

Il benessere dei pesci in allevamento

INTRODUZIONE

Nel corso degli anni, lo studio del benessere animale ha assunto un significato sempre più importante, non solo per motivi etici, ma anche perché paradigmatico della qualità dell'ambiente e, più in generale, delle condizioni vitali in cui gli animali sono mantenuti. Per il pesce in allevamento il livello di benessere è direttamente correlato alla qualità della produzione, poiché ha un'influenza anche sui tassi di crescita e di conversione alimentare (FSBI, 2002). Le potenziali condizioni di sofferenza degli animali in allevamento, sia terrestri che acquatici (Ellis et al., 2002), sono state definite in base alla loro capacità di violare una delle cinque libertà del benessere animale (FAWC, 1979): (1) libertà dalla fame, dalla sete e dalla cattiva nutrizione; (2) libertà di avere un ambiente fisico adeguato; (3) libertà da ingiurie, malattie, ferite e traumi; (4) libertà di manifestare le normali caratteristiche comportamentali specie-specifiche; (5) libertà dalla paura. Alla base di questo schema vi è il riconoscimento della complessità del benessere animale, che può essere descritto attraverso diverse componenti fisiologiche e comportamentali. Un corollario di questo concetto è rappresentato dall'idea che solo la combinazione di diversi indicatori può contribuire a una più accurata valutazione dello stato di benessere (FSBI, 2002).

Opinione comune è che lo stress, di per sé, sia nocivo per gli esseri viventi. Il concetto di stress, infatti, è di frequente associato a un sistema messo in crisi, affaticato o addirittura malato. In realtà la risposta allo stress è una funzione normale ed essenziale per tutti gli organismi viventi (Iwama et al.,

* COISPA Tecnologia & Ricerca

2004), poiché è un meccanismo adattativo che consente, nello specifico a un pesce, di far fronte, mediante un complesso insieme di reazioni, agli stimoli destabilizzanti il normale equilibrio omeostatico del proprio organismo (Chrousos, 1998).

I pesci sono soggetti ad agenti di stress anche in natura. Le cause possono essere numerose e, in buona parte, riconducibili al sempre più significativo impatto che le attività antropiche hanno sugli ecosistemi naturali.

In condizioni di allevamento i fattori stressanti possono derivare, invece, dalla manipolazione, dal trasporto, dai livelli di densità (Vazzana et al., 2002), dalla presenza di parassiti (Grutter e Pankhurst, 2000).

Il grado di alterazione a carico dell'organismo è strettamente correlato all'intensità e alla durata dello stimolo stressante, nonché al grado d'importanza che il modulo comportamentale modificato riveste per la sopravvivenza (Schreck et al., 1997).

Le variazioni comportamentali sono in realtà riflessi dell'alterazione dello stato fisiologico dell'animale. Si possono distinguere tre differenti tipi di risposte fisiologiche, anche a livello temporale: una primaria, una secondaria e una terziaria (Iwama et al., 2004). Quando il pesce percepisce una variazione nell'ambiente circostante sopraggiungono repentini cambiamenti che inducono una rapida reazione neuro-endocrina. Questa implica l'immediato rilascio nel circolo ematico degli ormoni dello stress: le catecolamine e il cortisolo. Il rilascio delle catecolamine, nei pesci, è estremamente rapido, tanto da poterne osservare, a seguito di un qualsiasi evento stressante, un immediato aumento a livello plasmatico (Randall e Perry, 1992; Reid et al., 1998; Mommsen et al., 1999; Barton, 2002). Contemporaneamente alla produzione e al rilascio delle catecolamine si attiva l'asse HPI (ipotalamico-pituitario-interrenale) e a seguito dell'azione del CRH (ormone di rilascio delle corticotropine) si ha il successivo rilascio di cortisolo. Il rilascio di questo ormone, secreto dal tessuto interrenale, omologo della corteccia surrenale dei mammiferi (Mommsen et al., 1999), richiede un intervallo di tempo maggiore rispetto alle catecolamine (nell'ordine di alcuni minuti) (Barton, 2002) ed è regolato da un meccanismo di feedback negativo, attuato dallo stesso ormone a tutti i livelli dell'asse HPI (Barton, 2002).

