

T. suecica da parte di *M. galloprovincialis* è maggiore di quella di *I. galbana* (dati non riportati). Alla luce di questi risultati possiamo ragionevolmente ritenere che delle due specie fitoplanctoniche considerate *T. suecica* potrebbe essere con successo utilizzata come "vettore" di sostanze esogene da somministrarsi ai molluschi allo scopo di favorirne lo sviluppo.

Bibliografia

- ALBENTOSA M., PÉREZ-CAMACHO A., LABARTA U., FERNÁNDEZ-REIRIZ M.J. (1996) - Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture*, **148**: 11-23.
- BLIGH E.G., DYER W.J. (1959) - A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**: 911-917.
- BROWN M.R., MULAR M., MILLER I., FARMER C., TRENNERY C. (1999) - The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J. Appl. Phycol.*, **11**: 247-255.
- DUBOIS M., GILLIES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. (1956) - Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.
- GORNALL A.G., BARDAWILL G.S., DAVID M.M. (1949) - Determination of serum proteins by means of the reaction biuret. *J. Biol. Chem.*, **177**: 751-766.
- KREEGER D.A. (1993) - Seasonal patterns in the utilization of dietary protein by the mussel *Mytilus trossulus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **95**: 215-232.
- LEHANE C., DAVEMPORT J. (2002) - Ingestion of mesozooplankton by three species of bivalve: *Mytilus edulis*, *Cerastoderma edule* and *Aequipecten opercularis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **82**: 615-619.

G. CARUSO, M. MANCUSO, V. MICALE, U. MUGLIA¹, P. CARBONARA², L. GENOVESE

CNR - Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC), Sezione di Messina, Spianata S. Raineri, 86 - 98122 Messina, Italia.

¹Dip. di Morfologia, Biochimica, Fisiologia e Produzioni Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Messina, Polo Universitario Annunziata, Italia.

²COISPA Tecnologia e Ricerca, Bari, Italia.

VALUTAZIONE DEGLI ENZIMI DIGESTIVI NELL'ONTOGENESI DEL TRATTO GASTRO-INTESTINALE DI LARVE DI *PAGELLUS ERYTHRINUS* (LINNEO, 1758)

EVALUATION OF DIGESTIVE ENZYMES DURING THE ONTOGENESIS OF THE GASTROINTESTINAL TRACT IN *PAGELLUS ERYTHRINUS* (LINNEO, 1758) LARVAE

Abstract

A quali-quantitative study of enzymes occurring during the ontogenesis of digestive tract (total proteases, pepsin, trypsin, chymotrypsin, carboxypeptidases A and B, amylase, lipase and elastase) was carried out in *Pagellus erythrinus* larvae in order to follow the digestive processes during the larval development. Enzyme levels increased with age, with changes in the relative contribution of acid and alkaline proteases that well reflected the morphological differentiation.

Key-words: digestion, enzymes, *Pagellus erythrinus*, larvae.

Introduzione

Durante il primo mese di vita, il tratto gastro-intestinale delle larve subisce profonde modifiche sia morfologiche che funzionali (Sarasquete *et al.*, 1993). Tali modifiche sono generalmente associate con la secrezione di enzimi specifici e comportano inizialmente un cambiamento del comportamento nutrizionale da endogeno ad esogeno e, successivamente, il passaggio da un'alimentazione a base di prede vive ad una a base di mangimi inerti (svezzamento). L'analisi quali/quantitativa degli enzimi digestivi, correlata con l'osservazione istologica durante l'ontogenesi del tratto gastrointestinale, è di fondamentale importanza per la messa a punto di opportuni protocolli nutrizionali.

Uno studio sui primi stadi di sviluppo di *Pagellus erythrinus*, specie innovativa con una grande potenzialità nel settore produttivo, è stato condotto al fine di ampliare le conoscenze, tuttora poco disponibili, sull'allevamento larvale e l'ontogenesi dell'apparato digerente.

Materiali e metodi

Le larve sono state allevate secondo il metodo "pseudo-green water" (Papan-droulakis *et al.*, 2001), introducendo nel mezzo di coltura *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica*. A partire dal giorno 3 dopo la schiusa (DAH) sono stati somministrati rotiferi (*Brachionus plicatilis*; ceppo *small*; lunghezza loricata: 129 µm), arricchiti nel contenuto in acidi grassi altamente insaturi mediante emulsioni commerciali (DHA SELCO). La somministrazione di naupli di *Artemia* arricchiti è

iniziata al giorno 28 mentre quella di alimento artificiale (\emptyset 544 μ m) al giorno 35. I cambiamenti nella dieta sono stati introdotti gradualmente, con fasi di sovrapposizione. Durante l'allevamento larvale (densità iniziale: 110 larve l⁻¹), il ricambio d'acqua era pari a 1.5 volumi giorni⁻¹, la temperatura nell'intervallo 8.5-20 °C, il fotoperiodo naturale.

