

**Programma di Azione Nazionale per l'Agricoltura Biologica e i Prodotti
Biologici per gli anni 2008 e 2009 – Azione 2.2)**

*Sperimentazione degli effetti di diverse densità di allevamento sul benessere dei
pesci e sulla qualità del prodotto in un modulo di acquacoltura biologica*

Acronimo: BIOLFISH

Responsabile: Giovanni B. Palmegiano
U.O. CNR ISPA
ISPA – CNR Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Torino)

Tel: 011 6709232
Fax: 011 6709297
Email: giovanni.palmegiano@ispa.cnr.it

“Questo studio è stato condotto con il contributo del Ministero per le Politiche Agricole e Forestali, Direzione SAQ X, esso non riflette necessariamente il punto di vista dell'Amministrazione e non anticipa in alcun modo le future decisioni gestionali”.

Parole Chiave: Allevamento biologico, Trota iridea, Densità, Benessere, Alimentazione, Ambiente, Qualità nutrizionale, Qualità organolettica.

RIASSUNTO

L'applicazione pratica dei principi e delle prescrizioni contenute nel Reg. CE 710/2009 all'acquacoltura biologica richiede uno specifico approfondimento dal punto di vista tecnico-scientifico. Le principali tematiche di rilevanza strategica che richiedono un approfondimento, in relazione allo sviluppo dell'acquacoltura biologica, possono essere sintetizzate come segue: performance zootecniche; alimentazione dei pesci; risposta fisiologica integrata e benessere nei pesci; impatto ambientale; qualità nutrizionale e organolettica. Il rationale è che, in condizioni di densità più elevata, le performance zootecniche dovrebbero deteriorarsi perché l'energia globale è veicolata verso i meccanismi endogeni di mitigazione dello stress.

ABSTRACT

The practical application of the principles and rules contained in EC Regulation 710/2009 for organic aquaculture requires a specific depth from the point of view of technical and scientific. The main topics of strategic importance that need further attention, in relation to the development of organic aquaculture, can be summarized as follows: zootechnical performances, fish feeding, and integrated physiological response in fish welfare, environmental, nutritional and organoleptic quality. The rationale is that, in conditions of higher density, the zootechnical performances should deteriorate because the global energy is conveyed towards the endogenous mechanisms of mitigation of stress.

INTRODUZIONE

La qualità delle carni di un pesce allevato è in stretta dipendenza con la qualità della filiera produttiva. La qualità e composizione dell'alimentazione, la densità dei pesci in una vasca o gabbia, fattori ambientali, le modalità di uccisione ed il successivo trattamento di manipolazione e conservazione hanno influenza sulle caratteristiche organolettiche e sulla composizione corporea del pesce. Densità elevate e diete a consistente livello di proteina vegetale possono indurre stress cronico a livello dell'orletto a spazzola dell'intestino; si può indurre cioè uno stato di sofferenza di bassa intensità che non appare con i normali controlli zootecnici, ma che si manifesta nel lungo periodo sulla qualità del prodotto.

Il regolamento 710/2009 pone in modo insistente l'accento sul benessere in particolare l'articolo 25 septies, sulle Norme generali in materia di allevamento, afferma chiaramente che gli animali di acquacoltura devono disporre di spazio sufficiente e che per determinate i coefficienti di densità, indicati nell'allegato XIII bis, vanno determinati in funzione di alcuni parametri quali pinne danneggiate, altre lesioni, indice di crescita, comportamento manifestato e stato di salute generale. Inoltre al punto 10 dell'incipit del regolamento si dice che: "La produzione di animali di acquacoltura biologica deve garantire il rispetto delle esigenze proprie di ciascuna specie animale". Attualmente negli allevamenti italiani convenzionali, a meno che non si usi ossigeno liquido, raramente si raggiungono i 20kg m⁻³, cosicché già oggi per la densità tutti gli allevatori potrebbero definirsi "produttori biologici".

Tuttavia, risultati contraddittori emergono nella review di Ellis e Glasscock (2004), nella quale alcuni autori britannici hanno esaminato 43 diversi studi dell'effetto della densità in allevamenti convenzionali in sistemi a ricircolo e in gabbie collocate in ponds; hanno concluso che i risultati non sono risolutivi poiché tanti sono i parametri che influenzano il benessere. L'EFSA nella Scientific Opinion del 2008, dice che la densità di stoccaggio, il flusso di acqua e la distribuzione di cibo influenzano tutti le aggressioni e che non sono disponibili in letteratura strategie pratiche per minimizzare il problema.

Stevenson (2007) riporta che la letteratura indica che la densità è importante in quanto è uno di una serie di fattori, tra cui la qualità dell'acqua, la portata di acqua in ingresso e tipo di alimentazione, che interagiscono per determinare la densità di allevamento benessere del salmone d'allevamento e trote. Ellis e gli altri (2004) conclusero che la densità è "un fattore importante per il benessere dei pesci, ma non può essere considerata separatamente da altri fattori ambientali".

E' ovvio che una correlazione diretta non è possibile, inoltre gli studi citati non sono omogenei quanto a parametri di allevamento. Tuttavia anche Ellis e Glasscock (2004) ammettono che al crescere della densità, da 50 a 170 kg m⁻³ diminuiscono gli indici di crescita e resa, e aumentano le lesioni alle pinne che loro attribuiscono a "social aggressions", senza darne una definizione, probabilmente si tratta di aggressioni per il cibo immesso in vasca come conferma l'EFSA (2008): "Intra-specific aggression is a cause of poor welfare, causing for example fin damage and reduced access to food and others".

Inoltre, al crescere della densità c'è un significativo aumento del cortisolo plasmatico (Mazur e Iwama (1993) ed una minore sopravvivenza (Sirakov and Ivancheva, 2008).

Nel Nord Europa vi è chi ritiene ammissibile l'uso dell'ossigeno liquido, necessario nei sistemi convenzionali a ricircolo; con questo supporto certamente si ottiene un'ottima ossigenazione delle acque pari a quella ottenibile con basse densità di stoccaggio. Tuttavia, gli studi che sostengono le alte densità fanno riferimento ad un momento storico in cui si privilegiava la quantità rispetto alla qualità e paradossalmente si tratta di lavori scientifici effettuati in quei paesi che non hanno mai avuto grandi produzioni di trote, ma che oggi sono tra i pionieri del biologico.

L'applicazione pratica dei principi e delle prescrizioni contenute nel Reg. CE 710/2009 all'acquacoltura biologica richiede uno specifico approfondimento dal punto di vista tecnico-

scientifico, oggetto del presente studio. Infatti, mentre sui diversi aspetti relativi all'acquacoltura convenzionale esiste una copiosa letteratura scientifica, non esistono sufficienti informazioni relative all'impatto dell'applicazione di uno standard di produzione biologica in termini di qualità del processo, oltre che del prodotto.

Pertanto le principali tematiche di rilevanza strategica che sono state approfondite, in relazione allo sviluppo dell'acquacoltura biologica, possono essere sintetizzate come segue.

1. **Performance zootecniche.** Ricostruire la risposta delle specie allevate con uno standard di produzione biologico, tenendo conto delle componenti fondamentali del sistema: crescita, qualità, redditività, impatto.
2. **Alimentazione dei pesci.** Verificare la rispondenza dei mangimi biologici ai fabbisogni nutrizionali delle diverse fasi del ciclo vitale.
3. **Risposta fisiologica integrata e benessere nei pesci.** Descrivere le “risposte biologiche” comportamentali e funzionali derivate dalla misura del budget energetico speso, nelle diverse fasi del ciclo produttivo, in relazione a fattori quali la densità, la qualità dell'ambiente di coltura, l'alimentazione, etc.
4. **Impatto ambientale.** Valutare la compatibilità con un agrosistema sano e sostenibile dei livelli di concentrazione di nutrienti nei reflui di un allevamento biologico.
5. **Qualità nutrizionale e organolettica.** Caratterizzare le relazioni tra protocolli di allevamento e qualità alimentare per l'uomo, mediante l'analisi della composizione chimico-fisica e dietetico-nutrizionale dei filetti del pesce allevato in regime biologico.

Valutazione delle prestazioni, della qualità della carne in termini compositivi e sensoriali e della qualità dell'acqua di trote allevate a due diverse densità.

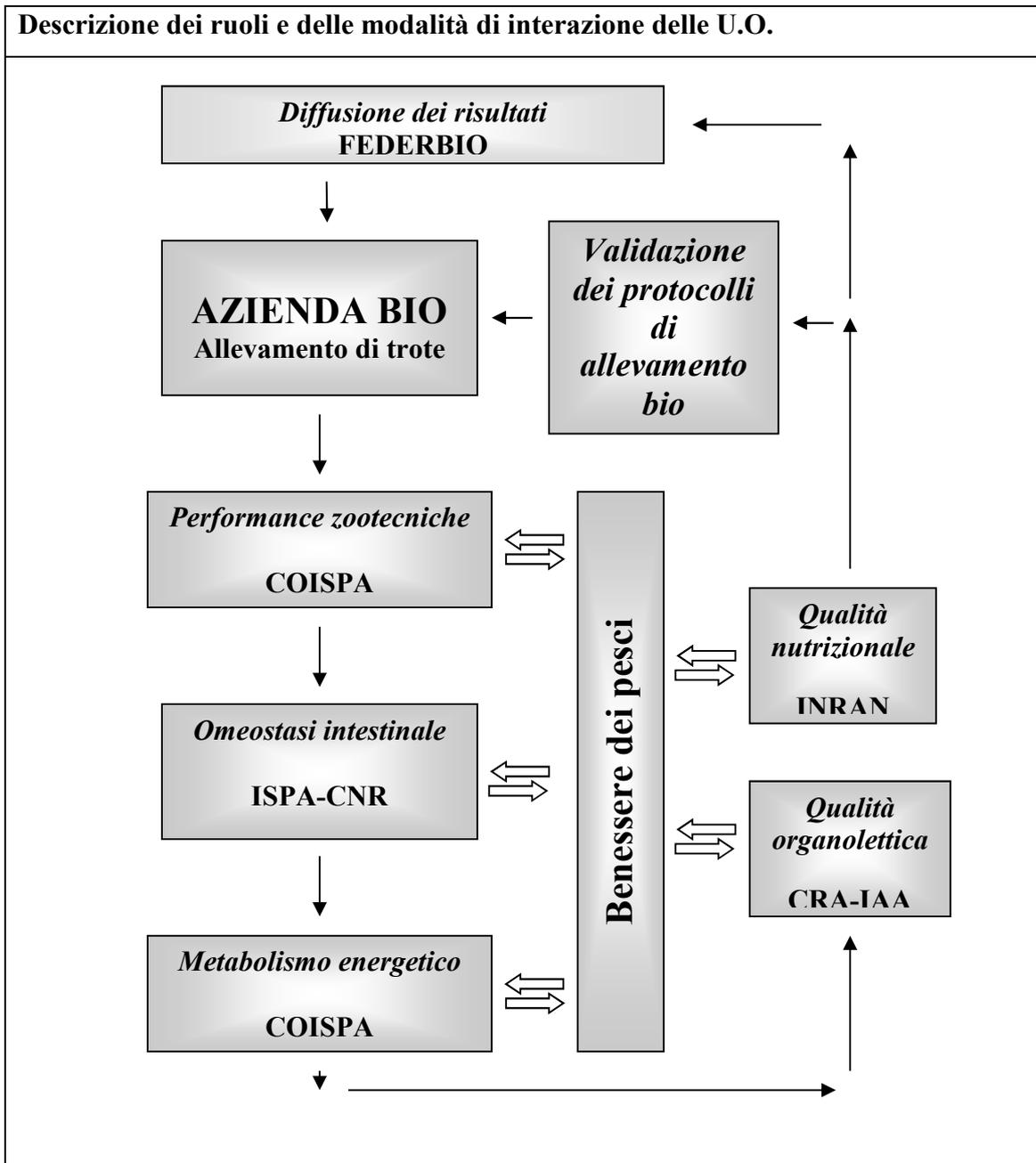
Dopo un primo sopralluogo e una serie di contatti con un allevatore trentino ci si è spostati presso un allevamento friulano dove si sta svolgendo la prova, l'Azienda agricola Caio di proprietà del dott. Pier Antonio Salvador di Porcia (PN), azienda che ha già deciso di avviare le procedure per la produzione biologica.

La parte sperimentale del progetto Biofish in corso consiste nel seguire due lotti di produzione paralleli di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), dalla fase di trotelle alla taglia commerciale, a cui si sta somministrando, rispettivamente, un mangime convenzionale ed un mangime biologico con ridotto contenuto in farine di pesce. Per entrambi i lotti saranno rispettate le prescrizioni del Reg. 710/2009, in particolare con una densità di allevamento pari a iniziale di 10 e 15 kgm⁻³, allo scopo di verificare l'influenza sul risultato finale della diversa alimentazione, in assenza di altre possibili interferenze dovute ad altri fattori. Il mangime è stato fornito da un'azienda che ha già iniziato la produzione di mangimi biologici certificati sulla base di standard volontari.

Il risultato finale della prova è valutato in termini di: performance zootecniche, alimentazione dei pesci, risposta fisiologica integrata e benessere nei pesci, impatto ambientale, qualità nutrizionale, qualità organolettica.

L'attività svolta e coordinata tra tutte le Unità Operative partecipanti al progetto e, in funzione delle prove di allevamento, è stata focalizzata sullo studio della risposta complessiva delle trote allevate a due diverse densità di riferimento (15 e 25 kgm⁻³) ed alimentate con mangime biologico a ridotto contenuto in farine di pesce.

**STRUTTURA DEL PROGETTO,
Unità operative, loro relazioni, ruoli e attività affidate**



Unità Operative loro ruolo e attività affidate

Il progetto è stato strutturato in work package coordinati dai partner.

WP1 Performance zootecniche.	UO coordinatrice COISPA	Responsabile dott. G. Lembo
WP2 2 Omeostasi intestinale.	UO coordinatrice ISPA	Responsabile dott. G.B. Palmegiano
WP3 Risposta fisiologica integrata e benessere nei pesci.	UO coordinatrice COISPA	Responsabile dott. G. Lembo
WP4 Impatto ambientale.	UO coordinatrice ISPA	Responsabile dott. G.B. Palmegiano
WP5 Qualità nutrizionale.	UO coordinatrice INRAN	Responsabile dott.ssa E. Orban
WP6 Qualità organolettica.	UO coordinatrice CRA-IAA	Responsabile dott. R. Lo Scalzo
WP7 Attività divulgative.	UO coordinatrice Federbio	Responsabile dott. P. Carnemolla

Ricercatori e tecnici coinvolti nella ricerca: Giulia Bianchi, Pierluigi Carbonara, Francesco Gai, Laura Gasco, Maurizio Grassi, Giuseppe Lembo, Roberto Lo Scalzo, Fabio Lovati, Elena Orban, G.B. Palmegiano, Piergiorgio Peiretti, Anna Rizzolo, Giuseppe Strazzullo.

OBIETTIVI GENERALI

La scelta di un corretto rapporto tra densità di allevamento, benessere dei pesci e convenienza economica è un elemento cruciale per lo sviluppo dell'acquacoltura biologica. Con il progetto BIOLFISH si intende verificare, sul piano sperimentale, se determinati livelli di densità inducano condizioni critiche, ed il limite oltre il quale si riscontra un deterioramento del benessere dei pesci allevati ed un aumento dei rischi di diminuzione della convenienza economica.

E', inoltre, di estrema importanza per gli allevatori che volessero praticare oggi l'acquacoltura biologica poter documentare, con risultati di prove sperimentali, che la qualità del prodotto finito è negativamente correlata con l'aumento della densità di allevamento. Ed, inoltre, che si possono ottenere buone performance zootecniche, oltre ad una mitigazione dell'impatto ambientale, contenendo le densità di allevamento e, di conseguenza, i costi di produzione.

La parte sperimentale del progetto BIOLFISH sarà svolta in un allevamento e consisterà nel seguire due lotti di produzione paralleli di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), dallo stadio di trotella alla taglia commerciale, a cui sarà somministrato un mangime biologico con ridotto contenuto in farine di pesce. I due lotti saranno allevati rispettivamente a 15 e 25 kg/mc, che sono le due densità, minima e massima, consentite dal Reg. CE 710/2009 per le diverse specie di salmonidi. Per entrambi i lotti saranno rispettate le altre prescrizioni del Reg. CE 710/2009, allo scopo isolare l'effetto densità sul risultato finale, in assenza di altre possibili interferenze dovute ad altri fattori. Il mangime biologico sarà prodotto da un'azienda nazionale che ha già iniziato, recentemente, la produzione di mangimi biologici certificati sulla base di standard volontari. Le prove sperimentali saranno svolte in un'azienda che ha già deciso di avviare le procedure per la produzione biologica. Entrambe le aziende hanno partecipato alle fasi preparatorie della proposta progettuale. Il risultato finale della prova sarà valutato in termini di: performance zootecniche, omeostasi intestinale, risposta fisiologica integrata e benessere nei pesci, impatto ambientale, qualità nutrizionale, qualità organolettica.

OBIETTIVI SPECIFICI

Obiettivi specifici del Work Package 1

Performance zootecniche

In acquacoltura gli indici più importanti in grado di descrivere la massimizzazione della redditività e la minimizzazione dell'impatto ambientale, sono l'accrescimento e la conversione alimentare. Tali indici di performance sono descrittori sintetici che incorporano informazioni di tipo fisiologico e zootecnico relative all'organismo allevato. In particolare, per testare gli effetti di diversi regimi alimentari, o di specifiche condizioni ambientali, sono utilizzati ulteriori indici che forniscono elementi di valutazione circa gli apporti proteici e dei grassi (Luzzana et al., 2005; Bendiksen et al., 2002, Jobling, 2003). Il rationale è che, in condizioni di densità più elevata, le performance zootecniche potrebbero deteriorarsi perché l'energia globale è veicolata verso i meccanismi endogeni di mitigazione dello stress. In questo studio saranno quindi monitorati i principali indicatori di performance zootecnica, sia a livello di individuo che di popolazione. A livello individuale, le performance di crescita saranno stimate mediante l'incremento ponderale standardizzato (I) il tasso specifico di crescita (SGR), l'indice di condizione di Fulton (IC), l'indice epatosomatico (HSI), l'indice viscerosomatico (VSI), il coefficiente di adiposità CF. A livello di popolazione, le performance di allevamento saranno valutate stimando i seguenti indici: l'incremento in biomassa (IB), il tasso di assunzione giornaliero di alimento (DFI), l'indice di conversione (FCR), il consumo individuale giornaliero di alimento (F), l'efficienza di conversione

(GCE) ed il tasso di efficienza proteica (PER). Gli indicatori di performance zootecnica a livello individuale saranno stimati campionando, per ciascun lotto di trattamento e di controllo, 50 individui ogni due mesi. I dati saranno analizzati utilizzando l'approccio dei generalized linear model (GLM). Tali indicatori saranno utilizzati per ricostruire, nell'ambito dei concetti della qualità totale, un quadro sintetico di risposta degli organismi, tenendo conto delle componenti fondamentali del sistema: crescita, qualità, redditività, impatto.

Obiettivi specifici del Work Package 2

Omeostasi intestinale e Analisi istologiche

Campionamento e colorazioni

All'inizio ed alla fine della prova, cinque/sei pesci per ciascun trattamento sono stati soppressi 6 ore dopo l'ultimo pasto mediante overdose di anestetico (olio di garofano).

Da questi furono prelevati campioni di intestino prossimale e distale e fegato che vennero fissati in formalina 4% tamponata (pH 7,2). Le vials con i campioni saranno mantenuti a 4°C in attesa delle analisi. Dopo una settimana, sono stati fissati i pezzi in paraffina, seguendo le procedure istologiche standard.

Con il microtomo si taglieranno sezioni dello spessore di 5 µm e messe su vetrini da microscopio per le successive colorazioni. I tessuti campionati saranno colorati con il normale metodo ematossilina-eosina di Mayer e saranno fatte più sezioni di fegato; in particolare queste saranno colorate con PAS, PAS diastase e Sudan Black. La colorazione PAS diastasi è necessaria per discriminare le reazioni PAS positive, dovute al glicogeno, dalle altre positività PAS, come avviene talvolta per la presenza di mucopolisaccaridi e glicoproteine. La colorazione Sudan permetterà di evidenziare la possibile presenza di sostanza ceroidale.

Obiettivi specifici del Work Package 3

Risposta fisiologica integrata e benessere nei pesci

Indicatori operazionali dell'attività di nuoto, come l'abilità di nuoto sostenuto (misurata mediante Ucrit) e di attività muscolare (misurata mediante elettromiogrammi, EMG) consentono di correlare lo stato generale di salute dei pesci, sia a variazioni dei parametri ambientali (temperatura, profondità, etc.), sia a variazioni della densità di allevamento, sia a variazioni nell'alimentazione. In questo studio sarà valutata la capacità critica di nuoto (Ucrit), misurata in camera di Blaska (Blaska *et al.*, 1960), per definire la baseline indispensabile per la calibrazione e l'interpretazione dell'EMG, che rappresenta l'indicatore della risposta integrata dell'intero organismo allo stress elettivamente misurato in questo studio.

I recenti sviluppi della telemetria fisiologica e della sensoristica consentono, infatti, di monitorare i livelli di attività muscolare su animali liberi di muoversi sia nell'ambiente naturale (Weatherley *et al.*, 1996; Okland *et al.*, 2002), sia in vasche di allevamento ed in gabbie (Beddow e McKinley, 1999; McFarlane *et al.*, 2004). Sarà quindi possibile correlare i livelli di attività muscolare, mediante la misura degli EMG, in risposta alle diverse densità di allevamento adottate. La calibrazione fra velocità critica di nuoto, EMG e consumo di ossigeno consentirà di stimare la spesa energetica in corrispondenza di determinati livelli di attività, sia in termini di metabolismo aerobico che anaerobico (McKinley e Power, 1992; Cooke *et al.*, 2000; Geist *et al.*, 2000).

Le tecniche di telemetria fisiologica saranno applicate per lo studio della capacità aerobica ed anaerobica dei pesci e consentiranno di misurare la risposta in termini di EMG, sia in camera di Blaska, sia in condizioni di "remote sensing". Per gli esperimenti in camera di Blaska saranno utilizzati almeno 10 individui per i diversi scacchi di taglia. Mentre, in condizioni di "remote sensing", saranno monitorati almeno 30 individui.

Agli indicatori dell'attività di nuoto, allo scopo di completare il quadro diagnostico, sarà affiancata la misura dei principali parametri ematici, quali ad es. globuli rossi totali (RBCC), volume medio cellulare (MCV), contenuto cellulare medio di emoglobina (MCH), concentrazione media cellulare di emoglobina (MCHC), lattato, cortisolo, glicemia, insieme alla concentrazione di emoglobina (Hb) ed all'ematocrito (Hct). In questo studio, i parametri ematici dello stress saranno analizzati su campioni di sangue intero o di plasma, con metodiche istologiche, spettrofotometriche, spettrofluorimetriche. I parametri ematici dello stress saranno analizzati all'inizio ed alla fine dell'esperimento, per un totale di circa 100 campioni.

Obiettivi specifici del Work Package 4

Impatto ambientale

In letteratura non vi sono esperienze sperimentali riconducibili ad impianti gestiti con metodo biologico. Mentre, numerosi sono gli studi sull'escrezione azotata, sia in laboratorio sia in impianti produttivi convenzionali. Ciò è dovuto all'esigenza di costruire modelli predittivi per minimizzare gli effetti di un'attività zootecnica che di per sé concentra i nutrienti e quindi può incidere in modo profondo sulla qualità delle acque dei corpi idrici che ricevono i reflui delle trosculture. Per poter includere la piscicoltura in un agrosistema sostenibile è necessario che le concentrazioni di ammonio e fosforo presenti nei reflui siano contenute a livelli accettabili e rispettosi delle leggi vigenti. In ricerche passate il contenuto di ammonio nei reflui di piscicoltura intensive era molto variabile per effetto delle attività di gestione degli impianti; ad esempio ogni qualvolta i pesci vengono indotti ad aumentare l'attività motoria si assiste ad un incremento della concentrazione di ammonio oltre 1 mg/l, dovuto alla risospensione dei residui presenti sul fondo delle vasche e rappresentato da feci, alimento non consumato e materiale organico trasportato dall'acqua dai canali che alimentano gli impianti. Un altro elemento che introduce variabilità di risposta è la tipologia dell'impianto, di alta quota con temperature basse (5-10°C) o di bassa quota con temperature più alte (12-14°C). Inoltre, c'è una diversa risposta di natura fisiologica dovuta alla somministrazione dell'alimento che provoca prima un'escrezione per via urinaria e branchiale e poi, dopo qualche ora, una fecale; questi picchi sono in relazione al numero delle somministrazioni della razione alimentare durante il giorno, che possono arrivare fino a quattro nelle trotelle e una o due nel finissaggio. Negli allevamenti convenzionali la concentrazione di azoto oscilla da 4,3 µg h⁻¹ in trotelle a digiuno, e fino a 12-14 µg h⁻¹, con punte di 400µg h⁻¹, in situazioni limite (e.g. al momento della raccolta del pesce per la vendita). Per il fosforo si va da un minimo di 0,011 ad un massimo di 0,095 mg l⁻¹, mentre per il fosforo solubile si va da 100 a 1500 mg h⁻¹. E' possibile che in impianti che utilizzano il protocollo biologico con trote alimentate con diete a basso contenuto di farina di pesce altamente digeribile (≈90%), ma con una presenza di proteina vegetale meno digeribile l'escrezione sia maggiore. Questo è uno degli elementi chiave di valutazione. La variabilità alta dei risultati di letteratura, suggerisce un numero molto elevato di determinazioni, infatti, oltre che a monte, in modo random, a valle delle vasche di allevamento si monitoreranno i livelli di azoto e fosforo nelle acque reflue. Si determineranno azoto e fosforo nel corso di cicli giornalieri, ad intervalli di un'ora per 16 ore al giorno e per due giorni ogni due mesi durante tutto il ciclo di ingrasso, da trotelle fino alla taglia commerciale. Le determinazioni saranno effettuate per via colorimetrica con un apparecchio SpettroQuant e kit rapidi; un'analisi statistica specifica per cicli temporali sarà applicata per verificare la normalità degli andamenti nelle due vasche ed un'analisi della varianza sarà applicata per confrontare i valori degli output di azoto e fosforo nelle vasche con le due densità. Al termine della sperimentazione si valuteranno i risultati ottenuti con i modelli di escrezione riportati in letteratura e con quelli noti ai produttori.

Obiettivi specifici del Work Package 5

Qualità delle carni

La qualità delle carni di un pesce allevato è in stretta dipendenza con la qualità della filiera produttiva. La qualità e composizione dell'alimentazione, la densità dei pesci in una vasca o gabbia, fattori ambientali, le modalità di uccisione ed il successivo trattamento di manipolazione e conservazione hanno influenza sulle caratteristiche organolettiche e sulla composizione corporea del pesce. Densità elevate e diete a consistente livello di proteina vegetale possono indurre stress cronico a livello dell'orletto a spazzola dell'intestino; si può indurre cioè uno stato di sofferenza di bassa intensità che non appare con i normali controlli zootecnici, ma che si manifesta nel lungo periodo e, di conseguenza, con effetti sulla shelf life del fresco e del trasformato. L'attività che si intende svolgere sarà coordinata con le altre UU.OO. partecipanti al progetto e, in funzione delle prove di allevamento, sarà focalizzata sullo studio della composizione chimico-nutrizionale delle trote allevate a due diverse densità (15 e 25 kgm⁻³) ed alimentate con mangime biologico a ridotto contenuto in farine di pesce. Verrà, inoltre, effettuato uno studio di conservabilità dei suddetti campioni in cella refrigerata a temp. 1-2°C.

Il monitoraggio verrà realizzato prelevando, da ciascuna delle vasche sperimentali, 20-25 esemplari, al momento della semina, alla taglia di preingrasso ed alla taglia commerciale. Su ogni campione saranno determinate le caratteristiche biometriche: peso, lunghezza, peso dei visceri, % di parte edibile. Verranno, quindi, determinati, sull'intero filetto: pH, umidità, proteine, azoto non proteico, ceneri totali, lipidi totali, composizione in acidi grassi, frazione insaponificabile, colesterolo, squalene, vitamina A (all-trans retinolo), vitamina E (α tocoferolo), eventuali steroli vegetali presenti.

Dai risultati ottenuti si potrà verificare la qualità nutrizionale, in particolare la presenza di acidi grassi ω3 ed alcune sostanze ad attività antiossidante. Le stesse analisi verranno effettuate sul mangime.

Lo studio della conservabilità sarà effettuato sui pesci a taglia di preingrasso e commerciale. I parametri di conservabilità da considerare saranno: - ATP e suoi prodotti di degradazione;- indice K ("K-value")- azoto basico volatile totale (TVBN). I livelli di ATP e dei suoi prodotti di degradazione, adenosina-difosfato (ADP), adenosina-monofosfato (AMP), inosina-monofosfato (IMP), inosina (HxR), ipoxantina (Hx), vengono estratti e separati cromatograficamente come descritto da Vazquez-Ortiz *et al.* (1997) e Veciana-Nogues *et al.* (1997). L'indice K è determinato secondo la formula di Saito *et al.* (1959). La determinazione dell'azoto basico volatile totale (TVBN, "total volatile basic nitrogen") sarà effettuata secondo il metodo ufficiale CEE (Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee del 29-4-95, 95/149/CE N. L 97/84).

Obiettivo dell'attività sperimentale dell'INRAN era lo studio dell'effetto della differente densità di allevamento sulla qualità chimico-nutrizionale di trote provenienti da uno stesso lotto (T0) ma seminate ed allevate a due differenti densità.

Obiettivi specifici del Work Package 6

Qualità organolettica

Il divario tra valutazioni qualitative oggettive e soggettive, per i prodotti agroalimentari, va riducendosi sempre più con il progredire delle tecniche analitiche sensoriali, se basate sul rispetto di rigorosi protocolli metodologici. Per tale ragione le forme di correlazione tra i risultati delle analisi biochimiche e sensoriali, al fine di delineare la qualità degli alimenti, sono ormai un dato scientifico acquisito. Nell'ambito delle attività di progetto, ed in relazione ad alimenti piuttosto complessi come i pesci, si comincerà, in una prima fase, con una rigorosa selezione di giudici, per il cui addestramento saranno necessarie ripetute sedute, condotte prima con alimenti modello, per passare

a test di allenamento con varie specie ittiche. La fase successiva consisterà nell'adozione di descrittori sensoriali efficaci e diretti, da applicare ad una griglia di valutazione su scheda, che comprenda minimi e massimi di espressione dei descrittori. Potrebbe risultare importante la definizione di parametri di qualità visivi ed olfattivi sugli animali post mortem e nel corso di una breve shelf-life a differenti temperature di conservazione. La codifica dei procedimenti di cottura dei campioni delle due classi di pesci è elemento ineludibile per la corretta esecuzione del test sensoriale, così come l'uniformità di vari altri parametri con forte influenza psicologica sulla giuria. Al termine del progetto saranno realizzati consumer test anche con obiettivi divulgativi. La definizione dei vari aspetti qualitativi dei pesci sarà ottenuta confrontando le osservazioni sensoriali con il rilievo delle coordinate cromatiche (colorimetria per riflettanza) su muscoli o sull'intero animale e con l'acquisizione delle immagini via software dedicato (Image Analysis). L'elaborazione statistica dei risultati con il metodo Fizz reseau, di rapida esecuzione, consentirà di convertire i giudizi espressi dall'analisi sensoriale in valori da sommare ad altri risultati, frutto di altri rilievi analitici, al fine di ottenere un quadro qualitativo definitivo, ampiamente riproducibile.

Obiettivi specifici del Work Package 7

Divulgazione

Con il coordinamento di FEDERBIO sarà organizzato un Convegno finale per la diffusione dei risultati e micro-iniziativa locali a supporto dell'attività dei produttori biologici. Sarà dato supporto al CRA-IAA per l'organizzazione di consumer test. Saranno redatti documenti applicativi, schede tecniche di processo e di prodotto, materiali esplicativi.

METODOLOGIE

Metodologie di base per tutti i WPs

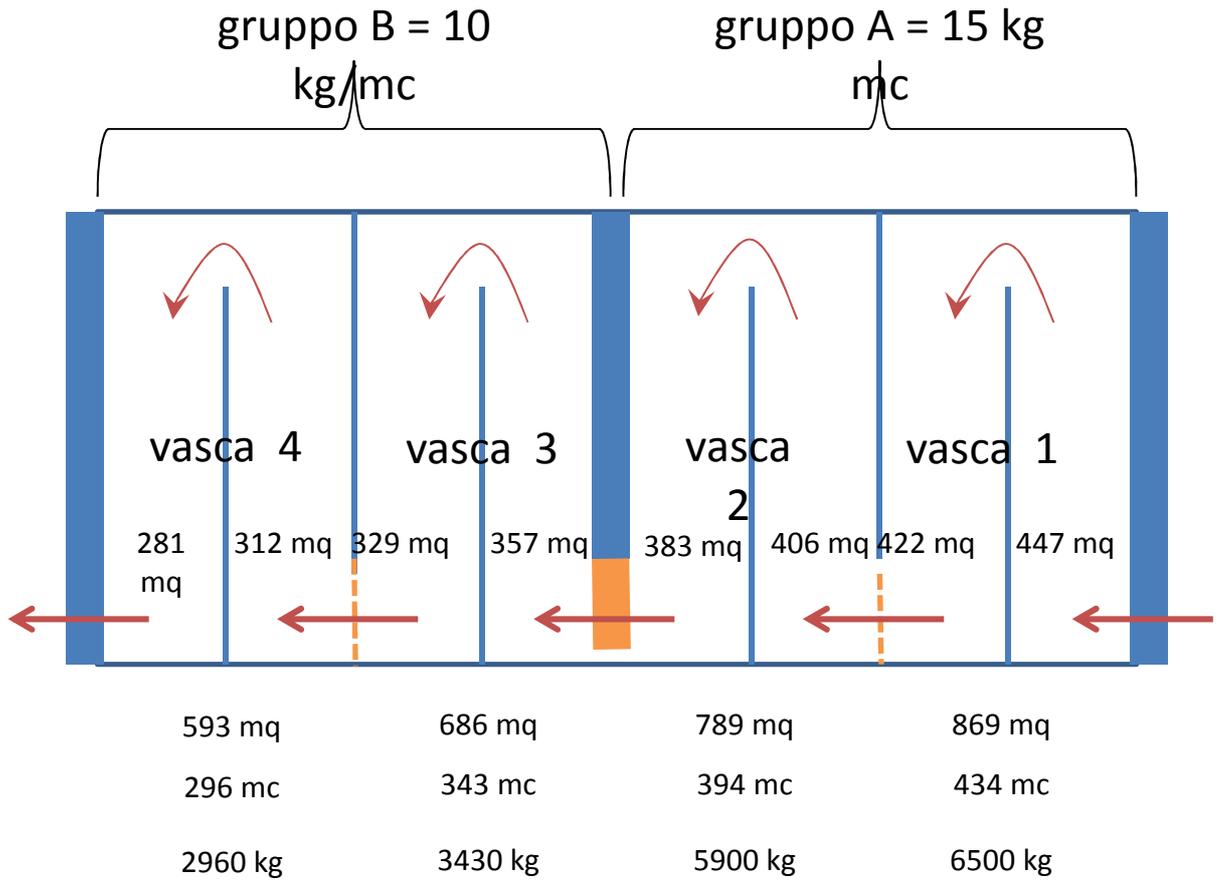
L'Azienda agricola Caio di proprietà del sig. Salvador, ha messo a disposizione 4 vasche (vedere piantina in Fig. 1). Sono state quindi realizzate 2 repliche per ogni trattamento. E' stato adoperato un mangime Biologico della Skretting la cui composizione è descritta nella Fig.2.

Al termine delle prove in impianto si è proceduto ad una sperimentazione suppletiva in ambiente più controllato utilizzando l'impianto dell'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università di Torino.

Sono state utilizzate 6 vasche da 3 m^3 ciascuna con il livello posto a circa 80 cm di battente.

In tre vasche sono state introdotte 60 trote per vasca con un peso medio di 401 g per un peso totale di 79 kg pari ad una densità iniziale di 12 kg m^{-3} . Nelle altre tre sono state introdotte 90 trote di per vasca con un peso medio di 374 g per un peso totale di 109 kg pari ad una densità iniziale di 17 kg m^{-3} . Le trote sono state alimentate con una razione pari allo 0,8% della biomassa presente in vasca. Le densità non sono state fisse, ma hanno seguito l'andamento crescente delle biomasse; la crescita, come nelle vasche di allevamento, è stata di 3 g al giorno per trota. Questo sta ad indicare che l'ambiente confinato non ha interferito con la crescita.

Figura 1. Pianta delle vasche utilizzate nella prova. La risorgiva che serve l'impianto è situata all'altezza del vertice superiore destro delle vasche.



- argine
- griglia
- flusso acqua

Figura 2. Scheda tecnica del mangime biologico usato per la sperimentazione.



EMERALD FINGERLING & TROUT

Alimenti per l'allevamento biologico della trota

A fronte dell'interesse crescente verso l'allevamento biologico della trota, Skretting ha rivisto e aggiornato la sua gamma di alimenti per questo mercato.

Emerald Fingerling e Emerald Trout contengono i seguenti ingredienti:

Farina di pesce e olio di pesce da sottoprodotti della pesca destinata al consumo umano e derivanti da pesca sostenibile certificata.

Frumento biologico.

Farina di girasole biologico.

Vitamine e minerali. Nutrienti essenziali

Antiossidante. Indispensabile per proteggere dall'ossidazione gli acidi grassi altamente insaturi dell'olio di pesce.

Questi alimenti rispettano gli standard Naturland e Soil Association per l'acquacoltura biologica

Analisi chimica

Composizione %	E. Fingerling 23	E. Fingerling 30	E. Trout 45	E. Trout 60	E. Trout 85
Proteina Grezza	45.0	43.0	40.0	38.0	35.0
Oli e Grassi Grezzi	19.0	21.0	25.0	26.0	26.0
Ceneri Grezze	12.0	12.0	11.0	19.0	23.0
Fosforo	1.8	1.8	1.6	1.6	1.6
Energia Digeribile (MJ/kg)	18.1	18.4	19.2	19.5	19.1

Ingredienti:
Fare riferimento al cartellino.

Indicazioni per il razionamento (in % della biomassa al giorno)*

Emerald	Ø mm	Peso del pesce in g	4°C	6°C	8°C	10°C	12°C	14°C	16°C	18°C
Fingerling 23	2.0-2.5	8-90	1.3	1.5	1.8	2.2	2.5	2.9	3.3	3.7
Fingerling 30	2.5-3.5	25-120	0.9	1.2	1.4	1.7	2.0	2.3	2.6	2.9
Trout 45	4-5	100-500	0.7	0.8	0.9	1.1	1.3	1.4	1.6	1.7
Trout 60	5-7	400-900	0.6	0.6	0.7	0.8	1.0	1.1	1.2	1.3
Trout 85	7.5-9.5	>800	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.9	1.0	1.1

*La tabella di alimentazione sopra indicata è una linea guida indicativa. Il servizio tecnico Skretting è a Vostra disposizione per assistervi nell'ottimizzazione della razione applicando il concetto RME.

La presente scheda tecnica ha esclusivamente valore informativo. Il documento ufficiale è il cartellino.

www.skretting.it

Skretting Italia S.p.A. - si riserva il diritto di modificare questo scritto tecnico in qualunque momento.
Rev. 7-07-2012






© Skretting Company

Disegno sperimentale:

In impianto

4 vasche a terra,

2 densità di allevamento: 10 e 15 kg⁻³ da ottenere alla fine della prova.

Sono state impiegate trotelle del peso medio di 130 g

Nel gruppo A (sulla piantina = vasca 1 + vasca 2) sono stati immessi circa 8500 kg di pesce (densità iniziale = circa 10,2 kg⁻³) e nel gruppo B (vasca 3 + vasca 4) circa 4500 kg avendo quindi una densità iniziale di circa 7 kg⁻³.

Sulla base di un peso medio iniziale di circa 130 grammi, nel gruppo A (vasca 1 + 2) abbiamo 65400 pesci; Nel gruppo B (vasca 3 +4): 34600.

Considerando un accrescimento di 2 grammi al giorno si dovrebbero ottenere delle densità finali (dopo 120 giorni di allevamento) par a circa: gruppo A = 30 kg/mc gruppo B = 20 kg/mc

Al fine di mantenere le densità prossime a quanto pianificato, si procederà con uno sfoltimento dei pesci nel corso della prova, con la garanzia della professionalità dell'azienda.

Metodologie WPI

Il rationale è che, in condizioni di densità più elevata, le performance zootecniche dovrebbero deteriorarsi perché l'energia globale è veicolata verso i meccanismi endogeni di mitigazione dello stress. In questo studio saranno quindi monitorati i principali indicatori di performance zootecnica, sia a livello di individuo che di popolazione. A livello individuale, le performance di crescita saranno stimate mediante l'incremento ponderale standardizzato (*I*) il tasso specifico di crescita (*SGR*), l'indice di condizione di Fulton (*IC*), l'indice epatosomatico (*HSI*), l'indice viscerosomatico (*VSI*), il coefficiente di adiposità *CF*. A livello di popolazione, le performance di allevamento saranno valutate stimando i seguenti indici: l'incremento in biomassa (*IB*), il tasso di assunzione giornaliero di alimento (*DFI*), l'indice di conversione (*FCR*), il consumo individuale giornaliero di alimento (*F*), l'efficienza di conversione (*GCE*) ed il tasso di efficienza proteica (*PER*). Gli indicatori di performance zootecnica a livello individuale saranno stimati campionando, per ciascun lotto di trattamento e di controllo, 50 individui per mese. I dati saranno analizzati utilizzando l'approccio dei generalized linear model (GLM). Tali indicatori saranno utilizzati per ricostruire, nell'ambito dei concetti della qualità totale, un quadro sintetico di risposta degli organismi, tenendo conto delle componenti fondamentali del sistema: crescita, qualità, redditività, impatto.

Nel corso del primo campionamento (realizzato al momento della messa in vasca dei pesci = T0) l'Unità Operativa di Torino ha provveduto a:

- prelevare campioni di acqua in ingresso ed uscita delle vasche per le analisi di azoto e fosforo.
- prelevare il sangue secondo protocollo inviato dall'Unità di Bari per le valutazioni ematiche
- effettuare foto di 15 pesci per calcoli morfometrici
- misurare peso totale, lunghezza totale
- campionamento di 15 pesci per misure: HSI, VSI e RIL

VSI, cioè l'indice Viscero Somatico è il rapporto tra peso dei visceri e peso totale;

HSI ossia l'indice Epato Somatico è il rapporto tra peso del fegato e peso totale

RIL è il rapporto tra lunghezza dell'intestino, misurata dal punto di inserzione dei ciechi pilorici, e il peso totale

Il mangime biologico utilizzato, l'Emerald della Hendrix, è un mangime a basso tenore proteico (38%) e con un livello di grassi (26%) inferiore a quelli dei mangimi convenzionali (30%) ed un rapporto PD/ED inferiore a 2.

In vasche sperimentali

Sono state utilizzate 6 vasche da 3 m³ ciascuna con il livello posto a circa 80 cm di battente.

In tre vasche sono state introdotte 65 trote di peso medio di 401,1±9,3 g per un peso totale di 79kg pari ad una densità iniziale di 12 kg m⁻³. Nelle altre tre sono state introdotte 95 trote di peso medio di 374,4g per un peso totale di 109kg pari ad una densità iniziale di 17 kgm⁻³.

Le trote sono state alimentate con una razione pari allo 0,8% della biomassa.

L'alimento sia commerciale sia biologico veniva distribuito 2 volte al giorno tranne il sabato e la domenica (1 volta).

Le densità non sono state fisse, ma hanno seguito l'andamento crescente delle biomasse; la crescita, come nelle vasche di allevamento, è stata di 3 g al giorno per trota. Questo sta ad indicare che l'ambiente confinato non ha interferito con la crescita.

Metodologie WP2

Per quanto concerne le analisi istologiche i pesci per i campioni sono stati soppressi 6 ore dopo l'ultimo pasto mediante overdose di anestetico (3-aminobenzoic acid ethyl ester, MS 222; 100 mgL⁻¹ Sigma) e da questi furono prelevati campioni di stomaco, intestino e fegato dopo averli isolati dal resto del pacchetto viscerale da cui va separato il grasso periviscerale. I campioni sono stati quindi fissati in formalina tamponata (pH 7,2) al 4% e refrigerata a 4°C in attesa delle analisi.

Dopo una settimana, i pezzi fissati sono stati messi in paraffina, seguendo le procedure istologiche standard. Sono state tagliate con il microtomo sezioni dello spessore di 5 µm poi montate su vetrini da microscopio per le successive colorazioni. Tutti i tessuti campionati sono stati colorati con il normale metodo ematossilina-eosina di Mayer e nel caso del fegato sono state fatte le seguenti colorazioni: PAS, PAS diastasi e Sudan Black. La colorazione PAS diastasi è necessaria per discriminare le reazioni PAS positive, dovute al glicogeno, dalle altre positività PAS, come avviene talvolta per la presenza di mucopolisaccaridi e glicoproteine.

La colorazione Sudan è necessaria per evidenziare la possibile presenza di sostanza ceroidi. Una volta terminata la realizzazione dei preparati istologici si è proceduto a valutarne il quadro istopatologico generale di ciascuno di essi. Gli indicatori patologici sono la lipidosi epatica, la congestione vascolare e la vacuolizzazione lipidica, indici di sofferenza digestiva.

