel coefficiente di crescita specifico, solo una leggera riduzione dell'utilizzazione del cibo se somministrata a concentrazioni elevate. Anche la composizione del muscolo e del pesce in toto non ha mostrato differenze; sembra quindi che la farina di nocciola possa sostituire la farina di soia nella dieta di trota iridea fino a 300g/kg di mangime commerciale. (Tekinay et al., 2008)

3.1.2 Lipidi

Gli acidi grassi essenziali sono forniti dal cibo e sono necessari agli animali per sostenere le attività biochimiche e le funzioni fisiologiche. Gli acidi grassi della serie ω -3 e ω -6 con più di 18 atomi di carbonio sono sintetizzati principalmente dal fitoplancton acquatici e sono trasferiti attraverso la catena alimentare agli animali superiori. (Moreno et al., 1979)

La composizione in acidi grassi di microalghe planctoniche, alimento principale di organismi marini, varia notevolmente e dipende dalla posizione tassonomica della specie. (Walkman et al., 1989)

La maggior parte degli studi per fini acquacolturali, hanno evidenziato che l'aggiunta di acidi grassi essenziali (PUFA) alle diete, migliora le performance di crescita e la riproduzione degli animali; essi inoltre concorrono all'assorbimento di vitamine ed altri micronutrienti liposolubili.

Similmente ad altri vertebrati, nei pesci, alcuni acidi grassi risultano essenziali (AGE), ovvero non possono essere sintetizzati dall'animale. Tuttavia solo una carenza dietetica molto prolungata di AGE porta alla morte del pesce, mentre

subcarenze o carenze periodiche danneggiano le prestazioni produttive e riproduttive. Infatti gli AGE sono necessari ai pesci come componenti dei fosfolipidi delle membrane cellulari e delle lipoproteine di trasporto e come substrato per la sintesi di una intera famiglia di molecole con caratteristiche ormonali, quali le prostaglandine (PG) e i composti derivati (leucotrieni e trombossani).

I fabbisogni in AGE differiscono da specie a specie ed, in generale, si osserva che i pesci d'acqua dolce richiedono l'acido linoleico o l'acido linolenico o entrambi, mentre quelli marini, stenoalini, l'acido eicosapentaenoico e/o l'acido docosaesaenoico. (*Bell et al., 1986*)

Oggi, l'interesse verso tali nutrienti si è concentrato sull'aspetto energetico dal momento che i lipidi, se forniti in quantità idonee, consentono di evitare il consumo di proteine per fini energetici, di ridurre il rilascio di azoto nell'ambiente e di migliorare l'indice di conversione alimentare.

Non esiste un fabbisogno assoluto per la categoria generale dei lipidi, tuttavia i livelli lipidici nelle diete non possono prescindere dalla specie, dallo stadio di sviluppo (avannotto, pesce in accrescimento, riproduttore), dal rapporto ottimale energia/proteina per quella data specie (Tabella 2).

L'impiego degli attuali mangimi estrusi richiede un maggior controllo del razionamento e dello stato di conservazione dei grassi, che possono essere soggetti ad ossidazione; in particolare gli effetti negativi sono legati alla maggiore quantità di grasso depositato nel pacchetto viscerale e nella possibilità che vengano modificate le caratteristiche organolettiche della parte edibile.

Particolare importanza rivestono i lipidi nel corso della vitellogenesi, momento in cui si mobilitano i depositi lipidici corporei e vengono incorporati nell'ovario durante lo sviluppo delle uova. Normalmente il contenuto lipidico delle uova varia dall'1,5 al 10% (sul tal quale) nei pesci d'acqua dolce. Anche i lipidi di origine alimentare giocano un ruolo importante: fino al 50% dei lipidi totali degli oociti di trota iridea sono di origine alimentare. Ancora una volta, occorre considerare le abitudini alimentari di ciascuna specie ittica per comprendere le differenze interspecifiche nell'importanza relativa delle riserve corporee e dei lipidi della dieta. (*Sargent et al., 1989*).

Specie	Taglia (g)	Prot. Dig. (%)	Energia dig. (MJ kg ⁻³)	DP/DE (g/MJ kg ⁻³)
Trotta iridea	94	42	17,15	24,48
	175	42,3	23,2	18,23
Carpa comune	20	31,5*	12,1*	25,96
Tilapia nilotica	50	30	12,1	27,27
Hybrid bass	35	31,5	11,7	26,89
Pesce gatto americano	34	28,8*	12,8*	22,42
	266	27,0	13,1	20,55
	600	24,4*	12,8*	19,12
Branzino	175	41,8	20,6	19,00
Red drum	43	31,5*	13,4*	23,52

* Proteina digeribile ed energia digeribile stimati in funzione della composizione chimica degli ingredienti della dieta.

Tabella 2. Rapporto ottimale energia/proteina per diverse specie

Un effetto marcato del profilo degli acidi grassi dei lipidi della dieta su quello delle uova è stato anche riscontrato per l'orata (*Sparus aurata*) (Mourente e Odriozola, 1990; Harel et al., 1993): questa specie, sembra avere un fabbisogno più elevato in HUFA ω -3 per la riproduzione rispetto a quello riportato per la crescita, dal momento che è stato riscontrato un effetto positivo della somministrazione di diete ad elevato contenuto in HUFA ω -3 (1.6% della dieta) per tre settimane sulla fecondità, tasso di schiusa e sopravvivenza delle larve. Tale effetto potrebbe infatti derivare dal loro ruolo di precursori delle prostaglandine (PG), alcune delle quali, come la PGF₂, agiscono come feromoni nel pesce rosso (*Carassius auratus*), stimolando il comportamento sessuale del maschio e sincronizzando la frega dei maschi e delle femmine (Sorensen et al., 1988).

Comunque il profilo degli acidi grassi delle uova è risultato ancora una volta fortemente influenzato dalla fonte lipidica utilizzata nella dieta (Hardy et al., 1989) ed è stato riscontrato che la modificazione della composizione in acidi grassi della dieta, a seguito dell'utilizzo di fonti lipidiche alternative di origine animale e vegetale (sego bovino e olio di soia), al posto dell'olio di aringa nella formulazione delle diete per riproduttori di salmone coho, porta a significative alterazioni del profilo degli acidi grassi dei lipidi delle uova spremute, senza che la sopravvivenza delle uova stesse, fino alla fase di embrione, venisse ridotta.

L'olio di colza (*Brassica napus*) è stato identificato come un promettente sostituto dell'olio di pesce fino al 50%, anche se la sostituzione comporta una alterazione della composizione in acidi grassi, con meno EPA e DHA. Infatti, in *Salvelinus alpinus* non sono state trovate differenze nei lipidi totali del muscolo bianco e una maggior quantità di lipidi totali nel fegato; in tutti i casi si è avuta però una riduzione del rapporto ω -3/ ω -6. (Pettersson et al., 2008)

3.1.3 Carboidrati

I carboidrati si trovano prevalentemente sotto forma di glicogeno, amido, chitina, cellulosa e lignina. La maggior parte degli animali può utilizzare solo glicogeno e amido, grazie alla produzione di amilasi per la loro digestione. Le eccezioni (ad es. i ruminanti) sono possibili grazie a simbiosi con forme di flora intestinale che produce cellulalasi e chitinasi (digestione microbica).

I pesci non fanno eccezioni a questa regola. Poiché la maggior parte dei pesci è carnivora od onnivora, i carboidrati non sono i maggiori costituenti della loro dieta. Alcune specie sia d'acqua dolce che marine, tuttavia, sono specializzate per una dieta erbivora, e molte specie, anche di interesse per l'acquacoltura, sono capaci di nutrirsi di significative quantità di cibo vegetale.

Comunque, i pesci, in generale, hanno una scarsa capacità di utilizzare i carboidrati contenuti nella dieta poiché incapaci di metabolizzare rapidamente il glucosio: un eccesso di carboidrati nella dieta stimola la sintesi di glicogeno.

Sebbene nei pesci siano presenti tutti gli enzimi della degradazione del glicogeno, il loro ruolo nell'omeostasi della glicemia è scarso: infatti lunghi periodi di digiuno non causano diminuzione del glicogeno muscolare; al contrario, è stato dimostrato che la via preferenziale per il mantenimento dei livelli ematici di glucosio nei pesci è la gluconeogenesi. In definitiva in questi animali il glucagone, l'ormone responsabile dell'incremento di glucosio nel sangue, stimola la gluconeogenesi e non la glicogenolisi.

Dunque, la quantità di carboidrati nella dieta dei pesci di allevamento deve essere accuratamente controllata, in quanto l'eccesso di carboidrati tende ad accumularsi come glicogeno, che, per questi animali, rappresenta una forma di riserva non disponibile ad un utilizzo rapido come fonte di energia.

La percentuale di carboidrati nella dieta può essere più alta per le specie onnivore (ad es. 30-40 % nella carpa) e molto più bassa (fino al 10 %) per le specie carnivore. (Cataudella S. e Bronzi P., 2001)

3.1.4 Micronutrienti

Le vitamine sono in genere classificate in liposolubili (A, D, E e K) ed idrosolubili (gruppo B, vit. C, colina e inositolo). Le prime vengono assorbite a livello intestinale in presenza di lipidi e possono essere accumulate nelle riserve adipose; le seconde vengono assorbite mediante trasporto attivo, sono solubili in acqua e non possono essere accumulate dai pesci.

Particolare importanza rivestono i micronutrienti in fase riproduttiva: la maggior parte degli studi riguardanti gli effetti del contenuto vitaminico della dieta sul successo dei riproduttori, individuano le diverse forme di vitamina C come composti capaci di migliorare la qualità delle uova, soprattutto in relazione alla loro attività sinergica con la vitamina E, nel mantenere i livelli intracellulari di antiossidanti e di trappole per i radicali liberi.

Oltre alla vitamina E, la vitamina C svolge anche un'azione sinergica con il Selenio nel mantenimento dell'attività della glutazione perossidasi e della superossido dismutasi (Halver, 1989). Inoltre l'acido ascorbico agisce come regolatore e cofattore nella biosintesi degli steroidi nel follicolo e nelle cellule surrenali e risulta molto importante nella sintesi di collagene, dove gioca un ruolo importante come cofattore nell'idrossilazione della prolina e della lisina (Halver, 1989). Inoltre hanno riscontrato un incremento nel contenuto di acido ascorbico delle gonadi di merluzzo (*Gadus morhua*) nel corso della maturazione sessuale. Un aumento del contenuto in acido ascorbico negli oociti o nell'ovario e una deplezione delle riserve corporee di vitamina C durante lo sviluppo delle gonadi sono anche state riportate per Vimba vimba (Dabrowski, 1976), carassio (*Carassius carassius*) (Seymour, 1981) e salmerino alpino (*Salvelinus alpinus*) (Dabrowski, 1991). Inoltre, molti autori suggerirono che il contenuto di vitamina C delle diete per i riproduttori di trota debba essere pari ad almeno 100 mg/kg, per ottenere un contenuto di acido ascorbico nelle uova superiore a 20 µg/g, al fine di ottenere risultati ottimali nella schiusa.

Molto importanti sono anche le altre vitamine: la vitamina A (retinolo), che è presente negli alimenti vegetali soltanto come provitamina o carotene, agisce sulla moltiplicazione cellulare, sulla vista e sulla protezione degli epitelii, la vitamina D interviene nel ricambio del calcio e del fosforo; la vitamina E partecipa al metabolismo cellulare e ha una funzione antiossidante e la vitamina K che interviene nella coagulazione del sangue.

In particolare la vitamina E è stata oggetto di numerosi studi, data la relazione che esiste tra l' α -tocoferolo ed il metabolismo lipidico (*Luquet e Watanabe, 1986*) ed il suo ruolo come antiossidante. Infatti, pare che sia coinvolta nella permeabilità della membrana embrionale e nella schiudibilità delle uova.

È stato dimostrato che il livello di tocoferoli nella dieta ha un effetto significativo sul contenuto in vitamina E delle uova di diverse specie ittiche (*Sugii e Kinumaki, 1968; King et al., 1985*), ma i pesci sembrano immagazzinare in anticipo sufficiente α -tocoferolo per soddisfare i fabbisogni dell'ovario in via di sviluppo.

È noto da tempo che i pigmenti carotenoidi vengono depositati nell'ovario e nella cute dei maschi prima della frega (*Mikulín e Soin, 1975; Czezuga, 1979*). In natura vengono assunti tramite l'ingestione di alghe e crostacei che ne contengono grandi quantità, mentre in allevamento, i pigmenti devono essere necessariamente forniti con la dieta e risultano fondamentali per l'ottenimento del tipico colore arancio delle carni del salmone o della trota salmonata e per ottenere il tipico colore rosa della pelle dei pagelli. (*Kalinowski et al., 2005*)

I carotenoidi, oltre alla funzione di pigmenti, giocano un ruolo simile a quello dell' α -tocoferolo nel proteggere tessuti delicati e composti reattivi all'azione ossidativa. Altri possibili ruoli dei carotenoidi includono un coinvolgimento nella respirazione delle uova o nella loro capacità di tollerare condizioni ambientali sfavorevoli, come ridotti livelli di ossigeno disciolto, elevati tassi di ammoniaca indissociata, o alte temperature e intensità luminose.

I minerali essenziali per i pesci sono circa 20 e possono essere classificati in macroelementi (Ca, P, K, Mg) e microelementi (Fe, Zn, Mn, Co, Cu, I, Se). Tra i macro, il fosforo (P) assume una particolare importanza in quanto viene scarsamente assunto dall'acqua, e quindi, deve essere fornito con la dieta. Peraltro, un contenuto eccessivo di P nelle diete aumenta la concentrazione dei fosfati nei

reflui, una delle principali cause del fenomeno di eutrofizzazione delle acque. L'uso di proteine vegetali addizionate con l'enzima fitasi consente di contenere il livello di P negli alimenti, di ridurre la quantità di P rilasciato nelle acque reflue a 6-7 kg/t di pesce prodotto e di migliorare l'utilizzazione di altri ioni (Zn, Fe) e delle proteine.

Il calcio (Ca) viene utilizzato nella formazione dello scheletro, ma interviene pure nella coagulazione del sangue oltre al ruolo di coenzima in diverse reazioni.

Il magnesio (Mg) viene metabolizzato in associazione al calcio e fosforo ed è un costituente fondamentale di diversi enzimi; il sodio (Na), il potassio (K) e il cloro (Cl) intervengono nella regolazione osmotica.

Tra i microelementi molto importante è il ferro (Fe), essenziale per la formazione dell'emoglobina e per diverse reazioni enzimatiche.

Infine, lo zinco (Zn), il manganese (Mn) e il rame (Cu) agiscono come cofattori e attivatori di importanti reazioni enzimatiche.

Nella determinazione dei fabbisogni minerali, a differenza degli animali terrestri, nei pesci bisogna considerare che alcuni elementi minerali (Ca, Mg, Na, K, Fe, Zn, Cu e Se) possono essere assunti direttamente dall'acqua mediante le branchie, la pelle e l'apparato digerente. (*Cataudella e Bronzi, 2001*)

4. Qualità e salubrità dei prodotti ittici

4.1 Profilo nutrizionale del pesce nell'alimentazione umana

Per l'alimentazione umana, il termine "pesce" identifica, genericamente, le carni e le altre parti edibili di animali acquatici ottenuti dalle attività di pesca e dall'acquacoltura comprendendo, oltre ai veri e propri pesci, anche molluschi e crostacei.

Le specie di maggiore interesse alimentare appartengono alle seguenti categorie:

- Pesci:
 - *teleostei*: clupeiformi, anguilliformi, gadiformi, perciformi, pleuronettiformi;
 - *selaci*: squaliformi e raiformi;
 - *ganoidi*: arcipenseriformi (storione).
- Molluschi:
 - *lamellibranchi*: mitiloidi (mitili), pteriodi (ostriche, cappellette, ecc.), veneroidi (vongole, telline);
 - *cefalopodi*: decapodi (seppie e calamari), ottopodi (polpi, totani, moscardini).
- Crostacei:
 - *decapodi* (gamberetti, scampi, aragoste);
 - *brachiuri* (granchi).

Secondo la classificazione ISSCAP (International Standard Statistical Classification of Aquatic Animals and Plants), i prodotti ittici si suddividono in:

- Pesci di acqua salata: aringa, dentice, merluzzo, orata, spigola (o branzino), sarago, sogliola, sardina, tonno, acciuga o alice, sgombro, ecc..
- Pesce di acqua dolce: carpa, luccio, pesce persico, trota, tinca.
- Pesci diadromi: salmone, anguilla.
- Molluschi: calamaro, seppia, polpo, dattero di mare, mitilo, ostrica, vongola.
- Crostacei: aragosta, gamberetto, granchio, canocchia, scampo.

La composizione del pesce è alquanto simile a quella della carne, soprattutto per quanto riguarda la ripartizione dei macronutrienti. Come nella carne, l'acqua è il

componente principale (60-80%): il suo contenuto varia in proporzione inversa al contenuto di lipidi. Le proteine sono presenti nella misura del 15-25% circa. Rispetto agli animali a sangue caldo, i muscoli dei pesci si differenziano principalmente per una minor quantità di tessuto connettivo, costituito in prevalenza da collagene, che gelatinizza a temperature inferiori rispetto a quello della carne. Dopo la cottura, infatti, la carne di pesce tende a sfaldarsi più facilmente rispetto a quella degli animali terrestri.

Le fibre muscolari sono più corte e organizzate in lamine. Le proteine, in particolare la miosina, sono più sensibili alla denaturazione e alla proteolisi. I grassi possono oscillare tra lo 0,5 e il 22% del totale.

In base al contenuto di grassi, i pesci si suddividono in:

- Grassi (>8%): anguille, aringhe, sgombri, salmoni.
- Semimagri (3-8%): triglie, sardine, coregoni, cefali, carpe, tonni, storioni.
- Magri (<3%): sarde, trote (di allevamento e non), dentici, orate, spigole, merluzzi, halibut, pesci gatto, pagelli, calamari, cernie, seppie, rombi, palombi, polpi, razze.

Nei muscoli dei pesci magri, i trigliceridi sono pressoché assenti. Gli unici pesci con una percentuale veramente alta di grassi sono le anguille, che ne contengono fino al 22%. Il grasso del pesce, rispetto a quelli degli animali terrestri, presenta una percentuale maggiore di acidi grassi insaturi, prevalentemente quelli della serie Omega 3, che mantengono fluido il grasso anche alle basse temperature delle acque dei mari e dei fiumi freddi; inoltre contengono un elevato tasso di fosfolipidi (soprattutto lecitine) ed un contenuto minore di colesterolo (circa 60 mg/100 g); esistono tuttavia alcune eccezioni: è il caso di sgombri (100 mg/100 g), cozze (120 mg/100 g) e gamberi (150 mg/ 100 g).

I glucidi sono presenti in modeste quantità (0,5-1%) e sono costituiti prevalentemente da monosaccaridi e tracce di glicogeno.

Notevole è il tenore di minerali nella carne di pesce (0,8-2%); fra questi prevalgono fosforo, calcio e iodio (pesce marino).

La carne dei molluschi e dei crostacei ha una composizione analoga a quella del pesce magro, con alcune caratteristiche peculiari: il tenore di proteine (13-18%) è

leggermente inferiore rispetto agli altri pesci; i glucidi sono piuttosto abbondanti, fino al 6-10%, motivo per cui i crostacei hanno un sapore così dolce; il tenore totale di grassi è basso (1-2%). Le cozze e le ostriche contengono un'elevata quantità di ferro e di vitamina C (fino al 60% dell'assunzione giornaliera raccomandata)

COMPOSIZIONE CHIMICA PER 100g DI PARTE EDIBILE DEI PRINCIPALI MOLLUSCHI BIVALVI			
Composizione	Cozza o mitilo	Ostrica	Vongola
Parte edibile %	32	12	25
H₂O g	82,1	85,7	82,5
Proteine g/100	11,7	10,2	10,2
Grassi g/100	2,7	0,9	2,5
Colesterolo mg/100 g	121	150	-
Carboidrati g/100	3,4	5,4	2,2
Vitamine:	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g
vitamina A	0,05	0,08	0,02
vitamina B1	0,12	0,10	-
vitamina C	17	5	-
vitamina D	0,15	0,22	-
vitamina E	0,2	-	-
Sali minerali:	mg/100g	mg/100 g	mg/100g
Zinco	1,87	-	-
Sodio	290	510	36
Calcio	88	186	-
Ferro	5,8	6	-
Fosforo	236	267	-
Potassio	320	260	
Cloro	455	620	
Rame	0,09		1,2
Magnesio	65,7		

Tabella 3. Fonte dati istituto nazionale di ricerca per gli alimenti e la nutrizione (INRAN)

Nei crostacei c'è da segnalare un contenuto in colesterolo più elevato che nei molluschi e nei pesci. I gamberi ne possono contenere da 95 a 180 mg ogni 100 grammi di parte edibile. I crostacei sono, comunque, una buona fonte di zinco, magnesio, iodio e ferro.

Un consumo regolare di pesce, almeno due volte a settimana, è consigliato per un'alimentazione sana e corretta. Il pesce, infatti, è un alimento prezioso per la sua

alta digeribilità, per l'elevato contenuto di proteine ad alto valore biologico, di minerali e vitamine e per la particolare composizione della frazione lipidica. È più digeribile della carne grazie al minore contenuto di connettivo; inoltre le fibre muscolari sono più corte e le proteine più sensibili alla denaturazione e alla proteolisi. (INRAM)

Dal punto di vista plastico, il pesce ha lo stesso valore alimentare della carne; pur possedendo un tenore medio di proteine più basso, hanno, però, un valore biologico e un'utilizzazione proteica netta più elevati. L'alto contenuto di fosforo non rappresenta il carattere distintivo del pesce, considerata la presenza del minerale in molti alimenti. La peculiare abbondanza di acidi grassi polinsaturi della serie Omega 3, il basso contenuto di colesterolo e quello relativamente elevato di fosfolipidi, fanno del pesce un alimento particolarmente adatto alla prevenzione delle malattie cardiovascolari correlate all'aterosclerosi.

In particolare, l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), della serie Omega 3, è un precursore delle prostaglandine della serie 3m, che hanno un'azione antitrombotica e vasodilatatrice a differenza di quelle della serie 2, derivanti dall'acido arachidonico (20:4n-6), che inducono l'aggregazione delle piastrine.

La scarsa trombogenicità piastrinica riscontrata nei consumatori abituali di pesce è stata attribuita ad un elevato livello di EPA nel plasma e nelle piastrine e alla contemporanea limitata presenza di arachidonico. Agli acidi grassi omega 3 sono, inoltre, state attribuite funzioni essenziali per lo sviluppo cerebrale, per la retina e per il rallentamento dell'invecchiamento cutaneo.

Numerosi studi hanno dimostrato che gli acidi grassi polinsaturi, inseriti nella dieta durante la gravidanza, prevengono la depressione post-parto. Inoltre, per evitare un parto prematuro, è consigliato il consumo di pesce almeno una volta a settimana.

Il British Medical Journal, rivela che alcuni ricercatori danesi hanno tenuto sotto controllo 8.700 donne in gravidanza scoprendo che, con la protezione degli acidi grassi Omega 3 contenuti nel pesce, il rischio d'interruzioni di gravidanza diminuisce di oltre il 30%. Infine, specialisti della nutrizione dell'Università britannica del Surrey hanno messo a punto un menù per aumentare la fertilità dell'uomo: una dieta ricca di frutta, verdura e soprattutto proteine provenienti dal pesce.

4.2 Igiene e sicurezza

Uno dei principali problemi della commercializzazione del pesce deriva dalla sua elevata deperibilità. I prodotti ittici sono, infatti, facilmente deteriorabili per la particolare composizione chimica e per le specifiche caratteristiche fisiologiche e strutturali.