Da un pool di 100 larve, prelevate a digiuno, sono stati raccolti campioni del tratto digestivo, oggetto di determinazione enzimatica. Sono state selezionate 9 classi d'età: 0 giorni (alla schiusa), dopo 3, 6, 10, 17, 24, 31, 38 fino a 45 giorni dalla schiusa (days after hatching, DAH).

I campioni, diluiti in rapporto di 1:5 (peso/volume) in acqua distillata fredda (Ribeiro *et al.*, 1999) ed omogeneizzati, sono stati centrifugati a 3000 rpm \times 20 minuti. L'estratto ottenuto è stato saggiato per il contenuto in proteasi totali, pepsina, tripsina, chimotripsina, carbossipeptidasi A e B, amilasi e lipasi (Caruso *et al.*, 2001). Tutti i valori sono stati infine riportati come attività specifiche (U/mg proteina), rispetto al contenuto in proteine. I dati sono stati sottoposti a Spearman test.

Per lo studio morfologico sono state condotte osservazioni istologiche a partire dal giorno 0 fino al 50°. Le larve, sacrificate con dose letale di MS-222, sono state fissate in liquido di Bouin, disidratate e incluse in paraffina e metilmetacrilato. Sezioni longitudinali e trasversali di 5 μ m sono state colorate con ematossilina/eosina ed osservate al microscopio ottico. Sono state sacrificate 10 larve da 0 al 20° giorno; 6 larve ogni 2 giorni dal 20° al 30° ed infine 6 larve ogni 3 gg dal 30 al 50° giorno.

Tab. 1 - Contenuto in enzimi digestivi (media \pm deviazione standard) misurato in larve di *Pagellus erythrinus* (n=100). I valori ottenuti sono espressi in U/mg proteina per le proteasi ed in U/ml per amilasi e lipasi.

Digestive enzymes (mean \pm standard deviation) measured in *Pagellus erythrinus* larvae (n=100). Values obtained are expressed as U/mg protein for all proteases and U/ml for amylase and lipase.

Età (gg)	Pepsina	Tripsina	Chimotripsina	Carbossipept. A	Carbossipept. B	Amilasi	Lipasi
0	0.27 \pm 0.00	0.15 \pm 0.00	0.19 \pm 0.03	0.06 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
3	0.34 \pm 0.01	0.16 \pm 0.00	0.22 \pm 0.01	0.06 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
6	0.42 \pm 0.01	0.17 \pm 0.00	0.29 \pm 0.01	0.07 \pm 0.00	0.04 \pm 0.03	0.07 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
10	0.65 \pm 0.00	0.19 \pm 0.01	0.32 \pm 0.04	0.07 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	0.15 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00
17	0.68 \pm 0.01	0.21 \pm 0.05	0.45 \pm 0.01	0.08 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00	0.15 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00
24	1.01 \pm 0.00	0.21 \pm 0.07	0.69 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.09 \pm 0.00	0.17 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00
31	2.11 \pm 0.07	0.22 \pm 0.01	0.72 \pm 0.03	0.09 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.17 \pm 0.00	7.35 \pm 0.45
38	2.35 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02	0.99 \pm 0.02	0.13 \pm 0.08	0.10 \pm 0.01	0.26 \pm 0.00	7.35 \pm 0.23
45	2.80 \pm 0.01	0.34 \pm 0.00	1.78 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01	0.11 \pm 0.00	1.24 \pm 0.03	9.80 \pm 0.13

