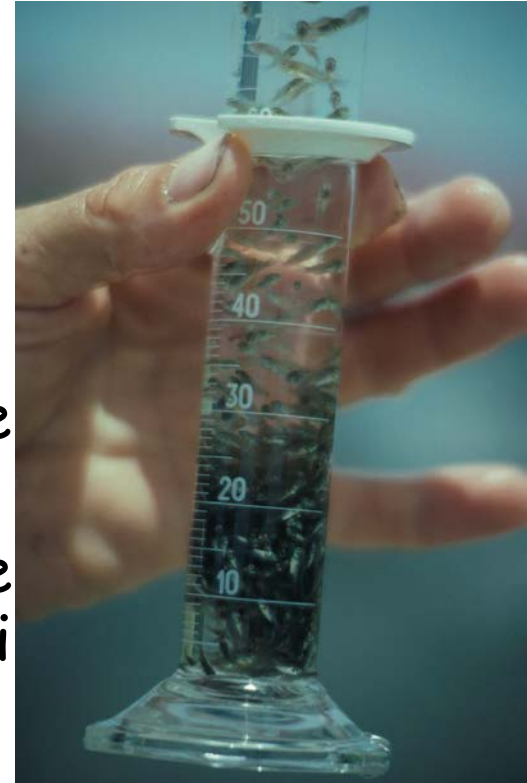


# Produzione di Avannotti in Allevamento Intensivo

## FASI

1. Produzione di uova
2. Trattamento delle uova per la schiusa
3. Produzione parallela di fitoplancton
4. Produzione parallela di zooplancton
5. Allevamento delle larve con mangime vivo (appastamento)
6. Svezzamento delle larve con mangime inerte e trasferimento degli avannotti di preingrasso



# Alimentazione larvale



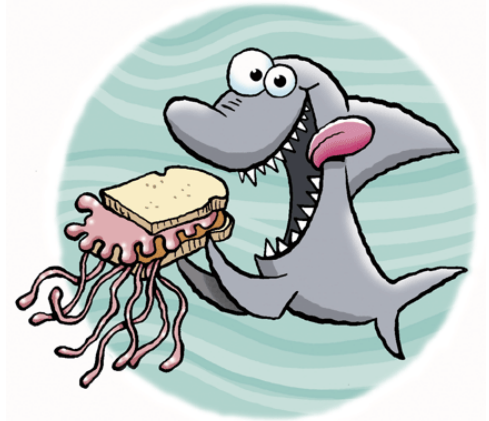
Le specie ittiche allevate in impianti intensivi sono adattate all'alimentazione prevalente o esclusiva con mangimi inerti, secchi o freschi

Tuttavia, la prima fase di sviluppo, che segue immediatamente la schiusa dell'uovo e dell'esaurimento delle riserve nutritive in esso presenti, richiede obbligatoriamente la disponibilità di prede vive (fanno eccezione alcune specie, come trote e carpe)

Questa fase di alimentazione, che deve fare affidamento su diete a base di prede vive è detta in gergo **appastamento**

# Alimentazione larvale

## APPASTAMENTO



L'importanza delle prede vive durante tale fase è legata a due aspetti:

1. L'industria mangimistica non è al momento in grado di produrre alimenti in grado di assicurare un perfetto sviluppo alle larve
2. La motilità delle prede è un requisito indispensabile per lo sviluppo dell'istinto predatorio che spinge alla prensione dell'alimento

# Alimentazione larvale

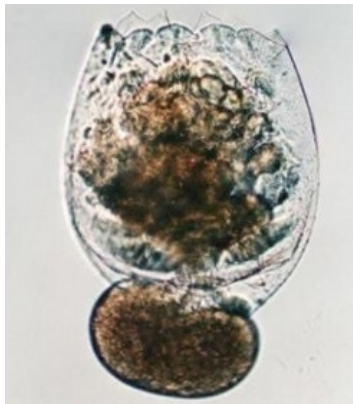
## APPASTAMENTO

Attualmente le prede vive universalmente utilizzate in acquacoltura intensiva nella fase di appastamento di larve di teleostei e crostacei sono due organismi zooplanctontici:

1. Il rotifero *Brachionus plicatilis*
2. I nauplii del crostaceo *Artemia salina*

Le caratteristiche dimensionali e nutrizionali, la relativa semplicità di reperimento e mantenimento li rendono ideali allo scopo.