Nel caso di presenza di lipidosi epatica si eseguirà anche la colorazione Sudan nero B che, su campioni fissati in formalina, serve ad evidenziare la presenza di sostanza ceroidi, reperto da considerarsi patologico. E' stata valutata la presenza di zone con congestione vascolare e di vacuolizzazione lipidica intracitoplasmatica (colorazione ematossilina eosina) identificabile come spot circolari bianchi che può anche deformare gli epatociti. Talvolta si può trovare anche la presenza di zone di focolaio di necrosi epatica, grave segno di sofferenza epatica (colorazione ematossilina eosina). Di norma negli allevamenti convenzionali è presente una percentuale non rilevante di questi

aspetti patologici; ci si attende che in allevamento biologico il quadro complessivo veda questa percentuale uguale o ridotta.

Questa serie di analisi era finalizzata alla verifica del buon stato delle cellule dell'orletto a spazzola deputate all'assorbimento delle sostanze nutritive; infatti, nel corso dell'ingrasso, uno degli effetti di un eccesso della densità è uno stress di tipo cronico che può provocare un assorbimento non ottimale può determinare effetti negativi sulla crescita e indirettamente sulla qualità del prodotto finito.

Metodologie WP3

U_{crit}

Il nuoto nei pesci è stato studiato da diversi punti vista, compresi gli aspetti biochimici e fisiologici che soggiacciono al rifornimento energetico, essenziale per la sua realizzazione. In letteratura, la modalità di nuoto maggiormente studiata è quella del nuoto prolungato, valutato mediante la velocità critica di nuoto (U_{crit}), che fornisce una stima della massima attività aerobica che può essere sostenuta da un pesce (Plaut, 2001). Inoltre, è stato dimostrato come l' U_{crit} sia ampiamente riproducibile grazie l'utilizzo della camera di nuoto, poiché lo stato di "velocità critica" può essere individuato facilmente ed oggettivamente al raggiungimento dello stato di affaticamento del pesce (Hammer, 1995; Kolok, 1999). L' U_{crit} è, comunque, strettamente collegato con lo stato fisiologico e, per tale ragione, in diversi studi viene utilizzato come parametro di benessere e per la valutazione delle risposte dei pesci a stress di varia natura (Alsop and Wood, 1997; Andrew et al., 2002; Beamish, 1978; FSBI, 2002; Hammer, 1995; Koumoundouros et al., 2002; Nelson et al., 1996; Wood et al., 1996). Spesso, infatti, l' U_{crit} viene utilizzato come misura della risposta fisiologica a disturbi metabolici provocati per esempio da ipossia (Farrell et al., 1998), malattie (Tierney and Farrell, 2004) o esposizione a sostanze tossiche (Beaumont et al., 2003; Shingles et al., 2001). Tali disturbi hanno, generalmente, l'effetto di diminuire la capacità di nuoto critico (U_{crit}).

Il monitoraggio dei livelli di attività è stato eseguito per mezzo di una camera di nuoto di tipo Blažka (Blažka et al., 1960) (Figura WP3.1). Lo strumento è una camera di tipo stazionario nella quale viene imposto un flusso d'acqua a velocità costante.

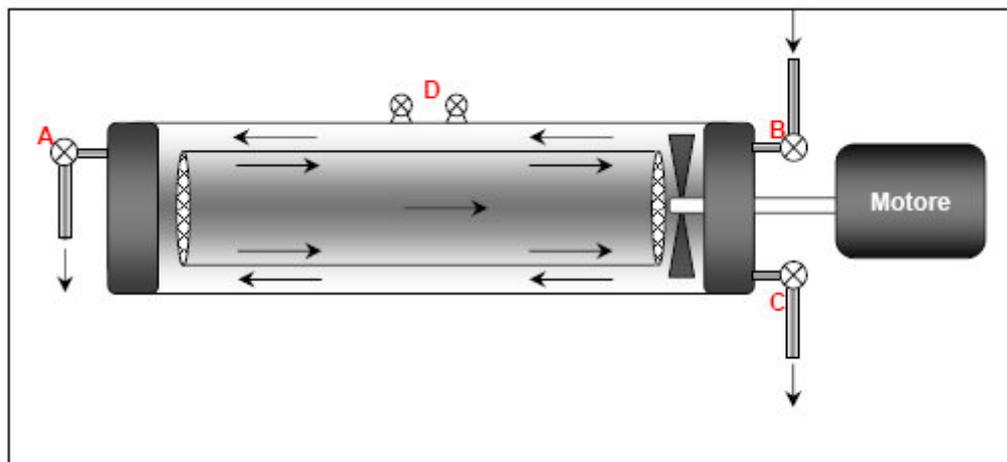


Figura WP3.1 Rappresentazione schematica della camera di Blažka. A,C: valvole di scarico; B: valvola di carico; D: valvole per lo svuotamento dell'aria ed inserimento dei sensori.

Essa è costituita da due cilindri concentrici di Plexiglas® trasparente lunghi 123 cm ed un diametro rispettivamente di 24 e 35 cm. Il volume totale della camera è di 120 L. Il flusso d'acqua all'interno della camera è generato da un'elica posta nel tubo più esterno, collegata ad un motore, con una potenza di 3 CV, attraverso un'asse-motore. La velocità dell'elica, misurata in Hertz, viene controllata da una centralina elettrica (Leeson Spedmaster) a cui è collegato elettricamente il motore. Il flusso, all'interno della camera, deve essere il più possibile di tipo laminare in modo che la velocità dell'acqua rimanga costante in ciascun punto della sezione del tubo. Questa condizione è indispensabile per poter calcolare con esattezza la velocità critica di nuoto (U_{crit}). Infatti, se si dovessero creare all'interno della camera o un particolare profilo di velocità o condizioni di turbolenza, si correrebbe il rischio di sovrastimare l' U_{crit} . Per minimizzare questo effetto, lo strumento è dotato di due griglie di plastica posizionate alle due estremità del cilindro più interno ed, inoltre, presenta una chiusura di forma concava alle due estremità del cilindro più esterno (Beamish, 1978). Il ricambio continuo dell'acqua all'interno della camera di nuoto è garantito da due valvole, rispettivamente di ingresso e di uscita (A e B in Figura WP3.1), mentre una terza valvola consente lo svuotamento completo dello strumento (C in Figura WP3.1). L'eliminazione di bolle d'aria, durante il riempimento, è invece assicurato da due ugelli sulla superficie superiore del cilindro esterno (D in Figura WP3.1) utilizzati anche per il passaggio di sonde, sensori ed elettrodi.

Prima dell'utilizzo, la camera è stata calibrata utilizzando un flussometro Doppler (Sigma). Il sensore è stato posizionato all'interno della camera per misurare la velocità di flusso a differenti valori di frequenza (Hz). Per ogni frequenza impostata sono state condotte 5 misure, in modo da poter costruire una retta di regressione (Figura WP3.2). A seguito del calcolo è stato possibile valutare la frequenza da utilizzare per ottenere velocità all'interno dei cilindri da 0,1 a 1,7 m s⁻¹.

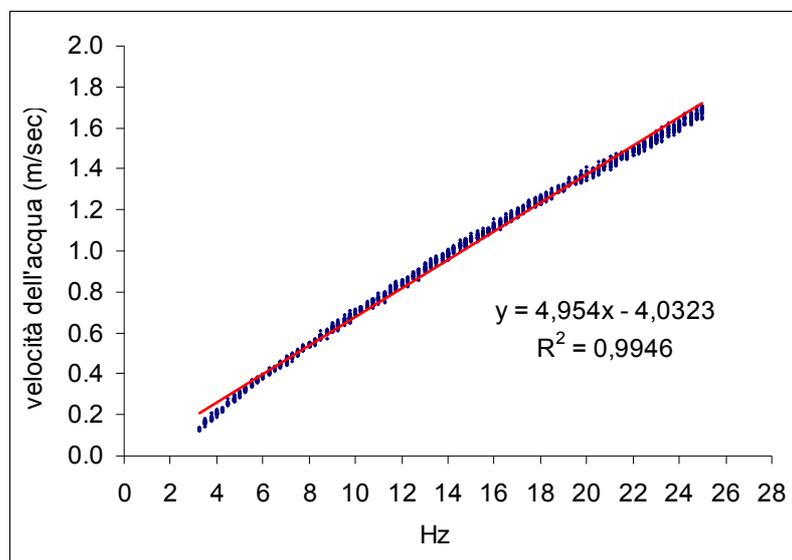


Figura WP3.2 Calibrazione della camera di Blažka: relazione tra frequenza e velocità dell'acqua.

Ciascun pesce destinato alla prova è stato tenuto a digiuno per le 12 ore precedenti il test in modo da assicurare una condizione di post-assorbimento (stadio di consumo delle riserve di glicogeno), in maniera che l'attività muscolare non fosse influenzata dalla digestione e/o assorbimento del cibo (McFarlane et al., 2004). Una volta trasferito, il più velocemente possibile, nella camera di nuoto è stato lasciato a riposo per almeno 60

minuti (tempo di acclimatazione alla camera). Successivamente, il pesce è stato sottoposto ad un flusso d'acqua a bassa velocità ($0,1 \text{ m s}^{-1}$) per almeno 30 minuti (velocità di adattamento al flusso) (Brett, 1964). All'occorrenza, questa fase è stata adeguatamente prolungata per garantire un corretto e naturale orientamento del pesce nel tubo. Una volta terminata la fase di acclimatazione, la velocità dell'acqua è stata incrementata di $0,1 \text{ ms}^{-1}$ ad intervalli di 10 minuti, fino a quando il pesce non raggiungeva la velocità critica di nuoto (U_{crit}). Tale soglia è stata definita, nelle nostre condizioni sperimentali, come lo *step* durante il quale il pesce tocca con la pinna caudale la griglia posteriore per più di 5 secondi consecutivi. Prima di raggiungere l'affaticamento (U_{crit}) la tipologia di nuoto passa da una modalità di tipo stazionario ad una modalità di nuoto a scatti (nuoto erratico) segno dell'aumento dell'utilizzo di fibre muscolari bianche-veloci-anaerobiche (MB) facilmente affaticabili (Bone, 1966). Ogni prova di nuoto è stata cronometrata e, inoltre, su apposite schede è stata riportata la tempistica di ogni prova a partire dal periodo di acclimatazione fino al termine del nuoto. Sono state anche registrate tutte le informazioni sul comportamento e sulla modalità natatoria del pesce.

Il valore di U_{crit} assoluto è stato calcolato secondo la seguente formula (Brett, 1964):

$$U_{\text{critassoluto}} = U + \left(\left(\frac{t}{\Delta t} \right) \times u \right)$$

dove U rappresenta l'ultimo intervallo di velocità completato per intero (m s^{-1}); t è il tempo impiegato nell'ultimo intervallo per raggiungere l'affaticamento (in s); Δt è l'intervallo di tempo in cui viene applicata la medesima velocità (600 s); u indica l'incremento di velocità per ogni intervallo di tempo ($0,1 \text{ ms}^{-1}$). Per individui con larghezza somatica (larghezza alla prima spina dorsale) maggiore del 10% del diametro interno del tubo è stata apportata una correzione del valore di U_{crit} in accordo con Smit et al. (1971) secondo la seguente formula:

$$U_{\text{critcorretto}} = U_m \times \left(1 + \left(\frac{D_{\text{pesce}}}{D_{\text{cilindro}}} \right) \right)$$

U_m rappresenta la velocità dell'acqua in assenza del pesce; D_{pesce} e D_{cilindro} indicano rispettivamente la larghezza massima del pesce (cm) ed il diametro del cilindro interno (cm).

Per le prove di nuoto sono stati utilizzati 20 pesci di taglia compresa tra i 230 g ed i 632 g. Ulteriori dati morfometrici degli animali utilizzati per la sperimentazione sono riportati in Tabella WP3.1. Tutti gli esemplari sono stati stabulati presso il centro sperimentale della COISPA Tecnologia & Ricerca (Bari), in un impianto a ciclo chiuso costituito da vasche circolari di vetroresina di 1200 L e diametro di 120 cm, filtro sterilizzatore Helix-Max ad UV da 55W (Aqua Medic), filtro meccanico ASTRAL d500 con sabbia di poliestere (ASTRALPOOL) e filtro biologico ARTIC d650 con resina di poliestere e fibra di vetro (ASTRALPOOL). La temperatura dell'acqua è stata mantenuta costante tra i 10 ed gli 11°C attraverso l'utilizzo di un sistema di refrigerazione (gruppo frigo semiermetico da 2 CV con scambiatore da 3 CV in titanio).

Tabella WP3.1 Dati morfometrici degli animali utilizzati per le prove di nuoto in camera di Blažka (LT = lunghezza totale, LS = lunghezza standard, h = altezza somatica, l = larghezza somatica, PT = peso totale).

n = 20	media	e.s.	intervallo
LT (cm)	34.4	0.7	27.1 - 37.0
LS (cm)	28.2	0.5	22.1 - 30.0
h (cm)	75.5	2.2	59.1 - 87.2
l (cm)	39.0	0.9	29.6 - 45.6
PT (g)	485.9	24.6	230.0 - 631.2

Al termine di ciascuna prova, è stata compilata, per ogni spigola, una scheda con tutti gli intervalli di velocità completati ed è stata segnata la durata della prova in minuti e secondi. Infatti, è stato necessario cronometrare esattamente l'ultimo *step* per poter calcolare precisamente il valore della velocità critica di nuoto.

Stima del consumo di ossigeno

La muscolatura dei pesci è principalmente composta da fibre glicolitiche a contrazione veloce (bianche) e fibre ossidative a contrazione lenta (rosse) (Bone, 1966). Le fibre muscolari rosse costituiscono la maggior parte della muscolatura delle pinne, mentre una percentuale variabile dallo 0,5 al 70%, a seconda della modalità di nuoto di ciascuna specie, rappresenta la muscolatura del tronco (miotomale). La struttura delle fibre muscolari rosse presenta un'alta concentrazione di mioglobina, numerosi capillari, un'alta densità mitocondriale (prossima a quella presente nel muscolo cardiaco dei mammiferi) ed un sistema sarcotubulare molto sviluppato. Tutte queste caratteristiche determinano l'elevata ossigenazione di questo tessuto. Inoltre, il muscolo rosso dei pesci, al contrario della maggior parte dei vertebrati, presenta consistenti riserve di glicogeno. Questa particolare caratteristica spiegherebbe perché la via metabolica per sostenere il nuoto sia principalmente aerobica (Johnston, 1980).

Nei teleostei, le fibre muscolari bianche costituiscono la maggior parte della muscolatura (fino al 90%). Esse presentano una bassa concentrazione di mioglobina ed una minore concentrazione di capillari e mitocondri del muscolo rosso. Il muscolo bianco presenta anche una minore percentuale di riserva di glicogeno rispetto al muscolo rosso. La fonte energetica della muscolatura bianca è rappresentata soprattutto dal metabolismo dei carboidrati (Wagner et al., 2004). Per queste caratteristiche, la produzione energetica quasi esclusivamente per via anaerobica (glicolisi anaerobica), è in grado di fornire energia per far fronte a sforzi rapidi ma di breve durata, come durante le fasi di nuoto sostenuto (Johnston, 1980).

L'attività muscolare è strettamente correlata con il tasso di consumo di ossigeno. Questa relazione è stata studiata in diverse specie, per lo più salmonidi. La formula generalmente utilizzata per la stima di questo parametro è la seguente:

$$MO_2 = \frac{([O_2]_{t_0} - [O_2]_{t_1}) \cdot V \cdot BW}{t}$$

in cui $[O_2]_{t_0}$ e $[O_2]_{t_1}$ rappresentano rispettivamente la concentrazione di ossigeno (mg O_2/l) all'interno del respirometro all'inizio ed alla fine della misurazione; V indica il volume (l) del respirometro privato del volume dell'animale; BW indica il peso dell'animale (kg); $t (t_0 - t_1)$ è la durata della misurazione in ore.

In generale, mantenendo costanti alcuni parametri come la temperatura e la concentrazione di ossigeno ambientale, il tasso di consumo di ossigeno aumenta all'aumentare della velocità di nuoto, rappresentando, quindi, un indice dell'attività del metabolismo aerobico (Smit et al., 1971). Infatti, durante il nuoto sostenuto la mobilitazione dell'energia è permessa da processi aerobici tali che la quantità di ossigeno consumata risulta proporzionale alla quantità di lavoro compiuto (Beamish, 1978). Man mano che aumenta la velocità, aumenta parallelamente anche il reclutamento delle fibre muscolari bianche e quindi il consumo di ossigeno a tali velocità (nuoto a scatti, 'burst swimming') non sarà più proporzionale alla velocità di nuoto (Lembo et al., 2007).

La registrazione del consumo di ossigeno (MO_2) attraverso il respirometro DAQ-1 (Loligo Systems) (Figura WP3.3), la cui sonda è stata posizionata all'interno della camera di nuoto, è stata effettuata durante lo svolgimento delle prove di nuoto esaustivo (U_{crit})

Il consumo di ossigeno ($mgO_2/kg/h$) è stato stimato, a camera di nuoto chiusa (Steffensen, 1989), durante gli ultimi 3 minuti di ogni singolo intervallo di velocità. Il software utilizzato per la registrazione dei dati (Loliresp, Loligo systems) effettua una lettura di pressione parziale di ossigeno per secondo. I dati ottenuti nei tre minuti di registrazione vengono sottoposti dal software ad analisi della regressione lineare.

Il consumo di ossigeno è stato stimato in totale su 11 esemplari di peso medio pari a 361.80 ± 28.8 g (31.3 ± 1.1 cm). È stato, quindi, stimato il consumo di ossigeno medio per ogni incremento di velocità al fine di tracciare la *baseline* del consumo di ossigeno associato a diversi livelli di intensità muscolare.

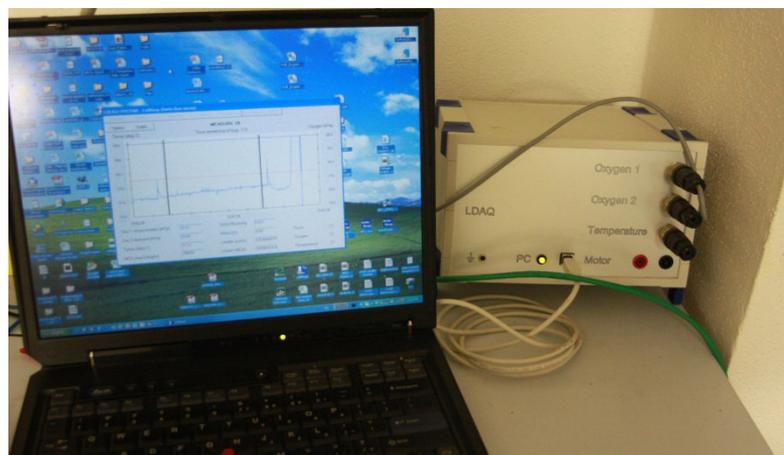


Figura WP3.3 Respirometro DAQ-1 (Loligo system) connesso al PC per la raccolta dei dati sperimentali.

Wired-EMG ed indagini telemetriche

Le misure dell'attività di nuoto, sia in termini metabolici, sia comportamentali sono, da tempo, utilizzate come efficace metodo diagnostico per valutare la capacità dei pesci di adattarsi all'ambiente in cui vivono (Jain et al., 1998; Kristiansen et al., 2004). In particolare, il monitoraggio dell'attività elettrica dei muscoli è stato utilizzato, negli ultimi anni, come misura del dispendio energetico aerobico e, quindi, come misura relativa di stato di benessere (Chandroo et al., 2005; Cooke et al., 2000; McFarlane et al., 2004).

L'obiettivo di questa fase della sperimentazione è consistita nell'esaminare il contemporaneo contributo dei due tipi di muscolatura (rossa e bianca) (wired-EMG) all'attività di nuoto della trota iridea (*O. mykiss*). Tali risultati sono stati

successivamente utilizzati per "sintonizzare" le misure di attività muscolare ottenute con l'impianto di trasmettitori (tail beat-tag) e, quindi, correlarle ai livelli di dispendio energetico dei pesci lasciati liberi in allevamento, all'interno di vasche allestite con due differenti livelli di densità di popolazione. Ciò dovrebbe rendere possibile valutare i possibili effetti generati dalle diverse densità di allevamento sui livelli di attività di nuoto e quindi sulla spesa energetica globale degli individui.

Il monitoraggio dell'attività muscolare risulta, infatti, essenziale per stimare lo *scope for activity* (SFA), ossia la quantità di energia disponibile per svolgere le varie attività vitali per il pesce (nuoto, predazione, fuga, corteggiamento, riproduzione), esclusa la quantità destinata al solo metabolismo basale: lo *standard metabolic rate* (SMR). Esso rappresenta, invece, il consumo di ossigeno in un pesce non in movimento (Fry, 1971). Il coinvolgimento dei due diversi tipi di muscolatura implica, di fatto, un diverso utilizzo delle energie metaboliche e, di conseguenza, una diversa risposta agli stimoli.

Per l'analisi degli elettromiogrammi *via* wired-EMG sono stati utilizzati 10 animali di peso medio pari a 374.40 ± 25.7 g (31.5 ± 1.0 cm) e lunghezza media pari a 31.3 ± 1.1 cm. Tutti gli esemplari sono stati stabulati nelle condizioni descritte nei paragrafi precedenti. Le prove si sono svolte presso il centro sperimentale della COISPA Tecnologia & Ricerca (BA).

I segnali elettromiografici, per essere analizzati, necessitano di una precisa interfaccia elettrica (terminali, box di interfaccia ed amplificatore GRASS P511, 8 canali) ed elettronica (scheda DAQ) per essere registrati su un PC.

Il segnale bioelettrico della muscolatura, nel pesce in movimento, viene inviato come segnale differenziale, attraverso cavi elettrici di sezione microscopica (wire) collegati per mezzo di terminali, all'amplificatore (D in Figura WP3.4 e Figura WP3.5), trasformato e registrato come potenziale in mV (Figura WP3.6).

I terminali che portano il segnale agli amplificatori sono dotati di tre collegamenti, 2 per i segnali elettromiografici della muscolatura (G1, G2) ed 1 per lo zero (COM) (Figura WP3.7). Questa impostazione bipolare, ossia con due elettrodi attivi ed uno zero, è ampiamente usata nello studio dei movimenti muscolari poiché implica minori interferenze dovute a muscoli adiacenti o più profondi.

Il voltaggio misurato corrisponde alla differenza di tensione elettrica del muscolo rispetto ad uno zero di riferimento. Nel nostro caso lo zero è stato posto sull'acqua circolante nel tubo, per avere un riferimento stabile. Il segnale che arriva (S), quindi, viene calcolato come:

$$S = (G1 - G2) - COM$$

Una volta amplificati, i segnali vengono trasformati in un segnale non differenziale che può essere elaborato dalla scheda DAQ.

Gli amplificatori sono stati settati in modo da ridurre al minimo le interferenze. Allo stesso modo, anche il box di interfaccia è stato schermato opportunamente, con una presa di terra stabile, per ridurre al minimo le interferenze elettriche.

La scheda DAQ, infine, è stata installata sul PC e settata per la ricezione di segnali non differenziali allo scopo di ottenere una risoluzione ottimale dei dati.

Le registrazioni sono state effettuate utilizzando il software Labview (versione 6i) e successivamente elaborate con il software statistico R.



Figura WP3. 4 Laboratorio di telemetria presso la COISPA Tecnologia & Ricerca (BA).
A: Terminali per le connessioni dei wire; B: Camera di nuoto di Blažka; C: Centralina elettrica;
D: Amplificatore

La registrazione del segnale elettromiografico è stata effettuata all'interno della camera di nuoto di Blažka, durante lo svolgimento di opportune prove di U_{crit} . Quindi, subito dopo l'impianto chirurgico degli elettrodi nei muscoli, con la procedura descritta di seguito, i pesci vengono posti, ancora anestetizzati, nella camera di nuoto. I cavi (wire) vengono fatti passare attraverso le aperture superiori del tubo e collegati con i terminali. I fili vengono lasciati per circa 70-80 cm all'interno della camera in modo da non limitare i movimenti e quindi la capacità natatoria del pesce.

La registrazione del segnale è stata effettuata per l'intera durata di ogni singolo intervallo di velocità (10 minuti circa), fino al raggiungimento della condizione di affaticamento del pesce.



Figura WP3.5 Dettaglio dell'amplificatore GRAS per il segnale elettromiografico.

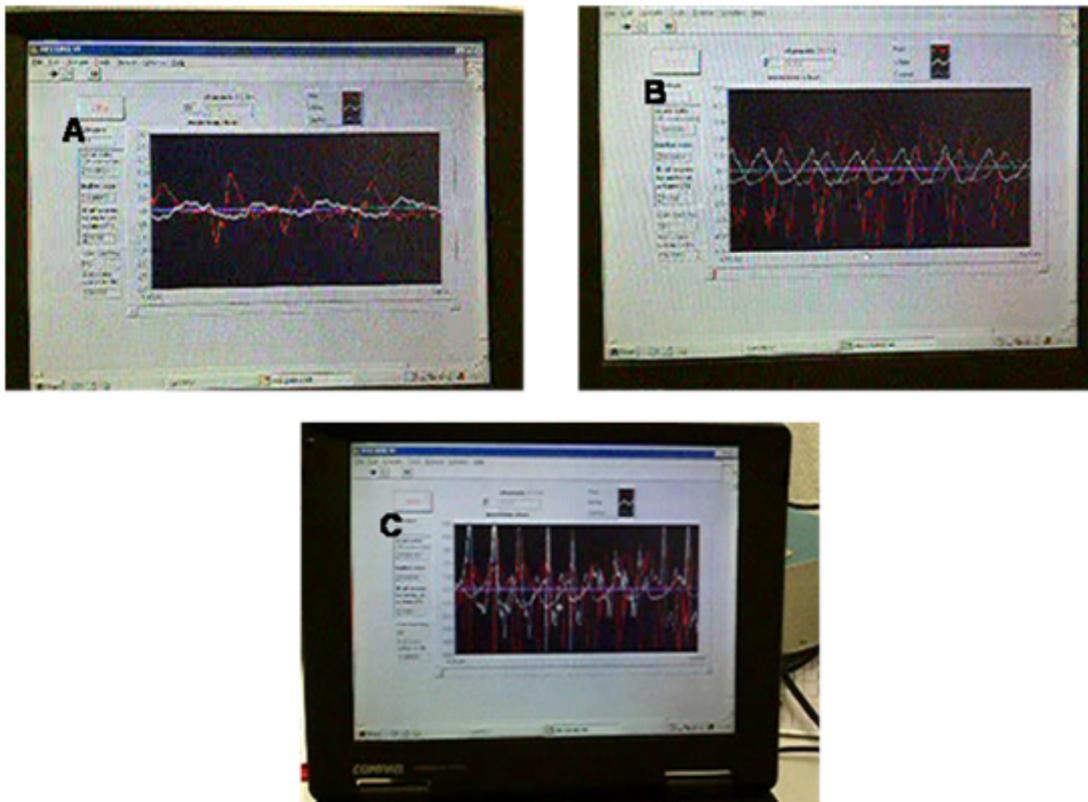


Figura WP3.6 Esempi di registrazione di elettromiogrammi a diversi step di velocità durante una prova di nuoto esaustivo. A velocità $0,2 \text{ m s}^{-1}$; B velocità $0,6 \text{ m s}^{-1}$; C 1 m s^{-1} (Ucrit). La linea rossa rappresenta la variazione del potenziale elettrico nella muscolatura bianca.

Nei pesci allevati nelle vasche sperimentali, presso l'impianto dell'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università di Torino sono stati impiantati in totale 30 trasmettitori acustici V9A (9 mm di diametro, 43 mm di lunghezza, 5.8 g di peso), accelerometri di produzione Vemco, in grado di misurare l'accelerazione dell'animale in m/s^2 sotto forma di un vettore la cui dimensione è la risultante della misura dell'accelerazione sui tre assi (x, y, z). Questo valore di accelerazione può essere utilizzato come misura dell'attività di un animale libero di muoversi in un ambiente naturale.

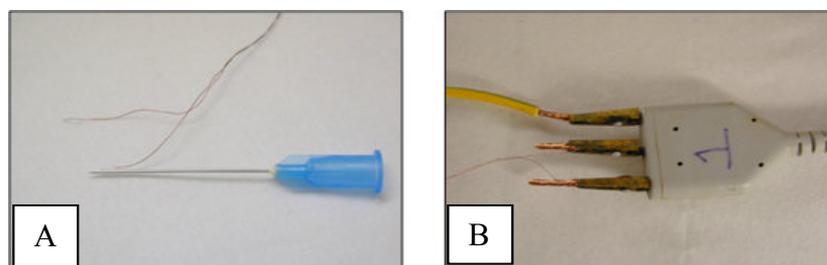


Figura WP3.7 Elettrodi fine wire prima del posizionamento intramuscolo; B: Collegamento degli elettrodi e della messa a terra ad uno dei terminali.

Il software installato nei trasmettitori è stato programmato in modo da effettuare un'ora di registrazione alla sua accensione, per fornire il tempo necessario per il test della strumentazione una volta finita l'operazione, e poi spegnersi per i successivi 10 giorni, in modo tale da consentire ai pesci di recuperare completamente lo stress dell'operazione e potersi acclimatare alle condizioni di allevamento. L'autonomia della

batteria di questi trasmettitori, certificata dal produttore, è di circa 50 giorni, durante i quali essi sono in grado di trasmettere ogni 80 secondi un segnale di accelerazione al ricevitore acustico installato in vasca. Quest'ultimo è un ricevitore sommergibile della Vemco, VR2W, in grado di codificare approssimativamente 192000 singoli trasmettitori, operanti su di un set di frequenze definite dal costruttore, nel nostro caso 69 kHz. Il ricevitore è alloggiato all'interno di un contenitore cilindrico di plastica sotto pressione, resistente alla corrosione. Esso incorpora un idrofono ad una delle estremità del contenitore, un sistema di comunicazione *wireless* con tecnologia *Bluetooth*[®] ed una capacità di immagazzinamento di dati digitali di 8 Mbyte. I dati registrati, una volta recuperato il ricevitore, possono essere acquisiti facilmente con un PC dotato di comunicazione *wireless Bluetooth*[®], utilizzando il software VEMCO VUE2.0.

I pesci sottoposti ad operazione chirurgica per l'applicazione dei trasmettitori sono stati selezionati casualmente e ridistribuiti in egual numero nelle tre repliche delle due densità sperimentali (densità iniziali, 12 e 17 kg/m³), in tutto sei vasche di forma rettangolare.

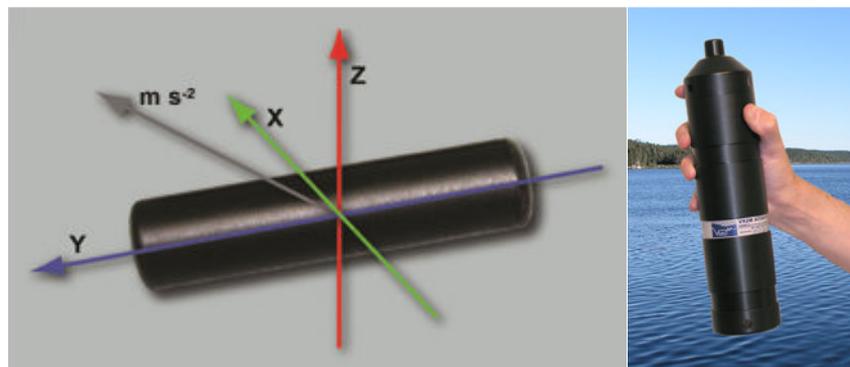


Figura WP3. 8. schema del funzionamento dell'accelerometro V9A della Vemco (sulla sinistra); immagine del ricevitore VR2W della Vemco (sulla destra).

La calibrazione degli accelerometri è stata effettuata presso il centro sperimentale della COISPA Tecnologia & Ricerca (BA), sottoponendo gli animali sottoposti ad impianto chirurgico dei trasmettitori ad opportune prove di U_{crit} in modo da ottenere dettagliate informazioni circa i livelli di attività registrati dalla strumentazione per ogni singolo intervallo di velocità. I valori di accelerazione, in seguito estratti dal ricevitore acustico sono stati mediati per ogni singolo animale per ogni intervallo di velocità con il software di analisi statistica R.

Per la calibrazione dei trasmettitori sono stati utilizzati 10 animali di 35.4 ± 0.6 cm di lunghezza totale (27.1 - 36.1 cm) e 561.7 ± 29.8 g (377 - 631.2 g).

Procedure chirurgiche

Per misurare i livelli di attività degli animali è stata utilizzata quella che in medicina umana viene definita come elettromiografia chinesiológica. Questo genere di analisi studia fondamentalmente l'attivazione muscolare, a seguito del movimento dei diversi segmenti del corpo.

Per ottenere gli elettromiogrammi (EMG) è stato necessario applicare agli animali dei sottili elettrodi per mezzo di un intervento chirurgico.

Questo tipo di elettrodi ha una serie di vantaggi, tra cui la possibilità di testare la muscolatura profonda, o fasce muscolari poco estese, grazie al suo esiguo spessore.

Gli elettrodi, che consistono in due sottili fili metallici di acciaio inossidabile (304) (sezione 0,1 mm lunghezza 1 m) attorcigliati insieme a formare un unico wire (Figura WP3.7), vengono inseriti nella muscolatura per mezzo di aghi da siringa (23G), in direzione caudale, a circa il 70% della lunghezza del pesce, dove l'ampiezza e lo spessore della muscolatura rossa è massima e la stessa muscolatura è maggiormente coinvolta nell'attività propulsiva del nuoto.

Gli animali sono stati anestetizzati e posti su un tavolo operatorio dove gli sono stati applicati gli elettrodi. Durante l'operazione le branchie sono state continuamente irrorate, per mezzo di una pompa a ricircolo, di soluzione idroalcolica anestetizzante (clove oil, principio attico eugenolo, 30 ppm).

Gli elettrodi vengono inseriti a coppie nel muscolo rosso e nel muscolo bianco; i primi poco al di sopra della linea laterale appena sotto la cute (A in Figura WP3.9), i secondi, nella stessa posizione ma più in profondità.

Dopo l'inserimento, i wire sono fissati sul fianco dell'animale con tre suture, arricciando il filo in modo da non forzare direttamente sui punti di inserzione (B e C in Figura WP3.9) durante il nuoto. Il tempo totale della procedura è di circa 15 - 18 minuti, compresa l'anestesia.

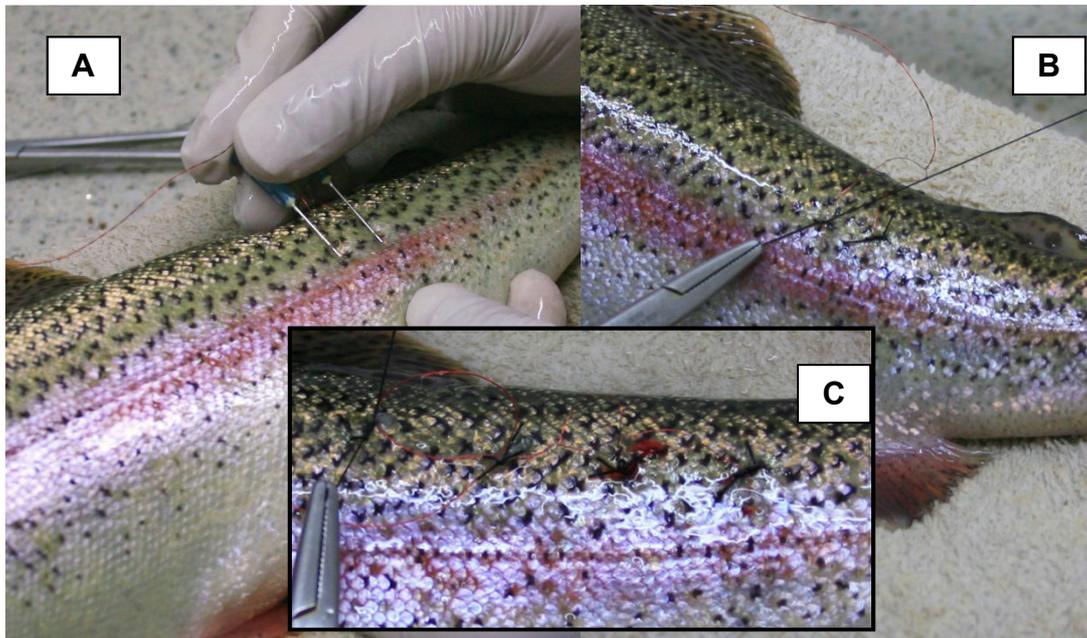


Figura WP3.9 Inserzione degli elettrodi nella muscolatura; B-C: Applicazione di punti di sutura per bloccare i wire sul fianco del pesce.

Gli esemplari sottoposti all'impianto dei tag, sono stati mantenuti a digiuno per 24 ore prima dell'intervento. È stata utilizzata la procedura di impianto descritta da McFarlane et al. (2004). Gli animali sono stati anestetizzati in soluzione alcolica di olio essenziale di chiodi di garofano nella concentrazione di 30 ppm (Massee et al., 1995) e posti sul tavolo operatorio. Le branchie durante tutta la durata dell'operazione sono state irrigate continuamente con la soluzione anestetizzante (A in Figura WP3.10). Il trasmettitore è stato inserito attraverso un'incisione di 3 cm effettuata nella porzione caudale della cavità addominale (B e C in Figura WP3.10). Questo posizionamento ha permesso di inserire i tag in una posizione il più possibile esposta alle sollecitazioni prodotte dall'attività natatoria. Una volta inserito il trasmettitore, sono stati applicati tre punti di sutura indipendenti con filo chirurgico 3/0 (Ethicon) per richiudere l'incisione (D in Figura WP3.10). Il tempo totale della procedura è stato di circa 5 - 10 minuti, compresa

l'anestesia. Al termine dell'operazione gli animali sono stati rilasciati in vasca e lasciati in isolamento per facilitarne la ripresa. Per i due giorni successivi l'operazione, ciascun pesce è stato trattato per via intraperitoneale con un antibiotico ad ampio spettro (Amplium-Sigma-tau, principio attivo ampicillina sodica-cloxacillina sodica) per prevenire infezioni post operatorie. La dose utilizzata è stata di 300 mg/kg di peso vivo ogni 12 ore.

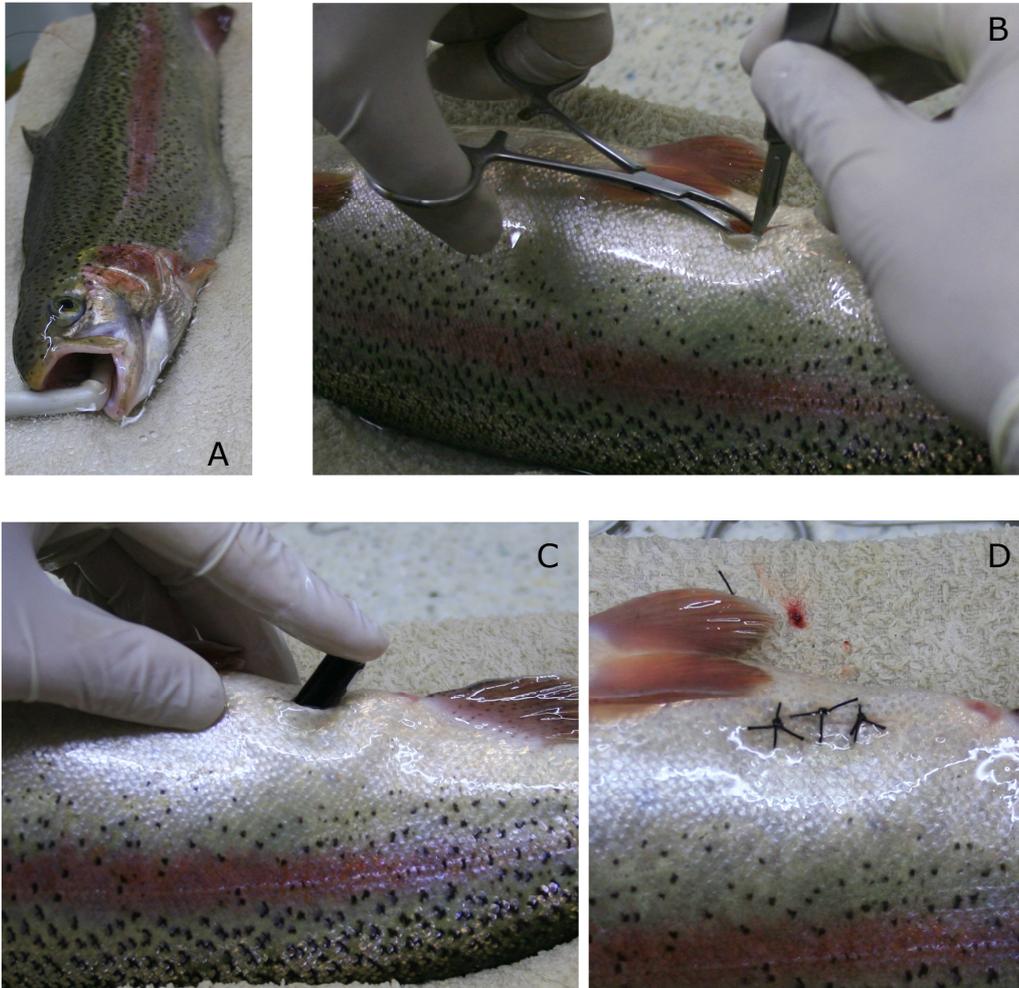


Figura WP3.10 Fasi dell'impianto chirurgico dei tag all'interno della cavità addominale delle trote iridee sottoposte ad operazione. (A) intubazione per garantire un continuo apporto di anestetico durante l'operazione; (B) incisione sul ventre per alloggiare il tag all'interno della cavità peritoneale; (C) inserimento del trasmettitore attraverso l'incisione; (D) punti di sutura indipendenti per chiudere l'incisione addominale.



Figura WP3.11 Esempio di taglio chirurgico completamente rimarginato. È ancora evidente la posizione dei tre punti di sutura utilizzati per facilitare la saldatura dei lembi della ferita.

In totale sono stati operati animali 18 trote. Esse sono state distribuite in modo casuale nei tre replicati delle due densità: 3 esemplari per vasca, secondo lo schema riportato in Tabella WP3.2. Nella stessa tabella sono riportati anche i principali parametri morfometrici relativi agli animali operati per l'applicazione dei trasmettitori. La fase di registrazione di attività natatoria è cominciata il 15/08/2012 e si è conclusa il 16/09/2012.

Tabella WP3.2 misure morfometriche individuali di LT (lunghezza totale), LS (lunghezza standard), PT (peso totale) e valori minimi, massimi, medi ed errori standard, più schema di distribuzione degli animali operati all'interno delle vasche sperimentali.

	LT (cm)	LS (cm)	PT (g)	Codice
Vasca 1 (bassa densità)	32.8	281.0	446	ID 2-1141733
	33.5	295.0	458	ID 1-1141732
	30.7	266.0	346	ID 3-1141734
Vasca 2 (alta densità)	35.0	307.0	458	ID 4-1141735
	34.4	293.0	422	ID 5-1141736
	32.8	286.0	379	ID 6-1141737
Vasca 3 (bassa densità)	30.6	262.0	319	ID 7-1141738
	32.5	281.0	344	ID 8-1141739
	33.6	288.0	407	ID 9-1141740
Vasca 4 (alta densità)	33.5	290.0	389	ID 10-1141741
	36.1	313.0	530	ID 11-1141742
	30.0	259.0	306	ID 12-1141743
Vasca 5 (bassa densità)	32.4	278.0	368	ID 13-1141744
	32.6	279.0	354	ID 14-1141745
	31.7	273.0	379	ID 15-1141746
Vasca 6 (alta densità)	32.2	277.0	364	ID 16-1141747
	32.4	279.0	353	ID 17-1141748
	36.7	317.0	546	ID 18-1141749
min	30.0	259.0	306	
max	36.7	317.0	546	
media	33.0	284.7	398.2	
e.s.	0.4	3.8	15.8	

Parametri ematici e plasmatici

Allo scopo di completare il quadro diagnostico, agli indicatori dell'attività di nuoto è stata affiancata la misura dei principali parametri ematici, nello specifico: conta eritrocitaria (RBCC), ematocrito (Hct), cortisolo, lattato, glucosio e lisozima. Il sangue, prelevato a livello del peduncolo caudale, è stato utilizzato "intero" per le analisi di ematocrito e per la conta eritrocitaria, il resto è stato centrifugato (3000 rpm per 5 minuti) ed il plasma così ottenuto è stato aliquotato e congelato a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ per le successive analisi di glucosio, cortisolo, lattato e lisozima.

Ematocrito (Hct) può essere definito come il rapporto tra le cellule e il plasma nel sangue ed è espresso come percentuale. Per le analisi sono stati utilizzati microcapillari eparinizzati (lunghezza 75 mm; diametro interno 1.2 mm; diametro esterno 1.5 mm) (Figura WP3.12). Immediatamente dopo il prelievo i capillari sono stati riempiti (a circa $\frac{3}{4}$ dell'intero volume) e chiusi ad una estremità con sigillante commerciale. Il campione è stato successivamente centrifugato a 13000 rpm per 3 minuti (centrifuga Tehtnica Centric®) e letto immediatamente dopo.



Figura WP3.12 Risultato della centrifugazione del sangue intero in un capillare per microematocrito.

La conta eritrocitaria (RBCC) è stata eseguita al microscopio (Nikon 400E) con ingrandimento di 40x nella camera conta-globuli di Bürker (Figura WP3.13) usando la soluzione di Hendricks's (Hendricks, 1952) come diluente. Un volume pari a $5\text{ }\mu\text{l}$ di sangue intero è stato diluito in 1 ml di soluzione così da ottenere una diluizione di 1:200. La soluzione così ottenuta è stata conservata a 4°C prima della conta. La concentrazione eritrocitaria è stata espressa come 10^6 cellule per mm^3 .