Gli elevati livelli di cortisolo provocano una serie di eventi biochimici e fisiologici a cascata con cambiamenti a livello metabolico e della funzione immunitaria. L'azione del cortisolo si manifesta soprattutto con l'incremento della produzione di glucosio e del suo rilascio a livello plasmatico (Iwama et al., 2004). Per questa ragione, la concentrazione di glucosio è spesso utilizzata come indicatore della risposta secondaria (metabolica) associata a stati di

stress (Barton, 2002). Infatti, il cortisolo ha, in genere, un effetto iperglicemico, primariamente come risultato dell'aumento della gluconeogenesi e della glicogenolisi a livello epatico.

Le risposte di tipo terziario intervengono per far fronte a stress più o meno prolungati o ripetuti (Schreck, 2000). Tali risposte coinvolgono l'organismo nel suo complesso, inficiandone attività e prestazioni. Tra le conseguenze più rilevanti si riportano: cambiamenti nei tassi di crescita, minore resistenza alle malattie, variazioni del *metabolic scope for activity* (Fry, 1971) (la differenza fra massimo tasso metabolico e metabolismo basale), modificazioni del comportamento e, in ultimo, anche la morte (Wedemeyer e McLeay, 1981; Wedemeyer et al., 1990).

PERFORMANCE DI NUOTO E BENESSERE

Tra le varie risposte allo stress che i pesci possono manifestare, i cambiamenti a livello dell'attività di nuoto hanno senz'altro suscitato notevole interesse scientifico (Nelson et al., 1996; Wood et al., 1996; Alsop e Wood, 1997; Koumoundouros et al., 2002). Infatti, il nuoto è, insieme ad altre funzioni di base, fondamentale per tutte le attività vitali del pesce, dalla ricerca del cibo e del partner, alla fuga dai predatori e dalle situazioni di pericolo.

Molti Autori, fin dagli anni '20, si sono dedicati allo studio del nuoto dei pesci sotto un profilo sia biologico, sia fisiologico (Beamish, 1978; Brett, 1964; Hammer, 1995). Le modalità e le attività di nuoto sono dipendenti da caratteri specie-specifici, quali ad esempio la forma del corpo e delle pinne (Webb, 1984; Wardle et al., 1995), lo stato ontogenetico e la taglia (Hale, 1999; Georgalas et al., 2006), lo stadio di maturità sessuale dell'individuo (Quintella et al., 2004).

I meccanismi biochimici e fisiologici che forniscono l'energia necessaria per sostenere il nuoto nei salmonidi sono stati ampiamente studiati così come i diversi livelli che caratterizzano l'attività di nuoto. I differenti tipi di nuoto nei pesci sono stati classificati da Beamish (1978) come: nuoto prolungato, nuoto sostenuto e nuoto esplosivo. Nello specifico, il nuoto prolungato è caratterizzato dal mantenimento di una velocità costante per periodi di tempo prolungati (>200 minuti). Questa tipologia di nuoto è quasi esclusivamente sostenuta dall'attività del muscolo rosso e non prevede il raggiungimento della condizione di affaticamento. Gli animali, infatti, sono in grado di rimetabolizzare i sottoprodotti dell'attività muscolare (lattato) e, quindi, di recuperare anche l'acidosi muscolare. Normalmente, la cessazione di tale atti-

vità è legata alla mancanza di riserve energetiche. Il nuoto sostenuto riguarda, generalmente, tutte le attività routinarie di nuoto di quasi tutte le specie e può essere mantenuto per un intervallo di tempo più breve, non superiore ai 200 minuti. Questa tipologia di nuoto termina con l'affaticamento, che viene raggiunto perché il pesce non è più in grado di recuperare l'energia dispersa durante il nuoto. La spinta propulsiva è assicurata dal contemporaneo coinvolgimento della muscolatura rossa e di quella bianca. Diversamente da queste due tipologie, il nuoto esplosivo può essere sostenuto per tempi molto brevi (<20 secondi). È, infatti, supportato maggiormente dal metabolismo anaerobico e, di conseguenza, principalmente dall'attività del muscolo bianco.

