

# RELAZIONE FINALE RICERCA ERA NET ANIHWA

## Final report ERA NET ANIHWA

Istituto	Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie		
Titolo ricerca	Welfare, Health and Individuality in Farmed FISH <i>Acronymous: WIN-FISH</i>		
Responsabile	Dr. Amedeo Manfrin		
Data convenzione	26/05/2015		
Cod. Ricerca	ID 54 – CUP B85113000160001		
Data Inizio/	01.05.2015	Data fine autoriz- zata	30.11.2018

<b>Relazione Finale</b>	Data compilazione : 28/01/2019
-------------------------	--------------------------------

### A. Unità Operative partecipanti

- 1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Centro Specialistico Ittico (Fish Pathology Unit) Legnaro (PD)
- 2) COISPA Tecnologia ed innovazione – Bari

### B. Obiettivi del progetto

Il progetto WINFISH si proponeva i seguenti obiettivi:

WP1) verificare le correlazioni tra Stress Coping Style e gli indicatori comportamentali, fisiologici e immunologici in pesci sottoposti a stress e a cambiamenti ambientali;

WP2) approfondire i meccanismi molecolari che caratterizzano i diversi SCS nei pesci;

WP3) identificare le problematiche legate al benessere in nuovi modelli produttivi in acquacoltura nelle maggiori specie ittiche allevate in Europa;

WP4) identificare gli effetti favorevoli degli arricchimenti ambientali nel favorire stati emotive positivi;

WP5) produrre dei marcatori di stress genetici e molecolari da utilizzare per la selezione con lo scopo di ottimizzare le performance produttive e ridurre l'aggressività nel salmone atlantico.

IZSVE e COISPA sono stati coinvolti principalmente nel WP3: valutazione dello SCS e risposta ai cambiamenti ambientali. In orate, durante la fase di ingrasso in impianti a flusso continuo, è stato valutato il benessere in relazione alla densità di allevamento, utilizzando indicatori come la curva di accrescimento ed il profilo metabolico. Questi parametri sono essenziali, in quanto rappresentano una risposta integrata di tutto l'organismo allo stress. Le performance fisiologiche, prima e dopo l'accrescimento a diverse densità, sono state valutate in pesci con differente SCS (proactive o *bold*; reactive o *shy*). I pesci erano dotati di sensori applicati sulla coda per misurare l'attività natatoria e metabolica. Infine sono stati valutati il profilo metabolico ed immunologico degli animali dopo essere stati vaccinati nei confronti della Vibriosi.

## C. Metodologia applicata

### *Screening della personalità*

Nei pesci la variabilità individuale della risposta allo stress è caratterizzata da diversi fattori fisiologici e comportamentali (Øverli *et al.*, 2002) che modulano la personalità e sono conosciuti come “stress coping styles” (SCS) (Koolhaas *et al.*, 1999). Sono stati riconosciuti e descritti due principali SCS: *proactive* (*Bold*) e *reactive* (*Shy*). Gli individui *proactive* hanno la tendenza ad assumere una risposta di tipo “fight or flight” (combatti o scappi) (Cannon, 1929) caratterizzata da controllo del territorio ed aggressività. Gli individui *reactive* utilizzano la cosiddetta risposta “conservation-withdrawal” (conservazione-ritirata) (Engel and Schmale, 1972) nella quale l’aggressività è ridotta. Da un punto di vista fisiologico gli individui *proactive* manifestano una ridotta reattività lungo l’asse Ipotalamo-Pituitario-Interrenale (HPI), bassa reattività del sistema parasimpatico e del controllo ormonale, mentre la risposta immunitaria ed il consumo di ossigeno sono elevati (Castanheira *et al.*, 2017). Negli individui *reactive* si manifestano risposte di tipo opposto.

Con lo scopo di perfezionare la metodologia impiegata per lo screening della personalità in individui di orata (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758), in questo lavoro è stato adottato un approccio multiparametrico che integra l’utilizzo di indicatori comportamentali (test di *risk-taking* ed ipossia) e fisiologici (cortisolo, adrenalina, noradrenalina, glucosio, lattato, ematocrito, emoglobina, concentrazione eritrocitaria e lisozima).

Le prove sono state condotte utilizzando 3 gruppi di 15 pesci, marcati con tag RFID (Radio Frequency Identification) ID100 (Trovan<sup>®</sup>), allevati in vasche di vetroresina da 1,2 m<sup>3</sup>. Il peso medio degli individui nelle tre vasche all’inizio delle prove era di 273,7 ± 49,7 g (gruppo 1); 268,8 ± 44,9 g (gruppo 2); 266,1 ± 55,1 g (gruppo 3).

Tutti i pesci dei tre gruppi sono stati sottoposti allo screening della personalità utilizzando due differenti test comportamentali di gruppo: ipossia e *risk-taking*, descritti da Castanheira *et al.* (2013). Sono state condotte due prove consecutive per ogni test, a distanza di una settimana.

### *Test di ipossia*

Il test di ipossia ha la finalità di misurare il comportamento di fuga che si instaura in pesci in condizioni di ipossia. Il test è stato condotto in un apparato sperimentale realizzato da due vasche di plastica del volume di 75 L, unite da un tubo trasparente (40 cm di lunghezza, 20 cm di diametro) (Figura 1). I pesci, un gruppo alla volta, sono stati inseriti in una delle vasche. Le vasche sono state tenute separate tra loro con una rete fino all’inizio della prova (Figura 2). Entrambe le vasche sono state costantemente ossigenate. La prova è incominciata rimuovendo la rete di separazione tra le vasche e la pietra porosa per l’ossigenazione dalla vasca con i pesci, e dando inizio al cronometro.

A causa della respirazione dei pesci, la concentrazione di ossigeno in acqua cala, creando un ambiente sempre più anossico che dovrebbe favorire il comportamento di fuga per raggiungere un ambiente con livelli di ossigenazione normali. Due antenne di forma quadrata (Dorset, Netherlands) sono state posizionate alle due estremità del tubo di connessione delle vasche (Figura 2) per rilevare il passaggio dei pesci con il tag RFID. Si considera il test di ipossia terminato quando metà dei pesci è fuggita dalla vasca di ipossia o quando la concentrazione di ossigeno nella vasca di ipossia cala al di sotto di 3 mg L<sup>-1</sup> o, ancora, dopo 4.5 ore dall’inizio della prova. Il punteggio di 1 viene assegnato, per ogni test, ai primi 8 individui che effettuano il passaggio dall’area di ipossia a quella di normossia.

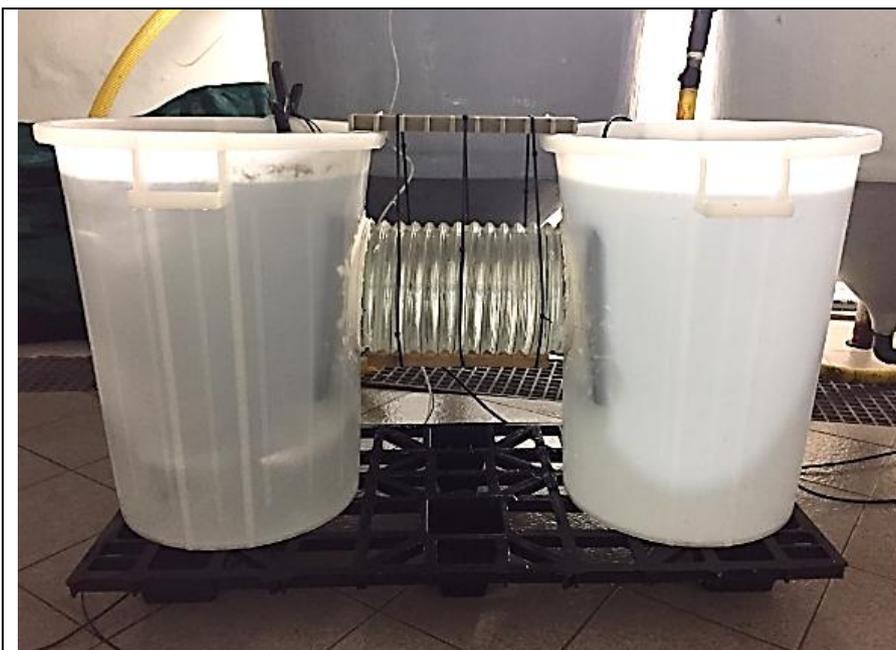


Figura 1. Dispositivo utilizzato per le prove di ipossia, costituito da due vasche di 75 L connesse da un tubo di plastica trasparente.



Figura 2. Dettaglio della vasca di ipossia in cui è mostrato il posizionamento dell'antenna e della rete che chiude l'accesso all'area di normossia prima che l'esperimento prenda inizio.

### Test di risk-taking

I test di risk-taking sono condotti direttamente all'interno delle vasche di allevamento (volume di  $1,2 \text{ m}^3$ ) che vengono divise in due aree (sicurezza e rischio) da un pannello opaco in cui è stato praticato un foro (diametro di circa 30 cm) nel centro (Figura 3). Una volta sistemato il pannello divisorio all'interno della vasca, i pesci sono stati lasciati acclimatare per una notte intera. Il test prende inizio con l'apertura del foro sul pannello, lasciando che i pesci passino liberamente

dall'area di sicurezza a quella di rischio e viceversa. Attorno al foro è stata posta un'antenna quadrata, connessa ad un computer, per rilevare il passaggio dei pesci dotati di tag RFID. Per ogni pesce il computer registra il tempo impiegato, dall'inizio della prova, per effettuare il primo passaggio attraverso il buco ed il numero totale di transiti. Il test di risk-taking si conclude quando la metà dei pesci entra nell'area di rischio o dopo 4.5 ore dall'inizio dell'esperimento. Il punteggio di 1 viene assegnato, per ogni test, ai primi 8 individui che effettuano il passaggio dall'area di rischio a quella di ipossia.

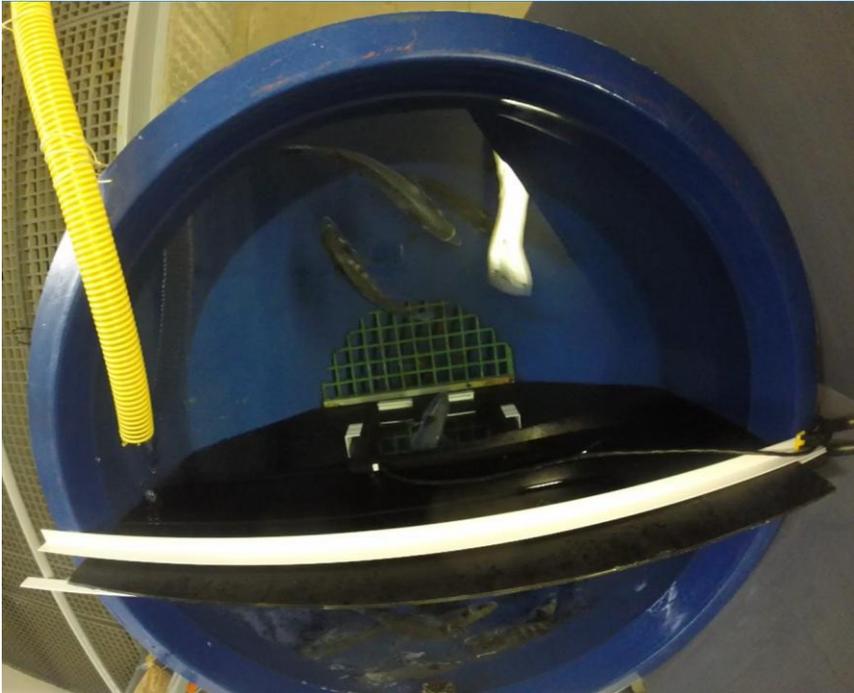


Figura 3. Vasca di allevamento divisa in un'area di rischio (porzione superiore) ed una sicurezza (porzione inferiore).

### Parametri ematici

Un'aliquota di sangue pari a circa 1,5 ml è stata prelevata da ciascun individuo con una siringa eparinizzata, una settimana dopo il termine delle prove comportamentali, al fine di stimare i livelli dei seguenti parametri ematologici: ematocrito (Hct), conta eritrocitaria (RBCC), emoglobina (Hb), cortisolo (cortisol), adrenalina (adrenaline), noradrenalina (noradrenaline), glucosio (glucose), lattato (lactate) e lisozima (lysozyme). L'ematocrito è stato determinato utilizzando microcapillari di vetro eparinizzati, riempiti direttamente con l'ago della siringa utilizzata per il prelievo e centrifugati (15000 g per 3 minuti). I capillari sono stati immediatamente letti. Il valore di ematocrito è stato espresso come percentuale della porzione corpuscolata del sangue sul volume totale. Gli eritrociti sono stati contati in una camera di Burker mediante un microscopio a luce trasmessa (Nikon 400E). La concentrazione di emoglobina è stata determinata utilizzando un kit commerciale (Sigma, St. Louis, USA). Il cortisolo plasmatico è stato determinato utilizzando un saggio immunoenzimatico competitivo (ELISA). Adrenalina e noradrenalina, ricavate dal plasma, sono state misurate con un kit ELISA (lettore di piastre per microtitolazione a 405 nm). Le concentrazioni di glucosio e lattato plasmatico sono state determinate utilizzando un kit commerciale (Sentinel, Italy) basato sulla reazione enzimatico colorimetrica di Trinder (GOD/PAP per il glucosio and PAP per il lattato). Il livello di lisozima plasmatico è stato determinato utilizzando un saggio turbidimetrico modificato per lettore di piastre per microtitolazione.

## Analisi statistiche

La determinazione della personalità individuale in questo lavoro segue un approccio multiparametrico ed utilizza un'Analisi delle Componenti Principali (PCA) ed un'analisi dei cluster (k-mean). La prima è stata applicata per identificare le variabili che forniscono un contributo maggiore alle differenze di personalità che intercorrono tra gli individui, mentre l'analisi dei cluster è stata utilizzata per validare i criteri di assegnazione dei profili SCS ai pesci.

Sulla base dell'idea che i pesci vincitori delle prove di ipossia e risk-taking manifestino maggiormente una personalità *proactive*, sono stati assegnati i profili SCS ai singoli pesci, tenendo conto dei punteggi totalizzati durante i test di screening ed utilizzando lo schema riportato in Tabella 1.

L'analisi delle componenti principali e l'analisi dei cluster sono state realizzate utilizzando un set di parametri fisiologici (HB, HCT, RBCC, glucosio, cortisolo, lisozima, adrenalina e noradrenalina) e parametri comportamentali (tempo trascorso fino al primo passaggio nei test di ipossia: Hy1, Hy2; numero di passaggi effettuati dall'area di sicurezza a quella di rischio e viceversa: nRT1, nRT2; tempo trascorso fino al primo passaggio nell'area di rischio: tRT1, tRT2). Il profilo SCS è stato utilizzato come variabile supplementare qualitativa (categorica).

Le analisi statistiche sono state effettuate con il software R (R Development Core Team, 2018), mentre la PCA ha richiesto l'uso della libreria FactoMineR (R Development Core Team, 2018).

Tabella 1. Schema per l'assegnazione dei profili SCS sulla base dei punteggi totalizzati durante i test di screening della personalità.

SCS	Hypoxia scores	Risk-taking scores
BOLD	2	2
	1	2
	2	1
INTERMEDIATE	0	2
	2	0
	1	1
SHY	0	1
	1	0
	0	0

## Calibrazione dei TAG

Durante lo svolgimento del task 3.2.1 è stato previsto l'utilizzo di accelerometri *tailbeat* (TAG) per stimare i livelli di attività di nuoto in pesci cresciuti in due differenti densità di allevamento (15 e 30 kg/m<sup>3</sup>) per un periodo di circa 3 mesi.

I risultati ottenuti dal monitoraggio in remoto dell'attività di nuoto possono essere utili per predire la spesa energetica per ogni pesce. Per questa ragione si è proceduto con una fase propedeutica alla sperimentazione finalizzata alla definizione di una baseline della capacità di nuoto e della spesa energetica associata per la specie in esame. Si è quindi proceduto con la calibrazione dei *tailbeat* TAG con la stima del tasso di consumo di ossigeno in ambienti controllati per il nuoto: sono state utilizzate opportune camere di nuoto (Figura 4). Un'elica attivata da un motore elettrico genera un flusso circolare di acqua all'interno della camera di nuoto. Le dimensioni della camera sono 70 x 20 x 20 cm (lunghezza x profondità x altezza). Uno schermo a nido d'ape è installato all'ingresso del flusso nella camera di nuoto al fine di ridurre le turbolenze ed far sì che l'acqua assuma un profilo di velocità uniforme. Il respirometro è alloggiato all'interno di una vasca di buffer per garantire un controllo più accurato della temperatura.