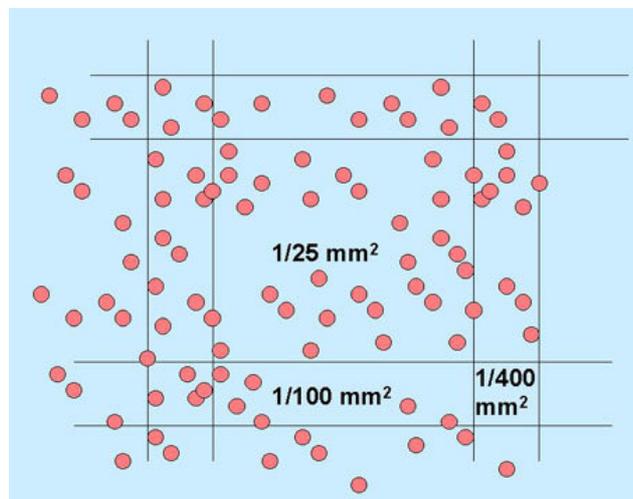


Figura WP3.13 Esempio di conta cellulare con camera conta globuli di Bürker. La profondità della camera è di $1/10\text{ mm}$. Conoscendo la diluizione del campione e la media di cellule presenti nell'area di $1/25\text{ mm}^2$ è possibile conoscere il numero di cellule per mm^3 .

I quattro parametri sierologici indagati sono stati: cortisolo (risposta primaria allo stress), glucosio e lattato (risposta secondaria allo stress) e, come indice dell'immunità aspecifica, il lisozima (risposta terziaria allo stress).

La determinazione quantitativa del cortisolo plasmatico è stata effettuata mediante l'utilizzo di un metodo immunoenzimatico. Nello specifico, è stato utilizzato un kit commerciale prodotto della InterMedical: viene utilizzata una micro piastra coattata con anticorpi anti-cortisolo alla quale vengono aggiunti del siero di controllo, ed il coniugato enzima-cortisolo. Il cortisolo presente nei campioni analizzati compete con il coniugato enzima-cortisolo coattato alla micropiastra a formare il complesso antigene-anticorpo. Tramite lavaggio viene eliminato dalla piastra il coniugato non legato. L'attività enzimatica nella frazione legata-anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione del cortisolo (ng/ml). L'attività enzimatica è rilevata tramite viraggio del colore della tetrametilbenzidina (TMB-substrato) per mezzo di un fotometro ad otto canali per la lettura simultanea e sequenziale di micropiastre (Plate Reader, Dasitaly).

Il glucosio plasmatico è stato determinato utilizzando un kit commerciale (Polymed®). Il principio del metodo si basa sulla reazione di Trinder: il D-glucosio viene ossidato dalla glucosio ossidasi in D-gluconato con formazione di perossido di idrogeno che, per catalisi della perossidasi, ossida il sistema cromogeno costituito da acido p-idrossibenzoico e 4-amminoantipirina con formazione di un complesso chinonico colorato. L'intensità del colore è direttamente proporzionale al quantitativo di D-glucosio presente nel campione. La quantità di glucosio plasmatico è stata determinata con uno spettrofotometro HITACHI 4020 ed espressa in mg/dl.

Il lattato plasmatico è stato determinato utilizzando un kit commerciale (Sentinel®). Il principio del metodo si basa sulla reazione di Trinder: il lattato viene ossidato in presenza di lattato-ossidasi, in piruvato ed acqua ossigenata. Per azione della perossidasi il perossido di idrogeno reagisce con il complesso cromogeno la cui intensità è direttamente proporzionale al lattato presente nel campione. La quantità di lattato plasmatico è stata determinata con uno spettrofotometro SHIMADZU UVmini-1240 ed espressa in mg/dl. La concentrazione del lisozima è stata misurata utilizzando il metodo turbidimetrico opportunamente modificato per la lettura di micro piastre (Sutton et al., 2006). I risultati sono stati espressi come $\mu\text{g mL}^{-1}$ HEWL.

Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate con il software statistico R. Le relazioni tra U_{crit} corretto-lunghezza totale, U_{crit} corretto-lunghezza standard ed U_{crit} corretto-peso totale sono state valutate con un'analisi della regressione lineare.

Per determinare il modello con il fitting migliore, tra esponenziale e lineare, per la relazione velocità di nuoto - consumo di ossigeno è stato utilizzato il test di verifica delle informazioni di Akaike (AIC) (Akaike, 1974). Una volta determinato il modello più adatto è stata effettuata l'opportuna analisi della regressione.

Il test AIC è stato utilizzato anche per determinare il miglior fitting tra modello lineare, logistico ed esponenziale per le relazioni velocità-EMG muscolo rosso ed velocità-accelerazione (calibrazione degli accelerometri). Mentre sono stati confrontati i modelli lineare ed esponenziale per la relazione velocità-EMG muscolo bianco. Per ognuna delle succitate relazioni è stata effettuata una analisi della regressione.

I dati di attività muscolare ottenuti dagli accelerometri impiantati negli animali rilasciati in vasca a differenti densità di stoccaggio sono stati sottoposti alle seguenti analisi: test di correlazione tra attività di nuoto e tempo di stabulazione per le due differenti densità; è stata, inoltre, condotta l'analisi del trend con il test di Cox-Stuart.

Per ogni densità è stato stimato un modello GLM dei valori di attività utilizzando le ore del giorno ed il giorno come variabili esplicative del modello di seguito riportato:

$$\text{Attività} = \alpha \cdot \text{Ora} + \beta \cdot \text{Giorno} + \text{err}$$

Il giorno e l'ora sono utilizzati come parametri fattoriali.

I risultati delle analisi ematologiche sono state sottoposte, per ogni replicato, all'inizio ed alla fine dell'esperimento, al test di normalità di Shapiro-Wilk ed al test di Levene per l'omogeneità delle varianze. Sono stati condotti confronti multipli tra i tre replicati per ogni densità, all'inizio ed alla fine dell'esperimento (nei gruppi) e tra inizio e fine esperimento delle due densità (tra i gruppi). I valori medi relativi ai gruppi risultati normalmente distribuiti ed omoschedastici sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e le eventuali differenze sono state testate con un opportuno test *post-hoc*. Per i gruppi di dati risultati omoschedastici ma non distribuiti normalmente è stato applicato il confronto delle medie con il test di Kruskal-Wallis e le eventuali differenze riscontrate sono state evidenziate con il test *post-hoc* di Tukey.

Metodologie WP4

In letteratura sono riportate numerose valutazioni della quantità di azoto e fosforo prodotte dalle attività di piscicoltura, ma spesso sono dati ottenuti in laboratorio, mentre sono decisamente meno numerosi i dati sperimentali ottenuti in impianti produttivi o in impianti pilota. Non vi sono, invece, esperienze sperimentali riconducibili ad impianti gestiti con metodo biologico. Per poter includere la piscicoltura in un agrosistema sostenibile è necessario che le concentrazioni di ammonio e fosforo presenti nei reflui siano contenute a livelli accettabili. Pertanto, l'attività sperimentale prevede la determinazione dei livelli di azoto e fosforo durante un ciclo di produzione di due lotti di trote, allevati a due diverse densità (15 e 25 kg/mc) ed alimentati con una stessa dieta biologica caratterizzata da un minor contenuto di farina di pesce. A valle delle vasche di allevamento si monitoreranno i livelli di azoto e fosforo nelle acque reflue, per verificare se vi sono differenze apprezzabili negli scarichi degli allevamenti. Si determineranno azoto e fosforo nel corso di cicli giornalieri, ad intervalli di un'ora per 16 ore al giorno e per due giorni ogni mese durante tutto il ciclo di ingrasso, da trotelle fino a pesci porzione per un totale di 960 determinazioni. Le determinazioni saranno effettuate per via colorimetrica con un apparecchio SpettroQuant e kit rapidi.

Metodologie WP5

All'inizio della sperimentazione sono state prelevate 22 trotelle, T0 della sperimentazione, e relativo mangime (Veronesi (Ecoprime 3) presso l'Azienda agricola Caio (PN).

Sui campioni di trota sono stati effettuati i rilevamenti biometrici (lunghezza, peso, % visceri) e le valutazioni chimico-nutrizionali: pH, umidità, proteine e ceneri valutati secondo i metodi AOAC (1990). L'azoto non proteico è stato determinato dopo precipitazione delle proteine con acido tricloroacetico al 20% (p/v). I lipidi totali sono stati estratti secondo il metodo di Bligh & Dyer (1959) con le modifiche apportate da Kinsella et al. (1977), usando *tert*-Butilididrossiquinone (TBHQ) come agente antiossidante. I composti lipidici insaponificabili (squalene, colesterolo, alfa-tocoferolo ed all-trans retinolo) sono stati determinati cromatograficamente previa saponificazione in atmosfera di azoto. La strumentazione utilizzata era un HPLC (Hewlett-Packard 1100 Series Liquid Chromatography) dotato di un rivelatore a serie di diodi, pompa quaternaria e sistema di degassaggio dei solventi. La separazione cromatografica è stata effettuata su colonna C18 Ultrasphere (5 micron, 25 cm x 4.6 mm) protetta da una

precolonna Ultrasphere ODS (4.6 mm x 4.5 cm, 5 micron, Beckman). I dati sono stati elaborati dal Software Chemstation della Hewlett Packard. La caratterizzazione della composizione in acidi grassi dei lipidi totali è effettuata trasformando gli acidi grassi in metilesteri ed analizzando questi mediante gas-cromatografia. E' stato utilizzato un Gas Cromatografo (Hewlett Packard 6890 Series) dotato di rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) e di colonna capillare in silice (30 m x 0.25 mm, 0.20 μ m). Gli acidi grassi determinati al FID sono identificati e confermati alla Gas-Massa (Varian 3900/Saturn 2100T GC/MS) usando una colonna con maggiore potere risolutivo (Crompack© CP-WAX 52 CB 60 m x 0.32 mm ID, 0.5 μ m film thickness) e standards puri di tutti gli analiti.

L'attività sperimentale in un primo tempo è stata svolta presso l'Azienda agricola Caio (PN) dove sono state prelevate 22 trotelle, T0 della sperimentazione, e relativo mangime (Veronesi (Ecoprime 3). Sul mangime è stata effettuata la caratterizzazione chimico nutrizionale. Sui campioni di trota sono stati effettuati i rilevamenti biometrici (lunghezza, peso, % visceri) e le valutazioni chimico-nutrizionali delle **quali è già stata fatta una prima rendicontazione**



Figura WP5.1 *Impianto Azienda Agricola Caio , Sacile (PN)*

L'attività sperimentale dell'INRAN è quindi proseguita con la partecipazione alla sperimentazione suppletiva in ambiente più controllato relativa all'impianto dell'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università di Torino sito a Carmagnola nella quale, come prevedeva il protocollo sperimentale valido per tutte le Unità Operative afferenti al progetto, sono state utilizzate 6 vasche da 3 m³ ciascuna con il livello posto a circa 80 cm di battente. In tre vasche sono state introdotte 60 trote per vasca per un peso totale di 79 kg pari ad una densità iniziale di 12 kg m⁻³. Nelle altre tre sono state introdotte 90 trote di per vasca per un peso totale di 109 kg pari ad una densità iniziale di 17 kg m⁻³. Le trote sono state alimentate con una razione pari allo 0,8% della biomassa presente in vasca. Le densità non sono state fisse, ma hanno seguito l'andamento crescente delle biomasse; la crescita, come nelle vasche di allevamento, è stata di 3 g al giorno per trota. Questo sta ad indicare che l'ambiente confinato non ha interferito con la crescita

Campionamento

Campioni di trote in numero di 20 sono stati prelevati dall'impianto di acquacoltura di Carmagnola (To) nell'agosto 2012, alla taglia di circa 220-370 g (tempo T=0). Successivamente le trote sono state immerse in vasche a 2 differenti densità per ogni vasca, e ad ottobre 2012, alla taglia commerciale di 600-700 g sono state nuovamente prelevate in numero di 10 per ciascuna vasca ed immediatamente messe sotto ghiaccio e trasportate in condizioni ottimali di refrigerazione presso i laboratori dell'INRAN. Le trote dell'inizio sperimentazione erano state alimentate con una dieta "home made" fino alla taglia di 220-370 g (tempo T=0). Nei successivi 3 mesi, dopo la semina in vasche a differenti densità, le trote sono state alimentate con una dieta biologica (Emerald Trout 60, Skretting) razionata allo 0.8% P/V in vasche ad alta (AD) e bassa densità (BD) di allevamento. Sugli individui prelevati per le analisi sono stati effettuati i rilevamenti biometrici e la filettatura dei campioni. Le analisi chimico-nutrizionali e quelle dei contaminanti sono state effettuate sulla parte edibile di più pools di trote per ciascuna tipologia. Ogni pool era costituito da 2-3 individui. Sul mangime somministrato ai pesci al tempo 0 (formulazione "home made") e su quello biologico commerciale somministrato nell'ultima fase della sperimentazione sono state effettuate le stesse analisi effettuate sulle trote. La lista degli ingredienti dei due mangimi è riportata nella Tab.WP5 1



Figura WP5.2 Vasche di allevamento situate nell'impianto dell'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università di Torino (Grugliasco)

Analisi chimico – nutrizionali

Il pH, l'umidità, le proteine e le ceneri sono stati valutati secondo i metodi AOAC (1990). L'azoto non proteico è stato determinato dopo precipitazione delle proteine con acido tricloroacetico al 20% (p/v). I lipidi totali sono stati estratti secondo il metodo di Bligh & Dyer (1959). I componenti della frazione lipidica insaponificabile (squalene, colesterolo, α - γ - e δ -tocoferolo, ed all-trans retinolo) sono stati determinati cromatograficamente previa saponificazione come descritto da Orban et al (2000). Xantofille e carotenoidi (astaxantina, cantaxantina cis e trans, luteina e β -carotene) sono stati determinati in HPLC sia sull'olio tal quale, per determinare le forme libere, che sull'olio dopo saponificazione, per determinare anche le forme esterificate, (Orban et al. 2007). La strumentazione utilizzata era un HPLC (Hewlett-Packard 1100 Series Liquid Chromatography) dotato di un rivelatore a serie di diodi, pompa quaternaria e sistema di degassaggio dei solventi. La separazione cromatografica è stata effettuata su colonna C18 Ultrasphere (5 micron, 25 cm x 4.6 mm, Beckman) protetta da una precolonna Ultrasphere ODS (4.6 mm x 4.5 cm, 5 micron, Beckman). Gli analiti erano identificati in base ai tempi di ritenzione ed agli spettri di assorbimento nella regione UV-visibile. I dati sono stati elaborati dal Software Chemstation della Hewlett Packard. I carotenoidi totali sono stati determinati spettrofotometricamente sull'olio estratto (Cejas et al. 2003)

La caratterizzazione della composizione in acidi grassi dei lipidi totali è stata effettuata trasformando gli acidi grassi in metilesteri mediante l'impiego di trifluoruro di boro metanolico (14% P/V)-metanolo (1:1 V/V) ed analizzando questi mediante gas-cromatografia. E' stato utilizzato un Gas Cromatografo (Hewlett Packard 6890 Series) dotato di rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) e di colonna capillare in silice fusa (30 m x 0.25 mm ID, 0.20 μ m film thickness). Gli acidi grassi determinati al FID sono identificati e confermati alla Gas-Massa (Varian 3900/Saturn 2100T GC/MS) usando una colonna con maggiore potere risolutivo (Crompack[®] CP-WAX 52 CB, 60 m x 0.32 mm ID, 0.5 μ m film thickness) e standards puri di tutti gli analiti.

Analisi dei contaminanti

Pesticidi organoclorurati e PCB – Sono stati determinati 23 Pesticidi Organoclorurati per i quali la legislazione Italiana ha fissato i limiti massimi tollerabili (Gazzetta Ufficiale 14-12-2004 Supp. Ordinario 179) ed altri 4 che, pur non compresi nella Normativa vigente, sono comunque importanti dal punto di vista ambientale. Per quanto riguarda i PCB non esiste ancora una Normativa Italiana per i prodotti ittici, che sia ben definita come per i Pesticidi. A livello Europeo sono stati selezionati, ormai da tempo, 7 PCB come “congeneri indicatori” dell'inquinamento da PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 138, PCB 153, PCB 180): per essi è stato fatto riferimento ai valori guida adottati da alcuni paesi OSPAR. Oltre a questi sono stati determinati altri 17 PCB scelti tra quelli maggiormente diffusi nell'ambiente. Tutti i PCB analizzati appartengono alla categoria “non-diossino simili”La determinazione strumentale di pesticidi e PCB è stata effettuata con un gascromatografo Varian CP-3800 equipaggiato con un autocampionatore, due iniettori e due colonne capillari separate e diverse. La prima colonna afferiva al detector ECD (Electron Capture Detector), la seconda colonna afferiva allo Spettrometro di Massa a trappola ionica “Saturn 2000 Varian. La doppia analisi strumentale ECD-Massa è quanto raccomandato dalle BPL (Buone Pratiche di Laboratorio) indicate dai Laboratori di Riferimento Italiano ed Europeo per l'analisi di Pesticidi Organoclorurati e dei PCB (Rapp. Istisan 1997).

Mercurio totale - Il mercurio totale nei campioni è stato determinato utilizzando l'Analizzatore Diretto di Mercurio DMA-80 (Milestone, Inc.). La strumentazione è costituita da un sistema automatizzato che permette l'analisi diretta di mercurio in matrici liquide e solide. Il campione viene decomposto ad elevate temperature, il mercurio in esso contenuto viene quindi intrappolato in amalgama d'oro, rilasciato come vapore e letto tramite Spettrofotometria per Assorbimento Atomico a 253.7 nm

Analisi statistica

I dati sono riportati come media \pm deviazione standard di almeno due repliche analitiche. La significatività delle differenze emerse fra campioni di trote allevate in vasche ad alta e bassa densità è stata determinata con il test-t di Student

Metodologie WP6

I campioni di pesci sono stati prelevati in data 22 ottobre 2012 presso il CNR di Torino, Dipartimento di Scienze Zootecniche Centro di allevamento Carmagnola, Strada Torino, 620 km 14 - Carmagnola (TO), in numero di 10 per ogni vasca, macellati ed immediatamente messi in miscela acqua-ghiaccio, monitorando per ogni individuo i principali parametri fisiologici (peso integrale, peso eviscerato, peso dei principali organi interni).

Sono state monitorate 6 vasche di produzione, 3 con una bassa densità di allevamento (BD, vasche 1, 3 e 5) e 3 con alta densità (AD, vasche 2, 4 e 6).

I pesci, eviscerati e sciacquati sotto acqua corrente, sono stati immediatamente avvolti in fogli di alluminio per uso alimentare, messi in miscela acqua-ghiaccio e trasportati presso il Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Unità di Ricerca per i Processi dell'Industria Agro-Alimentare di Milano (CRA-IAA), mantenendo la catena del freddo (2-4°C) fino alla effettuazione delle analisi qualitative previste.

Presso il CRA-IAA di Milano i pesci sono stati valutati per i seguenti parametri, misurandoli sia sul materiale biologico crudo, sia su quello cotto. Le misure qualitative, elencate qui di seguito, sono state effettuate in due giornate differenti, il 24 ed il 25 ottobre 2012:

Pesce crudo

-Valutazione sensoriale con un panel addestrato di 10 assaggiatori valutando i parametri qualitativi di un individuo per ogni vasca, presentando ad ogni assaggiatore su un piatto identificato con un codice di tre cifre casuali, sia la faccia esterna che quella interna dopo aver asportato la lisca centrale, e richiedendo di fornire un giudizio di gradimento per ogni descrittore con un test di classificazione per intervalli con valori 1, 2 e 3, dove il valore 1 è il minimo del gradimento ed il 3 è quello massimo. I descrittori considerati sono stati l'aspetto generale, la consistenza e l'odore.

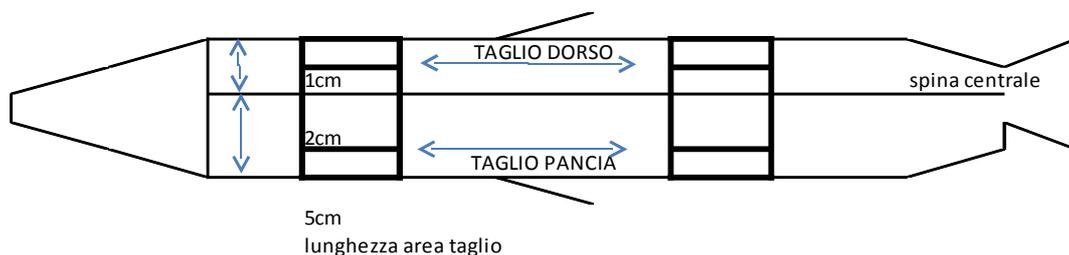
-Consistenza del filetto, misurato su due individui prelevati per ogni vasca in modo randomizzato. La misura ha previsto la resistenza al taglio con Dinamometro INSTRON (lama illustrata in Figura 1, velocità di discesa 100mm/min) di una quantità di filetto di circa 50 g di dimensioni costanti comprese della pelle, distinte in zona dorsale, 5 × 1 cm, e zona ventrale, 5 × 2 cm (Figura 2) e posta in modo tale che la direzione delle fasce muscolari era perpendicolare alla lama di taglio. I risultati sono espressi in kg di forza necessari per la rottura del tessuto. Il parametro della consistenza è generalmente

considerato un dato di grande importanza, i cui valori relativamente elevati denoterebbero una carne “soda”, quindi di elevata qualità. Lavori precedenti riguardanti studi sui cambiamenti della consistenza su prodotti a base di carne in base a differenti trattamenti tecnologici sono stati effettuati da parte del CRA-IAA (Paleari et al., Fleischwirtschaft Int., 1993, vol 9: 1020-1021; Paleari et al., Fleischwirtschaft Int., 1997, vol 6: 11-13).

Figura WP6.1 Probe per la misura della resistenza al taglio sui campioni di filetti del pesce crudo, spessore 1 mm, apertura taglio 6 cm.



Figura WP6.2. Schema del campionamento dei filetti per la misura della consistenza sul pesce crudo.



-La misura del colore è stata effettuata in riflettanza usando un colorimetro-spettrofotometro Minolta CM2600D supportato da un software di acquisizione dei dati Spectramagic NX. Le misure sono state effettuate sia sulla superficie esterna dei pesci tal quali che sulla parte interna del pesce dopo sfilettatura ed eliminazione della lisca centrale (tre misure sulla zona dorsale e tre su quella ventrale per ogni pesce). Il numero dei pesci per ogni vasca è stato di due, prelevati in maniera randomizzata. I parametri rilevati sono stati la luminosità (L^*), l'intensità del rosso-verde (a^*), l'intensità del

giallo-blu (b^*), la tonalità hue (h), la saturazione chroma (C^*), il grado di lucentezza (gloss), ed infine lo spettro in riflettanza tra 360 e 740 nm acquisito ad intervalli di 10 nm. La riflettanza nel visibile, specialmente riguardo il monitoraggio della possibile presenza di sangue nel filetto (400-450 nm e 525-670 nm) è stata considerata come un utile ausilio nella oggettivazione della freschezza del pesce, come affermato da lavori precedenti (Nilsen et al., Journal of Food Science, 2002, vol 67: 1821- 1826; Nilsen e Esaiassen, Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 2005, vol 38: 95-99).

Pesce cotto

I pesci eviscerati, scelti a caso in numero di 4 per ogni vasca, sono stati cotti in acqua bollente per 13 minuti esatti, usando un rapporto peso-acqua 1:5. Successivamente, sono stati raffreddati a temperatura ambiente. prima delle analisi qualitative.

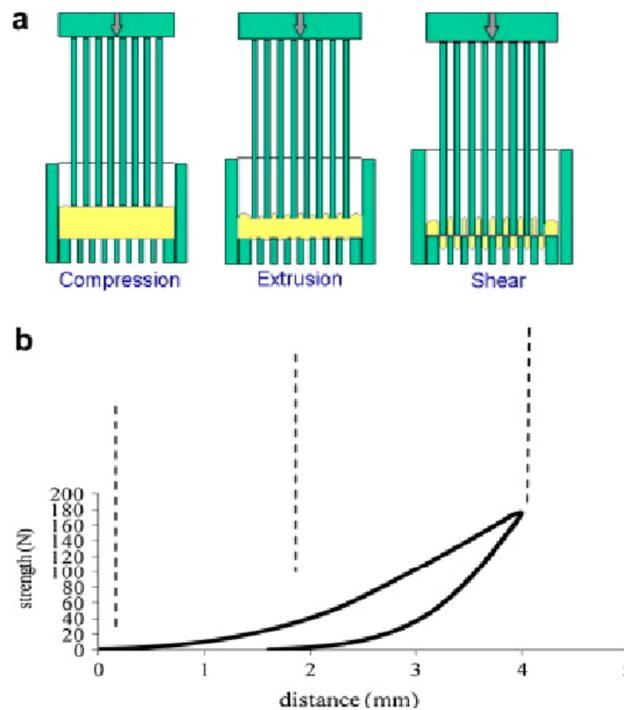
-Valutazione sensoriale con un panel addestrato di 10 assaggiatori valutando i parametri qualitativi di un individuo per ogni vasca, presentando ad ogni assaggiatore una porzione di filetto deliscato/vasca, ciascuno identificato con un codice di tre cifre casuali e richiedendo di fornire un giudizio di gradimento per ogni descrittore con un test di classificazione per intervalli con valori 1, 2 e 3, dove il valore 1 è il minimo del gradimento ed il 3 è quello massimo. I descrittori considerati sono stati l'aspetto generale, la consistenza, l'odore ed il sapore.

-Misura della consistenza. La consistenza è stata misurata con Dinamometro INSTRON su due campioni di filetto cotto provenienti da due individui prelevati per ogni vasca in modo randomizzato. La misura ha previsto la resistenza al taglio-disfacimento in una Kramer shear-press (Figura 3, velocità di discesa 100 mm/min) di una quantità di carne deliscata e pesata di circa 50 g, ponendo le fasce muscolari perpendicolari alle lame della shear-press. I risultati sono espressi in kg di forza necessari per la rottura del tessuto per 50 g, come dal principio di funzionamento dell'apparato, illustrato schematicamente in Figura 4.

Figura WP6.3. Illustrazione della Kramer-shear-press usata per la misura della consistenza sui campioni di pesce cotto.



Figura WP6.4. Schema illustrante il principio di funzionamento della Kramer shear-press (a), con il corrispondente andamento della forza coinvolta vs la distanza percorsa dal probe durante l'analisi (b).

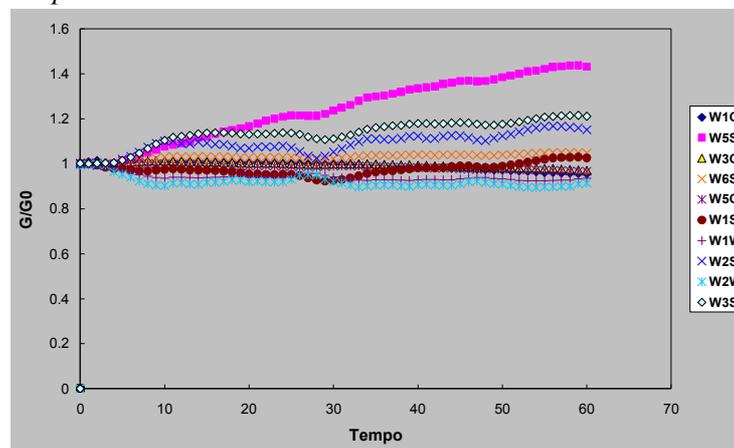


-La misura del colore è stata effettuata in riflettanza usando un colorimetro Minolta come sopra. Le misure sono state effettuate sui filetti dei pesci dopo la cottura (tre misure per ogni pesce). Il numero dei pesci per ogni vasca è stato di due, prelevati in maniera randomizzata. I parametri rilevati sono stati la luminosità (L^*), l'intensità del

rosso-verde (a^*), l'intensità del giallo-blu (b^*), la tonalità hue (h), la saturazione chroma (C^*), il grado di lucentezza (gloss), ed infine la riflettanza nell'intervallo tra 360 e 740 nm ad un intervallo di 10 nm.

- Naso elettronico Per le misure con il naso elettronico, 10 g di campione di trota cotta dopo raffreddamento (pool di 2 pesci, 2 repliche per tesi) sono stati posti in vials da 20 ml dotate di chiusura in alluminio e setto di silicone/PTFE e tenute a temperatura ambiente fino al momento dell'analisi con il naso elettronico. Le analisi dei campioni di trota sono state condotte a temperatura ambiente ($20^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$) con un naso elettronico portatile commerciale (PEN 3) prodotto dalla WMA (Win Muster Airsense, Analytics Inc., Germania). Il PEN3 è costituito da un apparato campionario, un rilevatore che comprende l'array dei sensori e un software per il riconoscimento delle impronte odorose (Win Muster vers. 3.0) per la registrazione dei dati. Il sistema di rilevazione è costituito da 10 sensori MOS (a base di ossidi di metalli) ciascuno con affinità specifiche e più precisamente: W1C (aromatico), W5S (ampio spettro), W3C (aromatico) W6S (idrogeno) W5C (aromatico-alifatico) W1S (metano-ampio spettro), W1W (solforato-organico) W2S (ampio spettro-alcologico) W2W (solforato-clorurato) e W3S (metano alifatici). Il gas dello spazio di testa è stato pompato sulla superficie dei sensori per 60 secondi (tempo di iniezione) al flusso di 45 ml/min; i segnali dei sensori sono stati registrati durante il tempo di iniezione. Dopo l'analisi del campione il sistema è stato pulito per 120 s con aria filtrata prima della successiva iniezione per permettere il ristabilimento della linea di base. Ciascun campione è stato analizzato con tre corse consecutive. Nella Figura 5 si riporta a titolo di esempio l'insieme dei segnali di G/G_0 registrati per un campione.

Figura WP6.5. Andamento del segnale G/G_0 dei sensori del PEN3 nell'arco dei 60 secondi di misurazione del campione VIA.



Analisi delle risposte dei sensori

Per ogni corsa, la conduttività G/G_0 dei dieci sensori al tempo corrispondente al massimo normalizzato di tutti i segnali è stato preso come il vettore del segnale dei sensori. Per l'analisi statistica delle risposte dei sensori è stata calcolata per ciascun campione (vial) la media delle tre corse.

ANALISI STATISTICA

I dati sensoriali, essendo di tipo categorico, sono stati sottoposti ad analisi della varianza ad una via con test di Kruskal-Wallis, considerando come fattore la vasca di allevamento; le mediane sono state confrontate utilizzando i grafici *box-and-whisker*.

I dati dei parametri di colore (L^* , a^* , b^* , C^* , H° , 8° gloss) e quelli dei valori di riflettanza a 420, 470, 540 e 670 nm ed i rapporti R420/540, R470/420 ed R670/420 sono stati sottoposti ad analisi della varianza ad una via e le medie sono state confrontate con il test di Tukey per $P \leq 0,05\%$.

Per quanto riguarda i dati sensoristici, le risposte di ciascun sensore sono state sottoposte ad analisi della varianza multifattoriale, considerando come fattori la modalità di allevamento e il tempo di conservazione a 4°C prima della cottura e la loro interazione. Le medie sono state confrontate con il test di Tukey. Inoltre per estrarre informazioni dai dati del naso elettronico e per studiare la correlazione globale delle variabili è stata condotta l'analisi delle componenti principali (PCA), utilizzando una matrice dei dati dei sensori costituita da 10 colonne (le variabili del naso elettronico) e 24 righe (una riga/pesce/vasca di allevamento/giorno di analisi) analizzando separatamente i giorni di conservazione a 4°C prima della cottura.

Infine sono stati studiati dei modelli di classificazione dei pesci dopo cottura per la modalità di allevamento tramite analisi discriminante lineare utilizzando quali variabili indipendenti la consistenza strumentale, i parametri di colore L^* e C^* , i rapporti delle riflettanze R420/540, R470/420 e le risposte dei sensori W1S, W2S e W3S.

Le analisi ANOVA, ANOVA multifattoriale, ANOVA con test di Kruskal-Wallis e l'analisi discriminante lineare sono state condotte con il pacchetto statistico Statgraphics versione 7 (Manugistic Inc, Rockville, MD, USA). L'analisi PCA è stata condotta con il pacchetto statistico The Unscrambler X versione 10.0.1 (CAMO, Oslo, Norvegia) usando l'algoritmo NIPALS (nonlinear iterative partial least-square).

RISULTATI SPERIMENTALI

WP1- Performance zootecniche

Il'inizio della sperimentazione su un campione di 15 esemplari sono state rilevate le prime misure qui di seguito riportate

Tabella wp1.1 - Misure realizzate sui campioni di trota a inizio prova

Lunghezza totale	21,8±1,5 cm
Peso Totale	115,9±27,6 g
Lunghezza dell'intestino	86±11 mm
Peso dei visceri	12,39±5,10 g
Peso del fegato	1,62±0,50 g
Indici ¹	
VSI	10,59±2,51
HSI	1,39±0,17
RIL	1,06±0,25
K	2,56±0,74

¹ VSI Indice Viscero somatico: rapporto tra peso dei visceri e peso totale

HSI Indice epato somatico: rapporto tra peso del fegato e peso totale

RIL : rapporto tra lunghezza dell'intestino e peso totale

K Indice di condizione: rapporto tra peso totale e lunghezza totale al cubo

A fine prova su un campione di 15 esemplari di trota per vasca sono stati rilevati i valori degli indici somatici per entrambe le densità.

Tabella wp1.2 - Misure realizzate sui campioni di trota a fine prova

	K	CY	VSI	HSI	GSI
AD	1.16±0.01	88.10±1.23	11.47±1.42	1.22±0.06	2.98±1.73
BD	1.16±0.03	90.42±2.38	10.76±1.21	1.17±0.29	1.83±1.02

Tabella WP1.1. Parametri zootecnici valori medi di vasca/individuali. I valori sono riportati come medie ± ds

	Bassa Densità	Alta densità
Peso medio (g)		
Prima iniziale	401± 9	374± 9
Prima pesata	451±44	455± 4
Seconda pesata	524±55	524± 5
Terza pesata	581±64	575± 6
Quarta pesata	660±76	646± 9
Pesata finale	683±74	673±15
SGR (%) della biomassa	0,65±0,12	0,69±0,04
SGR (%) individuale	0,65±0,11	0,73±0,01
FCR della biomassa	0,75±0,01	1,16±0,01
FCR Individuale	0,82±0,14	0,80±0,03
PER della biomassa	3,22±0,53	3,13±0,23
PER individuale	3,01±0,46	3,04±0,12
FR (%) della biomassa	0,20±0,01	0,22±0,01
FR (%) della biomassa	0,53±0,01	0,60±0,01

WP2 Omeostasi intestinale

All'inizio della sperimentazione sono stati campionati 6 esemplari per il controllo dello stato fisiologico dell'intestino e del fegato con le consuete metodiche istochimiche standard.

Nel corso del primo campionamento sono stati prelevati due tratti di intestino, prossimale e distale, ed il fegato; i campioni sono stati immediatamente messi sotto formalina al 4% e tamponata a pH 7,2. I campioni sono stati inclusi in paraffina e colorati per verificare lo stato di salute iniziale.

Al termine della prova in impianto sui due lotti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in sperimentazione, mantenuti rispettivamente a 15 e a 25 kg/m³, a cui è stato somministrato un alimento biologico a basso contenuto di farine di pesce, si controllerà con le opportune analisi biochimiche ed istologiche, che la parete intestinale si mantenga nelle migliori condizioni di salute. Questa serie di analisi è finalizzata alla verifica del buon stato delle cellule deputate all'assorbimento delle sostanze nutritive; nel corso dell'ingrasso, uno stress cronico da densità può provocare un assorbimento non ottimale con riflessi negativi sulla crescita e sulla qualità del prodotto finito. Per quanto concerne le analisi istologiche sono stati effettuati due campionamenti, uno all'inizio ed uno alla fine della sperimentazione, durante i quali verranno selezionati in maniera casuale almeno cinque pesci per ogni trattamento sperimentale. I pesci sono stati soppressi a digiuno (48 ore) mediante overdose di anestetico (Olio di chiodo di garofano,) e da questi sono stati prelevati campioni di intestino prossimale e distale. I campioni sono stati quindi fissati in formalina tamponata (pH 7,2) al 4% e refrigerata a 4°C in attesa delle analisi. Dopo una settimana, i pezzi fissati sono stati messi in paraffina, seguendo le procedure istologiche standard e tagliati con il microtomo sezioni dello spessore di 5 µm che sono poi state montate su vetrini da microscopio per le successive colorazioni. Tutti i tessuti campionati, una volta colorati con il normale metodo ematossilina-eosina di Mayer, sono stati valutati per il loro quadro istopatologico. Gli indicatori isto-patologici che sono stati valutati sono: l'altezza media degli enterociti, lo spessore della lamina propria, la lunghezza della lamina propria, il rapporto fra enterocita e lamina propria ed il rapporto lunghezza e altezza del villo. Un totale di cinque enterociti per villo e due villi intestinali per pesce sono stati misurati tramite un programma di analisi per immagini (Image Pro Plus® software, Bethesda, Usa), come descritto in Daprà et al., (2011). I risultati ottenuti sono riportati in tabella 5.

I valori sono riportati come medie \pm ds; n=10.

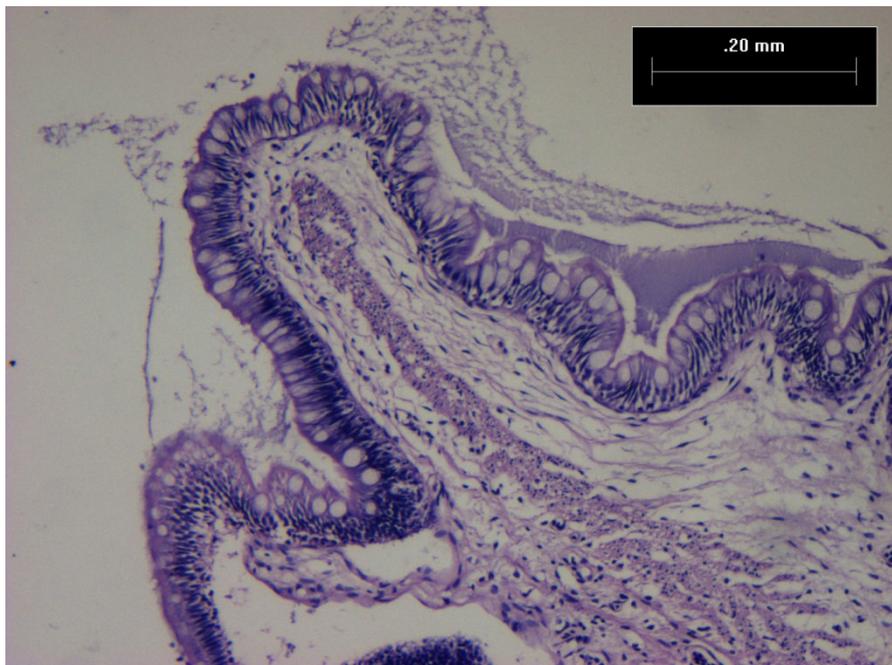
	Bassa Densità	Alta Densità
Intestino prossimale		
Peso medio pesci (g)	693 \pm 94	637 \pm 129
Altezza media enterociti (μ m)	44 \pm 23	44 \pm 9
Spessore lamina propria (μ m)	29 \pm 16	26 \pm 7
Lunghezza lamina propria (μ m)	603 \pm 297	689 \pm 106
Rapporto Enterocita/Lamina propria	1,6 \pm 0,6	1,7 \pm 0,3
Rapporto lunghezza/altezza villo	5,6 \pm 1,8	6,3 \pm 2,2
Intestino Distale		
Peso medio (g)	682 \pm 109	642 \pm 133
Altezza enterociti (μ m)	69 \pm 23	60 \pm 26
Spessore lamina propria (μ m)	199 \pm 129	136 \pm 84
Lunghezza Lamina propria (μ m)	2260 \pm 728	1884 \pm 759
Rapporto enterocita/Lamina propria	0,5 \pm 0,2	0,5 \pm 0,2
Rapporto lunghezza/altezza del villo	7,6 \pm 2,7	8,2 \pm 2,8

Questa serie di analisi è finalizzata alla verifica del buon stato delle cellule della mucosa intestinale deputate all'assorbimento delle sostanze nutritive; infatti, nel corso dell'ingrasso, uno degli effetti di un eccesso della densità è uno stress di tipo cronico che può provocare un assorbimento non ottimale può determinare effetti negativi sulla crescita e indirettamente sulla qualità del prodotto finito.

Figura WP2.1- Intestino prossimale; nella prima immagine è riportato il lume intestinale e nella seconda a maggior ingrandimento il dettaglio dei villi.



Figura WP2.2 - Intestino distale; in alto vi è la struttura di un principale ed in basso il dettaglio della struttura di un villo secondario.



L'altezza degli enterociti e la lunghezza dei villi intestinali sono dei parametri utili per esaminare lo stato fisiologico dell'intestino dei pesci (Ostaszewska et al. 2005; Rašković et al. 2011); se questi valori sono incrementati, questo comporta solitamente un migliore assorbimento dei nutrienti a livello intestinale (Epler et al. 2009). L'analisi istomorfometrica dell'altezza degli enterociti nell'intestino prossimale e distale non ha rivelato sostanziali differenze tra i gruppi di pesci allevati ad alta e bassa densità (Tabella WP2.1). Differenze si possono apprezzare solo comparando i due tipi di tessuto intestinale, ma questo risulta esser un normale dato riconducibile alla loro differente struttura anatomica. Inoltre, tipici segni delle patologie riscontrabili a livello dell'intestino dei pesci sono l'accorciamento dei villi intestinali, l'ispessimento della lamina propria e della sottomucosa con l'infiltrazione di cellule infiammatorie (nelle trote in particolare granulociti eosinofili e linfociti) ed un incrementato numero di cellule caliciformi mucipare nell'epitelio (Krogdahl et al. 2000; Refstie et al. 2000). Anche per questi parametri, come riportato precedentemente, l'analisi istomorfometrica non ha rivelato sostanziali differenze tra i gruppi di pesci allevati ad alta e bassa densità (Tabella WP2.1). Dall'insieme quindi di questi risultati si può affermare che le due densità di allevamento sperimentate non hanno alterato lo stato morfologico dell'intestino e di conseguenza l'assorbimento delle sostanze nutritive, confermando in questo modo i dati relativi alle crescite ed ai parametri zootecnici registrati durante la sperimentazione.

Dalle immagini riportate nelle figure WP2.1 e WP2.2 emerge che le trote alimentate con l'alimento biologico non presentavano alcuna alterazione vuoi per effetto della formulazione alimentare vuoi per effetto di una corretta gestione. In altre sperimentazioni in condizioni simili a quelle produttive alcune alterazioni si presentavano con un numero di campioni inferiori alla presente sperimentazione (n=15). Dall'analisi autoptica anche lo stato dei fegati era ottimale rendendo superflua ogni altra analisi istologica.

Risultati WP3

Ucrit

Il valore medio di U_{crit} corretto (Tabella WP3.3) mostrato dai 20 individui di *O. mykiss* impiegati per le prove di nuoto è pari a 1.28 ± 0.05 m/s.

L'analisi della regressione lineare effettuata sui dati di *performance* di nuoto ha evidenziato l'esistenza di relazioni positive tra la velocità critica di nuoto e la taglia, mentre la velocità critica di nuoto relativa (sia standardizzata con LT che con SL) ha mostrato una relazione positiva solo con il peso (Tabella WP3.4, Figura WP3.14).

Tabella WP3.3 Valori medi (media \pm errore standard) ed range di U_{crit} , U_{crit} corretto e U_{crit} ottenuti durante la sperimentazione.

n = 20	media	intervallo
U_{crit} (m/s)	1.10 \pm 0.04	0.6 - 1.4
U_{crit} corretto (m/s)	1.28 \pm 0.05	0.7 - 1.6
U_{crit} relativo (BL/s)	3.71 \pm 0.12	2.6 - 4.6

Tabella WP3.4 Risultati delle regressioni lineari effettuate nelle varie combinazioni.

	U_{crit} corretto	U_{crit} relativo (BL)	U_{crit} relativo (SL)
LT	$R^2=0.54$; $p=0.00024$	$R^2=0.13$; $p=0.12$	$R^2=0.22$; $p=0.035$
LS	$R^2=0.53$; $p=0.00029$	$R^2=0.15$; $p=0.094$	$R^2=0.19$; $p=0.058$
PT	$R^2=0.67$; $p=0.00001$	$R^2=0.29$; $p=0.014$	$R^2=0.35$; $p=0.0056$

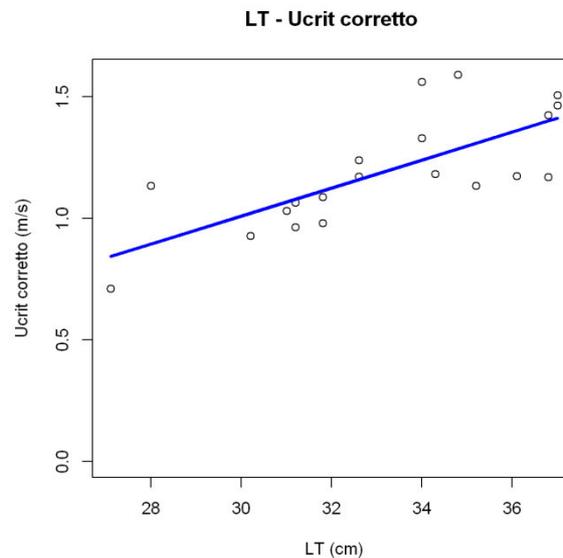


Figura WP3.14 Regressione lineare tra lunghezza totale e U_{crit} corretto ($n = 20$, p -value=0.00024).