Risultati

Dalla schiusa al 45° giorno le larve sono cresciute da 2.5 a 15 mm di lunghezza e da 0.07 a 2.48 g di peso. Lo sviluppo corporeo è stato affiancato dal differenziamento morfologico del tratto digerente e dei suoi organi accessori (fegato, pan-

creas e cistifellea), già evidente all'inizio dell'alimentazione esogena (3-4 DAH). La Tab. 1 riporta i valori misurati di attività enzimatiche specifiche. In larve da 0 a 17 gg è stata osservata per le proteasi totali una maggiore attività ai pH alcalini (Fig. 1). Il rilevamento in uno stadio precoce di sviluppo di un dotto pancreatico (non mostrato in Figura), attraverso il quale vengono immessi nel lume intestinale tripsina, chimotripsina, elastasi e carbossipeptidasi (enzimi attivi a pH alcalino), supporta tale risultato. Il riscontro di granuli di zimogeno a livello delle cellule pancreatiche esocrine è peraltro indicativo di una attiva funzionalità enzimatica. L'aumento dei livelli di proteasi acide osservato dal 24 al 31° giorno trova conferma nel rilevamento di ghiandole gastriche, la cui comparsa risale al 28° giorno (non mostrato in figura). Una chiara corrispondenza fra struttura morfologica e funzionalità metabolica non si riscontra invece per i lipidi, il cui assorbimento è già evidente nell'intestino anteriore a partire dal 6° giorno, mentre non si misurano a tale data quantità di lipasi rilevabili all'analisi biochimica.

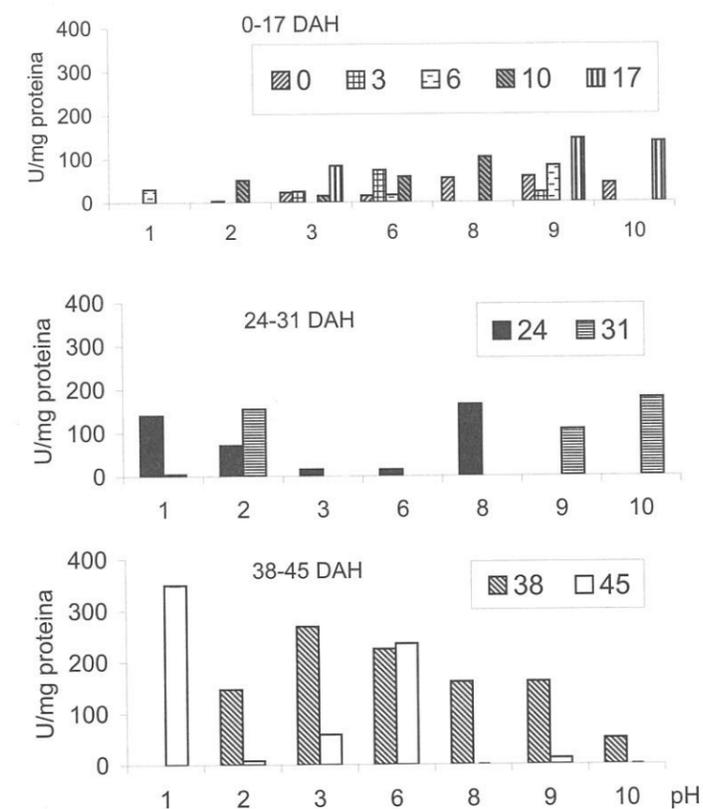


Fig. 1 - Attività proteasica totale di larve di *Pagellus erythrinus*. Valori misurati a diverso pH (1-10). Total proteolytic activity of *Pagellus erythrinus* larvae. Values measured in a pH range 1-10.

Conclusioni

Lo studio ha consentito di ampliare le conoscenze sullo sviluppo del corredo enzimatico di *P. erythrinus* durante i primissimi stadi larvali. L'ampio range di enzimi, rilevato in esemplari a digiuno, suggerisce una buona capacità digestiva larvale indipendentemente dall'ingestione di cibo. L'elevato contenuto di proteasi acide, dal 24 al 31° giorno, è strettamente collegato allo sviluppo delle ghiandole gastriche sotto-mucose; livelli elevati di tripsina e chimotripsina sono stati invece osservati già nei primi stadi di sviluppo, come riportato da Lauff and Hofer (1984). Da un confronto con gli adulti della stessa specie (Caruso e Genovese, 2000) è risultato che le larve presentavano un contenuto di amilasi 4 volte più alto, mentre è risultato ridotto il contenuto di lipasi. L'aumento dei livelli enzimatici con lo sviluppo, come confermato dal test di Spearman ($r=0.999$, $P<0.01$) e come riscontrato in altre specie (Govoni *et al.*, 1986), può essere attribuito al pieghettamento dell'epitelio intestinale che rende disponibile una maggiore superficie per l'assorbimento dei nutrienti.