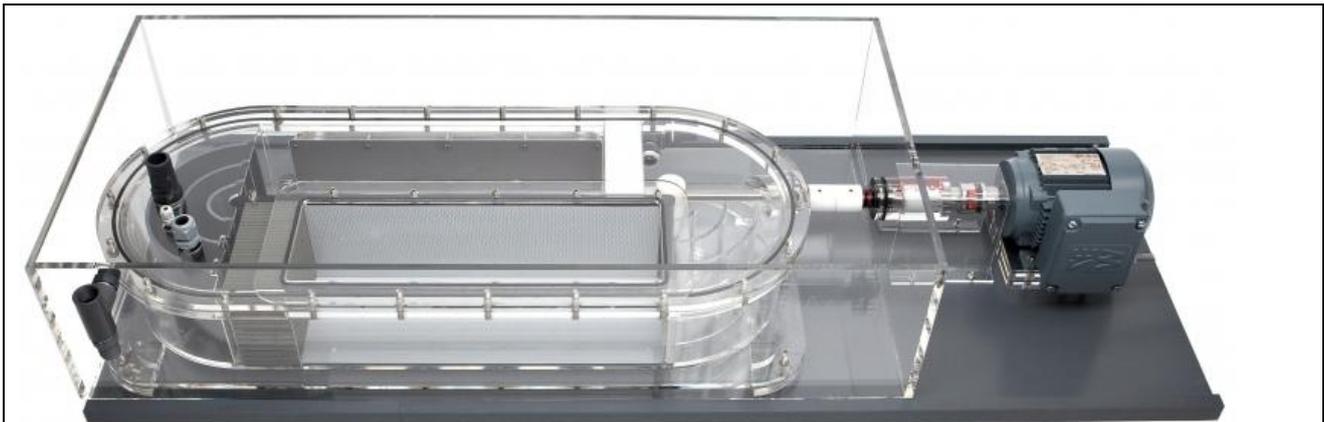


Figura 4. Camera di nuoto Loligo system, vasca buffer e motore.

### Performance di nuoto e spesa energetica

La camera di nuoto qui utilizzata è caratterizzata dalla capacità di generare un flusso laminare di acqua con un profilo di velocità costante. La velocità del flusso d'acqua è calibrata con un flussimetro. Il tasso di consumo di ossigeno è stimato inserendo nella camera un'opportuna sonda per l'ossigeno.

Le prove sono state realizzate utilizzando una camera di nuoto da 90 L della Loligo system, controllata da una periferica DAQ-M. Il controllo dell'ossigeno e della temperatura è stato effettuato dalla periferica Witrox 1, munita di un mini sensore a fibra ottica per l'ossigeno ed un sensore ad elevata accuratezza per la temperatura. La camera di nuoto è stata utilizzata per effettuare prove di nuoto esaustivo ( $U_{crit}$ ) nelle quali è imposta una rampa di velocità di nuoto ad intervalli di tempo costanti, fino al sopraggiungere dell'affaticamento del pesce (Lembo *et al.*, 2007).

Le prove di nuoto sono state condotte su 43 esemplari (Tabella 2). In particolare, sono state usate 4 classi di taglia: gruppo 1= 100-199 g (n=5); gruppo 2= 200-299 g (n=17); gruppo 3= 300-399 g (n=16); gruppo 4= 400-600 g (n=5). È stata eseguita l'analisi della regressione della lunghezza somatica (TL) sia con l' $U_{crit}$  sia con l' $U_{crit}$  standardizzato con TL ( $BLU_{crit}$ ).

Tabella 2. Misure morfometriche dei pesci coinvolti nelle prove di nuoto.

n=43	TL (mm)	Weight (g)
min	225.0	159.0
max	330.0	589.3
mean	269.1	302.3
s.d.	25.0	95.9

### Consumo di ossigeno

Durante lo svolgimento delle prove di  $U_{crit}$  dei quattro gruppi di pesci è stato anche monitorato il consumo di ossigeno per stimare la spesa energetica legata agli incrementi della velocità di nuoto. È stato quindi realizzato un modello per descrivere il tasso di consumo di ossigeno ( $MO_2$ ) in funzione della velocità di nuoto per ciascun gruppo di taglia. Il miglior modello per gruppo è stato scelto tra il lineare, l'esponenziale ed il sigmoide, selezionando quello con il valore più basso di AIC (Akaike, 1973).

I modelli così ottenuti sono stati utilizzati per stimare tre differenti indici relativi al tasso metabolico: *standard metabolic rate* (SMR), *active metabolic rate* (AMR) e *scope for activity* (SFA). Il primo indica la minima richiesta energetica necessaria per far fronte alle attività connesse con il metabolismo basale in pesci in condizione d'immobilità. L'AMR indica il massimo consumo

sostenibile durante esercizi di nuoto esaustivo ( $U_{crit}$ ). La differenza tra AMR e SMR rappresenta la quantità di energia disponibile per supportare tutte le esigenze motorie e fisiologiche (Brett, 1972).

### Elettromiogrammi

15 esemplari sono stati selezionati per la misurazione degli elettromiogrammi (Tabella 3). Due paia di elettrodi di acciaio inossidabile 304 (California Fine Wire Company™; 0,1 mm di spessore e lunghi 1 m) sono stati impiantati chirurgicamente rispettivamente nel muscolo rosso e nel muscolo bianco. Il segnale EMG è stato amplificato, filtrato e mediato (RMS). I pesci sono stati messi a digiuno nelle 24 ore precedenti l'impianto chirurgico, per assicurare una condizione di post-assorbimento (McFarlane *et al.*, 2004), e poi anestetizzati (stadio 4: perdita di riflessi e mancata risposta a forti stimoli esterni, come riportato da Iversen *et al.* (2003)) con una soluzione idroalcolica di *clove oil* (eugenolo) a  $30 \text{ mg L}^{-1}$  (Massee *et al.*, 1995; Zupa *et al.*, 2015). Durante l'operazione chirurgica le branchie sono state irrorate continuamente con la soluzione anestetica.

Tabella 3. Misure morfometriche dei pesci utilizzati per la rilevazione del segnale elettromiografico dal muscolo rosso e bianco.

n=15	TL (mm)	Weight (g)
min	264.00	276.40
max	318.00	466.60
mean	287.61	363.66
s.d.	17.94	64.22

### TAG Accelerometri

I tassi di consumo di ossigeno sono stati calibrati con le attività di nuoto mediante l'utilizzo di tag accelerometri per il rilevamento dell'accelerazione del pinneggio (*tailbeat*) impiantati nella cavità addominale di 12 orate (Tabella 4). La calibrazione è stata eseguita con accelerometri acustici V9AP della VEMCO programmati per misurare, con un tasso di campionamento di 10 Hz, l'accelerazione su due assi (X e Z) (Figura 5), escludendo i movimenti di avanzamento-arretramento rilevati sull'asse Y. Gli accelerometri trasmettono il codice identificativo del TAG (ID) e il valore codificato corrispondente all'accelerazione con un ritardo medio di 30 secondi. I dati di accelerazione sono registrati nella memoria di ricevitore acustico sommersibile (Vemco VR2W). I pesci sono stati tenuti a digiuno nelle 24 ore precedenti l'impianto chirurgico (McFarlane *et al.*, 2004) ed anestetizzati (stadio 4) (Iversen *et al.*, 2003) con una soluzione idroalcolica di *clove oil* (eugenolo) a  $30 \text{ mg L}^{-1}$  (Massee *et al.*, 1995; Zupa *et al.*, 2015). I trasmettitori sono stati inseriti nella cavità addominale attraverso un'incisione di 1,5 cm (Figura 6).

I dati di attività rilevati dai TAG sono stati utili per generare, con il software R (R Development Core Team, 2018), un modello logaritmico di calibrazione con i tassi di consumo di ossigeno.

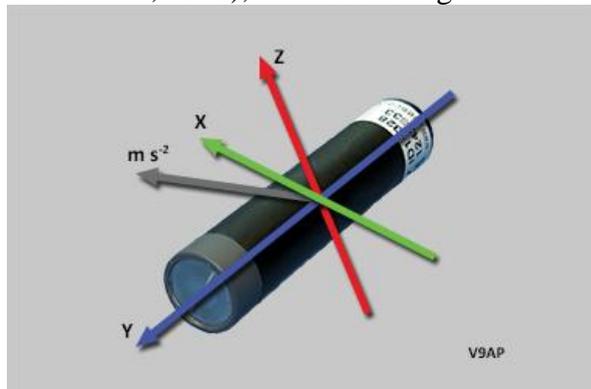


Figura 5. TAG V9AP prodotti dalla VEMCO. Le frecce indicano le componenti di accelerazione che possono essere potenzialmente

rilevate dal TAG.



Figura 6. Impianto chirurgico di un TAG tailbeat VAP nella cavità addominale di un esemplare di orata.

Tabella 4. Misure morfometriche dei pesci in cui sono stati impiantati i TAG per il *tailbeat*.

n=12	TL (mm)	Weight (g)
min	235.0	170.2
max	283.0	379.0
mean	263.2	277.5
s.d.	17.4	67.1

### Esperimento sulla densità

Il presente esperimento aveva la finalità di descrivere le performance fisiologiche di due gruppi di orate, dopo un periodo di crescita ad alta ( $30 \text{ kg/m}^3$ ) e bassa ( $15 \text{ kg/m}^3$ ) densità, valutate in animali che mostrano differente profilo SCS (assegnato in accordo con i risultati ottenuti durante l'esperimento sullo screening della personalità).

Un totale di 514 individui (Tabella 5) è stato selezionato in modo casuale da un gruppo di 900 esemplari di *S. aurata* (precedentemente marcati sottopelle con transponder RFID, Trovan) allevato in una vasca di vetroresina da  $16 \text{ m}^3$  e suddiviso in 6 differenti vasche di vetroresina da  $1,2 \text{ m}^3$  (Figura 7): 3 vasche a bassa densità,  $15 \text{ kg/m}^3$ , ed altre 3 vasche a  $30 \text{ kg/m}^3$ . I pesci sono stati allevati in un fotoperiodo di 12:12 ore (buio/luce) in acqua a  $18^\circ\text{C}$  con una salinità del 35‰. Le condizioni ambientali sono state mantenute costanti per tutta la durata dell'esperimento. I pesci sono stati alimentati una volta al giorno, con l'1% del loro peso con pellet commerciale (Skretting Marine 3P), per mezzo di mangiatoie automatiche. Il livello di ossigeno disciolto nelle vasche è stato monitorato in continuo ed in remoto attraverso un sistema automatico programmato per mantenere la concentrazione su livelli superiori alla soglia di  $5,0 \pm 1,0 \text{ ppm}$  con il rilascio di ossigeno puro.



Figura 7. Vasche sperimentali presso l'impianto di COISPA Tecnologia & Ricerca

A ciascun pesce è stato assegnato un profilo di personalità. A tale scopo, è stato utilizzato il solo test di risk-taking (vedi descrizione precedente) poiché nei test preliminari è risultato essere maggiormente sensibile dell'ipossia nello screening della personalità. Per ogni vasca, sono stati condotti due test consecutivi a distanza di una settimana. Per ogni singola prova 1 punto è stato assegnato alla prima metà di pesci che è passata nell'area di rischio (ordine di accesso), un altro punto è stato assegnato ai pesci che hanno compiuto un numero di passaggi, attraverso il pannello centrale, superiore al 67°percentile della popolazione della vasca. In caso contrario è stato assegnato un punteggio 0. Il profilo è stato assegnato secondo lo schema riportato in

Tabella 6, considerando il punteggio totalizzato durante entrambe le prove di risk-taking.

Tabella 5. Misure morfometriche dei pesci usati nell'esperienza sulla densità.

Tank	TL (cm)	BW (g)	n	Density <sup>3</sup> (kg/m <sup>3</sup> )
1	27.70 ± 1.32	312.08 ± 49.32	117	30.4
2	27.69 ± 1.36	314.46 ± 49.21	115	30.1
3	27.92 ± 1.45	317.35 ± 48.83	114	30.1
4	28.22 ± 1.43	320.81 ± 49.66	57	15.2
5	27.68 ± 1.69	323.50 ± 58.17	56	15.1
6	28.15 ± 1.69	330.10 ± 57.95	55	15.1

Tabella 6. Schema per l'assegnazione dell'SCS in base ai punteggi totalizzati durante i test di risk-taking per lo screening della personalità.

SCS	Time to first access (score)	Number of passages (score)
BOLD	2	2
	1	2
	2	1
INTERMEDIATE	0	2
	2	0
	1	1
SHY	0	1
	1	0
	0	0

L'esperimento ha preso inizio una settimana dopo la fine dello screening della personalità. Sono stati effettuati tre campionamenti di sangue consecutivi su un totale di 36 pesci: 3 *Bold* e 3 *Shy*, selezionati in modo casuale da ogni vasca. Il primo campionamento è stato eseguito all'inizio dell'esperimento, mentre gli altri due sono stati compiuti ad intervalli regolari di un mese. Ai pesci anestetizzati con *clove oil* (30 mg L<sup>-1</sup>) è stata prelevata un'aliquota di sangue di circa 1,5 ml, con una siringa eparinizzata, dal primo arco branchiale. Prima del risveglio dall'anestesia, sono state eseguite le misurazioni morfometriche degli individui per stimare l'accrescimento durante il periodo sperimentale. Altri due campionamenti sono stati eseguiti sugli stessi individui a intervalli regolari di un mese. Soltanto in occasione del terzo campionamento sono stati raccolti 72 campioni di sangue dai 36 pesci già utilizzati a questo scopo, più altri 36 esemplari (6 individui *Bold* e 6 *Shy* per vasca). Sono stati determinati i livelli dei seguenti parametri ematici: emoglobina (Hb), conta eritrocitaria (RBCC), ematocrito (Hct), glucosio, lattato, cortisolo, adrenalina, noradrenalina e lisozima. Maggiori dettagli circa il metodo sono riportati nel paragrafo "Parametri ematici".

### Indicatori dello stress

La Heat Shock Protein 70 (HSP70), la malondialdehide (MDA), la Nitrotyrosina (NT) e il 4-Hydroxynonenal (HNE) sono indicatori dello stress e sono stati identificati mediante tecniche di immunoistochimica (approccio semi-quantitativo) e per quanto riguarda HSP70 anche tramite Real-Time PCR (procedura quantitativa).

HSP70 è una proteina che appare immediatamente negli organi ben vascolarizzati quando il pesce è sotto stress, ad esempio durante le manipolazioni o le selezioni, mentre MDA è un marker di danno tissutale dopo l'esposizione a perossidi di idrogeno prodotti durante stress endogeni od esogeni, principalmente a causa del danneggiamento delle membrane plasmatiche.

NT è invece normalmente ritrovata in fluidi biologici come il plasma e il suo livello deve essere comparato con altri indicatori di stress (cortisolo, lattato, etc.), mentre HNE è prodotto dalla perossidazione dei lipidi nelle cellule animali ed è ritrovato in grandi quantità durante fenomeni di stress ossidativo a seguito di eventi stressanti.

L'immunoistochimica è una tecnica semi-quantitativa, ma spesso le differenze tra pesci fortemente o debolmente stressati sono evidenti. Per il rilevamento dei 4 biomarcatori sono stati utilizzati anticorpi commerciali monoclonali anti-HSP70, anti-MDA, anti-HNE (Abcam) e policlonale anti-NT (GeneTex).

Porzioni di organi (rene, milza, fegato, branchie, cervello, muscolo, intestino e cuore) sono stati

fissati in paraformaldeide al 4% sono stati ridotti, inseriti in apposite biocassette, processati, inclusi in paraffina, tagliati a 3 µm e sistemati su vetrini polilisinati.

L'immunocolorazione si compone di diverse fasi qui di seguito elencate: sparaffinamento delle sezioni, smascheramento antigenico con tripsina, immunocolorazione, colorazione di contrasto (ematossilina di Harris) e montaggio del vetrino con glicerolo in gelatina.

Gli anticorpi sono stati utilizzati alle seguenti diluizioni: anticorpo anti-Heat Shock Protein 70 (1:200); anticorpo anti-Malondialdeide (1:1000); anticorpo anti-Nitrotirosina (1:1000); anticorpo anti-4 Idrossinonenale (1:40).

La soluzione di lavoro del substrato a base di AEC (3-amino-9ethylcarbazole) produce un precipitato di colore rosso in corrispondenza dell'antigene bersaglio (target) che viene riconosciuto dall'anticorpo primario. È stato sempre utilizzato per ogni colorazione di HSP70 anche un controllo positivo di campo ottenuto da un soggetto fortemente positivo in Real-Time PCR. Inoltre sono stati aggiunti dei controlli negativi, confermati in Real-Time PCR, per verificare l'effettiva specificità del riconoscimento dell'anticorpo sull'antigene durante le colorazioni.

Per le colorazioni con HNE, NT e MDA sono stati inseriti controlli positivi di campo, che si sono confermati tali nelle successive immunocolorazioni. Per tutti i protocolli sono stati valutati alcuni campioni, sostituendo l'anticorpo primario con diluente per anticorpi, da utilizzarsi come controlli negativi di processo. I vetrini ottenuti dalla colorazione immunoistochimica sono stati osservati al microscopio ottico a diversi ingrandimenti.

Allo scopo di quantificare la presenza di HSP70 è stata anche sviluppata una nuova tecnica di Real-Time PCR.

All'inizio della sperimentazione sono stati testati al tempo ( $T_0$ ) 6 animali sacrificandoli in una soluzione acquosa di *clove oil* ( $60 \text{ mg L}^{-1}$ ) utilizzandoli sia per le prove di specificità, nella colorazione immunoistochimica, sia per allestire la nuova tecnica di biologia molecolare, da utilizzarsi come "bianchi", cioè animali non stressati per individuare la quantità basale di HSP70 nelle orate non sottoposte a stress.

Alla fine della sperimentazione tutti i 72 animali, a cui era stato prelevato il sangue precedentemente, sono stati sacrificati per le analisi di Real-Time PCR e immunoistochimica.

Per poter allestire la prova molecolare sono stati prelevati diverse porzioni di organo (fegato, milza, rene, cervello, branchie) stoccati a  $-80^\circ\text{C}$  in RNA later. 30 mg di ciascun campione sono stati lisati e omogenati tramite uno strumento specifico (Tissue Lyser II, Qiagen), e successivamente sono stati processati con RNA easy mini-kit (Qiagen) secondo il protocollo fornito dalla ditta, per estrarre RNA totale. La quantità di RNA è stata quantificata mediante uno spettrofotometro (NanoDrop), diluita  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  e stoccata nuovamente a  $-80^\circ\text{C}$ .