Questa classificazione generica permette, attraverso particolari test di laboratorio, di stimare la spesa energetica e di valutare le risposte biochimiche associate al nuoto (metabolismo aerobico e anaerobico). Si distinguono quattro tipologie di test di nuoto: esercizi di *endurance*, di *fast start*, esaustivi e di recupero. In particolare gli esercizi esaustivi sono stati per lo più utilizzati per valutare i cambiamenti biochimici che si instaurano al raggiungimento della condizione di affaticamento. Nella maggior parte dei casi i test esaustivi si conducono imponendo incrementi discreti di velocità dell'acqua fino all'affaticamento del pesce, si parla quindi di test di "velocità critica di nuoto" (U_{crit}). L' U_{crit} consente di studiare l'intero spettro delle variazioni metaboliche che si susseguono (anche temporalmente) durante il nuoto del pesce (fase aerobica e anaerobica). Questo genere di prova è quasi esclusivamente limitato a condizioni di laboratorio perché è necessario l'utilizzo di una camera di nuoto che rende facilmente e oggettivamente riproducibile il test di U_{crit} (Hammer, 1995; Kolok, 1999). L' U_{crit} costituisce una buona misura eco-fisiologica per predire i possibili impatti dei cambiamenti ambientali sull'organismo (Plaut, 2001). Le prestazioni di nuoto, inoltre, sono state utilizzate come potenziale parametro di benessere e per valutare le risposte dei pesci a stress di varia natura (FSBI, 2002). La valutazione quantitativa dell'attività di nuoto, per specie marine e d'acqua dolce, è stata possibile grazie alla messa a punto di protocolli sperimentali, sebbene non ancora del tutto standardizzati nei dettagli operativi. Infatti, le variazioni di velocità utilizzate in letteratura variano ampiamente, anche se quelle maggiormente utilizzate sono comprese tra 5 cm s^{-1} e 10 cm s^{-1} . L'intervallo di tempo varia più frequentemente tra 20 e 30 minuti, nonostante siano stati utilizzati anche intervalli più lunghi, pari a 60 minuti, e più brevi, pari a 3 minuti (Kolok, 1999). I valori della velocità possono essere espressi in termini assoluti o relativi alla lunghezza totale (BL s^{-1}). La velocità critica relativa è correlata negativamente con la lunghezza totale

(Wolter e Arlinghaus, 2003). Per cui, in genere, si preferisce utilizzare i valori di velocità critica relativa quando si opera con un ampio *range* di taglie (Kolk, 1999).

In termini ecologici è ormai opinione diffusa che l' U_{crit} sia un buon indicatore fisiologico dell'impatto dei cambiamenti ambientali sull'organismo. Ciò nonostante, l' U_{crit} non sempre si rivela particolarmente sensibile ai disturbi metabolici. Un indice di maggiore importanza ecologica – il *recovery test* – si basa sull'idea che un pesce in buona salute e non stressato possa ripetere, dopo un intermezzo di riposo dedicato a ristabilire le riserve di glicogeno e a recuperare energia, una prova di nuoto mantenendo invariato il proprio livello di prestazione (Jain et al., 1998). Si utilizzano, quindi, due prove consecutive di U_{crit} intervallate da un breve lasso di tempo (*recovery time*) necessario e sufficiente per ripristinare le riserve di glicogeno utilizzate durante lo sforzo speso nella prima prova (Milligan, 2003). In particolare, il rapporto tra il primo e il secondo U_{crit} (*recovery ratio*, RR) viene utilizzato come indice del recupero metabolico; per cui un pesce che ha raggiunto un completo recupero dovrebbe mostrare un *recovery ratio* pari a uno (Jain et al., 1998). È stata dimostrata tuttavia non necessaria la ricostituzione delle precise condizioni iniziali perché un pesce possa ripetere, con prestazioni invariate, una prova di nuoto. Infatti, in *Oncorhynchus nerka* è stato osservato che, dopo l'aumento dei livelli di lattato, conseguente a una prima prova di nuoto, al termine di una seconda e di una terza prova le concentrazioni non si elevavano ulteriormente (Farrell et al., 1998).

Lo sforzo fisico in un pesce, anche se non sottoposto a fonti di stress, comporta delle variazioni a livello ematologico (valori dell'ematocrito, concentrazione di cortisolo, glucosio, lattato) dalle quali può dipendere la durata del periodo di tempo necessario al recupero, durata che si è rivelata specie-specifica. È stato dimostrato, infatti, che in *Oncorhynchus mykiss* alti livelli plasmatici di cortisolo sono coinvolti nel ritardo dell'attivazione della glicogenosintesi a livello muscolare al termine di una prova di nuoto, il che comporta il conseguente ritardo nel recupero delle riserve energetiche (glicogeno) durante l'eventuale tempo di recupero (Milligan, 2003).