I fenomeni che avvengono dopo la morte dell'animale sono simili a quelli che interessano la carne: esaurimento delle riserve di ATP del muscolo; formazione di legami irreversibili tra le proteine del tessuto muscolare (actina e miosina); aumento dell'acidità; liberazione degli enzimi, che danno inizio alle reazioni di degradazione. Le differenze che, tuttavia, si riscontrano sono all'origine della minor durata di conservazione del pesce: il rigor mortis e la frollatura hanno un decorso molto limitato: a 0° C durano rispettivamente 5 ore e 30 ore circa, trascorse queste, le qualità organolettiche cominciano a cadere. Grazie ad un maggior contenuto d'acqua, a scapito del tessuto connettivo, e ad una struttura molecolare delle proteine meno "addensata" rispetto a quelle dei mammiferi, le carni sono più tenere ma anche più esposte alla penetrazione dei microrganismi. Inoltre, l'aumento dell'acidità è limitato dalla modesta quantità di carboidrati presenti che, durante la glicolisi anaerobica, producono ridotte quantità di acido lattico. Ciò non ritarda lo sviluppo dei microrganismi che sono normalmente presenti nel pesce vivo, su branchie, muco superficiale e nell'intestino. Infine, i grassi vanno incontro facilmente a irrancidimento, anche alle temperature di refrigerazione, a causa dell'elevato grado di insaturazione degli acidi grassi.

L'odore sgradevole del pesce marino (pesci, crostacei e molluschi) non più fresco si genera, dopo la morte dell'animale, dall'ossido di trimetilammina (TMAO) accumulato nei tessuti che, a seguito dell'attività microbica, produce derivati volatili. Il pesce di acqua dolce, pur non accumulando l'ossido di TMA che viene espulso, genera il cattivo odore da un derivato dell'amminoacido lisina, la piperidina. Anche altri composti derivati dalla degradazione delle proteine, delle sostanze azotate, del lattato e dei grassi, tutte sostanze che nel pesce sono attaccabili più facilmente rispetto alla carne, concorrono alla formazione del cattivo odore. I pesci cartilaginei, come palombo e smeriglio, contengono una notevole quantità di urea nel sangue, che è trasformata in ammoniaca e anidride carbonica. Questi pesci,

anche freschi, emanano un tenue odore di ammoniaca, che aumenta con l'invecchiare. (*Confagricoltura, 2006*)

La definizione FAO/WHO sull'igiene alimentare così recita: "Per igiene alimentare si intendono le precauzioni e le misure che, se adottate in modo giusto, durante la produzione, manipolazione, stoccaggio e distribuzione dell'alimento, portano come risultato ad un prodotto salubre e commerciale".

I principali componenti della filiera ittica nell'acquacoltura sono:

- l'impianto di allevamento;
- lo stabilimento di trasformazione (ai sensi del D.lgs. 531/92);
- il sistema di trasporto;
- il commercio all'ingrosso;
- la distribuzione al dettaglio;
- la ristorazione.

Il quadro attuale del settore delle produzioni ittiche da acquacoltura delinea una nuova fase che dovrà confrontarsi non più, o meglio non solo, con i problemi legati alla sola competitività aziendale, ma dovrà misurarsi con sistemi produttivi in grado di garantire la "qualità totale". Tale principio deve essere inteso nel senso più ampio con implicazioni che riguardano il processo produttivo, le materie prime utilizzate, l'igiene e la sicurezza d'uso del prodotto e le interazioni con l'ambiente.

Vanno promossi sistemi al fine di costituire garanzie aggiuntive alle esigenze dei consumatori e migliorare la capacità competitiva complessiva del settore, basandola su una strategia di qualità e di trasparenza negli scambi. La qualità totale del prodotto ittico va intesa come il complesso delle caratteristiche, che soddisfano le esigenze alimentari, salutiste, edoniste e di comodità d'uso dell'acquirente/consumatore rinvenute nel prodotto ottenuto mediante una corretta gestione del rilevamento e della filiera nel rispetto del lavoro, della sostenibilità dell'ambiente e del benessere animale.

In definitiva, nella filiera, hanno rilievo fondamentale:

- l'igiene e la qualità dei prodotti di allevamento (sistema igiene e qualità);
- la costanza della qualità del processo produttivo (sistema dei controlli);
- le informazioni e le garanzie (sistema di tracciabilità);

- l'impatto ambientale (sistema ambiente).

La qualità del pesce d'acquacoltura è principalmente dovuta ai seguenti attributi: freschezza, conservabilità, caratteristiche nutrizionali e organolettiche. La freschezza e la qualità costante della fornitura assumono un ruolo di primo piano.

La freschezza del pesce può essere valutata con analisi chimiche e microbiologiche, ma il metodo più immediato e di più facile esecuzione è l'analisi sensoriale. Essendo un criterio soggettivo, esistono delle tabelle di valutazione che sono utilizzate per determinare il grado di freschezza del pesce e, quindi, il suo valore commerciale. La tabella utilizzata nei Paesi dell'Unione Europea (*Reg CEE n. 2406/96*) suddivide i pesci in 4 categorie:

- Extra: il prodotto è freschissimo.
- A: il prodotto è fresco.
- B: il prodotto è sufficientemente fresco.
- Non ammesso alla commercializzazione.

Tabella di classificazione della freschezza del pesce						
	Pelle	Muco cutaneo	Occhio	Branchie	Peritoneo	Odore
Extra	Colorazione viva e lucente	Trasparente	Convesso con cornea trasparente e pupilla nera brillante	Assenza di muco e colorazione rosso brillante	Colore brillante, aderisce bene alla carne	Caratteristico dell'ambiente in cui vive l'animale
A	Colorazione viva ma priva di lucentezza	Leggermente lattiginoso	Leggermente infossato con cornea lievemente opalescente e pupilla nera non brillante	Presenza di muco trasparente e lieve perdita di colore	Colore lievemente opaco con alcune zone staccate dalla carne	Neutro
B	Colorazione spenta con parti decolorate	Lattiginoso	Piatto con cornea opalescente e pupilla opaca	Muco opaco e colorazione rosso scuro	Colore opaco, si stacca facilmente dalla carne	Lievemente acre
Non Ammesso	Colorazione spenta e facile perdita delle	Giallognolo	Concavo con cornea lattiginosa e	Muco lattiginoso e colorazione	Non è attaccato alla carne	Acre

squame

pupilla grigia

giallognola

Tabella 4. Classificazione CE della freschezza del pesce

4

Anche il “benessere del pesce” incide sulla qualità del prodotto ed alcuni fattori sono di particolare importanza, quali:

- l’idoneità delle acque d’allevamento (caratteristiche chimiche, pH, ossigenazione, temperatura, velocità di ricambio ed altri parametri);
- l’idoneità delle vasche d’allevamento (facilità di pulizia e di eliminazione dei sedimenti);
- la cura della salute del pesce attraverso la prevenzione e la terapia (rispettivamente con vaccini e con prodotti terapeutici) delle specifiche patologiche;
- la protezione dai predatori (gabbiani ed altre specie ittiofaghe) che possono causare danni agli allevamenti soprattutto menomando, con ferite e mutilazioni, le condizioni fisiche dei pesci;
- la scelta di modalità di allevamento e l’adozione di accorgimenti tecnici che minimizzino lo stress può essere sottoposto il pesce;
- la densità di allevamento, che rappresenta l’indice di maggior rilievo del rispetto del benessere del pesce.

Quest’ultimo è un fattore da prendere comunque in particolare considerazione, ma diversamente da quanto avviene per altre specie di animali da allevamento (ad esempio per i bovini e per i polli), il limite massimo di densità di allevamento in acquacoltura non è l’elemento fondamentale poiché altri fattori, come qualità dell’acqua in relazione alle specie allevate, ricambio idrico e livello di ossigeno disciolto, variando da specie a specie, determinano il benessere del pesce allevato e quindi la qualità del prodotto finale. Pertanto, in relazione anche alle suddette argomentazioni a tutt’oggi il limite massimo di densità in allevamento non è disciplinato dalla legge. (*Confagricoltura, 2006*)

La scelta della strategia alimentare da adottare negli allevamenti intensivi è di assoluta importanza ai fini produttivi, essendo in grado di condizionare la resa produttiva e la qualità del pesce sia in senso positivo che negativo.

Negli allevamenti intensivi l’alimentazione dei pesci riveste un ruolo di primaria importanza. La voce “mangimi” è quella che più incide nella gestione di un

allevamento, infatti rappresenta dal 25 al 50% dei costi totali. Ne consegue che la scelta del tipo di mangime e delle modalità con cui viene somministrato è determinante per la redditività dell'impianto.

Oltre a soddisfare i fabbisogni nutrizionali delle specie allevate, il mangime deve anche rispondere a determinati criteri, quali, ad esempio, quello del minor inquinamento possibile.

Allo stato attuale, il mangime maggiormente utilizzato negli allevamenti intensivi di spigole e orate è l'estruso. Tale tipologia di mangime è di nuova concezione ed è frutto di innovazione tecnologica. Esso risponde ai requisiti di sostenibilità ambientale, digeribilità e concentrazione nutritiva, elevato grado di appetibilità, stabilità nel mezzo acquatico e lento affondamento.

La tipologia di mangime adottato nelle pratiche di allevamento influenza la composizione corporea del pesce allevato ed è per questo motivo che la scelta delle materie prime si deve basare su criteri di digeribilità ed ecosostenibilità ambientale. Gli alimenti destinati ai pesci nelle aziende d'acquacoltura devono rispondere alle vigenti disposizioni di legge in materia, emanate a livello comunitario e nazionale. In particolare, devono essere curate: la qualità delle materie prime costituenti il mangime; la formulazione e confezione del mangime stesso, al fine di soddisfare i fabbisogni della specie allevata in sostanze nutritive, di conferire elevata digeribilità all'alimento e allo stesso tempo di minimizzare il deterioramento dell'ambiente acquatico. L'origine e la composizione di alimenti speciali eventualmente utilizzati in alcune fasi dell'allevamento (mangimi medicati, Artemia, additivi) deve essere sempre sicura, e tali alimenti devono essere utilizzati in conformità alle norme vigenti. L'alimentazione delle specie ittiche è regolata in modo rigoroso da precisi protocolli d'intesa sottoscritti con le aziende mangimistiche associate e prevede l'impiego nei mangimi di materie prime derivate da alimenti naturali. I mangimi utilizzati nelle pratiche di allevamento sono composti principalmente da farina di pesce e olio di pesce con percentuali che variano dal 50 all'80%. E' bene precisare che non si tratta di sottoprodotti, ma di pesce fresco di basso pregio commerciale (cicerelli, papaline ed aringhe), utilizzato per la produzione di mangimi di elevata qualità e sicurezza d'uso. Inoltre sono presenti in percentuale minore farine vegetali di provenienza sicura (non OGM) e come leganti amidi derivati dal frumento. Va

comunque precisato che nella formulazione di mangimi destinati all'acquacoltura non vengono utilizzate proteine di origine animale ed in particolare farine di carne.

E' infine importante ricordare che le autorità sanitarie competenti (ASL) eseguono controlli costanti sugli impianti produttivi, con prelievi di pesci e mangimi, riducendo al minimo il rischio di comportamenti illeciti e garantendo la sicurezza in ogni fase del processo produttivo. (IAMC, 2006)

Per quanto riguarda le caratteristiche nutrizionali e organolettiche dei molluschi bivalvi (cozze, vongole) allevati, esse non differiscono da quelle dei molluschi bivalvi non allevati, in quanto tali organismi crescono nel loro ambiente naturale. C'è da considerare, infatti, che le zone di mare per questi allevamenti sono preventivamente selezionate e controllate dal punto di vista della carica microbica e della presenza di contaminanti (metalli pesanti, pesticidi, ecc.). Ciò garantisce i molluschi allevati anche dal punto di vista della qualità igienico-sanitaria.

I molluschi devono essere obbligatoriamente venduti vivi, poiché la flora microbica si sviluppa molto velocemente dopo la morte, in confezioni sigillate provviste di un bollo sanitario dal quale è possibile risalire al centro di depurazione o di spedizione. Hanno una conservabilità di cinque giorni dalla data di confezionamento e non devono superare i 6° C di temperatura durante il trasporto, lo stazionamento e la vendita.

La buona qualità degli alimenti e le corrette modalità di somministrazione degli stessi rivestono un ruolo fondamentale nel garantire una migliore qualità dell'acqua, buone performances dell'allevamento, buono stato di salute dei pesci allevati, qualità ottimale delle carni dei pesci allevati in termini organolettici e di sicurezza igienico-sanitaria per il consumatore.

Oggi più che mai, trasparenza e sicurezza sono elementi fondamentali per la vendita ed il consumo delle produzioni ittiche, risulta dunque necessario sapere tutto ciò che viene identificato con il termine *tracciabilità*, ovvero: provenienza, modalità e mezzi di ottenimento e, se necessario, anche l'identificazione delle organizzazioni coinvolte nelle attività produttive della filiera. Tutto ciò permette di poter risalire, con un processo di rintracciabilità, da valle a monte della filiera, cioè dal pesce sul mercato a tutta la sua "storia".

Questa esigenza dei consumatori e dei trasformatori può essere soddisfatta se l'allevatore documenta, da monte a valle, la tracciabilità delle sue produzioni e sottoponendola a certificazione. Se decide di seguire questa via, perché ritiene che il mercato premierà una scelta che valorizza le sue produzioni stabilendo un rapporto di fiducia con chi le acquista ed utilizza, l'allevatore deve predisporre ed attuare una procedura di gestione della tracciabilità, basata su sistematiche registrazioni e documentazioni, che facciano riferimento alla norma UNI 10939: 2001 (sistema di rintracciabilità nelle filiere alimentari) e consenta di identificare:

- le caratteristiche e la provenienza del materiale biologico d'origine: riproduttori, uova embrionate, larve ed avannotti;
- l'ubicazione geografica aziendale dell'allevamento in ogni sua fase;
- le modalità d'allevamento adottate;
- i mezzi tecnici utilizzati: alimenti larvali, mangimi completi, medicati e per salmonatura, disinfettanti e sanitizzanti;
- le aziende produttrici e fornitrici dei mezzi tecnici;
- gli estremi di riconoscimento attribuiti a ciascun lotto di pesci, dalle vasche sino alle cassette nelle quali ciascun lotto viene suddiviso;
- le date di cattura di ogni lotto;
- le quantità di pesce corrispondenti ai vari lotti di produzione e le informazioni riportate sulle etichette;
- l'identificazione dei relativi acquirenti.

A garanzia che la documentazione di tracciabilità consenta, col processo di rintracciabilità, di ricostruire, senza vuoti d'informazione, la storia del pesce in vendita sino alla sua origine, l'allevatore deve provvedere a periodiche verifiche dell'efficacia della tracciabilità ed alla corretta gestione delle non conformità rilevate allo scopo di garantire un prodotto d'acquacoltura sicuro e caratterizzato da adeguati standard qualitativi, garantire al consumatore l'origine delle materie prime utilizzate nella formulazione degli alimenti per gli animali d'acquacoltura, garantire la trasparenza dei processi produttivi, applicando procedure di rintracciabilità degli alimenti e degli animali d'acquacoltura destinati alla produzione alimentare in tutte le fasi della produzione. (*Confagricoltura, 2006*)

5. Sostenibilità: luci e ombre dell'acquacoltura

Da oltre vent'anni il settore della pesca, a livello mondiale, sta vivendo una fase molto difficile caratterizzata da una forte preoccupazione sullo stato di salute di numerosi stock ittici e dalla diffusa sofferenza in cui versano le imprese di pesca, i pescatori e le principali comunità marinare.

Molteplici sono i fattori che ancora oggi condizionano gli equilibri della pesca: il difficile equilibrio (in alcuni casi, addirittura, assenza) tra sforzo di pesca e risorse catturabili; l'inosservanza delle regole basilari che disciplinano lo sfruttamento razionale delle risorse ittiche e degli altri organismi acquatici; l'impoverimento degli stock ittici; l'aumento della pressione antropica sulla fascia costiera; la forte incidenza di fattori negativi esterni al mondo della pesca (incremento dei traffici marittimi, inquinamento, ecc...).

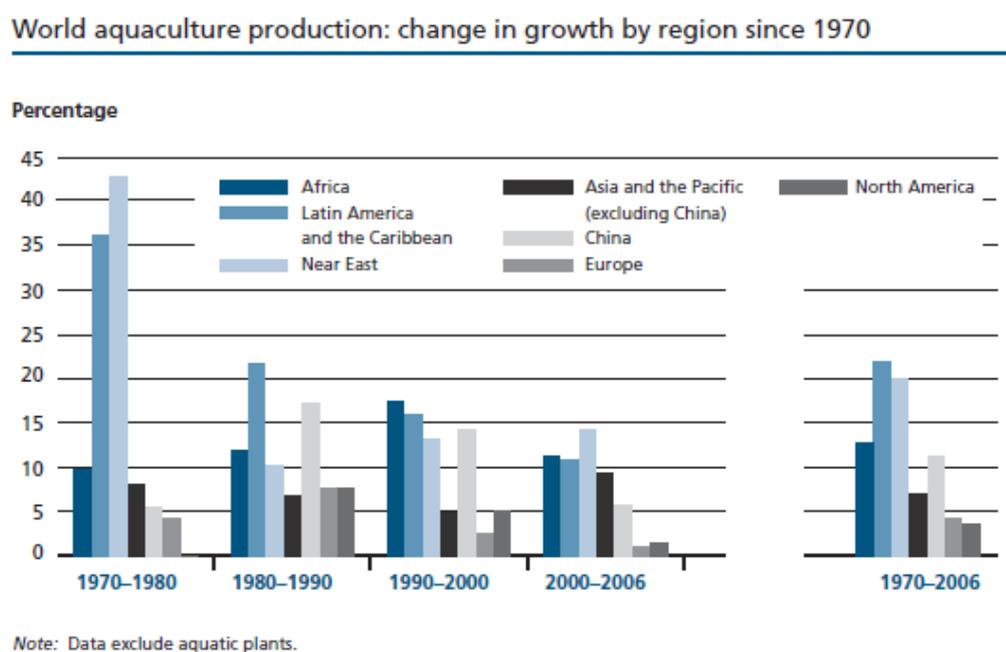


Figura 5. World aquaculture production: change in growth by region since 1970 (FAO 2008, World review of fisheries and aquaculture)

La crisi di cui stiamo parlando ha interrotto bruscamente un periodo durato oltre 20 anni (dagli anni 70 fino agli inizi degli anni 90); periodo durante il quale esisteva una scarsa sensibilità verso i temi dello sviluppo sostenibile e della tutela della

biodiversità; d'altra parte è pur vero che in quegli anni le risorse ittiche erano abbondanti in tutte le acque del mondo e, probabilmente, ritenute inesauribili. Durante quel periodo, i vari Stati favorirono numerosi interventi strutturali sulle flotte per favorire l'aumento della produzione, contribuendo così ad un significativo aumento degli addetti impegnati sia nelle attività di pesca, industriale e artigianale, sia in quelle di allevamento.

La forte evoluzione tecnologica dell'industria della pesca e il notevole incremento della domanda di prodotti ittici ha fatto sì che, secondo la FAO, più del 60% dei principali stock ittici risulti totalmente sfruttato. L'impatto negativo di queste attività sulla sopravvivenza degli stock ittici disponibili è stato in qualche modo temperato dalla crescita della produzione proveniente da attività di acquacoltura.

Gli anni che vanno dal 1997 sono stati segnati da una costante fluttuazione nella produzione in diverse aree di pesca nel mondo. La produzione mondiale di pesci, crostacei e molluschi era di circa 122,4 milioni di tonnellate alla fine del 1997 (da catture in mare e da acquacoltura). Con un calo del 4,3%, nel 1998 la produzione era scesa a 117,1 milioni di tonnellate, il 74% dei quali era rappresentato da pesci catturati in mare. Infatti, a fronte di un aumento della produzione di acquacoltura che cresceva nello stesso periodo passando da 28,8 a 30,9 milioni di tonnellate, i prodotti della pesca calavano da 93.619.015 a 86.299.321 tonnellate.

Un incremento vistoso della produzione mondiale di pesci è stato registrato nel 1999. Una crescita complessiva del 7,2% ha portato la produzione totale mondiale da 86,3 milioni di tonnellate del 1998 a 92,9 milioni di tonnellate, con le catture in mare pari al 74% della produzione totale. La produzione d'acquacoltura crebbe da 30,8 a 33,3 milioni di tonnellate.

La produzione globale di pesci registrata nel 2001 è stata di 130,2 milioni di tonnellate di cui 37,9 milioni di tonnellate provenienti dall'acquacoltura. La produzione marina è scesa da 95,5 milioni di tonnellate registrati nel 2000 a 92,4 milioni di tonnellate del 2001.

Le fluttuazioni in questi anni nella produzione mondiale da cattura sono dovute principalmente alle variazioni nella cattura delle acciughe peruviane a causa del

condizionamento climatico (es. El Niño). In effetti, la produzione globale da cattura, escluse le acciughe peruviane, è stato sostanzialmente stabile dal 1995.

La produzione globale di pesci registrata nel 2002 è stata di poco più di 132 milioni di tonnellate, di cui 41,9 milioni di tonnellate da attività di acquacoltura. La cattura mondiale di pesci ammontava a 93,2 milioni di tonnellate, con un decremento dello 0,4% rispetto al 2001 e del 2,4% rispetto alla produzione registrata nel 2000.

Il primo valore stimato di vendita della produzione da cattura è stato di 78 miliardi di dollari americani nel 2002, con un calo dell'1,6 % rispetto al 2000, dovuto alla diminuzione delle catture, ma anche all'abbassamento del valore unitario degli sbarchi di prodotto per il consumo.

Nel 2002, i dati statistici sulla classificazione dei paesi produttori hanno visto ancora una volta la Cina classificarsi come 1° Paese produttore con ben 16,6 milioni di tonnellate, a pari con il dato del 2001 ma con il 2,6 % in meno rispetto al 2000. Dopo la Cina, troviamo il Perù con 8,8 milioni, gli Stati Uniti d'America con 4,9 milioni, l'Indonesia con 4,5 milioni ed il Giappone con 4,4 milioni di tonnellate. La produzione da catture in mare registrata nel 2002 è stata di 84,5 milioni di tonnellate, con un lieve incremento dello 0,4 % rispetto al 2001 e 2,6 % di calo rispetto alle catture registrate nel 2000. L'area di pesca che ha contribuito di più è stata nuovamente l'area del Pacifico nord-orientale con una quota del 25,4% sulla produzione totale da cattura in mare. La cattura da acque interne è stata di 8,7 milioni di tonnellate, in crescita dello 0,5 % rispetto al 2001.

Nel 2003, poi, l'andamento della produzione mondiale di pesce non ha visto un cambiamento significativo. La produzione globale è stata leggermente inferiore rispetto al 2002 (circa 133 milioni di tonnellate) con 132,6 milioni. S'è trattato di un calo dovuto alla produzione da cattura in mare che è passata dai 93,2 milioni del 2002 ai 90,3 milioni di tonnellate. L'acquacoltura ha avuto una crescita modesta rispetto agli anni precedenti, passando dai 41,9 a soli 42,3 milioni di tonnellate. La tabella che segue mostra l'andamento della produzione globale tra il 1997 ed il 2003. *(FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2008)*

Produzione globale da cattura in mare 1997 - 2006 in milioni di tonnellate										
Anno	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
<i>In mare</i>	86,0	78,2	84,6	86,04	84,1	84,7	81,5	85,7	84,5	81,9
<i>Acque interne</i>	7,5	8,0	8,2	8,8	8,6	8,7	9,0	8,9	9,7	10,1
<i>Totale</i>	93,6	86,2	92,8	94,8	92,8	93,4	90,5	94,6	94,2	92,0
<i>Dati da FAO Fishery Information, Data and Statistics</i>										

Tabella 5. Produzione globale da cattura in mare 1997-2006

Oggi, l'acquacoltura è il comparto della produzione alimentare (di origine animale) con la crescita maggiore e fornisce il 43% del pesce per uso alimentare. La crescita è stata notevole sia per numero di specie allevate (il 97% delle specie allevate oggi (circa 430 specie, quindi) sono state addomesticate solo negli ultimi 100 anni), che per quantità di prodotto: i dati FAO affermano che dal 2000 al 2005 la produzione mondiale di acquacoltura è passata da 35,5 a 47,8 milioni di tonnellate (Mt) con un incremento del 34,65% che è stato maggiore per le specie d'acqua dolce (da 21,2 a 28,9 Mt: +36,32%) rispetto a quelle di mare (da 15,4 a 18,9 Mt: + 32,17%) (*Allsopp et al., 2008*).