L'RNA è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando Random Examers e la SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) per poter effettuare le analisi di Real-Time PCR in modo da riuscire a quantificare HSP70 in maniera assoluta; ciò è stato possibile costruendo un plasmide con il kit TA Cloning® Kit (Invitrogen). Tale materiale è stato ottenuto partendo da campioni di orate provenienti dal COISPA a cui è stato estratto RNA totale, trasformato in cDNA; quest'ultimo è stato amplificato con PCR end point, successivamente sequenziato e identificato come HSP70 di orata. Il prodotto è stato inserito nel genoma di *E. coli*, fatto crescere all'interno del microorganismo, successivamente sono state selezionate le colonie, riestratto il materiale genetico, quantificato e infine diluito a concentrazioni note per poter creare la retta di taratura. (Figura 8).

I primer specifici per HSP70 in orata sono stati disegnati appositamente da noi utilizzando le sequenze depositate in GenBank (DQ524995.1 EU805481.1).

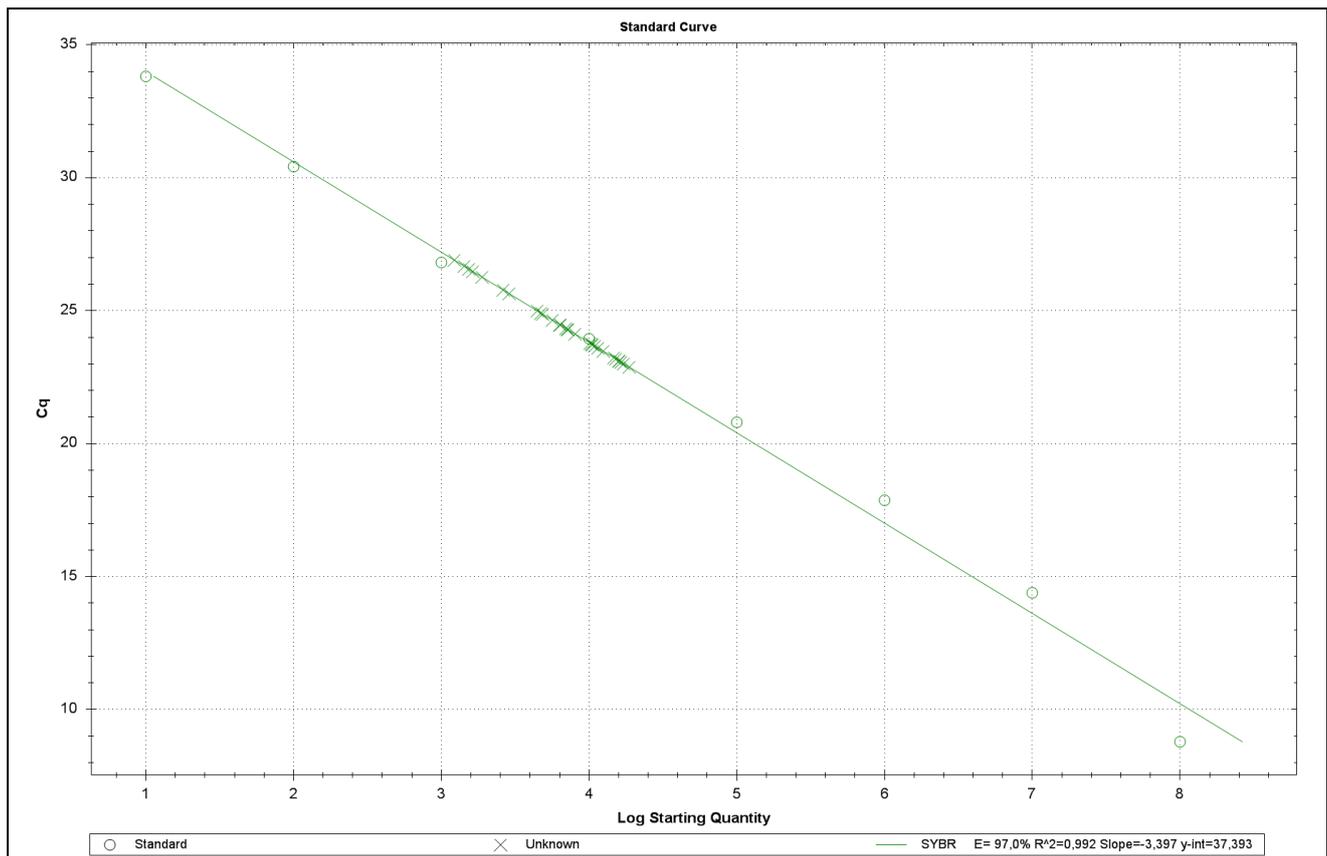


Figura 8. Costruzione della retta di taratura utilizzando le diluizioni seriali del plasmide (cerchi) e quantificazione dei campioni (X).

Durante l'allestimento della prova di biologia molecolare sono stati testati diversi protocolli di Real-Time PCR, sino ad ottenere quello ottimizzato che prevede l'utilizzo del Sybr Green come intercalante del DNA, 0,4 μM di ciascun primer, 40 cicli e una temperatura di annealing di 60 °C.

Durante un lavoro di tesi sperimentale sono state condotte diverse prove anche su branzini stressati da manipolazioni e carenza di ossigeno; in quell'occasione sono stati testati dei primer trovati in letteratura (Poltronieri et al., 2007), ma poiché hanno dato problemi di aspecificità con la formazione di dimeri di primer, è stata disegnata una nuova coppia di primer basandosi sulla sequenza di HSP70 di branzino disponibile in GenBank (AY423555.2).

La sequenza di HSP70 di branzino, ottenuta dopo sequenziamento dell'amplificato trovato successivamente all'estrazione dell'RNA con la metodica precedentemente descritta, è stata depositata in GenBank (MG711592).

Nel periodo intercorso tra il primo e il secondo campionamento di sangue, in 36 pesci sono stati impiantati chirurgicamente TAG *tailbeat* (3 *Bold* e 3 *Shy* selezionati casualmente da ogni vasca). I TAG presentavano le stesse caratteristiche riportate nel paragrafo "TAG Accelerometri", eccetto che per l'intervallo di 2 minuti nella trasmissione del segnale. I TAG sono rimasti attivi per trenta giorni, monitorando l'attività di nuoto dei pesci durante l'esperimento.

Le performance di crescita dei pesci sono state valutate per ciascuna densità e per profilo SCS. Tre parametri principali sono stati stimati: Tasso specifico di crescita (SGR), il peso acquisito, il fattore di conversione del cibo (FCR) ed il tasso di sopravvivenza

L'SGR è stato calcolato secondo la seguente formula:

$$SGR = 100 * \frac{\ln(W_1 - W_0)}{T},$$

dove, W è il peso totale (BW) del pesce, rispettivamente al terzo campionamento ( $W_1$ ) ed all'inizio dell'esperimento ( $W_0$ ), e T è il numero totale di giorni di alimentazione.

Il fattore di conversione del cibo (FCR) è stato calcolato come rapporto del cibo somministrato (kg

di peso secco) per la biomassa di peso acquisito (kg). È stata, inoltre, stimata la percentuale di sopravvivenza dei pesci durante l'esperimento.

### Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte con il software open source R (R Development Core Team, 2018). I valori medi dei parametri ematici sono stati confrontati tra i campionamenti, le densità e gli SCS con l'analisi della varianza non-parametrica di Kruskal Wallis (Daniel, 1990), mentre i livelli medi di attività di nuoto sono stati confrontati con l'ANOVA.

È stato adottato, inoltre, un approccio multiparametrico per valutare l'effetto delle densità di allevamento sulle performance fisiologiche di pesci con differente SCS. Sono state, quindi, effettuate tre differenti analisi delle componenti principali (PCA), una per ogni campionamento. Al fine di ridurre il numero di variabili coinvolte nell'analisi statistica, è stata attuata una selezione dei parametri ematici da considerare nelle PCA: peso totale (BW), lunghezza somatica (TL), ematocrito (HCT), lattato (LAT), adrenalina (ADR), noradrenalina (NOR), cortisolo (CORT), HSP70. SCS e densità sono state utilizzate come variabili qualitative supplementari.

### Esperimento di vaccinazione

Un totale di 159 individui (Tabella 7) è stato selezionato in modo casuale da un gruppo di circa 500 esemplari di *S. aurata* (precedentemente marcati sottopelle con transponder RFID, Trovan) allevato in una vasca di vetroresina da 16 m<sup>3</sup> e suddiviso in 3 differenti vasche di vetroresina da 1,2 m<sup>3</sup> (Figura 7). La densità media di allevamento nelle vasche era di circa ~19 kg/m<sup>3</sup> (vasca 1: 18,54 kg/m<sup>3</sup>, vasca 2: 19,06 kg/m<sup>3</sup>, vasca 3: 18,55 kg/m<sup>3</sup>). I pesci sono stati allevati con un fotoperiodo costante di 12:12 ore (buio/luce) in acqua salata al 35‰ ad una temperatura di 18°C. Le condizioni sperimentali sono state mantenute per tutta la durata dell'esperimento. I pesci sono stati alimentati una volta al giorno, con l'1% del loro peso con pellet commerciale (Skretting Marine 3P), per mezzo di mangiatoie automatiche. Il livello di ossigeno disciolto nelle vasche è stato monitorato in continuo ed in remoto attraverso un sistema automatico programmato per mantenere la concentrazione su livelli superiori alla soglia di 5,0 ± 1,0 ppm con il rilascio di ossigeno puro. I pesci sono stati sottoposti allo screening della personalità per l'assegnazione del profilo SCS secondo il metodo descritto nel paragrafo "Esperimento sulla densità".

Tabella 7. Misure morfometriche dei pesci impiegati nell'esperimento di vaccinazione.

Tank	TL (cm)	BW (g)	n	Density (kg/m <sup>3</sup> )
1	30.88±0.83	419.68±47.74	53	18.54
2	31.09±1.07	431.57±50.71	53	19.06
3	30.91±0.82	420.02±39.11	53	18.55
total	30.96±0.92	423.75±46.16	159	18.72

Una settimana dopo la fine dello screening della personalità, l'esperimento ha preso inizio con un campionamento delle misure morfometriche su tutti gli animali coinvolti nell'esperimento e il prelievo di sangue al tempo T<sub>0</sub>, circa 2 ml per soggetto, effettuato su un totale di 27 pesci (secondo il metodo descritto nel paragrafo "Esperimento sulla densità"): 3 *Bold* e 3 *Shy*, selezionati in modo casuale da ogni vasca. Tutti gli animali sono stati, inoltre, sottoposti ad iniezione intraperitoneale con 0.2 ml di un vaccino inattivato contro la Vibriosi, una delle principali patologie che affligge le specie marine. Il vaccino è stato prodotto a partire da colonie pure di *Vibrio anguillarum* O1 (ceppo di riferimento LMG 10861), coltivato a 25°C ± 2°C per 48 ore ed inattivato con il 4 % di formalina. Il prodotto finale è stato testato per valutarne la sterilità, mediante incubazione di terreni specifici per 10 gg a 25° e 37°C. La concentrazione finale del vaccino era di 10<sup>7</sup> ufc/ml, per cui a ciascun

animale è stata somministrata una concentrazione finale di  $10^6$  ufc/pesce.

Altri due campionamenti sono stati eseguiti sugli stessi individui a intervalli regolari di un mese,  $T_1$  e  $T_2$  rispettivamente, chiudendo la sperimentazione a 60 gg. Sono stati determinati i livelli dei seguenti parametri ematici: emoglobina (Hb), conta eritrocitaria (RBCC), ematocrito (Hct), glucosio, lattato, cortisolo, adrenalina, noradrenalina e lisozima. Maggiori dettagli circa il metodo sono riportati nel paragrafo “Parametri ematici”.

Nel presente lavoro sono stati utilizzati anche altri quattro parametri al fine di descrivere l’attivazione della risposta immunologica innata: protease, antiproteasi, perossidasi e proteine totali. L’attività delle proteasi è stata stimata mediante il saggio di idrolisi dell’azocaseina in accordo con il metodo descritto da Ross et al. (2000). L’attività antiproteasica totale è stata determinata attraverso la capacità del siero di inibire l’attività della tripsina (Hanif, Bakopoulos and Dimitriadis, 2004). L’attività perossidasi del siero è stata misurata in accordo con Quade and Roth (1997) mentre la concentrazione totale di proteine è stata stimata con il metodo proposto da Lowry et al. (1951)

All’inizio della sperimentazione ( $T_0$ ) inoltre sono stati sacrificati 5 animali come controllo per la tecnica immunoistochimica e di biologia molecolare. I 27 pesci alla fine della sperimentazione ( $T_2$ ) sono stati sacrificati per eseguire anche le analisi immunoistochimiche e di biologia molecolare per la quantificazione di HSP70 e degli altri biomarcatori di stress ossidativo. I dettagli sono riportati nel paragrafo “Indicatori dello stress”.

Sui sieri dei 27 animali, prelevati ai tempi  $T_0$ ,  $T_1$  e  $T_2$ , stoccati a  $-80^\circ\text{C}$ , è stata fatta la titolazione degli anticorpi anti *Vibrio anguillarum* per valutarne la risposta immunitaria specifica, utilizzando la seguente tecnica ELISA in micropiastre a 96 pozzetti:

- Aggiunta sul fondo del pozzetto di 100  $\mu\text{L}$  di Ag *V. anguillarum* 01 LMG 10861 alla concentrazione di  $3 \times 10^7$  ufc/ml.
- Incubazione overnight a  $4^\circ\text{C}$ .
- 3 lavaggi con soluzione PBS allo 0.05 % di Tween.
- Saturazione dei siti aspecifici con soluzione BSA 3%.
- Incubazione per 60 minuti a  $22^\circ\text{C}$ .
- 3 lavaggi con soluzione PBS allo 0.05 % di Tween.
- Aggiunta di 100  $\mu\text{L}$  di siero di orata da esaminare diluito 1:100.
- Incubazione per 60 minuti a  $22^\circ\text{C}$ .
- Aggiunta di 100  $\mu\text{L}$  di anticorpi monoclonali anti-orata Aquatic Ltd. ® (diluti 1:100).
- Aggiunta di 100  $\mu\text{L}$  di anticorpo anti mouse SIGMA® legato alla perossidasi (diluto 1:2000 in PBS).
- Incubazione per 60 minuti a  $22^\circ\text{C}$ .
- Aggiunta di 100  $\mu\text{L}$  di rilevatore cromogeno (TMB – Tetramethyl Benzidine).
- 100  $\mu\text{L}$  soluzione stop (acido solforico – 2N).
- Lettura della densità ottica a 450 nm mediante spettrofotometro.

In 18 pesci, all’inizio dell’esperimento, sono stati impiantati chirurgicamente TAG *tailbeat* (3 *Bold* e 3 *Shy* selezionati casualmente da ogni vasca). I TAG presentavano le stesse caratteristiche riportate nel paragrafo “TAG Accelerometri”, eccetto che per l’intervallo di 2 minuti nella trasmissione del segnale. I TAG sono rimasti attivi per 42 giorni, monitorando l’attività di nuoto dei pesci durante l’esperimento.

## D. Risultati ottenuti

### Screening della personalità

Nell'analisi delle componenti principali sono state prese in esame le prime 4 dimensioni per un totale di varianza spiegata del 55.11%. Le correlazioni maggiormente significative ( $|r| > 0.5$ ) sulla prima componente principale (18.8% di varianza) sono state quelle con le seguenti variabili (Tabella 8): noradrenalina (-0.85), RBCC (0.72); Hb (0.68), adrenalina (-0.59); sulla seconda dimensione (15.5% della varianza) sono state: tRT1 (0.65), nRT2 (0.63), nRT1 (0.54), cortisolo (-0.53), tRT2 (0.52) e Hb (-0.50); sulla terza componente principale (11.2% della varianza): Hy2 (0.73) e HCT (-0.51); mentre sulla quarta dimensione (9.5% della varianza): Hy1 (-0.62). La sovrapposizione dei dati delle ellissi di confidenza dei profili SCS sui dati (Figura 9) mostra una netta separazione tra il gruppo degli individui *Bold* da quelli *Shy*, mentre il gruppo degli *Intermediate* si sovrappone parzialmente ai due gruppi, mostrando un comportamento, per l'appunto, intermedio.

Gli indicatori utilizzati per discriminare i profili SCS hanno fornito una risposta consistente, anche se con una differente sensibilità. Infatti, gli indicatori che hanno mostrato un contributo considerevole alla segregazione dei profili SCS sono risultati: Hb, noradrenalina, RBCC, tRT, nRT e adrenalina. Il test di Risk-taking si è mostrato maggiormente sensibile del test di ipossia nel discriminare i profili SCS. Ad ogni modo, in entrambi i test comportamentali, i pesci *proactive* hanno esibito strategie per far fronte al fattore di stress al quale erano sottoposti (ipossia e densità). Se si considerano i parametri fisiologici, adrenalina, noradrenalina, Hb e RBCC hanno mostrato una correlazione più stretta con il profilo SCS esibito.