Tuttavia, il loro utilizzo è limitato alle prime fasi di sviluppo in quanto rappresentano comunque un costo notevole.



# Alimentazione larvale

## Caratteristiche biologiche del fitoplancton

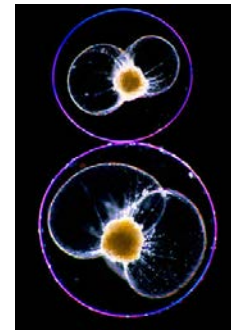
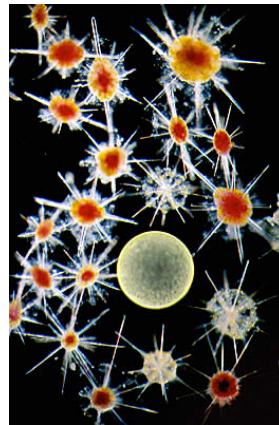
Lo sviluppo delle popolazioni algali è correlato alla disponibilità dei fattori che permettono la fotosintesi: luce, anidride carbonica, minerali

In natura le popolazioni fitoplanctoniche presentano un andamento oscillatorio caratterizzato da:

fase di crescita esponenziale

fase di stabilizzazione

fase di declino



La fase di declino è dovuta sia al fatto che una ricca popolazione algale favorisce l'incremento dei predatori delle stesse, sia al peggioramento delle condizioni ambientali che diminuisce l'efficienza della fotosintesi.

# Alimentazione larvale

## Coltura del fitoplancton

Al fitoplancton appartengono vari generi di microalghe che possono essere utilizzate in acquacoltura sia direttamente come alimento (per stadi larvali di gamberi, orate, cernie, cefali, molluschi, ecc.) sia per la produzione e l'arricchimento delle proprietà nutrizionali dello zooplancton.

# Alimentazione larvale

## Coltura del fitoplancton

La produzione di microalghe prevede il mantenimento delle colture monocellulari specifiche (ceppi) in contenitori pirex da 15-250 ml di volume, in condizioni che non favoriscono eccessivamente le duplicazioni cellulari. Il mantenimento si ottiene per inoculi successivi al 10% di volumi di acqua filtrata ad 1 mm, sterilizzata in autoclave e arricchita con "mezzo Walne" e preparati vitaminici.

# Alimentazione larvale

## Coltura del fitoplancton

Per la produzione di microalghe sono utilizzati volumi crescenti in palloni pyrex (2-10 litri), in sacchi in pvc o polietilene trasparenti (25-300 litri) e, nel caso di produzioni massive, in vasche di grande volume, poste all'esterno o sotto serre di tipo agricolo. Qui si creano le condizioni migliori per la crescita della popolazione cellulare, ovvero temperature comprese tra 20-25°C, salinità 25-30 ppt, pH 8.0-8.6, ed intensità di luce di almeno 2000 lux per 24 h/giorno.

L'acqua viene sterilizzata con ipoclorito di sodio (5 ppm) tamponata con tiosolfato di sodio ed arricchita con mezzo Walne e preparato vitaminico.

L'inoculo si esegue con 10-20% di coltura matura ( $3-10 \times 10^6$  cellule/ml).



# Alimentazione larvale

## Coltura del fitoplancton

In condizioni controllate occorre mantenere le colture algali in fase di crescita stabile.

Il mezzo colturale è l'acqua di mare.

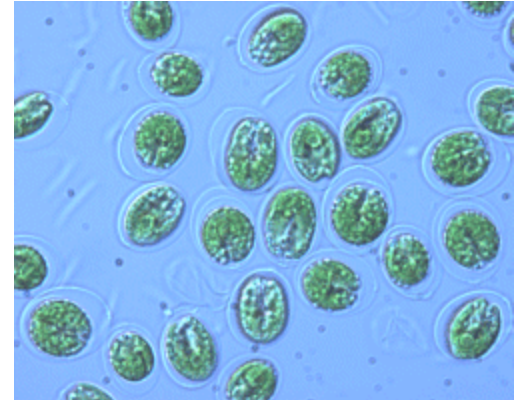
È fondamentale il monitoraggio di alcuni parametri, come:

**Turbolenza**, necessaria per mantenere omogeneo il substrato colturale, favorire l'ossigenazione e la distribuzione di  $CO_2$ , evitare la sedimentazione e la stratificazione cellulare, migliorare l'esposizione alla luce;

**$CO_2$** , indispensabile per la fotosintesi e per l'azione tampone sulle variazioni del pH (vicino alla neutralità o poco superiore).