Consumo di ossigeno

Il modello in grado di offrire il miglior *fitting* dei dati relativi al consumo di ossigeno è stato il modello logistico. Esso ha, infatti, mostrato un $AIC = 1163.387$ più basso di quello mostrato dal modello lineare ($AIC_{lineare}=1166.45$) e dal modello esponenziale ($AIC_{exp}=1178.89$).

La regressione effettuata sui dati di consumo di ossigeno in funzione della velocità di nuoto ha mostrato una elevata significatività (p -value < 0.05) (Figura WP3.15; Tabella WP3.5).

L'equazione del modello è la seguente:

$$Y = \frac{A_{sym}}{1 + e^{\frac{x_{mid} - X}{scal}}}$$

dove A_{sym} rappresenta l'asintoto; x_{mid} rappresenta il valore di x nel punto di flesso della curva, quando $Y = A_{sym}/2$; $scal$ è un parametro di scala sull'asse delle X .

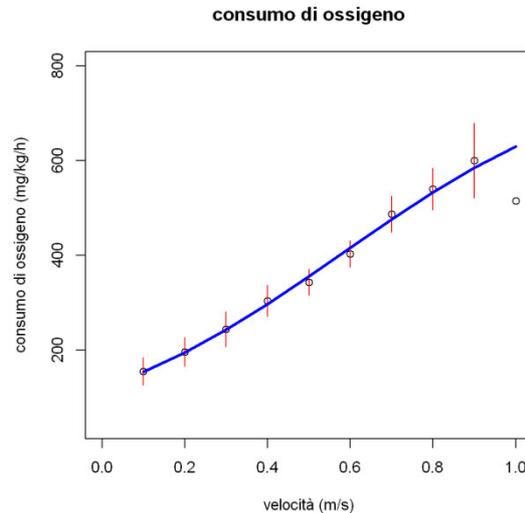


Figura WP3.15 Modello logistico del consumo di ossigeno in funzione della velocità di nuoto (p -value < 0.05).

Tabella WP3.5 Parametri relativi alla stima del modello logistico del consumo di ossigeno. Livelli di significatività: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05.

	stima	Std. Error	t-value	p-value	livello significatività
Asym	806.65	234.66	3.44	0.000887	***
Xmid	0.58	0.21	2.70	0.008183	**
Beta	0.33	0.097	3.39	0.001031	**

Lo *standard metabolic rate* (SMR) è definito come il consumo di ossigeno in condizioni di inattività. Esso può, quindi, essere stimato estrapolando il consumo di ossigeno a $U=0$. *Active metabolic rate* (AMR) viene, invece, stimato estrapolando il consumo di ossigeno alla massima velocità teorica: l' U_{crit} (Tabella WP3.6).

Tabella WP3.6 Valori di SMR, AMR e di SFA estrapolati dal modello stimato per il consumo di ossigeno.

	SMR	AMR	SFA
mgO ₂ /kg/h	119.35	668.41	549.06

Attività muscolare

I modelli in grado di offrire il miglior *fitting* dei dati relativi all'attività del muscolo rosso e del muscolo bianco in funzione della velocità di nuoto sono stati rispettivamente quello lineare e quello esponenziale (Figura WP3.16, Tabella WP3.7). Essi hanno

mostrato i valori di AIC più bassi rispetto agli altri modelli testati, come riportato in Tabella WP3.8.

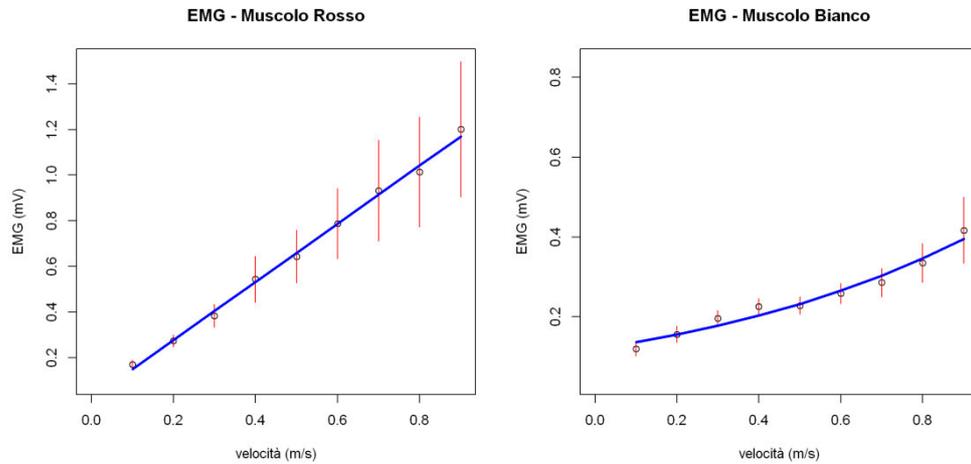


Figura WP3.16 Modello lineare dell'attività muscolare del muscolo rosso ed esponenziale dell'attività del muscolo bianco, in funzione della velocità di nuoto.

Tabella WP3.7 Parametri relativi alla stima del modello lineare dell'EMG del muscolo rosso (p -value= 2.07E-09). Livelli di significatività: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05.

Muscolo rosso					
	stima	Std. Error	t-value	p-value	livello significatività
intercetta	0.02293	0.10265	0.223	0.824	
X	1.27478	0.1895	6.727	2.07E-09	***
Muscolo bianco					
	stima	Std. Error	t-value	p-value	livello significatività
alpha	0.11992	0.01522	7.881	1.12E-11	***
beta	1.32576	0.18752	7.07	4.46E-10	***

Tabella WP3.8 Valori di AIC stimati per differenti modelli di attività del muscolo rosso e del muscolo bianco

	Modello lineare	Modello esponenziale	Modello logistico
Muscolo rosso	105.176	106.719	107.194
Muscolo bianco	-146.78	-147.85	-

Calibrazione dei tag tail-beat

Il modello in grado di offrire il miglior *fitting* dei dati relativi alla calibrazione dei trasmettitori utilizzati, ovvero di attività natatoria (intesa come accelerazione del tail-beat) in funzione della velocità di nuoto, è stato il modello esponenziale. Esso ha, infatti, mostrato un $AIC = 759.64$ più basso di quello mostrato dal modello logistico ($AIC_{\text{logistico}}=760.29$) e dal modello lineare ($AIC_{\text{lineare}}=762.50$) (Figura WP3.17, Tabella

WP3.9). E' stato, inoltre, stimato il modello lineare del consumo di ossigeno in funzione del livello di attività natatoria registrata durante la calibrazione dei trasmettitori (Figura WP3.18, Tabella WP3.10).

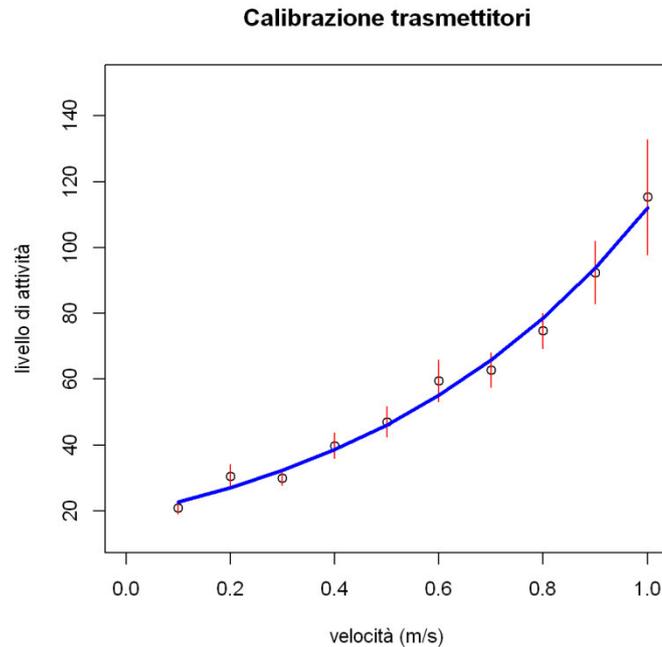


Figura WP3.17 Modello esponenziale dell'attività natatoria delle trote utilizzate per la calibrazione dei trasmettitori in funzione della velocità di nuoto. Il livello di attività estrapolato dai trasmettitori è un numero adimensionale, compreso in un range da 0 a 255. Esso esprime il modulo del vettore risultante dalla somma dei vettori di accelerazione rilevati dal tag sui tre assi cartesiani.

Tabella WP3. 9 Parametri relativi alla stima del modello esponenziale dell'attività di nuoto durante la calibrazione dei trasmettitori. Livelli di significatività: *** 0.001, ** 0.01, * 0.05.

	stima	Std. Error	t-value	p-value	livello significatività
alpha	18.97	2.41	7.86	5.17E-12	***
beta	1.78	0.15	11.44	< 2E-10	***

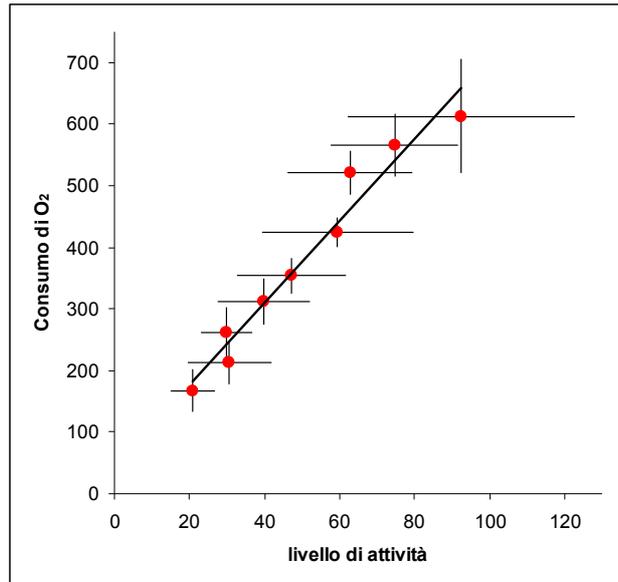


Figura WP3.18 Modello lineare del consumo di ossigeno in funzione del livello di attività natatoria registrata durante la calibrazione dei trasmettitori.

Tabella WP3.10 Parametri relativi alla stima del modello lineare del consumo di ossigeno in funzione del livello di attività ($p\text{-value} = 4.04E-06$, $R^2 = 0.95$). Livelli di significatività: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05.

	stima	Std. Error	t-value	p-value	livello significatività
intercetta	42.74	28.77	1.49	0.181	
X	6.66	0.52	12.84	4.04E-6	***

Indagini telemetriche

I modelli GLM dell'attività natatoria circadiana hanno mostrato in entrambe le densità una elevata significatività della stima per tutte le ore del giorno e quasi tutte quelle della notte (fatta eccezione per le ore 23 e 01 (Tabella WP3.11-WP3.12). La rappresentazione grafica dei modelli è riportata in Figura WP3.19.

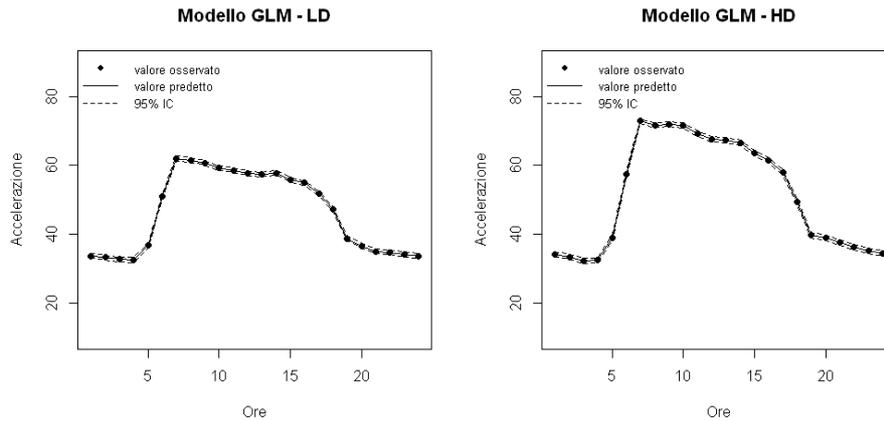


Figura WP3.19 Modello circadiano dell'intensità di attività di nuoto nei due gruppi sperimentali (LD: bassa densità; HD: alta densità) (IC: intervallo di confidenza del 95%).

Dalla rappresentazione grafica dei modelli risulta evidente che la maggior parte dell'attività di nuoto è esibita, dalle trote, durante le ore diurne, ed in particolare i livelli di attività registrati nel gruppo sperimentale a più alta densità, in questo periodo della giornata, risultano più elevati di quelli mostrati dagli animali allevati a bassa densità. Per questa ragione le successive analisi hanno tenuto conto dei dati registrati durante le sole ore diurne caratterizzate dalla maggiore attività di nuoto (dalle ore 8 alle ore 18) (Figura WP3.20). L'analisi dei trend condotta sui due campioni con il test di Cox-Stuart ha evidenziato la significativa diminuzione dell'attività nei due gruppi sperimentali nel periodo di tempo considerato nella sperimentazione (p-value < 0.05).

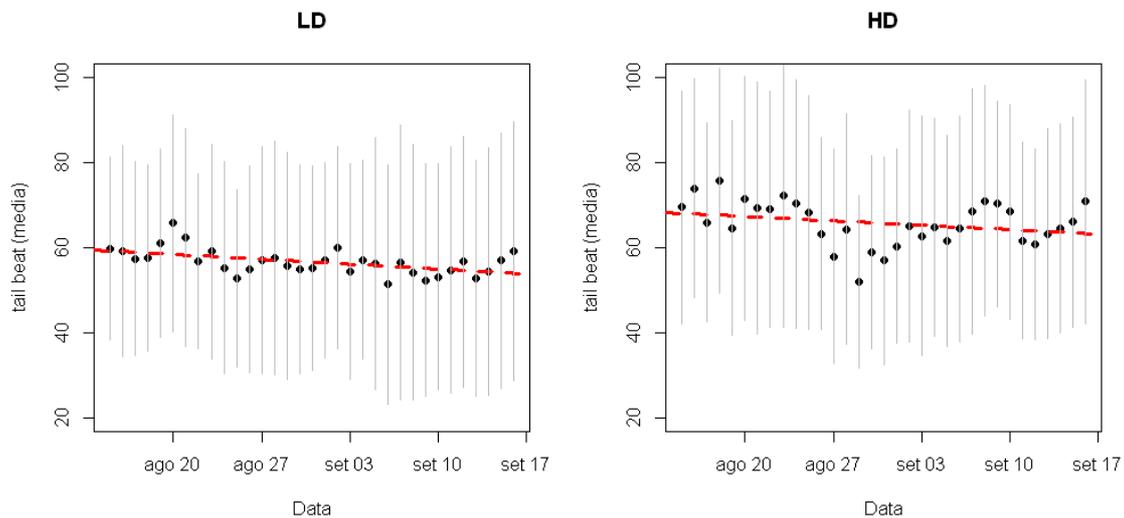


Figura WP3.20 Valori diurni medi (\pm deviazione standard) di attività di nuoto nella bassa (sinistra) e nella alta (destra) densità nel periodo compreso tra il 15/08/2012 ed il 16/09/2012. Il livello di attività registrato dai trasmettitori è un numero adimensionale compreso in un range da 0 a 255.

Tabella WP3.11 Risultato della analisi GLM effettuata sui dati di attività registrati dagli animali anlevati nelle vasche a bassa densità.

```

Call:
glm(formula = Tag$Value ~ factor(Tag$Ora) + factor(Tag$Giorno),
     family = gaussian(link = "identity"), data = Tag)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-62.495 -11.734  -1.843   9.317  224.123

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    32.432873   0.355006   91.359 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 01    -0.322662   0.330680   -0.976 0.329189
factor(Tag$Ora) 02    -0.900543   0.329885   -2.730 0.006337 **
factor(Tag$Ora) 03    -1.095777   0.329406   -3.327 0.000880 ***
factor(Tag$Ora) 04     3.051729   0.329203    9.270 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 05    17.204267   0.329302   52.245 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 06    28.317653   0.329862   85.847 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 07    27.824811   0.329862   84.353 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 08    27.002638   0.330111   81.799 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 09    25.511848   0.330232   77.254 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 10    24.854790   0.329679   75.391 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 11    24.067579   0.330387   72.847 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 12    23.673136   0.329070   71.940 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 13    24.134884   0.329797   73.181 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 14    22.240046   0.329756   67.444 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 15    21.335994   0.328946   64.862 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 16    18.063640   0.329537   54.815 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 17    13.633604   0.328554   41.496 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 18     5.095997   0.328581   15.509 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 19     2.994716   0.330339    9.066 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 20     1.345338   0.329538    4.082 4.46e-05 ***
factor(Tag$Ora) 21     1.141908   0.329509    3.465 0.000529 ***
factor(Tag$Ora) 22     0.523003   0.330283    1.583 0.113309
factor(Tag$Ora) 23     0.003284   0.329276    0.010 0.992042
factor(Tag$Giorno) 02    1.081629   0.384808    2.811 0.004942 **
factor(Tag$Giorno) 03   -0.535907   0.384059   -1.395 0.162904
factor(Tag$Giorno) 04    1.668196   0.384518    4.338 1.44e-05 ***
factor(Tag$Giorno) 05   -0.459830   0.383491   -1.199 0.230504
factor(Tag$Giorno) 06   -2.627001   0.385039   -6.823 8.96e-12 ***
factor(Tag$Giorno) 07    0.385531   0.386403    0.998 0.318404
factor(Tag$Giorno) 08   -0.121104   0.385474   -0.314 0.753393
factor(Tag$Giorno) 09   -1.510993   0.386420   -3.910 9.22e-05 ***
factor(Tag$Giorno) 10   -1.001099   0.386852   -2.588 0.009659 **
factor(Tag$Giorno) 11    0.615761   0.385824    1.596 0.110499
factor(Tag$Giorno) 12    1.025547   0.386224    2.655 0.007924 **
factor(Tag$Giorno) 13   -0.753220   0.384879   -1.957 0.050345 .
factor(Tag$Giorno) 14    0.511805   0.385518    1.328 0.184319
factor(Tag$Giorno) 15    3.237545   0.336613    9.618 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno) 16    3.412380   0.334248   10.209 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno) 17    3.859579   0.384950   10.026 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno) 18    3.801192   0.382704    9.932 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno) 19    4.890094   0.385286   12.692 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno) 20    6.230251   0.385664   16.155 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno) 21    4.424642   0.385007   11.492 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno) 22    2.505902   0.384722    6.514 7.36e-11 ***
factor(Tag$Giorno) 23    2.863524   0.384058    7.456 8.95e-14 ***
factor(Tag$Giorno) 24    0.966904   0.384329    2.516 0.011876 *
factor(Tag$Giorno) 25   -0.461878   0.384733   -1.201 0.229940
factor(Tag$Giorno) 26    0.995186   0.384703    2.587 0.009685 **
factor(Tag$Giorno) 27    0.840537   0.386584    2.174 0.029686 *
factor(Tag$Giorno) 28    0.555238   0.383901    1.446 0.148093
factor(Tag$Giorno) 29    0.253589   0.384587    0.659 0.509653
factor(Tag$Giorno) 30   -0.742289   0.384807   -1.929 0.053733 .
factor(Tag$Giorno) 31   -0.603290   0.385432   -1.565 0.117530
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for gaussian family taken to be 493.187)

Null deviance: 136768201 on 218281 degrees of freedom
Residual deviance: 107627212 on 218228 degrees of freedom
AIC: 1973056

Number of Fisher Scoring iterations: 2
  
```

Tabella WP3. 12 Risultato della 'analisi GLM effettuata sui dati di attività registrati dagli animali allevati nelle vasche ad alta densità.

```

Call:
glm(formula = Tag$Value ~ factor(Tag$Ora) + factor(Tag$Giorno),
     family = gaussian(link = "identity"), data = Tag)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-64.560  -13.254   -3.367    8.717   217.335

Coefficients:
                Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      28.8034     0.3947  72.969 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)01 -0.6058     0.3645  -1.662 0.096509 .
factor(Tag$Ora)02 -1.6623     0.3640  -4.567 4.96e-06 ***
factor(Tag$Ora)03 -1.6371     0.3651  -4.484 7.32e-06 ***
factor(Tag$Ora)04  4.8354     0.3674  13.163 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)05  23.4762     0.3744  62.710 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)06  38.8770     0.3728  104.277 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)07  37.6078     0.3738  100.608 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)08  38.0594     0.3749  101.515 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)09  37.5859     0.3744  100.400 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)10  35.2503     0.3731  94.473 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)11  33.7530     0.3749  90.032 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)12  33.3770     0.3751  88.973 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)13  32.6628     0.3756  86.964 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)14  29.7510     0.3755  79.221 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)15  27.6205     0.3748  73.699 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)16  24.0888     0.3748  64.278 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)17  15.6619     0.3738  41.903 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)18  5.9113     0.3700  15.976 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)19  4.8228     0.3659  13.179 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)20  3.4548     0.3645   9.478 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora)21  2.3289     0.3641   6.396 1.60e-10 ***
factor(Tag$Ora)22  1.0925     0.3641   3.001 0.002693 **
factor(Tag$Ora)23  0.3955     0.3637   1.088 0.276789
factor(Tag$Giorno)02 3.7394     0.4287   8.722 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)03 1.4325     0.4274   3.352 0.000803 ***
factor(Tag$Giorno)04 4.6823     0.4271  10.963 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)05 2.6603     0.4279   6.216 5.10e-10 ***
factor(Tag$Giorno)06 5.0841     0.4287  11.858 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)07 8.3519     0.4315  19.356 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)08 8.7403     0.4301  20.323 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)09 8.0050     0.4282  18.696 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)10 7.1512     0.4303  16.617 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)11 3.4283     0.4293   7.986 1.40e-15 ***
factor(Tag$Giorno)12 2.4969     0.4285   5.827 5.66e-09 ***
factor(Tag$Giorno)13 6.5326     0.4286  15.242 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)14 5.6570     0.4285  13.202 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)15 6.6976     0.3753  17.845 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)16 8.4067     0.3774  22.275 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)17 6.0946     0.4581  13.303 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)18 10.3199     0.4566  22.602 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)19 4.2562     0.4564   9.326 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)20 9.3243     0.4543  20.522 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)21 8.1108     0.4501  18.021 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)22 8.6410     0.4532  19.067 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)23 10.6436     0.4406  24.155 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)24 8.1952     0.4336  18.899 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)25 6.6576     0.4465  14.912 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)26 5.1216     0.4421  11.586 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)27 1.7508     0.4330   4.043 5.27e-05 ***
factor(Tag$Giorno)28 2.8939     0.4271   6.775 1.25e-11 ***
factor(Tag$Giorno)29 -2.8309     0.4298  -6.586 4.54e-11 ***
factor(Tag$Giorno)30 -0.7796     0.4291  -1.817 0.069257 .
factor(Tag$Giorno)31 -0.2597     0.4275  -0.608 0.543503
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for gaussian family taken to be 482.6981)

    Null deviance: 120944019  on 163922  degrees of freedom
Residual deviance: 79099249  on 163869  degrees of freedom
AIC: 1478194

Number of Fisher Scoring iterations: 2
  
```

Il valore medio delle attività di nuoto nei due gruppi sperimentali (ore diurne) sono stati rispettivamente di 56.62 ± 0.083 e 65.30 ± 0.098 per il gruppo a bassa e ad alta densità. Questi valori risultano significativamente differenti tra di loro (test di Kruskal-Wallis, p-value < $2.2E-16$). Tale differenza è altrettanto evidente nei grafici che riportano le distribuzioni di frequenza relativa delle attività (Figura WP3.21).

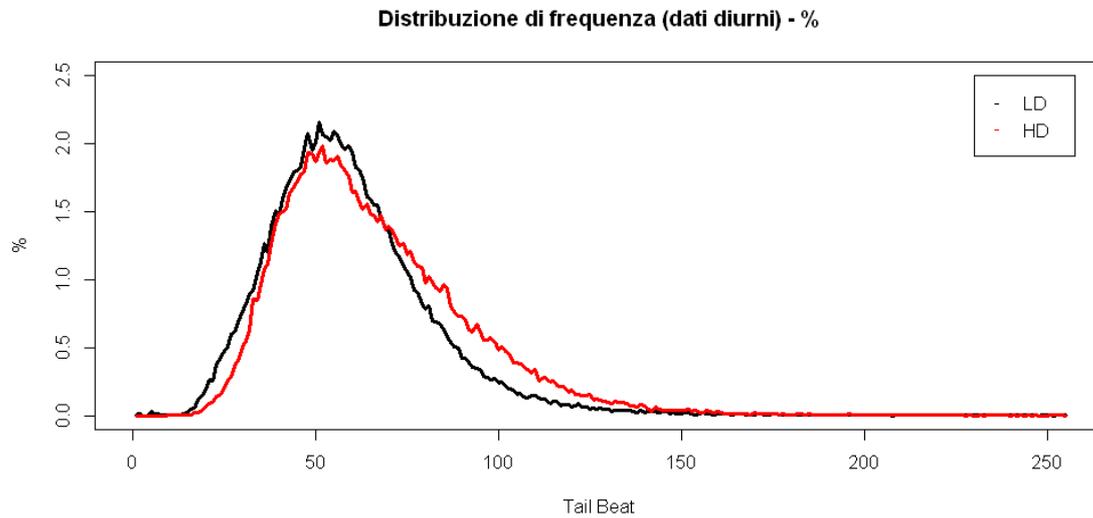


Figura WP3.21 Distribuzione di frequenza relativa dei dati diurni di attività di nuoto registrata tra il 15/08/2012 ed il 16/09/2012 nei due differenti gruppi sperimentali. Il livello di attività estrapolato dai trasmettitori è un numero adimensionale, compreso in un range da 0 a 255.

I modelli GLM sono stati nuovamente stimati con il nuovo set di dati relativo alle sole ore diurne del periodo compreso tra il 15/08/2012 ed il 16/09/2012 (Figura 22, Tabelle WP3.13-WP3.14).

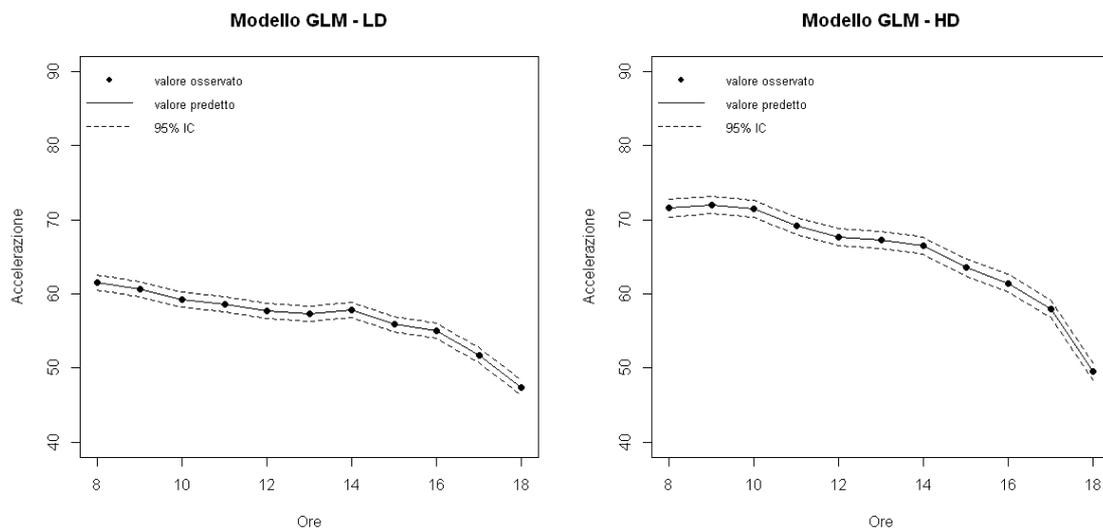


Figura WP3.22 Modello GLM diurno dell'intensità di attività di nuoto nei due gruppi sperimentali nel periodo tra il 15/08/2012 ed il 16/09/2012 (LD: bassa densità; HD: alta densità) (IC: intervallo di confidenza del 95%).

Tabella WP3. 13 Risultato della analisi GLM effettuata sui dati diurni di attività registrati dagli animali allevati nelle vasche a bassa densità (15/08/2012 ed il 16/09/2012).

```

Call:
glm(formula = Tag$Value ~ factor(Tag$Ora) + factor(Tag$Giorno),
     family = gaussian(link = "identity"), data = Tag)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-62.276  -14.595   -2.243   12.049   207.169

Coefficients:
                Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      62.05068    0.53362  116.283 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 9     -0.80737    0.38328   -2.106 0.035166 *
factor(Tag$Ora) 10    -2.30095    0.38343   -6.001 1.97e-09 ***
factor(Tag$Ora) 11    -2.96696    0.38278   -7.751 9.20e-15 ***
factor(Tag$Ora) 12    -3.76299    0.38360   -9.810 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 13    -4.15287    0.38207  -10.869 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 14    -3.69943    0.38292   -9.661 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 15    -5.59276    0.38287  -14.608 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 16    -6.49241    0.38193  -16.999 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 17    -9.75274    0.38261  -25.490 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 18   -14.19556    0.38147  -37.213 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)02  2.80172    0.65965   4.247 2.17e-05 ***
factor(Tag$Giorno)03 -2.68587    0.65874   -4.077 4.56e-05 ***
factor(Tag$Giorno)04 -0.01126    0.66030   -0.017 0.986392
factor(Tag$Giorno)05 -1.07547    0.65868   -1.633 0.102525
factor(Tag$Giorno)06 -5.78548    0.66019   -8.763 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)07 -0.56454    0.66444   -0.850 0.395524
factor(Tag$Giorno)08 -2.99975    0.66237   -4.529 5.94e-06 ***
factor(Tag$Giorno)09 -4.78735    0.66388   -7.211 5.59e-13 ***
factor(Tag$Giorno)10 -3.97777    0.66349   -5.995 2.04e-09 ***
factor(Tag$Giorno)11 -2.43471    0.66232   -3.676 0.000237 ***
factor(Tag$Giorno)12 -0.43387    0.66332   -0.654 0.513051
factor(Tag$Giorno)13 -4.44377    0.66133   -6.719 1.83e-11 ***
factor(Tag$Giorno)14 -2.80613    0.66254   -4.235 2.28e-05 ***
factor(Tag$Giorno)15  1.22537    0.57763   2.121 0.033892 *
factor(Tag$Giorno)16  2.01670    0.57313   3.519 0.000434 ***
factor(Tag$Giorno)17  0.16407    0.65916   0.249 0.803430
factor(Tag$Giorno)18  0.33979    0.65565   0.518 0.604280
factor(Tag$Giorno)19  3.78870    0.65976   5.743 9.35e-09 ***
factor(Tag$Giorno)20  8.64227    0.66166  13.062 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)21  5.12172    0.66111   7.747 9.48e-15 ***
factor(Tag$Giorno)22 -0.39165    0.65949   -0.594 0.552605
factor(Tag$Giorno)23  1.98532    0.65684   3.023 0.002507 **
factor(Tag$Giorno)24 -1.86301    0.65884   -2.828 0.004689 **
factor(Tag$Giorno)25 -4.45968    0.65987   -6.758 1.40e-11 ***
factor(Tag$Giorno)26 -2.37174    0.65954   -3.596 0.000323 ***
factor(Tag$Giorno)27 -0.02393    0.66395   -0.036 0.971254
factor(Tag$Giorno)28  0.51359    0.65927   0.779 0.435962
factor(Tag$Giorno)29 -1.47966    0.66067   -2.240 0.025118 *
factor(Tag$Giorno)30 -2.39287    0.66100   -3.620 0.000295 ***
factor(Tag$Giorno)31 -2.08236    0.66003   -3.155 0.001606 **
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for gaussian family taken to be 665.3049)

Null deviance: 68979883  on 100078  degrees of freedom
Residual deviance: 66555768  on 100038  degrees of freedom
AIC: 934593

Number of Fisher Scoring iterations: 2

```

Tabella WP3.14 Risultato della 'analisi GLM effettuata sui dati diurni di attività registrati dagli animali allevati nelle vasche ad alta densità (15/08/2012 ed il 16/09/2012).

```

Call:
glm(formula = Tag$Value ~ factor(Tag$Ora) + factor(Tag$Giorno),
     family = gaussian(link = "identity"), data = Tag)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-65.069 -17.156  -4.096  12.393  209.980

Coefficients:
                Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      66.603627   0.591967  112.512 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 9         0.471265   0.438739    1.074 0.282765
factor(Tag$Ora) 10         0.009034   0.438118    0.021 0.983548
factor(Tag$Ora) 11        -2.340178   0.436760   -5.358 8.44e-08 ***
factor(Tag$Ora) 12        -3.814732   0.438706   -8.695 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 13        -4.168792   0.438991   -9.496 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 14        -4.881878   0.439509  -11.108 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 15        -7.775897   0.439464  -17.694 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 16        -9.914381   0.438623  -22.603 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 17       -13.442371   0.438612  -30.648 < 2e-16 ***
factor(Tag$Ora) 18       -21.891061   0.437488  -50.038 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)02      4.755865   0.721847    6.588 4.47e-11 ***
factor(Tag$Giorno)03      2.362149   0.724969    3.258 0.001121 **
factor(Tag$Giorno)04      4.469154   0.720179    6.206 5.48e-10 ***
factor(Tag$Giorno)05      1.190714   0.722362    1.648 0.099283 .
factor(Tag$Giorno)06      3.922079   0.723476    5.421 5.94e-08 ***
factor(Tag$Giorno)07      7.980716   0.731826   10.905 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)08     10.739504   0.726337   14.786 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)09      9.801407   0.721705   13.581 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)10      7.996912   0.725057   11.029 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)11      1.269780   0.724976    1.751 0.079868 .
factor(Tag$Giorno)12      0.307193   0.721706    0.426 0.670365
factor(Tag$Giorno)13      2.783442   0.725339    3.837 0.000124 ***
factor(Tag$Giorno)14      4.150890   0.724070    5.733 9.92e-09 ***
factor(Tag$Giorno)15      6.993848   0.641720   10.899 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)16     11.623968   0.649936   17.885 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)17      5.310093   0.818225    6.490 8.65e-11 ***
factor(Tag$Giorno)18     14.905041   0.804928   18.517 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)19      3.814284   0.815719    4.676 2.93e-06 ***
factor(Tag$Giorno)20     10.936212   0.806551   13.559 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)21      9.119128   0.794121   11.483 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)22      8.784622   0.818720   10.730 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)23     11.007827   0.755848   14.564 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)24      9.990257   0.731020   13.666 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)25      7.325956   0.770450    9.509 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)26      3.530640   0.765108    4.615 3.95e-06 ***
factor(Tag$Giorno)27     -2.095796   0.735397   -2.850 0.004375 **
factor(Tag$Giorno)28      3.821499   0.719968    5.308 1.11e-07 ***
factor(Tag$Giorno)29     -8.637505   0.728961  -11.849 < 2e-16 ***
factor(Tag$Giorno)30     -1.456522   0.723767   -2.012 0.044180 *
factor(Tag$Giorno)31     -3.404293   0.721774   -4.717 2.40e-06 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for gaussian family taken to be 628.4379)

    Null deviance: 49928385  on 71685  degrees of freedom
Residual deviance: 45024434  on 71645  degrees of freedom
AIC: 665369

Number of Fisher Scoring iterations: 2
  
```

Parametri ematologici

I risultati delle analisi ematologiche sono riportati come media \pm errore standard in Tabella WP3.15.

I valori di ematocrito non hanno mostrato differenze significative nei confronti effettuati all'interno dei gruppi (Inizio, gruppo a bassa densità (G1) e gruppo ad alta densità (G2): test di Kruskal-Wallis $p = 0.223$, $p = 0.386$; Fine, G1 e G2: ANOVA $p = 0.329$, $p = 0.771$). I valori medi di ematocrito riscontrati nei quattro gruppi sono stati i seguenti (media \pm errore standard): Inizio-G1 = $40.0\pm 0.71\%$; Inizio-G2 = $37.4\pm 0.78\%$; Fine-G1: $53.7\pm 1.52\%$; Fine-G2: $50.0\pm 1.35\%$ (Figura WP3.24). L'analisi della varianza effettuata su questi quattro gruppi ha evidenziato significative differenze ($p = 2.232E-14$). Nello specifico il *post-hoc* test ha mostrato un significativo aumento dell'ematocrito dall'inizio alla fine dell'esperimento sia del gruppo 1 che del gruppo 2. Inoltre, alla fine dell'esperimento il G2 ha mostrato valori di ematocrito più bassi del G1.

Anche i valori di RBCC non hanno mostrato significative differenze nel confronto effettuato all'interno dei gruppi (Inizio, G1 e G2 e fine G1 e G2, rispettivamente: ANOVA $p = 0.376$, $p = 0.982$, $p = 0.368$, $p = 0.149$). I valori medi di RBCC stimati nei quattro gruppi sono stati i seguenti (media \pm errore standard): Inizio-G1 = $0.94\pm 0.04 \cdot 10^6$ cellule/mm³; Inizio-G2 = $0.88\pm 0.04 \cdot 10^6$ cellule/mm³; Fine-G1: $1.38\pm 0.08 \cdot 10^6$ cellule/mm³; Fine-G2: $1.21\pm 0.06 \cdot 10^6$ cellule/mm³ (Figura WP3.25). L'analisi della varianza effettuata su questi quattro gruppi ha evidenziato significative differenze ($p = 4.962E-08$). Nello specifico il *post-hoc* test ha mostrato un significativo aumento dell'RBCC dall'inizio alla fine dell'esperimento sia nel G1 che nel G2. Inoltre, i livelli finali di RBCC sono risultati più bassi nel G2.

Il glucosio non ha mostrato significative differenze nel confronto effettuato all'interno dei gruppi (Inizio G2: test di Kruskal-Wallis $p = 0.094$; Inizio G1, Fine G1 e G2, rispettivamente: ANOVA $p = 0.817$, $p = 0.155$, $p = 0.077$). I valori medi di glucosio stimati nei quattro gruppi sono stati i seguenti (media \pm errore standard): Inizio-G1 = 74.7 ± 4.6 mg/dl; Inizio-G2 = 60.7 ± 5.1 mg/dl; Fine-G1: 108.5 ± 9.7 mg/dl; Fine-G2: 103.7 ± 10.9 mg/dl (Figura WP3.26). L'analisi della varianza effettuata su questi quattro gruppi ha evidenziato significative differenze ($p = 0.00014$). Nello specifico il *post-hoc* test ha mostrato un significativo aumento del glucosio dall'inizio alla fine dell'esperimento sia del G1 che del G2, mentre non sono state riscontrate differenze tra le due densità rispettivamente all'inizio ed alla fine dell'esperimento.

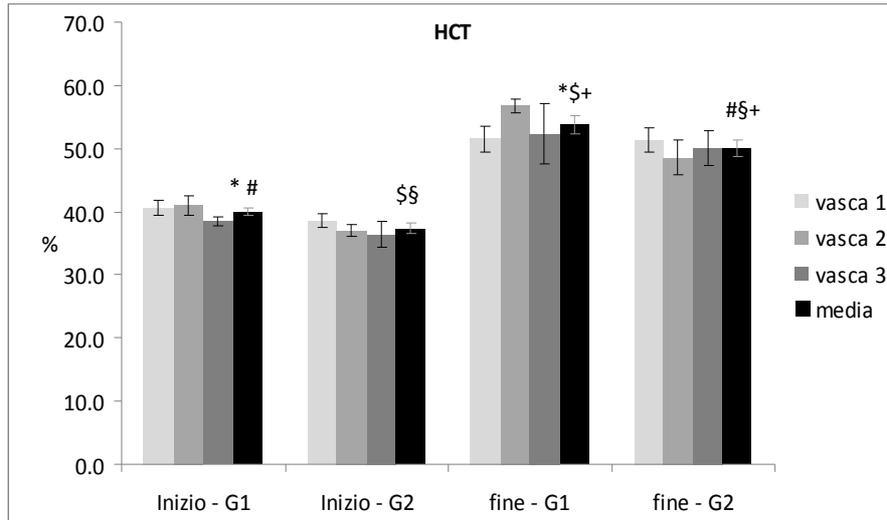


Figura WP3.24 Valori di ematocrito all'inizio ed alla fine dell'esperimento nei tre replicati dei due gruppi a diversa densità di stoccaggio. Le eventuali differenze tra i gruppi confrontati sono così rappresentate: le lettere (a e b) indicano la presenza di differenze significative ($p < 0.05$) all'interno dei gruppi, mentre i simboli (*,#,\$,+,§) indicano differenze significative tra i gruppi (gruppi riportanti lo stesso simbolo hanno valori medi statisticamente differenti).

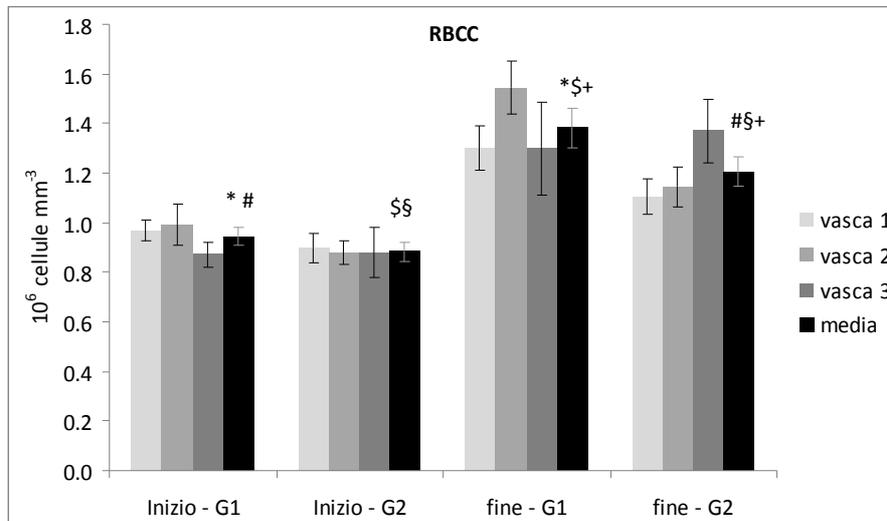


Figura WP3. 25 Valori di RBCC all'inizio ed alla fine dell'esperimento nei tre replicati dei due gruppi a diversa densità di stoccaggio. Le eventuali differenze tra i gruppi confrontati sono così rappresentate: le lettere (a e b) indicano la presenza di differenze significative ($p < 0.05$) all'interno dei gruppi, mentre i simboli (*,#,\$,+,§) indicano differenze significative tra i gruppi (gruppi riportanti lo stesso simbolo hanno valori medi statisticamente differenti).

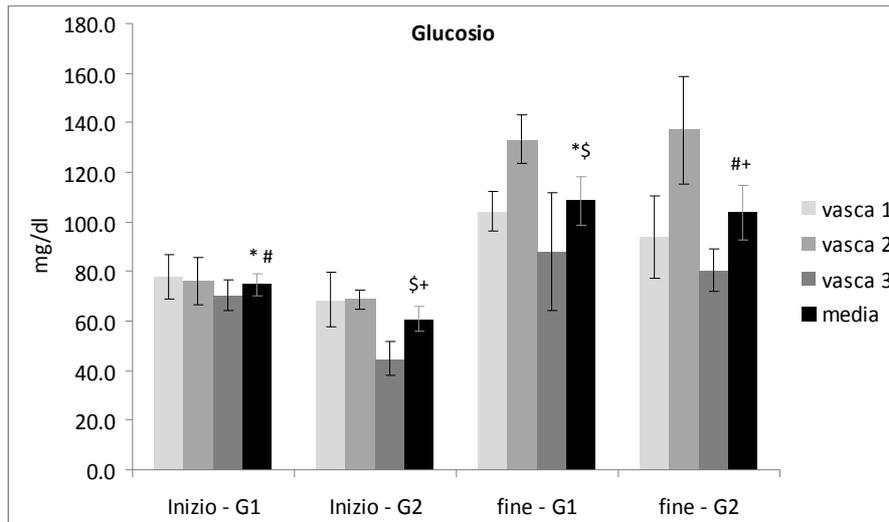


Figura WP3.26 Valori di glucosio all'inizio ed alla fine dell'esperimento nei tre replicati dei due gruppi a diversa densità di stoccaggio. Le eventuali differenze tra i gruppi confrontati sono così rappresentate: le lettere (a e b) indicano la presenza di differenze significative ($p < 0.05$) all'interno dei gruppi, mentre i simboli (*,#,\$,+,) indicano differenze significative tra i gruppi (gruppi riportanti lo stesso simbolo hanno valori medi statisticamente differenti).

Per quanto riguarda il lattato, sono state riscontrate differenze significative soltanto all'inizio dell'esperimento, tra i replicati del G1 (ANOVA, $p = 0.017$). I valori medi di lattato stimati nei quattro gruppi sono stati i seguenti (media±errore standard): Inizio-G1 = 26.5 ± 2.5 mg/dl; Inizio-G2 = 22.8 ± 1.8 mg/dl; Fine-G1: 32.6 ± 1.9 mg/dl; Fine-G2: 39.2 ± 3.7 mg/dl (Figura WP3.27). Il test di Kruskal-Wallis effettuato sui quattro gruppi ha evidenziato significative differenze ($p = 5.82E-04$). Nello specifico il test *post-hoc* ha mostrato un significativo aumento del lattato dall'inizio alla fine dell'esperimento nel G2, mentre non sono state riscontrate differenze all'interno del G1, tra l'inizio e la fine.