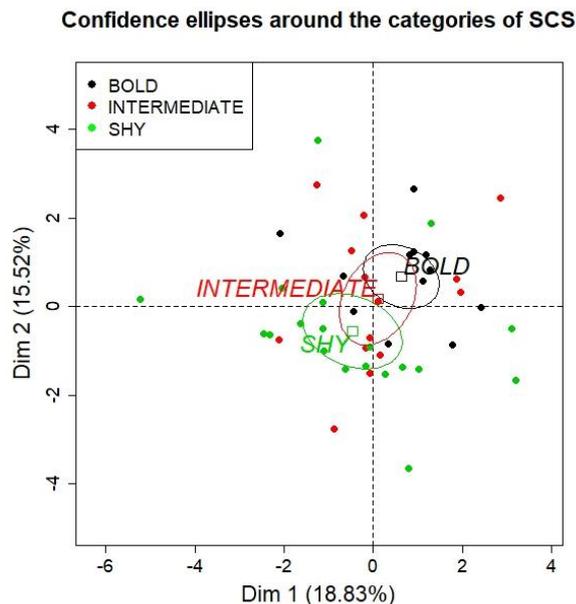


Figura 9. Ellissi di confidenza disegnate intorno ai livelli della variabile categorica (SCS) (livello di confidenza = 0.95)

Tabella 8. Sintesi delle correlazioni delle variabili quantitative e qualitative con le 4 componenti principali.

Dim.1			Dim.2		
	correlation	p.value (p<0.05)		Correlation	p.value (p<0.05)
Noradrenaline	-0.85	2.40E-13	tRT1	0.65	1.55E-06
RBCC	0.72	3.30E-08	nRT2	0.63	2.98E-06
Hb	0.68	2.80E-07	nRT1	0.54	1.19E-04
Adrenaline	-0.59	1.80E-05	Cortisol	-0.53	2.05E-04
HCT	0.40	6.32E-03	tRT2	0.52	2.68E-04
Lysozyme	0.34	2.07E-02	Hb	-0.50	4.66E-04
			Glucose	-0.39	8.48E-03
Dim.3			Dim.4		
	Correlation	p.value (p<0.05)		correlation	p.value (p<0.05)
Hy2	0.73	9.03E-09	Hy1	-0.62	6.72E-06
HCT	-0.51	3.89E-04	tRT2	0.49	5.58E-04
Glucose	0.43	3.55E-03	Lysozyme	-0.44	2.48E-03
Adrenaline	-0.41	5.36E-03	Hb	0.32	3.40E-02
Hy1	0.40	6.44E-03			
Lysozyme	-0.30	4.52E-02			
<i>Qualitative variable</i>					
	R <sup>2</sup>	p.value (p<0.05)			
SCS	0.35	1.20E-04			

L'analisi dei cluster ha riconosciuto la presenza di tre cluster (Tabella 9). Il gruppo numero 1 corrisponde quasi totalmente al gruppo di pesci *Bold*, mentre gli altri due gruppi sono composti da pesci classificati sia *Shy* che *Intermediate*. Questi risultati indicano che la classificazione basata sui soli parametri comportamentali (test della personalità) può essere utilizzata efficacemente per discriminare i profili di SCS, poiché la stessa classificazione produce risultati coerenti con quelli ottenuti dall'analisi multivariata, prendendo in esame contemporaneamente caratteri comportamentali e fisiologici.

Tabella 9. Numero di individui classificati per profilo SCS ed inclusi nei cluster riconosciuti dall'analisi dei cluster k-means.

k-means cluster analysis	clusters		
SCS	1	2	3
BOLD	11		1
INTERMEDIATE		7	7
SHY		12	7

### Calibrazione dei TAG

La stima della correlazione (Pearson) tra  $U_{crit}$  e TL non è risultata significativa ( $p > 0.05$ ), mentre una correlazione inversa significativa ( $r = -0.832$ ,  $p < 0.05$ ) è stata osservata tra TL e  $BLU_{crit}$  (Figura 10).

La velocità critica di nuoto media per i 4 gruppi di *S. aurata* utilizzati nell'esperimento è stata: gruppo 1,  $BLU_{crit} = 4.35 \pm 0.24$ ; gruppo 2,  $BLU_{crit} = 4.11 \pm 0.47$ ; gruppo 3,  $BLU_{crit} = 3.57 \pm 0.20$ ; gruppo 4,  $BLU_{crit} = 3.33 \pm 0.16$ ; mentre le singole prove sono comprese nei seguenti intervalli: gruppo 1, 3.99-4.61 BL/s; gruppo 2, 3.91-4.56 BL/s, gruppo 3, 3.4-3.74 BL/s; gruppo 4, 3.1-3.52 BL/s). Inoltre, i valori medi di  $BLU_{crit}$  dei primi due gruppi sono risultati significativamente differenti dalla media degli altri due gruppi (Kruskal Wallis test,  $p < 0.05$ ) (Figura 1).

Questi risultati dimostrano che la lunghezza somatica (BL) nell'orata rappresenta un fattore critico per l'attività di nuoto e che l' $U_{crit}$  si è rivelato un buon indice taglia-dipendente della capacità di nuoto in questa specie.

I modelli che descrivono il tasso di consumo di ossigeno per i quattro gruppi sperimentali sono riportati in Figura 2, mentre i parametri che li descrivono sono riassunti in Tabella 10. Il modello esponenziale è stato usato soltanto per il primo gruppo, mentre per gli altri modelli è stata utilizzata una funzione sigmoide. La stima dei valori di SMR, AMR e di SFA si riduce con l'aumentare della taglia del pesce (Figura 133) a indicare che, almeno per la specie in esame, i pesci di più piccola dimensione dispongono di una maggiore capacità aerobica, per far fronte a condizioni di stress, che si riduce con l'accrescimento.

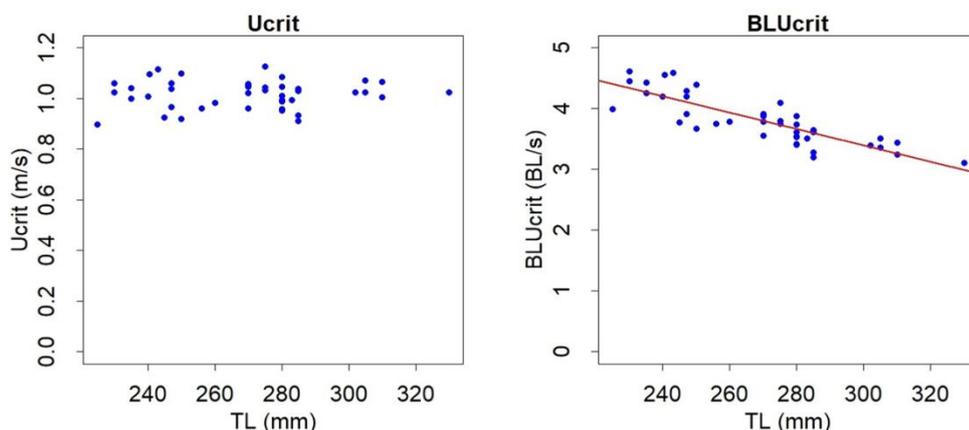


Figura 10. Valori di  $U_{crit}$  stimati durante le prove di nuoto. A sinistra: correlazione tra TL (mm) e  $U_{crit}$  (m/s) ( $p > 0.5$ ); a destra: correlazione tra TL (mm) a  $BLU_{crit}$  (BL/s) ( $p < 0.05$ ).

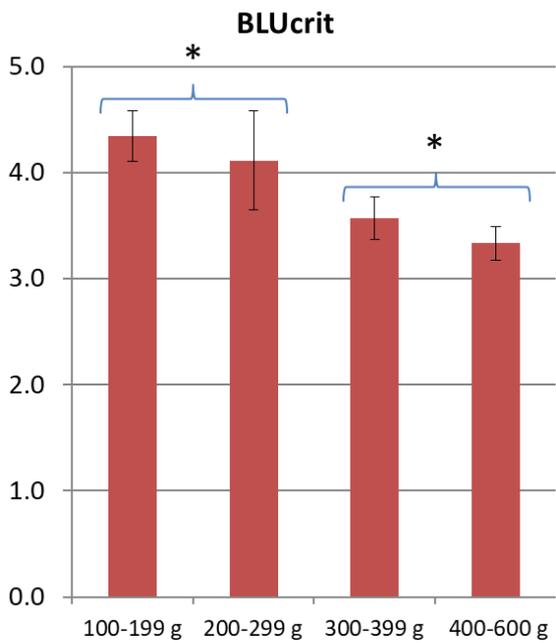


Figura 11. BLUcrit medio delle 4 classi di taglia. Gli asterischi indicano la presenza di differenze significative tra i gruppi (Kruskal Wallis test,  $p < 0.05$ ).

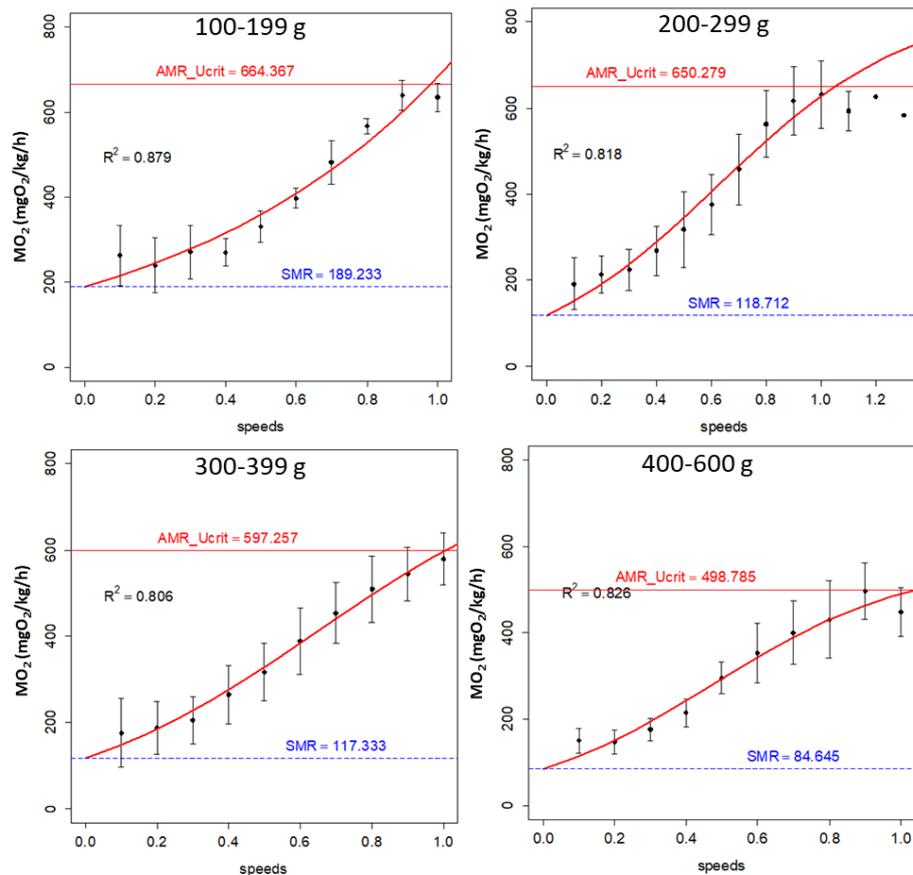


Figura 12. Modelli per la stima del tasso di consumo di ossigeno nelle 4 classi di taglia. Le linee orizzontali rosse rappresentano le stime di AMR mentre le linee tratteggiate blue indicano i valori si SMR.

Tabella 10. Sintesi dei parametri stimati per I modelli esponenziale e sigmoide ( $p < 0.05$ ).

	Exponential model		Sigmoid model		
	A	$\beta$	Asym	xmid	scal
<b>100-199 g</b>	189.2	1.3	-	-	-
<b>200-299 g</b>	-	-	840.97	0.62	0.35
<b>300-399 g</b>	-	-	821.01	0.65	0.36
<b>400-600 g</b>	-	-	563.80	0.48	0.28

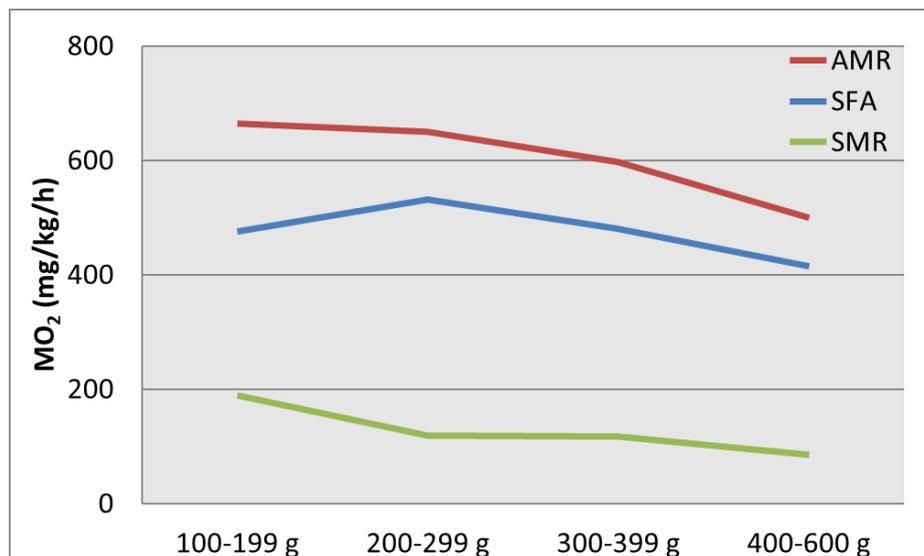


Figura 13. Valori di SMR, AMR e SFA estrapolati dai modelli delle 4 classi di taglia.

Importanti informazioni sono state ricavate dai dati di EMG (Figura4). Il pattern di attivazione del muscolo rosso è stato descritto da una funzione sigmoide che sembra essere solidale con il pattern di consumo di ossigeno osservato. Il muscolo bianco, diversamente, mostra un livello di attivazione molto basso fino a velocità di nuoto di 0.6 m/s, dopo le quali il suo contributo viene incrementato seguendo un andamento esponenziale. Il pattern di attivazione delle due muscolature è un parametro specie-specifico, infatti, in altre specie, quali ad esempio la spigola, lo schema è differente: il muscolo bianco fornisce un maggiore contributo al nuoto, anche alle velocità di nuoto più basse (Zupa *et al.*, 2015).

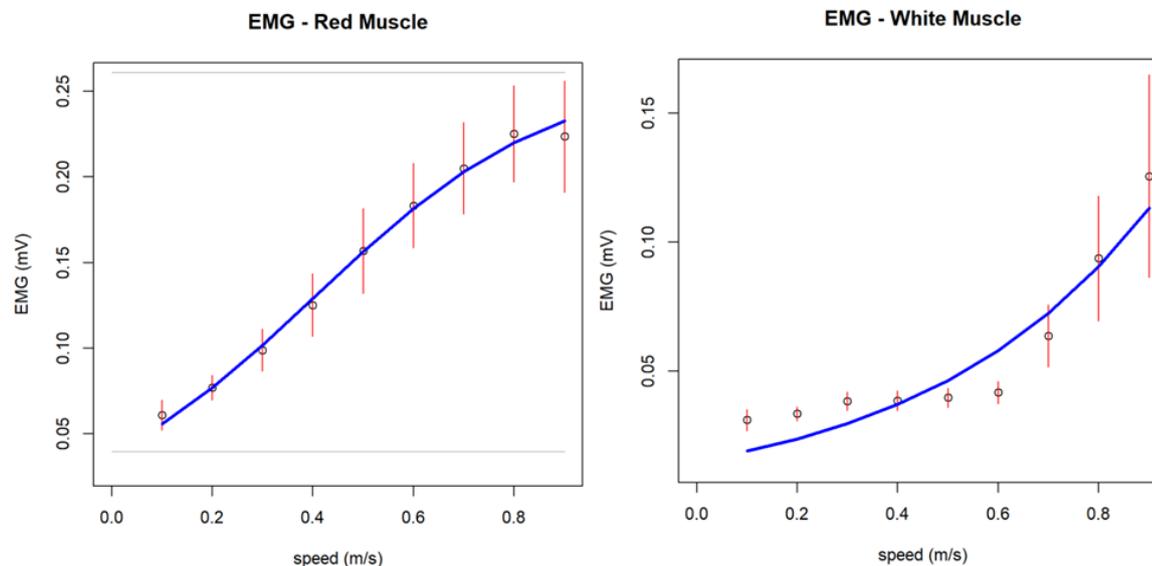


Figura 14. Livelli medi di EMG (mV, media  $\pm$  s.e.) e modelli dell'attività muscolare per il muscolo rosso (a sinistra) e bianco (a destra) in funzione della velocità di nuoto.

Il miglior modello in grado di fittare la variazione del consumo di ossigeno in funzione del segnale di *tailbeat* è stato quello logaritmico (Figura 15). Questo modello permette di stimare ad ogni livello di attività di nuoto il relativo costo energetico, permettendo di riconoscere in modo più accurato la risposta fisiologica legata ad un evento di stress (McFarlane *et al.*, 2004; Chandroo *et al.*, 2005; Carbonara *et al.*, 2015).