# Alimentazione larvale



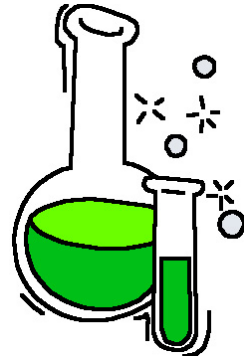
## Coltura del fitoplancton

### 1. Isolamento delle colture algali pure

Tre tecniche:

- **Sub-culture ripetute:** diluizioni ripetute di piccoli volumi di acqua contenenti cellule differenti, fino ad ottenerne una singola cellula per volume. Individuazione del volume contenente la specie che si intende coltivare.
- **Isolamento tramite pipetta capillare:** osservazione allo stereomicroscopio di popolazioni algali miste e prelievo tramite micropipetta sterile delle cellule che interessano.
- **Piastramento:** semina tramite ansa sterile di una goccia del campione su piastra contenente substrato solido. Incubazione per 4-8 gg. Individuazione della colonia algale e nuova semina. Si ripete fino all'isolamento.

# Alimentazione larvale



## Coltura del fitoplancton

### 2. Allestimento di un ambiente di crescita ottimale

La curva di crescita degli organismi unicellulari in laboratorio presenta quattro fasi di sviluppo:

1. Lag fase o fase di latenza
2. Fase di crescita logaritmica
3. Fase stazionaria (plateau), in cui il numero di cellule morte si equivale e durante la quale il substrato colturale si modifica per depauperamento dei nutrienti e accumulo di cataboliti tossici
4. Fase di declino, in cui le cellule hanno perso definitivamente la capacità replicativa.

# Alimentazione larvale

## Coltura del fitoplancton

### 2. Allestimento di un ambiente di crescita ottimale

Il mantenimento di ceppi puri avviene in volumi di 10-15 ml in mezzi liquidi (provette) o solidi (piastre di Petri).

Per tale fine non è necessaria una crescita rapida, per cui non è richiesta insufflazione di aria e  $CO_2$ .

Tutte le fasi di coltivazione del fitoplancton richiedono la massima sterilità, per cui tutti gli strumenti e contenitori devono essere previamente autoclavati e mantenuti in ambienti il più possibile asettici.



# Alimentazione larvale

## Coltura del fitoplancton

### 2. Allestimento di un ambiente di crescita ottimale

I brodi nutritivi contengono sempre sali, oligoelementi, vitamine, chelanti.

Devono essere sempre sterili

#### Terreno di Walne

Per litro di H<sub>2</sub>O si addiziona un cc della seguente soluzione:

- 1 litro H<sub>2</sub>O distillata
- 45 g sale bisodico dell'EDTA
- 33 g di acido borico
- 100 g nitrato di sodio
- 20 g biidrogenato di sodio
- 1 g cloruro di ferro idrato
- 0.5 g cloruro di manganese idrato
- 1 cc della seguente soluzione: 1dl H<sub>2</sub>O distillata, 2 g cloruro di Zn, 2 g cloruro di Co idrato, 1 g ammonio eptamolibdato, 2 g solfato di Cu
- 0.1 cc della seguente soluzione: 1 dl H<sub>2</sub>O distillata, 10 mg vit B<sub>12</sub>, 200 mg vit. B<sub>1</sub>