Nel 2030 ci vorranno 37 milioni di tonnellate di pesce in più all'anno per mantenere gli attuali livelli di consumo ittico della popolazione mondiale, la cui entità aumenta inesorabilmente. Molte specie di pesce commerciale stanno però scomparendo dai nostri mari: peschiamo troppo e non diamo ai pesci il tempo di riprodursi e crescere. Una delle soluzioni potrebbe essere quella di regolare i nostri consumi. L'altra, secondo molti, è nell'acquacoltura. Per l'organizzazione oggi consumiamo 48 milioni di tonnellate di pesce derivante dall'acquacoltura, ma fra poco più di 20 anni ce ne serviranno 85 milioni. (www.fao.org)

L'acquacoltura, o allevamento di pesci, crostacei e molluschi, svolge un ruolo simile a quello dell'industria della pesca. Rifornendo il mercato di pesci, crostacei e molluschi, contribuisce a ridurre il divario tra importazioni ed esportazioni di prodotti ittici. Tale attività genera inoltre occupazione in zone dove generalmente

mancano altre industrie. I consumatori beneficiano della varietà dei prodotti dell'acquacoltura, che integrano quelli della pesca.

Negli ultimi dieci anni l'acquacoltura ha registrato ovunque una rapida espansione, diventando il settore in più celere crescita nella produzione alimentare mondiale. Nel 1995 l'acquacoltura ha contribuito per circa un quinto del volume e per un terzo del valore alla produzione mondiale di pesci, crostacei e molluschi.

L'acquacoltura si è sviluppata in maniera considerevole anche all'interno della Comunità Europea. In alcuni paesi esiste una consolidata tradizione di allevamento dei prodotti ittici praticato a livelli diversi, dall'impresa artigianale alla società multinazionale.

L'acquacoltura comunitaria comprende tre attività principali: allevamento di pesci di mare; allevamento di crostacei e molluschi marini; allevamento di pesci d'acqua dolce; e predominano quattro specie: trota, salmone, mitili e ostriche.

Grazie ad una più approfondita conoscenza delle esigenze del settore e ai progressi della tecnologia, gli acquacoltori si sono orientati verso l'allevamento di specie quali la spigola, il dentice e il rombo. La diversificazione delle specie disponibili li rende meglio preparati ad affrontare la concorrenza mondiale.

Nonostante la rapida crescita degli ultimi anni, l'acquacoltura incontra oggi numerose difficoltà. Il mercato alimentare sta diventando sempre più competitivo. Analogamente a quanto accade in agricoltura, la situazione è resa ancora più problematica dalla fluttuazione della domanda. Una maggiore sensibilizzazione del pubblico circa la necessità di preservare le risorse naturali e di accrescere la sicurezza degli alimenti ha portato all'adozione di regolamenti più rigorosi in materia ambientale. I problemi tecnici e il rischio di malattie aggravano la vulnerabilità delle imprese. Per consolidare il settore sono ora allo studio numerose possibilità, tra cui incoraggiare la costituzione o il rafforzamento delle organizzazioni volontarie di produttori per favorire una produzione razionale e condizioni di mercato più stabili, diffondere e applicare i risultati delle ricerche e mettere a frutto gli esempi di buona pratica. (COM (2009) 162)

Pur essendo una validissima alternativa allo sfruttamento degli stock ittici naturali, l'acquacoltura presenta una serie di problematiche. Prima fra tutte il benessere dei pesci: secondo Ettore Tibaldi, di Slow Food e docente di zoologia dell'Università di Scienze Gastronomiche di Pollenzo e Colorno, "Il benessere negli allevamenti intensivi è impossibile, sia in terra sia in acqua." Il professore racconta infatti di aver visitato vasche di gamberetti in Thailandia così ricolme di gamberi da esigere la somministrazione in acqua di antibiotici, vitaminici, preparati contro la formazione di schiume, antisettici e disinfettanti fino a rendere, nel giro di pochi anni, inabitabili e quindi inutilizzabili le vasche tutte scavate all'interno di un ecosistema prezioso come la foresta a mangrovie. La superficie occupata dalla vasca non è più riconquistata alla vita della foresta per almeno una trentina d'anni".

C'è poi il problema dell'inquinamento dell'ambiente marino generato dagli scarichi degli allevamenti. "In realtà - prosegue Tibaldi - molti allevamenti intensivi, prima di tutto le gabbie di salmoni nel Mare del Nord, scaricano feci e mangime inutilizzato in grande quantità danneggiando l'ecosistema e determinando condizioni di totale insostenibilità".

Un altro "spreco imperdonabile", usando le parole di Tibaldi, è la gestione degli alimenti utilizzati nel ciclo produttivo dei pesci d'acquacoltura. "Si pescano pesci per produrre farina di pesce che è utilizzata per nutrire altri pesci". Questo è ovviamente un paradosso: si cerca di diminuire l'impatto ambientale di un'attività (la pesca) sostituendola con un'altra (l'acquacoltura) che, direttamente o indirettamente, stressa ancora di più gli ecosistemi. (www.slowfood.it)

5.1 Il benessere animale

In linea di massima il benessere si riferisce alla condizione fisica e mentale di un animale che interagisce e risponde all'ambiente ed alle sue variazioni (*Chandroo et al., 2004*).

Un'interpretazione maggiormente antropocentrica del benessere animale sostiene che il fattore più importante sia il possesso e la condizione di particolari capacità cognitive (*Duncan, 1996*). Ad ogni modo, nei siti di allevamento risulta importante tenere in considerazione non solo la salute psicologica e fisiologica di un organismo,

ma anche il livello di stress che esso deve affrontare (*Ashley, 2007; Huntingford et al., 2006*). Per questa ragione, una definizione più ampia di benessere dovrebbe descrivere le capacità (fisiologiche e psicologiche) del singolo pesce di far fronte ai cambiamenti del proprio ambiente.

La risposta allo stress, rappresenta una reazione fisiologica a condizioni naturali avverse e costituisce, quindi, un utile indicatore del deterioramento delle normali condizioni di benessere. Ciononostante, le risposte allo stress non sono necessariamente indicative di una condizione di sofferenza o di compromissione del benessere (*Huntingford et al., 2006*). Lo stress e le risposte ad esso associate devono essere considerate, in primo luogo, come una condizione adattativa dell'organismo, capace di garantirne la sopravvivenza.

Le cinque libertà del benessere animale		Indicatori
1	Libertà dalla fame, dalla sete e dalla cattiva nutrizione	Assimilazione del cibo, tassi di crescita, fattore di condizione
2	Libertà di avere un ambiente fisico adeguato	<ul style="list-style-type: none"> • Danni fisici: erosione delle pinne, cataratta, lesioni • Risposta immunitaria (attività del lisozima, attività respiratoria, attività fagocitaria)
3	Libertà dalle ingiurie, malattie, ferite e traumi	<ul style="list-style-type: none"> • Monitoraggio ambientale: qualità dell'acqua (ossigeno disciolto, azoto, pH, anidride carbonica, solidi sospesi) • Campionamenti mirati dei pesci: condizioni delle branchie e ricerca di infestazioni da parassiti
4	Libertà di manifestare le normali caratteristiche comportamentali specie-specifiche	Comportamenti anormali: nuoto ed alimentazione, disposizione del pesce all'interno del sistema, risposta del pesce all'avvicinarsi degli allevatori
5	Libertà dalla paura	Misura delle risposte primarie e secondarie allo stress: livelli plasmatici di cortisolo, glucosio, lattato e attività muscolare

Tabella 6. Le 5 libertà del benessere animale (FAWC, 1979) e gli indicatori utilizzati per valutare il deterioramento della condizione di benessere (FishWelfare, 2009)

Gli indicatori di benessere dei pesci in allevamento, indicati nel Regolamento (CE) N. 889/2008, includono “danni alle pinne, altre tipi di ferite, tassi di crescita, tipologie di comportamenti espressi, stato globale di salute e qualità dell'acqua”. Essi sono tutti compresi tra i più comuni indicatori (vedi tabella 6) impiegati per valutare la compromissione di ciascuna delle cosiddette 5 libertà (Five Freedom) (FAWC, 1979).

Questi indicatori sono stati comunemente accettati per la stima della sofferenza di animali terrestri ed acquatici in allevamento (*Ellis et al., 2002*). Alla base di questo

schema vi è il riconoscimento della complessità del benessere animale, che può essere descritto attraverso diverse componenti fisiologiche e comportamentali e, quindi, solo combinando diversi indicatori vi è la possibilità di una più accurata valutazione dello stato di benessere (FSBI, 2002).

I fattori che influenzano il benessere sono tutti interconnessi tra loro. Difatti, la qualità dell'acqua, la densità di allevamento, l'alimentazione, il livello nutrizionale e la gestione delle procedure hanno tutte un effetto diretto sul livello di stress, sulla conseguente capacità di tollerare lo stress, sulla salute e soprattutto sul benessere. Per questa ragione, la cura del tutto richiede una coscienziosa attenzione per ogni singola parte dell'insieme.

Il benessere degli animali è un aspetto che interessa consumatori, responsabili delle politiche e produttori. Al di là della sua dimensione etica, esso risulta un criterio importante nella scelta dei consumatori. Come per gli animali terrestri, anche per i pesci si rendono necessarie opportune riflessioni sulla gestione del benessere, e ciò emerge sia nei principi del biologico che nella regolamentazione europea. Le procedure biologiche di allevamento dovrebbero pertanto identificare, come priorità, la riduzione delle fonti di stress inutile ed il controllo dell'intero ciclo vitale del pesce in allevamento. Infatti, sia le condizioni di benessere dei pesci che i ricavi dell'acquacoltura potranno trarre giovamento dal miglioramento delle condizioni di allevamento. (IFOAM, 2010)

In linea con il piano di azione per il benessere degli animali³, la Commissione Europea nel documento COM(2009)162 si propone di chiedere pareri sul benessere dei pesci, in funzione delle diverse specie, promuoverà l'adozione di un approccio per specie nell'ambito dei consessi internazionali (in particolare l'Ufficio internazionale delle epizootie), di lanciare nei prossimi due anni una valutazione del benessere dei pesci in acquacoltura al fine di esaminare possibili misure legislative e di altro genere. La Commissione intende inoltre rivedere le disposizioni

³ COMUNICAZIONE DELLA COMMISSIONE EUROPEA "Un programma d'azione comunitario per la protezione ed il benessere degli animali 2006-2010. COM(2006) 13.

vigenti del regolamento sul trasporto degli animali⁴, che attualmente si applicano a tutti i vertebrati ma non risultano adatte agli animali acquatici, e incoraggerà le iniziative del settore volte ad assicurare il benessere dei pesci di allevamento. (COM(2009)162)

5.2 L'impatto ambientale

L'acquacoltura è un'attività zootecnica che interagisce strettamente con l'ambiente circostante utilizzando risorse e causando mutamenti ambientali. Molte delle attività di acquacoltura provocano inevitabilmente il rilascio nell'ambiente acquatico di prodotti metabolici di rifiuto e cibo non consumato. In generale, il contenitore per i rifiuti solubili è la colonna d'acqua, quello per i rifiuti organici è il sedimento. In particolare l'allevamento ittico, condotto secondo criteri intensivi, implica problemi di inquinamento delle acque. L'adozione di soluzioni innovative ai livelli nutrizionali, gestionali e impiantistici possono consentire la riduzione degli effetti negativi (Ballestrazzi, 1996).

A causa dell'alto numero di animali allevabili per unità di superficie, che comporta una quantità elevata e crescente di reflui prodotti, la gestione degli escreti animali è da tempo un problema scottante per la zootecnia, in particolar modo per l'acquacoltura. Finora la gestione degli allevamenti, sia di organismi terrestri che acquatici, ha avuto come fine la massimizzazione della quantità di prodotto utile ottenuto (quintali di carne/allevamento o quintali di latte/lattazione), con scarsa attenzione alle altre inevitabili e meno desiderabili produzioni. In particolar modo, le principali componenti del carico inquinante, generato dalle itticolture intensive, sono residui di mangime non consumato, residui fecali e cataboliti escreti. Altri effetti potenziali sono: la possibile interazione di farmaci utilizzati nei mangimi medicati con la flora batterica dei fondali, l'eventuale impatto di prodotti utilizzati come antifouling delle reti, la possibile interazione genetica di animali fuoriusciti dalle gabbie con le popolazioni selvatiche appartenenti alla stessa specie e infine, l'effetto di richiamo su specie pelagiche. Altro aspetto, ancora da valutare,

⁴ Regolamento (CE) n. 1/2005 sulla protezione degli animali durante il trasporto e le operazioni correlate

dell'allevamento in mare può consistere nella variazione della pescosità della zona (in senso sia positivo che negativo), valutabile come cattura per unità di sforzo di pesca da parte delle comunità di pescatori locali.

Gli aspetti ambientali tipici, invece di un impianto di piscicoltura in vasche a terra, alimentato con acqua marina o salmastra, ha stretti rapporti con l'ambiente esterno in due precisi punti, quali l'opera di presa ed il canale di restituzione. I corpi idrici interessati alla presa e alla restituzione possono anche essere diversi. L'utilizzo della risorsa idrica, relativamente alla quantità di prodotto che esce dall'azienda, è funzione del tipo di allevamento (avannotteria od ingrasso) e della tecnologia utilizzata (livello di intensivo, validità delle scelte tecnologiche, ecc.). Informazioni su possibili impatti a carico dell'ambiente idrico ricevente possono derivare da studi sulla biodiversità o comunque sulle comunità e sulle popolazioni selvatiche interessate dallo scarico o da eventuali protocolli di accordo tra l'azienda e le amministrazioni locali competenti che dovrebbero essere acquisiti.

Una politica ambientalista di tipo estremista ha "criminalizzato" qualsiasi forma di zootecnia intensiva, senza saper proporre altro che la chiusura degli allevamenti stessi. Fortunatamente negli ultimi anni, soprattutto nei Paesi anglosassoni, si è affermato un approccio pragmatico al problema (*Saroglia et al., 1994*), riassumibile nella seguente domanda: quali misure si possono intraprendere per minimizzare le quantità di reflui uscenti dall'allevamento? Le risposte che la ricerca ha dato a questo problema sono riscontrabili a tre diversi livelli, tra loro indipendenti, ma sommabili:

- **livello nutrizionale:** riguarda la formulazione di diete complete che massimizzino le ritenzioni dei principali nutrienti (lipidi, proteine, fosforo, ecc.) da parte delle diverse specie allevate, nelle diverse condizioni termiche ed osmotiche di allevamento;
- **livello gestionale:** riguarda i piani alimentari, cioè i diversi livelli nutritivi adottati nelle varie fasi del ciclo produttivo, alimentate con diete diverse, nonché tutte quelle tecniche di allevamento che minimizzano lo stress dei pesci, con ovvi vantaggi in termini di accrescimento degli stock ittici allevati;
- **livello impiantistico:** costruzione di una serie di manufatti spesso di semplice realizzazione che consentono l'abbattimento o la trasformazione in

forme non tossiche delle diverse forme di inquinanti prodotti dall'allevamento.

La contemporanea azione, a tutti i tre livelli sopracitati, consente di ridurre drasticamente le quantità assolute di sostanze inquinanti scaricate dalle itticolture. Si sottolinea "quantità assolute" di reflui, perché la sola concentrazione dei nutrienti presenti nei campioni d'acqua, disgiunta dalla misura dei flussi idrici, non consente di trarre alcuna conclusione, scientificamente certa, circa i veri carichi inquinanti.

Il problema degli effluenti inquinanti dagli impianti di acquacoltura può essere minimizzato con un'adeguata gestione e localizzazione degli impianti. Tuttavia, le migliori soluzioni sono quelle che prevedono un "ciclo chiuso" che annulla i reflui. Una possibile soluzione è identificabile in alcuni sistemi particolarmente innovativi, come la IMTA (integrated multi trophic aquaculture, acquacoltura multitrofica integrata), la cosiddetta "acquaponica" e i sistemi integrati di coltura agricola (riso) e acquacoltura. Nel sistema IMTA, i reflui ricchi di sostanza organica sono utilizzati per alimentare un'altra specie: ad esempio, un impianto che produce spigole in Israele utilizza i reflui per coltivare alghe che a loro volta sono usate per alimentare molluschi di interesse commerciale come l'abalone giapponese.; nell'acquaponica, i reflui sono utilizzati come nutrienti per alghe, fiori o altri vegetali: ad esempio, la compagnia olandese "Happy shrimp" con i reflui produce ortaggi, i gamberi sono allevati in un brodo con alghe, batteri e mangimi con proteine vegetali, in serre riscaldate e il ciclo biologico è completato in vasca e nessun giovanile viene pescato per l'allevamento; Infine i sistemi integrati sono già applicati nelle risaie, dove le deiezioni dei pesci fertilizzano il riso e i pesci si alimentano delle erbe che crescono nelle risaie, eliminando quindi le "erbacce". (Allsopp et al., 2008).

Il mondo della ricerca, della produzione e le associazioni di categoria si trovano oggi impegnati ad adottare e sviluppare modelli innovativi di acquacoltura responsabile in sostituzione di sistemi di produzione tradizionali, e le Amministrazioni competenti sono chiamate a sostenerli con misure appropriate. La Commissione Europea, anche in questo caso, considera fondamentale il raggiungimento di una completa compatibilità tra acquacoltura e ambiente, pertanto si propone di continuare a sottolineare, nelle proprie politiche e azioni, l'importanza di uno sviluppo dell'acquacoltura sostenibile dal punto di vista

ambientale, continuerà a sorvegliare il problema delle fuoriuscite di pesci e, se necessario, esaminerà il valore aggiunto derivante dall'adozione di misure a livello dell'UE, inoltre farà sì che gli Stati membri garantiscano un elevato livello di protezione delle acque destinate alla molluschicoltura nell'ambito dei primi piani di gestione dei bacini idrografici istituiti a norma della direttiva quadro in materia di acque WFD⁵. (COM (2009) 162)

5.3 I mangimi e le farine di pesce

Un'inappropriata composizione del cibo ed una non oculata scansione dei pasti nel tempo possono costituire elementi di criticità per il benessere dei pesci. La distribuzione di alimento in una piccola area dell'intera superficie disponibile può essere causa dell'insorgenza di competizione e aggressione tra i pesci e, di conseguenza, può essere responsabile di variazioni nella crescita degli individui, rafforzando fenomeni di dominanza gerarchica (Stevenson, 2007). L'incidenza di ferite dovute ad aggressione aumenta specialmente nei casi in cui la competizione per il cibo è forte (Greaves et al., 2001). La stessa composizione dell'alimento può essere un fattore importante per preservare il benessere. Difatti, diete in cui alcuni micronutrienti critici scarseggiano hanno un severo effetto sul welfare: insorgono piccole anomalie morfologiche e del comportamento, si osservano diminuzione dei tassi di crescita ed indebolimento delle funzioni immunitarie (Huntingford et al., 2006). Un esempio è costituito da livelli insufficienti di acidi grassi altamente insaturi (HUFA) che, oltre a ridurre la funzionalità del sistema immunitario, possono avere effetti negativi anche sulla funzione riproduttiva (Poli, 2009). È appunto per questa ragione che le farine e gli oli di pesce sono considerati fattori essenziali dell'alimentazione dei pesci in acquacoltura. Il problema è che nutrire i pesci d'allevamento con pesce selvatico determina ulteriori pressioni, talvolta insostenibili, per la pesca (LyMBERY, 2002). Nel 2003, il 53% della farina di pesce e l'86% dell'olio di pesce prodotti in tutto il mondo sono stati usati per l'acquacoltura. Mentre questi prodotti sono usati sempre meno per l'allevamento di altri animali

⁵ Direttiva 2000/60/CE.

(polli, suini) il loro uso in acquacoltura aumenta. E' vero che almeno per certe specie il consumo di questi mangimi per kg di pesce prodotto è calato, ma l'aumento degli impianti annulla ogni effetto positivo: a parità di prodotto, la farina di pesce usata per i salmoni si è ridotta del 25% tra il 1997 e il 2001, ma nello stesso periodo la produzione di salmone è aumentata del 60%! Nel 2006 l'acquacoltura ha consumato 3,06 milioni di tonnellate (il 56 per cento) della produzione mondiale di farina di pesce e 780.000 tonnellate (l'87 per cento) della produzione totale di olio di pesce. Oltre il 50 per cento dell'impiego di olio di pesce del settore è stato assorbito dagli allevamenti di salmone. (Allsopp et al., 2008).

Le regole specifiche per l'alimentazione degli animali carnivori in acquacoltura biologica danno priorità allo sfruttamento sostenibile della pesca, favorendo l'utilizzo di ingredienti di origine animale derivati dagli scarti della pesca (specie non commerciali o scarti della lavorazione di specie commerciali). Una particolare attenzione viene data alla componente nutrizionale che, a sua volta, dovrà assicurare l'alta qualità del prodotto finito a basso impatto. Ad ogni modo, farine di pesce derivanti esclusivamente dallo scarto delle lavorazioni della pesca commerciale risultano essere piuttosto povere di aminoacidi e di acidi grassi essenziali e, inoltre, producono un più elevato accumulo di cataboliti. Il problema più impegnativo è, quindi, individuare la proporzione di scarto che rappresenti il compromesso ottimale tra la più alta qualità del prodotto per il consumatore, il più basso impatto ambientale e lo sfruttamento sostenibile della pesca.

Rohana Subasinghe, esperto FAO di pesca d'allevamento e Segretario della Sottocommissione del COFI (The Committee on Fisheries) sull'acquacoltura ha sottolineato che, per l'alimentazione di pesci onnivori come la carpa, sono sempre più impiegati mangimi composti, con un conseguente aumento della domanda di farina di pesce. Dobbiamo dunque fare un uso più efficiente dei mangimi e cercare di trovare complementi di proteine alternativi". Il problema della farina e dell'olio di pesce è legato soprattutto alle produzioni "di lusso". L'acquacoltura di sussistenza utilizza sovente specie erbivore o onnivore (è il caso delle carpe) mentre quella destinata ai consumatori più abbienti predilige sempre più specie di predatori (salmone o, per fare esempi a noi più vicini, orate e spigole). Per l'alimentazione di queste specie fino ad ora non possono essere eliminate le proteine

e i grassi animali (e in particolare gli omega-3) anche se esistono protocolli sperimentali, il cui sviluppo è da incentivare, che promettono una riduzione significativa di questi mangimi.

Certamente, non è sostenibile utilizzare pesci di scarso valore economico per farne mangimi: in genere per ottenere un kg di pesce di acquacoltura ci vogliono 2,5-5 kg di pesce trasformato in mangime. Ma ci sono specie ancor più problematiche: per ingrassare un tonno di un kg, ci vogliono 20 kg di pesce congelato! La cosiddetta “pesca industrializzata”, cioè quella la cui produzione (c.a. 22/24 milioni di tonnellate/anno) non è diretta al consumo umano, è in gran parte insostenibile e causa un evidente sovrasfruttamento delle risorse, con impatti generali sugli ecosistemi: la pesca alle anguille della sabbia (usate per produrre farina di pesce) è stata collegata al fallimento delle covate dei pulcinella di mare, che in alcuni anni non avevano di che sfamare i pulcini.