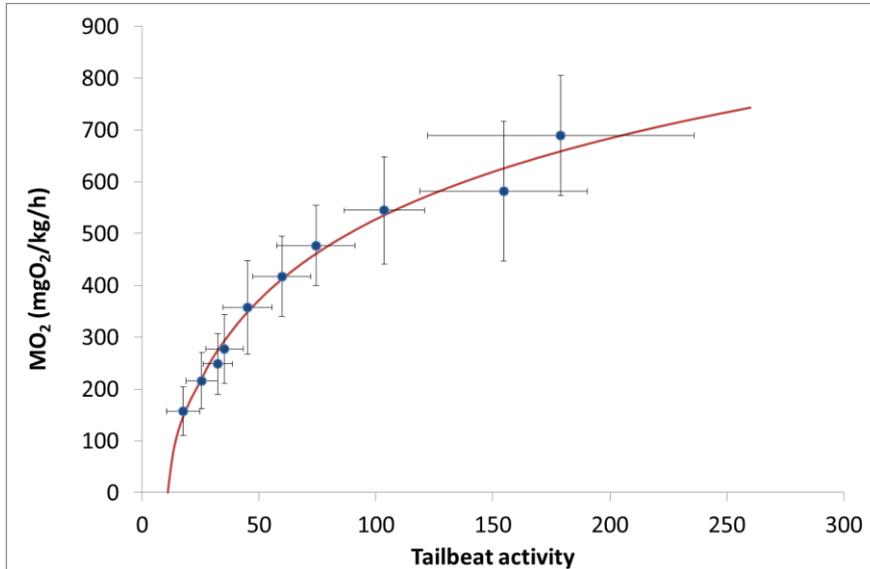


Figura 15. modello di calibrazione dei TAG *tailbeat*

### Esperimento sulla densità

I pesci hanno mostrato un accrescimento continuo durante tutta la durata dell'esperimento in entrambe le densità di allevamento (Figura). Sono state osservate differenze nei tassi di crescita tra i gruppi: un valore di SGR più elevato è stato esibito dal gruppo LD che ha anche riportato un maggiore aumento di peso acquisito (Tabella 11). Inoltre, se anche differenze sono state osservate tra le due densità di allevamento, nessuna differenza significativa è emersa all'interno degli stessi gruppi quando sono stati presi in esame i differenti profili SCS. Per quanto riguarda il fattore di conversione, non sono state osservate differenze tra i gruppi (Tabella 11). Inoltre, alla fine dell'esperimento, sono state registrate elevate percentuali di sopravvivenza (98.64% del totale dei pesci utilizzati nell'esperimento).

Tabella 11. Valori dei parametri zootecnici: tasso standard di crescita (SGR), peso acquisito (gained weight) e tasso di conversione del cibo (FCR). I simboli indicano le differenze significative nei confronti tra gruppi (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ).

Group	SGR	Gained Weight (g)	FCR
HD	0.47 ± 0.13 (*)	142.41 ± 39.77 (#)	2.03 ± 0.22
LD	0.51 ± 0.14 (*)	161.59 ± 42.35 (#)	1.87 ± 0.19
HD-BOLD	0.48 ± 0.14	146.78 ± 42.74	2.05 ± 0.69
HD-SHY	0.47 ± 0.11	142.46 ± 37.14	2.28 ± 1.86
LD-BOLD	0.51 ± 0.13	166.43 ± 40.38	2.05 ± 0.83

LD-SHY	$0.51 \pm 0.15$	$161.31 \pm 43.58$	$1.95 \pm 0.61$
--------	-----------------	--------------------	-----------------

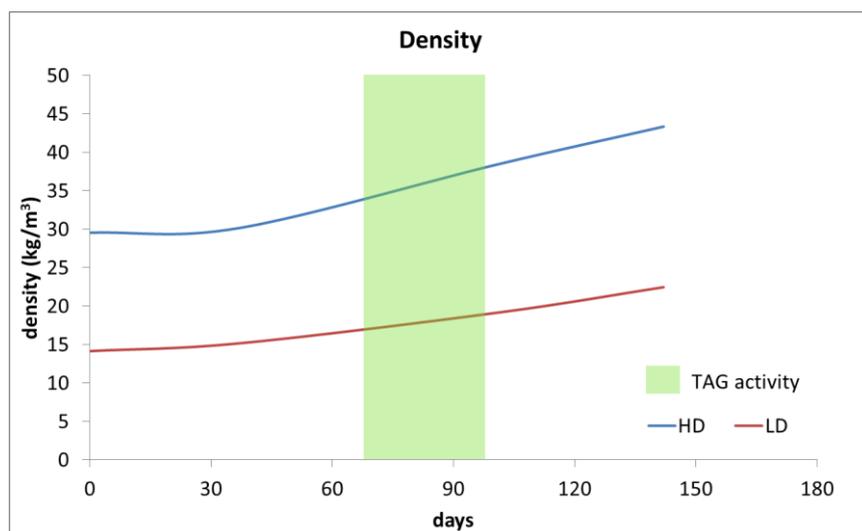


Figura 16. Variazione delle densità di allevamento nei gruppi durante il periodo sperimentale. HD: gruppo ad alta densità (30 kg/m<sup>3</sup>); LD: gruppo a bassa densità (15 kg/m<sup>3</sup>). In verde è mostrata la durata del periodo di funzionamento dei tag.

Il monitoraggio continuo dell'attività natatoria espresso dai pesci durante 30 giorni del periodo sperimentale (Figura7 e Figura8) ha contribuito a meglio delineare gli effetti dei due stressori nel tempo sul comportamento dei pesci. In particolare, è stata osservata una correlazione inversa tra l'attività media giornaliera ed il tempo nel gruppo HD (test di correlazione di Pearson,  $r = -0.478$ ,  $p < 0.05$ ), mentre la stessa correlazione nel gruppo LD non è risultata significativa ( $r = 0.191$ ,  $p > 0.05$ ). L'attività media sull'intero periodo è risultata differente tra le due densità (t-test,  $p < 0.05$ ):  $43.73 \pm 0.04$  (HD, media  $\pm$  s.e.),  $44.59 \pm 0.04$  (LD, media  $\pm$  s.e.). I relativi tassi di consumo di ossigeno, estrapolati per mezzo della curva di calibrazione, sono stati:  $341.3 \text{ mgO}_2/\text{kg/h}$  (HD) and  $354.7 \text{ mgO}_2/\text{kg/h}$  (LD) (SFA =  $479.9 \text{ mgO}_2/\text{kg/h}$ ).

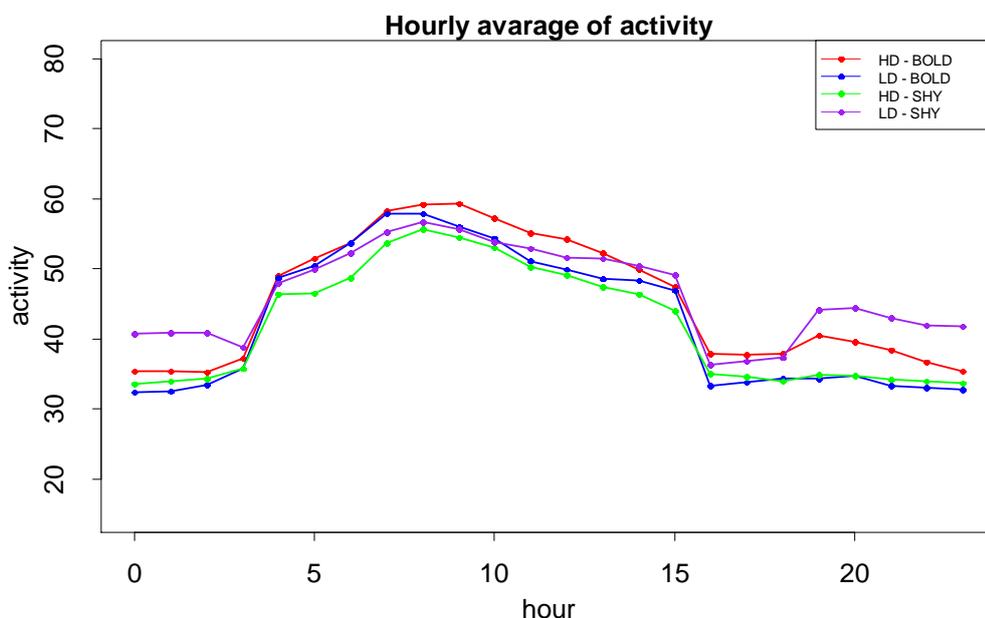


Figura 17. Media oraria dell'attività di nuoto nei 4 gruppi di densità-SCS

Non sono state rilevate differenze tra le attività di nuoto medie tra i due profili SCS (t-test,  $p > 0.05$ ) (Figura 18, a sinistra), sebbene esse siano risultate evidenti quando le attività dei due SCS sono state confrontate all'interno dello stesso gruppo di densità (t-test,  $p < 0.05$ ). Infatti, nel gruppo HD i pesci con profilo *Bold* mostrano un'attività mediamente più elevata degli *Shy*, mentre nel gruppo LD la

situazione è invertita:  $45.6 \pm 0.06$  (HD-BOLD);  $41.9 \pm 0.05$  (HD-SHY);  $42.8 \pm 0.06$  (LD-BOLD);  $46.3 \pm 0.06$  (HD-SHY). I relativi tassi di consumo di ossigeno, estrapolati per mezzo della curva di calibrazione, sono stati:  $350.6 \text{ mgO}_2/\text{kg/h}$  (HD-BOLD);  $332.0 \text{ mgO}_2/\text{kg/h}$  (HD-SHY);  $336.7 \text{ mgO}_2/\text{kg/h}$  (LD-BOLD);  $354.5 \text{ mgO}_2/\text{kg/h}$  (LD-SHY) (SFA =  $479.9 \text{ mgO}_2/\text{kg/h}$ ).

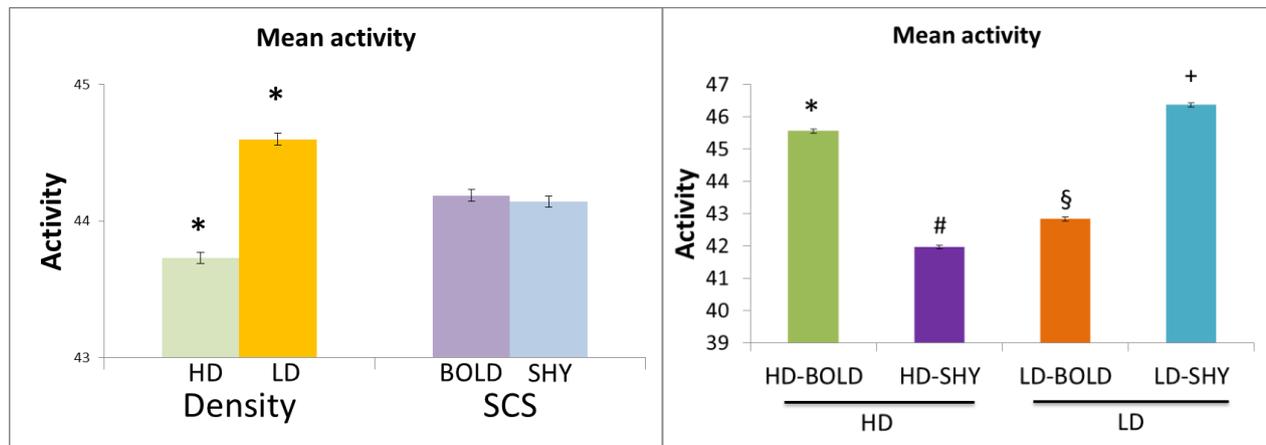


Figura 18. Attività media di nuoto nei gruppi sperimentali. A sinistra: valori medi dei gruppi per densità ed SCS; a destra: valori medi per i 4 gruppi densità-SCS. I simboli indicano le differenze significative tra i gruppi (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

I risultati dell'analisi dei parametri ematici sono riportati in Figura9 e Figura20. Le differenze osservate nei parametri della linea rossa (RBCC, Hb and HCT) sono risultati particolarmente legati al tempo e non sono state rilevate evidenze dell'effetto della densità o del profilo SCS. Il glucosio, nel gruppo HD, ha mostrato medie differenti tra i profili SCS e tra gli individui *bold* delle due densità all'inizio dell'esperimento, ma non nei campionamenti successivi. Allo stesso modo, sono state riscontrate differenze nei valori di lattato sia tra le densità sia tra i profili SCS. Il cortisolo e le catecolamine hanno mostrato una variazione nel tempo, diminuendo ai successivi campionamenti, mentre nel caso della noradrenalina, almeno nei primi due campionamenti, le differenze sono riconducibili sia a un effetto densità sia uno SCS. Il lisozima non ha mostrato variazioni significative tra i gruppi esaminati. Diversamente, i livelli di HSP70 si sono dimostrati un indice sensibile dello stress da densità nell'orata. Infatti, una maggiore espressione è stata riscontrata nel gruppo ad alta densità (HD) (Figura1, right frame). Inoltre, le differenze osservate nell'espressione delle proteine HSP70 nei vari organi si sono mantenute costanti nei vari gruppi densità-SCS. I livelli più bassi di espressione sono stati a carico del sistema nervoso centrale (CNS). Al contrario, la concentrazione più elevata è stata rilevata nelle branchie e nel rene, organi maggiormente coinvolti nella risposta a condizioni di stress ambientale (Heath, 1995).

Potrebbe risultare complesso tracciare un quadro completo degli effetti dovuti sia alla densità che al profilo SCS su tutti i parametri ematici analizzati. Per questa ragione è stato scelto di adottare un approccio multiparametrico, eseguendo un'analisi delle componenti principali (PCA) per ogni campionamento effettuato durante l'esperimento. L'analisi ha permesso di ridurre, in tutte e tre le analisi condotte, il numero iniziale di variabili coinvolte alle prime tre componenti principali (PC) (Tabella 12). I risultati delle PCA sono riportati in Tabella 13. All'inizio dell'esperimento (prima PCA) è stato osservato un debole effetto dovuto al profilo SCS, in particolare sulle seguenti variabili (PC1): peso corporeo (BW), lunghezza somatica (TL), lattato (LAT), noradrenalina (NOR), ematocrito (HCT) e adrenalina (ADR) ( $|r| > 0.5$ ), mentre la densità ha mostrato il proprio effetto soltanto su PC3 con HSP70 e HCT. Nella seconda PCA è stato osservato un effetto densità più importante di quello imputato al profilo SCS. Le variabili con le correlazioni più forti con le componenti principali sono state: BW, TL e LAT per PC1. La densità ha mostrato una debole correlazione con ADR, NOR, e HCT su PC2, mentre CORT e LAT hanno mostrato un legame su PC3 con il profilo SCS. Alla fine dell'esperimento, è stato osservato esclusivamente un effetto densità su PC3 con HSP70 e HCT. In conclusione, il profilo SCS sembra abbia avuto un'influenza

significativa sulla fisiologia dei pesci all'inizio dell'esperimento, effetto che sembra andare perso gradualmente nei successivi campionamenti, mentre l'influenza della densità permane per tutta la durata dell'esperimento.

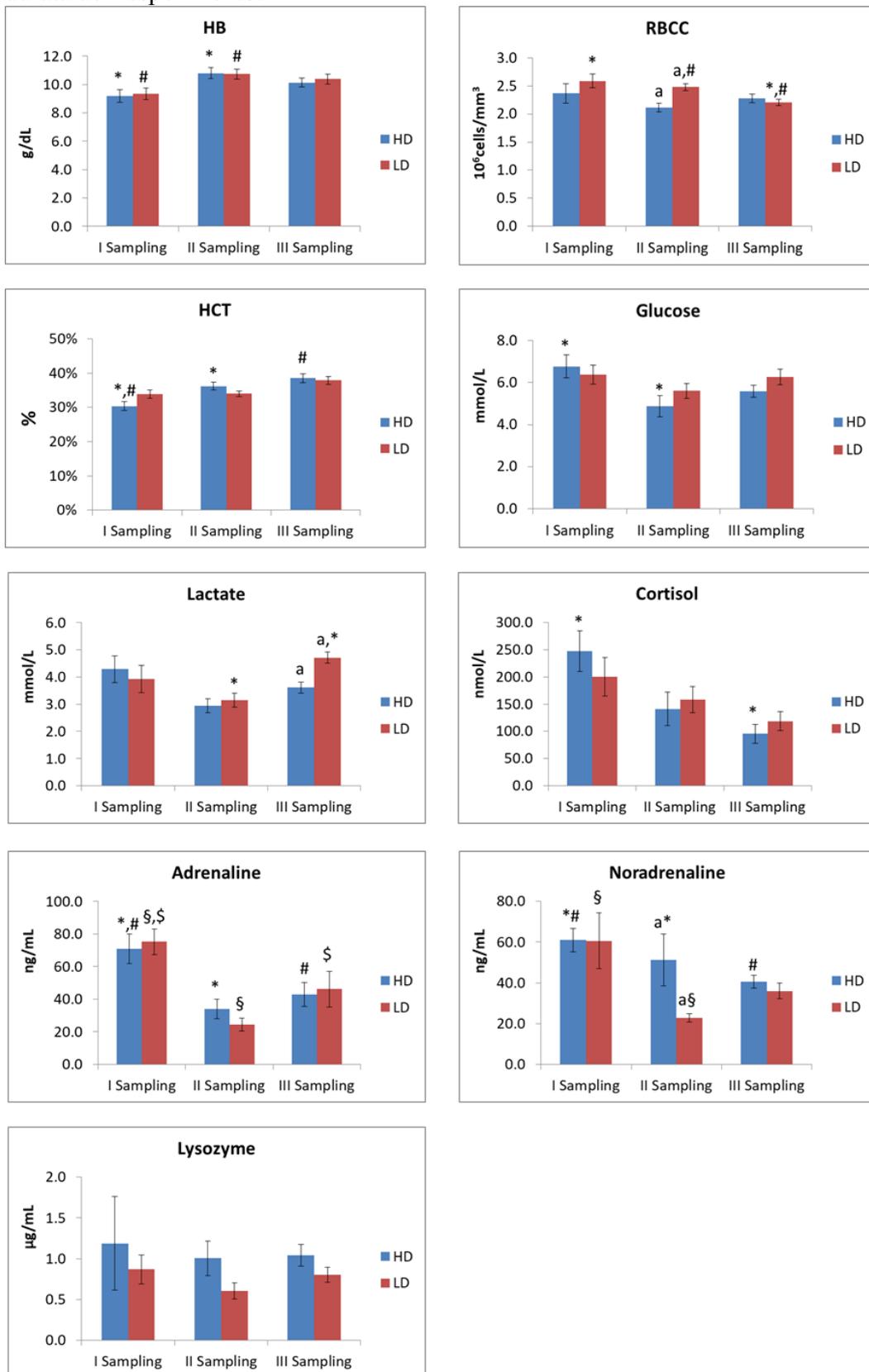


Figura 19. valori dei parametri ematici per densità. I dati sono riportati per ciascun campionamento. I simboli (\*, #, § and \$) indicano le differenze significative all'interno dello stesso gruppo nel tempo; le lettere (a, b, c) indicano le differenze tra i gruppi, durante lo stesso campionamento (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ).