Bibliografia

- CARUSO G., GENOVESE L. (2000) - Osservazioni sugli enzimi digestivi di differenti specie di Sparidi. *Biol. Mar. Medit.*, **7** (1): 621-623.
- CARUSO G., GENOVESE L., MICALE V., SPEDICATO M.T., MANCUSO M. (2001) - Preliminary investigation of the digestive enzymes in *Pagellus erythrinus* (Linneo 1758) larvae. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.*, **34**: 265-268.
- GOVONI J.J., BOEHLERT G.W., WATANABE Y. (1986) - The physiology of digestion in fish larvae. *Env. Biol. Fish.*, **16** (1-3): 59-77.
- LAUFF M., HOFER R. (1984) - Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, **37**: 335-346.
- PAPANDROULAKIS N., DIVANACH P., ANASTASIADIS P., KENTOURI M. (2001) - The pseudo-green water technique for intensive rearing of sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture Int.*, **9**: 205-216.
- RIBEIRO L., ZAMBONINO-INFANTE J.L., CAHU C., DINIS M.T. (1999) - Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis* (Kaup 1858). *Aquaculture*, **179**: 465-473.
- SARASQUETE M.C., POLO A., GONZALES DE CANALES M.L. (1993) - A histochemical and immunochemical study of digestive enzymes and hormones during larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L. *Histochem. J.*, **25**: 430-437.

Lo studio è stato condotto con contributo del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (L.N. 41/82, IV e V Piano triennale).

L. CILENTI, P. BREBER

Facoltà d'Agraria, Università degli Studi di Foggia, c/o ISMAR-CNR, Sezione Coste e Lagune,
Via Pola, 4 - 71010 Lesina (FG), Italia.
lucrezia.cilenti@fg.ismar.cnr.it

TAPES DECUSSATUS SUPERA T. PHILIPPINARUM IN LAGUNA DI VARANO

TAPES DECUSSATUS SURPASSES T. PHILIPPINARUM IN VARANO LAGOON (S. ITALY)

Abstract

The growth rates of *Tapes decussatus* (Mollusca; Bivalvia) and *T. philippinarum* farmed in Varano lagoon (S. Italy) are compared. Two adjacent areas were sown in March 2003 with 16 mm *T. decussatus* seed and 20 mm *T. philippinarum* seed respectively, at a density of 1000 ind./m². By October 2003 the mean size of *T. decussatus* was 28 mm whereas *T. philippinarum* showed practically no growth, registering only 21 mm. The cause for the scant performance of this latter species is perhaps due to its preference for colder waters.

Key-words: clam culture, Varano lagoon, *Tapes decussatus*, *Tapes philippinarum*.

Introduzione

Vengono presentati i primi risultati di una prova di allevamento in parallelo di *Tapes decussatus* e *T. philippinarum* effettuata in laguna di Varano (Foggia). Il progetto è mirato a sviluppare l'economia locale. *T. philippinarum* mantiene un buon mercato pur con le abbondanti produzioni dell'alto Adriatico, ma più interessante è *T. decussatus* in quanto viene pagato almeno due volte di più della prima. *T. decussatus* selvatico è raro a Varano mentre *T. philippinarum*, pur essendo stata immessa a varie riprese in passato, non dimostra di essersi acclimatato permanentemente in questa laguna.

Materiali e metodi

La prova è stata organizzata allestendo due parchi separati ma vicini presso la sponda nord di Varano. Il sito è stato scelto tenendo presente l'autoecologia delle due specie: sedimento sabbioso-fangoso, 0,7 m di batimetria, buon movimento laminare d'acqua (Korringa 1976; Breber, 1985, 1996). Il seme, fornito da uno schiuditoio, misurava 16 mm in *T. decussatus* e 20 mm in *T. philippinarum*. È stato messo a dimora a novembre 2002 ad una densità di 1000 ind./m². Il metodo per valutare l'esito dell'allevamento pilota è quello di misurare il tempo richiesto dai bivalvi per raggiungere la taglia commerciale ottimale (35 mm), e quante perdite si registrano in questo lasso di tempo. Ogni quindici giorni sono stati eseguiti dei controlli costituiti dalla misurazione della taglia (lunghezza mm) di 20 esemplari ogni volta diversi, notando eventuali valve vuote. Contemporaneamente, sono stati rilevati quei parametri ambientali ritenuti significativi: temperatura dell'acqua, salinità, potenziale redox del sedimento superficiale, fitoplancton e diatomee pennate bentoniche (Breber, 1996).