La possibilità di accedere facilmente e a prezzi abbordabili ai mangimi resta un aspetto critico per lo sviluppo dell'acquacoltura. Le principali specie richieste dal mercato europeo sono carnivore e la loro alimentazione dipende ancora in larga misura dalla disponibilità di farine e oli di pesce. La dipendenza del settore dalle farine e dagli oli di pesce come ingredienti principali dei mangimi può far sorgere dubbi circa la loro sostenibilità economica e ambientale. Da un lato, la produzione di farine e oli di pesce incontra difficoltà nel soddisfare una domanda crescente, il che contribuisce ad un aumento dei prezzi. Dall'altro, l'uso di farine e oli provenienti dalla pesca industriale può mettere a rischio la sostenibilità del settore e nuocere alla sua immagine. Al tempo stesso, nella ricerca di alternative adeguate occorre tener conto di vari aspetti, che spaziano dalla protezione dei consumatori al benessere degli animali. (Allsopp et al., 2008). Allo scopo di mitigare tale pressione sugli ecosistemi marini, si sono impiegati proteine ed oli vegetali per sostituire parzialmente le componenti di origine animale: già da tempo, infatti, si sono individuati diversi vegetali come fonti alimentari alternative alle diete tradizionali, ciò renderebbe più sostenibile e meno dispendiosa l'alimentazione degli organismi allevati. Si sono testate fonti proteiche alternative come la soia e i piselli (Hernández et al., 2007; Kesper et al., 2007; Bautista-Teruel et al., 2003), fonti lipidiche come olio di soia, olio di colza, olio di semi di lino (Montero et al., 2003), frutti di palma,

manioca e banane (*Lockmann et al., 2009*) per l'allevamento di diverse specie di pesci, paprika e peperoncino per la pigmentazione delle trote (*Ibrahim et al., 2004*), germe di grano per l'alimentazione delle cozze (*Pirini et al., 2007*) e riso per l'alimentazione delle artemie. (*Sorgeloos et al., 1980*) Purtroppo, oltre un determinato livello nella dieta, le componenti vegetali possono mostrare fattori antinutrizionali e contenuti inutilizzabili di acidi grassi essenziali e di aminoacidi, con conseguente deterioramento del benessere. Un ulteriore ruolo cruciale per la corretta funzionalità immunitaria e per la capacità dei pesci in acquacoltura di rispondere ad eventi di stress è rappresentato da un corretto apporto di vitamine, minerali in tracce ed antiossidanti. (*Ashley, 2007*).

Nel definire le norme e gli standard comunitari relativi ai mangimi per pesci occorre equilibrare i benefici derivanti da un'elevata protezione dei consumatori e i vincoli imposti sulla competitività del settore. Nell'ambito della sua politica volta a garantire un elevato livello di tutela dei consumatori, la Commissione si propone di favorire l'acquacoltura dell'UE migliorando la normativa comunitaria sui mangimi in due modi: aumentando la disponibilità degli additivi necessari per i mangimi, in particolare sulla base degli orientamenti volti a facilitare le procedure di autorizzazione per gli additivi dei mangimi adottati nel maggio 2008 e garantendo l'adozione della sua proposta di revisione del regolamento sui sottoprodotti di origine animale, per far sì che gli animali acquatici possano essere alimentati con mangimi derivanti da animali acquatici, impedendo al tempo stesso che una determinata specie venga alimentata con mangimi derivanti da pesci della stessa specie. (*COM(2009)162*)

6. Arricchimento di *Artemia salina* L. con antiossidanti di origine vegetale e acidi grassi polinsaturi: valutazione della sopravvivenza e del profilo nutrizionale dei nauplii

6.1 Introduzione

Tra gli organismi allevati parallelamente come alimenti per la produzione di specie ittiche marine, gioca un ruolo fondamentale l'*Artemia salina* (Linneo, 1758), un crostaceo che produce delle cisti durature. Queste, se immerse in acqua marina per circa 24 ore, anche dopo anni di conservazione in ambienti asciutti, possono svilupparsi dando vita a nauplii vitali.

Le cisti vengono raccolte negli ambienti naturali, essiccate, selezionate, confezionate e distribuite. Compito dell'acquacoltore è quello di schiudere le cisti in vasche con acqua salata, secondo le procedure indicate dalle stesse case di commercializzazione, arricchire i nauplii con prodotti specifici e somministrarli alle larve.

L'artemia non è una risorsa illimitata e la crescente domanda da parte dei vari settori dell'acquacoltura ha determinato forti problemi di disponibilità, oltre all'incremento dei prezzi di mercato. Lo sviluppo sostenibile dell'acquacoltura certamente deve fare i conti con una risorsa limitata come quella dell'artemia. Sin da oggi è possibile utilizzare al meglio questa risorsa allevandola per 48 - 72 ore e determinando un aumento della biomassa individuale, oppure sostituendola con altre produzioni zooplanctoniche quali ed esempio i copepodi.

Negli ultimi anni sono state introdotte delle diete artificiali, umide o secche, estrusi o microincapsulati. Questi mangimi artificiali sono stati messi a punto con l'intento di sostituire le colture parallele, fito-zooplankton ed artemie, impegnative sia dal punto di vista tecnico che economico. Tuttavia la qualità delle diete disponibili sul mercato, non è ancora tale da permettere la completa sostituzione delle colture parallele soprattutto nelle prime fasi di allevamento larvale dei pesci; sono tuttavia molto utili nell'anticipare il momento dello svezzamento. (*Cataudella S. e Bronzi P., 2001*)

L'*A. salina* non contiene gli acidi grassi polinsaturi di cui necessitano le larve di pesci per il proprio accrescimento, si provvede dunque a sottoporla a metodiche di arricchimento che le permettono di assumere rapidamente gli integratori, soprattutto lipidici, raggiungendo la concentrazione massima di HUFA⁶- ω 3 dopo 8 - 16 ore di trattamento.

La tabella di seguito mostra l'intervallo entro cui rientra la percentuale di acidi grassi polinsaturi che normalmente si ritrovano in artemie prelevate dalle diverse zone di produzione (Tabella 7): è evidente che tale percentuale non supera il 10% anche nel migliore dei casi.

Cyst source	20:5n-3 range (area %)
San Francisco Bay, CA-USA	0.3-13.3
Great Salt Lake (South arm), UT-USA	2.7-3.6
Great Salt Lake (North arm), UT-USA	0.3-0.4
Chaplin Lake, Canada	5.2-9.5
Macau, Brazil	3.5-10.6
Bohai Bay, PR China	1.3-15.4

Tabella 7. Intra-strain variability of 20:5n-3 (EPA) content in Artemia. Values represent the range (area percent) and coefficient of variation of data as compiled. (FAO, 1996)

Le ricerche fino ad ora condotte sul valore nutritivo delle artemie, hanno evidenziato, quale fattore principale che condiziona lo sviluppo delle larve, il contenuto in acidi grassi essenziali (EFA), ed in particolare la frazione degli acidi grassi altamente insaturi della serie omega-3 (HUFA- ω 3). Il contenuto di acidi grassi delle artemie è nettamente influenzato dal tipo di alimento che viene loro somministrato, per cui la finalità di molte ricerche è stata quella di definire come le diverse fonti incidano sul valore nutritivo di questi organismi.

Tra le microalghe la *Chlorella minutissima* viene largamente usata sia per la sua facilità di coltivazione, sia per le sue caratteristiche chimiche: contiene un alto livello di acidi grassi essenziali, in particolare l'acido eicosapentanoico (EPA) 20:5 ω 3 (25-

⁶ High Unsaturated Fatty Acid

30% sui lipidi totali). Di conseguenza le artemie coltivate su *Chlorella minutissima* hanno una concentrazione di HUFA- ω 3 pari al 26-32% dei lipidi totali, di cui il 23-30% è costituito da EPA, che si è rivelato della massima importanza durante lo sviluppo larvale. L'uso della *Chlorella minutissima*, coprendo le esigenze in HUFA- ω 3 delle larve, permette di ottenere buone prestazioni con tassi di sopravvivenza che possono raggiungere il 60-80% in larve di 30 giorni di età. (FAO, 1996)

Al fine di migliorare sia la produttività, che il valore nutritivo delle artemie, si è diffusa la tecnica di coltivazione su substrato lievito e microalghe, provvedendo successivamente al finissaggio in sole alghe. In questo modo i tassi di sopravvivenza delle larve migliorano passando, ad esempio, dal 10-20%, con solo lievito, al 50% dopo sole 6 h di alimentazione dell'artemia con alga.

Attualmente, allo scopo di ridurre sensibilmente o totalmente i costi di investimento (strutture) e di gestione (manodopera) della produzione del fitoplancton, si stanno studiando alimenti o diete secche per artemie in grado di sostituire completamente il lievito e le alghe.

Alcuni prodotti già immessi sul mercato fornirebbero, secondo le ditte produttrici, risultati simili o addirittura superiori dal punto di vista qualitativo a quelli ottenibili con *Saccharomyces* sp. e *Chlorella* sp.: ciò porta ad una notevole semplificazione del diagramma produttivo.

La constatazione della relazione diretta esistente tra il contenuto in HUFA- ω 3 delle artemie e l'ottenimento di buone prestazioni nelle larve, ha portato alla ricerca di tecniche che permettano di condizionare la composizione chimica delle artemie in misura molto più precisa di quanto ottenibile con gli alimenti semplici, sfruttando la grande adattabilità fisiologica di cui esse sono dotate. Con queste metodiche, denominate tecniche di arricchimento (o di finissaggio), è possibile ottenere un alimento vivo più rispondente alle esigenze nutrizionali delle larve.

Si distinguono tecniche indirette e dirette: le prime prevedono l'arricchimento del substrato su cui le artemie verranno allevate: si può ad esempio aggiungere olio di pesce o olio di fegato di calamaro al mezzo colturale impiegato, come ad esempio il lievito; il valore nutritivo dell' *A. salina* alimentata con il lievito così ottenuto si è dimostrato superiore rispetto a quelle allevate con *Chlorella marina*. I metodi diretti di arricchimento sono attualmente i più usati in quanto garantiscono una

composizione chimica dello zooplancton più costante e di maggiore valore nutritivo per le larve. (Cataudella S. e Bronzi P., 2001) Si tratta di additivi che vengono somministrati alle colture di artemie poche ore prima del loro impiego come alimento vivo per le larve. Elaborati da ditte specializzate, gli arricchitori, come vengono genericamente denominati, sono costituiti da miscele di acidi grassi polinsaturi, vitamine, minerali, cui vengono talora aggiunti amminoacidi; possono presentarsi in forma di microcapsule, microparticelle o emulsioni.

Generalmente nell'alimentazione delle larve si utilizzano naupli di artemia appena schiusi, in quanto essi hanno un valore nutritivo del 28% superiore rispetto agli adulti, ma ultimamente si sta valutando la possibilità di somministrare l'artemia in stadi giovanili. Questo porterebbe, data la maggiore taglia, ad un minore uso di cisti, l'apporto proteico aumenterebbe e i pesci spenderebbero meno energia per alimentarsi. Inoltre l'arricchimento di questi stadi richiede un tempo minore rispetto ai naupli (2-4h vs 8-10 ore). Di conseguenza potrebbe essere conveniente somministrare in un primo momento artemie di piccole dimensioni, favorendo così una più rapida transizione dai rotiferi, per poi passare a ceppi più grossi. (FAO, 1996)

6.2 Arricchimento di *Artemia salina* L. con antiossidanti di origine vegetale in aggiunta ad emulsioni commerciali di acidi grassi polinsaturi

Dal punto di vista chimico gli arricchitori commerciali attualmente utilizzati risultano caratterizzati dal 30-40% di proteina grezza e dal 25-40% di lipidi totali di cui il 18-40% è rappresentato da acidi grassi polinsaturi. Riferiti alla sostanza secca dell'additivo i valori in HUFA- ω 3 risultano compresi tra il 6 e il 10%. Rispetto alle alghe, questi prodotti risultano particolarmente ricchi in acido decoesanoico (22:6- ω 3; 7-13% dei lipidi totali).

L'aggiunta di questi additivi alle artemie avviene 6-12 ore prima della loro somministrazione alle larve. Con i prodotti attuali vengono utilizzate quantità pari a 200 g/mc ad una densità di 250000 nauplii/L. L'arricchimento comporta generalmente un aumento significativo del contenuto lipidico delle artemie,

variabile tra il 20 ed il 70% in funzione delle caratteristiche dell'additivo e della sua dose di impiego.

Commercial emulsion	%HUFA- ω -3
Super Selco (INVE Aquaculture NV)	5,03
DHA Selco (INVE Aquaculture NV)	3,27
Superartemia (Catvis)	2,63
SuperHUFA (Salt Creek)	4,11

Tabella 8. Enrichment levels in *Artemia nauplii* boosted with various products (FAO, 1996)

E' ben noto che gli acidi grassi polinsaturi (HUFA- ω 3) sono facilmente ossidabili e dunque facilmente deperibili, per ovviare a questo problema i prodotti presenti in commercio prevedono l'aggiunta di stabilizzanti ed antiossidanti che riducono la perossidazione lipidica.

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

Tabella 9. Composizione DHA Selco (INVE)

L'idea di partenza di questo lavoro consiste nell'utilizzare estratti antiossidanti di origine naturale quali polifenoli dell'uva e dell'oliva, origano e cranberry con funzione protettiva degli acidi grassi polinsaturi usati per l'arricchimento. Si è valutato quindi la capacità dell' *Artemia salina* di assumere, metabolizzare e bioaccumulare gli antiossidanti contenuti nelle matrici vegetali somministrate e la loro effettiva azione antiossidante. Ciò permetterebbe in futuro di poter utilizzare arricchitori puri proteggendoli con molecole antiossidanti di origine naturale.

6.2.1 Materiali e metodi

Piano sperimentale

Per l'esperimento è stata utilizzato il crostaceo *Artemia salina* (AF type, INVE, Belgio). Le cisti sono state messe a bagno per 1-2 ore, in acqua dolce addizionata con 0,1-0,2 cc/litro di soluzione commerciale di cloro al 14-18%, in presenza di aerazione e alla densità di circa 1 g/litro. A fine idratazione, sono state lavate molto bene. La

schiusa, della durata di 24 ore, è avvenuta in acqua filtrata (limpida) e disinfettata⁷, con salinità 30-35‰; luce e temperatura costante di 30° C; forte aerazione e/o ossigenazione; densità 1 g di cisti per litro (cisti precedentemente idratate e disinfettate). (*Sorgeloos et al., 1977*)

Al termine del trattamento sono stati prelevati i nauplii, suddivisi in 14 gruppi e posti in vaschette da 10 L ciascuna ad una densità media di 25 individui/mL.

Diete	Gruppi	Antiossidante (AO g/l)	DHA (g/l)
Controllo	-	0	0
DHA	-	0	0,6
Polifenoli dell'uva	A	0,01	0,6
	B	0,05	0,6
	C	0,25	0,6
Polifenoli dell'oliva	A	0,01	0,6
	B	0,05	0,6
	C	0,25	0,6
Origano	A	0,01	0,6
	B	0,05	0,6
	C	0,25	0,6
Cranberry	A	0,01	0,6
	B	0,05	0,6
	C	0,25	0,6

Tabella 10. Diete e rispettivi gruppi sperimentali

L'arricchimento è durato 24 ore in condizioni costanti (temperatura 19,0 °C; salinità 30 ‰; pH 8 ± 0,2; acqua di mare microfiltrata a 1 µm; aereazione sostenuta e costante). (*Sorgeloos et al., 1986*)

Le diete prevedevano l'aggiunta in acqua di una concentrazione di DHA Selco (INVE, Belgium) pari a 0,6 g/L con diverse concentrazioni di antiossidante di origine vegetale (0,01 g/L; 0,05 g/L; 0,25 g/L) quali polifenoli dell'uva, polifenoli dell'oliva, origano, cranberry. Inoltre sono state allestiti due ulteriori gruppi alle

⁷ L'acqua delle vasche è sottoposta a disinfezione con 0,10 cc/litro di soluzione commerciale di cloro al 14-18% e successiva neutralizzazione con 0,10 cc/litro di soluzione di tiosolfato al 20%.

medesime condizioni di crescita: il primo arricchito con solo DHA Selco (INVE), e il secondo senza alcun arricchimento (digiuno).

Al termine delle 24 ore di arricchimento, sono stati prelevati i campioni da ciascuna vaschetta filtrando l'intero contenuto e raccogliendo le artemie. Queste sono state poi congelate a -15 °C e successivamente liofilizzate.



Figura 6. Gruppi sperimentali e raccolta artemie a fine arricchimento.

Sui campioni così ottenuti è stata determinata l'attività antiossidante lipofila mediante metodo ABTS su solido e l'ossidazione lipidica tramite analisi spettrofotometrica dei T-BARS.

Attività antiossidante

Il metodo ABTS (Miller et al., 1995; Miller et al., 1997a e b; Pellegrini et al., 1999) misura l'attività antiossidante su composti insolubili valutando la formazione di un composto colorato il cui massimo di assorbanza è a 734 nm. Tale metodo si basa sull'utilizzo del cromogeno 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-solfonato), indicato con la sigla ABTS, che produce, nella forma radicalica, un assorbimento tipico a 734 nm. L'ABTS è un composto che non presenta alcun assorbimento spettrofotometrico nel campo del visibile, mentre assume un'intensa colorazione rossa in ambiente acido e in presenza di un opportuno ossidante. L'ABTS forma in tal caso un catione radicalico stabilizzato per risonanza:



Il catione radicalico è fortemente colorato e presenta un picco di assorbanza massimo a 734 nm (con ϵ_{max} di 18 in metanolo assoluto); a tale lunghezza d'onda è valutato il decremento dell'assorbanza dovuto al sequestro dell'elettrone singolo da parte dei composti antiossidanti (AO) che risultano più affini per esso:



Quindi l'equilibrio della reazione catione/catione radicalico si sposta verso la forma cationica decolorata proporzionalmente all'attività antiossidante del campione.

Per questo motivo l'attività antiossidante è espressa come percentuale di decremento dell'assorbanza, detta anche *percentuale di inibizione*, calcolata secondo l'equazione:

$$\text{Abs} (\%) = (1 - \text{Abs}_c / \text{Abs}_b) * 100$$

dove Abs_c è l'assorbanza del catione radicalico dopo l'aggiunta della soluzione di antiossidanti estratti dal campione, mentre Abs_b è l'assorbanza del cosiddetto "bianco", cioè del catione radicalico dopo l'aggiunta di sola acqua deionizzata, quindi senza l'aggiunta di antiossidanti, in modo da ottenere l'assorbanza della soluzione con il cromogeno non inibito.

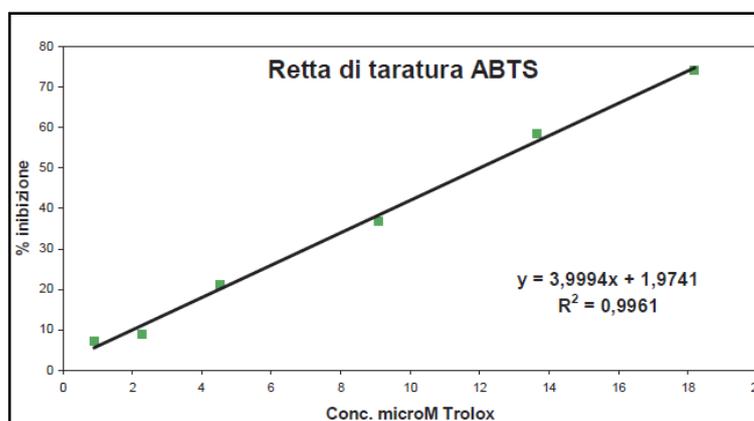


Figura 7. Retta di taratura ABTS

I campioni di Artemie raccolti sono stati macinati con un frullatore Blender. La procedura di misurazione, come descritto in *Serpen et al., 2007.*, prevedeva di pesare 10 mg di campione e di trasferirlo in una provetta da centrifuga. La reazione è stata avviata con l'aggiunta di 6 ml di reagente ABTS precedentemente preparato facendo reagire 7 mmol/L di soluzione acquosa di ABTS con 2,45 mmol/L di potassio persolfato sciolto in una miscela di etanolo:acqua (50:50, v/v). Le provette

sono state collocate in un agitatore basculante al fine di facilitare la reazione superficiale tra le particelle solide ed il reagente ABTS. Dopo centrifugazione a 9200 x g per 2 min, il surnatante chiaro è stato separato e le misure di assorbanza sono state eseguite a 734 nm dopo 60 minuti.

La capacità antiossidante è stata espressa in mmol di Trolox equivalente alla capacità antiossidante (TEAC) per kg di campione mediante una curva dose-risposta. Sostituendo i valori di percentuale di inibizione ottenuti con i campioni contenenti l'estratto nella retta di taratura, si è ricavata l'attività antiossidante lipofila espressa come mmol di trolox /100 g di campione.

I campioni sono stati diluiti con polvere di cellulosa, composto inerte al reagente ABTS nel dosaggio delle condizioni sopra descritte. La diluizione con cellulosa ha permesso di estrapolare meglio la totalità della capacità antiossidante (*Serpen et al., 2007*)

Valutazione della perossidazione lipidica

La misurazione dei TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) costituisce un saggio d'elezione per lo screening ed il monitoraggio della perossidazione lipidica, tra i maggiori indicatori dello stress ossidativo. La metodica è in grado di fornire importanti informazioni sull'attività dei radicali liberi in situazioni di stress. Il prodotto finale della cascata ossidativa è la Malonildialdeide (MDA), la quale forma un addotto in rapporto 1:2 con l'acido tiobarbiturico. In pratica, essi sono espressi e quantificati in termini di equivalenti di malondialdeide (MDA).

L'analisi dei TBARS è stata effettuata tramite adattamento del metodo *Burk et al., 1980*. Il campione è stato preparato a partire da 0,5 g di campione liofilizzato a cui sono stati aggiunti 10 mL di acqua distillata. Dopo agitazione al vortex per 1 minuto, si sono aggiunti 2,5 mL di una soluzione TCA/H₂O al 25%. Il composto così ottenuto è stato ulteriormente agitato e posto per 5 minuti a 4°C. Dopo si è provveduto a centrifugazione a 4000 rpm per 5 minuti, al termine della quale si sono prelevati 3,5 mL di surnatante a cui sono stati aggiunti 1,5 mL di una soluzione TBA/H₂O allo 0,6%. La soluzione è stata poi incubata per 15 minuti in un bagnetto termostato a 70°C. La lettura è stata effettuata allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 532 nm contro un bianco costituito da 1 mL di TCA/H₂O al

25%+1,5 mL di TBA/H₂O allo 0,6%. I valori di assorbanza così ottenuti sono stati convertiti in concentrazione di MDA (nmoli/mL di Malondialdeide) attraverso la retta di taratura riportata in figura 8.

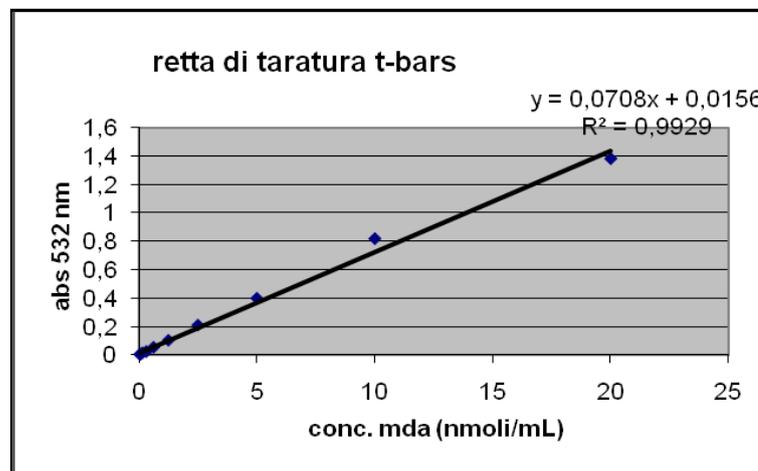


Figura 8. Retta di taratura t-bars

6.2.2 Risultati e discussione

I normali protocolli di arricchimento suggeriscono che tale processo avvenga in condizioni di aereazione sostenuta, illuminazione costante e temperatura intorno ai 27° C, condizioni che accelerano l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi e la formazione di prodotti d'ossidazione potenzialmente tossici (*Ramanathan et al., 1994*)

Ovviamente i prodotti commerciali a base di emulsioni di acidi grassi polinsaturi contengono già antiossidanti con azione protettiva, tale quantità, però, non riesce a garantire una completa integrità a lungo termine, infatti è stato dimostrato che dopo 23 h di arricchimento delle artemie con DHA Selco, si registra un notevole aumento dei prodotti d'ossidazione lipidica. (*McEvoy, 1995*)

Come già accennato, l'analisi dell'ABTS ci permette di misurare la concentrazione di composti antiossidanti liberi capaci di chelare i ROS. Da un primo screening del grafico riportato sotto, si nota come i due gruppi, controllo e DHA, identificati come riferimenti rispetto alle diete addizionate con antiossidanti, non mostrano una significativa differenza. Tale condizione è spiegabile considerando che, nel gruppo controllo, l'attività antiossidante è "basale" in quanto non è presente alcun arricchimento, né in grassi né in antiossidanti esogeni. Il gruppo DHA, invece, è

ricco sia in acidi grassi polinsaturi sia in antiossidanti, come già evidenziato nella tabella 9 in cui si riporta il profilo del DHA Selco, e l'attività antiossidante dei composti preposti è probabilmente completamente esaurita durante il processo di arricchimento, portando dunque il valore dell'ABTS del gruppo DHA ad un livello molto simile a quello "basale".