Il cortisolo non ha mostrato significative differenze nel confronto effettuato all'interno dei gruppi (Inizio, G1 e G2: test di Kruskal-Wallis $p = 0.102$, $p = 0.169$; Fine, G1 e G2: ANOVA $p = 0.349$, $p = 0.537$). I valori medi di cortisolo determinati nei quattro gruppi sono stati i seguenti (media±errore standard): Inizio-G1 = 116.2 ± 210.34 ng/ml; Inizio-G2 = 118.5 ± 15.39 ng/ml; Fine-G1: 156.9 ± 8.71 ng/ml; Fine-G2: 170.2 ± 10.45 ng/ml (Figura WP3.28). Il test di Kruskal-Wallis effettuato sui quattro gruppi ha evidenziato significative differenze ($p = 5.82E-04$). Nello specifico il test *post-hoc* ha mostrato un significativo aumento del lattato dall'inizio alla fine dell'esperimento nel G2, mentre non sono state riscontrate differenze all'interno del G1, tra l'inizio e la fine e tra i due gruppi rispettivamente all'inizio ed alla fine.

I livelli di lisozima non hanno mostrato significative differenze nel confronto effettuato all'interno dei gruppi (Inizio G1, Inizio G2, Fine G1 e G2: ANOVA $p = 0.178$, $p = 0.121$, $p = 0.087$, $p = 0.096$). I valori plasmatici medi di lisozima determinati nei quattro gruppi sono stati i seguenti (media±errore standard): Inizio-G1 = 6.0 ± 0.74 µg/ml; Inizio-G2 = 5.1 ± 0.81 µg/ml; Fine-G1: 22.3 ± 0.78 µg/ml; Fine-G2: 20.9 ± 1.38 µg/ml (Figura WP3.29). Il test di Kruskal-Wallis effettuato sui quattro gruppi ha evidenziato significative differenze ($p = 1.91E-09$). Nello specifico il test *post-hoc* ha mostrato un significativo aumento del lattato dall'inizio alla fine dell'esperimento nei gruppi 1 e 2, mentre non sono state riscontrate differenze tra i gruppi rispettivamente all'inizio e alla fine dell'esperimento.

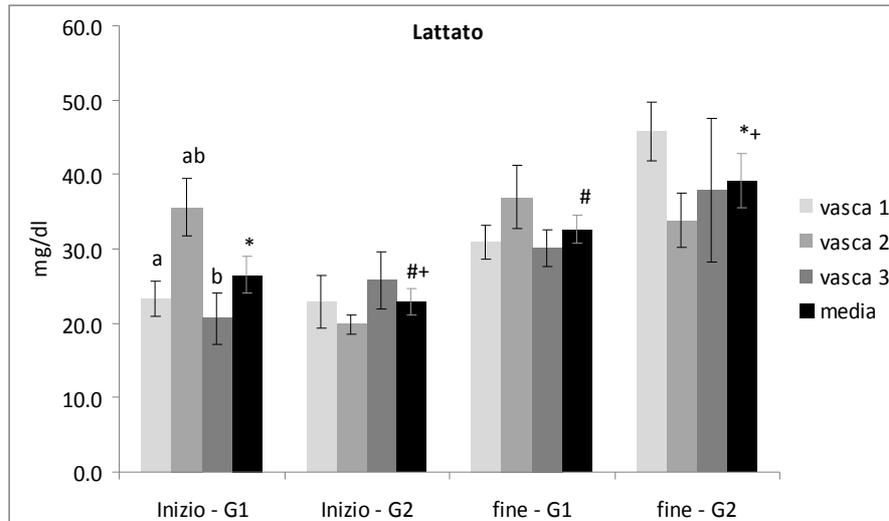


Figura WP3. 27 Valori di lattato all'inizio ed alla fine dell'esperimento nei tre replicati dei due gruppi sperimentali a diversa densità di stoccaggio. Le eventuali differenze tra i gruppi confrontati sono così rappresentate: le lettere (a e b) indicano la presenza di differenze significative ($p < 0.05$) all'interno dei gruppi, mentre i simboli (*, #, \$, +, §) indicano differenze significative tra i gruppi (gruppi riportanti lo stesso simbolo hanno valori medi statisticamente differenti).

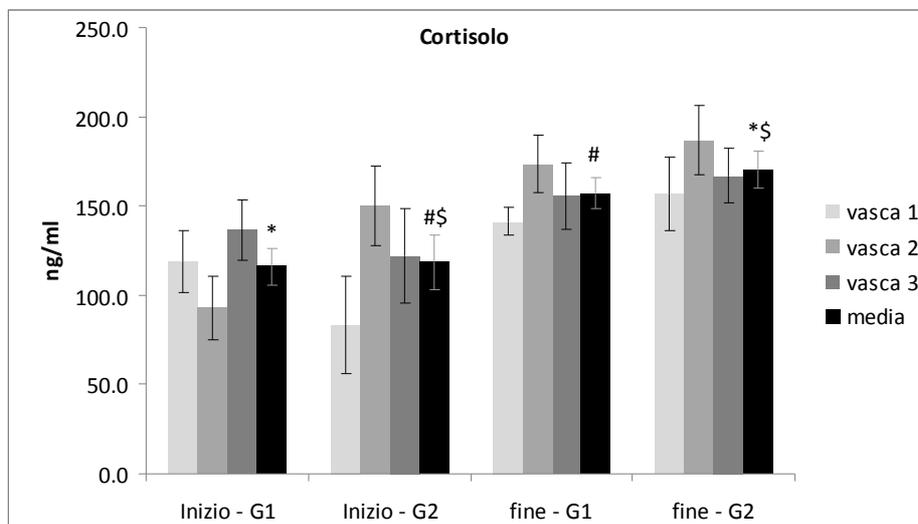


Figura WP3.28 Valori di cortisolo all'inizio ed alla fine dell'esperimento nei tre replicati dei due gruppi sperimentali a diversa densità di stoccaggio. Le eventuali differenze tra i gruppi confrontati sono così rappresentate: le lettere (a e b) indicano la presenza di differenze significative ($p < 0.05$) all'interno dei gruppi, mentre i simboli (*, #, \$, +, §) indicano differenze significative tra i gruppi (gruppi riportanti lo stesso simbolo hanno valori medi statisticamente differenti).

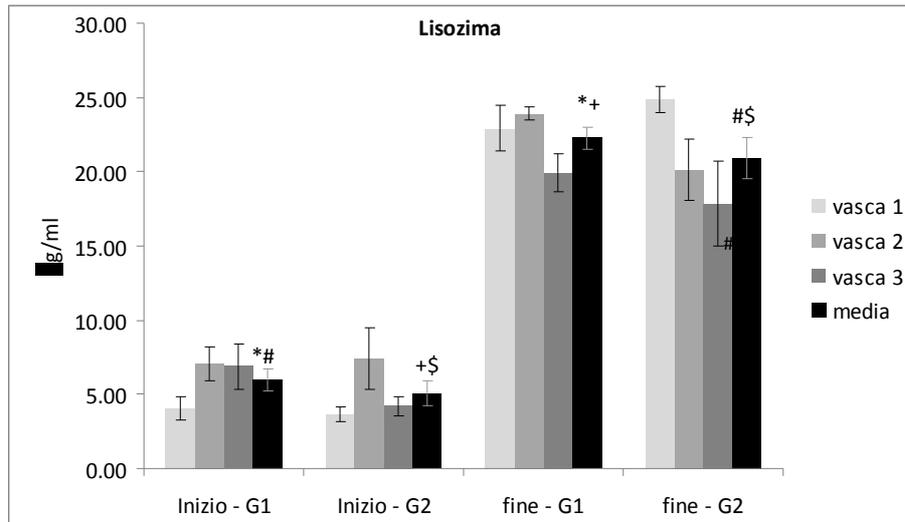


Figura WP3.29 Valori di lisozima all'inizio ed alla fine dell'esperimento nei tre replicati dei due gruppi sperimentali a diversa densità di stoccaggio. Le eventuali differenze tra i gruppi confrontati sono così rappresentate: le lettere (a e b) indicano la presenza di differenze significative ($p < 0.05$) all'interno dei gruppi, mentre i simboli (*,#,\$,+,§) indicano differenze significative tra i gruppi (gruppi riportanti lo stesso simbolo hanno valori medi statisticamente differenti).

Tabella WP3.15 valori dei parametri ematici (Hct, RBCC, glucosio, lattato, cortisolo, lisozima) relativi ad ogni singolo replicato dei due gruppi sperimentali all'inizio ed alla fine dell'esperimento.

		vasca 1	vasca 2	vasca 3	media
Hct %	Inizio - G1	40.6 ± 1.15	41.0 ± 1.55	38.4 ± 0.72	40.0 ± 0.71
	Inizio - G2	38.6 ± 0.99	37.1 ± 0.98	36.4 ± 1.96	37.4 ± 0.78
	fine - G1	51.5 ± 2.03	56.8 ± 1.08	52.3 ± 4.85	53.7 ± 1.52
	fine - G2	51.4 ± 1.88	48.6 ± 2.67	50.1 ± 2.75	50.0 ± 1.35
RBCC 10^6 cellule/ mm^3	Inizio - G1	0.97 ± 0.04	0.99 ± 0.08	0.87 ± 0.05	0.94 ± 0.04
	Inizio - G2	0.90 ± 0.06	0.88 ± 0.05	0.88 ± 0.10	0.88 ± 0.04
	fine - G1	1.30 ± 0.09	1.55 ± 0.11	1.30 ± 0.19	1.38 ± 0.08
	fine - G2	1.10 ± 0.07	1.14 ± 0.08	1.37 ± 0.13	1.21 ± 0.06
Glucosio mg/dl	Inizio - G1	77.8 ± 9.13	75.8 ± 9.54	70.4 ± 6.39	74.7 ± 4.60
	Inizio - G2	68.5 ± 10.78	68.9 ± 3.87	44.7 ± 6.72	60.7 ± 5.09
	fine - G1	104.2 ± 7.82	133.4 ± 9.97	87.9 ± 23.82	108.5 ± 9.73
	fine - G2	93.9 ± 16.49	136.9 ± 21.68	80.4 ± 8.63	103.7 ± 10.92
Lattato mg/dl	Inizio - G1	23.4 ± 2.36	35.6 ± 3.84	20.7 ± 3.44	26.5 ± 2.46
	Inizio - G2	22.9 ± 3.60	19.8 ± 1.31	25.8 ± 3.82	22.8 ± 1.79
	fine - G1	30.9 ± 2.32	36.9 ± 4.26	30.1 ± 2.52	32.6 ± 1.87
	fine - G2	45.8 ± 3.95	33.8 ± 3.68	37.8 ± 9.65	39.2 ± 3.66
Cortisolo ng/ml	Inizio - G1	119.1 ± 17.23	92.8 ± 17.54	136.6 ± 16.58	116.2 ± 10.34
	Inizio - G2	83.4 ± 27.45	150.1 ± 21.98	121.9 ± 26.24	118.5 ± 15.39
	fine - G1	141.4 ± 7.83	173.4 ± 16.13	155.8 ± 18.61	156.9 ± 8.71
	fine - G2	157.0 ± 20.72	186.6 ± 19.33	167.1 ± 15.22	170.2 ± 10.45
Lisozima μg/ml	Inizio - G1	4.0 ± 0.80	7.1 ± 1.17	6.9 ± 1.52	6.0 ± 0.74
	Inizio - G2	3.6 ± 0.51	7.4 ± 2.04	4.2 ± 0.64	5.1 ± 0.81
	fine - G1	22.9 ± 1.54	23.9 ± 0.47	20.0 ± 1.28	22.3 ± 0.78
	fine - G2	24.9 ± 0.89	20.1 ± 2.10	17.8 ± 2.89	20.9 ± 1.38

WP3 Discussione

L'espressione '*stocking density*' si riferisce alla densità iniziale di allevamento alla quale i pesci vengono esposti quando "stoccati", ovvero, introdotti in un nuovo sistema di allevamento. Questa espressione è però generalmente recepita con un significato più dinamico di quello fornito dalla sua traduzione letterale. Infatti, spesso ci si riferisce alla densità in ogni singolo momento nel tempo di allevamento (Ellis et al., 2001). Non è, infatti, naturale pensare alla densità dei pesci in allevamento come ad un parametro statico. In allevamento, i pesci sono esposti a continue fluttuazioni dovute alle normali pratiche di gestione degli impianti. Anche il semplice accrescimento degli individui porta ad un costante incremento della densità (Conte, 2004; Ellis et al., 2001).

I pesci, contrariamente alla maggior parte degli animali superiori, vivono e si muovono in un mezzo tridimensionale. Questo particolare mezzo è "vitale" per la loro sopravvivenza e per l'espressione della loro completa gamma di comportamenti naturali. Per questa ragione, il concetto di spazio minimo per i pesci risulta sicuramente più complesso rispetto agli animali terrestri e ciò rende ancor più delicate le implicazioni circa le densità di allevamento.

Inoltre, tra i pesci, esistono marcate differenze interspecifiche (Cooke et al., 2000; Di Marco et al., 2008; Dingsør et al., 2007; Kristiansen et al., 2004) ed intraspecifiche (legate allo stadio ontogenetico) (Di Marco et al., 2008; Kolios et al., 1997; Papoutsoglou et al., 1998) in merito alle necessità di spazio e tolleranza della densità di allevamento (Martins et al., 2012).

In generale, le alte densità di allevamento portano ad un aumento dell'attività di nuoto e delle interazioni con gli altri pesci, il che comporta un incremento della spesa energetica fino a livelli che possono rivelarsi nocivi per i processi fisiologici. In particolar modo, una più elevata attività muscolare può risolversi in un più elevato consumo del metabolismo anaerobio. Questo, a sua volta, rappresenta l'energia di riserva impiegata per far fronte a situazioni di stress (Lembo et al., 2007). Una minore disponibilità di queste riserve può essere causa di una riduzione delle capacità del pesce di reagire ad altri eventi di stress nel proprio ambiente (Carbonara et al., 2008). I fenomeni generalmente associati alle alte densità (diminuzione dei tassi di crescita, compromesso stato nutrizionale, incremento del tasso di conversione degli alimenti, erosione delle pinne e mortalità) sono causati dal deterioramento del comportamento (aumento di competizione, aggressione, danni fisici e cannibalismo) e della qualità dell'acqua (Ellis et al., 2001).

Nel presente lavoro è stata prevista una fase iniziale di sperimentazione finalizzata alla comprensione delle capacità di nuoto e del metabolismo energetico della trota iridea (*O. mykiss*). In particolare si è posta l'attenzione sulle *performace* di nuoto, intese come prove di U_{crit} . Ad esse è stato abbinato anche il monitoraggio del consumo energetico aerobico, con la stima del consumo di ossigeno, dell'attività muscolare, con gli EMG (*wired*), e natatoria, attraverso la calibrazione dei tail beat-tag.

Le prove di U_{crit} hanno confermato la descrizione della trota iridea come un buon nuotatore, in grado di raggiungere velocità fino a circa 1.28 m/s, in termini assoluti e 3.71 BL/s, in termini relativi. Le velocità assolute qui stimate risultano più elevate di quanto riportato in letteratura per la stessa specie (0.58-1.1 m/s) (Tabella WP3.16), mentre le stesse velocità, viste in termini relativi alla taglia appaiono confrontabili con la media delle velocità riportate (1.72-5.23 BL/s).

La grande varietà di protocolli impiegati, unita alla grande varietà dei *range* di taglie utilizzati nei vari esperimenti, rendono i valori di U_{crit} non sempre facilmente o completamente confrontabili. Infatti, Gallagher et al. (1992) riportano un protocollo quasi del tutto simile a quello qui utilizzato, ma con animali di taglia completamente differente, riportando risultati molto più bassi. Per questa ragione è sempre preferibile tracciare, in ogni occasione, una base-line che tenga conto delle specifiche esigenze sperimentali. I risultati hanno mostrato, inoltre, una correlazione diretta, già evidenziata in letteratura per altre specie (Beamish, 1978; Hammer, 1995), tra U_{crit} assoluto e dimensioni del pesce, così come anche una relazione inversa tra U_{crit} relativo (BL/s) e lunghezza totale. È infatti noto che, in molte specie, l' U_{crit} assoluto aumenta con l'aumentare della taglia (Beamish, 1978; Hammer, 1995). Quest'ultima, quindi, anche nella trota iridea, rappresenta un fattore critico sia per l'attività di nuoto che per il suo costo energetico relativo, comunemente identificato come la massima spesa aerobica individuale (AMR).

Anche per ciò che riguarda i risultati del consumo di ossigeno, le condizioni sperimentali utilizzate nei lavori riportati in Tabella WP3.17 appaiono abbastanza variabili. I valori di *standard metabolic rate* (SMR) stimati nel presente lavoro (119.35 mgO₂/kg/h) sono compresi nel *range* dei valori riportati in letteratura per questa specie (Tabella WP3.17) (75.5-144 mgO₂/kg/h). Anche i valori di *active metabolic rate* (AMR) stimati nel presente lavoro risultano compresi nel *range* dei valori riportati in letteratura per animali della stessa taglia (320-684.5 mgO₂/kg/h). La variabilità osservata in letteratura per questi indici è, probabilmente, da attribuire alle eventuali differenti condizioni sperimentali. Ad ogni modo, i risultati riportati in questo lavoro sono in linea con quanto è noto circa il consumo energetico nei pesci. Ossia, esso può fluttuare in un *range* di valori di almeno cinque volte il consumo basale, in funzione delle condizioni ambientali e dell'attività (Beamish, 1978; Brett, 1972). Un fattore sicuramente rilevante per la richiesta energetica di ossigeno è la taglia dell'individuo dalla quale dipendono, rispettivamente, la massa del muscolo rosso e del muscolo bianco. Infatti, a ciò si devono gli aumentati costi massa-dipendenti della locomozione negli animali di più grandi dimensioni (Goolish, 1991).

Il monitoraggio del segnale elettromiografico, nel presente lavoro, è risultato particolarmente utile per valutare e descrivere lo schema di attivazione muscolare in questa specie durante le varie fasi di nuoto. Infatti, è stato possibile appurare che già dalle velocità di nuoto più basse la spinta propulsiva è sempre più sostenuta dal muscolo rosso il cui ruolo, all'aumentare della velocità, diventa sempre più determinante. L'intervento del muscolo bianco, in termini di attivazione, è lento e non raggiunge, comunque, elevati livelli di coinvolgimento nella generazione della spinta, anche in prossimità dell' U_{crit} . La trota iridea appare, quindi, capace di affrontare il nuoto prolungato a velocità medio-basse (coinvolgendo maggiormente le fibre muscolari a contrazione lenta del muscolo rosso) (Rome et al., 1988). Durante il nuoto, le fibre più profonde e più veloci sono sempre più coinvolte, così come dimostrato anche da Ellerby et al. (2001), ma non tanto da garantire una lunga resistenza in prossimità della velocità critica di nuoto. Il livello di attivazione del muscolo bianco (fibre muscolari a contrazione veloce) non sembra, infatti, supportare lungamente la resistenza al nuoto alle alte velocità. Ad ogni modo, l'inizio del reclutamento della muscolatura bianca sembra essere, in un certo senso, "specie-specifico" (Burgetz et al., 1998). Ciò può dipendere dalla quantità relativa e dal posizionamento della muscolatura e può condizionare lo stile e la capacità di nuoto delle diverse specie (Ellerby et al., 2001; Ellerby, 2008). Gli Scombridi, per esempio, specializzati per nuoto prolungato, hanno miotomi allungati e la presenza di connettivo tendineo che funge come un efficiente mezzo di trasmissione della spinta caudale lungo tutta la lunghezza del pesce, anche se tali adattamenti morfo-funzionali tendono a ridurre la manovrabilità. Anche i salmonidi generano la maggior parte della potenza di nuoto nella muscolatura posteriore, mentre le anguille (alta curvatura corporea) utilizzano principalmente i miotomi anteriori nel nuoto. La trota iridea è, invece, considerata un nuotatore "generico" poiché non è specializzato né nel nuoto di resistenza né nel nuoto di accelerazione: espleta entrambi ragionevolmente bene (Webb, 1978; Webb, 1984).

Lo *Scope for Activity* (SFA), o costo energetico di attività, è un parametro che varia nel tempo e tra le specie (Briggs and Post, 1996). I risultati degli elettromiogrammi *wired* hanno dimostrato come nella trota lo SFA è supportato per lo più dal metabolismo aerobico. Infatti, le misure elettromiografiche effettuate contemporaneamente sulla muscolatura rossa e bianca hanno mostrato, anche al di sotto dell' U_{crit} , un modesto coinvolgimento della muscolatura bianca. Tutto ciò influisce nella valutazione del bilancio energetico. Infatti, una valutazione di SFA basata solo sull'attività della muscolatura rossa sottostimerebbe la spesa energetica globale (Burgetz et al., 1998), tanto che, il metabolismo aerobico nei pesci è stato stimato essere circa quattro volte più grande della componente energetica associata al muscolo bianco (Itazawa and Oikawa, 1983). La comprensione dell'attività della muscolatura bianca, inoltre, riveste grande importanza poiché essa è considerata una sorta di riserva energetica utilizzabile per affrontare momenti di stress. Una misura dell'utilizzo dell'energia anaerobica può essere, quindi un indice indiretto di benessere, considerando che, maggiore sarà l'utilizzo di energia anaerobica, minore sarà la capacità di compensazione rispetto a situazioni stressanti. Infatti, la proporzione

dell'utilizzo del muscolo rosso e del muscolo bianco è stata messa, con successo, in relazione con lo stato fisiologico nella spigola (Lembo et al., 2007).

L'utilizzo degli accelerometri acustici durante le prove di U_{crit} condotte con lo stesso protocollo delle altre prove ha permesso di calibrare finemente l'attività muscolare del muscolo rosso e del muscolo bianco, oltre alla corrispondente richiesta energetica, in termini di consumo di ossigeno, con le varie velocità di nuoto. Il quadro così delineato fornisce la possibilità di stimare il consumo energetico medio degli animali lasciati liberi di nuotare nelle vasche sperimentali, con gli stessi trasmettitori impiantati. Il monitoraggio continuo per il periodo di un mese dell'attività di 18 esemplari dislocati in due gruppi sperimentali a differente densità iniziale ha fornito informazioni utili per la stima di un modello circadiano dell'intensità di nuoto della trota per ogni gruppo sperimentale. È stato osservato che l'attività degli animali cominciava ad aumentare circa un'ora prima dell'alba, per poi calare circa un'ora prima del tramonto, registrando un picco di attività per le ore 7 del mattino. Diversamente, durante le ore notturne sono stati registrati i livelli più bassi di attività muscolare. Tale abbassamento dell'attività notturna era stata già osservata in *O. mykiss*, in particolare in condizioni di bassa densità di allevamento (Bégout Anras et al., 2004). Alti livelli di attività notturna sono stati registrati, al contrario, in condizioni di alte densità di allevamento.

I livelli medi di attività diurna, nelle due densità sperimentali, sono stati rispettivamente di 56.62 ± 0.083 e 65.30 ± 0.098 , per la bassa e l'alta densità. Sebbene essi siano risultati significativamente differenti nelle due densità, corrispondono a livelli di consumo di ossigeno pari a 334.3 e 392.2 $mgO_2/kg/h$. Tali livelli di richiesta energetica sono abbondantemente al di sotto della soglia critica, identificata con il SFA (549.03 $mgO_2/kg/h$). Questo dato fa intendere che, sebbene siano state riscontrate significative differenze tra i gruppi sperimentali in termini di richiesta di ossigeno e di attività muscolare, le densità raggiunte sono tali da non generare condizioni critiche per il benessere e la sopravvivenza della specie in allevamento. Viene, anzi, garantito un ampio margine di energia per il resto delle funzioni vitali non basali: riproduzione, crescita, difesa da stress di vario tipo.

Per quanto riguarda le analisi dei parametri ematologici, i risultati non mostrano evidenti differenze tra gli effetti causati dalla densità sui due gruppi sperimentali. Infatti, per la maggior parte dei parametri analizzati si riscontra, sia nel gruppo a bassa densità che nel gruppo ad alta densità, un significativo aumento dei valori dall'inizio della prova alla sua conclusione. Gli unici valori a non seguire questo andamento sono stati il lattato e il cortisolo, infatti, nel gruppo a bassa densità non è stata osservata alcuna variazione significativa nel tempo. Anche dal confronto dei risultati ottenuti alla fine del trattamento tra i due gruppi sperimentali non si sono evidenziate differenze significative se non nell'ematocrito e nella conta eritrocitaria, in cui si osservano valori più bassi nel gruppo ad alta densità.

Tutti i valori di ematocrito sono compresi nei range di valori pubblicati precedentemente per esemplari di *O. mykiss* in condizioni di salute normali (Tabella WP.3.18), anche se risultano, comunque al di sopra del valore ottimale di ematocrito stimato per la trota iridea (30%) (Skov et al., 2011; Wells and Weber, 1991). Le variazioni di ematocrito spesso riflettono un abbassamento della disponibilità di ossigeno o della qualità dell'acqua ed intervengono come strategia per contrastare questi fattori di stress: interviene il rilascio di epinefrina (catecolamina) al quale seguono contrazioni della milza, determinando un maggiore rilascio nel circolo ematico di eritrociti immaturi, di solito più efficienti nel trasporto di ossigeno (Houston et al., 1996). L'incremento dell'ematocrito è accompagnato dall'aumento della viscosità del sangue che, in ultima analisi, può causare un aumento dello sforzo cardiaco (Docan et al., 2011). Le variazioni di Hct osservate nei due gruppi sperimentali sono state accompagnate dal significativo aumento della conta eritrocitaria, che, comunque, è rimasta entro i livelli fisiologici riportati in letteratura ($0.80-1.5 \cdot 10^6$ cellule/ mm^3) (Docan et al., 2011; Ghittino, 1985). Ad ogni modo, variazioni dell'emopoiesi in condizione di elevata densità sono state messe in relazione maggiormente con la bassa qualità dell'acqua che con l'effetto della densità (Person-Le Ruyet et al., 2008). Infatti, una certa capacità di adattamento dell'emopoiesi a cambiamenti intrinseci ed estrinseci è nota sia nella trota iridea (Smith et al., 1981) che in diverse altre specie come il merluzzo atlantico (Audet et al., 1993) e la spigola (Lupi et al., 2005). Comunque, come si può

facilmente osservare in Tabella WP.3.18, i dati riportati in letteratura per Hct ed RBCC soffrono di una elevata variabilità, probabilmente a causa dei tanti fattori in grado di influenzare questi valori. Gli animali acquatici posseggono, infatti, una maggiore capacità di adattamento rispetto ai mammiferi, per cui quando si fa riferimento a valori ematologici basali nei pesci, questi rappresentano, molto spesso, un range troppo ampio per essere indicativo dello status fisiologico dell'organismo (Houston et al., 1996).

Un parametro molto utilizzato come descrittore dello stato fisiologico nei pesci è la concentrazione plasmatica di glucosio (Iwama et al., 2004), che caratterizza la risposta secondaria allo stress. Sebbene la trota iridea, in natura, assuma relativamente pochi carboidrati e possieda una limitata capacità di utilizzare i carboidrati della dieta per scopi di tipo energetico, l'utilizzo del glucosio come substrato ossidativo è essenziale per il funzionamento del cervello, il quale, ne richiede un continuo approvvigionamento attraverso il sangue (Soengas and Aldegunde, 2002; Tubío et al., 2010). Come in molte specie avviene (Mommsen et al., 1999), il rilascio di cortisolo (risposta primaria allo stress) provoca un aumento della concentrazione di glucosio plasmatico (Fanouraki et al., 2008; Roche and Bogè, 1996; Santulli et al., 1999; Vazzana et al., 2002). Il cortisolo, quindi, è considerato il fattore più importante del controllo del metabolismo dei carboidrati nei pesci (Mommsen et al., 1999), sebbene siano state raccolte evidenze che le catecolamine (adrenalina e noradrenalina) siano in grado di indurre un effetto iperglicemico (Iwama et al., 2004; Reid et al., 1998) con un meccanismo simile a quello già osservato in altri vertebrati. Studi recenti hanno evidenziato anche il possibile coinvolgimento della serotonina nell'incremento della secrezione del cortisolo, e quindi nell'aumento della concentrazione sanguigna del glucosio. I valori di glucosio osservati nel presente lavoro sono sempre rimasti all'interno del range fisiologico riportato in letteratura (79-151) (Tabella WP.3.18). Quindi, sebbene il glucosio sia soggetto al controllo da parte di tanti fattori interni (Tubío et al., 2010) ed esterni (quali la temperatura, la densità e le normali procedure di gestione degli impianti di allevamento), i valori qui riportati sono ampiamente compresi nei valori fisiologici riportati in letteratura per questa specie, mostrando che, seppure differenze si siano generate tra i gruppi sperimentali, la loro entità è tale da generare una risposta adattativa moderata e compatibile con la normale sopravvivenza degli individui.

Per il cortisolo, a causa dell'ampia gamma di risultati riportati nei vari lavori, normalmente generata dai differenti protocolli analitici utilizzati, il confronto dei valori sperimentali risulta concretamente complicato. Il cortisolo, infatti, ha una struttura chimica di base steroidea da cui derivano una serie di molecole con proprietà ormonali. Queste molecole differiscono tra loro solamente per i diversi gradi di saturazione (doppi e tripli legami) e per i gruppi funzionali legati agli anelli aromatici, fenantrenico e ciclopentanico. La forte similarità chimica delle molecole steroidee si riflette in una elevata reazione crociata dell'anticorpo tracciante nelle metodiche RIA ed ELISA ed in una bassa risoluzione dei picchi (quasi completa sovrapposizione) per l'HPLC. Si tenga conto che per la trota iridea sono riportati valori fisiologici compresi nel range 0.95-181.95 ng/ml: circa quattro ordini di grandezza di differenza. Ad ogni modo le variazioni plasmatiche di cortisolo sono state messe in relazione, in letteratura, con diversi fattori interni, come per esempio le differenze genetiche tra gruppi di individui, ad esempio la ploidia (Pottinger and Carrick, 1999) o la differente risposta a fattori di stress gene-dipendenti (Benfey and Biron, 2000), così come a molti fattori esterni, come qualità dell'acqua (Bleau et al., 1996), le procedure di manipolazione in allevamento (Barton, 2002), la densità di allevamento (Pickering et al., 1991) e la temperatura (Meka and McCormick, 2005). È, quindi, evidente che il cortisolo non può essere facilmente utilizzato in termini assoluti, ma le differenze relative evidenziate nelle stesse condizioni sperimentali risultano significative.

Un altro parametro importante per la valutazione del metabolismo dei carboidrati è il lattato, parametro legato al metabolismo anaerobico e per questo particolarmente interessante in associazione con le misure fisiologiche, come indicatore dell'utilizzo della muscolatura bianca e quindi dell'energia di riserva anaerobica mobilizzata per rispondere a stimoli stressanti (Lembo et al., 2007). È noto, infatti, che durante una intensa attività muscolare, venga consumato circa il 50% di glicogeno muscolare, già durante i primi 2 minuti di attività. A livello muscolare (principalmente muscolo

bianco a contrazione veloce) aumentano rapidamente le concentrazioni di lattato e piruvato, che aumento altrettanto a livello del sangue. Al termine dell'attività, i valori muscolari di lattato rientrano rapidamente, mentre a livello plasmatico i valori di lattato possono anche aumentare per la successiva fase di recupero dallo sforzo (Black et al., 1962). Ad ogni modo l'aumento di lattato riscontrato essenzialmente nel gruppo ad alta densità, alla fine dell'esperimento, sembra essere un chiaro riscontro delle differenze di attività natatoria precedentemente descritte tra i due gruppi sperimentali. I valori iniziali di lattato, in entrambi i gruppi, sono risultati più elevati di quelli riportati da altri autori per la trota iridea (Tabella WP.3.18). Non è facile capire a cosa possano essere dovuti questi valori iniziali elevati di lattato, ma i dati disponibili in letteratura sono scarsi ed insufficienti a tracciare un reale range fisiologico del lattato per questa specie.

La concentrazione di lisozima nel plasma viene considerato uno dei più importanti indicatori della funzionalità dell'immunità aspecifica (Balfry et al., 2001). In essa sono coinvolti monociti macrofagi, granulociti neutrofili, eosinofili ed i prodotti da loro secreti (lisozima serico, interferone, transferina, lectina ecc.). Lo studio dell'immunità aspecifica riveste grande importanza poiché essa rappresenta la prima barriera di difesa contro microrganismi patogeni ed è, inoltre, attiva anche in condizioni ambientali estreme (eg. basse temperature) e già nelle prime fasi embrionali dei pesci (Balfry e Iwama, 2001). Il cortisolo sembra avere un ruolo importante nella modulazione del sistema immunitario dei teleostei, infatti, condizioni di stress acute in vivo (manipolazione, trasporto, anossia ecc.) o somministrazioni sperimentali di ormone sembrano stimolare la risposta immunitaria non specifica, mentre stress cronici sembrano deprimere la risposta immunitaria specifica (Weyts et al., 1999). In un quadro ancora poco chiaro su quali siano i precisi meccanismi di regolazione del cortisolo su tutto il sistema immunitario del teleostei, la durata e l'intensità dello stress sembrano essere tuttavia determinanti per la risposta immunitaria (Weyts et al., 1999). I risultati ottenuti circa i livelli di lisozima plasmatico non fanno altro che confermare quando già delineato dagli altri parametri ematologici. I pesci hanno manifestato una risposta positiva alle condizioni sperimentali. L'aumento delle densità (forse non sostanzialmente differenti tra di loro), probabilmente anche taglia-dipendente, ha stimolato nei due gruppi delle risposte fisiologiche tali da permettere il completo adattamento degli individui senza un eccessivo dispendio di energia metabolica. Infatti, proprio l'incremento dei valori plasmatici di lisozima (Mock and Peters, 1990) dimostra come la risposta fisiologica sia stata orientata verso la compensazione e non ha raggiunto la condizione di deterioramento del benessere, e quindi della stessa risposta fisiologica di adattamento.

Tabella WP3.16 Schema dei protocolli e dei risultati delle performance di nuoto, presenti in letteratura, relativi alla trota iridea.

Articolo	n. esemplari	TL - taglia (cm)	FL - taglia (cm)	SL - taglia (cm)	taglia (g)	densità (kg/m ³)	tank volume (L)	Speed step	step length (min)	unità di misura	U _{crit}	U _{opt}	Note
Alsop and Wood, 1997	120						211			BL/s	4.52±0.18		A digiuno Alimentati all'1% della biomassa Alimentati a sazietà
Alsop and Wood, 1997	120						211			BL/s	4.25±0.21		
Alsop and Wood, 1997	120						211			BL/s	3.85±0.16		
Burgetzet al., 1998	7	35.79±0.44			492.56±17.44		2000	0.25 BL/s	30	BL/s	2.13±0.05		
Chandaroo et al., 2005	12		44.0±0.64.5		1259±370	30		0.17 BL/s	15	m/s	0.90 ± 0.05		Non allenati
Farrell et al., 1990	8				532±22.5					m/s	0.68±0.05		
Gallaugheret al., 1992	-	36-41			530-738		200	0,1 m/s	10	BL/s	~2		
Gregory and Wood, 1998	8				18.70 ± 1.04		60	0.75 BL/s	40	BL/s	5.23 ± 0.09		
Jainet al., 1997	5									BL/s	1.72 ± 0.08		Piccolo taglia Piccola taglia Grossa taglia Grossa taglia
Kiceniuk and Jones, 1977	-				707-950			0,1 m/s	30	BL/s	~2		
McKenzie et al., 2007	50		24.6±0.5		205±11		615			BL/s	4.50±0.07		
McKenzie et al., 2007	55		23.9±0.6		211±12		615			BL/s	4.20±0.10		
McKenzie et al., 2007	50		24.6±0.5		205±11		615			m/s	1.1±0.01		Grossa taglia Grossa taglia
McKenzie et al., 2007	55		23.9±0.6		211±12		615			m/s	1.0±0.02		
Skov et al., 2011	-			30.5±0.6	492±44	25				BL/s	1.78±0.03	1.23±0.02	still water 0.9 BL/s (water corrent)
Skov et al., 2011	-			30.1±1.1	486±45	25				BL/s	1.72±0.07	1.17±0.04	
Webb, 1971	10	29.2±0.7			263.7±26.6			0.5 cm/s	continuous	BL/s	2		
Webb, 1971	10	29.2±0.7			263.7±26.6			0.5 cm/s	continuous	m/s	0.58±0.055		
Presente lavoro	20	27.1-37.0		22.1-30.0	230.0-631.2	12	3	0.1 m/s	10	m/s	1.28±0.05		
Presente lavoro	20	27.1-37.0		22.1-30.0	230.0-631.2	17	3	0.1 m/s	10	BL/s	3.71±0.12		

Tabella WP3.17 Schema delle condizioni sperimentali e dei risultati di consumo di ossigeno, presenti in letteratura, relativi alla trota iridea.

Articolo	n. esemplari	TL - taglia (cm)	FL - taglia (cm)	SL - taglia (cm)	taglia (g)	Densità iniziale (kg/m ³)	tank volume (L)	unità di misura	MO ₂ (SMR)	MO ₂ (AMR)	note
McKenzie et al., 2007	50				205±11		615	mgO ₂ /kg/h	144±2.24	684.48±16.96	
McKenzie et al., 2007	55				211±12		615	mgO ₂ /kg/h	134.4±3.2	621.12±14.4	
Skov et al., 2011	-			30.5±0.6	492±44	25	600	mgO ₂ /kg/h	118.4±2.7	595.7±34.5	acqua calma 0.9 BL/s (vel. corrente)
Skov et al., 2011	-			30.1±1.1	486±45	25	600	mgO ₂ /kg/h	133.4±3.7	534.0±24.9	
Alsop and Wood, 1997	120						211	mgO ₂ /kg/h		320	
Cooke et al., 2000	-		43.23±0.92			15		mgO ₂ /kg/h	75.6		
Cooke et al., 2000	-		43.23±0.93			30		mgO ₂ /kg/h	90		
Cooke et al., 2000	-		43.23±0.94			60		mgO ₂ /kg/h	102.6		
Miller et al., 1995	20	16.44			52.6	2.46		mgO ₂ /kg/h	245		
Miller et al., 1995	20	16.44			47.95	9.83		mgO ₂ /kg/h	345		
Webb, 1971	10	29.2±0.7			263.7±26.6			mgO ₂ /kg/h	75.5	658	
Presente lavoro	20	27.1-37.0		22.1-30.0	230.0-631.2	~10	1200	mgO ₂ /kg/h	119.35	668.41	

Tabella WP3. 18 Schema delle condizioni sperimentali e dei risultati dei parametri ematici, presenti in letteratura, relativi alla trota iridea

Articoli	n. esemplari	TL - taglia (cm)	FL - taglia (cm)	SL - taglia (cm)	taglia (g)	densità (kg/m ³)	Tank volume	HCT (%)	RBCC	Glucose (mg/dL)	Lactate (mg/dL)	Cortisol (ng/mL)	Lysozyme (µg/mL)	Note
Kubilay e Ulukoy, 2002	30	24			147					10-39		0.6-30.2	140-480	controllo
Skov et al., 2001	-			30.5±0.6	492±44	25	600	24.92±0.74	0.93±0.07					
Skov et al., 2001	-			30.1±1.1	486±45	25	600	25.96±1.68	0.95±0.08					
McKenzie et al., 2012	61				242±6	23.4±0.2	615					1.05±0.73		acqua statica
McKenzie et al., 2012	63				236±14	23.4±0.1	615					0.95±0.13		corrente
Atamanalp et al., 2008	-				145±20		600	43.00±12.40	0.64±0.19					
Docan et al., 2011	41				494,34	20		40±6.8	1.09±0.13					
Docan et al., 2011	28				474,46	13		35±8.6	0.99±0.15					
Ghittino, 1985	-							22-55	0.85-1.50					
Svobodová et al., 1991	-							30-45	0.80-1.50					
Gallaugh et al., 1992	10	36-41			530-738		200	34.4±2.7	1.9±0.1		0.89±0.89			
Milligan, 1996	5										6.23±0.89	37.6±7.6		
Atamanalp et al., 2011	48				145±12		780	40.38±7.63	0.655±0.046					
Wilson e Egginton, 1994	6				707-950			13.8±0.37			10.42±2.58			
Holloway et al., 2004	-				125		200			79±2.84		181.95±6.40		
Gholipour kanani et al., 2011	15	25±2			100±10								77.4±6.43	
Barton, 2002	-											1.7±0.5		pre-stress
Barton, 2002	-											43±3.5		stress da manipolazione
Ruane et al., 2000	36				86.8±4.1		700	31.55±2.02		79.27		2.85±1.15		
Tubío et al., 2010	10				100±40		200			108.09				
Benfey e Biron (2000)	12	35.8±0.6			593±36		150	38.4±1.2	1.24±0.04	150.79±11.89		28.6±11.4		diploidi
Benfey e Biron (2000)	12	35.7±0.3			543±23		150	36.1±1.4	0.73±0.03	86.92±4.32		12.5±2.1		triploidi
Presente lavoro	15	32.54±1.93		29.19±1.69	386.3±73.35	~12		40.65±1.15	1.0±0.04	77.8±9.13	23.4±2.36	119.1±17.23	4.0±0.80	

WP4 Impatto ambientale di azoto e fosforo

Risultati del WP4

Nella tabella WP4.1 e nelle Figure da WP4.1 a WP4.6 sono riportati i risultati relativi alla emissione di azoto e fosforo e quelli morfometrici. In particolare nella tabella 2 sono riportate le misure di azoto effettuate in ambienti estremi per avere una prima approssimazione dell'emissione in ambiente produttivo e non delle semplici misure in ambienti confinati, sicuramente più precise, ma meno rappresentative della realtà produttiva. Le misure in questo caso sono state fatte con un apparato di tipo industriale più efficace per numero di analisi, ma meno preciso dal punto di vista analitico.

Si sono verificati dei picchi, non significativi ai test statistici applicati, che rappresentano una tendenza. In impianto a più alta densità c'è un primo picco tra le 5 e le 6 del mattino quando con la prima luce le trote aumentano il moto e rimescolano il fondo che porta all'aumento delle concentrazioni di azoto. Un secondo picco è risultato coerente con l'alimentazione del mattino che avveniva 4 o 5 ore prima del picco; nessun chiaro picco dopo il pasto pomeridiano che avveniva tra le 14 e le 15.

Nel laghetto a bassa densità sono apparsi due picchi tra le 4 e le 5 ore dopo i pasti che venivano somministrati tra le 8 e le 9 al mattino e attorno alle 14 al pomeriggio.

Le media complessive danno per l'impianto 0.197 ± 0.068 ppm e per il laghetto 0.166 ± 0.018 ppm, cioè con valori più alti con le densità più elevate.

I valori delle misure ottenuti nell'impianto friulano non si sono discostate da quanto previsto con le prime determinazioni e ovviamente i valori più alti si riscontrano nelle vasche a maggior densità: 0,250 ppm contro 0.344 ppm: con oscillazioni a seconda delle ore del giorno tra un minimo di 0.169 ppm ed un massimo di 0,348 ppm per la bassa densità e un minimo di 0,331 ppm ed un massimo di 0,356 ppm per la massima densità. Non appare in questi primi dati l'effetto dell'alimentazione che avviene alle 9:30 ed alle 14:30.

Nella tabella WP4.1, Misure di azoto effettuate in un impianto produttivo e in un laghetto di raccolta di trote di un ittigenico. I valori sono espressi in ppm

Tabella WP4.1 Emissione giornaliera di azoto in due realtà

Piccolo impianto da 600 qli anno Alta densità con alto ricambio		Laghetto Bassa densità con basso ricambio	
Ora del giorno		Ora del giorno	
0	0,173±0,049	0	0,175±0,147
1	0,161±0,047	1	0,267±0,511
2	0,162±0,001	2	0,162±0,143
3	0,157±0,021	3	0,142±0,0179
4	0,148±0,071	4	0,157±0,176
5	0,193±0,067	5	0,155±0,252
6	0,190±0,720	6	0,132±0,120
7	0,147±0,097	7	0,124±0,128
8	0,113±0,153	8	0,102±0,108
9	0,150±0,000	9	0,142±0,233
10	0,153±0,057	10	0,129±0,177
11	0,152±0,028	11	0,261±0,498
12	0,153±0,046	12	0,288±0,618
13	0,194±0,020	13	0,305±1,003
14	0,164±0,021	14	0,216±0,626
15	0,176±0,102	15	0,302±0,712
16	0,167±0,109	16	0,155±0,199
17	0,170±0,244	17	0,179±0,398
18	0,185±0,301	18	0,183±0,284
19	0,159±0,107	19	0,314±0,859
20	0,166±0,070	20	0,317±0,804
21	0,173±0,038	21	0,130±0,131
22	0,189±0,079	22	0,213±0,440
23	0,178±0,008	23	0,168±0,224

Il fosforo è sempre risultato assente nella sorgente dell'impianto, o quanto meno è sempre rimasto sotto la soglia di rilevamento dello strumento. Inoltre il fosforo presenta un picco 4 ore dopo il pasto senza alcuna differenza apprezzabile tra le densità.

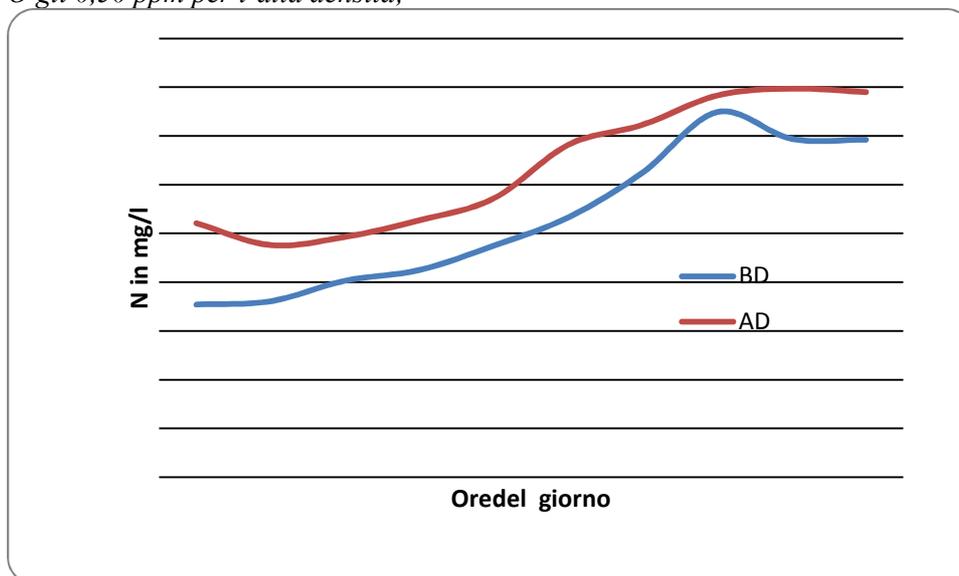
L'azoto nella sorgente è sempre risultato assente o quanto meno sotto la soglia di rilevamento dello strumento. In particolare l'azoto ha risposto coerentemente con concentrazioni più alte con la densità maggiore.