# Alimentazione larvale

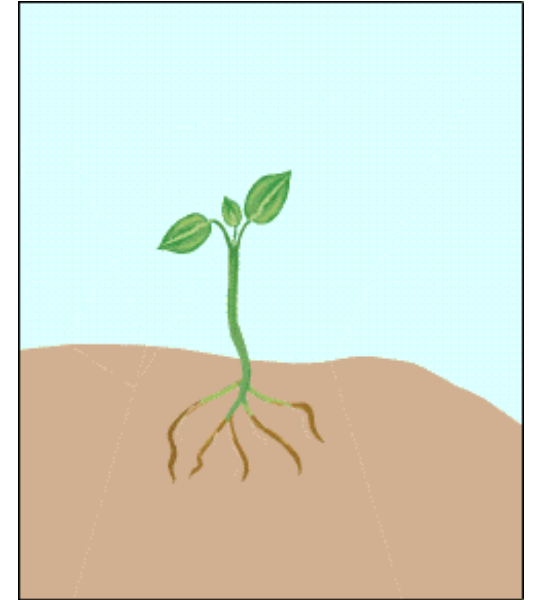
## Coltura del fitoplancton

### 2. Allestimento di un ambiente di crescita ottimale

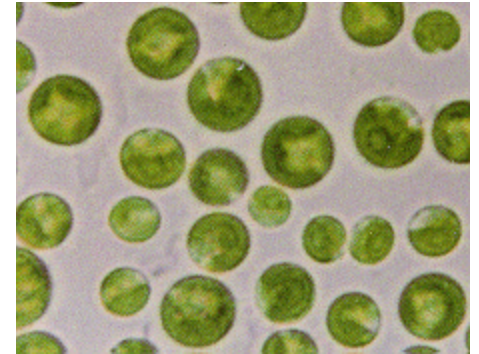
Le colture vengono mantenute a temperatura di 18-20°C, con luce fluorescente fredda a bassa densità (max. 1000 lux).

### Replicazione del fitoplancton

Occorre mantenere le colture sempre in fase di crescita, per cui i ceppi vengono replicati inoculando 1/5 delle colture precedenti in nuove provette contenenti acqua di mare arricchita e sterilizzata in autoclave (120 °C x 20 min.) o, se coltivate su terreni solidi, prelevando una piccola quantità con un'ansa di Henle e strisciandola su una nuova piastra opportunamente allestita.



# Alimentazione larvale



## Colture massive del fitoplancton

Sono costituite da popolazioni algali ad elevata concentrazione

Le tecniche variano in relazione all'uso della biomassa algale

Si effettuano diversi passaggi in volumi crescenti:

- Inoculum dei ceppi di mantenimento in beute da 500-1000 ml
- Passaggio in matracci di pirex da 5-10 l
- Passaggio in buste di polietilene di 25-30 l

Tali passaggi portano ad una riduzione dei tempi di crescita delle colture che vengono così mantenute sempre in fase di crescita logaritmica.

# Alimentazione larvale

## Colture massive del fitoplancton

Raggiunti i volumi di utilizzo, le colture possono essere mantenute con due metodiche differenti:

### 1. Mantenimento in semi-continuo

Quando la concentrazione algale è  $10^6$ /ml si preleva il 20-30% della coltura e si riporta a volume aggiungendo acqua di mare arricchita

**Vantaggi:** una volta avviata, può protrarsi per lunghi periodi

**Svantaggi:** è più soggetta a inquinamenti

### 2. Mantenimento in discontinuo

Si porta a massima concentrazione la coltura e la si utilizza in toto

**Vantaggi:** più semplice e garantisce maggiore purezza della coltura

**Svantaggi:** rigorosa programmazione delle colture in serie



# Alimentazione larvale

## Camere fito-zooplanctoniche

Sono ambienti appositamente costruiti nell'ambito degli allevamenti intensivi per realizzare le colture fito- e zooplanctoniche e devono rispondere ai seguenti requisiti:

- Essere provviste di impianti di illuminazione a luce solare o fluorescente fredda
- Essere termoregolate costantemente a 18-22°C
- Avere una rete di distribuzione per l'aria e per la CO<sub>2</sub>
- Avere un impianto di distribuzione dell'acqua di mare

# Alimentazione larvale

Trattamento dell'acqua di mare da utilizzare per le colture

Decantazione

Filtraggio meccanico tramite passaggio attraverso filtri con maglie di diametro decrescente da 50 a 1  $\mu\text{m}$

Sterilizzazione in autoclave (piccoli volumi) o con raggi ultravioletti



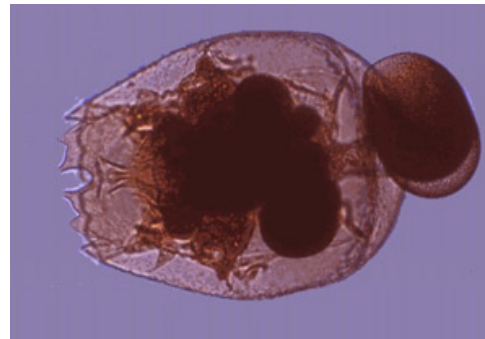
# Alimentazione larvale

## Caratteristiche biologiche del rotifero *Brachionus plicatilis*

I rotiferi sono tra i Metazoi più piccoli. Si ritrovano maggiormente in acque dolci, ma anche in quelle salate, salmastre e nei terreni umidi.