Se il contenuto di antiossidanti presenti nel prodotto fosse adeguato alle condizioni di arricchimento, ci saremmo aspettati un considerevole aumento dell'attività antiossidante nei gruppi in cui l'arricchimento in DHA è stato addizionato con ulteriori antiossidanti, quali i polifenoli dell'uva e dell'oliva, e gli antiossidanti presenti nell'origano e nel cranberry.

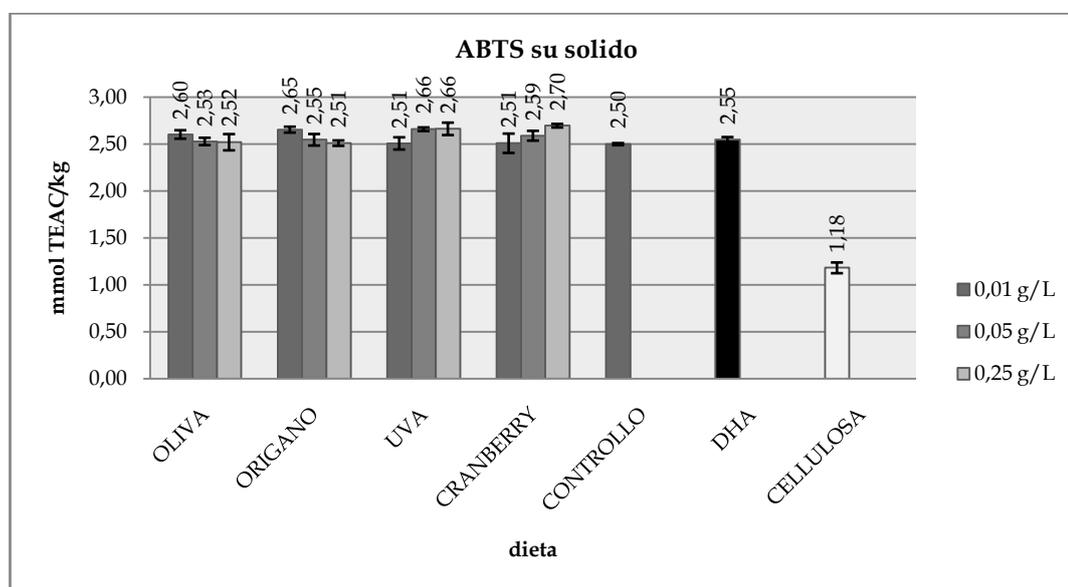


Figura 9. ABTS su solido (*Artemia salina*)

Tale condizione però non si verifica. Infatti i valori di ABTS per questi gruppi non mostrano un significativo aumento di mmol TEAC/kg rispetto ai gruppi controllo e DHA. Ciò fa dunque ipotizzare che, nelle nostre condizioni sperimentali in cui era previsto un arricchimento di 24 ore, anche i composti antiossidanti addizionati siano stati utilizzati dagli organismi per chelare i ROS, che di fatto l'emulsione DHA Selco

non riesce ad esaurire, nonostante i composti antiossidanti⁸ già presenti nel prodotto.

L'ipotesi avanzata con i risultati dell'ABTS, che prevede un effettivo utilizzo degli antiossidanti naturali addizionati durante l'arricchimento di artemia salina con DHA Selco, va però verificata correlando tali dati alla valutazione della perossidazione lipidica tramite TBARS.

Dal grafico in basso si evidenziano notevoli differenze tra i valori di MDA ottenuti, sia in funzione delle diverse tipologie di antiossidanti sia in funzione delle diverse concentrazioni. Interessante è il risultato ottenuto con l'aggiunta di polifenoli dell'oliva, soprattutto alla concentrazioni più bassa⁹. Infatti, in corrispondenza di una sostenuta attività antiossidante ($2,60 \pm 0,04$ mmol TEAC/kg) ritroviamo una ridotta concentrazione di MDA ($2,04 \pm 0,09$ nmol/ml di MDA) rispetto al gruppo arricchito con solo DHA Selco ($2,91 \pm 0,05$ nmol/ml di MDA). In questo caso, dunque, è verificata l'ipotesi di un effetto positivo nella protezione degli acidi grassi polinsaturi ad opera dei polifenoli dell'oliva. Invece, nei gruppi cranberry e origano c¹⁰, l'aggiunta di ulteriori antiossidanti all'emulsione commerciale DHA Selco, ha provocato un effetto pro-ossidante, facendo registrare un aumento del valore di TBARS rispetto al gruppo DHA.

I polifenoli e i carotenoidi sono ampiamente descritti in letteratura come antiossidanti, ma non mancano evidenze sperimentali in vitro che indicano come, alcune di queste sostanze possono, soprattutto a concentrazioni molto elevate avere un'azioni pro-ossidante (Paolozza et al., 1998; Zhang et al., 2001).

Poco rilevante è l'effetto dell'aggiunta di polifenoli dell'uva e dell'origano, soprattutto a basse concentrazioni (b e c), che mostrano risultati molto simili al gruppo DHA

⁸ Vit.A 1.500.000 IU/kg; Vit.D 3150.000 IU/kg; Vit.E 3.600 IU/kg; Vit.C 800 IU/kg.

⁹ Concentrazione antiossidante a: 0,01 g/l.

¹⁰ Concentrazione antiossidante: 0,025 g/l.

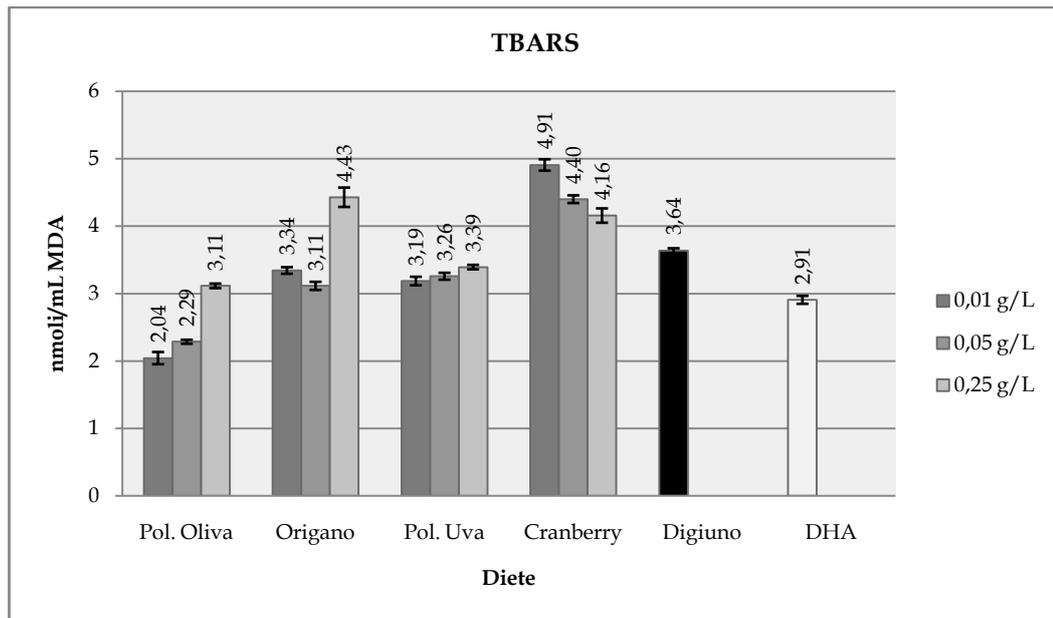


Figura 10. TBARS (*Artemia salina*)

6.3 Valutazione del profilo nutrizionale di nauplii di *Artemia Salina* L. alimentati con dieta inerte a base di spinacio

Come già accennato, l'*Artemia salina* viene raccolta dai laghi salati di molti paesi tropicali e subtropicali, e dalle saline; viene poi commercializzata sottoforma di cisti quiescenti. E' un crostaceo filtratore non selettivo e in natura si ciba di microalghe, protozoi, batteri, detriti organici, ecc. di dimensioni comprese tra 1 e 50 μm . (*Dhont and Sorgeloos, 2002*)

Data l'importanza di tale organismo in acquacoltura e la ridotta disponibilità della risorsa naturale, si stanno effettuando ricerche per incrementare la produzione naturale nelle saline somministrando diete inerti a base di riso, soia e mais a supporto dei naturali "bloom" algali da cui dipende l'alimentazione di questi organismi e dunque la loro produzione. (*Baert et al., 1997*)

La possibilità di ottenere Artemie "indoor" porterebbe diversi vantaggi: una produzione indipendente dalla stagione e dal clima, raccolte più frequenti e possibilità di riavvio della coltura in qualsiasi momento, una produzione controllata in funzione dello stadio di sviluppo, dimensione e valore nutrizionale specifico utile ai diversi campi d'impiego, un maggiore controllo su batteri e malattie.

Purtroppo però la produzione di *Artemia salina* in condizioni controllate richiede grandi quantità di alimento con elevate qualità nutrizionali come le microalghe vive *Dunaliella sp.*, *Isochrysis sp.*, e *Chaetoceros sp.* già comunemente usate in acquacoltura.

La produzione di alghe unicellulari, però, è faticosa e molto dispendiosa: infatti è uno dei principali vincoli per la coltura di filtratori acquatici. In alternativa sono stati utilizzati diversi supplementi all'alimentazione algale come batteri (*Intriago e Jones, 1993*), lievito di birra (*Coutteau et al., 1990, 1992*), farina di soia, riso e crusca di frumento. (*Dobbeleir et al, 1979. Sorgeloos et al, 1980;. Dhert et al, 1992, 1993*) Queste aggiunte o sostituzioni dell'alimento standard a base di microalghe, però, non ottengono gli stessi risultati nutrizionali.

Lo sviluppo di diete alternative nutrizionalmente valide e a basso costo risulta dunque di notevole importanza.

6.3.1 Materiali e metodi

Piano sperimentale

Per l'esperimento sono state utilizzate cisti di *Artemia salina* L. (AF type, INVE, Belgio). Il protocollo usato per la reidratazione e schiusa è identico a quello descritto per il precedente esperimento¹¹. (*Sorgeloos et al., 1977*).

Al termine del trattamento sono stati prelevati i nauplii e sono stati suddivisi in due gruppi: il primo alimentato con *Tetraselmis suecica* (TET) viva prodotta in una coltura parallela su terreno Walne e il secondo alimentato con liofilizzato di spinacio *Spinacea oleracea* (SPI); ciascun gruppo è stato poi posto in vaschette da 5 litri ad una densità di 5 org/mL.

Dieta	Razione giornaliera	Kcal/100 g
SPI	50 µg DW/org	23,3 (USDA)
TET	25 µg DW/org.	48,2 (Reed mariculture)

Tabella 11. Diete e rispettivi gruppi sperimentali

¹¹ Vedi pag. 56. Piano sperimentale

Le condizioni sperimentali prevedevano: temperatura 19,0 °C; salinità 30 ‰; pH 8±0,2; acqua di mare microfiltrata a 1 µm; aereazione e luce costante (Sorgeloos et al. 1986), sostituzione giornaliera del 50% dell'acqua di coltura.



Figura 11. Gruppi sperimentali

L'esperimento è durato sette giorni e prevedeva due somministrazioni giornaliere di alimento. Dato il diverso potere energetico delle due diete (tabella 11), la dose giornaliera di alimento per ciascun organismo ammontava a 50 µg DW, per la dieta SPI, e 25 µg DW, per la dieta TET.

Al termine dell'esperimento sono stati prelevati i campioni da ciascuna vaschetta filtrando l'intero contenuto e raccogliendo le artemie; queste sono state poi congelate a -15 °C e successivamente liofilizzate.

Sui campioni così ottenuti si è misurata la percentuale dei grassi totali, l'ossidazione lipidica tramite l'analisi spettrofotometrica dei T-BARS e le xantofille attraverso l'analisi cromatografica all'HPLC.

Grassi totali

L'estrazione dei lipidi è stata effettuata secondo la metodica di Bligh e Dyer (1959). Una quantità pari a 5 grammi di campione è stata tritata, miscelata con 20 ml di una soluzione di cloroformio e metanolo (2:1 v/v) e agitata per 20 minuti. Dopodiché sono stati aggiunti altri 20 mL della miscela cloroformio e metanolo e messo in agitazione per 10 minuti. Successivamente il campione è stato travato in un imbuto separatore e aggiungiamo 20 mL di acqua clorurata allo 0,5%. Da questo

processo si ottiene un sistema costituito da tre fasi: fase acquosa, fase solida e fase cloroformica. La fase che viene recuperata è la fase cloroformica. Il tutto è stato sottoposto a centrifugazione per 5 minuti a 4500 rpm per permettere la separazione delle fasi. La miscela estratta è stata anidrificata su solfato di sodio anidro e filtrata su filtri di cellulosa a separazione lenta, prima di essere portata a secco mediante evaporatore rotante.

La percentuale di grasso estratto è stata espressa in rapporto

$$p/p. P/M*100 = \% \text{ GRASSO (p/p)}$$

dove P è la quantità di grasso estratto, espresso in grammi, ed M è la quantità di campione utilizzato.

TBARS

La valutazione della perossidazione lipidica tramite l'analisi dei TBARS secondo il metodo *Burk et al., 1980* è stata già precedentemente descritta¹² nei paragrafi precedenti.

Carotenoidi

L'estrazione dei carotenoidi è stata effettuata secondo la metodica descritta da *Amara et al. 2004*. Una quantità pari a 1 g di campione è stato omogeneizzato con 2 mL di acetone per 3 minuti all'Ultraturrax in becker con ghiaccio. L'estratto così ottenuto è stato filtrato con cloroformio in un palloncino e portato a secco con evaporatore rotante sottovuoto a temperatura compresa tra 30°C e 35°C.

Al residuo secco è stato successivamente aggiunto 1 mL di KOH 50% e 10 mL di metanolo per attivare il processo di saponificazione; il pallone è stato poi saturato con azoto e posto al buio in agitazione su piastra basculante per 2 ore.

Successivamente il miscuglio è stato posto in un pallone separatore e vi è stato aggiunto 25 mL di diclorometano (fase organica) e 15 mL di H₂O (fase acquosa); la

¹² Vedi Valutazione perossidazione lipidica pag. 59

fase organica è stata lavata per 2 volte. La fase organica, posta in un pallone, è nuovamente portata a secco con evaporatore rotante sottovuoto e risospesa in 0,500 μ L di esano.

I campioni sono stati analizzati all'HPLC per iniezione di 100 μ L di ciascun estratto su colonna Suplex pKb - 100 C₁₈ con velocità di flusso di 0.8 mL/min. Il gradiente utilizzato prevedeva l'uso di due fasi mobili: la fase A era costituita da acetonitrile mentre la fase B da acetonitrile, esano, metanolo e diclorometano (2:1:1:1), secondo quanto descritto da *Tonucci et al. (1995)*. Il rilevamento è stato fatto a 450 nm, lunghezza d'onda di assorbimento tipica dei carotenoidi.

6.3.2 Risultati e discussione

La prima misura analitica sui campioni dei due gruppi valutava la percentuale DW dei grassi totali. È interessante notare che, i grassi presenti negli organismi alimentati con le due diete diverse non varia di molto, mantenendo, inoltre, valori simili a quelli rilevati da *Pedro et al., 2009* che, dopo 5 giorni di alimentazione con *Tetraselmis suecica*, ottenne una percentuale di grassi totali pari al $15,2 \pm 0,6\%$. L'idea di utilizzare diete inerti nell'alimentazione delle artemie è stata già verificata in altre ricerche, con diversi prodotti commerciali come ad esempio il Nestum¹³, con cui si sono ottenuti risultati molto soddisfacenti e, addirittura, migliori rispetto alla tradizionale dieta a base di alghe unicellulari: nella fattispecie si ottenne una percentuale di lipidi totali pari al $16,45 \pm 1,39\%$ DW. (*Ludwig et al., 1999*)

Diete	Lipid tot % DW	Citazioni
Spinacio (inert)	$16 \pm 0,5$	
Tetraselmis sp.	$15 \pm 0,6$	
Tetraselmis sp.	$15,2 \pm 0,6$	Pedro et al., 2009
Nestum (inert)	$16,45 \pm 1,39$	Ludwig et al., 1999
Natura	$9,32 \pm 1,0$	Castro et al. 2009

Tabella 12. Lipidi totali

¹³ Preparato liofilizzato nutrizionalmente completo per l'alimentazione dei bambini, prodotto dalla Nestlé. (*Ludwig et al., 1999*)

Oltre alla valutazione della percentuale in grassi totali, si è provveduto anche all'analisi dei prodotti di ossidazione degli acidi grassi attraverso la misura dei TBARS. Ciò ha permesso di valutare la capacità antiossidante dell'alimento spinacio di cui è noto l'elevato contenuto in carotenoidi.

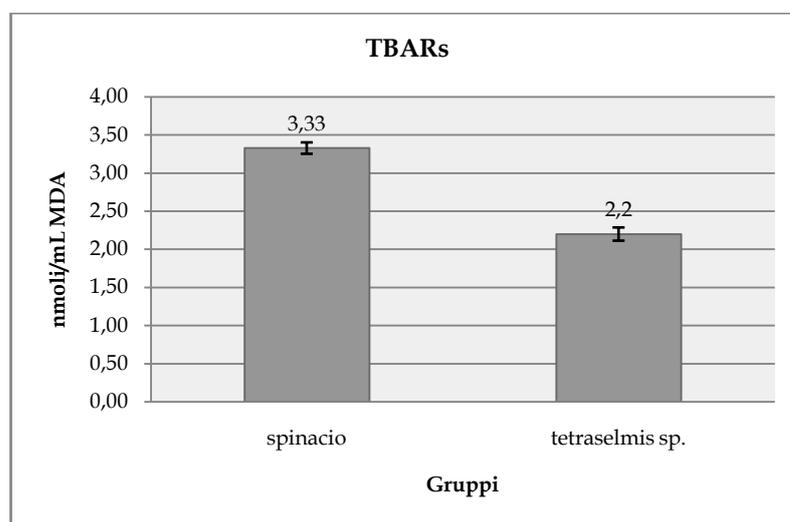


Figura 12. TBARS (*Artemia salina*)

I valori di TBARS ottenuti su campioni di artemia alimentata esclusivamente con spinacio risultano di fatto maggiori rispetto a quelli di artemia alimentata con la microalga *Tetraselmis* sp.. Tale risultato può essere dovuto sia al maggiore contenuto di lipidi che si evidenzia dall'analisi precedentemente descritta, sia ad una possibile difficoltà fisiologica di assimilazione della nuova dieta a base di spinacio, che può aver provocato un maggiore stress.

Per ulteriore conferma all'ipotesi di bioaccumulo di antiossidanti presenti nello spinacio si è provveduto anche all'analisi all'HPLC dei carotenoidi. La figura riportata in basso mostra una sovrapposizione dei cromatogrammi a 450 nm dei due gruppi in cui si evidenziano dei picchi a 3,5 minuti, 4,5 minuti e 7,5 minuti, tempi di ritenzione tipici delle xantofille. Non è stato possibile identificare tali picchi, ma si notano rilevanti differenze tra i picchi dei due gruppi e in particolare a 3,5 minuti. Tale risultato fa dunque pensare ad un possibile bioaccumulo degli antiossidanti somministrati con la dieta, ma sono necessari ulteriori studi di approfondimento per verificare tale ipotesi.

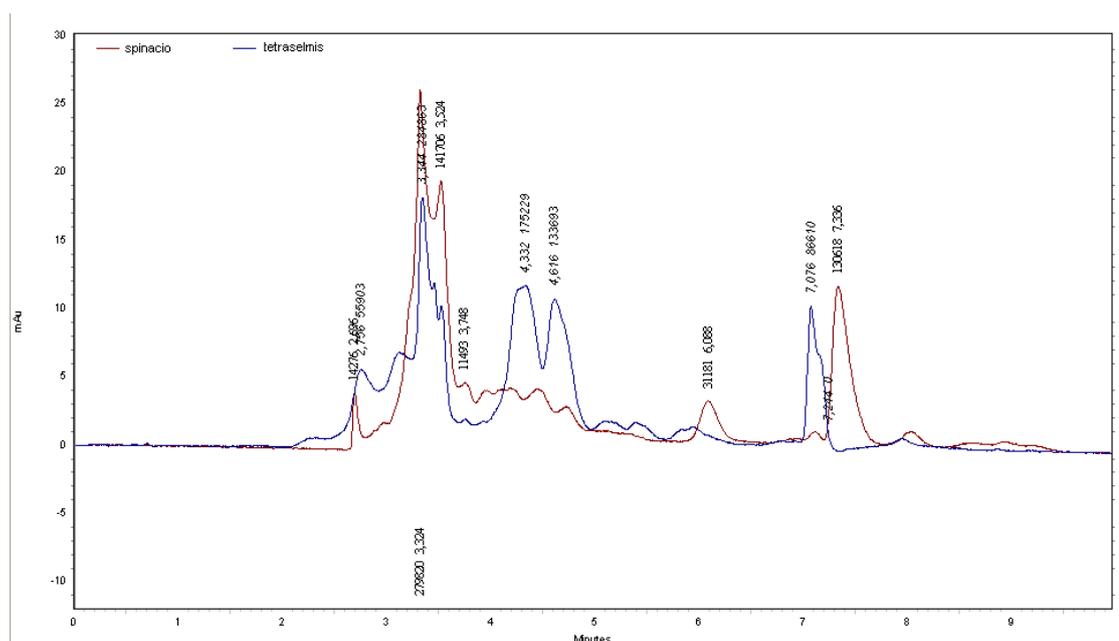


Figura 13. Cromatogramma HPLC dei carotenoidi (*Artemia salina*)

6.4 Conclusioni

L'idea di incrementare l'azione antiossidante per proteggere gli acidi grassi altamente insaturi (HUFA- ω 3) durante le fasi di arricchimento è verificabile solo con specifici composti come i polifenoli dell'oliva. In particolare l'aggiunta di tale composto alle tradizionali emulsioni commerciali favorisce ancor di più l'ottenimento di una elevata concentrazione di HUFA necessari all'alimentazione larvale dei pesci riducendone l'ossidazione. Inoltre, questo risultato, suggerisce che ulteriori studi potrebbero portare alla composizione di nuovi arricchitori a base di oli di pesce, grassi e antiossidanti vegetali, riducendo, quindi, i costi di produzione di emulsioni sintetiche e offrendo agli operatori un'alternativa nell'ottica dell'acquacoltura biologica.

L'utilizzo di un alimento inerte per la produzione di artemie in condizioni controllate, ottenendo dunque un minor rischio di contaminazioni e di sviluppo di malattie, riduce di gran lunga gli elevati costi di produzione del fitoplancton.

Tale condizione permetterebbe, dunque, l'ottenimento di organismi più grandi (minor numero di animali e maggiore biomassa) per l'alimentazione degli avannotti e, di conseguenza, una riduzione dello sfruttamento degli stock naturali, attualmente unica fonte di approvvigionamento di cisti. Inoltre, la possibilità di

mantenere per lungo tempo le artemie in condizioni ottimali, fa ipotizzare una produzione vera e propria, permettendo la riproduzione autonoma degli organismi stessi abolendo la dipendenza dalla disponibilità naturale.