Il *recovery test* è stato utilizzato anche in *Salmo salar* per valutare l'effetto di diete con diverso contenuto in acidi grassi sulle prestazioni di nuoto (Wagner et al., 2004). Lo stato di sazietà e la composizione nutrizionale del cibo possono infatti influire sul comportamento dei pesci e, allo stesso tempo, sulle prestazioni di nuoto (Gregory e Wood, 1998; McFarlane et al., 2004; Wagner et al., 2004). Nel muscolo rosso di *O. mykiss*, infatti, l'ossidazione dei lipidi sostiene il nuoto a livello energetico fino al 70-80% dell' U_{crit} , mentre riveste un ruolo secondario, rispetto al metabolismo dei carboidrati, tra il 70% e il

100% dell' U_{crit} (Wagner et al., 2004). Inoltre, anche la proporzione relativa di acidi grassi saturi e insaturi (della serie ω -3) può alterare la condizione cardiorespiratoria (McKenzie, 2001) e, di conseguenza, influire sulle prestazioni di nuoto (McKenzie et al., 1998). In *Salmo salar* una dieta con una più alta concentrazione di acido oleico e linoleico incrementa significativamente le prestazioni di nuoto (McKenzie et al., 1998).

La somministrazione di cortisolo è stata spesso applicata per mimare gli effetti dello stress, utilizzando le soluzioni saline, per simulare uno stress acuto e studiarne gli effetti a breve termine, e le emulsioni lipidiche per simulare situazioni di tipo cronico e studiarne gli effetti a lungo termine (Mommensen et al., 1999). La somministrazione di cortisolo è stata quindi utilizzata nelle carpe e nei salmonidi per comprendere gli effetti dello stress (Mommensen et al., 1999) sull'osmoregolazione, sul sistema immunitario (Ruglyis, 1985; Wang et al., 2005), sull'alimentazione (De Pedro et al., 1997), sull'attività di nuoto (Gregory e Wood, 1999; Milligan, 2003), sul metabolismo epatico e sulle interazioni sociali (Di Battista et al., 2005).

Il quadro conoscitivo relativo alle capacità di nuoto della spigola (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) (Koumoundouros et al., 2002; Chatelier et al., 2005), specie di notevole importanza ecologica ed economica per il Mediterraneo, è andato espandendosi, anche grazie agli esperimenti realizzati di recente da Carbonara e collaboratori (2006; 2010a; 2010b) e da Lembo e collaboratori (2007, 2008). Il primo di questi lavori ha tracciato una *base-line* relativa alla stima della velocità critica di nuoto in spigole allevate e non sottoposte a fonti di stress per un ampio spettro di taglie (23-38 cm; 90-600 g). In particolare, questi studi hanno evidenziato una correlazione positiva tra lunghezza totale degli individui e U_{crit} assoluto (intervallo 97-127 cm s^{-1}) e una correlazione negativa tra lunghezza totale e U_{crit} relativo (intervallo 3,6-4,1 BL s^{-1}), in accordo con Brett (1964), dimostrando quindi, anche per la spigola, che pesci più grandi, sebbene in grado di raggiungere velocità critiche più elevate, hanno capacità di nuoto ridotte, se messe in relazione con la taglia. Nello stesso lavoro i *recovery test* riportavano, per tutto il *range* di taglie esaminate, un *recovery ratio* pari a uno, indicando come pesci non sottoposti a condizioni di stress fossero in grado di ripetere con successo due prove consecutive di U_{crit} , separate da un adeguato periodo di recupero metabolico (60 minuti).

La simulazione di una condizione di stress acuto, indotta dagli stessi Autori (Carbonara et al., 2010a) con la somministrazione intraperitoneale di idrocortisolo in soluzione salina, evidenziava invece una alterazione della capacità di nuoto e del recupero metabolico in prove di *recovery test*. Infatti, fra i gruppi sperimentali (*gruppo stress*: pesci sottoposti a somministrazione di idrocortisolo; *gruppo place-*

bo: trattati con sola soluzione fisiologica; *gruppo controllo*: non trattato in alcun modo), solo i pesci del gruppo trattato con il cortisolo mostravano differenze significative tra le due prove consecutive di nuoto, con un calo delle prestazioni nella seconda prova. Il periodo di *recovery* si mostrava invece sufficiente per recuperare le energie metaboliche e ripristinare le riserve di glicogeno nei gruppi *controllo* e *placebo*. I gruppi *placebo* e *stress* mostravano, inoltre, gli effetti fisiologici tipici della reazione secondaria allo stress, con un incremento dei livelli di glucosio, all'inizio della prova, rispetto al gruppo di controllo (Carbonara et al., 2010a). I livelli di glucosio si innalzavano ulteriormente, successivamente alle prove di nuoto, fino a livelli simili in tutti e tre i gruppi, mostrando sia la tipica risposta alla fatica (West et al., 1994), sia il risultato del meccanismo di saturazione dei recettori cellulari per il cortisolo (Mommsen et al., 1999).