Alcuni sono sessili e secernono a livello del piede una sostanza vischiosa che rende possibile l'ancoraggio.

I rotiferi natanti si spostano molto lentamente per le correnti sviluppate dai movimenti delle ciglia che circondano la bocca. Tali correnti servono anche per convogliare l'acqua alla regione orale permettendo la cattura delle particelle in sospensione.



# Alimentazione larvale

## Caratteristiche biologiche del rotifero *Brachionus plicatilis*

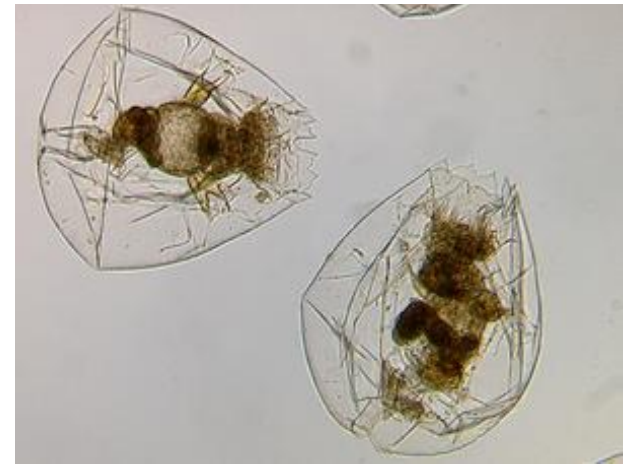
*B. plicatilis* è pelagico, filtratore, tipico abitatore di acque salmastre.

Alla nascita misura 80  $\mu\text{m}$ , da adulto 140-240  $\mu\text{m}$ .

Come molti rotiferi, presenta un ciclo riproduttivo caratterizzato dall'alternanza di due modalità riproduttive:

1. Fase amittica

2. Fase mittica



# Alimentazione larvale

## Caratteristiche biologiche del rotifero *Brachionus plicatilis*

### 1. Fase amittica:

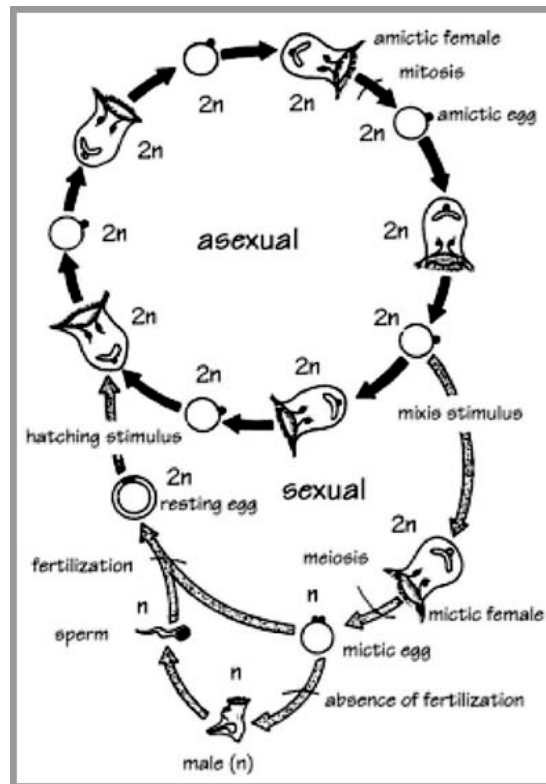
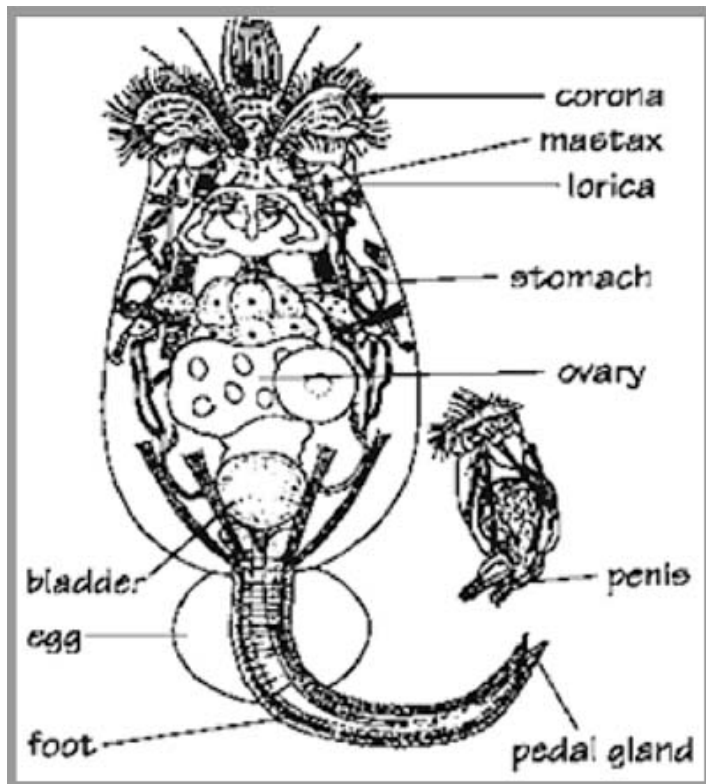
Partenogenetica, si realizza in condizioni ambientali favorevoli; le femmine, dette amittiche, producono uova dal guscio sottile da cui nascono altre femmine amittiche. La riproduzione è molto rapida.

### 2. Fase mittica:

Sessuata, si realizza in condizioni sfavorevoli. Le femmine amittiche depongono uova da cui origina un altro tipo di femmine dette mittiche che produrranno uova da cui nasceranno maschi. Dall'accoppiamento dei maschi con le femmine mittiche originano uova dal guscio spesso, dette cisti, che possono sopravvivere anche in condizioni estreme.

# Alimentazione larviale

## Caratteristiche biologiche del rotifero *Brachionus plicatilis*



# Alimentazione larvale



## Aspetti vantaggiosi del rotifero *B. plicatilis*

Dimensioni idonee per le larve di teleostei e crostacei.

Scarsa mobilità (predazione facile e stimolante).

Riproduzione partenogenetica (rapido accrescimento).

Adattabilità alle variazioni ambientali, come salinità, temperatura, pH, ossigeno, che favorisce il mantenimento in cattività.



# Alimentazione larvale

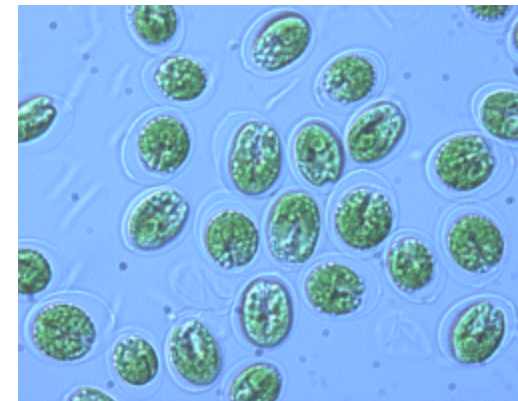
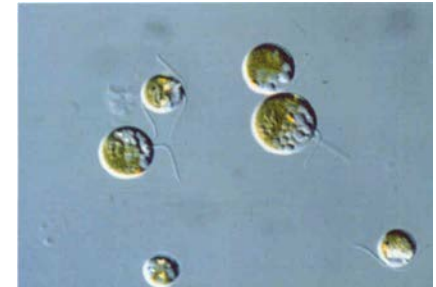
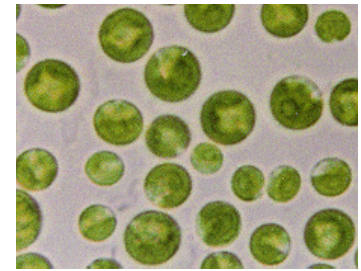
## Allevamento del rotifero *B. plicatilis*

- Temperatura sui 28 °C
- Salinità 18-20 ‰
- pH ~ 7

Le colture si sviluppano in buste di 25-35 litri, abbondantemente aerate per evitare cali di ossigeno e l'ammassarsi dei rotiferi sul fondo

L'alimentazione si basa su alghe unicellulari appartenenti ai generi *Chlorella*, *Isochrysis*, *Dunaliella*, *Tetraselmis*.