Complessivamente sono state effettuate oltre 600 determinazioni.

Nella situazione sperimentale dell'impianto l'azoto cresce dalle prime ore di luce dal minimo notturno, quando i pesci sono al minimo dell'attività, per giungere ad un massimo attorno alle 17. In questa condizione sperimentale si sono registrati un valor minimo a 0,35 ppm per la bassa densità e poco sotto gli 0,50 ppm per l'alta densità; con picchi sempre attorno alle 17 con valori che vanno dagli 0,75 ppm per la bassa Densità e gli 0,80 per l'alta densità.

Il fosforo ha variazioni più contenute, in impianto supera in un solo caso e sia pur di poco gli 0,12 ppm con il picco che si verifica tra 3 e le 4 ore dopo il pasto; poi cala rapidamente. Il fosforo, al contrario non segue lo stesso andamento non manifestando nelle vasche dell'impianto un incremento apprezzabile.

Fig.WP4.1 – Andamento giornaliero dell'azoto in impianto produttivo alle due densità.
O gli 0,50 ppm per l'alta densità;



WP4.2 – *Andamento del fosforo in impianto produttivo alle due densità.*

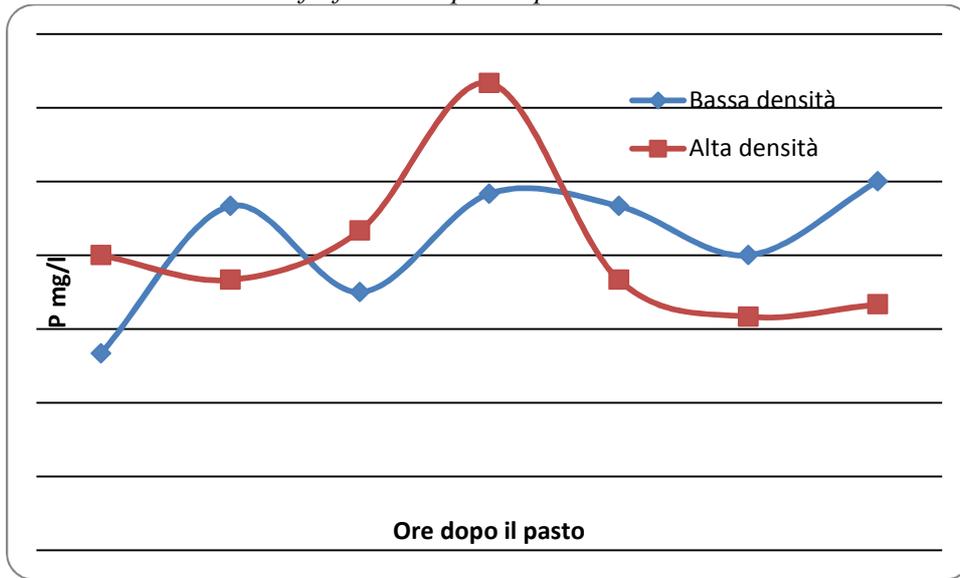


Fig. WP4.3 Emissione di azoto in impianto pilota

I valori sono espressi in mg/l, il valore iniziale è riferito a prima del pasto mentre gli altri valori indicano le ore dopo il pasto

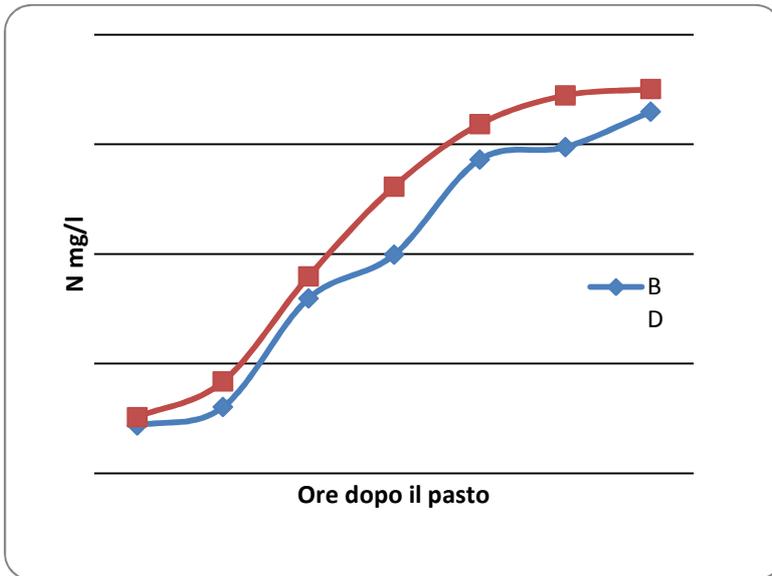
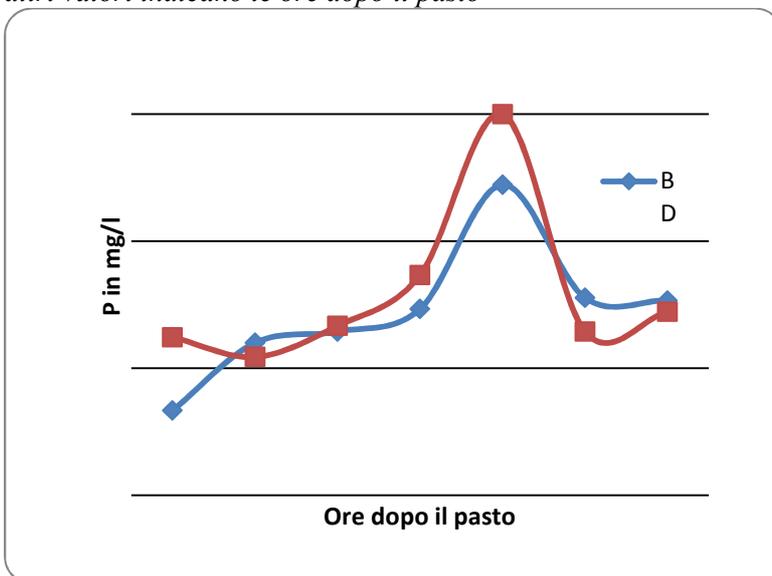
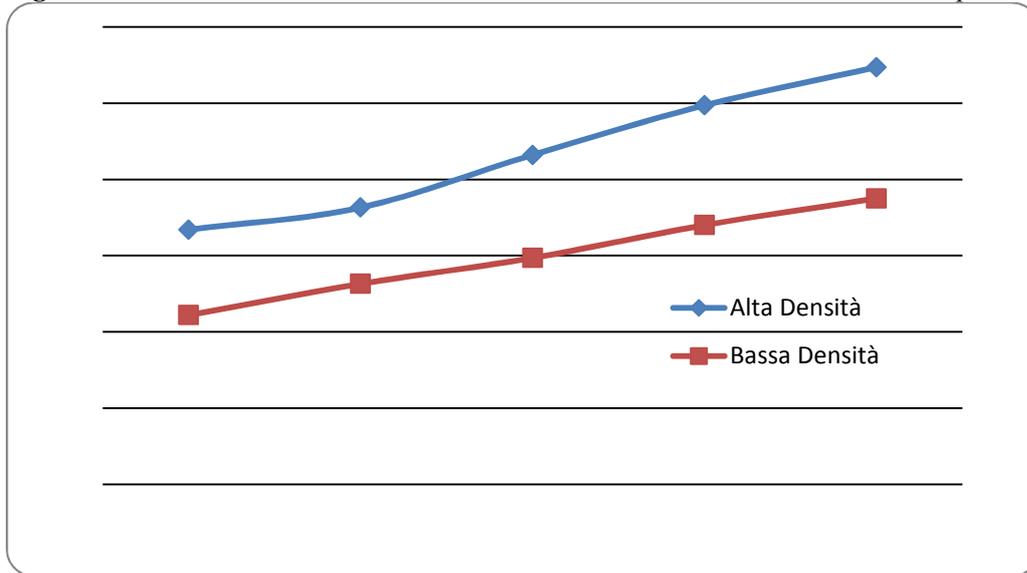


Fig. WP4.4 - Emissione di fosforo espresso in mg/l, il valore iniziale è riferito a prima del pasto mentre gli altri valori indicano le ore dopo il pasto

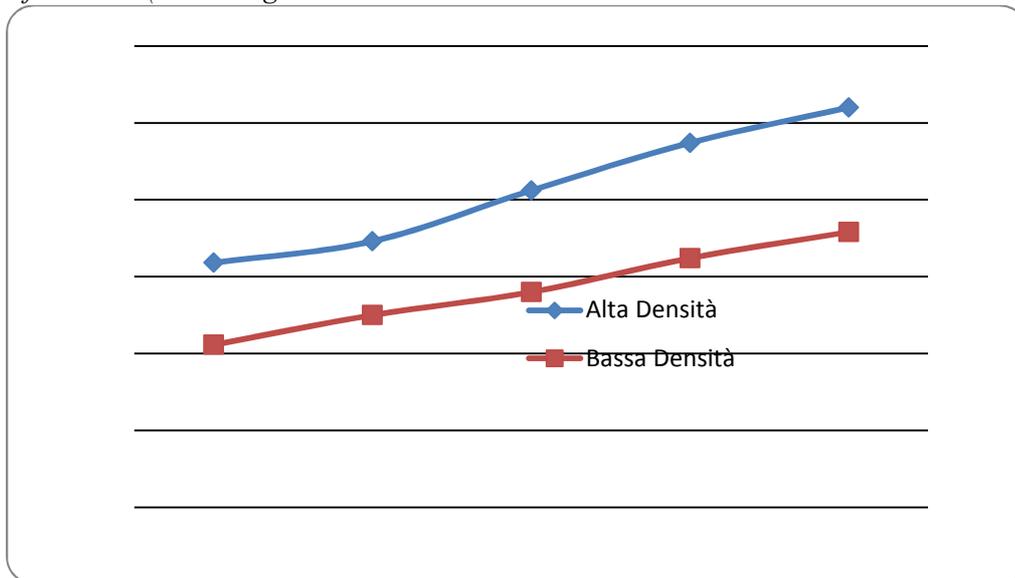


La produzione di Azoto va di pari passo con il crescere della biomassa come era atteso.

Fig. WP4.5 – Andamento dell'azoto al crescere della biomassa nel corso della sperimentazione.



WP4.6 - Andamento della densità reale nel corso della sperimentazione a partire dalle due densità di riferimento (10 e 15 kg m^{-3} iniziali).



Dal confronto tra la figura WP4.& la WP1.1 si vede come in corrispondenza con le densità di 15 e 25 kg m^{-3} si ha il maggiore incremento di crescita.

Discussione e conclusioni WP4

Alcuni autori (Holby e Hall, 1992; Hall et al., 1992)) hanno stimato che fino al 60% del fosforo totale e l'80% dell'azoto totale viene scaricato nella colonna d'acqua per effetto delle operazioni di allevamento. Carter et al. (2001) hanno determinato il pattern dell'escrezione dell'ammonio e dell'anidride carbonica in carpa ed hanno dimostrato l'esistenza di una sincronizzazione tra questi due parametri ed in consumo di ossigeno. Subito dopo il pasto c'è un incremento del consumo di ossigeno e dell'escrezione dell'anidride carbonica con un massimo dopo circa un'ora; mentre il picco dell'escrezione azotata si manifesta dopo 3 ore dal pasto.

Dosdat et al. (1996,) in uno studio su alcune specie di pesci di allevamento, marini e di acqua dolce, riporta due differenti pattern di emissione azotata per spigola. In animali di piccola taglia, attorno ai 10 g e alimentati due volte al giorno, si registrano due picchi di emissione dopo circa 2-5 ore dal primo pasto; mentre dopo il secondo pasto compariva un solo picco. Spigole di circa 100 g alimentate una sola volta al giorno Dosdat riporta un solo picco tra 5 e le 8 ore dopo il pasto. La taglia del pesce e lo stress indotto dall'alta densità in vasca potrebbe spiegare questa differenza.

Per quanto riguarda la trota, di cui è ben noto che il bilancio azotato è influenzato dall'energia totale derivante dai lipidi della dieta. Nella presente sperimentazione con trote di 300-700 g, la quota lipidica della dieta era del 25-26% a seconda della dimensione del pellet (4,5 e 6 mm); ciononostante il tempo tra la somministrazione del pasto e l'escrezione azotata è rimasto costante attorno alle 4 ore, in linea con quanto riportato dagli studi citati per trota con differenze rispetto all'escrezione della spigola.

WP5 - Qualità nutrizionale

Composizione chimico-nutrizionale del mangime consumato prima della sperimentazione

Per quanto riguarda il mangime che le trote hanno consumato prima dell'avvio della prova, in una prima fase era utilizzato un mangime Veronesi (Ecoprime 3) avente la seguente composizione chimica: U: 8%; PG: 44%; Oli: 24%; Cellulosa: 2%; Ceneri: 6.2%. Mentre in una seconda fase è stato distribuito un Ecoprime 4 avente un tenore proteico più basso (42%) ed un tenore lipidico più elevato (28%).

Composizione chimico-nutrizionale delle trote ad inizio sperimentazione

I risultati della composizione chimico-nutrizionale delle trote alimentate, fino al momento del campionamento, con mangime non biologico, hanno mostrato un buon livello in proteine, basso tenore in grassi, buon contenuto in vit. E, α tocoferolo, importante per la sua azione antiossidante (Tab. WP5.1 2 WP5.2). Per quanto riguarda il profilo in acidi grassi (Tab. WP5.3), si è evidenziato un elevato contenuto in acidi grassi polinsaturi rappresentati prevalentemente dagli acidi grassi N-3, in particolare il DHA, importante per lo sviluppo cerebrale e della retina. Il DHA insieme all'EPA, altro acido grasso presente nelle specie ittiche, danno origine a molecole (eicosanoidi) che migliorano la fluidità del sangue prevenendo la formazione di trombi, hanno importanti funzioni nelle reazioni infiammatorie ed in numerose altre funzioni. Abbastanza elevato è stato rilevato però anche il livello dell'acido linoleico (C 18:2 n-6) legato alle farine di origine vegetale del mangime.

Tab. WP5.1 Composizione chimico-nutrizionale di Trota iridea da allevamento biologico tempo 0

	<i>Pool 1 (taglia 40-50 g)</i>		<i>Pool 2 (taglia 70-80 g)</i>	
	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>

Peso (g)	45.40	8.70	77.93	5.93
Lunghezza (cm)	16.2	1.1	18.3	0.8
Visceri (% peso)	13.11	3.60	14.18	3.12
pH	6.73	0.01	6.61	0.01
		g/100 g parte edibile		
Umidità	80.22	0.13	79.05	0.04
Proteine	17.10	0.28	16.99	0.20
Lipidi totali	2.38	0.03	3.63	0.03
N non proteico	0.38	0.01	0.36	0.01
Ceneri	1.12	0.03	1.12	0.02
Mercurio totale (mg/kg)	0.0106		0.0083	

Tab. P5.2 - Composizione della frazione insaponificabile di Trota iridea da allevamento biologico tempo 0

	<i>Pool 1</i> (taglia 40-50 g)		<i>Pool 2</i> (taglia 70-80 g)	
	mg/g olio			
	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>
Colesterolo	24.13	0.24	16.55	0.32
Squalene	0.33	0.02	0.26	0.01
α - tocoferolo	0.53	0.04	0.40	0.01
γ - tocoferolo	0.00	0.00	0.00	0.00
δ - tocoferolo	0.00	0.00	0.00	0.00
	mg/100 g parte edibile			
Colesterolo	57.42	0.57	60.07	1.16
Squalene	0.80	0.04	0.96	0.03
α - tocoferolo	1.26	0.11	1.44	0.03
γ - tocoferolo	0.00	0.00	0.00	0.00
δ - tocoferolo	0.00	0.00	0.00	0.00

Tab. WP5.3 - Composizione in acidi grassi di Trota iridea da allevamento biologico tempo 0 (% del totale degli acidi grassi)

	<i>Pool 1</i> (taglia 40-50 g)		<i>Pool 2</i> (taglia 70-80 g)	
	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>
C 12:0	0.05	0.00	0.05	0.00
C 13:0	0.02	0.00	0.02	0.00
C 14:0	3.67	0.02	3.92	0.03
C 15:0	0.32	0.00	0.33	0.00
C 16:0	16.46	0.07	16.14	0.01
C 17:0	0.29	0.00	0.29	0.01
C 18:0	5.66	0.13	5.86	0.10
C 19:0	0.08	0.00	0.07	0.00
C 20:0	0.14	0.01	0.14	0.00
C 21:0	0.02	0.00	0.01	0.00
Saturi totali	26.71	0.18	26.85	0.09
C 14:1 n - 5	0.02	0.00	0.02	0.00
C 16:1 n - 7	4.07	0.05	4.34	0.01
C 18:1 n - 9	13.02	0.01	13.73	0.05
C 18:1 n - 7	2.28	0.01	2.33	0.02
C 20:1 n - 9	1.04	0.02	1.06	0.01
C 20:1 n - 11	0.10	0.01	0.10	0.00
C 22:1 n - 9	0.12	0.01	0.12	0.00
C 22:1 n - 11	0.80	0.09	0.76	0.01
C 24:1 n - 9	0.25	0.00	0.25	0.00
Monoinsaturi tot	21.70	0.01	22.70	0.08
C 16:2 n - 4	0.38	0.01	0.40	0.00
C 18:2 n - 6	18.43	0.14	19.81	0.03
C 18:3 n - 6	0.38	0.00	0.42	0.03
C 18:3 n - 3	2.30	0.01	2.51	0.00
C 18:4 n - 3	0.88	0.00	0.94	0.00
C 20:2 n - 6	0.54	0.06	0.63	0.00
C 20:4 n - 3	0.66	0.01	0.69	0.01
C 20:4 n - 6	0.65	0.00	0.59	0.00
C 20:5 n - 3 EPA	4.63	0.03	4.59	0.02
C 22:4 n - 6	0.06	0.00	0.06	0.00
C 22:5 n - 3	1.64	0.01	1.54	0.00
C 22:6 n - 3 DHA	16.01	0.22	13.24	0.05
Polinsaturi totali	46.55	0.17	45.41	0.01
<i>somma n - 3</i>	<i>26.12</i>	<i>0.26</i>	<i>23.50</i>	<i>0.07</i>
<i>somma n - 6</i>	<i>20.06</i>	<i>0.08</i>	<i>21.51</i>	<i>0.06</i>
<i>n - 3 / n-6</i>	<i>1.30</i>	<i>0.02</i>	<i>1.09</i>	<i>0.01</i>

L'evoluzione dei parametri nutrizionali fino ad ora studiati verrà seguita nei futuri campionamenti delle stesse trote, allevate con mangime biologico e a differente densità di allevamento. Attualmente è ancora in corso la caratterizzazione del mangime Ecoprime 3.

WP5 Risultati

Gli ingredienti e la composizione chimico-nutrizionale dei mangimi somministrati alle trote di inizio sperimentazione (T=0) e nell'ultima fase della sperimentazione è riportata nelle Tabelle 2-4. Si precisa che nel mangime commerciale biologico non erano riportate in etichetta la percentuale dei rispettivi ingredienti. Le principali differenze fra i due mangimi, riconducibili alla loro diversa formulazione, si riscontrano nel tenore e profilo lipidico. I lipidi totali, il colesterolo e l' α -tocoferolo (vitamina E), importante antiossidante di membrana la cui integrazione nei mangimi ha anche la funzione di prevenire l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, sono presenti in più elevate concentrazioni nel mangime biologico somministrato nell'ultima fase della sperimentazione (Tab. 2,3). I tocoferoli β -, γ -, e δ -, omologhi dell' α - tocoferolo, assenti nel mangime del tempo T=0, sono stati invece riscontrati nel mangime biologico dell'ultima fase, anche se in quantitativi inferiori all' α - tocoferolo. Gli omologhi dell' α -tocoferolo sono molecole dotate di una minore

tività vitaminica E, ma di elevate proprietà anti-infiammatorie ed antiossidanti, anche superiori a quelle dell' α -tocoferolo, in grado di agire in sinergia con quest'ultimo e di potenziarne le benefiche proprietà (Saldeen and Saldeen, 2005; Mourente et al. 2007).

Nelle due diete di questa sperimentazione sono state riscontrate significative quantità di all-trans retinolo (vitamina A), nettamente superiori nella dieta delle trote al tempo T=0 (1381.76 vs 810.53 ug/100g). Anche i carotenoidi erano presenti in concentrazioni nettamente superiori nella dieta del tempo T=0 rispetto a quella dell'ultima fase di sperimentazione. Fra questi prevalevano l'astaxantina in forma libera (3,3'-diidrossi- β , β carotene-4,4'-dione), molecola con elevato potere antiossidante aggiunta come integratore per conferire colorazione alle carni, e la luteina. Il β -carotene, precursore del retinolo, era presente in modeste quantità in forma esterificata; la cantaxantina (β , β carotene-4,4'-dione) è stata rilevata, in forma libera, solo nel mangime biologico dell'ultima fase sperimentale. L'integrazione dei mangimi per acquacoltura con composti vitaminici e provitaminici è una pratica necessaria per coprire i fabbisogni vitaminici delle specie ittiche nelle diverse fasi di crescita. Inoltre, come è il caso dei tocoferoli e dei carotenoidi, queste molecole svolgono una funzione protettiva ed antiossidante nei riguardi di molecole altamente instabili e suscettibili ad ossidazione come gli acidi grassi polinsaturi omega-3 di cui le diete e gli stessi pesci sono ricchi. L'astaxantina e la cantaxantina sono i pigmenti più utilizzati in acquacoltura per incrementare la colorazione delle carni di salmonidi, che rappresenta una delle caratteristiche più apprezzate e ricercate dal consumatore.

L'analisi gas-cromatografica degli acidi grassi ha evidenziato un profilo sostanzialmente simile fra le due diete, ma con alcune importanti differenze per quanto riguarda i monoinsaturi acido oleico C18:1 n-9, C20:1 n-9 acido gadoleico e l'acido cetoleico C22:1 questi ultimi due presenti negli oli di specie marine, ed il polinsaturo acido linoleico C18:2 n-6 (Tab. 4). Tali differenze si ripercuoteranno, come sarà illustrato in seguito, anche sul profilo di acidi grassi delle trote al termine della sperimentazione.

Per quanto riguarda i contaminanti, l'analisi del mercurio totale ha indicato una presenza di questo metallo a livelli molto bassi in entrambi i mangimi. I livelli erano comunque superiori nel mangime biologico dell'ultima fase sperimentale

(0.071 vs 0.035 mg/kg), presumibilmente per una maggior percentuale di farina di pesce fra gli ingredienti che lo compongono.

Le analisi di pesticidi e PCB effettuate sul mangime biologico dell'ultima fase di sperimentazione mostrano un basso livello di contaminazione (Tab. 5 e 6).

Tab. WP5.1 *Ingredienti del mangime somministrato alle trote al tempo 0 e di quello biologico (Emerald Trout 60, Skretting) somministrato nell'ultima fase della sperimentazione.*

Mangime Tempo T=0		Mangime Biologico (Emerald Trout 60, Skretting)
	g/100g	
Farina di pesce	50.0	Farina di pesce (cert.)
Glutine	12.0	Olio di pesce (cert.)
Farina di mais macinata	9.0	Frumento (agr. biol.)
Orzo macinato	14.9	Farina di semi di girasole (agr. biol.)
Merigel	5.0	Vitamine
Olio di fegato di merluzzo	6.0	Minerali
Astaxantina	0.0075	
Vitamine	1.5	
Minerali	1.5	

Tab. WP5.2 *Composizione chimica di base del mangime somministrato alle trote al tempo 0 e di quello biologico (Emerald Trout 60, Skretting) somministrato nell'ultima fase della sperimentazione.*

	Mangime Tempo T=0		Mangime Biologico	
	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>
pH	5.53	0.01	5.65	0.02
	g/100 g parte edibile			
Umidità	3.71	0.04	7.27	0.03
Proteine	44.55	0.41	38.05	0.30
Lipidi totali	9.17	0.02	23.86	0.06
N non proteico	1.34	0.01	1.67	0.01
Ceneri	8.70	0.01	10.55	0.06
Mercurio totale (mg/kg)	0.035	0.001	0.071	0.003

Tab. WP5.3 *Composizione della frazione lipidica insaponificabile del mangime somministrato alle trote al tempo 0 e di quello biologico (Emerald Trout 60, Skretting) somministrato nell'ultima fase della sperimentazione.*

	Mangime Tempo T=0		Mangime Biologico	
	mg/100 g parte edibile			
	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>
Colesterolo	98.65	0.92	328.10	0.44
Squalene	3.50	0.06	3.57	0.02
∠ - tocoferolo	0.68	0.03	15.40	0.34
© - tocoferolo + ®-tocof.	n.r.		3.80	0.09
™ - tocoferolo	n.r.		2.72	0.02
All-trans retinolo (ug)	1381.76	128.93	810.53	13.83
Alfa-carotene (ug)	tr		n.r.	
Beta-carotene (ug)	25.98	0.16	4.88	0.79
Astaxantina libera (ug)	1801.59	50.00	91.99	5.00
Luteina (ug)	420.52	10.00	44.00	1.50
Trans cantaxantina (ug)	n.r.		18.71	0.50
Cis cantaxantina (ug)	n.r.		tr	
Carotenoidi totali (ug)	4549.25	61.08	1663.76	90.90
	mg/g olio			
Colesterolo	10.76	0.10	13.75	0.02
Squalene	0.38	0.01	0.15	0.01
∠ - tocoferolo	0.07	0.01	0.65	0.01
© - tocoferolo + ®-tocof.	n.r.		0.16	0.01
™ - tocoferolo	n.r.		0.11	0.01
All-trans retinolo (ug)	150.68	14.06	33.97	0.58
Alfa-carotene (ug)	tr		n.r.	
Beta-carotene (ug)	2.83	0.02	0.20	0.03
Astaxantina libera (ug)	196.46	6.00	3.86	0.50
Luteina (ug)	45.85	2.00	1.80	0.20
Trans cantaxantina (ug)	n.r.		0.78	0.05
Cis cantaxantina (ug)	n.r.		tr	
Carotenoidi totali (ug)	495.77	6.66	69.73	3.81

n.r. non rilevabile
 tr tracce

Tab.WP5.4 Profilo degli acidi grassi nei lipidi totali del mangime somministrato alle trote al tempo 0 e di quello biologico (Emerald Trout 60, Skretting) somministrato nell'ultima fase della sperimentazione (% degli acidi grassi totali).

	Mangime Tempo T=0		Mangime Biologico	
	media	ds	media	ds
C 12:0	0.07	0.00	0.05	0.01
C 13:0	0.02	0.00	0.03	0.00
C 14:0	4.17	0.02	5.45	0.14
C 15:0	0.32	0.00	0.36	0.01
C 16:0	15.44	0.01	12.65	0.10
C 17:0	0.28	0.00	0.26	0.00
C 18:0	2.71	0.01	2.34	0.00
C 19:0	0.05	0.00	0.05	0.00
C 20:0	0.21	0.00	0.18	0.00
C 21:0	0.00	0.00	0.00	0.00
Saturi totali	23.27	0.00	21.38	0.26
C 14:1 n - 5	0.03	0.00	0.05	0.00
C 16:1 n - 7	4.55	0.00	4.15	0.03
C 18:1 n - 9	21.18	0.01	12.99	0.02
C 18:1 n - 7	2.59	0.00	2.18	0.01
C 20:1 n - 9	4.11	0.01	8.21	0.02
C 20:1 n - 11	0.56	0.04	0.55	0.02
C 22:1 n - 9	0.45	0.00	13.21	0.02
C 22:1 n - 11	4.97	0.02		
C 24:1 n - 9	0.45	0.00	0.75	0.00
Monoinsaturi tot	38.90	0.03	42.10	0.00
C 16:2 n - 4	0.47	0.00	0.44	0.00
C 18:2 n - 6	12.24	0.02	8.77	0.07
C 18:3 n - 6	0.09	0.00	0.09	0.00
C 18:3 n - 3	2.16	0.02	1.59	0.01
C 18:4 n - 3	1.23	0.01	2.80	0.02
C 20:2 n - 6	0.43	0.00	0.25	0.00
C 20:4 n - 3	0.74	0.04	0.72	0.03
C 20:4 n - 6	0.44	0.00	0.48	0.00
C 20:5 n - 3	5.74	0.01	6.63	0.04
C 22:4 n - 6	0.04	0.00	0.07	0.01
C 22:5 n - 3	1.51	0.00	1.17	0.01
C 22:6 n - 3	7.69	0.01	8.44	0.06
<u>Polinsaturi totali</u>	<u>32.76</u>	<u>0.03</u>	<u>31.45</u>	<u>0.26</u>
somma n - 3	19.07	0.01	21.35	0.18
somma n - 6	13.23	0.02	9.66	0.08
n - 3 / n-6	1.44	0.00	2.21	0.00

Tab. WP5.5 Pesticidi organoclorurati nel mangime biologico (Emerald Trout 60, Skretting) somministrato alle trote nell'ultima fase della sperimentazione.

Il fosforo, al contrario non segue lo stesso andamento non manifestando nelle vasche dell'impianto un incremento apprezzabile.

Mangime biologico Grugliasco (Trote)

CAMPIONAMENTO DEL 24-10-2012

		ng / g (ppb)			ng / g (ppb)	
analiti cercati			analiti cercati			
Limite 21,0	Aldrin	n.r.	Limite 10,5	n.r.	Endrin	n.r.
Limite 21,0	Dieldrin	2,94		somma	Endrin ketone	n.r.
	4,4'-DDT	1,47	Limite 21,0		α-HCH	0,28
	4,4'-DDD	1,90	Limite 10,5		β-HCH	n.r.
	4,4'-DDE	4,49			δ-HCH	n.r.
Limite 52,5	4,4'-DDMU	0,69	Limite 210,1		γ-HCH (Lindane)	0,09
		somma	Limite 10,5		HCB	1,56
	2,4'-DDT	n.r.			Heptachlor	n.r.
	2,4'-DDD	n.r.	Limite 10,5	0,55	Hept. exo epox.	0,55
	2,4'-DDE	n.r.		somma	Octachlorostyrene	n.r.
	α-Chlordane	1,02			α-Endosulfan	n.r.
Limite 21,0	γ-Chlordane	0,53			Mirex	n.r.
		somma			Quintozen	n.r.
	Oxychlordane	1,34				
	cis-Nonachlor	0,74				
	trans-Nonachlor	1,29				

LIMITI DI RIFERIMENTO: DIR. 2006/77/CE, aggiornamento della DIR. 2002/32/CE, attuata dal Gov. Italiano con DECRETO MIN. SALUTE DEL 27/5/2007 (GAZZ. UFF. n. 237 dell' 11/10/2007). TASSO DI UMIDITA' DEL CAMPIONE: 7,6%

 valore fuori limite
 valore nei limiti
 limite non stabilito

n.r

Analiti compresi nella normativa vigente, ma non ricercati nel campione:

Toxafene, beta-Endosulfan, Endosulfan

Tab. 6 PCB nel mangime biologico (Emerald Trout 60, Skretting) somministrato alle trote nell'ultima fase della sperimentazione.

Mangime biologico Grugliasco - camp. del 24-10-12

	ng per grammo (ppb)		ng per grammo (ppb)
analiti cercati		analiti cercati	
PCB 28	0,36	PCB 128	0,38
PCB 31	0,54	PCB 132	n.r.
PCB 44	0,23	PCB 138	1,57
PCB 47	0,21	PCB 151	0,24
PCB 49	0,40	PCB 153	2,01
PCB 52	1,52	PCB 163	0,35
PCB 66	0,25	PCB 170	0,12
PCB 74	n.r.	PCB 180	0,32
PCB 87	0,12	PCB 185	n.r.
PCB 97	0,12	PCB 187	0,23
PCB 101	1,66	PCB 194	n.r.
PCB 110	0,95	PCB 206	n.r.
PCB 118	1,09		
		SOMMA 12,67	
		Somma dei sette PCB "indicatori" (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) su base grassa	
		ng per g di grasso (ppb fat basis) 35,00	



Valori di recupero degli standard interni aggiunti al campione all'inizio dell'analisi: 2,2'-DDE = 79,0% PCB 5 = 84,3% Heptachlor endo epoxide = 81,4%
 Doppia analisi gascromatografica: a cattura di elettroni ed in Spettrometria di Massa.
 CRA ex-INRAN. 5 febbraio 2013

Le trote prelevate al tempo $T=0$ della sperimentazione avevano una taglia compresa fra i 220 g e i 370 g. Le analisi chimiche sono state effettuate su due pools distinti, ciascuno composto da 2-3 individui di taglia equivalente (pool 1 220-250 g e pool 2 g 320-370 g). Le trote del pool 1, di minor taglia, presentavano un tenore lipidico inferiore rispetto al pool 2 (3.68% vs 5.24%), a conferma della variabilità di crescita e di accumulo lipidico a livello muscolare (Tab. 7), anche partendo da uno stesso lotto di pesci cresciuti nella stessa vasca. Anche i componenti insaponificabili, ad eccezione del colesterolo, presentavano un maggior accumulo nel tessuto muscolare e nei lipidi degli individui di maggior taglia (Tab. 8).

Le trote sono state quindi immerse in vasche distinte a differente densità. Al termine della sperimentazione le trote, giunte alla taglia commerciale di 600-700 g, sono state campionate da: Vasca V1 e V3 a Bassa Densità e V2 e V4 ad Alta Densità..

I risultati evidenziavano un tenore lipidico non di molto superiore a quello del pool 2 al tempo $T=0$ (5.7-7.6%), (Tab. 9 e 12). Per quanto riguarda i lipidi insaponificabili, con il cambio di dieta le trote hanno acquisito quei componenti minori come i tocoferoli β -, γ -, e δ - e l'astaxantina, assenti o presenti in minime quantità al tempo $T=0$.

Dal punto di vista qualitativo il profilo acidico dei lipidi totali delle trote al termine della sperimentazione è risultato modificato, rispetto alle trote di inizio sperimentazione (T_0), per le percentuali dei monoinsaturi, aumentate dal 30% al 34-35% degli acidi grassi totali, e per quelle dei polinsaturi, diminuita dal 45-47% al 37-39% degli acidi grassi totali. Nel dettaglio, gli acidi grassi monoinsaturi le cui percentuali risultano maggiormente aumentate al termine della sperimentazione sono il C20:1 n-9 ed il C22:1 n-11, quest'ultimo presente negli oli di pesce.. Tale modifiche rispecchiano le differenze evidenziate fra i due mangimi proprio per questi due acidi grassi. Per quanto riguarda gli acidi grassi polinsaturi, la diminuzione percentuale osservata al termine della sperimentazione riguarda esclusivamente gli n-6, in particolare l'acido linoleico (C18:2 n-6), le cui percentuali scendono dal 20-24% dei totali al tempo $T=0$ al 13-14% dei totali al termine della sperimentazione. Il cambio di dieta non ha invece comportato alcuna modifica sulle percentuali di acidi grassi polinsaturi n-3 delle trote. Ne consegue che al termine della sperimentazione si registra un aumento del rapporto n-3/n-6 da circa 1 nelle trote al tempo $T=0$ a circa 1.5. Tutte le modifiche sul profilo lipidico delle trote intervenute con il cambio di dieta dalla taglia 220-370 g alla taglia 600-700 g, rispecchiano il profilo lipidico del mangime biologico commerciale somministrato in questa seconda fase della sperimentazione.

Nel complesso, gli individui provenienti da vasche ad alta (AD) o bassa densità (BD) non evidenziavano differenze significative fra loro dal punto di vista chimico-nutrizionale per alcun parametro ad eccezione che per il contenuto in carotenoidi totali e per le percentuali relative di due acidi grassi (C20:1 n-11 e C18:4 n-3), risultati significativamente superiori negli individui provenienti da vasche a bassa densità. Anche i livelli di mercurio totale, sempre molto bassi e ben al di sotto del limite di legge (0.5 mg/kg) non differivano significativamente fra le due tipologie di trote, AD e BD.

Tab. 7 Composizione chimica di base delle trote di Carmagnola al tempo T=0 in pools di pesci di diversa taglia.

	TEMPO T=0			
	Pool 1		Pool 2	
	Taglia 220- 250 g		Taglia 320-370 g	
	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>
Peso (g)	245.0	20.0	336.0	16.0
Lunghezza (cm)	27.5	0.5	30.5	0.7
pH	6.67	0.04	6.62	0.01
	g/100 g parte edibile			
Umidità	77.42	0.03	74.06	0.08
Proteine	18.31	0.09	19.22	0.27
Lipidi totali	3.68	0.01	5.24	0.01
N non proteico	0.36	0.01	0.35	0.03
Ceneri	1.18	0.01	1.25	0.01
Mercurio totale (mg/kg)	0.024	0.001	0.012	0.001

Tab. 8 Composizione della frazione lipidica insaponificabile delle trote di Carmagnola al tempo T=0 in pools di pesci di diversa taglia.

	TEMPO T=0			
	mg/100 g parte edibile			
	Pool 1 Taglia 220- 250 g		Pool 2 Taglia 320-370 g	
	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>
Colesterolo	61.42	0.06	58.91	0.05
Squalene	0.79	0.01	1.29	0.01
⟨ - tocoferolo	0.64	0.02	2.06	0.01
© - tocoferolo + ®-tocof.	0.09	0.01	0.11	0.02
TM - tocoferolo	n.r.		n.r.	
All-trans retinolo (ug)	5.34	1.57	17.00	7.87
Alfa-carotene (ug)	n.r.		n.r.	
Beta-carotene (ug)	n.r.		n.r.	
Astaxantina libera (ug)	5.40	0.50	n.r.	
Luteina (ug)	31.80	1.00	80.02	1.34
Trans cantaxantina (ug)	1.54	0.10	8.63	0.13
Cis cantaxantina (ug)	n.r.		n.r.	
Carotenoidi totali (ug)	79.19	1.54	137.22	1.55
	mg/g olio			
Colesterolo	16.69	0.02	11.24	0.01
Squalene	0.21	0.01	0.25	0.01
⟨ - tocoferolo	0.17	0.01	0.39	0.01
© - tocoferolo + ®-tocof.	0.02	0.01	0.02	0.01
TM - tocoferolo	n.r.		n.r.	
All-trans retinolo (ug)	1.45	0.43	3.24	1.50
Alfa-carotene (ug)	n.r.		n.r.	
Beta-carotene (ug)	n.r.		n.r.	
Astaxantina libera (ug)	1.47	0.10	n.r.	
Luteina (ug)	8.64	0.30	15.27	0.26
Trans cantaxantina (ug)	0.42	0.05	1.65	0.02
Cis cantaxantina (ug)	n.r.		n.r.	
Carotenoidi totali (ug)	21.52	0.42	26.19	0.30

n.r. non rilevabile

Tab. 9 Profilo degli acidi grassi nei lipidi totali delle trote di Carmagnola al tempo T=0 in pools di pesci di diversa taglia (% degli acidi grassi totali).

	TEMPO T=0			
	Pool 1 Taglia 220- 250 g		Pool 2 Taglia 320-370 g	
	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>
C 12:0	0.03	0.00	0.03	0.00
C 13:0	0.01	0.00	0.02	0.00
C 14:0	2.59	0.04	2.93	0.06
C 15:0	0.22	0.00	0.24	0.01
C 16:0	13.16	0.06	13.63	0.26
C 17:0	0.20	0.00	0.24	0.00
C 18:0	3.74	0.02	3.78	0.02
C 19:0	0.04	0.00	0.06	0.02
C 20:0	0.14	0.00	0.13	0.00
C 21:0	0.00	0.00	0.00	0.00
Saturi totali	20.15	0.03	21.05	0.37
C 14:1 n – 5	0.02	0.00	0.02	0.00
C 16:1 n – 7	3.42	0.02	3.98	0.08
C 18:1 n – 9	20.93	0.08	17.49	0.02
C 18:1 n – 7	2.31	0.00	2.50	0.02
C 20:1 n – 9	1.66	0.02	1.04	0.03
C 20:1 n – 11	0.21	0.00	0.13	0.00
C 22:1 n – 9	0.19	0.01	0.12	0.00
C 22:1 n – 11	1.39	0.03	0.81	0.04
C 24:1 n – 9	0.22	0.00	0.19	0.01
Monoinsaturi tot	30.35	0.04	26.28	0.04
C 16:2 n – 4	0.31	0.00	0.41	0.01
C 18:2 n – 6	19.74	0.09	23.84	0.01
C 18:3 n – 6	0.29	0.00	0.41	0.02
C 18:3 n – 3	3.91	0.02	2.72	0.07
C 18:4 n- 3	0.96	0.01	1.00	0.01
C 20:2 n – 6	0.70	0.01	0.66	0.01
C 20:4 n – 3	0.67	0.00	0.60	0.01
C 20:4 n – 6	0.64	0.00	0.64	0.01
C 20:5 n – 3	3.87	0.01	4.91	0.11
C 22:4 n – 6	0.03	0.00	0.07	0.01
C 22:5 n – 3	1.59	0.03	1.75	0.05
C 22:6 n – 3	11.72	0.15	10.63	0.33
<u>Polinsaturi totali</u>	<u>44.46</u>	<u>0.07</u>	<u>47.63</u>	<u>0.41</u>
<i>somma n – 3</i>	22.74	0.17	21.60	0.43
<i>somma n – 6</i>	21.41	0.09	25.61	0.01
<i>n – 3 / n-6</i>	1.06	0.01	0.84	0.02

Tab. 10 Composizione chimica di base delle trote di allevamento biologico Bassa Densità (BD) e Alta Densità (AD) di Carmagnola (Torino)

	<i>BD</i>				<i>AD</i>				<i>t-test</i>
	<i>V1</i>		<i>V3</i>		<i>V2</i>		<i>V4</i>		
	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>	
Peso (g)	671.9	114.6	692.6	41.7	625.3	50.3	582.1	65.9	
Lunghezza (cm)	37.0	1.3	37.0	0.5	37.0	1.4	35.7	1.9	
Visceri (% peso)	10.6	0.6	10.1	2.1	10.3	0.8	8.3	1.2	
Parte edibile (%peso)	68.4	1.4	68.0	4.7	70.6	0.2	66.4	3.1	
pH	6.61	0.03	6.42	0.02	6.52	0.01	6.40	0.01	NS
	g/100 g parte edibile								
Umidità	73.70	0.19	73.13	0.02	73.35	0.08	74.06	0.11	NS
Proteine	19.11	0.14	18.55	0.33	19.66	0.17	18.96	0.21	NS
Lipidi totali	5.69	0.03	7.60	0.02	6.61	0.03	5.96	0.03	NS
N non proteico	0.38	0.01	0.37	0.01	0.38	0.02	0.37	0.02	NS
Ceneri	1.46	0.16	1.24	0.02	1.27	0.01	1.22	0.01	NS
Mercurio totale (mg/kg)	0.038	0.001	0.038	0.001	0.037	0.001	0.036	0.0001	NS

NS non significativo: t-test, significatività delle differenze fra “Bassa Densità” e “Alta Densità”.

Su un campione di trote allevate in vasca ad alta densità sono stati determinati i residui di pesticidi organoclorurati e PCB. Il campione analizzato è risultato un prodotto di buona qualità dal punto di vista della contaminazione da POPs (Persistent Organic Pollutants). I livelli di tutti gli analiti indagati erano di gran lunga al di sotto del ppb edibile portion ed anche la somma delle varie classi non eccedeva tale valore. Solo l’ottima sensibilità strumentale ha permesso di rilevare la presenza di tali xenobiotici.

Tale risultato è da attribuirsi molto probabilmente al mangime utilizzato che ha infatti mostrato un basso livello di contaminazione, pari a quello della trota. I risultati hanno evidenziato, infatti, che la percentuale lipidica del mangime era circa sei volte quella della trota e che il livello di xenobiotici su base grassa del mangime e del campione di trote analizzato era del tutto simile.