Nei tre gruppi sperimentali, solo il gruppo trattato con il cortisolo mostrava una diminuzione dei livelli di lisozima - uno dei fattori chiave dell'immunità aspecifica - tra inizio e fine delle prove di nuoto, fatto che indicherebbe una depressione del sistema immunitario aspecifico. Tuttavia, il ruolo del cortisolo come regolatore del sistema immunitario aspecifico non è ancora del tutto chiarito. Alcuni autori, infatti, hanno registrato un aumento dei livelli di lisozima dopo un evento di stress acuto (Demers e Bayne, 1997; Rotllant e Tort, 1997), mentre altri ne hanno descritto una diminuzione (Möck e Peters, 1990). Le risposte del sistema immunitario sembrano comunque correlate all'intensità e alla durata dello stress (Weyts et al., 1999).

I risultati di queste ricerche hanno evidenziato, inoltre, che i livelli di manipolazione (*placebo*) e di trattamento con il cortisolo (*stress*) non avevano un impatto significativo sul profilo ematologico (emoglobina, ematocrito e conta eritrocitaria non sono risultati significativamente differenti tra i gruppi) nella spigola, in accordo con quanto osservato, in genere, in situazioni di stress acuto (Thorstad et al., 2003; Morales et al., 2005). Infatti, le alterazioni dei parametri ematici sembrano maggiormente legate a condizioni di stress cronico (Barcellos et al., 2006), come quelle che possono determinarsi a seguito di cambiamenti ambientali, come la quantità di ossigeno disciolto, la temperatura e la salinità (Roche e Bogé, 1996; Lupi et al., 2005) o la presenza di xenobionti organici e inorganici (Roche e Bogé, 2000).

ELETTROMIOGRAMMI (EMG) E BENESSERE

La misura degli elettromiogrammi (EMG), ossia del segnale elettrico derivante dalla differenza di potenziale legata alla contrazione muscolare, si è

rivelata utile per stimare la quantità di ossigeno consumata da un pesce in movimento (*metabolic scope for activity*), in contrapposizione con il consumo di ossigeno a livelli basali (*standard metabolic rate*). Un contributo significativo, in questo campo, è stato fornito dalla telemetria fisiologica che, attraverso l'impianto (interno o esterno) di un trasmettitore *wireless*, consente di monitorare l'attività muscolare in pesci liberi di nuotare nel proprio ambiente (Cooke et al., 2000; Thorstad et al., 2003; McFarlane et al., 2004; Lembo et al., 2008). Nonostante sia sempre aperto il dibattito circa gli effetti dell'impianto stesso sulla salute e il normale comportamento del pesce (Jepsen et al., 2002; Bridger e Booth, 2003), è proprio l'utilizzo dei trasmettitori di segnale elettromiografico che ha reso possibile diagnosticare disturbi a livello fisiologico, anche in assenza di sintomi di sofferenza dell'animale, sia di tipo clinico che biochimico.

Il monitoraggio dell'attività elettrica muscolare è stato quindi considerato uno strumento efficace per valutare il benessere animale in acquacoltura (Cooke et al., 2000; McFarlane et al., 2004; Chandroo et al., 2005).

Nella spigola, il monitoraggio degli elettromiogrammi è stato essenziale per descrivere, da un punto di vista quantitativo, la diversa attività del muscolo rosso e del muscolo bianco a differenti velocità di nuoto (Lembo et al., 2007), dimostrando il coinvolgimento dei due tipi di fibre muscolari nel sostenere il nuoto al di sotto dell' U_{crit} ed evidenziando che il *metabolic scope for activity* non è sostenuto esclusivamente dal metabolismo aerobico.