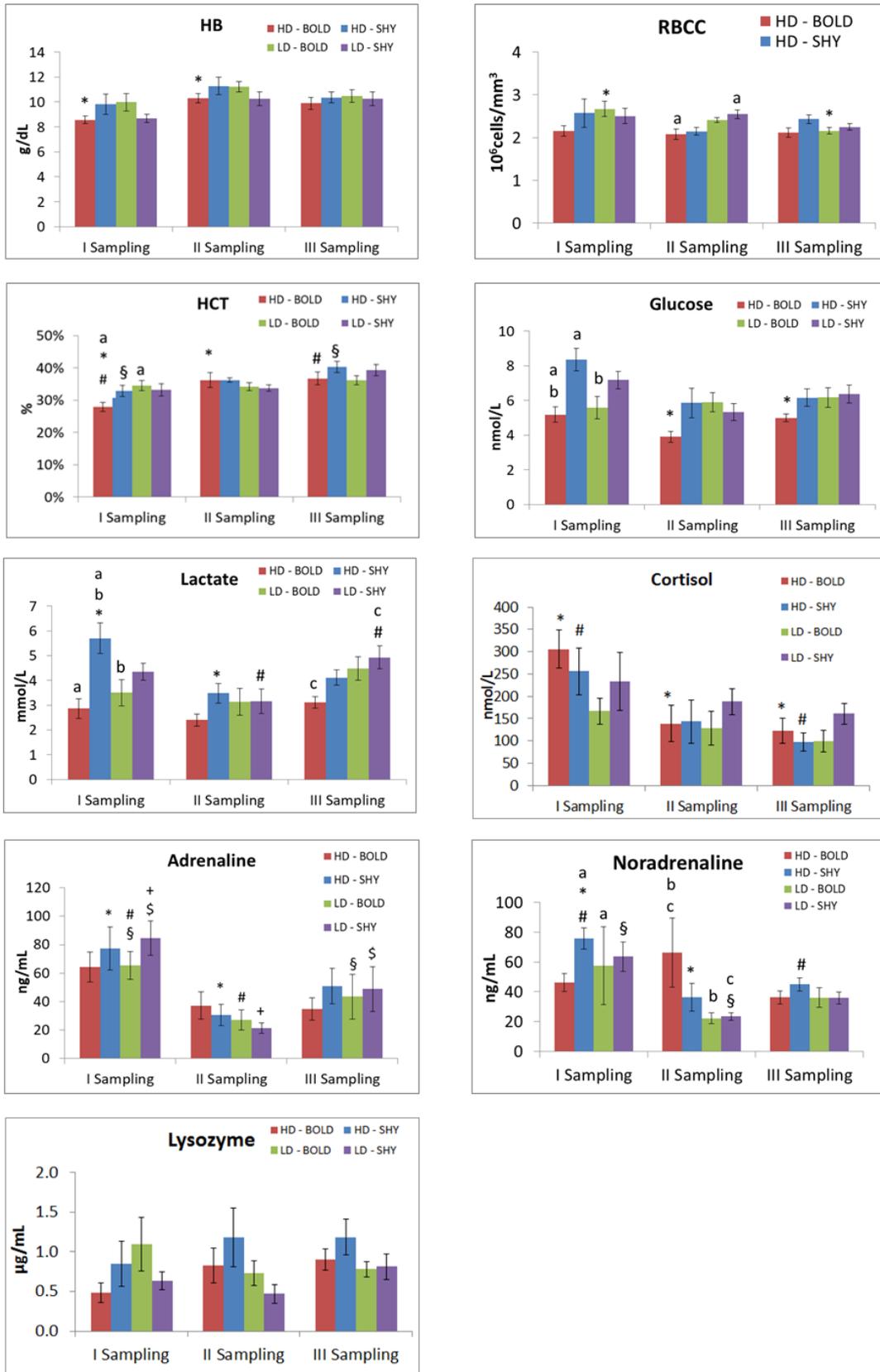


Figura 20. Valori dei parametri ematici nei 4 gruppi densità-SCS. I dati sono riportati per i tre campionamenti. I simboli (\*, #, §, + and §) indicano le differenze significative nello stesso gruppo nel tempo; le letter (a, b, c) indicano le differenze tra i gruppi nello stesso campionamento (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ).

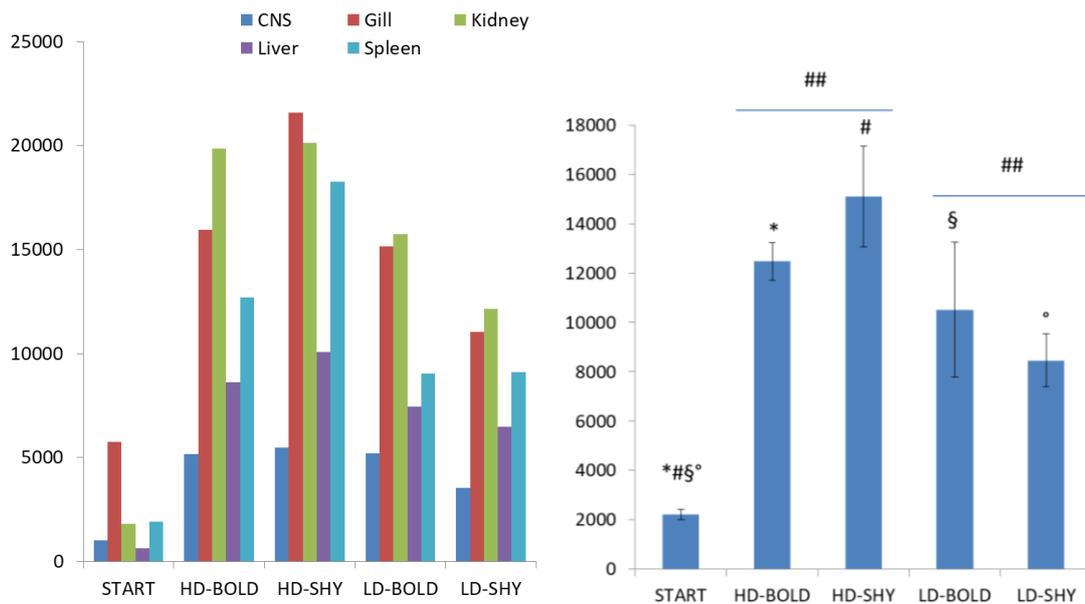


Figura 21. Livelli di HSP70 riscontrati all'inizio dell'esperimento (valore stimato su tutti gli animali insieme) ed alla fine dell'esperimento (per ciascun gruppo sperimentale). A sinistra: valori rilevati per i principali organi: sistema nervoso centrale (CNS), branchie, rene, fegato e milza; sulla destra: valore medio per ciascun gruppo (i simboli indicando le differenze significative, Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ).

Tabella 12. Valori di varianza (Variance), percentuale di varianza (% of var.) e percentuale cumulata di varianza spiegata da ciascuna dimensione (PC) delle tre analisi delle componenti principali (PCA) effettuate.

Principal Component	I sampling			II sampling			III sampling		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
Variance	2.63	1.43	1.09	2.21	2.05	1.18	2.20	1.93	1.13
% of var.	37.52	20.38	15.49	31.54	29.25	16.91	27.51	24.14	14.13
Cumulative % of var.	37.52	57.90	73.39	31.54	60.80	77.70	27.51	51.65	65.78

Tabella 13. Sintesi dei coefficienti di correlazione (r) e dei livelli di significatività (p-value) sia delle variabili continue sia delle variabili qualitative con ciascuna componente principale presa in esame durante le PCA. Nelle analisi sono state utilizzate le seguenti variabili: peso corporeo (BW), lunghezza somatica (TL), SCS (profilo SCS), densità (DENSITY), ematocrito (HCT), lattato (LAT), adrenalina (ADR), noradrenalina (NOR), cortisolo (CORT) ed HSP70.

	I sampling			II sampling			III sampling		
	variable	r	p-value	variable	R	p-value	variable	R	p-value
PC1	BW	-0.733	3.70E-07	BW	0.785	1.46E-08	ADR	0.82	1.35E-18
	TL	-0.705	1.57E-06	TL	0.738	2.81E-07	NOR	0.786	2.97E-16
	LAT	0.645	2.17E-05	LAT	0.594	1.34E-04	LAT	0.701	7.25E-12
	NOR	0.608	8.49E-05	CORT	0.446	6.45E-03	HCT	0.463	4.28E-05
	HCT	0.605	9.13E-05	NOR	0.445	6.55E-03	CORT	0.354	2.26E-03
	ADR	0.549	5.33E-04	HCT	0.393	1.77E-02	HSP70	0.261	2.70E-02
	CORT	0.373	2.53E-02	ADR	0.379	2.27E-02			
	<b>Qualitative</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p-value</b>						
SCS	0.173	0.012							
PC2	TL	0.656	1.38E-05	ADR	0.778	2.38E-08	BW	0.955	9.60E-39
	BW	0.63	3.79E-05	NOR	0.676	6.12E-06	TL	0.942	6.27E-35
	LAT	0.496	2.10E-03	HCT	0.673	6.91E-06	CORT	-0.275	1.96E-02
	HCT	0.432	8.52E-03	TL	-0.499	1.95E-03			
	NOR	0.36	3.09E-02	BW	-0.499	1.93E-03			
				<b>Qualitative</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p-value</b>			
			DENSITY	0.116	0.042				
PC3	HSP70	0.655	4.22E-10	CORT	0.684	4.22E-06	HSP70	0.655	4.22E-10
	HCT	0.583	7.71E-08	LAT	0.57	2.82E-04	HCT	0.583	7.71E-08
	CORT	-0.443	9.81E-05	TL	-0.38	2.21E-02	CORT	-0.443	9.81E-05
	LAT	-0.363	1.74E-03	NOR	-0.36	3.08E-02	LAT	-0.363	1.74E-03
	<b>Qualitative</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p-value</b>	<b>Qualitative</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p-value</b>	<b>Qualitative</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p-value</b>
	DENSITY	0.101	6.47E-03	SCS	0.185	8.85E-03	DENSITY	0.101	6.47E-03

La colorazione immunostochimica non ha evidenziato immunoprecipitati per HSP70, MDA e NT nei soggetti campionati a inizio sperimentazione e cioè non stressati; lievissime positività si sono riscontrate in rene, fegato e sistema nervoso centrale per il biomarcatore 4-Idrossinonenale.

Al contrario nei soggetti campionati a fine della sperimentazione i risultati sono riportati in tabella 14.

	NT HD		NT LD		HSP70 HD		HSP70 LD		MDA HD		MDA LD		HNE HD		HNE LD	
	Bold	Shy	Bold	Shy	Bold	Shy	Bold	Shy	Bold	Shy	Bold	Shy	Bold	Shy	Bold	Shy
<b>Rene</b>	++	+	+	+	+	+	-	++	-	-	-	-	+	+	++	+
<b>Fegato</b>	+	+	+	+	+	++	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<b>Milza</b>	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	++	+
<b>CNS</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<b>Branchie</b>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Tabella 14. Risultati delle colorazioni immunostochimiche considerando sia la densità di allevamento HD: 30 Kg/m<sup>3</sup> e LD 15 Kg/m<sup>3</sup> sia il carattere degli animali SCS. CNS: Sistema Nervoso Centrale. (+) presenza di immunoprecipitati solo in alcuni soggetti e in numero inferiore a 10 precipitati per organo; (++) presenza di immunoprecipitati in tutti i soggetti numericamente presenti precipitati tra 10 e 20; (+++) abbondante presenza di immunoprecipitati in tutti i soggetti in numero superiore a 20; (-) immunoprecipitati assenti in tutti i soggetti.

Dalla tabella si evince che in generale la tecnica immunohistochimica non fornisce chiare indicazioni sullo stato di salute dei pesci, ovvero non vi sono differenze significative di espressione dei biomarcatori, né tra le due densità di allevamento né considerando il comportamento degli animali. Allo stesso tempo si può vedere che NT è maggiormente evidenziata nella milza e alcuni immunoprecipitati sono stati riscontrati in rene, fegato e branchie.

HSP70 risulta un po' più espressa in soggetti shy in rene e fegato; HNE è uniformemente visibile in tutti i soggetti in tutti gli organi, con qualche positività maggiore nei soggetti bold in rene e milza. La malondialdeide, invece non è stata visualizzata in nessun organo di nessun animale.

### Esperimento di vaccinazione

#### Esperimento di vaccinazione

I pesci hanno mostrato un accrescimento continuo durante tutta la durata dell'esperimento (Figura 22), infatti, sono state registrate significative variazioni del peso corporeo (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ), con conseguente incremento della densità. La mortalità si è limitata, durante l'esperimento, ad un solo esemplare.

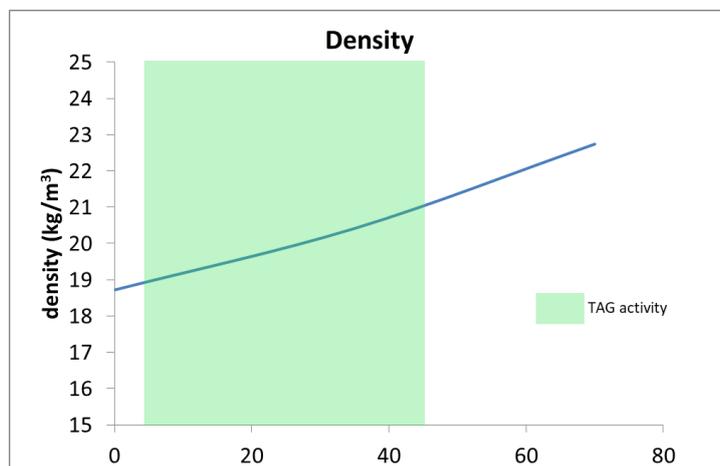


Figura 22. variazioni della densità di allevamento durante il periodo sperimentale. In verde è evidenziata l'estensione del periodo di attività dei tag.

Il monitoraggio continuo dell'attività di nuoto espressa dai pesci durante 42 giorni dell'esperimento ha contribuito a delineare l'effetto esercitato dalla vaccinazione sui gruppi sperimentali (profilo SCS) nel tempo (Figura 83, 24 e 25). In particolare, è stata descritta una correlazione positiva tra attività media diurna ed il tempo sia nel gruppo *Shy* (coefficiente di correlazione di Pearson:  $r = 0.604$ ,  $p < 0.05$ ) sia nel gruppo *Bold* ( $r = 0.686$ ,  $p < 0.05$ ). I livelli di attività medi dei pesci *Shy*, così come il tasso di consumo di ossigeno, estrapolato dalla curva di calibrazione (attività di nuoto =  $38.14 \pm 17.71$ ;  $MO_2 = 310.48 \text{ mgO}_2/\text{kg/h}$ ), sono risultati più elevati rispetto al gruppo *Bold* (attività di nuoto =  $35.84 \pm 16.47$ ;  $MO_2 = 296.46 \text{ mgO}_2/\text{kg/h}$ ) (Figura ) (t-test,  $p < 0.05$ ). Queste differenze sono state descritte precedentemente, nell'esperimento con le densità, negli animali allevati a bassa densità. Questi risultati rivelano che lo stress da densità è in grado nell'orata di modulare il comportamento, modificandone i livelli di attività natatoria.

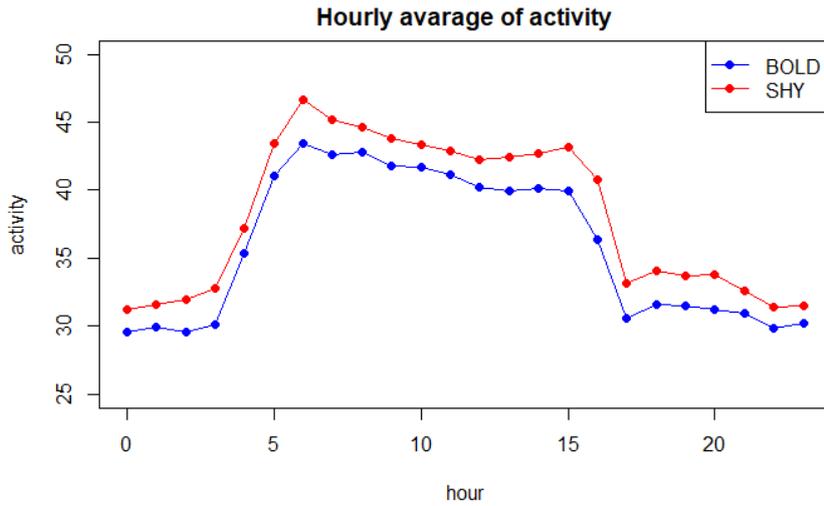


Figura 8. medie orarie dell'attività di nuoto nei due profili SCS (in rosso: gruppo *Shy*; in blue: gruppo *Bold*).