Tab. 11 Composizione della frazione lipidica insaponificabile delle trote di allevamento biologico Bassa Densità (BD) e Alta Densità (AD) di Carmagnola (Torino)

	<i>BD</i>				<i>AD</i>				<i>t-test</i>
	<i>V1</i>		<i>V3</i>		<i>V2</i>		<i>V4</i>		
	mg/100 g parte edibile								
	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>	
Colesterolo	54.93	0.18	59.66	0.37	59.19	0.12	56.30	0.45	NS
Squalene	0.86	0.01	1.37	0.01	1.14	0.01	1.11	0.01	NS
∠ - tocoferolo	1.60	0.02	2.06	0.01	1.85	0.01	1.53	0.03	NS
© - tocoferolo + ®-tocof.	0.22	0.01	0.31	0.01	0.25	0.01	0.28	0.01	NS
™ - tocoferolo	0.13	0.01	0.20	0.01	0.16	0.01	0.17	0.01	NS
All-trans retinolo (ug)	10.09	0.70	10.33	0.80	8.78	3.35	7.03	0.05	NS
Alfa-carotene (ug)	n.r.		n.r.		n.r.		n.r.		NS
Beta-carotene (ug)	n.r.		n.r.		n.r.		n.r.		NS
Astaxantina libera (ug)	34.85	0.47	27.71	0.13	27.95	0.16	18.70	0.20	NS
Luteina (ug)	24.08	0.10	58.52	1.74	22.75	0.10	21.15	0.20	NS
Trans cantaxantina (ug)	3.76	0.04	4.82	0.19	5.13	0.17	4.29	0.10	NS
Cis cantaxantina (ug)	n.r.		tr		tr		tr		NS
Carotenoidi totali (ug)	141.86	12.13	124.94	4.22	94.88	6.73	84.98	3.78	*
	mg/g olio								
Colesterolo	9.65	0.03	7.85	0.05	8.96	0.02	9.45	0.07	NS
Squalene	0.15	0.01	0.18	0.02	0.17	0.01	0.19	0.02	NS
∠ - tocoferolo	0.28	0.02	0.27	0.02	0.28	0.03	0.26	0.02	NS
© - tocoferolo + ®-tocof.	0.04	0.01	0.04	0.01	0.04	0.01	0.05	0.01	NS
™ - tocoferolo	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	NS
All-trans retinolo (ug)	1.77	0.12	1.36	0.11	1.33	0.51	1.18	0.05	NS
Alfa-carotene (ug)	n.r.		n.r.		n.r.		n.r.		NS
Beta-carotene (ug)	n.r.		n.r.		n.r.		n.r.		NS
Astaxantina libera (ug)	6.12	0.08	3.65	0.02	4.23	0.02	3.14	0.03	NS
Luteina (ug)	4.23	0.02	7.70	0.23	3.44	0.01	3.55	0.03	NS
Trans cantaxantina (ug)	0.66	0.01	0.63	0.02	0.78	0.03	0.72	0.05	NS
Cis cantaxantina (ug)	n.r.		tr		tr		tr		NS
Carotenoidi totali (ug)	24.93	2.13	16.44	0.56	14.35	1.02	14.26	0.63	NS

n.r. non rilevabile; tr tracce

NS non significativo, *≤ P 0.05: t-test, significatività delle differenze fra “Bassa Densità” e “Alta Densità”.

Tab. 12 Profilo degli acidi grassi nei lipidi totali delle trote di allevamento biologico Bassa Densità (BD) e Alta Densità (AD) di Carmagnola (Torino)

	BD				AD				t-test
	V1		V3		V2		V4		
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds	
C 12:0	0.03	0.00	0.04	0.00	0.04	0.00	0.03	0.00	NS
C 13:0	0.02	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00	NS
C 14:0	4.28	0.05	4.78	0.03	4.70	0.02	4.34	0.11	NS
C 15:0	0.33	0.00	0.36	0.00	0.35	0.00	0.33	0.01	NS
C 16:0	13.98	0.06	14.68	0.02	14.53	0.08	13.99	0.16	NS
C 17:0	0.26	0.00	0.29	0.05	0.26	0.00	0.25	0.00	NS
C 18:0	3.02	0.02	2.96	0.01	3.05	0.02	2.92	0.01	NS
C 19:0	0.05	0.00	0.05	0.00	0.05	0.00	0.05	0.00	NS
C 20:0	0.13	0.00	0.12	0.00	0.13	0.00	0.12	0.00	NS
C 21:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NS
Saturi totali	22.09	0.02	23.30	0.08	23.14	0.06	22.04	0.27	NS
C 14:1 n - 5	0.03	0.00	0.03	0.00	0.03	0.00	0.03	0.00	NS
C 16:1 n - 7	3.96	0.00	4.39	0.01	4.15	0.03	4.26	0.04	NS
C 18:1 n - 9	15.32	0.06	15.22	0.06	15.12	0.02	15.56	0.10	NS
C 18:1 n - 7	2.41	0.00	2.40	0.00	2.38	0.02	2.41	0.02	NS
C 20:1 n - 9	5.17	0.01	4.77	0.09	4.90	0.07	4.59	0.05	NS
C 20:1 n - 11	0.75	0.02	0.73	0.01	0.64	0.01	0.63	0.01	*
C 22:1 n - 9	0.51	0.01	0.41	0.02	0.46	0.00	0.41	0.01	NS
C 22:1 n - 11	6.53	0.08	5.64	0.15	6.17	0.16	5.52	0.10	NS
C 24:1 n - 9	0.49	0.00	0.39	0.01	0.44	0.02	0.39	0.01	NS
<u>Monoinsaturi tot</u>	<u>35.16</u>	<u>0.05</u>	<u>33.98</u>	<u>0.32</u>	<u>34.29</u>	<u>0.19</u>	<u>33.78</u>	<u>0.24</u>	<u>NS</u>
C 16:2 n - 4	0.40	0.00	0.44	0.00	0.42	0.00	0.42	0.00	NS
C 18:2 n - 6	12.80	0.12	13.26	0.06	13.85	0.08	14.06	0.02	NS
C 18:3 n - 6	0.17	0.00	0.15	0.01	0.18	0.00	0.19	0.00	NS
C 18:3 n - 3	1.65	0.03	1.82	0.00	1.78	0.02	1.83	0.00	NS
C 18:4 n - 3	1.57	0.02	1.59	0.01	1.52	0.01	1.51	0.01	*
C 20:2 n - 6	0.54	0.00	0.56	0.00	0.52	0.01	0.61	0.00	NS
C 20:4 n - 3	1.07	0.00	1.14	0.00	1.18	0.01	1.04	0.01	NS
C 20:4 n - 6	0.53	0.00	0.50	0.01	0.49	0.00	0.50	0.00	NS
C 20:5 n - 3	4.91	0.01	4.77	0.05	4.69	0.01	4.83	0.02	NS
C 22:4 n - 6	0.07	0.01	0.03	0.01	0.03	0.01	0.03	0.01	NS
C 22:5 n - 3	1.71	0.03	1.67	0.00	1.50	0.02	1.84	0.01	NS
C 22:6 n - 3	12.28	0.11	11.77	0.22	11.33	0.06	12.28	0.05	NS
<u>Polinsaturi totali</u>	<u>37.69</u>	<u>0.02</u>	<u>37.69</u>	<u>0.35</u>	<u>37.50</u>	<u>0.13</u>	<u>39.12</u>	<u>0.03</u>	<u>NS</u>
somma n - 3	23.19	0.09	22.75	0.28	22.01	0.07	23.32	0.02	NS
somma n - 6	14.11	0.11	14.49	0.07	15.06	0.06	15.39	0.01	NS
n - 3 / n - 6	1.64	0.02	1.57	0.01	1.46	0.00	1.52	0.00	NS

NS non significativo, * P ≤ 0.05: t-test, significatività delle differenze fra “Bassa Densità” e “Alta Densità”.

Tab. 13 Pesticidi organoclorurati nelle trote di allevamento biologico ad Alta Densità (AD) di Grugliasco (Torino).

Trota biologica Grugliasco

CAMPIONAMENTO DELL' 8-1-2013

		ng per grammo di parte edibile (ppb)			ng per grammo di parte edibile (ppb)	
analiti cercati			analiti cercati			
Limite 5 somma	Aldrin	n.r.	Limite 1 somma	Endrin	n.r.	
	Dieldrin	0,29		Endrin ketone	n.r.	
	4,4'-DDT	0,13		α-HCH	n.r.	
	4,4'-DDD	0,19		β-HCH	n.r.	
	4,4'-DDE	0,63		δ-HCH	n.r.	
	4,4'-DDMU	0,05		γ-HCH (Lindane)	n.r.	
	2,4'-DDT	n.r.		HCB	0,22	
	2,4'-DDD	n.r.		Limite 5 somma	Heptachlor	n.r.
	2,4'-DDE	n.r.			Hept. exo epox.	0,05
	α-Chlordane	0,08			Octachlorostyrene	n.r.
Limite 50 somma	γ-Chlordane	0,04	α-Endosulfan	n.r.		
	Oxychlordane	0,04	Mirex	n.r.		
	cis-Nonachlor	0,07	Quintozen	n.r.		
Limite 5 somma	trans-Nonachlor	0,15				

LIMITI DI RIFERIMENTO
 PESTICIDI
 ORGANOCLORURATI:
 GAZZ. UFF. n. 292
 (supp. Ord. 179) anno 2004

■ valore fuori limite
■ valore nei limiti
■ limite non stabilito
n.r. non rilevato

Tab. 14 PCB nelle trote di allevamento biologico ad Alta Densità (AD) di Grugliasco (Torino).

Trota biologica Grugliasco - camp. dell' 8-1-13

analiti cercati	ng per grammo di parte edibile (ppb)	analiti cercati	ng per grammo di parte edibile (ppb)
PCB 28	0,08	PCB 128	0,05
PCB 31	0,08	PCB 132	n.r.
PCB 44	0,06	PCB 138	0,25
PCB 47	0,04	PCB 151	0,03
PCB 49	0,04	PCB 153	0,36
PCB 52	0,17	PCB 163	0,07
PCB 66	0,03	PCB 170	0,01
PCB 74	n.r.	PCB 180	0,06
PCB 87	0,02	PCB 185	n.r.
PCB 97	0,03	PCB 187	0,07
PCB 101	0,24	PCB 194	n.r.
PCB 110	0,10	PCB 206	0,03
PCB 118	0,16		

SOMMA 1,98

Somma dei sette PCB "indicatori" (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) su base grassa
 ng per g di grasso (ppb fat basis) 34,83

RIFERIMENTO PCB: valori guida adottati da alcuni paesi OSPAR
 valore fuori limite
 valore nei limiti
 limite non stabilito
 n.r. non rilevato

Valori di recupero degli standard interni aggiunti al campione all'inizio dell'analisi: 2,2'-DDE = 81,4% PCB 5 = 79,9% Heptachlor endo epoxide = 87,9%
 Doppia analisi gascromatografica: a cattura di elettroni ed in Spettrometria di Massa.
 CRA ex-INTRAN. 5 febbraio 2013

Conclusioni WP5

In conclusione, dai risultati ottenuti è emerso come non sia significativo l'effetto della densità, comunque bassa, scelta per l'allevamento delle trote, sulla loro qualità chimico-nutrizionale. E' evidente invece il ruolo del mangime nel determinare la qualità nutrizionale del pesce in particolare influenzando il livello di acidi grassi polinsaturi n-3. Tali acidi grassi entrano nella costituzione delle nostre membrane cellulari, sono essenziali per lo sviluppo cerebrale e della retina, ma soprattutto sono precursori di eicosanoidi (prostaglandine, trombossani, leucotrieni) che migliorano la fluidità del sangue prevenendo la formazione di trombi, hanno importanti funzioni nelle reazioni infiammatorie ed in numerose altre funzioni.

Per la sostenibilità del sistema produttivo, la ricerca nel settore mangimistico si è sempre di più spostata verso formulazioni a basso impatto ambientale dove si valuta sempre di più la sostituzione di parte della farina di pesce e olio di pesce, elementi base dei mangimi per l'acquacoltura, con farine ed oli vegetali. Risulta quindi importante l'approfondimento delle attuali conoscenze sull'impiego di fonti lipidiche e proteiche alternative non limitandosi solamente agli aspetti zootecnici ma anche studiando i possibili riflessi che questo impiego pone nei riguardi dello stato di salute, resistenza agli stress ambientali, qualità nutrizionale ed organolettica del prodotto.

La collaborazione tra il CNR-ISPA (Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO)) ed il CRA-IAA di Milano, nell'ambito del Programma Sviluppo e Potenziamento dell'Agricoltura Biologica coordinato dal MIPAAF, nasce dall'esigenza di integrare le conoscenze di base sui parametri relativi alla piscicoltura con criteri biologici con valutazioni qualitative sul prodotto che integrino parametrizzazioni di tipo organolettico e sensoriale con misure oggettive chimico-fisiche.

L'oggetto di studio è stato un allevamento sperimentale di trote con criterio biologico, in cui si è introdotta la variabile della densità degli individui, per valutare se tale indice può influire sulla qualità delle carni al momento del consumo umano.

Risultati WP6

Saggi Sensoriali

I risultati dell'analisi statistica dei singoli descrittori per i pesci crudi e cotti suddivisi per le due giornate in cui è stato condotto il test sono riportati nella tabella WP6.1, mentre nella tabella WP6.2 (pesci crudi) e WP6.3 (pesci cotti) sono riportati i valori delle mediane e delle medie dei punteggi sensoriali tenendo distinte le vasche di allevamento.

Tabella WP6.1- Significatività (P-value) e valore della distribuzione χ^2 dell'analisi della varianza a una via Kruskal-Wallis considerando quale fattore la vasca di allevamento.

		giorno 1		giorno 2	
		χ^2	P-value	χ^2	P-value
CRUDO	aspetto	8,604	0,125	7,436	0,190
	consistenza	1,861	0,868	5,380	0,371
	odore	3,105	0,684	3,105	0,684
COTTO	aspetto	4,957	0,421	4,347	0,501
	consistenza	2,776	0,734	9,337	0,096
	odore	2,107	0,843	5,268	0,384
	sapore	1,797	0,876	0,701	0,983

Tabella WP6.2 - Mediane e medie dei descrittori qualitativi relativi ad aspetto, consistenza ed odore per pesce crudo integro e sfilettato da ogni vasca, identificata in maniera anonima, operato da 10 assaggiatori addestrati per ciascun giorno di conservazione a 4°C prima della cottura.

CRUDO	I giorno			II giorno			totale		
	media tesi 1, 3, 5 (bassa densità, BD)			media tesi 1, 3, 5 (bassa densità, BD)			media tesi 1, 3, 5 (bassa densità, BD)		
	aspetto	consistenza	odore	aspetto	consistenza	odore	aspetto	consistenza	odore
media	2,83	2,80	2,97	2,77	2,80	2,95	2,80	2,78	2,97
dev std	0,38	0,41	0,18	0,43	0,41	0,22	0,40	0,42	0,18
	media tesi 2, 4, 6 (alta densità, AD)			media tesi 2, 4, 6 (alta densità, AD)			media tesi 2, 4, 6 (alta densità, AD)		
media	2,77	2,83	2,93	2,80	2,73	2,93	2,95	2,90	2,85
dev std	0,43	0,38	0,25	0,41	0,52	0,25	0,22	0,31	0,37
BD/AD	1,024	0,988	1,011	0,988	1,024	1,006	0,949	0,960	1,041

CRUDO		giorno 1						giorno 2					
		aspetto		consistenza		odore		aspetto		consistenza		odore	
		mediana	media	mediana	media	mediana	media	mediana	media	mediana	media	mediana	media
BD	v1	3	2,7	3	2,8	3	3	3	2,8	3	2,8	3	3
	v3	3	2,9	3	2,8	3	2,9	3	2,6	3	2,6	3	2,9
	v5	3	2,9	3	2,8	3	3	3	2,9	3	2,6	3	3
AD	v2	3	2,9	3	2,7	3	2,9	3	2,6	3	2,5	3	3
	v4	2,5	2,5	3	2,9	3	2,9	3	3	3	2,9	3	2,9
	v6	3	2,9	3	2,9	3	3	3	2,8	3	2,8	3	2,9

Tabella WP6.3. Mediane e medie dei descrittori qualitativi relativi ad aspetto, consistenza, odore e sapore per pesce cotto da ogni vasca, identificata in maniera anonima, operato da 10 assaggiatori addestrati per ciascun giorno di conservazione a 4°C prima della cottura.

COTTO	I giorno				II giorno				totale			
	media tesi 1, 3, 5 (bassa densità, BD)				media tesi 1, 3, 5 (bassa densità, BD)				media tesi 1, 3, 5 (bassa densità, BD)			
	aspetto	consistenza	odore	sapore	aspetto	consistenza	odore	sapore	aspetto	consistenza	odore	sapore
media	2,53	2,60	2,93	2,70	2,70	2,23	2,90	2,57	2,62	2,42	2,92	2,63
dev std	0,57	0,72	0,25	0,47	0,53	0,63	0,31	0,63	0,56	0,70	0,28	0,55
media tesi 2, 4, 6 (alta densità, AD)				media tesi 2, 4, 6 (alta densità, AD)				media tesi 2, 4, 6 (alta densità, AD)				
	aspetto	consistenza	odore	sapore	aspetto	consistenza	odore	sapore	aspetto	consistenza	odore	sapore
media	2,73	2,47	2,93	2,57	2,77	2,47	2,97	2,70	2,75	2,47	2,95	2,63
dev std	0,45	0,73	0,25	0,63	0,50	0,68	0,18	0,47	0,47	0,70	0,22	0,55
BD/AD	0,927	1,054	1,000	1,052	0,976	0,905	0,978	0,951	0,952	0,980	0,989	1,000

COTTO		giorno 1							
		aspetto		consistenza		odore		sapore	
		mediana	media	mediana	media	mediana	media	mediana	media
BD	v1	3	2,5	3	2,6	3	2,9	3	2,7
	v3	2	2,4	3	2,7	3	2,9	3	2,7
	v5	3	2,7	3	2,5	3	3	3	2,7
AD	v2	3	2,8	3	2,7	3	3	3	2,7
	v4	3	2,6	3	2,5	3	2,9	3	2,6
	v6	3	2,8	2,5	2,2	3	2,9	2,5	2,4
		giorno 2							
		aspetto		consistenza		odore		sapore	
		mediana	media	mediana	media	mediana	media	mediana	media
BD	v1	3	2,7	2	1,9	3	3	3	2,5
	v3	3	2,9	2,5	2,4	3	2,9	3	2,6
	v5	3	2,5	2	2,4	3	2,8	3	2,6
AD	v2	3	2,8	3	2,6	3	3	3	2,7
	v4	3	2,6	2	2,2	3	3	3	2,7
	v6	3	2,9	3	2,6	3	2,9	3	2,7

Non si è riscontrata differenza statistica tra le vasche di allevamento sia per i descrittori del pesce crudo che per quelli del pesce cotto per entrambi i giorni di prova (Tabella 1), anche se al secondo giorno si osservano valori di P-value minori rispetto al giorno 1 per la consistenza del pesce crudo e per l'odore e la consistenza del pesce cotto.

Dai dati della Tabella 2, si può infatti riscontrare che la v2 (AD) per il descrittore consistenza ha avuto il punteggio medio minore pur avendo la stessa mediana di tutte le altre vasche. Per contro, i pesci provenienti dalle vasche 1, 3, e 5 (BD) dopo cottura al giorno 2 presentavano per la consistenza valori di mediane 2, 2 e 2,5, mentre i pesci provenienti dalle vasche 2, 4 e 6 (AD) valori di mediane di 3, 2 e 3.

Misura del colore

Per quanto riguarda le valutazioni delle coordinate colorimetriche sul pesce crudo, le relative misure sono state effettuate sulla parte dorsale e sulla parte ventrale dei pesci sia sulla pelle esterna tal quale che sulla parte interna dopo sfilettatura, tenendole ovviamente separate in quanto il colore dei pesci è significativamente differente tra i due distretti corporei. Nella Tabella WP6.4 sono riportati i dati relativi al colore della parte dorsale esterna. Dal confronto tra le misure dei valori medi, evidenziato dai rapporti tra gli stessi nelle tesi BD ed AD, non vi sono state variazioni significative. A livello indicativo, il valore che spicca è quello relativo alla riflettanza a 420 nm, che risulta maggiore nella tesi BD, quindi assumendo che ad una maggiore riflettanza corrisponde una minore assorbanza, un minore contributo di colore derivato da incipiente ossidazione si potrebbe supporre nella tesi a bassa densità di allevamento rispetto a quella ad alta densità. Inoltre si evidenzia, sempre in BD, il valore minore di b^* e di C^* , ed infine si ha anche un valore di lucentezza maggiore (Tabella 4).

Tabella WP6.4. Coordinate colorimetriche misurate in riflettanza su campioni di pesce integro esterno saggiando la parte dorsale. Ogni valore è la media di 3 misure distinte: L^* luminosità; a^* componente rosso-verde; b^* componente giallo-blu; C^* Chroma o saturazione; h hue o tonalità; 8 degree gloss indice di lucentezza; 420, 470, 540, 670 nm riflettanze alle varie lunghezze d'onda. Il simbolo # indica la colonna dei valori dove ci sono le differenze maggiori tra il valore medio BD ed AD, i due asterischi indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0.01$).

PESCE INTEGRO, COLORE DORSO														
vasca	$L^*(D65)$	$a^*(D65)$	$b^*(D65)$	$C^*(D65)$	$h(D65)$	8 degree gloss		420nm	470 nm	540nm	670 nm	420/540	470/420	670/420
1	45.46	-0.63	11.02	11.05	93.50	22.33		8.66	12.08	15.33	17.46	0.56	1.40	2.02
3	51.76	-1.15	11.89	11.99	95.50	22.17		10.26	16.78	20.19	22.75	0.51	1.64	2.22
5	49.89	-0.59	10.86	10.97	92.25	21.25		11.31	15.52	18.83	21.32	0.60	1.37	1.89
media BD	49.04	-0.79	11.26	11.34	93.75	21.92		10.07	14.79	18.12	20.51	0.56	1.47	2.04
dev std BD	3.24	0.31	0.56	0.57	1.64	0.58		1.33	2.43	2.51	2.74	0.05	0.15	0.17
2	48.83	-1.28	11.25	11.39	96.50	19.58		10.09	14.33	17.81	19.59	0.57	1.42	1.94
4	48.87	0.01	14.84	14.91	89.66	20.17		7.37	13.02	16.97	20.99	0.43	1.77	2.85
6	49.25	-1.15	12.58	12.66	95.12	19.42		9.45	14.76	18.47	20.77	0.51	1.56	2.20
media AD	48.98	-0.81	12.89	12.99	93.76	19.72		8.97	14.04	17.75	20.45	0.50	1.58	2.33
dev std AD	0.23	0.71	1.82	1.78	3.62	0.39		1.43	0.90	0.75	0.75	0.07	0.18	0.47
BD/AD	1.001	0.983	0.873	0.873	1.000	1.111		1.123	1.054	1.021	1.003	1.106	0.927	0.876
			#	#				#						**

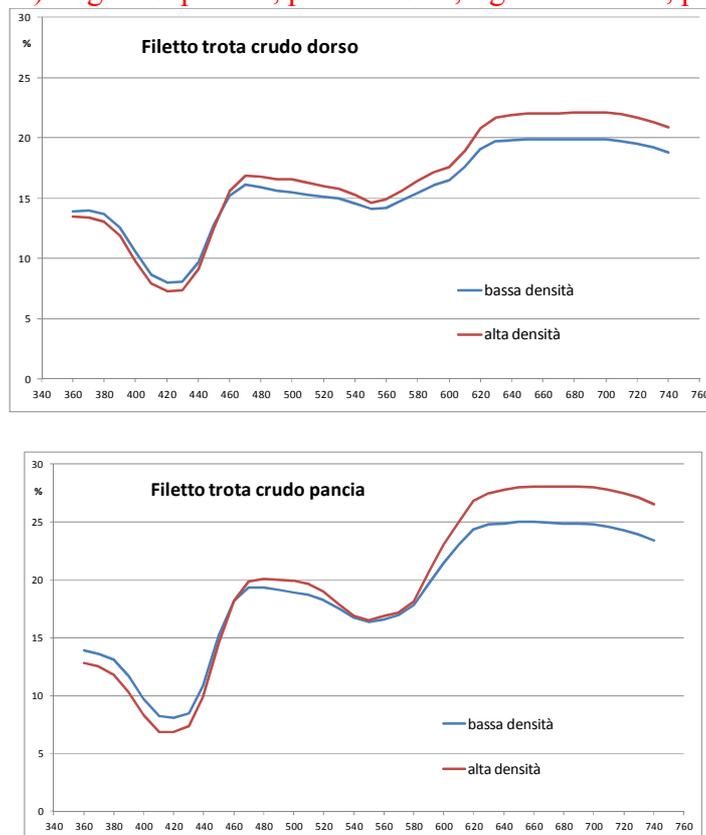
I dati rilevati precedentemente sulla parte dorsale vengono generalmente confermati dalle rilevazioni effettuate sulle zone ventrali (Tabella 5), in cui si ha il rapporto maggiore tra BD ed AD per quanto riguarda il grado di lucentezza ed il rapporto minore sulla differenza della coordinata a^* , che presenta la maggiore differenza di valore tra BD ed AD, arrivando ad un valore di 0.707 (Tabella 5), senza significatività tra le due tesi a causa dell'alto valore delle deviazioni standard.

Tabella WP6.5. Coordinate colorimetriche misurate in riflettanza su campioni di pesce integro esterno saggiando la parte ventrale. Ogni valore è la media di 3 misure distinte: L* luminosità; a* componente rosso-verde; b* componente giallo-blu; C* Chroma o saturazione; h hue o tonalità; 8 degree gloss indice di lucentezza; 420, 470, 540, 670 nm, riflettanze alle varie lunghezze d'onda. Il simbolo # indica la colonna dei valori dove ci sono le differenze maggiori tra il valore medio BD ed AD.

PESCE INTEGRO, COLORE VENTRE														
vasca	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h(D65)	8 degree gloss		420nm	470 nm	540nm	670 nm	420/540	470/420	670/420
1	74.74	-1.12	10.10	10.22	95.81	46.25		30.18	43.94	47.83	52.41	0.63	1.46	1.74
3	74.32	-0.18	8.68	8.70	90.92	59.17		28.99	43.70	46.08	52.18	0.63	1.51	1.80
5	76.80	-1.70	8.52	8.76	102.15	59.75		35.82	47.89	51.49	53.69	0.70	1.34	1.50
media BD	75.29	-1.00	9.10	9.23	96.29	55.06		31.66	45.18	48.47	52.76	0.65	1.43	1.68
dev std BD	1.33	0.77	0.87	0.86	5.63	7.63		3.65	2.35	2.76	0.82	0.04	0.09	0.16
2	72.97	-1.66	11.34	11.54	98.23	43.33		27.59	40.04	45.02	48.35	0.61	1.45	1.75
4	71.41	-1.20	11.29	11.41	96.14	47.42		25.53	37.90	42.42	46.69	0.60	1.48	1.83
6	78.18	-1.40	7.83	8.02	100.33	60.33		35.50	50.16	52.89	56.19	0.67	1.41	1.58
media AD	74.19	-1.42	10.15	10.32	98.23	50.36		29.54	42.70	46.78	50.41	0.63	1.45	1.72
dev std AD	3.54	0.23	2.02	2.00	2.10	8.87		5.27	6.55	5.45	5.07	0.04	0.04	0.13
BD/AD	1.015	0.707	0.896	0.894	0.980	1.093		1.072	1.058	1.036	1.047	1.037	0.989	0.975
		#												#

I dati più rilevanti riguardano gli spettri di riflettanza da cui derivano le coordinate colorimetriche del filetto crudo, sia valutato sulla parte dorsale che su quella ventrale. Come si può vedere dall'andamento degli spettri medi (Figura 6), sia sulla parte dorsale che su quella ventrale, fermo restando il differente spettro di riflettanza tra le due parti anatomiche, l'andamento dei valori è analogo se si confrontano i valori da esemplari diversamente allevati: la valle che si ha attorno a 420 nm è sempre più profonda, anche se di poco, nei campioni ad alta densità, mentre la situazione si inverte nella zona tra 620 e 700 nm, con valori generalmente minori nei campioni a bassa densità.

Figura 6. Spettri di riflettanza medi per i campioni di pesce filettato AD (alta densità) e BD (bassa densità) Figura superiore, parte dorsale, figura inferiore, parte ventrale.



Tale andamento è confermato dai dati numerici delle coordinate colorimetriche ricavate tramite elaborazione degli spettri. I valori di riflettanza sulla parte dorsale sono risultati significativamente maggiori a 420 nm e minori a 670 nm per BD rispetto ad AD, con conseguenti notevoli differenze per i rapporti 420/540 nm, 470/420 nm e 670/420 nm. Tale andamento è confermato dalle coordinate cromatiche, che sono risultate statisticamente significative per il parametro b^* e C^* , con valori minori in BD, mentre la lucentezza della parte dorsale è risultata maggiore in BD, senza significatività (Tabella WP6.6).

Tabella WP6.6. Coordinate colorimetriche misurate in riflettanza su campioni di pesce sfilettato all'interno saggiando la parte dorsale. Ogni valore è la media di 3 misure distinte: L* luminosità; a* componente rosso-verde; b* componente giallo-blu; C* Chroma o saturazione; h hue o tonalità; 8 degree gloss indice di lucentezza; 420, 470, 540, 670 nm riflettanze alle varie lunghezze d'onda. . Il simbolo # indica la maggiore differenza tra i valori medi di BD ed AD; il doppio asterisco indica la colonna dei valori dove c'è differenza statisticamente significativa tra il valore medio BD ed AD (p<0.01).

FILETTO INTERNO, DORSO														
vasca	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h(D65)	8 degree gloss		420nm	470 nm	540nm	670 nm	420/540	470/420	670/420
1	46.47	2.70	5.99	6.59	66.39	0.67		8.61	16.49	14.61	20.82	0.59	1.92	2.42
3	46.95	1.37	6.34	6.52	78.56	0.50		7.94	17.10	15.14	19.63	0.52	2.15	2.47
5	45.30	2.02	7.55	7.90	75.25	1.50		7.46	14.80	13.96	19.12	0.62	1.98	2.56
media BD	46.24	2.03	6.62	7.00	73.40	0.89		8.00	16.13	14.57	19.86	0.58	2.01	2.48
dev std BD	0.85	0.67	0.82	0.77	6.29	0.54		0.57	1.19	0.59	0.87	0.05	0.12	0.07
2	46.12	2.78	10.59	10.99	76.15	0.67		6.42	14.49	14.33	21.08	0.04	2.26	3.28
4	49.03	0.97	6.95	7.05	80.96	0.50		8.09	19.46	16.59	22.86	0.00	2.40	2.83
6	46.91	2.52	8.09	8.52	71.43	0.83		7.32	16.56	14.96	22.18	0.43	2.26	3.03
media AD	47.36	2.09	8.54	8.85	76.18	0.67		7.28	16.83	15.29	22.04	0.16	2.31	3.05
dev std AD	1.51	0.98	1.86	1.99	4.76	0.17		0.84	2.49	1.16	0.89	0.24	0.08	0.23
BD/AD	0.976	0.969	0.775	0.791	0.964	1.333		1.100	0.958	0.953	0.901	3.687	0.871	0.816
			**	**		#		**			**	**	**	**

I valori rilevati sulla parte ventrale (Tabella 7) in generale ricalcano ciò che si è precedentemente visto. I parametri a*, b* e C* risultano minori in BD rispetto ad AD; la lucentezza, seppur non significativa, è maggiore in BD, la riflettanza a 420 nm è maggiore in BD ed i rapporti 470/420 e 670/420 sono significativamente minori in BD rispetto ad AD.

Tabella WP6.7. Coordinate colorimetriche misurate per riflettanza su campioni di pesce sfilettato all'interno saggiando la parte ventrale. Ogni valore è la media di 3 misure distinte: L* luminosità; a* componente rosso-verde; b* componente giallo-blu; C* Chroma o saturazione; h hue o tonalità; 8 degree gloss indice di lucentezza; 420, 470, 540, 670 nm riflettanze alle varie lunghezze d'onda. Il simbolo # indica la maggiore differenza tra i valori medi di BD ed AD; il doppio asterisco indica la colonna dei valori dove c'è differenza statisticamente significativa tra il valore medio BD ed AD (p<0.01).

FILETTO INTERNO, VENTRE														
vasca	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h(D65)	8 degree gloss		420 nm	470 nm	540 nm	670 nm	420/540	470/420	670/420
1	49.46	3.09	7.55	8.18	67.58	9.33		8.26	18.47	16.44	23.34	0.50	2.24	2.83
3	51.96	3.99	8.41	9.35	65.17	9.17		7.68	21.47	17.84	27.41	0.43	2.80	3.57
5	49.06	4.31	7.68	8.99	63.58	13.17		8.35	18.21	15.93	24.04	0.52	2.18	2.88
media BD	50.16	3.80	7.88	8.84	65.44	10.56		8.10	19.38	16.74	24.93	0.48	2.39	3.09
dev std BD	1.57	0.63	0.47	0.60	2.01	2.26		0.37	1.81	0.99	2.18	0.05	0.34	0.42
2	51.31	5.46	11.73	13.15	66.08	4.17		6.02	19.33	16.94	28.58	0.36	3.21	4.75
4	49.83	5.73	9.73	11.41	58.75	11.17		5.91	19.59	15.54	28.38	0.38	3.32	4.81
6	51.80	3.66	8.80	9.57	67.03	9.67		8.54	20.58	18.08	27.20	0.47	2.41	3.19
media AD	50.98	4.95	10.08	11.37	63.95	8.33		6.82	19.83	16.85	28.05	0.40	2.91	4.25
dev std AD	1.03	1.12	1.50	1.79	4.53	3.69		1.49	0.66	1.28	0.75	0.06	0.49	0.92
BD/AD	0.984	0.768	0.781	0.777	1.023	1.267		1.187	0.977	0.993	0.889	1.202	0.823	0.728
		**	**	**		#		**					**	**

La considerazione finale che si può trarre è che la carne dei pesci allevati a bassa densità è di una colorazione tendenzialmente meno satura e più brillante dei corrispettivi ad alta densità, denotando una qualità maggiore, con minore indice di imbrunimento riferito alla maggiore riflettanza a 420 nm e potenziale minore presenza di sangue dopo la macellazione.

Lo stesso approccio è stato applicato alle analisi di colore relative ai campioni di pesce dopo la cottura (dati in Tabella 8), dove non si sono rilevate differenze statisticamente significative tra le due densità di allevamento. Le due maggiori differenze tra le medie rilevate sono risultate una nel parametro a^* , che è risultata maggiore di quasi il 30% nei campioni di carne provenienti da pesci a bassa densità di allevamento, mentre l'intensità di lucentezza, potenzialmente ascrivibile ad una presenza di carni più asciutte, è minore nelle tesi BD rispetto alle AD, arrivando ad un rapporto tra i due valori medi di 0.658 (Tabella 8). Gli altri dati, avendo valori dei rapporti BD/AD generalmente molto vicini ad 1, portano a ritenere che la qualità del pesce diversamente allevato dopo cottura dal punto di vista colorimetrico è sovrapponibile.

Tabella WP6.8. Coordinate colorimetriche misurate in riflettanza su campioni di pesce cotto. Ogni valore è la media di 3 misure distinte: L* luminosità; a* componente rosso-verde; b* componente giallo-blu; C* Chroma o saturazione; h hue o tonalità; 8 degree gloss indice di lucentezza; 420, 470, 540, 670 nm riflettanze alle varie lunghezze d'onda. Il simbolo # indica la colonna dei valori dove c'è differenza maggiormente rilevante tra i valori medi BD ed AD.

PESCE COTTO														
vasca	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h(D65)	8 degree gloss		420nm	470nm	540nm	670 nm	420/540	470/420	670/420
1	75.45	2.85	20.04	20.28	82.13	3.08		21.40	38.68	46.15	62.88	0.46	1.81	2.94
3	73.62	1.65	19.64	19.74	85.26	1.75		19.37	37.75	43.72	60.20	0.44	1.95	3.11
5	80.09	2.41	19.21	19.38	82.75	3.33		29.46	44.09	53.93	70.06	0.55	1.50	2.38
media BD	76.39	2.30	19.63	19.80	83.38	2.72		23.41	40.17	47.93	64.38	0.48	1.75	2.81
dev std BD	3.34	0.60	0.41	0.45	1.66	0.85		5.33	3.42	5.34	5.10	0.05	0.23	0.38
2	79.82	2.15	18.80	18.94	83.61	4.25		28.05	44.88	53.41	69.56	0.53	1.60	2.48
4	73.10	1.31	20.72	20.83	87.37	4.25		20.38	34.94	43.53	58.19	0.47	1.71	2.85
6	78.44	1.89	19.77	19.88	84.24	3.92		28.03	40.85	51.61	66.10	0.54	1.46	2.36
media AD	77.12	1.78	19.76	19.88	85.08	4.14		25.49	40.22	49.52	64.62	0.51	1.59	2.56
dev std AD	3.55	0.43	0.96	0.94	2.01	0.19		4.42	5.00	5.26	5.83	0.04	0.13	0.26
BD/AD	0.991	1.291	0.993	0.996	0.980	0.658		0.918	0.999	0.968	0.996	0.946	1.101	1.095
		#												#

Misura della consistenza

I dati relativi alla consistenza sono illustrati in Tabella WP6. 9 (parte dorsale e ventrale, P6.), sia sulla parte dorsale che su quella ventrale, hanno un andamento che denota una sostanziale equivalenza dei valori di consistenza tra BD ed AD che sono molto sovrapponibili: 34.1 kg vs 36.7 kg per AD sul dorso e minori valori sulla parte ventrale, 25.6 kg vs 25.8 kg.

Tabella WP6.9. Valori della consistenza, misurata attraverso la resistenza al taglio di una lama triangolare con larghezza iniziale 6 cm e spessore 1 mm, velocità 100 mm/min, di una sezione di muscolo crudo di dimensioni costanti, preso sulla parte dorsale (5×1 cm) e ventrale (5×2 cm) in due differenti punti per ogni individuo campionato.

CRUDO	dorso	ventre
Vasca	Kg/5 cm	Kg/5 cm
1 (BD)	30.2	24.2
3 (BD)	42.6	32.7
5 (BD)	29.7	19.8
media BD	34.1	25.6
dev std	7.3	6.6
2 (AD)	32.8	21.4
4 (AD)	41.6	29.2
6 (AD)	35.8	26.7
media AD	36.7	25.8
dev std	4.4	4.0
BD/AD	0.930	0.993

I valori di consistenza sulle porzioni di filetto cotto (Tabella 10), invece, presentano una evoluzione in direzione di una maggiore consistenza nelle carni dai pesci allevati in sistemi a bassa densità, decisamente maggiori nella prima giornata di misura, e con differenze minori nella seconda giornata. Il calcolo della media finale dà un valore decisamente maggiore nei campioni BD (95.3 kg/50g) rispetto ai campioni AD (85.4 kg/50g). I rapporti BD/AD calcolati in ogni replica sono risultati 3 volte decisamente maggiori di 1 ed 1 volta praticamente uguali, fanno pensare ad un reale andamento nel senso di una maggiore consistenza e quindi una maggiore tenuta alla cottura delle carni da pesci allevati con una minore densità di allevamento.

Tabella W6.10 - Valori della consistenza, misurata attraverso la resistenza al taglio, di un campione di carne cotta normalizzata ad una quantità di 50 g. I valori nella colonna denominata “Totale” sono riferiti alle medie delle 4 misure per ogni vasca nei due giorni di campionamento.

COTTI	analisi del 24 ott 2012		analisi del 25 ott 2012		TOTALE	
	R1	R2	R1	R2	media	dev std
Vasca	Kg/50 g		Kg/50 g		Kg/50 g	
1 (BD)	71,8	78,6	89,8	90,6	82,7	9,1
3 (BD)	90,3	94,6	91,5	101,4	94,4	5,0
5 (BD)	115,9	103,5	123,4	91,6	108,6	14,0
media BD	92,7	92,3	101,6	94,5	95,3	9,4
2 (AD)	77,0	73,9	95,8	80,4	81,8	9,7
4 (AD)	68,7	51,5	117,7	96,2	83,5	29,3
6 (AD)	72,1	80,4	107,4	103,8	90,9	17,3
media AD	72,6	68,6	106,9	93,5	85,4	18,8
BD/AD	1,277	1,344	0,950	1,011	1,115	0,498

Naso elettronico

Nella Tabella WP6.11 sono riportati i risultati dell’analisi ANOVA applicata alle risposte dei sensori.

Tabella WP6.11 - Risultati analisi ANOVA multifattoriale delle risposte dei 10 sensori del naso elettronico. Significatività di F: ns, non significativo; *, $P \leq 0.05\%$; **, $P \leq 0.01\%$; ***, $P \leq 0.001\%$.

	W1C	W5S	W3C	W6S	W5C	W1S	W1W	W2S	W2W	W3S
Effetti principali										
A: giorno	*	ns	***	*	***	***	ns	**	***	***
B: allevamento	ns	*								
Interazioni										
A × B	ns									

La maggioranza dei sensori ha fornito una risposta significativamente differente per i giorni di conservazione a 4°C prima della cottura, mentre solo il sensore W3S ha fornito una risposta differente anche rispetto al sistema di allevamento.

Nella Figura 7 sono riportati i profili sensoristici medi per ciascun giorno di analisi, mentre nella Figura 8 sono mostrate le risposte medie di ciascun sensore per ciascuna forma di allevamento. Prolungando il tempo di conservazione a 4°C prima della cottura

si osserva una diminuzione significativa della risposta dei sensori più affini ai composti aromatici W1C e W3C, a composti aromatici alifatici W5C e metano alifatici W3S, e un aumento significativo delle risposte dei sensori di più ampio spettro quali W1S (metano), W2S (alcool) e W2W (composti sulfurei/clorurati). Questa evoluzione del pattern sensoristico è consistente con l'evoluzione dei composti volatili legati alla freschezza del pesce riportati in letteratura. Più precisamente è riportato che nei primi 3-4 giorni, quando comunque i pesci sono giudicati dal punto di vista organolettico con odore di pesce fresco, si assiste ad un notevole incremento di "fresh fish alcohols" accoppiato ad una diminuzione di "fresh fish carbonyls" secondo quanto illustrato nella Figura 9.

Figura 7. Profilo sensoristico di trote cotte in funzione del tempo di conservazione a 4°C prima della cottura. Significatività di F: *, $P \leq 0.05\%$; **, $P \leq 0.01\%$; ***, $P \leq 0.001\%$.

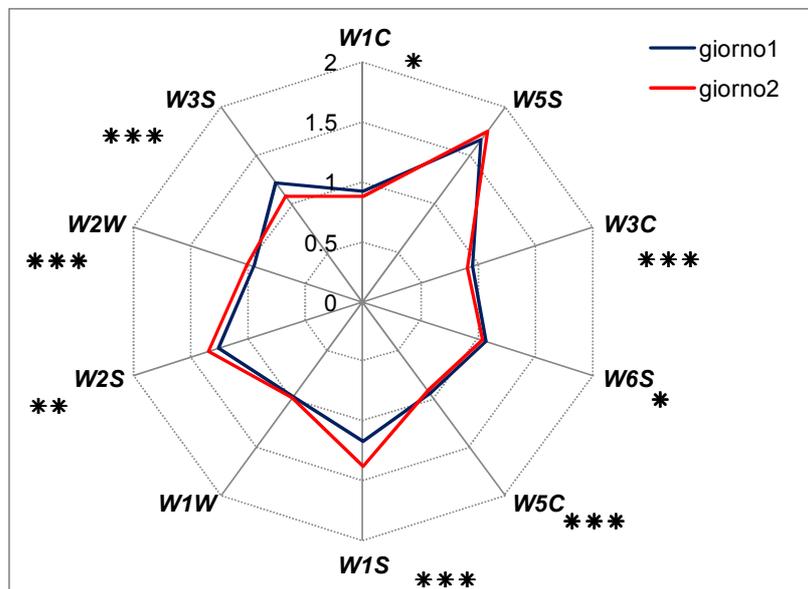
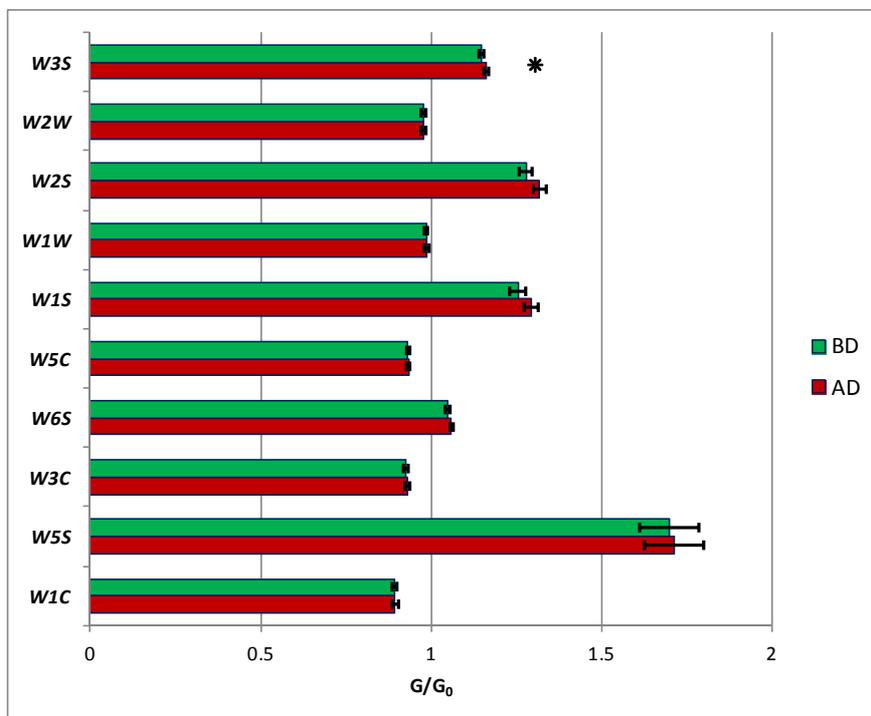
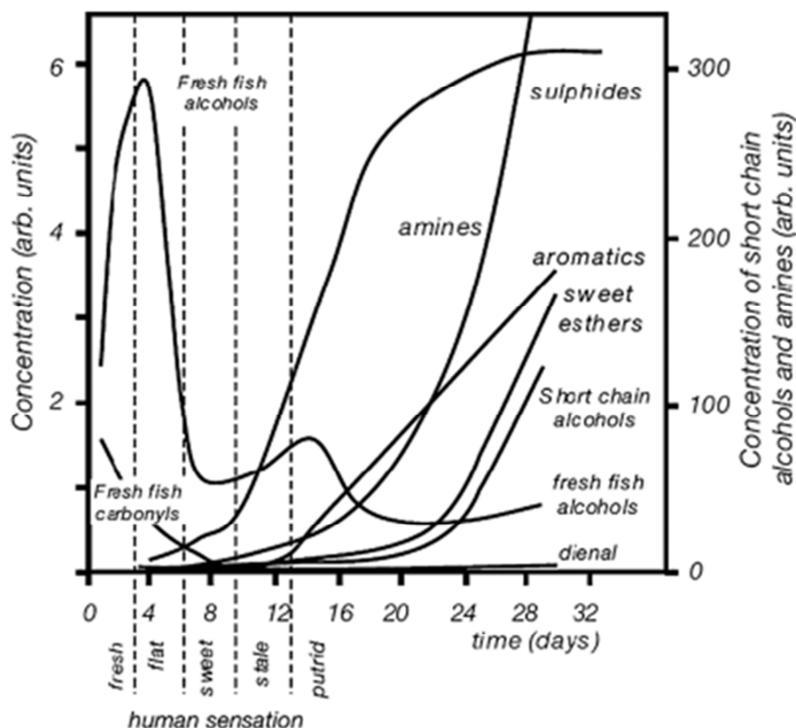


Figura 8. Risposte medie dei sensori in funzione del sistema di allevamento .BD= bassa densità, AD= alta densità. Le barre riportano l'errore standard delle medie. Significatività di F: *, $P \leq 0.05\%$.