L'uso di lieviti, come *S. cerevisiae*, si è rivelato inadatto non per il rotifero, ma per l'assenza degli ac. grassi poliinsaturi indispensabili alle larve.





# Alimentazione larvale

## Camere fito-zooplanctoniche

Se le esigenze ecologiche delle specie algali allevate sono **compatibili** con quelle del *Brachionus plicatilis*, si può inoculare il rotifero prelevato in natura in alcune buste contenenti popolazioni algali ben avviate

Se le esigenze biologiche algali sono **non compatibili** col rotifero, le due colture verranno sviluppate in buste differenti e quella contenente i rotiferi saranno inoculate quotidianamente con le quantità di cellule algali necessarie al loro sostentamento

# Alimentazione larvale



## Appastamento

2<sup>a</sup> fase di appastamento con nauplii e metanauplii di *Artemia salina*

Sostituiscono e integrano i rotiferi in quanto risultano di dimensioni troppo ridotte per le larve di 20-25 gg

I nauplii di *A. salina* misurano 240-400  $\mu$

Se provengono da aree salmastre non inquinate forniscono i giusti nutrienti per la crescita larvale

Anche l'*Artemia* in condizioni sfavorevoli produce forme cistiche molto resistenti

Le cisti vengono raccolte, essiccate, inscatolate e commercializzate

Possono essere stoccate anche per anni mantenendo inalterate le caratteristiche

# Alimentazione larvale

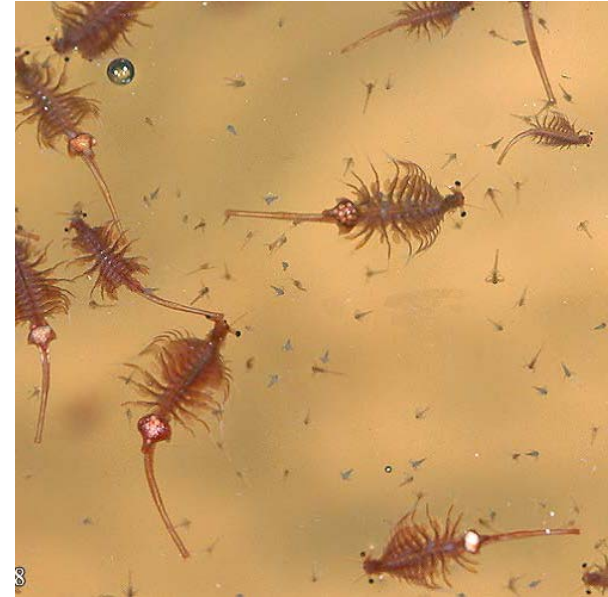
## Appastamento

2<sup>^</sup> fase di appastamento con nauplii e metanauplii di *Artemia salina*

I nauplii hanno caratteristiche dimensionali e di motilità ottimali per le larve di qualche giorno

Le caratteristiche nutrizionali, già buone, possono essere ulteriormente migliorate aggiungendo all'acqua di incubazione integratori studiati per essere ingeriti dai nauplii subito dopo la schiusa per arricchirli di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena (20:5 w3 e 22:6 w3)

Se si vogliono somministrare prede vive di dimensioni maggiori, si può far crescere su substrato algale il nauplio che dopo 2-3 gg si trasforma in metanauplio