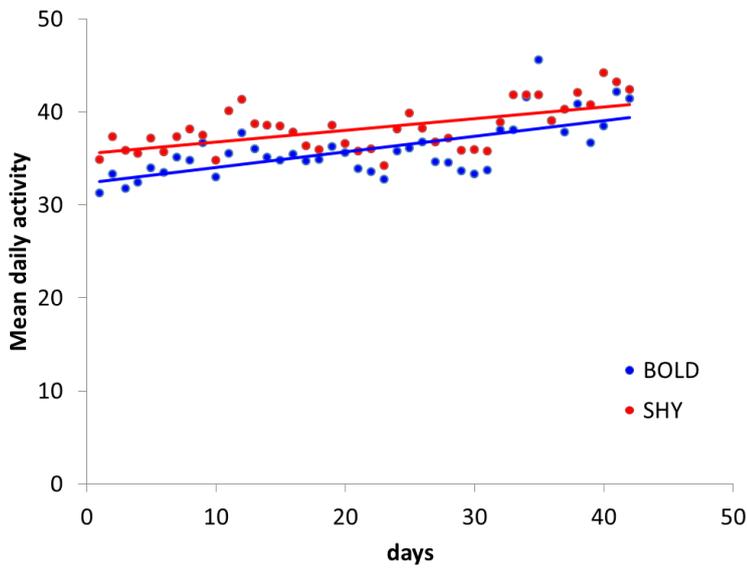


Figura 24. Tendenze temporali dell'attività si nuoto giornaliera (in rosso: gruppo *Shy*; in blue: gruppo *Bold*).

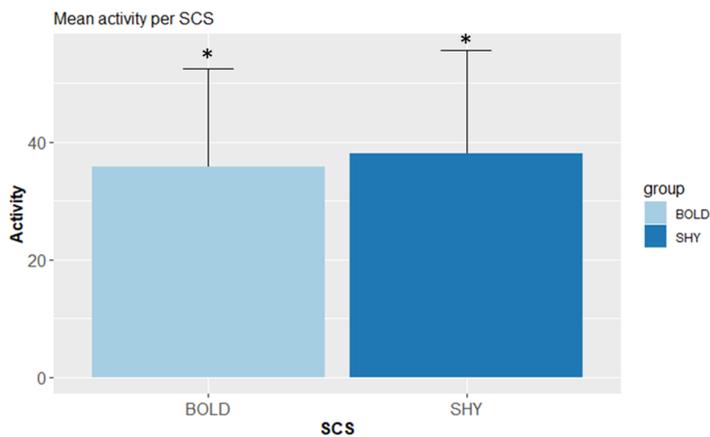


Figura 25. Attività di nuoto media nei due gruppi di SCS. Gli asterischi indicano le differenze significative tra i gruppi (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

I risultati dei parametri ematologici sono riportati in Figura 26 e 27. Sono riportati, in Figura 27, anche i risultati dei livelli sierologici relativi all'immunità aspecifica (lisozima, perossidasi, proteasi, antiproteasi e proteine totali). I parametri ematologici (Hb, HCT and RBCC) non hanno mostrato, durante tutta la durata dell'esperimento, variazioni significative tra i gruppi ed all'interno dei gruppi. Tutti i parametri immunologici hanno mostrato un'elevata variabilità tra i gruppi e nei gruppi e, complessivamente, non sono state rilevate differenze significative, tranne che per i livelli delle proteine totali (primi quattro riquadri in alto di Figura 27). In particolare il gruppo dei bold ha riportato i livelli di proteine totali più elevati degli altri gruppi ( $p < 0.05$ , Kruskal Wallis test), in particolare rispetto al gruppo Intermedi ate all'inizio dell'esperimento e del gruppo shy durante il secondo campionamento. Nei gruppi bold e shy i livelli di proteine totali si sono mantenuti costanti durante tutti i campionamenti. Soltanto nel gruppo Intermediate è stato registrato un incremento di questo parametro dopo il primo campionamento. Altre variazioni temporali sono state osservate nei livelli di antiproteasi e perossidasi. Infatti, in entrambi i gruppi si registra un drastico aumento dei valori in corrispondenza del secondo campionamento. Inoltre, nello stesso campionamento, i livelli di antiproteasi sono maggiori nei pesci bold rispetto a quelli del gruppo intermediate. Differenze significative di livelli di lisozima sono anche state rilevate, durante il secondo campionamento, tra il gruppo bold e quello shy. Dalla Figura 26 si evince quindi che solamente per il lisozima esiste una differenza significativa nei soggetti Bold tra tempo  $T_0$  e  $T_1$ . Nessuno degli altri parametri, invece, fornisce informazioni utili a discriminare la diversa risposta fisiologica degli animali sottoposti a vaccinazione intraperitoneale.

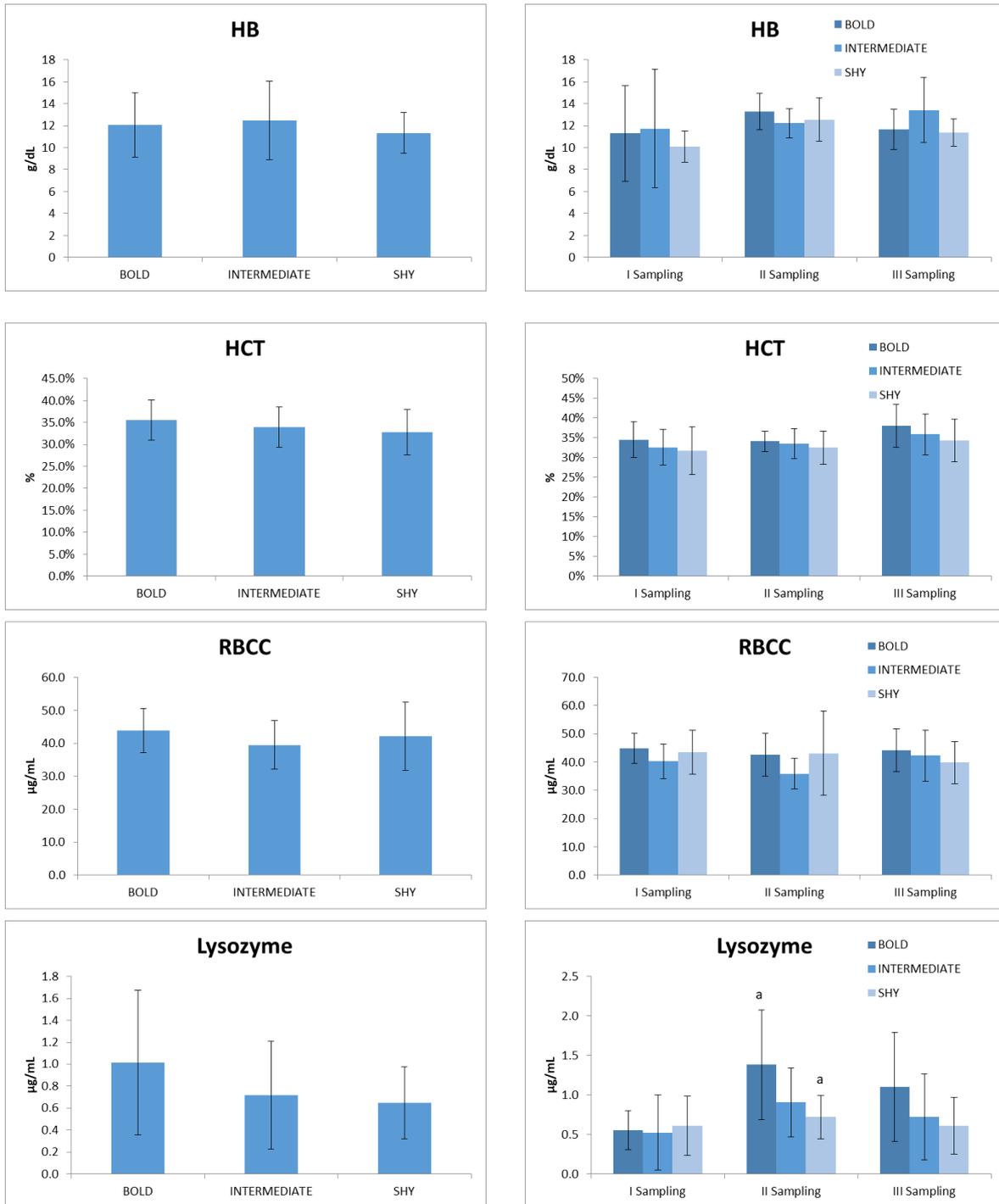


Figura 26. Valori dei parametri ematici per gruppo SCS (a sinistra) e per campionamento (a destra). La lettera "a" indica le differenze tra i gruppi SCS nello stesso campionamento (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ).

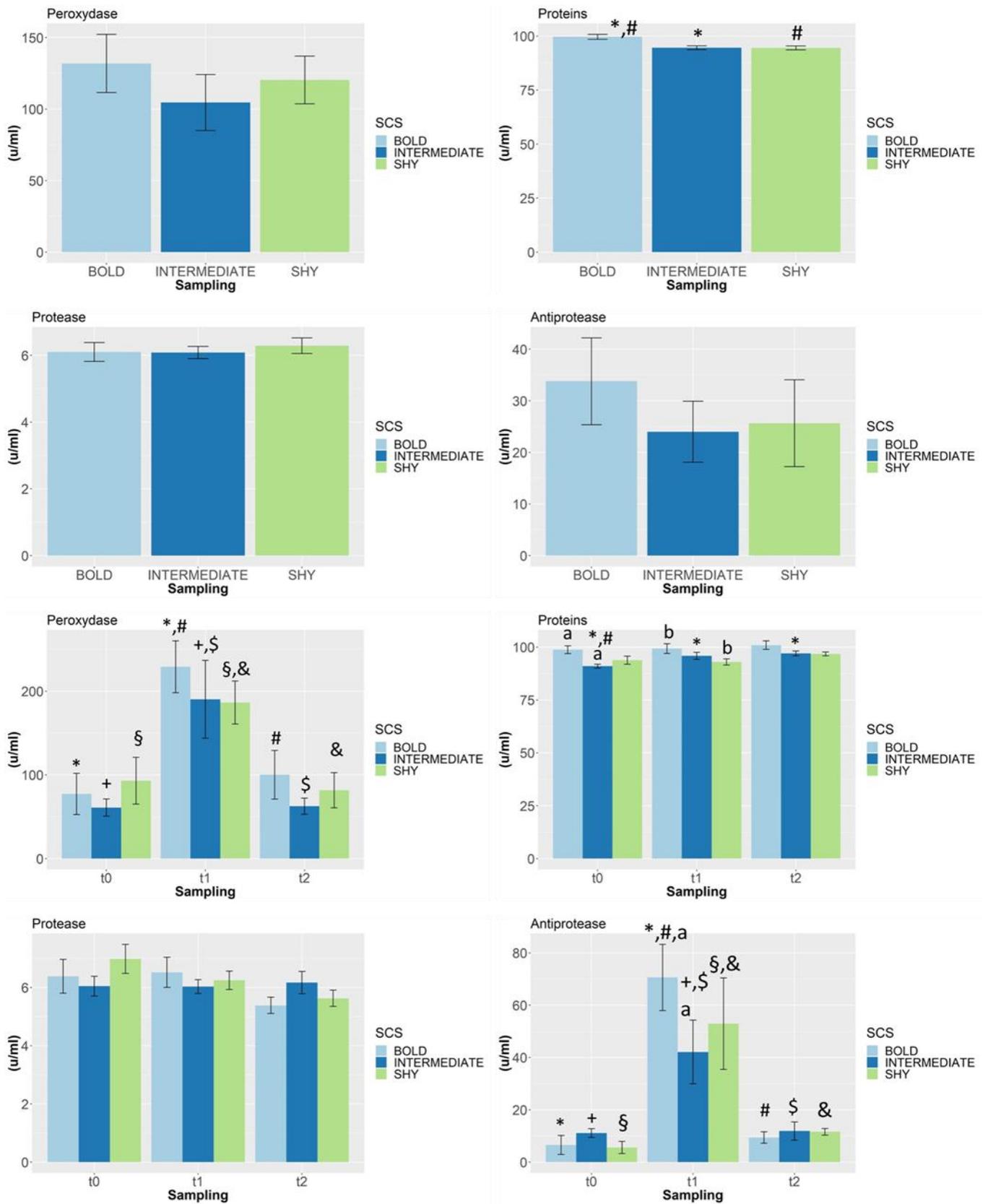


Figura 27. Valori dei parametri ematici relativi all'immunità aspecifica per gruppo SCS (a sinistra) e per campionamento (a destra). La lettera "a" indica le differenze tra i gruppi SCS nello stesso campionamento (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ).

Per quanto riguarda la risposta immunitaria specifica, i risultati sono riassunti nella tabella 15 e nelle figure 28, 29 e 30.

Fish	SCS	T0	T1	Delta % T0-T1	T2	Delta % T1-T2
2	<b>Bold</b>	874	1646	<b>88,3</b>	1472	<b>-10,5</b>
25	Interm.	1149	2152	87,2	1919	<b>-10,8</b>
9	<b>Bold</b>	1312	2279	73,7	1018	<b>-55,3</b>
19	Interm.	1054	1699	61,1	1428	<b>-15,9</b>
8	<b>Bold</b>	1115	1790	60,5	1655	<b>-7,5</b>
13	<b>Bold</b>	840	1339	53,4	1362	1,7
6	Shy	1371	2068	50,8	2268	9,6
1	<b>Bold</b>	1024	1535	49,9	<b>died</b>	na
11	Shy	860	1274	48,1	1303	2,2
14	<b>Bold</b>	1513	2241	48,1	2131	<b>-4,9</b>
26	Interm.	1109	1616	45,7	1759	8,8
3	<b>Bold</b>	1310	1883	43,7	1804	<b>-4,1</b>
23	Interm.	1154	1586	38,2	1827	15,1
4	Shy	963	1325	37,6	1280	<b>-4,5</b>
12	Shy	1421	1875	31,9	1750	<b>-6,6</b>
24	Interm.	1130	1540	26,6	1665	8,1
20	Interm.	860	1038	20,7	1023	<b>-1,4</b>
27	Interm.	1119	1407	20,4	1349	<b>-4,1</b>
17	Shy	1187	1425	20	1232	<b>-13,5</b>
18	Shy	1446	1689	16,8	1720	1,8
22	Interm.	1105	1289	16,6	1505	16,7
7	<b>Bold</b>	1625	1782	9,6	1904	6,8
5	Shy	890	966	8,5	1342	38,9
15	<b>Bold</b>	1394	1494	7,1	1415	<b>-5,2</b>
16	Shy	1350	1348	<b>-0,1</b>	1310	<b>-2,1</b>
21	Interm.	1315	1262	<b>-4</b>	1425	12,9
10	Shy	1069	971	<b>-9,1</b>	940	<b>-3,1</b>

Tabella 15: percentuali di incremento/decremento del titolo anticorpale (Delta) tra T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub> e tra T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>