L'uso dello spinacio ha permesso l'ottenimento di una buona percentuale di grassi totali il cui profilo potrebbe essere ottimizzato somministrando alle artemie una dieta complessa con aggiunta di composti con elevate concentrazioni di acidi grassi polinsaturi, necessari all'alimentazione larvale; proprio in quest'ottica sarebbe utile approfondire anche l'azione antiossidante dei carotenoidi presenti nei vegetali e in particolare nello spinacio, al fine di valutare anche l'effettiva azione protettiva di tali composti verso gli acidi grassi polinsaturi.

7. Utilizzo di una dieta vegetale in sostituzione alle alghe per la crescita controllata di *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

7.1 Introduzione

In ambito internazionale, la molluschicoltura è fonte di circa il 15% della produzione complessiva dell'acquacoltura, mentre in Italia il settore rappresenta oltre il 50% della produzione totale per un ammontare annuo che supera le 200.000 tonnellate.

Se si escludono le ancora poche esperienze di coltivazione dell'ostrica, l'intera produzione è sostenuta dall'allevamento di due sole specie di bivalvi: il mitile (*Mytilus galloprovincialis*) e la vongola filippina (*Tapes philippinarum*). Un quadro così descritto, certamente importante per il bilancio nazionale tra importazione ed esportazione dei prodotti ittici, suggerisce di ottimizzare le produzioni già avviate e di intraprendere nuove zoocolture indirizzate all'allevamento di altri molluschi di valore commerciale.

Al fine di conservare la biodiversità tipica dei mari italiani, l'allevamento dei molluschi va condotto utilizzando esclusivamente ceppi di seme autoctono, evitando, dunque, l'immissione di prodotto proveniente da aree extramediterranee. Questo anche per evitare il trasferimento di organismi associati, presenti nell'acqua intervalvare o come epibionti, che possono portare a nuove patologie o, più genericamente, ad una loro diffusione incontrollata nell'ambiente, con possibili ed imprevedibili danni di carattere genetico ed ecologico. (*IZS Abruzzo e molise, 2008*)

La molluschicoltura italiana, come anche quella europea, deve fare i conti anche con un fenomeno il cui impatto futuro è difficilmente prevedibile: le biotossine algali (PSP, DSP, ASP e altre), prodotte da alcune microalghe tossiche per l'uomo. Nutrendosi di queste alghe, i molluschi, ed i mitili in particolare, accumulano tossine che essendo termostabili resistono alla cottura e possono costituire un serio pericolo per la salute umana. Al di là del fatto che si rendono necessari metodi di rilevazione della presenza delle tossine più affidabili di quelli oggi in uso, poiché non si conosce attualmente alcun rimedio, non si può per ora fare altro che tenere sotto stretto controllo gli allevamenti.

In quest'ottica si stanno elaborando nuove tecniche di allevamento e di riproduzione controllata anche dei molluschi. In acquacoltura, infatti, la riproduzione controllata è una pratica largamente impiegata ed è strettamente associata alla necessità di garantire la disponibilità di seme di buona qualità della specie che si intende allevare. Purtroppo però, la produzione controllata di seme richiede un elevato dispendio di mezzi e di energie. Per ogni fase della produzione è indispensabile la presenza di strumentazioni sofisticate e soprattutto di manodopera specializzata; voce quest'ultima che incide sui costi per il 50%, mentre la spesa per la coltivazione delle microalghe ricopre circa il 40% dei costi complessivi sostenuti da uno schiuditoio¹⁴. I costi attuali non permettono di scendere sotto di 1,50 euro/1000 pezzi (2-3 mm), di conseguenza la raccolta di seme selvatico risulta di gran lunga più conveniente, soprattutto se viene eseguita direttamente dagli allevatori.

Indipendentemente da questi aspetti, l'insieme delle attività praticate dagli schiuditoi può avere importanti risvolti economici, ambientali e scientifici. Esso, infatti, può fornire un adeguato supporto tecnologico per diversificare le produzioni attraverso l'utilizzo di altre specie di molluschi di interesse commerciale. Il seme prodotto in schiuditoio, oltre ad essere impiegato negli allevamenti come fonte sempre disponibile e libera da contaminazioni (tossine algali), può servire in azioni di ripopolamento (restocking). In molti Paesi, per fronteggiare l'impoverimento degli stock naturali a causa del sovrasfruttamento, si effettua la semina con novellame proveniente da schiuditoio. Ad esempio, lungo le coste atlantiche della Francia, i banchi di cappasanta atlantica, *Pecten maximus*, vengono continuamente integrati con seme riprodotto in laboratorio. (Cataudella e Bronzi, 2001) Essere in grado di eseguire la riproduzione controllata di una specie può assumere, quindi, importanti sviluppi nell'ambito della conservazione e dello sfruttamento sostenibile delle risorse naturali.

¹⁴ Impianto per la schiusa e stabulazione di uova e larve di organismi acquatici.

Infine la possibilità di ottenere molluschi bivalvi con caratteristiche nutrizionali specifiche, apre la strada ad un utilizzo di questi organismi come alimento fresco e controllato nella stabulazione dei riproduttori di pesci allevati. Infatti è noto che le modificazioni nell'alimentazione a breve distanza dalla frega¹⁵ possono avere effetti marcati sul successo riproduttivo, e che i micronutrienti quali vitamine, minerali, acidi grassi essenziali e pigmenti carotenoidi rivestono un ruolo fondamentale in tale processo. (Mikulin e Soin, 1975; Czezuga, 1979; Tacon, 1981; Deufel, 1965; Waagbø et al., 1991; Solimen et al., 1986;)

Vi è dunque molto interesse, sia dal punto di vista scientifico sia da quello pratico, verso la comprensione delle relazioni che intercorrono tra la nutrizione e la riproduzione dei pesci, dato che la disponibilità di elevati quantitativi di uova vitali e di elevata qualità è chiaramente di estrema importanza per un ulteriore sviluppo dell'acquacoltura, ed esiste certamente la possibilità di ottenere significativi miglioramenti, con conseguenti riduzioni nei costi di produzione, anche attraverso la messa a punto di nuove diete più funzionali.

Proprio in quest'ottica si pone questo studio, il quale mira a valutare le capacità di metabolizzazione dello spinacio, di assorbimento e di bioaccumulo degli antiossidanti da parte dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) al fine di ottenere una maggiore protezione degli acidi grassi polinsaturi ed una maggiore resistenza agli stress ambientali. Ciò permetterebbe di ottenere un alimento funzionale di elevata qualità, ma a basso costo per l'alimentazione dei riproduttori di pesci eurialini, migliorandone il welfare, la resistenza agli stress e le performance riproduttive.

La scelta dello spinacio (*Spinacia oleracea*) come alimento da somministrare ai mitili è dettata dai bassi costi di produzione, dalla disponibilità di molto materiale di scarto alla presenza di una elevata quantità di carotenoidi, in particolare luteina e zeaxantina, appartenenti entrambi alla classe delle xantofille: lo spinacio crudo contiene 6603 µg/100g di all-trans lutein. (Perry et al., 2009) Proprio le xantofille

¹⁵ Periodo riproduttivo dei pesci.

sono i principali antiossidanti presenti nel phylum *Mollusca* ed in particolare β -Carotene, lutein, zeaxanthin, diatoxanthin, alloxanthin, pectenolone, pectenol, mytiloxanthin, isomytiloxanthin, fucoxanthinol, amarouciaxanthin A, mactraxanthin, canthaxanthin, phoenicoxanthin, astaxanthin. (Miyuki Tsushima et al. 1997) In particolare in *Mytilus galloprovincialis* si ritrovano alloxanthin e mytiloxanthin.

La molteplicità dei carotenoidi presenti nei molluschi è dovuta principalmente alle diverse risorse alimentari a cui accedono, ma in tutti risultano essere componenti del doppio strato lipidico delle membrane con funzione sia di pigmenti che di fluidificanti. (Vershinin A., 1996).

7.2 Materiali e metodi

Per l'esperimento sono stati utilizzati adulti di *Mytilus Galloprovincialis* Lmk. di 6 - 8 cm di lunghezza raccolti in inverno ed acquistati presso l'impianto di depurazione di molluschi Ittica 3000 (Villa Literno, CE). Trasportati in laboratorio sono stati sottoposti ad un periodo di acclimatazione di 7 giorni alla temperatura di 19,0 °C, salinità 30 ‰, Ossigeno Disciolto 7.0 mg O₂/L, pH 8,2, acqua di mare microfiltrata a 1 µm (Pirini et al., 2007), ricambio giornaliero del 50%.

Dallo stock iniziale sono stati prelevati 48 esemplari, 24 di questi sono stati suddivisi in 3 gruppi ciascuno costituito da 8 individui e collocati in 3 diverse vaschette di 10 litri ciascuna. I rimanenti 16 animali sono stati congelati a -15 °C ed utilizzati come campioni per il controllo al T₀ (bianco): questi sono stati ulteriormente suddivisi per la valutazione dell'umidità e per le analisi biochimiche.

Il primo gruppo non è stato alimentato (DIGIUNO) per l'intero periodo sperimentale, il secondo gruppo è stato alimentato con una dieta a base di alghe unicellulari in pasta della specie *Pavlova* sp (Istant Algae®, Reed Mariculture) (dieta PAV) e al terzo gruppo è stata somministrata una dieta a base di spinacio liofilizzato (dieta SPI).

La razione giornaliera prevedeva una concentrazione di alghe in vasca costante e pari a $3,3 \cdot 10^9$ cell/mL per la dieta PAV e 1 mg/ml di liofilizzato di spinacio, precedentemente setacciato a 70 µm (Pirini et al., 2007) per la dieta SPI; tale

quantità risultava equivalente alla stessa concentrazione di particelle prevista per le alghe.

La razione giornaliera somministrata è stata valutata tenendo conto che ogni individuo ha un fabbisogno giornaliero che equivale al 10% del peso secco del proprio frutto (che convertito in densità cellulare è di circa $1,5 \cdot 10^9$ cell/die), che la densità di cellule costantemente presenti in acqua non deve superare $1,5 \cdot 10^5$ cell/mL e che la densità ottimale di allevamento, per l'organismo in esame, è di circa 1 organismo/L (Gourthro et al., 1998 - Langdon, Onal, 1999), pertanto la somministrazione dell'alimento è avvenuta ad intervalli regolari di 30 minuti per 8 ore.

L'esperimento è durato 15 giorni: a 7 giorni (T_1) sono stati prelevati 3 esemplari da ciascuna vaschetta per il campionamento; i rimanenti 5 sono stati campionati a fine esperimento (T_2). Tutti i campioni erano costituiti dal corpo molle dell'animale, congelato immediatamente a -15°C e successivamente liofilizzato.

Ad ogni campionamento i mitili sono stati misurati tramite calibro e pesati. Per i campioni inoltre si è provveduto a determinarne il peso del frutto, ovvero del corpo molle, escluse le valve.

Le analisi biochimiche prevedevano la valutazione dei grassi totali, dei perossidi tramite TBARS e dei carotenoidi tramite analisi cromatografica all'HPLC. I metodi applicati fanno riferimento ai protocolli già descritti per l'esperimento con l'*Artemia salina*¹⁶.

7.3 Risultati e Discussione

Durante l'intero periodo sperimentale, tra i gruppi alimentati (PAV e SPI) non si è registrata nessuna mortalità, mentre per il Gruppo A (DIGIUNO), si è registrata una mortalità pari al 60%: ciò ha impedito il campionamento a 7 giorni (T_1), imponendo un unico campionamento a 15 giorni dei 3 organismi sopravvissuti

¹⁶ Vedi pag. 56, Materiali e metodi.

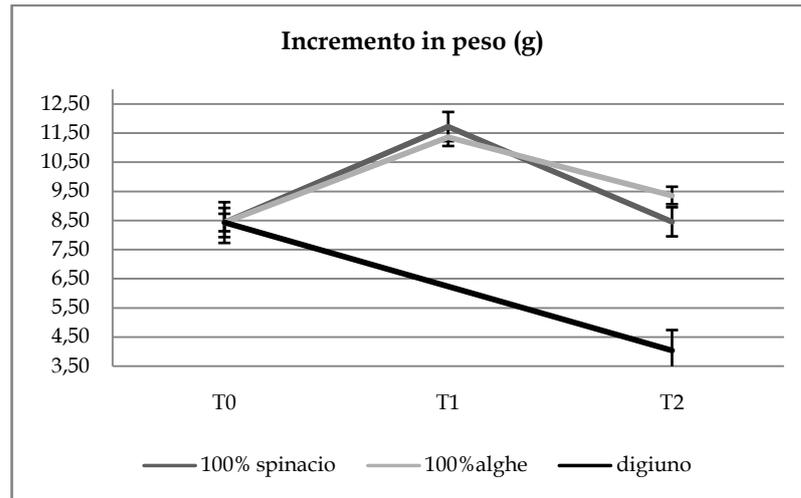


Figura 14. Incremento in peso (*Mytilus galloprovincialis*)

I risultati ottenuti dalle misure ponderali nelle varie fasi di campionamento, mostrano un andamento del peso totale in grammi del frutto sgocciolato (corpo molle escluse le valve), simile tra i due gruppi di alimentazione, mentre il gruppo DIGIUNO mostra un andamento molto differente.

Per entrambe le diete si registra un generale primo aumento di peso, probabilmente dovuto all'assunzione di cibo dopo il periodo di acclimatazione a digiuno, ed un successivo decremento al T₂. A differenza del gruppo DIGIUNO, in cui il profilo è costantemente in decremento, i gruppi PAV e SPI non scendono al di sotto del peso iniziale al T₀.

La completa sostituzione con lo spinacio (dieta SPI) della tradizionale dieta a base di alghe unicellulari (Pavlova sp.) (dieta PAV) nell'alimentazione del mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis*, non ha evidenziato differenze significative nella percentuale di grassi totali mostrando un andamento simile per l'intero periodo sperimentale (15 giorni), facendo registrare rispettivamente i valori 33±0,6% e 30±0,8% a 7 giorni, 34±0,9% e 28±1,5% a fine esperimento.

Diete	Lipid tot % DW	Citazioni
Spinacio (inert)	34,0 ± 0,9	
Pavlova sp.	28,0 ± 1,5	
T. weissflogii	27,4 ± 0,6	Pirini et al., 2007
Germe di grano	13,5 ± 0,2	Pirini et al., 2007
Natura	20,5 ± 0,5	Orban et al., 2002

Tabella 13. Percentuale grassi totali DW

Inoltre, i valori non discostano molto da quelli osservati in altri esperimenti condotti con dieta algale a base di *T. weissflogii* ($27.4 \pm 0.6\%$ DW) e con dieta a base di germe di grano ($13.5 \pm 0.2\%$ DW) (Pirini et al., 2007), valori che comunque risultano molto superiori a quelli riscontrati in natura ($20,5 \pm 0,5$) (Orban et al., 2002). Ciò induce a pensare che i mitili in questione abbiano ben metabolizzato la dieta a base di spinacio nonostante il profilo nutrizionale di questa fosse ben diverso da quello delle alghe; è noto infatti che i bivalvi e in particolare le specie intertidali come le cozze, sono capaci di ottimizzare diete ricche in carboidrati. (Albentosa et al., 2002

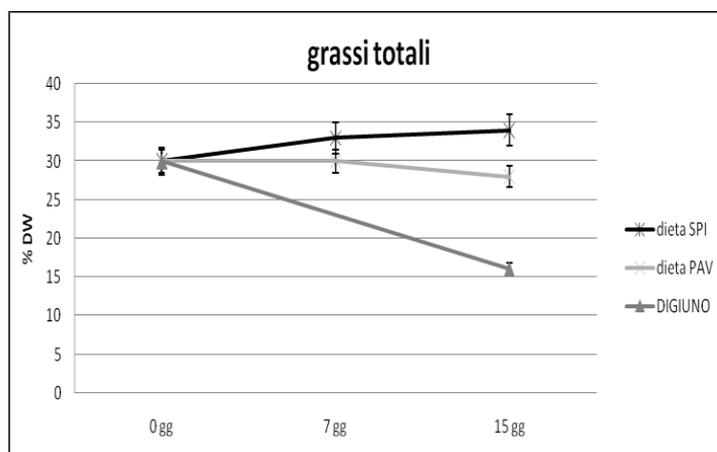


Figura 15. Grassi totali (*Mytilus galloprovincialis*)

Direttamente collegato ai valori dei grassi risulta l'andamento della perossidazione lipidica, che si presenta senza grosse variazioni nei mitili alimentati con diete diverse: a 7 giorni SPI $10,49 \pm 0,11$ e PAV $9,47 \pm 0,12$; a 15 giorni SPI $16,52 \pm 1,4$ e PAV $11,49 \pm 1,8$.

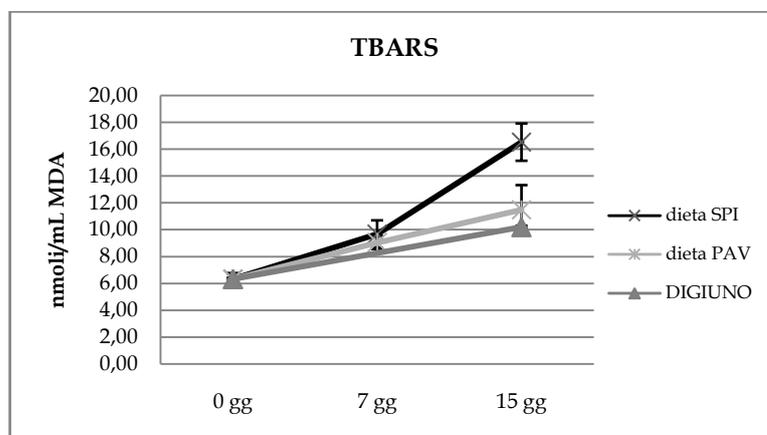


Figura 16. TBARS (*Mytilus galloprovincialis*)

La differenza al T₂ tra i due gruppi alimentati può essere dovuta sia alla percentuale in grassi totali maggiore nel gruppo SPI rispetto al gruppo PAV, sia ad un aumento dello stress indotto da effettive difficoltà metaboliche dello spinacio. Tali condizioni andrebbero in ogni caso verificate con ulteriori approfondimenti.

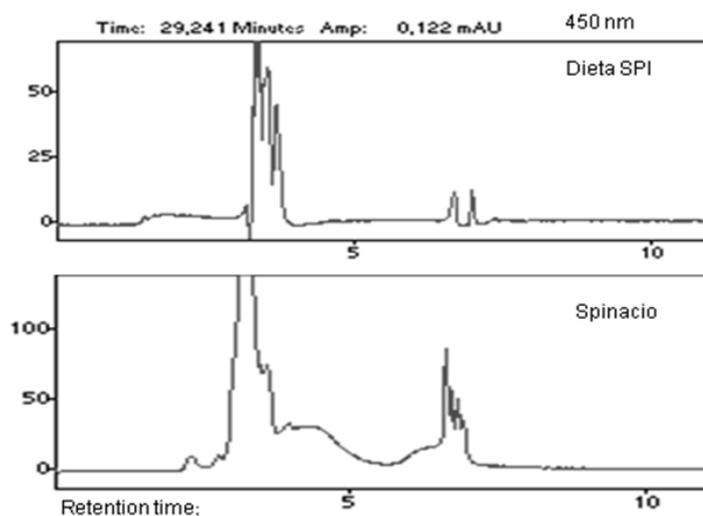


Figura 17. Cromatogramma HPLC dei carotenoidi di spinacio e mitile gruppo SPI.

Per l'analisi cromatografica dei carotenoidi, come già accennato, è noto che quelli più abbondanti nei mitili sono l'alloxanthin e mytiloxanthin. (Hertzberg *et al.*, 1988) Altri carotenoidi sono stati identificati nel genere mytilus come ad esempio il β -carotene, esteri di alloxantina e mytiloxantina, esteri di luteina, zeaxantina e diatoxantina. (Campbel *et al.*, 1970) La molteplicità dei carotenoidi presenti è dovuta principalmente alle diverse risorse alimentari a cui accedono. (Vershinin A., 1996) Nel nostro studio, lo studio dei carotenoidi presenti nei mitili alimentati con lo spinacio e quelli presenti nello spinacio della dieta ha permesso una tracciabilità delle componenti dalla dieta all'organismo, infatti nei cromatogrammi di seguito si evidenzia una corrispondenza dei picchi tra alimento (spinacio) ed organismo (mitile) che fa ipotizzare a un bioaccumulo dei carotenoidi, anche se i picchi sono difficilmente identificabili. E' comunque plausibile che la luteina sia stata di fatto assimilata e metabolizzata dall'organismo bioaccumulandosi sottoforma di un carotenoide tipico o di un isomero della luteina stessa che si evidenzia con un picco ed un relativo tempo di ritenzione molto vicino a quello della luteina presente nello spinacio. Molti studi sul metabolismo dei carotenoidi nei molluschi, infatti indicano

che il gasteropode *Littorina littorea* L. metabolizza la (3R,3'R,6'R)-Lutein in α -citaurin e poi in α -citaurinol, mentre il *Fusinus perplexus*, anch'esso un gasteropode, converte la (3R,3'R,6'R)-Lutein in fritschiellaxanthin ed anche la mytiloxantina dei mitili non è sintetizzata a partire dai substrati introdotti con le diete ma è sintetizzata a partire dalla fucoxantina (Doris A. O. et al, 1997).

7.4 Conclusioni

I mitili riescono ad ottenere buone performance di crescita con un'alimentazione esclusivamente a base di spinacio adattando facilmente il proprio metabolismo all'utilizzo di carboidrati. Ciò permette di ipotizzare una produzione indoor di seme di mitile controllata e sicura da contaminanti naturali, da usare per l'allevamento outdoor.

Inoltre, ulteriori approfondimenti sulle capacità di bioaccumulo degli antiossidanti vegetali nei mitili potrebbe concretizzare l'ipotesi di creare un alimento funzionale utile all'alimentazione dei riproduttori di pesci eurialini.

8. Valutazione dell'aggiunta di vegetali alla dieta tradizionale di *Sparus aurata L.* in fase di ingrasso

8.1 Introduzione

Nel corso degli ultimi anni, la maggiore disponibilità in termini quantitativi e la migliore valorizzazione del prodotto hanno determinato un aumento del consumo di pesce, sia di acqua dolce che salata, proveniente molto spesso da pratiche di allevamento. Secondo i dati ISMEA¹⁷ del 2007 il consumo pro capite annuo è di circa 22 kilogrammi.

Il pesce è prevalentemente costituito da acqua (60-80%) e contiene proteine (15-23%) di elevato valore biologico, ricche soprattutto in metionina e lisina la cui digeribilità è del 96-97%. La quantità di lipidi è pari a 0,5-20% e, in particolare, la composizione in acidi grassi della frazione trigliceridica e, ancor di più della frazione fosfolipidica, è caratterizzata dalla presenza di composti appartenenti alla serie metabolica dell'acido α -linolenico (C 18:3 ω -3) con prevalenza di componenti ad alto grado di insaturazione ed a lunga catena, quali gli acidi eicosapentaenoico, EPA (C 20:5 ω -3) e decosaesaenoico, DHA (C 22:6 ω -3) ampiamente riconosciuti come agenti di prevenzione delle malattie cardiovascolari.

Di fatto, il pesce risulta essere l'unica fonte significativa di ω -3 per l'uomo. L'importanza di una corretta alimentazione per una buona conservazione dello stato di salute è stata comprovata da tempo da numerosi studi epidemiologici. L'attuale dieta occidentale è caratterizzata da un aumento del consumo di grassi ed in particolare di acidi grassi saturi, acidi grassi trans, acidi grassi essenziali ω -6 e da una diminuzione di acidi grassi ω -3, con gravi rischi di insorgenza di malattie cardiovascolari, ipercolesterolemie, dislipidemie. Le direttive delle Società scientifiche internazionali e dell'American Cancer Society in particolare, suggeriscono un corretto comportamento alimentare che svolga un'azione

¹⁷ Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare

preventiva basata sulla diminuzione delle calorie totali limitando, in particolare, il consumo di grassi saturi e di colesterolo, e aumentando, invece, l'assunzione degli ω -3, sostituendo le carni rosse con il pesce, e dei vegetali e frutta che contengono sostanze antiossidanti e fibra; infine, limitare il consumo di alcool.