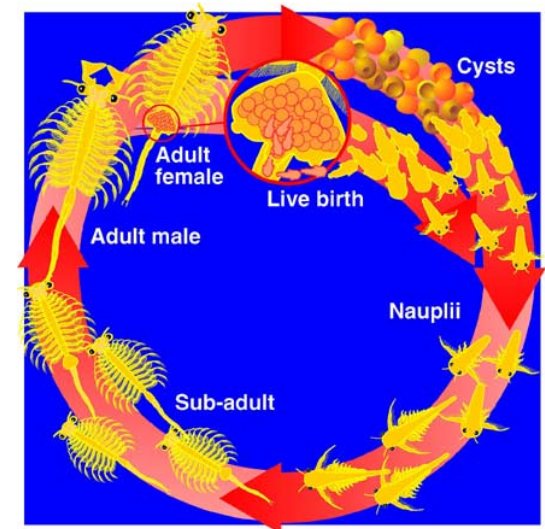


# Alimentazione larvale

2<sup>^</sup> fase di appastamento con nauplii e metanauplii di *Artemia salina*

Le cisti vanno mantenute in ambienti freschi e asciutti

Schiudono ponendole in acqua di mare filtrata, tuttavia le percentuali di schiusa ottimali si ottengono sottoponendo le cisti al processo di **decapsulazione**



# Alimentazione larvale

Appastamento

2<sup>^</sup> fase di appastamento con nauplii e metanauplii di *Artemia salina*

## Fasi della decapsulazione

### 1. Idratazione

Si pongono le cisti in un volume d'acqua sufficiente ad impedire l'ammassarsi delle cisti (circa 1,2 litri/100 g di cisti).

La durata è in funzione della temperatura e oscilla tra le 2 e le 5 ore)

### 2. Decapsulazione

Si ottiene aggiungendo all'acqua una soluzione di cloro e soda (circa 0.6 litri di ipoclorito di Na al 13% e 14 g di soda/100 g di cisti) e si agita vigorosamente insufflando aria. Dopo poco le cisti cambiano da bruno scuro ad arancione.

I tempi di esposizione devono essere esatti



# Alimentazione larvale

## Fasi della decapsulazione

### 3. Neutralizzazione dei residui clorosi e lavaggio

Si mettono le cisti in recipienti cilindrici traforati (maglie < 150  $\mu$ ) e si aggiunge abbondante acqua che allontana la maggior parte del Cl.

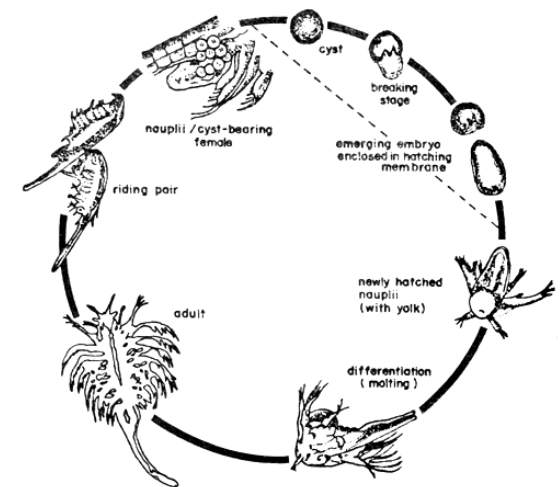
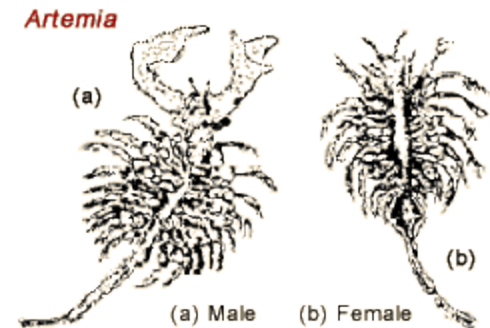
Si aggiunge bisolfito di Na che neutralizza il Cl assorbito dalle cisti.

Nuovo lavaggio fino a scomparsa di ogni odore di Cl.

Decantazione delle cisti in un secchio di acqua dolce: le cisti decapsulate affondano mentre i gusci galleggiano.

### 4. Incubazione (~ 20 ore)

Avviene in grandi contenitori di vetroresina contenenti acqua salina al 25-28 ‰, a 28°C, con notevole aerazione, illuminazione di 1000-1500 lux e pH non inferiore a 8 (la densità non deve superare i 10 g di cisti per litro).



# Alimentazione larvale

## Nuovi progressi nell'alimentazione larvale

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 nel mercato. Per ovviare a questo problema, si sta cercando di sostituire almeno parzialmente l'artemia con copepodi e alimenti artificiali per anticipare l'età dello svezzamento e diminuire i costi di produzione legati alla coltivazione e dell'allevamento di fito- e zooplancton.