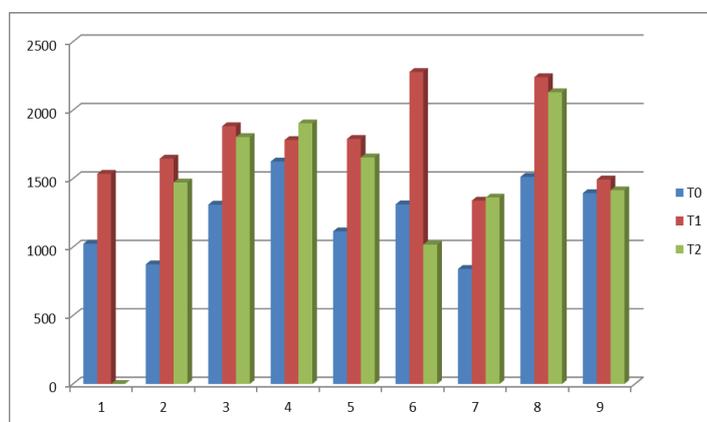


Figura 28: titolo anticorpale animali con SCS Bold

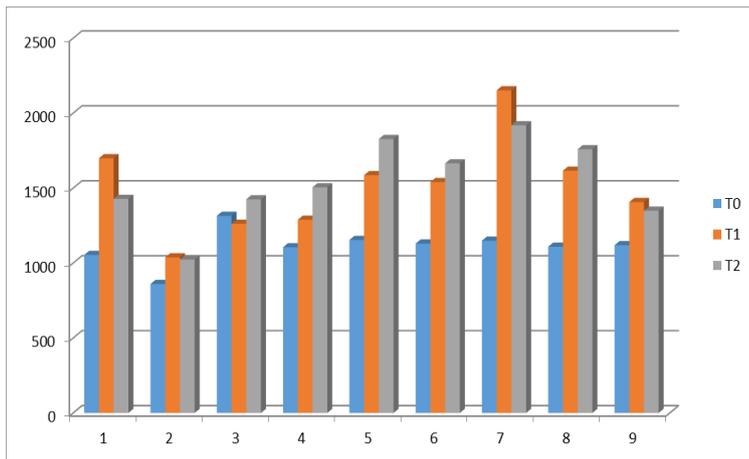


Figura 29: titolo anticorpale animali con SCS Intermediate

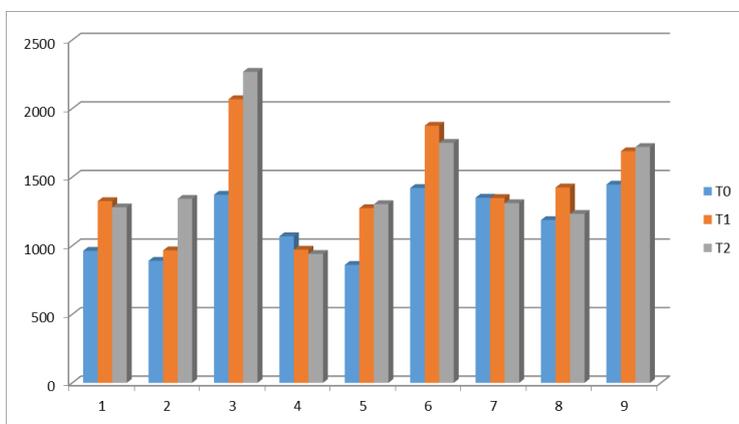


Figura 30: titolo anticorpale animali con SCS Shy

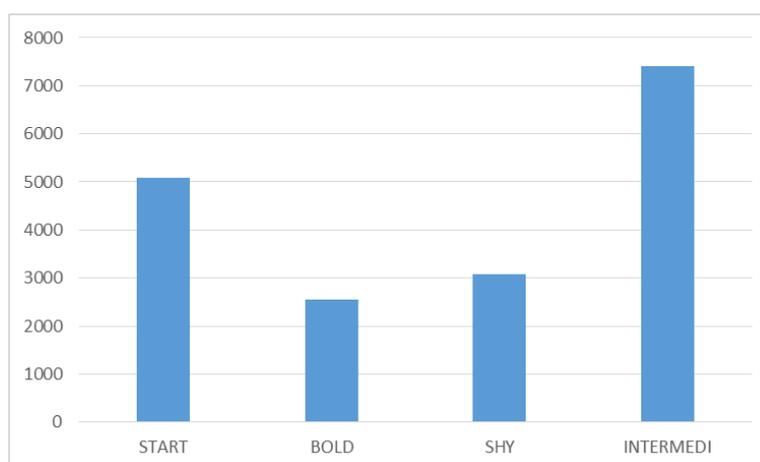
Dalla Tabella e dalle rappresentazioni grafiche si evince che 12/27 (44,4 %) orate hanno evidenziato un  $\Delta_{T0-T1}$  superiore al 40 % (da 43,7 a 88,3 %) e 7 di loro erano Bold, con i livelli più elevati di incremento del titolo anticorpale dopo 1 mese dalla vaccinazione. Dopo 2 mesi, invece, il titolo anticorpale resta tutto sommato stabile in 7/26 (26,9 %) animali o addirittura decresce in molti di essi (15/26m pari al 57,7 % dei soggetti vaccinati). Solo 3 soggetti hanno mostrato un titolo aumentato. I risultati delle analisi immunoistochimiche (Tabella 16) confermano quello precedentemente descritto nel paragrafo dei risultati della prova delle densità. La colorazione immunoistochimica non è discriminante tra le personalità dei pesci, il numero di immunoprecipitati riscontrati è il medesimo sia in pesci bold che shy.

È altresì vero che in questa prova gli animali non sono stati sottoposti a nessun fattore stressante e quindi trovare il medesimo numero di immunoprecipitati in entrambi gli animali era un risultato atteso, anzi conferma che la tecnica utilizzata è consolidata. La malondialdeide ha dato sempre esito negativo, come nella precedente sperimentazione.

	NT			HSP70			HNE		
	SHY	BOLD	INTERMEDIO	SHY	BOLD	INTERMEDIO	SHY	BOLD	INTERMEDIO
<b>RENE</b>	++	++	++	+	+	+	+	++	+
<b>FEGATO</b>	+	+	+	+	++	+	+	+	+
<b>MILZA</b>	++	++	++	-	+	-	++	+	+
<b>BRANCHIE</b>	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<b>CNS</b>	+	+	+	-	-	-	++	+	+

**Tabella 16. Risultati delle colorazioni immunostochimiche negli animali vaccinati. CNS: Sistema Nervoso Centrale. (+) presenza di immunoprecipitati solo in alcuni soggetti e in numero inferiore a 10 precipitati per organo; (++) presenza di immunoprecipitati in tutti i soggetti numericamente presenti precipitati tra 10 e 20; (+++) abbondante presenza di immunoprecipitati in tutti i soggetti in numero superiore a 20; (-) immunoprecipitati assenti in tutti i soggetti.**

Anche i risultati della Real-Time PCR (Figura 31) non mostrano differenze significative tra i pesci con diverse personalità, probabilmente perché gli animali sono stati posti solo a vaccinazione e non sono stati aggiunti ulteriori fattori stressanti. Allo stesso tempo, confrontando i risultati ottenuti nei soggetti soppressi a inizio delle due sperimentazioni, il valore basale di HSP70 nelle orate sembra essere confermato, permettendoci di poter considerare il metodo molecolare, da noi allestito, robusto ed affidabile.



**Figura 31. Rappresentazione della quantificazione media di HSP70 nei soggetti vaccinati, suddivisi per personalità. Start sono i 5 pesci soppressi a inizio sperimentazione non vaccinati.**

## BIBLIOGRAFIA

- Akaike, H. (1973) 'Information theory and an extension of the maximum likelihood principle', *International symposium on information theory*, (1973), pp. 267–281. doi: 10.1007/978-1-4612-1694-0.
- Brett, J. R. (1972) 'The metabolic demand for oxygen in fish, particularly salmonids, and a comparison with other vertebrates', *Respiration Physiology*, 14(1–2), pp. 151–170. doi: 10.1016/0034-5687(72)90025-4.
- Cannon, W. B. (1929) 'Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage', *Southern Medical Journal*. doi: 10.1097/00007611-192909000-00037.
- Carbonara, P., Scolamacchia, M., Spedicato, M. T., Zupa, W., McKinley, R. S. and Lembo, G. (2015) 'Muscle activity as a key indicator of welfare in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758)', *Aquaculture Research*, pp. 1–14. doi: 10.1111/are.12369.
- Castanheira, M. F., Conceição, L. E. C., Millot, S., Rey, S., Bégout, M.-L., Damsgård, B., Kristiansen, T., Höglund, E., Øverli, Ø. and Martins, C. I. M. (2017) 'Coping styles in farmed fish: consequences for aquaculture', *Reviews in Aquaculture*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 9(1), pp. 23–41. doi: 10.1111/raq.12100.
- Chandroo, K. P., Cooke, S. J., McKinley, R. S. and Moccia, R. D. (2005) 'Use of electromyogram telemetry to assess the behavioural and energetic responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to transportation stress', *Aquaculture Research*, 36(12), pp. 1226–1238. doi: 10.1111/j.1365-2109.2005.01347.x.
- Daniel, W. W. (1990) 'Kruskal–Wallis one-way analysis of variance by ranks', in *Applied Nonparametric Statistics (2nd ed.)*. Boston: PWS-Kent, pp. 226–234.
- Engel, G. L. and Schmale, A. H. (1972) 'Conservation-withdrawal: a primary regulatory process for organismic homeostasis', *Physiology, Emotion, and Psychosomatic Illness*. doi: 10.1192/bjp.123.2.237-a.
- Hanif, A., Bakopoulos, V. and Dimitriadis, G. J. (2004) 'Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae', *Fish and Shellfish Immunology*. doi: 10.1016/j.fsi.2004.04.013.
- Heath, A. G. (1995) 'Water Pollution and Fish Physiology', in *Water Pollution and Fish Physiology*. doi: 10.1063/1.4984362.
- 
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R. S. and Eliassen, R. a. (2003) 'The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity', *Aquaculture*. Elsevier, 221(1), pp. 549–566. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00111-X.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., De Jong, I. C., Ruis, M. A. W. and Blokhuis, H. J. (1999) 'Coping styles in animals: Current status in behavior and stress- physiology', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. doi: 10.1016/S0149-7634(99)00026-3.
- Lembo, G., Carbonara, P., Scolamacchia, M., Spedicato, M. T. and McKinley, R. S. (2007) 'Use of muscle activity indices as a relative measure of well-being in cultured sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)', *Hydrobiologia*, 582, pp. 271–280. doi: 10.1007/s10750-006-0538-9.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) 'Protein measurement with the Folin phenol reagent', *Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 193(1), pp. 265–275.
- Masee, K. C., Rust, M. B., Hardy, R. W. and Stickney, R. R. (1995) 'The effectiveness of

- tricaine, quinaldine sulfate and metomidate as anesthetics for larval fish', *Aquaculture*, 134(3–4), pp. 351–359. doi: 10.1016/0044-8486(95)00057-9.
- McFarlane, W. J., Cubitt, K. F., Williams, H., Rowsell, D., Moccia, R., Gosine, R. and McKinley, R. S. (2004) 'Can feeding status and stress level be assessed by analyzing patterns of muscle activity in free swimming rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)?', *Aquaculture*, 239(1–4), pp. 467–484. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.05.039.
  - Øverli, Ø., Pottinger, T. G., Carrick, T. R., Øverli, E. and Winberg, S. (2002) 'Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness', 395, pp. 391–395.
  - C. Poltronieri, L. Maccatrozzo, C. Simontacchi, D. Bertotto, B. Funkenstein, M. Patruno, G. Radaelli. 2007. "Quantitative RT-PCR analysis and immunohistochemical localization of HSP70 in sea bass *Dicentrarchus labrax* exposed to transport stress". *European Journal of Histochemistry*. 51(2): 125-136.
  - Quade, M. J. and Roth, J. A. (1997) 'A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules', *Veterinary Immunology and Immunopathology*. doi: 10.1016/S0165-2427(97)00048-2.
  - R Development Core Team (2018) *R Software, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. Available at: <https://www.r-project.org/>.
  - Ross, N. W., Firth, K. J., Wang, A., Burka, J. F. and Johnson, S. C. (2000) 'Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation', *Diseases of Aquatic Organisms*. doi: 10.3354/dao041043.
  - Zupa, W., Carbonara, P., Spedicato, M. T. and Lembo, G. (2015) 'Modelling swimming activities and energetic costs in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) during critical swimming tests', *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 48(5), pp. 341–357. doi: 10.1080/10236244.2015.1073456.



### E. Abstract ricerca per la pubblicazione Internet

Nella moderna acquacoltura i costi di produzione sono il maggior problema, comportando la necessità di adottare pratiche di allevamento intensivo. Di conseguenza i pesci allevati sono sottoposti a stressor sempre maggiori, che possono danneggiarne lo stato di salute e il benessere.

Inoltre è sempre più chiaro che la risposta individuale dei soggetti deve essere inclusa nel concetto di benessere. Tali differenze spesso comportano diverse risposte (Stress Coping Style) come reattività, aggressione e tendenza a seguire e sviluppare relazioni comportamentali abitudinarie. Spesso questi diversi comportamenti sono associati a variazioni del cortisolo e disfunzioni metaboliche o immunitarie. Nel progetto WINFISH sono stati valutati gli effetti dei sistemi a ricircolo sulla salute, benessere e performance produttive degli animali (branzino, orata, trota e salmone atlantico) in relazione anche ai differenti SCS. COISPA e IzsVe hanno valutato più specificatamente orate (*Sparus aurata*) allevate in sistemi a flusso continuo a diverse densità utilizzando tail beat sensors, testando tecniche di laboratorio classiche (IHC) o innovative (Real-Time PCR). In orate, durante la fase di ingrasso in impianti a flusso continuo, è stato valutato il benessere in relazione alla densità di allevamento, utilizzando indicatori come la curva di accrescimento ed il profilo metabolico. Questi parametri sono essenziali, in quanto rappresentano una risposta integrata di tutto l'organismo allo stress. Le performance fisiologiche, prima e dopo l'accrescimento a diverse densità (15 e 30 kg/m<sup>3</sup>), sono state valutate in pesci con differente SCS (proactive o *bold*; reactive o *shy*). I pesci erano dotati di sensori applicati sulla coda per misurare l'attività natatoria e metabolica. Infine sono stati valutati il profilo metabolico ed immunologico degli animali dopo essere stati vaccinati nei confronti della Vibriosi. I pesci hanno mostrato un accrescimento continuo durante tutta la durata dell'esperimento in entrambe le densità di allevamento. Sono state osservate differenze nei tassi di crescita tra i gruppi: un valore di SGR più elevato è stato esibito dal gruppo Low Density che ha anche riportato un maggiore aumento di peso acquisito. Inoltre, se anche differenze sono state osservate tra le due densità di allevamento, nessuna differenza significativa è emersa all'interno degli stessi gruppi quando sono stati presi in esame i differenti profili SCS. Per quanto riguarda il fattore di conversione, non sono state osservate differenze tra i gruppi. Inoltre, alla fine dell'esperimento, sono state registrate elevate percentuali di sopravvivenza (98.64% del totale dei pesci utilizzati nell'esperimento).

I risultati dell'analisi dei parametri ematici evidenziano una correlazione con il tempo mentre non sono state rilevate evidenze dell'effetto della densità o del profilo SCS. Il glucosio, nel gruppo HD, ha mostrato medie differenti tra i profili SCS e tra gli individui *bold* delle due densità all'inizio dell'esperimento, ma non nei campionamenti successivi. Allo stesso modo, sono state riscontrate differenze nei valori di lattato sia tra le densità sia tra i profili SCS. Il cortisolo e le catecolamine hanno mostrato una variazione nel tempo, diminuendo ai successivi campionamenti, mentre nel caso della noradrenalina, almeno nei primi due campionamenti, le differenze sono riconducibili sia a un effetto densità sia uno SCS. Il lisozima non ha mostrato variazioni significative tra i gruppi esaminati. Diversamente, i livelli di HSP70 si sono dimostrati un indice sensibile dello stress da densità nell'orata. Infatti, una maggiore espressione è stata riscontrata nel gruppo ad alta densità (HD). Inoltre, le differenze osservate nell'espressione delle proteine HSP70 nei vari organi si sono mantenute costanti nei vari gruppi densità-SCS. I livelli più bassi di espressione sono stati a carico del sistema nervoso centrale (CNS). Al contrario, la concentrazione più elevata è stata rilevata nelle branchie e nel rene, organi maggiormente coinvolti nella risposta a condizioni di stress ambientale. Per quanto riguarda la risposta alla vaccinazione contro la Vibriosi, la maggior parte dei soggetti Bold ha reagito positivamente con un significativo incremento della risposta



anticorpale dopo 1 mese dalla vaccinazione ( $T_1$ ), associata ad un incremento dell'attività del lisozima. Purtroppo tale risposta non è stata confermata a 60 gg dalla vaccinazione ( $T_2$ ) per cui saranno necessari ulteriori prove sperimentali, alla luce anche dei risultati non significativi ottenuti testando la HSP70 e i marker di stress ossidativo (malondialdehyde -MDA, Nitrotyrosina -NT e 4-Hydroxynonenal – HNE).

## F1. Prodotti della Ricerca (correlati al progetto)/Outputs

### Elaborati

- A. Tesi corso di laurea magistrale in Biotecnologie per l'alimentazione. Sviluppo di metodi molecolari ed istologici per la rilevazione di biomarcatori di stress ossidativo in branzino (*Dicentrarchus labrax*). Università degli Studi di Padova. (Dr.<sup>ssa</sup> Fiocchi Eleonora).

### Diffusione dei risultati

- Fiocchi E., Manfrin A., Winberg S., Bégout M.L., Roque A., Villarroel M., Lembo G., Gesto M. (2016). Benessere, salute ed individualità in acquacoltura: il progetto WIN-FISH. Book of abstract XXII Convegno nazionale Soc. Italiana Patologia Ittica, San Michele all'Adige (TN), p.57.
- Fiocchi E., Civettini M., Pretto T., Basaglia M., Manfrin A. (2017) Sviluppo di metodi molecolari ed istologici per la rilevazione di biomarcatori di stress ossidativo in branzino (*Dicentrarchus labrax*) e orata (*Sparus aurata*). Book of abstracts XXIII Convegno Nazionale S.I.P.I. Lecce Fiocchi E., Pretto T., Mangolini M., Zambon M., Manfrin A., Arcangeli G. (2017)
- E. Fiocchi<sup>1</sup>, M. Civettini, T. Pretto, M. Basaglia, A. Manfrin. (2017) Development of molecular and histological methods to evaluate stress oxidative biomarkers in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Book of abstract International Conference Aquaculture Europe 2017, p. 386.(I.F. 1,989).
- Fiocchi E., Pretto T., Mangolini M., Zambon M., Manfrin A., Arcangeli G. (2017) Prove preliminari di ricerca e localizzazione di biomarcatori di stress ossidativo in vongola verace (*Ruditapes philippinarum*) e vongola (*Chamelea gallina*). Book of abstract VI Convegno Nazionale SIRAM. San Benedetto del Tronto (PE), pp. 33-34.
- W. Zupa, P. Carbonara, E. Fiocchi, A. Manfrin, M. T. Spedicato, G. Lembo (2018) Personality screening in reared *Sparus aurata*/Selezione della personalita' in *Sparus aurata* allevate 49° Congresso della Società Italiana di Biologia Marina Cesenatico (FC), 4-8 giugno 2018

### Linee guida/protocolli operativi

- Protocollo vaccinale nei confronti della Vibriosi da *Vibrio anguillarum* in orate (*Sparus aurata*) durante la fase di accrescimento



*Ministero della Salute*

<b>F.2 Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate/Peer review papers</b>
3 pubblicazioni peer review verranno inserite in uno special issue Fish Welfare ....
<b>G. Costo Complessivo del progetto- Finanziamento Ministero Salute</b>
Costo Complessivo progetto: 448.954,24
Finanziamento Ministero Salute: 445.500

**Il Responsabile Scientifico**  
**Dr. *Amedeo Manfrin***  
*(firmato digitalmente)*