L'importanza degli acidi grassi altamente insaturi (HUFA) è evidente anche per la fisiologia dei pesci, infatti sono componenti dei fosfolipidi di membrana e precursori degli eicosanoidi¹⁸, molecole biologicamente attive (*Bell et al., 1995*). Purtroppo però, a causa del loro alto livello di insaturazione, sono molto sensibili all'ossidazione, processo fisiologico che avviene continuamente nella cellula (*Biesalski, 1992*). In quest'ottica risulta fondamentale il ruolo degli antiossidanti che impediscono i dannosi effetti della perossidazione lipidica (*Liebler, 1993*) ovvero della modificazione degli ω -3 annullando inevitabilmente i loro effetti benefici.

Recenti studi effettuati sul pesce gatto africano (*Baker e Davies, 1996*) e nel salmone atlantico (*Bell et al., 2000*) hanno mostrato cambiamenti nel tessuto della composizione degli HUFA in condizioni di carenza di antiossidanti. Una modifica nella composizione degli acidi grassi dei fosfolipidi di membrana correlata all'ossidazione nella cellula potrebbe dar luogo a processi degenerativi patologici (*Halliwell e Gutteridge, 1989*) e, di conseguenza, ad un aumento dei tassi di mortalità. Inoltre, è stato dimostrato che la carenza di astaxantina, può causare ritardi nella crescita ed un alto tasso di mortalità in larve e novellame di salmone atlantico. (*Christiansen et al., 1995; Christiansen e Torrissen, 1996*)

I pesci purtroppo non sono capaci di sintetizzare l'astaxantina e i carotenoidi in genere, quindi, devono necessariamente assumerli con la dieta (*Goodwin, 1984*), che in natura risulta prevalentemente a base di crostacei che ne contengono grosse quantità. (*Labropoulou et al., 1999*)

Dunque, l'aggiunta di antiossidanti ai mangimi usati in piscicoltura è praticamente necessaria per ridurre l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, sia di quelli presenti nei pellets, la cui composizione prevede circa il 70% di farina di pesce, sia

18 Ormoni regolatori che si suddividono in prostaglandine, trombossani, leucotrieni e lipossine

di quelli contenuti nelle carni dei pesci allevati, anche al fine di ottenere un animale sano riducendo l'azione dei radicali liberi. Diversi studi, infatti, suggeriscono che carotenoidi quali il β -carotene, l'astaxantina e la cantaxantina, sono potenti antiossidanti in modelli in vitro di membrana lavorando in sinergia con la vitamina E. (Nishigaki et al., 1994; Bell et al., 2000)

I carotenoidi si suddividono principalmente in due classi principali: le xantofille e i caroteni; alla prima appartengono l'astaxantina, la luteina, la zeaxantina, ecc., alla seconda appartengono il licopene ed i caroteni (α e β). In base a questa suddivisione sono stati individuati due alimenti vegetali di uso comune di cui è nota l'elevata concentrazione in carotenoidi: il pomodoro (46263 μ g in 100 g DW) e lo spinacio (12197 μ g in 100g DW).(USDA)

Questo studio mira dunque, a valutare l'effetto della somministrazione di liofilizzato di pomodoro e liofilizzato di spinacio, addizionati al mangime in pellets a giovanili di orata (circa 50 g) in funzione dell'azione antiossidante dei carotenoidi e della tollerabilità dei vegetali a sostituzione parziale delle farine di pesce. In particolare, gli aspetti su cui si focalizza la sperimentazione sono le qualità nutrizionali del filetto, la riduzione dello stress ossidativo sugli acidi grassi e l'eventuale bioaccumulo dei carotenoidi somministrati con la dieta.

8.2 Materiali e metodi

Piano sperimentale

Per l'esperimento sono stati utilizzati 237 giovanili di *Sparus aurata* L. di circa 60 g offerti dall'azienda d'acquacoltura Ittica 3000. Trasportati in laboratorio sono stati sottoposti ad un periodo di acclimatazione degli animali di 7 giorni alle seguenti condizioni: temperatura 19 ± 1 °C, Salinità 30 ‰, Ossigeno Disciolto 7.0 mg O₂/L, pH 8,2, fotoperiodo naturale, densità 5 kg/m³ (Ortuño et al., 2003)

Dallo stock iniziale si sono costituiti 3 gruppi da 79 esemplari ciascuno posto in vasche da 1 m³ d'acqua di mare. Per ciascun gruppo è stata preparata una diversa dieta come di seguito indicato:

Gruppi	Diete	Kcal/100g
CON	Ecolife 60 (100%)	52,1
SPI	Ecolife 60 (85%) + Spinacio (15%)	47,68
POM	Ecolife 60 (85%) + Pomodoro (15%)	47,38

Tabella 14. Diete e rispettivi gruppi

Le diete sono state formulate utilizzando il mangime Ecolife 64 in pellets n°4,5 prodotta da Biomar srl. Per la costituzione dei nuovi pellets si è provveduto a macinare i pellets in apposito mulino elettrico semiprofessionale, alla polvere così ottenuta si è mescolato il liofilizzato (di pomodoro o di spinacio) con l'aggiunta di acqua deionizzata, infine sono stati ricostituiti i pellets a grandezza simile a quella iniziale tramite una macchina impastatrice e sono stati congelati a -15 °C.

La razione giornaliera somministrata è stata valutata in base alla formula:

$$\text{g alimento} = \text{tasso alimentazione} * \text{biomassa} / 100$$

il tasso di alimentazione è indicato dalle tabelle alimentari del mangime utilizzato in base alla specie, la temperatura dell'acqua ed il peso medio degli animali (2%); inoltre è stata considerata la quantità d'acqua aggiunta per la ricostituzione dei pellets.

L'esperimento ha avuto la durata di 3 mesi, la razione giornaliera è stata suddivisa in due somministrazioni.

I campionamenti sono stati effettuati prima della sperimentazione (T₀), a 5 settimane di alimentazione (T₁) e a 12 settimane (T₂). Ciascun campionamento consisteva nel pesare e misurare tutti gli animali previa anestesia con fenossietanolo disciolto in acqua, inoltre si raccoglievano campioni di filetto e fegato da 3 animali per ciascun gruppo per le analisi biochimiche secondo il seguente protocollo: uccisione in acqua e ghiaccio, prelievo di filetti e fegati, congelamento dei campioni a -15 °C e successiva liofilizzazione.

Le analisi biochimiche prevedevano la valutazione degli acidi grassi, dei perossidi tramite TBARS e dei carotenoidi tramite analisi cromatografica all'HPLC. I metodi

applicati per l'analisi dei TBARS e dei carotenoidi fanno riferimento ai protocolli già descritti per l'esperimento con l'*Artemia salina*¹⁹

Acidi grassi

L'estrazione dei lipidi è stata effettuata secondo la metodica di *Bligh e Dyer (1959)*. Una quantità pari a 5 grammi di campione è stata tritata, miscelata con 20 ml di una soluzione di cloroformio e metanolo (2:1 v/v) e agitata per 20 minuti. Dopodiché sono stati aggiunti altri 20 mL della miscela cloroformio e metanolo e messo in agitazione per 10 minuti. Successivamente il campione è stato travato in un imbuto separatore e aggiungiamo 20 mL di acqua clorurata allo 0,5%. Da questo processo si ottiene un sistema costituito da tre fasi: fase acquosa, fase solida e fase cloroformica. La fase che viene recuperata è la fase cloroformica. Il tutto è stato sottoposto a centrifugazione per 5 minuti a 4500 rpm per permettere la separazione delle fasi. La miscela estratta è stata anidrificata su solfato di sodio anidro e filtrata su filtri di cellulosa a separazione lenta, prima di essere portata a secco mediante evaporatore rotante.

La percentuale di grasso estratto è stata espressa in rapporto

$$p/p. P/M*100 = \% \text{ GRASSO (p/p)}$$

dove P è la quantità di grasso estratto, espresso in grammi, ed M è la quantità di campione utilizzato.

La determinazione della componente acidica è stata eseguita mediante l'analisi degli esteri metilici degli acidi grassi previa trans-esterificazione. La trans-esterificazione è stata effettuata utilizzando MeOH e KOH 2N. La procedura ha previsto la preparazione di una soluzione di grasso in esano al 5%. È stato prelevato 1μL per l'analisi gas-cromatografica.

¹⁹ Vedi pag. 56. Materiali e metodi

8.3 Risultati e discussione

Nello studio con giovanili di *Sparus aurata*, sono state somministrate 3 diete di cui due prevedevano la sostituzione del 15% della dieta tradizionale con pomodoro e spinacio liofilizzato. Tale sostituzione è andata dunque a modificare il profilo nutrizionale dei pellets sostituendo parte delle proteine e dei lipidi date dalle farine di pesce con i carboidrati, componente molto più abbondante nei vegetali. Numerosi studi hanno evidenziato nel genere *Sparus* una buona capacità di metabolizzare piccole percentuali di carboidrati e trasformarli in grasso corporeo (Figueiredo-Silva et al., 2010; Hernández et al., 2001)

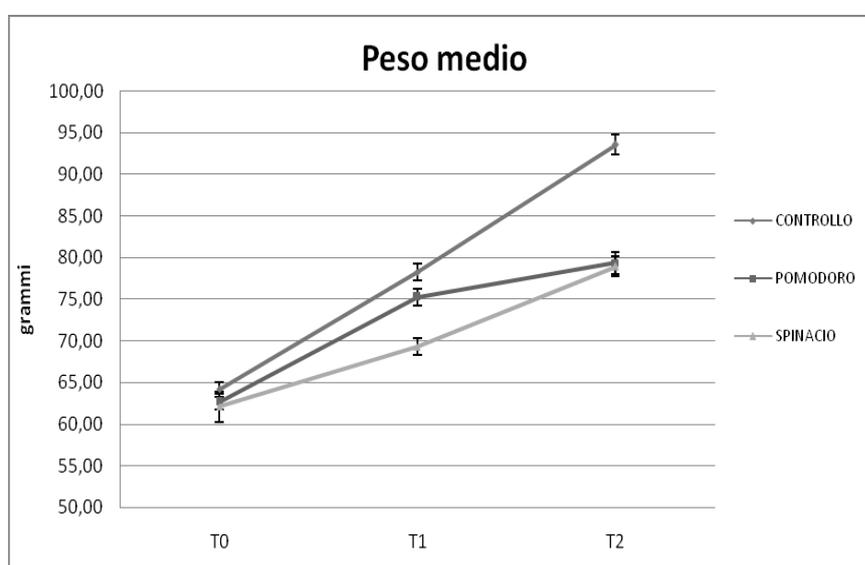
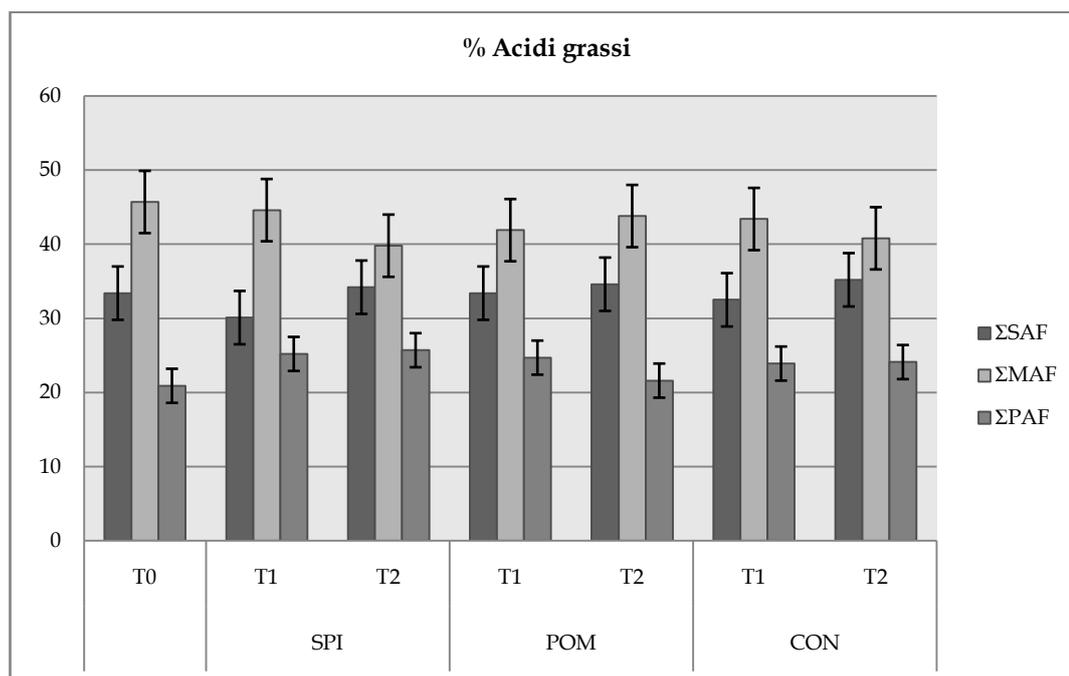


Figura 18. Peso medio (*Sparus aurata*)

Tale sostituzione, a lungo termine ha evidenziato un incremento in peso ridotto negli animali alimentati con la dieta SPI (18,69±1,21%) e la dieta POM (18,69±1,32%) rispetto agli animali alimentati con la dieta tradizionale CON (31,41±2,77%). Tale incremento dopo 7 gg non evidenzia però gli stessi risultati mostrando un andamento simile, soprattutto tra le diete POM e CON in cui si registra rispettivamente il 14,68±0,98% e il 18,02±1,09%.

%	Bianco	SPI		POM		CON	
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂
ac. Grasso	T ₀	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂
C14	5,8±0,1	5,2±0,3	4,9±0,5	5,1±0,2	6,5±0,1	6,2±0,3	5,4±0,2
C16	21,1±0,3	19,2±0,2	22,8±0,2	22,3±0,4	22,2±0,1	19,4±0,7	22,1±0,1
C18	6,5±0,1	5,7±0,1	6,5±0,5	6±0,2	5,9±0,3	6,9±0,2	7,7±0,5
ΣSAF	33,4±0,2	30,1±0,2	34,2±0,4	33,4±0,3	34,6±0,2	32,5±0,5	35,2±0,3
C16:1	7,8±0,6	7,4±0,3	6,6±0,5	7,3±0,2	8,4±0,6	8,1±0,1	7,6±0,4
C18:1	37,9±0,2	37,2±0,7	33,2±0,4	34,6±0,4	35,4±0,7	35,3±0,8	33,2±0,2
ΣMAF	45,7±0,4	44,6±0,5	39,8±0,4	41,9±0,3	43,8±0,6	43,4±0,5	40,3
C18:2	8,6±0,8	10,8±0,9	11,1±0,3	8,8±0,5	9,9±0,5	9,4±0,9	11,1±0,1
C18:3	0,5±0,1	1,4±0,1	0,9±0,6	1±0,3	1±0,2	1,5±0,2	0,9±0,2
C20:5	4,9±0,4	5,3±0,2	6,3±0,3	6,5±0,1	4,8±0,1	6,4±0,2	5,9±0,4
C22:6	6,9±0,1	7,7±0,2	7,4±0,1	8,4±0,3	5,9±0,1	6,6±0,1	6,2±0,6
ΣPAF	20,9±0,5	25,2±0,6	25,7±0,4	24,7±0,3	21,6±0,3	23,9±0,4	24,1±0,5

Tabella 15. Profilo degli acidi grassi (*Sparus aurata*)Figura 19. Percentuale degli acidi grassi (*Sparus aurata*)

Dall'analisi del profilo degli acidi grassi non si evidenziano variazioni notevoli tra le diverse diete, e ciò denota un trascurabile effetto dei vegetali aggiunti sulla composizione del grasso corporeo.

Particolare interesse suscita l'incremento costante in HUFA che si evidenzia nella dieta addizionata con lo spinacio (T₁: 13%±0,3; T₂: 13,7±0,2%) che al T₂, risulta maggiore della dieta tradizionale a base di farine di pesce (T₁: 13%±0,1; T₂: 12,1±0,5%).

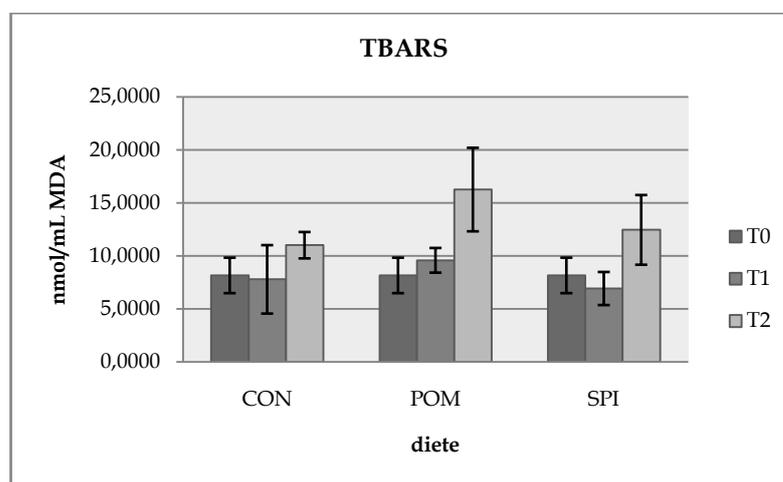


Figura 20. TBARS (*Sparus aurata*)

Per l'analisi spettrofotometrica dei TBARS i risultati mostrano un generale aumento al T₂ dello stress ossidativo in tutti i gruppi ed in particolare nel gruppo POM. Tale incremento è sicuramente dovuto all'aumento della densità data dall'aumento di peso degli animali, ma probabilmente anche le diete hanno inciso al T₂. Interessante è invece l'andamento al T₁ di tutti i gruppi che mostrano un andamento molto simile (CON 7,8±1,5 nmol/mL; POM 9,5±1,2 nmol/mL; SPI 6,9±3,2 nmol/mL) in particolare per quel che riguarda lo spinacio che risulta inferiore rispetto al controllo. Questo risultato avvalorava dunque l'idea di un qualche effetto protettivo dello spinacio e probabilmente delle xantofille sullo stress ossidativo con somministrazioni a breve termine.

Per l'analisi cromatografica dei carotenoidi si riportano i cromatogrammi risultanti dell'analisi all'HPLC a 450 nm (λ). In particolare quest'analisi è stata condotta sul fegato in quanto è l'organo in cui vi è una maggiore ritenzione di questi composti. Dal confronto tra il cromatogramma del fegato di pesci del gruppo SPI al T₂ e quello del fegato di pesci del gruppo POM allo stesso tempo, è possibile ipotizzare la presenza di carotenoidi solo nel fegato dei pesci del gruppo SPI in cui si notano una serie di picchi (non bene identificabili) intorno al tempo di ritenzione di 5 minuti ed un piccolo picco a circa 23 minuti.

8.4 Conclusioni

La sostituzione di piccole percentuali di alimento tradizionale con vegetali ricchi in carboidrati, non provoca rilevanti variazioni sul profilo degli acidi grassi delle orate, favorendo anzi, il bioaccumulo di grassi altamente insaturi come gli ω -3. Tale risultato potrebbe essere riconducibile all'azione antiossidante dei carotenoidi e, in particolare, delle xantofille contenute nello spinacio.

L'uso di vegetali come lo spinacio e il pomodoro, anche se in piccole percentuali è ipotizzabile per brevi periodi, in quanto la somministrazione a lungo termine ha evidenziato una riduzione dell'incremento in peso ed una conversione di alimento in biomassa meno efficiente.

9. Conclusioni

- La somministrazione solo di alcuni antiossidanti di origine naturale, come i polifenoli dell'oliva, nelle giuste concentrazioni, ha prodotto un'azione antiossidante più duratura nei tradizionali protocolli di arricchimento di *Artemia salina* con acidi grassi altamente insaturi (HUFA). In particolare l'aggiunta di tale composto alle tradizionali emulsioni commerciali favorisce ancor di più l'ottenimento di una elevata concentrazione di HUFA necessari all'alimentazione larvale dei pesci riducendone l'ossidazione. Inoltre, questo risultato, suggerisce che ulteriori studi potrebbero portare alla composizione di nuovi arricchitori a base di oli e/o grassi di pesce e antiossidanti vegetali, riducendo, quindi, i costi di produzione di emulsioni sintetiche e offrendo agli operatori un'alternativa nell'ottica dell'acquacoltura biologica.
- L'utilizzo di un alimento inerte per la produzione di artemie in condizioni controllate, ottenendo dunque un minor rischio di contaminazioni e di sviluppo di malattie, riduce di gran lunga gli elevati costi di produzione del fitoplancton. Tale condizione permetterebbe, dunque, l'ottenimento di organismi più grandi (minor numero di animali e maggiore biomassa) per l'alimentazione degli avannotti e, di conseguenza, una riduzione dello sfruttamento degli stock naturali, attualmente unica fonte di approvvigionamento di cisti. Inoltre, la possibilità di mantenere per lungo tempo le artemie in condizioni ottimali, fa ipotizzare una produzione a ciclo continuo, permettendo la riproduzione autonoma degli organismi stessi abolendo la dipendenza dalla disponibilità naturale. L'uso dello spinacio ha permesso l'ottenimento di una buona percentuale di grassi totali il cui profilo potrebbe essere ottimizzato somministrando alle artemie una dieta complessa con aggiunta di composti con elevate concentrazioni di acidi grassi polinsaturi, necessari all'alimentazione larvale; proprio in quest'ottica sarebbe utile approfondire anche l'azione antiossidante dei carotenoidi presenti nei vegetali e in particolare nello spinacio, al fine di valutare anche l'effettiva azione protettiva di tali composti verso gli acidi grassi polinsaturi.
- I mitili riescono ad ottenere buone performance di crescita con un'alimentazione esclusivamente a base di spinacio adattando facilmente il proprio metabolismo all'utilizzo di carboidrati. Ciò permette di ipotizzare

una produzione indoor di seme di mitile, controllata e sicura da contaminanti naturali, da usare per l'allevamento off-shore. Inoltre, ulteriori approfondimenti sulle capacità di bioaccumulo degli antiossidanti vegetali nei mitili potrebbe concretizzare l'ipotesi di creare un alimento funzionale utile all'alimentazione dei riproduttori di pesci eurialini.

- La sostituzione di piccole percentuali di alimento tradizionale con vegetali ricchi in carboidrati, non provoca rilevanti variazioni sul profilo degli acidi grassi delle orate, favorendo anzi, il bioaccumulo di grassi altamente insaturi come gli omega-3. Tale risultato potrebbe essere riconducibile all'azione antiossidante dei carotenoidi contenuti nel pomodoro e nello spinacio. Tale sostituzione, benché in piccole percentuali, è ipotizzabile solo per brevi periodi, in quanto la somministrazione a lungo termine ha evidenziato una riduzione dell'incremento in peso ed una conversione di alimento in biomassa meno efficiente.
- La sostituzione parziale o completa delle diete a base di farine e oli di pesce con i vegetali, potrebbe ridurre considerevolmente l'impatto sugli stock naturali e contribuire in modo rilevante all'ottenimento di una maggiore sostenibilità ambientale dell'acquacoltura. Inoltre l'uso di vegetali con elevato contenuto in carboidrati, ha un impatto ridotto sullo sfruttamento di risorse usate per l'alimentazione umana e riduce l'impatto ambientale dovuto alla elevata concentrazione di composti azotati dei reflui, conseguente al metabolismo delle proteine.
- La facile reperibilità e l'elevata diffusione di vegetali come il pomodoro, lo spinacio, l'oliva, l'uva, ecc. ridurrebbe di molto i costi di alimentazione in acquacoltura, soprattutto nell'ottica di recupero degli scarti di produzione dell'industria alimentare.