La modalità di allevamento ha influenzato la risposta dei sensori W1S (metano), W2S (alcol) e W3S (metano alifatici) (Figura 8). Infatti i pesci BD erano caratterizzati da risposte minori di questi sensori, rispetto a quelli AD, anche se la differenza è risultata statisticamente significativa solo per il sensore W3S.

Figura 9. Evoluzione dei composti volatili correlati alla freschezza del pesce (da: Perera A, Pardo A., Barrettino D., Hierlermann A., Marco S. Evaluation of fish spoilage by means of a single metal oxide sensor under temperature modulation. *Sensors and Actuators B: Chemical* 146 (2010) 477-482.)



La matrice dei dati dei sensori, costituita da 10 variabili (le risposte dei 10 sensori MOS) e da 24 righe corrispondenti ai campioni (6 pesci AD giorno1, 6 pesci BD giorno1, 6 pesci AD giorno2 e 6 pesci BD giorno2) è stata sottoposta ad analisi delle componenti principali (PCA) analizzando separatamente i giorni di conservazione a 4°C prima della cottura.

Nella Tabella WP6.12 sono riportati i pesi (loadings) delle variabili e la percentuale di varianza spiegata dalle prime due componenti principali (PC) per le analisi PCA dei giorni 1 e 2, mentre nella Figura 10 sono rappresentati i grafici PC-1 vs PC-2 degli score dei campioni a confronto con la disposizione dei pesi delle variabili. Ciascun campione è stato identificato o con il sistema di allevamento (grafici in alto) o con il codice della vasca di allevamento da cui provenivano (grafici in basso).

I risultati indicano che al primo giorno non esiste una chiara differenza nel pattern sensoristico tra i due sistemi di allevamento. Infatti la prima componente distingue il sensore W5S da tutti gli altri sensori e separa un campione proveniente dalla vasca 1 a bassa densità di allevamento, legato al sensore W5S, dai campioni provenienti dalla vasca 6 ad alta densità di allevamento ed uno proveniente dalla vasca 5 a bassa densità di allevamento, che hanno valori di PC-1 positivi ma minori rispetto al precedente, e questi campioni da tutti gli altri, che assumono valori negativi di PC-1. La seconda componente distingue i sensori W1S e W2S da tutti gli altri, ed assume i valori

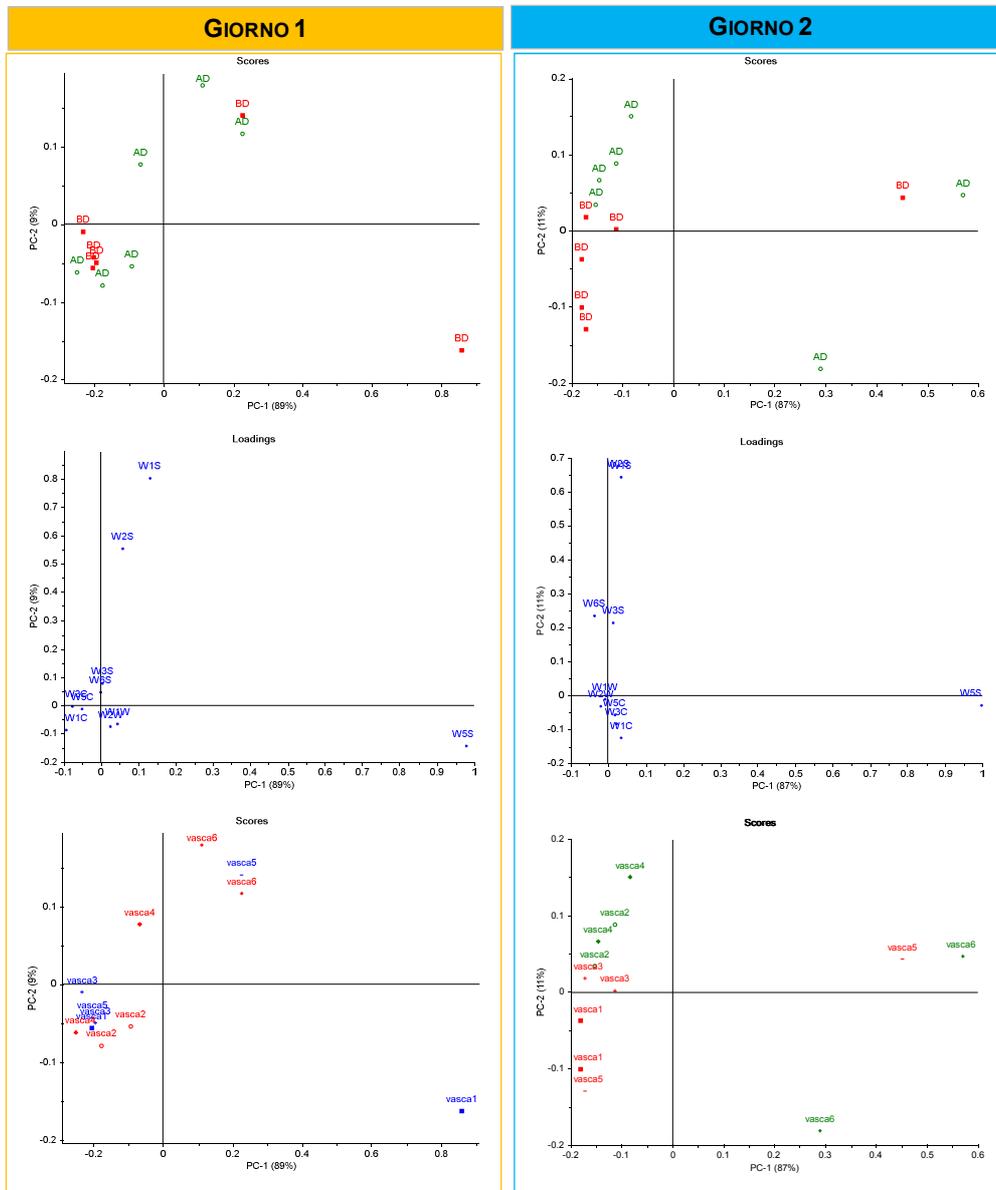
maggiori per i campioni provenienti dalla vasca 6 ad alta densità di allevamento e per uno proveniente dalla vasca 5 a bassa densità di allevamento.

Al secondo giorno la PC-1 oppone il sensore W5S a tutti gli altri, e separa i campioni provenienti dalla vasca 6 ad alta densità di allevamento e uno proveniente dalla vasca 5 a bassa densità di allevamento, che hanno valori positivi, da tutti gli altri, che presentano valori di PC-1 negativi.

Tabella WP6.12 - Risultati delle PCA condotte separatamente sui dati del giorno 1 e del giorno 2: pesi delle variabili delle prime due componenti e varianza spiegata.

variabile	giorno 1		giorno 2	
	PC-1	PC-2	PC-1	PC-2
W1C	-0.094	-0.088	0.034	-0.124
W5S	0.980	-0.145	0.997	-0.030
W3C	-0.076	-0.003	0.023	-0.085
W6S	0.000	0.046	-0.036	0.234
W5C	-0.050	-0.014	0.018	-0.058
W1S	0.131	0.804	0.035	0.644
W1W	0.044	-0.067	-0.008	-0.012
W2S	0.058	0.554	0.029	0.676
W2W	0.026	-0.075	-0.019	-0.031
W3S	0.004	0.077	0.014	0.213
varianza spiegata (%)	89.41	9.36	87.32	10.95
varianza totale spiegata	89.41	98.77	87.32	98.27

Figura 10. Confronto fra i grafici PC-1 vs PC-2 degli score e dei pesi delle variabili delle PCA del giorno 1 (sinistra) e del giorno 2 (destra).



La seconda componente principale oppone i sensori W1S e W2S (con maggior peso) e W3S e W6S a tutti gli altri sensori e separa la quasi totalità dei campioni in due gruppi: quelli ad alta densità (5 su 6) con valori positivi, da quelli a bassa densità. Probabilmente se l'intervallo tra i due giorni di analisi fosse stato maggiore, l'incidenza della modalità di allevamento sul pattern sensoristico sarebbe stata più chiara.

Analisi Discriminante

Sulla base dei risultati ottenuti per tutti i parametri considerati, sono stati sottoposti ad analisi discriminante lineare i dati dei filetti cotti relativi alla consistenza, ai parametri di colore L* e C*, alla risposta dei sensori W3S, W1S e W2S e ai rapporti R420/540 e

R470/420 dello spettro del colore considerando separatamente i giorni di conservazione a 4°C prima della cottura, ed adottando la modalità di allevamento come criterio di classificazione.

Nelle tabelle riportate in Figura 11 sono riportati i risultati dell'analisi discriminante condotta sui dati del giorno 1 e in quelle della Figura 12 i risultati dell'analisi discriminante condotta sui dati del giorno 2.

Figura 11. Analisi discriminante giorno 1: autovalori, correlazione canonica, P-value, coefficienti standardizzati della funzione D1 e matrice di confusione.

Discriminant Function	Eigenvalue	Relative Percentage	Canonical Correlation	
1	3.05897	100.00	0.86812	
Functions Derived	Wilks Lambda	Chi-Square	DF	P-Value
1	0.246368	8.4056	8	0.3949

Standardized Coefficients

	D1
L*	-1.91018
Consistenza	1.26614
C*	1.20045
W3S	1.15122
W1S	7.29279
W2S	-7.89625
R420/540	5.65814
R470/420	5.06016

Classification Table

Actual allevamento	Group Size	Predicted allevamento	
		AD	BD
AD	6	6 (100.00%)	0 (0.00%)
BD	6	0 (0.00%)	6 (100.00%)

Per entrambi i giorni le variabili che hanno maggior peso nella funzione discriminante sono W1S, W2S e R420/540. Al giorno 1 (Figura 11), il sensore W2S ha il peso maggiore, ed è opposto a W1S, R420/540, R470/420, W3S, C* e consistenza. Al giorno 2 (Figura 12) il sensore W1S ha il peso maggiore ed è opposto a L*, W3S e W2S.

Utilizzando le funzioni D1 (giorno1) e D2 (giorno2) per predire la modalità di allevamento dei campioni, si è ottenuto il 100% di predizioni corrette in entrambi i giorni.

Figura 12. Analisi discriminante giorno 2: autovalori, correlazione canonica, P-value, coefficienti standardizzati della funzione D2 e matrice di confusione.

Discriminant Function	Eigenvalue	Relative Percentage	Canonical Correlation
2	3.41573	100.00	0.87951

Functions Derived	Wilks Lambda	Chi-Square	DF	P-Value
2	0.226463	8.9110	8	0.3499

Standardized Coefficients

	D2
L*	1.29831
consistenza	-0.110096
C*	-0.892734
W3S	1.67997
W1S	-5.63786
W2S	4.29742
R420/540	-3.10061
R470/420	-2.42646

Classification Table

Actual allevamento	Group Size	Predicted allevamento	
		AD	BD
AD	6	6 (100.00%)	0 (0.00%)
BD	6	0 (0.00%)	6 (100.00%)

CONCLUSIONI

L'attività coordinata tra le varie Unità Operative ha rappresentato un importante momento di confronto sulle problematiche emerse dalle varie ricerche specifiche.

Dall'insieme quindi di questi risultati si può affermare che le due densità di allevamento sperimentate non hanno alterato lo stato morfologico dell'intestino e di conseguenza l'assorbimento delle sostanze nutritive, confermando in questo modo i dati relativi alle crescite ed ai parametri zootecnici registrati durante la sperimentazione.

le trote alimentate con l'alimento biologico non presentavano alcuna alterazione vuoi per effetto della formulazione alimentare vuoi per effetto di una corretta gestione. In altre sperimentazioni in condizioni simili a quelle produttive alcune alterazioni si presentavano con un numero di campioni inferiori alla presente sperimentazione. Dall'analisi autoptica anche lo stato dei fegati era ottimale rendendo superflua ogni altra analisi istologica.

I pesci, contrariamente alla maggior parte degli animali superiori, vivono e si muovono in un mezzo tridimensionale. Questo particolare mezzo è "vitale" per la loro sopravvivenza e per l'espressione della loro completa gamma di comportamenti naturali. Per questa ragione, il concetto di spazio minimo per i pesci risulta sicuramente più complesso rispetto agli animali terrestri e ciò rende ancor più delicate le implicazioni circa le densità di allevamento.

Inoltre, tra i pesci, esistono marcate differenze interspecifiche ed intraspecifiche in merito alle necessità di spazio e tolleranza della densità di allevamento.

In generale, le alte densità di allevamento portano ad un aumento dell'attività di nuoto e delle interazioni con gli altri pesci, il che comporta un incremento della spesa energetica fino a livelli che possono rivelarsi nocivi per i processi fisiologici. In particolar modo, una più elevata attività muscolare può risolversi in un più elevato consumo del metabolismo anaerobio. Questo, a sua volta, rappresenta l'energia di riserva impiegata per far fronte a situazioni di stress. Una minore disponibilità di queste riserve può essere causa di una riduzione delle capacità del pesce di reagire ad altri eventi di stress nel proprio ambiente. I fenomeni generalmente associati alle alte densità (diminuzione dei tassi di crescita, compromesso stato nutrizionale, incremento del tasso di conversione degli alimenti, erosione delle pinne e mortalità) sono causati dal deterioramento del comportamento (aumento di competizione, aggressione, danni fisici e cannibalismo) e della qualità dell'acqua.

Le prove di U_{crit} hanno confermato la descrizione della trota iridea come un buon nuotatore, in grado di raggiungere velocità fino a circa 1.28 m/s, in termini assoluti e 3.71 BL/s, in termini relativi. Anche per ciò che riguarda i risultati del consumo di ossigeno i valori di *standard metabolic rate* stimati nel presente lavoro sono compresi nel *range* dei valori riportati in letteratura per questa specie. Anche i valori di *active metabolic rate* stimati nel presente lavoro risultano compresi nel *range* dei valori riportati in letteratura per animali della stessa taglia.

E' stato possibile appurare che già dalle velocità di nuoto più basse la spinta propulsiva è sempre più sostenuta dal muscolo rosso il cui ruolo, all'aumentare della velocità, diventa sempre più determinante. L'intervento del muscolo bianco, in termini di attivazione, è lento e non raggiunge, comunque, elevati livelli di coinvolgimento nella

generazione della spinta, anche in prossimità dell' U_{crit} . La trota iridea appare, quindi, capace di affrontare il nuoto prolungato a velocità medio-basse, coinvolgendo maggiormente le fibre muscolari a contrazione lenta del muscolo rosso. Durante il nuoto, le fibre più profonde e più veloci sono sempre più coinvolte, così come dimostrato anche da Ellerby et al. (2001), ma non tanto da garantire una lunga resistenza in prossimità della velocità critica di nuoto.

La trota iridea si è, invece, confermata un nuotatore “generico” poiché non è specializzato né nel nuoto di resistenza né nel nuoto di accelerazione: espleta entrambi ragionevolmente bene.

I livelli medi di attività diurna, nelle due densità sperimentali, sono stati rispettivamente di 56.62 ± 0.083 e 65.30 ± 0.098 , per la bassa e l'alta densità. Sebbene essi siano risultati significativamente differenti nelle due densità, corrispondono a livelli di consumo di ossigeno pari a 334.3 e 392.2 $mgO_2/kg/h$. Tali livelli di richiesta energetica sono abbondantemente al di sotto della soglia critica, identificata con il SFA (549.03 $mgO_2/kg/h$). Questo dato fa intendere che, sebbene siano state riscontrate significative differenze tra i gruppi sperimentali in termini di richiesta di ossigeno e di attività muscolare, le densità raggiunte sono tali da non generare condizioni critiche per il benessere e la sopravvivenza della specie in allevamento. Viene, anzi, garantito un ampio margine di energia per il resto delle funzioni vitali non basali: riproduzione, crescita, difesa da stress di vario tipo.

Per quanto riguarda le analisi dei parametri ematologici, i risultati non mostrano evidenti differenze tra gli effetti causati dalla densità sui due gruppi sperimentali. Infatti, per la maggior parte dei parametri analizzati si riscontra, sia nel gruppo a bassa densità che nel gruppo ad alta densità, un significativo aumento dei valori dall'inizio della prova alla sua conclusione. Gli unici valori a non seguire questo andamento sono stati il lattato e il cortisolo, infatti, nel gruppo a bassa densità non è stata osservata alcuna variazione significativa nel tempo. Anche dal confronto dei risultati ottenuti alla fine del trattamento tra i due gruppi sperimentali non si sono evidenziate differenze significative se non nell'ematocrito e nella conta eritrocitaria, in cui si osservano valori più bassi nel gruppo ad alta densità.

Le variazioni di ematocrito spesso riflettono un abbassamento della disponibilità di ossigeno o della qualità dell'acqua ed intervengono come strategia per contrastare questi fattori di stress: interviene il rilascio di epinefrina (catecolamina) al quale seguono contrazioni della milza, determinando un maggiore rilascio nel circolo ematico di eritrociti immaturi, di solito più efficienti nel trasporto di ossigeno. L'incremento dell'ematocrito è accompagnato dall'aumento della viscosità del sangue che, in ultima analisi, può causare un aumento dello sforzo cardiaco. Le variazioni di Hct osservate nei due gruppi sperimentali sono state accompagnate dal significativo aumento della conta eritrocitaria, che, comunque, è rimasta entro i livelli fisiologici.

I pesci hanno manifestato una risposta positiva alle condizioni sperimentali. L'aumento delle densità (forse non sostanzialmente differenti tra di loro), probabilmente anche taglia-dipendente, ha stimolato nei due gruppi delle risposte fisiologiche tali da permettere il completo adattamento degli individui senza un eccessivo dispendio di energia metabolica. Infatti, proprio l'incremento dei valori plasmatici di lisozima (Mock and Peters, 1990) dimostra come la risposta fisiologica sia stata orientata verso la compensazione e non ha raggiunto la condizione di deterioramento del benessere, e quindi della stessa risposta fisiologica di adattamento.

I valori delle misure ottenuti nell'impianto friulano non si sono discostate da quanto previsto con le prime determinazioni e ovviamente i valori più alti si riscontrano nelle vasche a maggior densità: 0,250 ppm contro 0,344ppm: con oscillazioni a seconda delle ore del giorno tra un minimo di 0,169 ppm ed un massimo di 0,348 ppm per la bassa densità e un minimo di 0,331 ppm ed un massimo di 0,356 ppm per la massima densità. Nella situazione sperimentale dell'impianto l'azoto cresce dalle prime ore di luce dal minimo notturno, quando i pesci sono al minimo dell'attività, per giungere ad un massimo attorno alle 17. In questa condizione sperimentale si sono registrati un valor minimo a 0,35 ppm per la bassa densità e poco sotto gli 0,50 ppm per l'alta densità; con picchi sempre attorno alle 17 con valori che vanno dagli 0,75 ppm per la bassa Densità e gli 0,80 per l'alta densità.

Il fosforo ha variazioni più contenute, in impianto supera in un solo caso e sia pur di poco gli 0,12 ppm con il picco che si verifica tra 3 e le 4 ore dopo il pasto; poi cala rapidamente. Il fosforo, al contrario non segue lo stesso andamento non manifestando nelle vasche dell'impianto un incremento apprezzabile.

Dai risultati ottenuti é emerso come non sia significativo l'effetto della densità, comunque bassa, scelta per l'allevamento delle trote, sulla loro qualità chimico-nutrizionale. E' evidente invece il ruolo del mangime nel determinare la qualità nutrizionale del pesce in particolare influenzando il livello di acidi grassi polinsaturi n-3. Tali acidi grassi entrano nella costituzione delle nostre membrane cellulari, sono essenziali per lo sviluppo cerebrale e della retina, ma soprattutto sono precursori di eicosanoidi (prostaglandine, trombossani, leucotrieni) che migliorano la fluidità del sangue prevenendo la formazione di trombi, hanno importanti funzioni nelle reazioni infiammatorie ed in numerose altre funzioni.

Per la sostenibilità del sistema produttivo, la ricerca nel settore mangimistico si è sempre di più spostata verso formulazioni a basso impatto ambientale dove si valuta sempre di più la sostituzione di parte della farina di pesce e olio di pesce, elementi base dei mangimi per l'acquacoltura, con farine ed oli vegetali. Risulta quindi importante l'approfondimento delle attuali conoscenze sull'impiego di fonti lipidiche e proteiche alternative non limitandosi solamente agli aspetti zootecnici ma anche studiando i possibili riflessi che questo impiego pone nei riguardi dello stato di salute, resistenza agli stress ambientali, qualità nutrizionale ed organolettica del prodotto.

Prolungando il tempo di conservazione a 4°C prima della cottura si osserva una diminuzione significativa della risposta dei sensori più affini ai composti aromatici, a composti aromatici alifatici e metano alifatici W3S, e un aumento significativo delle risposte dei sensori di più ampio spettro quali metano, alcool e composti sulfurei clorurati. Questa evoluzione del pattern sensoristico è consistente con l'evoluzione dei composti volatili legati alla freschezza del pesce riportati in letteratura. Più precisamente è riportato che nei primi 3-4 giorni, quando comunque i pesci sono giudicati dal punto di vista organolettico con odore di pesce fresco, si assiste ad un notevole incremento di "fresh fish alcohols" accoppiato ad una diminuzione di "fresh fish carbonyls".

La modalità di allevamento ha influenzato la risposta dei sensori metano, alcool e metano alifatici. Infatti i pesci allevati a Bassa Densità erano caratterizzati da risposte

minori di questi sensori, rispetto a quelli tenuti ad Alta Densità, anche se la differenza è risultata statisticamente significativa solo per il sensore per i metao alifatici
I risultati indicano che al primo giorno non esiste una chiara differenza nel pattern sensoristico tra i due sistemi di allevamento.

BIBLIOGRAFIA

Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19, 716–723.

Alsop, D. H. and Wood, C. M. (1997). The interactive effects of feeding and exercise on oxygen consumption, swimming performance and protein usage in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology* 200, 2337-2346.

Amundsen P.A., Knudsen R., Klemetsen A. (2007). Intraspecific competition and density dependence of food consumption and growth in Arctic charr. *J. Anim. Ecol* 76(1), 149-158.

Andrew, J. E., Noble, C., Kadri, S. et al. (2002). The effect of demand feeding on swimming speed and feeding responses in Atlantic salmon *Salmo solar* L., gilthead sea bream *Sparus aurata* L. and European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. in sea cages. *Aquaculture Research* 33, 501-507.

AOAC (1990) Official Methods of Analysis. 15th ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.

Atamanalp, M., Angis, S., Oguzhan, P. et al. (2008). Alterations in Hematological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to DDVP. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 60, 9-12.

Atamanalp, M., Kocaman, E. M., Ucar, A. et al. (2011). The alterations in the hematological parameters of brown trout *Salmo trutta fario*, exposed to cobalt chloride. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9, 2167-2170.

Audet, C., Besner, M., Munro, J. et al. (1993). Seasonal and diel variations of various blood parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). *Canadian Journal of Zoology* 71, 611-618.

Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrated and Comparative Biology* 42, 517-525.

Beamish, F. W. H. (1978). Swimming Capacity. In *Fish physiology*. Hoar, WS. and Randall, DJ. 101–187.

Beaumont, M. W., Butler, P. J. and Taylor, E. W. (2003). Exposure of brown trout *Salmo trutta* to a sub-lethal concentration of copper and soft-acidic water: effects upon gas exchange and ammonia accumulation. *The Journal of Experimental Biology* 206, 153-162.

Bégout Anras, M.-L., LagardèreE, J. P. (2004). Measuring cultured fish swimming behaviour: first results on rainbow trout using acoustic telemetry in tanks. *Aquaculture* 240, 175-186.

- Benfey, T. J. and Biron, M. (2000). Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* 184, 167-176.
- Berrill I.K. and I. D. McCarthy (2000) The growth of a Welsh strain of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) and investigations into its aquaculture potential.
- Black, E. C., Connor, AR., Lam, K. et al. (1962). Changes in glycogen, pyruvate and lactate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during and following muscular activity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 19(3), 409-436.
- Blažka, P., Volf, M. and Cepela, M. (1960). A new type of respirometer for the determination of the metabolism of fish in an active state. *Physiologia Bohemoslovaca* 9, 553-558.
- Bleau, H., Daniel, C., Chevalier, G. et al. (1996). Effects of acute exposure to mercury chloride and methylmercury on plasma cortisol, T3, T4, glucose and liver glycogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 34, 221-235.
- Bligh EG, Dyer WJ: (1959). A rapid method of total lipid extraction. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
- Bone, Q. (1966). On the function of the two types of myotomal muscle fibres in elasmobranchs fish. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 46, 321-354.
- Brännäs, E. & Linnér, J. (2000). Growth effects in Arctic charr reared in cold water: Feed frequency, access to bottom feeding and stocking density. *Aquaculture International* 8, 381-389
- Brett, J. R. (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journal of Fisheries Research* 21, 1183-1226.
- Brett, J. R. (1972). The metabolic demand for oxygen in fish, particularly salmonids, and a comparison with other vertebrates. *Respiration Physiology* 14, 151-170.
- Briggs, C. T. and Post, J. R. (1996). In situ activity metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): estimates obtained from telemetry of axial musculature. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 859-866.
- Burgetz, I. J., Rojas-Vargas, A., Hinch, S. G. et al. (1998). Initial recruitment of anaerobic metabolism during sub-maximal swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology* 201, 2711-2721.
- Carbonara, P. L., Scolamacchia, M., Spedicato, M. T. et al. (2008). Muscle activity as a potential indicator of welfare in farmed european sea bass: results from an

electromyographic (emg) telemetry study. IFOAM conference on organic aquaculture. Cattolica – Italy. Edited by ICEA , 20-24.

Carter C., D. Houlian, A. Kiessling. F. Medale and M. Jobling (2001). Physiological effects of Feeding. Cap. 13 297-331 In D. Houlian, T. Boujard % M. Joblin ed Food Intake in Fish . Cost action 827. Blackwell Science 418 pp.

Cejas JR, Almansa E, Tejera N, Jerez S, Bolanos A, Lorenzo A. : Effect of dietary supplementation with shrimp on skin pigmentation and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) alevins. *Aquaculture* 218, 457- 469. (2003).

Chandroo, K P., Cooke, S. J., Mckinley, R. S. et al. (2005). Use of electromyogram telemetry to assess the behavioural and energetic responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to transportation stress. *Aquaculture Research* 36, 1226-1238.

Conte, F. S. (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science* 86, 205-223.

Cooke, S. J., Chandroo, K. P., Beddow, T. A. et al. (2000). Swimming activity and energetic expenditure of captive rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), estimated by electromyogram telemetry. *Aquaculture Research* 31, 495-506.

Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M. G. et al. (2008). Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture* 275, 319-328.

DingsØr, G. E., Ciannelli, L., Chan, K. et al. (2007). Density dependence and density independence during the early life stage of four marine fish stocks. *Ecology* 88, 625–634.

Docan, A., Cristea, V. and Dediu, L. (2011). Influence of thermal stress on the hematological profile of *Oncorhynchus mykiss* held in different stocking densities in recirculating aquaculture systems. *Lucrări Științifice-Seria Zootehnie* 55, 267.

Dosdat, A., Sevais, F., Métailler, R., Huelvan, C. And E. Desbruyères (1996). Comparison of nitrogenous losses in five teleost fish species. *Aquaculture* 141, 107-127.

The EFSA (2008). Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed Trout
EFSA Journal 796, 1-22

Ellerby, D. (2008). Integrating metabolic cost and muscle mechanical performance in swimming fish. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 150, S65-S65.

Ellerby, D., Altringham, J. D., Williams, T. et al. (2001). Slow muscle function of pacific bonito (*Sarda chiliensis*) during steady swimming. *The Journal of Experimental Biology* 203, 2001-2013.

Ellis, T., Scott, A. P., Bromage, N. et al. (2001). What is stocking density?. Trout News 32, 35-37.

Ellis T. and Denis Glasscock eds. (2004). Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science. CEFAS is an Executive Agency the Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra), 55 pp

Epler P, Ostaszewska T, Sokołowska-Mikołajczyk M, Nowak M (2009) Effect of feeding carp with fat-supplemented pelleted diets on histological appearance of the intestine and hepatopancreas. AACL Bioflux 2:285-292.

Fanouraki, E., Papandroulakis, N., Ellis, T. et al. (2008). Water cortisol is a reliable indicator of stress in European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Behaviour 145, 1267-1281.

Farrell, A. P., Gamper, K. and Birthwell, I K. (1998). Prolonged swimming, recovery and repeat swimming performance of mature sockeye salmon *Onchorhynchus nerka* exposed to moderate hypoxia and pentachlorophenol. The Journal of Experimental Biology 201, 2183-2193.

Farrell, A. P., Johansen, J. A., Steffensen, J. F. et al. (1990). Effects of exercise training and coronary ablation on swimming performance, heart size, and cardiac enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Canadian Journal of Zoology 68, 1174-1179.

Fry, F. E. J. The effect of environmental factors on the physiology of fish. In *Fish physiology, vol. vi*. Hoar, WS. and Randall, DJ.. 1971. 1-99.

FSBI (2002). Fish welfare. Briefing paper 2. , 27 pp.

Gallaughier, P., Axelsson, M. et al. (1992). Swimming performance and haematological variables in splenectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. The Journal of Experimental Biology 171, 301-314.

Ghittino, P. (1985). Tecnologia e patologia in acquacoltura. Patologia 2.

Gholipour kanani, H., Mirzargar, S. S., Soltani, M. et al. (2011). Anesthetic effect of tricaine methanesulfonate, clove oil and electroanesthesia on lysozyme activity of *Oncorhynchus mykiss*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 10, 393-402.

Goolish, E. M. (1991). Aerobic and anaerobic scaling in fish. Biological Reviews 66, 33-56.

Gregory, R. T. and Wood, C. M. (1999). The effects of chronic plasma cortisol elevation on feeding behaviour, growth, competitive ability and swimming performance of juvenile rainbow trout. Physiological and Biochemical Zoology 72, 286-295.

Hall POJ, Holby O., Kollberg S., Samuelson MO (1992). Chemical fluxes and mass balance in a marine fish cage farm. IV Nitrogen. Marine ecology Progress Series, 61, 61-73. . Citato in S.M.

Stead and L. Laird (2001). Handbook of Salmon Farming.501pp.

Hammer, C. (1995). Fatigue and exercise test with fish. Comparative Biochemistry and Physiology (A) 112, 1-20.

Hendricks, L. J. (1952). Erythrocytes counts and haemoglobin determinations for two species of suckers, genus *Catostomas*, from Colorado. Copeia 4, 265–266.

Holby O., Hall POJ (1992). Chemical fluxes and mass balance in a marine fish cage farm . II Phosphorus. Marine ecology Progress Series, 70, 263-272. Citato in S.M. Stead and L. Laird (2001). Handbook of Salmon Farming.501pp.

Holloway, A. C., Keene, J. L., Noakes, D. G. et al. (2004). Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*,Walbaum. Aquaculture Research 35, 1025-1030.

Houston, A., Dobric, N. and Kahurananga, R. (1996). The nature of hematological response in fish. Fish Physiology and Biochemistry 15, 339-347.

Itazawa, Y. and Oikawa, S. (1983). Metabolic rates in excised tissues of carp. Cellular and Molecular Life Sciences 39, 160-161.

Iwama, G. K., Afonso, L. O. B., Todgham, A. et al. (2004). Are hsps suitable for indicating stressed states in fish?. The Journal of Experimental Biology 207, 15-19.

Jain, K. E., Birtwell, I. K. and Farrell, A. P. (1998). Repeat swimming performance of mature sockeye salmon following a brief recovery period: a proposed measure of fish health and water quality. Canadian Journal of Zoology 76, 1488-1496.

Jain, K. E., Hamilton, J. C. and Farrell, A. P. (1997). Use of a ramp velocity test to measure critical swimming speed in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology 117, 441-444.

Jobling, M., Tveiten, H. & Hatlen, B. (1998). Cultivation of Arctic charr: an update. Aquaculture International 6, 181-196.

Jobling, M., Jørgensen, E. H., Christiansen, J. S., Arnesen, A. M. & Palsson, J. Ø.(1992). Investigation of growth requirements and aquaculture potential of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Icelandic Agricultural Science 6, 47-62

Jobling, M., Jørgensen, E.H., Arnesen, A.M. and Ringø, E. (1993) Feeding, growth, and environmental requirements of Arctic charr: a review of aquaculture potential. Aquaculture International 1, 20-46.

- Jobling M. 1981. Feeding, growth and environmental requirements of Arctic charr: a review of aquaculture potential. *J. Fish Biol.*, 19,439-455
- Johnston, I. A. (1980). Specialization in fish muscle. In *Development and specialization of muscle*. Goldspink, DF.
- Johnston, G. (2002) Arctic Charr Aquaculture. Fishing News Books, Oxford.
- Jørgensen, E.H., Christiansen, J.S., and Jobling, M. (1993). Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) Aquaculture, 110: 191-204.
- Kiceniuk, J. W. and Jones, D. R. (1977). The oxygen transport system in trout (*Salmo gairdneri*) during sustained exercise. *Journal of Experimental Biology* 69, 247-260.
- Kinsella JE, Shimp JL, Mai J, Weihrauch J (1997). Fatty acid content and composition of freshwater finfish. *J Am Oil Chem Soc* 54, 424-429.
- Kolios, P., Kiritsis, S. and Katribusas, N. (1997). Larval-rearing and growout of the red porgy (*Pagrus pagrus*) in the Riopesca hatchery (Greece). *Hydrobiologia* 358, 321–325.
- Kolok, A. S. (1999). Interindividual variation in the prolonged locomotor performance of ectothermic vertebrates: a comparison of fish and erpetofaunal methodologies and a brief review of the recent fish literature. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 700-710.
- Koumoundouros, G., Sfakianakis, D. G., Divanach, P. et al. (2002). Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles. *Journal of Fish Biology* 60, 923-932.
- Kristiansen, T. S., Ferno, A., Holm, J. C. et al. (2004). Swimming behaviour as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities. *Aquaculture* 230, 137-151.
- Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A.M., Røed, K.H. & Baeverfjord, G. (2000) Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquacult. Nutr.*, 6, 77-84.
- Lembo, G., Carbonara, P., Scolamacchia, M. et al. (2007). Use of muscle activity indices as a relative measure of well-being in cultured sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Hydrobiologia* 582, 271-280.
- Lupi, P., Vigiani, V., Mecatti, M. et al. (2005). First haematic results for the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) metabolic profile assessment. *Italian Journal of Animal Sciences* 4, 167-176.

Martins, C., Galhardo, L., Noble, C. et al. (2012). Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 17-41.

Massee, K. C., Rust, M. B., Hardy, R. W. et al. (1995). The effectiveness of tricaine, quinaldine sulfate and metomidate as anesthetics for larval fish. *Aquaculture* 134, 351-359.

Mazur C. F., Iwama G. K., (1993). Effect of handling and stocking density on hematocrit, plasma cortisol, and survival in wild and hatchery-reared chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aquaculture* 117:141-147.

McFarlane, W. J., Cubitt, K. F., Williams, H. et al. (2004). Can feeding status and stress level be assessed by analyzing pattern of muscle activity in free swimming rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)? *Aquaculture* 239, 467-484.

McKenzie, D. J., Hoglund, E., Dupont-Prinet, A. et al. (2012). Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. *Aquaculture* 338-341, 216-222.

McKenzie, D. J., Pedersen, P. B. and Jokumsen, A. (2007). Aspects of respiratory physiology and energetics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) families with different size-at-age and condition factor. *Aquaculture* 263, 280-294.

Meka, J. M. and McCormick, S. D. (2005). Physiological response of wild rainbow trout to angling: impact of angling duration, fish size, body condition, and temperature. *Fisheries Research* 72, 311-322.

Miller, S. A., Wagner, E. J. and Bosakowski, T. (1995). Performance and oxygen consumption of rainbow trout reared at two densities in raceways with oxygen supplementation. *The Progressive Fish-Culturist* 57, 206-212.

Milligan, C. (1996). Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 113, 51-60.

Mock, A. and Peters, G. (1990). Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. *Journal of Fish Biology* 37, 873-885.

Molony, B. (2001). Environmental requirements and tolerances of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown trout (*Salmo trutta*) with special reference to Western Australia: A review. *Fisheries Research Report* 130, 1-28.

Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. and Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.

Mourente G, Gordon Bell J, Tocher DG. (2007). Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? *Fish Physiol Biochem* 33, 269-280.

Nelson, J. A., Tang, Y. and Boutilier, R. G. (1996). The effects of salinity change on the exercise performance of two atlantic cod (*Gadus morhua*) populations inhabiting different environments. *The Journal of Experimental Biology* 199, 1295-1309.

Orban E, Di Lena G, Ricelli A, Paoletti F, Casini I, Gambelli L, Caproni R (2000). Quality characteristics of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) from different intensive rearing systems. *Food Chemistry* 70, 27-32.

Orban E, Di Lena G, Nevigato T, Casini I, Caproni R, Santaroni G, Giulini G. (2007). Nutritional and commercial quality of the clam *Chamelea gallina* from the Adriatic Sea. *Food Chemistry* 101, 1063-1070.

Ostaszewska T, Dabrowski K, Palacios ME, Olejniczak M, Wiczorek M (2005) Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. *Aquaculture* 245:273-286.

Papoutsoglou, S. E., Tziha, G., Vrettos, X. et al. (1998). Effects of stocking density on behaviour and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. *Aquacultural Engineering* 18, 135-144.

Person-Le Ruyet, J., Labbé, L., Le Bayon, N. et al. (2008). Combined effects of water quality and stocking density on welfare and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Living Resources* 21, 185-195.

Pickering, A. D., Pottinger, T. G., Sumpter, J. P. et al. (1991). Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 83, 86-93.

Plaut, I. (2001). Critical swimming performance: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 131, 41-50.

Pottinger, T. and Carrick, T. (1999). Modification of the Plasma Cortisol Response to Stress in Rainbow Trout by Selective Breeding. *General and Comparative Endocrinology* 116, 122-132.

Rašković BS, Stanković MB, Marković ZZ, Poleksić VD (2011) Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *J Agric Sci* 56:87-100.

Refstie, S., Korsøen, Ø. J., Storebakken, T., Baeverfjord, G., Lein, I. & Roem, A. J. (2000) Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 190, 49-63.

Reid, S. G., Bernier, N. J. and Perry, S. F. (1998). The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 120C, 1.27.

Roche, H. and Bogè, G. (1996). Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research* 41, 27-43.

Rome, L. C., Funke, R. P., McNeill Alexander, R. et al. (1988). Why animals have different muscle fibre types. *Nature* 335, 824-827.

Ruane, N M., Nolan, D. T., Rotlland, J. et al. (2000). Experimental exposure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to the infective stages of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) influences the physiological response to an acute stressor. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 451-463.

Saldeen, K. and Saldeen, T. (2005). Importance of tocopherols beyond alfa- tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutrition Research*, 25, 877-889.

Santulli, A., Modica, A., Messina, L. et al. (1999). Biochemical responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) to the stress induced by off shore experimental seismic prospecting. *Marine Pollution Bulletin* 38, 1105-1114.

Shingles, A., McKenzie, D. J., Taylor, E. W. et al. (2001). Effects of sublethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology* 204, 2691-2698.

Skov, P. V., Larsen, B. K., Frisk, M. et al. (2011). Effects of rearing density and water current on the respiratory physiology and haematology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* at high temperature. *Aquaculture* 319, 446-452.

Siikavuopio, S.I. and Jobling, M. (1995) The effects of stocking density on survival and growth of wild-caught Arctic charr. *Nordic Journal of Freshwater Research* 71, 419-423.

Sirakov I. and E. Ivancheva (2008). Influence of stocking density on the growth performance of rainbow trout and brown trout grown in recirculation system. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 14 (No 2) 2008, 150-154

Smit, H., Amelik-Koutstaal, J. M., Vijverberg, J. et al. (1971). Oxygen consumption and swimming efficiency of swimming goldfish. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 39, 1-28.

Smit, H., Amelink-Koutstaal, J., Vijverberg, J. et al. (1971). Oxygen consumption and efficiency of swimming goldfish. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 39, 1-28.

Soengas, J. L. and Aldegunde, M. (2002). Brain glucose and insulin: effects on food intake and brain biogenic amines of rainbow trout . *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 190, 641-649.

Steffensen, J. F. (1989). Some errors in respirometry of aquatic breathers: how to avoid and correct for them. *Journal of Fish Physiology and Biochemistry* 6, 49-59.

Stevenson P. (2007). Closed waters: the welfare of farmed atlantic salmon, rainbow trout, atlantic cod & atlantic halibut. CIWF Report . Density farm animal welfare. WSPA. 80pp

Sutton, J., Balfry, S., Higgs, D. et al. (2006). Impact of iron-catalyzed dietary lipid peroxidation on growth performance, general health and flesh proximate and fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) reared in seawater. *Aquaculture* 257, 534-557.

Svobodová, Z., Pravda, D. and Paláčková, J. (1991). Unified methods of haematological examination of fish. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology.

Tierney, K. B. and Farrell, A. P. (2004). The relationships between fish health, metabolic rate, swimming performance and recovery in return-run sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 27, 663-671.

Tubío, R. I. C., Pérez-Maceira, J. and Aldegunde, M. (2010). Homeostasis of glucose in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): the role of serotonin. *The Journal of Experimental Biology* 213, 1813-1821.

Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E. L. et al. (2002). Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depress peritoneal leucocyte cytotoxicity. *Aquaculture* 210, 231-243.

Wagner, G. N., Balfry, S. K., Higgs, D. A. et al. (2004). Dietary fatty acids composition affects the repeat swimming performance of Atlantic Salmon in seawater. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 137, 567-576.

Wandsvik (1983) and Tabachek (1984). The diet by Jobling and Wandsvik (1983). C.D. Webster, in: Chhorn Lim (2002) *Nature* - 418 pagine Among the first practical diets tested for Arctic char were those of Jobling

WEBB, P. W. (1971). The Swimming Energetics of Trout: I. Thrust and power output at cruising speeds. *The Journal of Experimental Biology* 55, 489-520.

Webb, P. W. (1978). Sprint performance and body form in seven species of teleost fish. *The Journal of Experimental Biology* 74, 211–226.

Webb, P. W. (1984). Body form, locomotion and foraging in aquatic vertebrates. *American Zoologist* 24, 107-120.

Wells, R. M. G. and Weber, R E. (1991). Is there an optimal haematocrit for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)? An interpretation of recent data based on blood viscosity measurements . *Journal Of Fish Biology* 38, 53.65.

Wilson, R. and Egginton, S. (1994). Assessment of maximum sustainable swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 192, 299-305.

Wood, A. W., Johnston, B. D., Farrell, A. P. et al. (1996). Effects of didecyl-dimethylammonium chloride (DDAC) on the swimming performance, gill morphology, disease resistance, and biochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 2424-2432.

Siti internet

Bjørn-Steinar Sæther og Sten Ivar Siikavuopio
www.northcharr.eu/.../water_quality_handling...
Water quality requirement and holding conditions of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) under intensive fish farming conditions.

*Gandolfi G.(2005)
Multidisciplinary approach to the study of human impact on vertebrate populations
www.ricercitaliana.it/.../unita_op_en-2005054... Open questions concerning the taxonomy and zoo-geography of Arctic charr ... to the characterization of Mediterranean strains of brown trout

*Kummer Helmut (helmut@edv1.boku.ac.at) AquaFlow Technical Leaflets
www.aquamedia.org/.../afshowarticle_en.asp?...
Improved Arctic Charr farming through strain selection - Comparison of Austrian strains from the

Mocanu M., V. Cristea, L. Dediu, D. Desimira, A. Docan, T. Ionescu (2008?)
The Influence of Different Stocking Densities on growth performances of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) in a recirculating aquaculture system
www.univagro-iasi.ro/.../Mirela_Mocanu.pdf

Molleda Mercedes Isla (2007). www.unuftp.is/static/.../mercedes07prf.pdf Simili
Water quality in recirculating Aquaculture Systems (Ras) for Arctic Charr (*Salvelinus Alpinus* L.) culture. United Nations University – Fishery training Programme, Holar University College 48 pp

*sciencealerts.com/.../Maturation_gro...
Maturation, growth and fecundity of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), life-history variants co-existing in lake systems of Southern Baffin Island, Nunavut, Canada

Woods P. (2001).
gradworks.umi.com/35/01/3501703.html Copia cache
Ecological diversity in the polymorphic fish arctic charr (*Salvelinus alpinus*)
A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of PhD, Washington University, School of Aquatic and Fishery Sciences.