10. Bibliografia

- Adamidou S., Nengas I., Nikolopoulou D., Kotzamanis Y., Karacostas I., Bell J.G. and Jauncey K., 2008. Growth performance of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed extruded diets including low and high levels of three different legumes; filed peas, chickpeas and faba beans. *Resource management. EAS, special pub. N° 37*, p. 31.
- Agrawal N.K. & Mahajan C.L. (1980). Comparative tissue ascorbic acid studies in fishes. *J. Fish Biol.* 17: 135-141.
- Albentosa, M., Perez-Camacho A., Fernandez-Reiriz M.J., Labarta U., 2002. Wheatgerm flour in diets for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, spat. *Aquaculture* 212, 335-245.
- Albentosa, M., Perez-Camacho A., Fernandez-Reiriz M.J., Labarta U., 2002. Wheatgerm flour in diets for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, spat. *Aquaculture* 212, 335-245.
- Allsopp Michelle, Johnston Paul & Santillo David, 2008. *Challenging the Aquaculture Industry on Sustainability: Technical Overview. Greenpeace.*
- Ando, Y., Kobayashi, S., Sugimoto, T., and Takamaru, N. (2003). Positional Distribution of n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids in Triacyl-sn-glycerols (TAG) of Rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with Fish and Seal Oils TAG *Aquaculture.*
- Ashley P. J., 2007. Fish welfare: Current issue in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, doi: 10.1016/J. Applanim.
- Azevedo P. A., CHO C. Y., Bureau D. P. (1998), Effects of feeding level and water temperature on growth, nutrient and energy utilization and waste outputs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Living Resour.* 11:227-238.
- Baert, P., Anh, N.T.N., Quynh, V.D., Hoa, N.V., 1997. Increasing cyst yields in *Artemia* culture ponds in Vietnam: the multi-cycle system. *Aquac. Res.* 28, 809-814.
- Baker, R.T.M., Davies, S.J., 1996. Increased production of docosahexaenoic acid (22: 6n-3, DHA) in catfish nutritionally stressed by the feeding of oxidized oils and the modulatory effect of dietary α -tocopheryl acetate. *J. Fish Biol.* 49, 748- 752.
- Ballestrazzi, R. G. U. (1996). *Fish Farming and Environmental Impact. Laguna*, 4:6-13.
- Bardach J. E., McLarney W. O., Ryther J. H. (1972), *Aquaculture, the farming and husbandry of freshwater and marine organism.* Wiley Interscience, New York.
- Barlow, D.I., Sleigh, M.A., 1980. The propulsion and use of water current for swimming and feeding in larval and adult *Artemia*. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O.A., Jaspers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp artemia*, Vol. 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology, Universa Press, Wetteren, pp. 61-73.
- Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, D.R., McDonald, F.M., Sargent, J.R., 1995. Effects of different arachidonic: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid composition and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol. Biochem.* 14, 139- 151.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 2000. Depletion of α -tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 130, 1800-1808.
- Biesalski, H.K., 1992. *Vitamins and carotenoids as biological antioxidants. Research and Practical Experience Ed. 33. 4th Forum on Livestock Nutrition, 4 -5 November 1992. BASF Fine Chemicals.*
- Blair, T., Castell, J., Neil, S., D'Abramo, L., Cahu, C., Harmon, P., and Kehinde, 2003. Evolution of Microdiets Versus Live Feeds on Growth, Survival and Fatty Acid Composition of Larval Haddock. *Aquaculture*, 225:451-461.
- Blanchard, C.E., 1987. A scanning electron-microscope study of the development of the phyllopods in *Artemia*. In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia Research and its Application*, Vol. 1. Morphology, Systematics, Genetics, Radiobiology, Ecotoxicology, Universa Press, Wetteren, pp. 5-32.
- Bligh E., Dyer W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.

- Bórquez A., Hernández A., Dantagnan P. and Alcaino J., 2008. Incorporation of high levels of whole green white lupin (*Lupinus albus*) in extruded diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on muscle fatty acid composition. *Resource management. EAS, special pub. N° 37*, p. 105.
- British Government in July 1979. *Farm Animal Welfare Council (FAWC)*.
- Burk R. F., Trumble M. J. and Lawrence R. A., 1980. Rat hepatic cytosolic GSH-dependent enzyme protection against lipid peroxidation system. *Biochim. Biophys. Acta*, 618: 35-41.
- Caers M., Coutteau P., Sorgeloos P., 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture*, 170, 307-322.
- Castro T., Sandoval H., Castro A., Castro J., Castro G., De Lara R., Hernandez L. H., 2009. Monthly assessments of proteins, fatty acids and amino acids in *Artemia franciscana* cultivated in "Las Salinas de Hidalgo", state of San Luis Potosí, Mexico. *Aquaculture Nutrition* 15: 123 - 128.
- Cataudella e Carrada, 2001. *Un mare di risorse. UNIPROM*.
- Cataudella S. e Bronzi P., 2001. *Acquacoltura Responsabile. UNIMAR-UNIPROM*.
- Cejas J. R., Almansa E., Tejera N., Jerez S., Bolanos A., Lorenzo A., 2003. Effect of dietary supplementation with shrimp on skin pigmentation and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) alevins. *Aquaculture* 218, 457-469.
- Chandroo K. P., Duncan I. J. M., Moccia R. D., 2004. Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science*, 86: 225-250.
- Cho C. Y. (1990), *Fish nutrition, feeds, and feeding with special emphasis on salmonid aquaculture. Food Rev. Int.* 6:333-357.
- Cho C. Y. (1992), *Feeding systems for rainbow trout and other salmonids with reference to current estimates of energy and protein requirements. Aquaculture* 100:107-123.
- Cho C. Y., SLINGER S. J., BAYLEY H. S. (1982), *Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. Comp. Biochem. Physiol.* 73:25-41.
- Christiansen, R., Lie, O., Torrissen, O.J., 1995. Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin. *First-feeding fry. Aquac. Nutr.* 1, 189- 198.
- Christiansen, R., Torrissen, O.J., 1996. Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin. *Juveniles. Aquac. Nutr.* 2, 55- 62.
- Cognetti G., Sarà M., Magazzù G., 2002. *Biologia marina. Calderini*.
- Confagricoltura, 2006. *La filiera dell'acquacoltura, dossier "Qualità in campo"*.
- Coutteau, P., Brendonck, L., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of *Anostraca*. *Hydrobiologia* 234, 25-32.
- Coutteau, P., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1990. Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: *Artemia* as a case study. *J. World Aquacult. Soc.* 21 (1), 1-9.
- Czezuga B. (1979). Carotenoids in fish. XXII Changes in carotenoids in *Cyprinus carpio*. *Hydrobiologia* 65: 233-240.
- D'Agostino, A.S., 1980. The vital requirements of *Artemia*, physiology and nutrition. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp artemia*, Vol. 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology, Universa Press, Wetteren, pp. 55-82.
- Dabrowski K. (1991). Ascorbic acid status in high-mountain charr (*Salvelinus alpinus*) in relation to the reproductive cycle. *Env. Biol. Fishes* 31: 213-217.
- Dabrowski K. (1976). The content of ascorbic acid in organs of silver bream (*Vimba vimba*). *Pol. Arch. Hydrobiol.* 24: 569- 573.
- Dadgar S., Alimon A.R, Kamarudin M.S., Nafisi M. and Saad C.R.B., 2008. Iranian cottonseed meal as substitute for soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ration. *EAS, special pub. N° 37*, p. 173.

- Della Croce N., Cattaneo Vietti R., Danovaro R., 1997. *Ecologia e protezione dell'ambiente marino costiero*.
- Deufel I. (1965). *Pigmentierungsversuche mit Canthaxanthin bei Regenbogenforellen*. Arch. Fishereiwiss 16: 125-132.
- Dhert, P., Bombeo, R.B., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1992. A simple semi flow-through culture technique for the controlled super-intensive production of *Artemia* juveniles and adults. *Aquacult. Eng.* 11, 107-119.
- Dhert, Ph., Bombeo, R.B., Sorgeloos, P., 1993. The use of ongrown *Artemia* in nursery culturing of the tiger shrimp. *Aquacult. Int.* 1, 170-177.
- Dhont, J., Sorgeloos, P., 2002. Enrichment or bio-encapsulation techniques. In: Abatzopolous, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos, P. (Eds.), *ARTEMIA: Basic and applied biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 265-266.
- Dobbeleir, J., Adam, N., Bossuyt, E., Bruggeman, E., Sorgeloos, P., 1979. New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp Artemia. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture*, vol. 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 165-174.
- Duncan I. J. H., 1996. *Animal welfare defined in terms of feelings*. Acta Agriculturae Scandinavica. Section A. Animal Science, 27: 29-35.
- Ellis T., Scott A. P., Bromage N., North B., Porter M, 2001. What is stocking density?. *Trout news*, 32: 35-37.
- Eskelinen P. (1989). *Effects of different diets on egg production and egg quality of Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. *Aquaculture* 79: 275-281.
- Evjemo J.O., Olsen Y., 1999. Effect of food concentration on the growth and production rate of *Artemia franciscana* feeding on algae (T. iso). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 242 (1999) 273 -296.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department. *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome, 2009 The State of World Fisheries and Aquaculture 2008*.
- FAO, 1991. *Fish for food and development* . Roma. 1-17, 27-29.
- FAO, 2006. *Yearbook fishery statistics summary*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italy.
- Farkas T, Kariko K, Csengeri I. Incorporation of [14 C] acetate into fatty acids of the crustaceans *Daphnia magna* and *Cyclop sternus* in relation to temperature. *Lipids* 1981;16:418-22.
- Fernandez-Reiriz M.J., Labarta U., Albentosa M., Perez-Camacho A., 2006. Lipid composition of *Ruditapes philippinarum* spat: effect of ration and diet quality. *Comp. Biochem. Physiol. B* 144, 229-237.
- Figueiredo-Silva A. C., Corraze G., Borges P. and Valente L. M. P., 2010. Dietary protein/lipid level and protein source effects on growth, tissue composition and lipid metabolism of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). *Aquaculture nutrition* 16: 173-187.
- Figueiredo-Silva C., Corraze G., Borges P. and Valente L. M. P., 2010. Dietary protein/lipid level and protein source effects on growth, tissue composition and lipid metabolism of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). *Aquaculture nutrition* 16: 173-187.
- Fisheries and aquaculture department - FAO, 2008. *The state of world fisheries and aquaculture*. Fao, 1996. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper. NO. 361.
- Franchetti A. (1983), *Elementi di maricoltura* . Edagricole, Bologna.
- FSBI, 2002. *Fish Welfare. Briefing Paper 2* (www.fsbi.org.wk/docs/brief.welfare_ref.pdf).
- Giordani G., Melotti P. (1994), *Elementi di acquacoltura* , Edagricole, Bologna.
- Goodwin, T.W., 1984. *The Biochemistry of the Carotenoids*, vol. II. Animals, 2nd edn. Chapman & Hall, London, 224 pp.

- Gourthro et al., 1998 - C. Langdon, E. Onal, 1999 Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus Galloprovincialis*.
- Graeve M, Kattner G, Hagen W. Diet-induced changes in the fatty acid composition of Arctic herbivorous copepods: experimental evidence of trophic markers. *J Exp Mar Biol Ecol* 1994;182:97-110.
- Greaves K., Tuene S., 2001. The form and context of aggressive behaviour in farmed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 193: 139-147.
- Guillame J., Kaushic S., Bergot P., Metailler Eds (1999). *Nutrition et Alimentation des Poissons et Crustacés*. INRA Editions. Paris, p. 498.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine* Clarendon Press, Oxford, UK.
- Halver J. E. (Ed) (1989). *Fish Nutrition*. 2nd Edition, Academic Press, London, p. 798.
- Hardy R. W., Scott T.M. & Harrell L. W. (1989). Replacement of herring oil with menhaden oil, soybean oil, or tallow in the diets of Atlantic salmon raised in marine net-pens. *Aquaculture*, 65: 267-277.
- Harel M., Tandler A., Kissil G. W. & Applebaum S. (1993). The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream s. *aurata* females and the subsequent effects on egg composition and egg quality. *Isr. J. Aquacult./Bamidgeb* 44: 127.
- Hertzberg S., Partali V., Liaaen-jensen S., 1988. Carotenoids of *Mytilus edulis* (Edible Mussel). *Acta Chem, Scand. Ser. B* 42: 495-503.
- HU Y.-H., LIU Y.-J., TIAN L.-X., YANG H.-J., LIANG G.-Y. & GAO W., 2007. Optimal dietary carbohydrate to lipid ratio for juvenile yellowfin seabream (*Sparus latus*). *Aquaculture Nutrition* 13: 291-297.
- Huet M. (1986), *Textbook of fish culture (breeding and cultivation of fish)*, Fishing news books, Farnham, p. 440.
- Huntingford F., Adams C. Braithwait V. A., Kari S. Pottinger T. G., Sandø e D., Turnbull J. F., 2006. Current issue in fish welfare. *Journal of Fish Biology*, 68: 332-372.
- IAMC, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero. 2006 *Acquacoltura nella provincia di Messina*.
- IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movement EU Group, 2010. *Acquacoltura biologica. Regolamenti (CE) 834/2007. (CE) 889/2008; (CE) 710/2009. Storia, valutazione, interpretazione*.
- INRAN - Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione. www.inran.it
- Intriago, P., Jones, D.A., 1993. Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture* 113, 115-127.
- IZS Abruzzo e molise "G. Caporale", 2008. *Progetto pilota per la produzione di seme di molluschi di interesse commerciale. Modiolus barbatus (cozza pelosa). Regione Molise*.
- Kalinowski C. T, Robaina L. E., Fernández-Palacios H., Schuchardt D., Izquierdo M. S, 2005. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquaculture* 244, 223-231.
- Kanazawa A, Tokiwa S, Kayama M. Essential fatty acids in the diet of prawn. I. Effects of linoleic and linolenic acids on growth. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1977;43:1111-4.
- King, Hardy R.W. & Halver J.E. (1985). The effect of dietary vitamin E on the distribution α -tocopherol in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during ovarian maturation. In: *Salmonid Reproduction: an International Symposium* (R.N. Iwamoto & S. Sower, eds.), Washington Sea Grant program, University of Washington, Seattle, p. 111.
- Kotzamanis Y.P., Van Eys J., Taylor S., Lindley N., Andersen M., Petsas G., Atherinos L., Iliat V., Vatsos I.N, 2008. Evaluation of partial substitution of dietary fish meal by soybean meal supplemented with synthetic amino acids on growth performances, serum chemistry and histology of the juvenile european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Resource management. EAS, special pub. N° 37, September 2008, p. 336*.
- Labropoulou, M., Machias, A., Tsimenides, T., 1999. Habitat selection and diet of juvenile red porgy, *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). *Fish Bull.* 97, 495-507.

- Lanari D., D'Agaro E., Ballestrazzi R. (1995). Effect of dietary DP/DE ratio on apparent digestibility, growth and nitrogen and phosphorus retention in rainbow trout, *Onchorychus mykiss*. *Aquaculture Nutrition*, 1:105-110.
- Lanari D., D'Agaro E., Turri C. (1998). Use of nonlinear regression to evaluate the effects of phytase enzyme treatment of plant protein diets for rainbow trout (*Onchorychus mykiss*). *Aquaculture*, 161:345-356.
- Langdon C., Onal E., 1999. Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture*, 180, 283-294.
- Liebler, D.C., 1993. Antioxidant reactions of carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 691, 20- 31.
- Ludwig C. A. Naegel, 1999. Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae *Chaetoceros*. *Aquaculture Engineering*, 21: 45-59.
- Luquet P. & Watanabe T. (1986). Interaction nutrition-reproduction in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 2: 121-129.
- Luzzana U., Valfri F., Halver J. E., 1997. Breve rassegna sul ruolo di alcuni micronutrienti sulla riproduzione dei pesci e sui fabbisogni alimentari stimati per i riproduttori. *Rivista italiana di acquacoltura*, API.
- Lymbery P., 2002. *In too deep, the welfare of intensively farmed fish*. C/WS, WSPA.
- M. Guadagnino, 2010. Reti trofiche. www.biologiamarina.eu
- Mandell G. (1995), Sviluppo e valorizzazione dei prodotti dell'acquacoltura, *IL PESCE* n. 2, pp. 18-20.
- Manduzio H., Rocher B., Durand F., Galap C., Leboulenger F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ*, 2, 91-104.
- McEvoy L. A., Navarro J. C., Bell J. G., Sargent J. R., 1995. Autoxidation of oil emulsion during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture* 134: 101-112.
- Mikulin A.Y. & SOIN S.G. (1975). The functional significance of carotenoids in the embryonic development of teleosts. *J. Ichtyol.* 15: 749-759.
- Moreno VJ, De Moreno JEA, Brenner RR., 1979. Fatty acid metabolism of the calanoid copepod *Paracalanus pargus*: 2. Palmitate, stearate, oleate and acetate. *Lipids*;14:318-22.
- Mourente G. & Odriozola J.M. (1990). Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 8: 93- 101.
- Navarro JC, Amat F, Sargent JR. A study of the variations in lipid levels, lipid class composition and fatty acid composition in the first stage of *Artemia* sp. *Mar Biol* 1991;111:461-5.
- Navarro JC, Amat F. Effect of algal diets on the fatty acid composition of brine shrimp, *Artemia* sp., cysts. *Aquaculture* 1992;101:223-7.
- Nishigaki, I., Dmitrovskii, A.A., Miki, W., Yagi, K., 1994. Suppressive effect of astaxanthin on lipid peroxidation induced in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 16, 161- 166.
- Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from European Commission on General approach to fish welfare and to the concept of sentience in fish. *The EFSA Journal* (2009) 954, 1-26.
- Orban E., Di Leva G., Navigato T., Casini I., Marzetti A., Caproni R., 2002. Seasonal changes in meat content condition index and chemical composition of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chemistry* 77: 57-65.
- Ortuno J. O., Esteban M. A. and Meseguer J., 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 14, 145-156.
- Palozza P, 1998. Pro-oxidant actions of carotenoids in biological systems. *Nutr. Rev.* 257-265.
- Pedro Seixas, Paula Coutinho, Martiña Ferreira, Ana Otero, 2009. Nutritional value of the cryptophyte *Rhodomonas lens* for *Artemia* sp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 381 (2009) 1-9.
- Perry A., Rasmussen H., Johnson E. J., 2009. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 9-15.

- Pettersson A., Brännäs E., Pickova J., 2008. Effects of crude rapeseed oil on lipid composition in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Resource management. EAS, special pub. N° 37*, p. 524.
- Pillay T. V. R. (1993), *Aquaculture principles and practices*, Fishing news books . Oxford, p. 184.
- Pirini M., Manuzzi P., Pagliarani A., Trombetti F., Borgatti A.R., Ventrella V., 2007. Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, 147,616-626.
- Poli B. M., 2009. Farmed fish welfare. Sufering assessment and impact on product quality. *Italian journal of Animal Sciences*, 8: 139-160.
- Provasoli, L., Shiraishi, K., 1959. Axenic cultivation of the brine shrimp *Artemia salina*. *Biol. Bull.* 117,347-355.
- Ramanathan L., Das N. P. and Li Q. T., 1994. Studies on lipid oxidation in fish phospholipid liposomes. *Biol. Trace Element Res*, 40: 59 – 70.
- Reeve, M.R., 1963b. The filter-feeding of in *Artemia*. II. In suspensions of various particles. *J. Exp. Biol.* 40, 207-214.
- Riso P., Visioli F., Erba D., Testolin G., Porrini M., 2004. Lycopene and vitamin C concentration increase in plasma and Lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection. *European Journal of Clinical Nutrition* 58, 1350-1358.
- Sally A Campbell, 1970. The carotenoid pigments of *mytilus edulis* and *mytilus californianus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 32: 97-115.
- Sargent J., Henderson J. & Tocher D.R. (1989). *The Lipids*. In: *Fish Nutrition* (J.E. Halver, ed.), 2nd edition, Academic Press, San Diego CA, pp.153-218.
- Saroglia e Ingle, 1992. *Tecniche di acquacoltura*. Edagricole.
- Saroglia, M., Tibaldi, E., and Gennari, L., editors (1994). *Atti del convegno "Tecniche per la gestione e la minimizzazione del rischio in acquacoltura"*. Ischitella Gargano (FG) Italia.
- Schrehardt, A., 1987. Scanning electron microscopic study of the post-embryonic development of *Artemia*. In: *Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W., Jaspers, E. (Eds.), artemia Research and Its Application, Vol. 1. Morphology, Systematics, Genetics, Radiobiology, Ecotoxicology*, Universa Press, Wetteren, pp. 5-32.
- Serpen Arda, Capuano Edoardo, Fogliano Vincenzo and Gokmen Vural, 2007. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7676-7681.
- Soliman A.K., Jauncey K. & Roberts R.J. (1986). The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis niloticus* (Peters). *Aquaculture* 59: 197 - 208.
- Sorensen P.W., Hara T.J., Stacey N.E. & Goetz F.W. (1988). F prostaglandins function as potent stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biol. Reprod.* 39: 1039-1050.
- Sorgeloos, P., Baeza-Mesa, M., Bossuyt, E., Bruggeman, E., Dobbeleir, J., Versichele, D., et al., 1980. Culture of *Artemia* on rice bran: the conversion of a waste-product into highly nutritive animal protein. *Aquaculture* 21, 393-396.
- Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Lavina, E., Baeza-Mesa, M., Persoone, G., 1977. Decapsulation of *Artemia* cysts: A simple technique for the improvement of use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture* 12, 311-315.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Le´ger, P., Tackaert, W., Versichele, D., 1986. *Manual for the Culture and Use of Brine Shrimp Artemia in Aquaculture*. State University of Ghent, Belgium, 319 pp.
- Stephens, D.W., Gillespie, D.M., 1976. Phytoplankton production in the Great Salt Lake, Utah, and a laboratory study of algal response to enrichment. *Limnol. Oceanogr.* 21, 74-87
- Stevenson P., 2007. *Closed waters: the welfare of farmed Atlantic salmon, rainbow trout, Atlantic cod & Atlantic halibut*. C/WS, WSPA.
- Sugii K. & Kinumachi T. (1968). Distribution of vitamin E in a few species of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 34: 420-428.

- Tacon A.G.J. (1981). *Speculative review of possible carotenoid function in fish*. *Prog. Fish-Cult.* 43: 205-208.
- Takashi Maoka, 2009. *Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483 (2), pp. 191-195.
- Tekinay A.A., Ergün S., Güroy D., Bulut M. and Bilen S., 2008. *Effects of dietary hazelnut meal on growth performance and body composition in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reared in sea water*. *Resource management. EAS, special pub. N° 37*, p. 628.
- The State of World Fisheries and Aquaculture, 2008*. FAO Fisheries and Aquaculture Department.
- Tufarelli V., Laudadio V., 2006. *Il consumo di alimento nei pesci d'acquacoltura*. *Il Pesce*, n. 3.
- USDA, United State Department of Agriculture. www.usda.gov
- Vershinin Alexander, 1996. *Carotenoids in mollusca: approaching the functions*. *Comp. Biochem. Physiol.* 113, 63-71.
- Waagbø R., Sandnes K., Sandvina. & Lie Ø (1991). *Feeding three levels of n-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E to Atlantic salmon (*Salmo salar*). Growth and chemical composition*. *Fisk. Dir: Skr., Ser: Ernoering 1*: 51-63.
- Waldock MJ, Holland DL. *Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids*. *Lipids* 1984;19:332-6.
- Watanabe T, Kitajima CS, Fujita S. *Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review*. *Aquaculture* 1983;34:115-34.
- Zapata M., Rodriguez F., Garrido J., 2000. *Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C₈ column and pyridine-containing mobile phases*. *Marine Ecology progress series*, 195, 29-45.
- Zhang, P., Omaye, S.T., 2001. *Antioxidant and pro-oxidant roles for β -carotene, α -tocopherol and ascorbic acid in human lung cells*. *Toxicol. In Vitro* 15, 13-54.