È proprio il differente utilizzo della muscolatura rossa e di quella bianca, ai diversi livelli di attività del pesce, a tradursi in un diverso utilizzo delle energie metaboliche e, quindi, in una diversa capacità di rispondere allo stress. Una stima accurata del *metabolic scope for activity* deve tenere conto, pertanto, anche dell'energia utilizzata dal muscolo bianco onde evitare la possibilità di sottostimare il *budget* di energia utilizzato (Burgetz et al., 1998). I trasmettitori *wireless* del segnale elettromiografico oggi disponibili consentono di monitorare esclusivamente l'attività del muscolo rosso, e quindi l'attività aerobica, fornendo una stima grezza del *metabolic scope for activity*. Per una stima della capacità globale del pesce di compensare eventi di stress, che ne esauriscono le scorte energetiche, è necessario che il *metabolic scope for activity* sia corretto per la componente anaerobica (Lembo et al., 2007).

La calibrazione dei trasmettitori EMG con gli elettromiogrammi *wired* riveste notevole importanza ai fini di un uso appropriato della tecnologia *wireless* (EMG-tag) per monitorare in *remote control* l'attività elettrica della muscolatura rossa e associare l'attività allo stato fisiologico del pesce e ai di-

versi livelli di risposta allo stress (Jain e Farrell, 2003; Chandroo et al., 2005). Inoltre, la calibrazione della velocità critica di nuoto e dei segnali EMG, attraverso prove di U_{crit} in camere di nuoto, è considerata una base di riferimento essenziale per una corretta interpretazione dei segnali EMG in relazione alla spesa energetica (Cooke et al., 2000; Thorstad et al., 2000; McFarlane et al., 2004).

Il monitoraggio degli EMG dopo calibrazione con l' U_{crit} (Carbonara et al., 2010b), in esperimenti condotti per verificare gli effetti di diverse densità di allevamento (10 e 50 kg m⁻³) sulle condizioni di benessere della spigola, ha messo in evidenza che i pesci allevati alla maggiore densità utilizzavano, in media, il 25% di energia in più rispetto a quelli tenuti a più bassa densità. La concentrazione plasmatica di cortisolo era più elevata alla maggiore densità e il contenuto di emoglobina, di eritrociti e l'ematocrito seguivano lo stesso pattern, mentre la concentrazione di lisozima diminuiva. I risultati dei profili di EMG ed ematologici convergevano, dunque, nell'indicare che la densità – uno dei parametri chiave nel determinare le condizioni di benessere in allevamento – contribuiva a generare, al livello più elevato, condizioni di stress cronico. In definitiva, l'uso complementare dell'EMG e dei profili ematologici e biochimici esplicava un maggiore potere nella formulazione di una diagnosi di stress causato dal protocollo di allevamento.

È noto che, insieme alla densità di allevamento, l'alimentazione (qualità, quantità, modalità e tempi di somministrazione del cibo) è un altro dei fattori che, nelle correnti pratiche colturali, può sensibilmente influenzare lo stato di benessere degli organismi allevati. La somministrazione di diete rispondenti a requisiti specie-specifici favorisce una maggiore resistenza allo stress e alle malattie (Poli, 2009), portando a una migliore condizione del benessere dei pesci e, di conseguenza, della qualità del prodotto finito.

In prove sperimentali condotte per testare la condizione di benessere della spigola in relazione alla composizione di tre differenti diete: due di tipo biologico – di cui una con un maggiore contenuto in proteine e l'altra con un maggior contenuto di lipidi – e una convenzionale, Carbonara (2009) ha utilizzato l'EMG in *remote control* e il *recovery test* associati a un insieme di indicatori plasmatici, ematologici e *biomarker*. Fra questi ultimi sono stati presi in considerazione il cortisolo, il glucosio, il lattato, il lisozima, l'ematocrito, la conta eritrocitaria, l'emoglobina, il complesso enzimatico delle monossigenasi a funzione mista: EROD (7-etossiresorufina-O-deetilasi) e GST (glutathione transferasi), l'indice epato-somatico (HSI). I risultati relativi alla misura di questi parametri, insieme alla valutazione delle *performance* di crescita – in

termini di tasso specifico di crescita (SGR), di percentuale di efficienza proteica (PER) e di rapporto di conversione (FCR) – hanno contribuito a delineare un quadro diagnostico completo sullo stato di benessere degli animali.

Dai risultati emergeva che gli EMG più elevati erano osservati nei pesci alimentati con la dieta di controllo e con la dieta più ricca in lipidi, mentre il gruppo di spigole alimentato con la dieta biologica maggiormente proteica mostrava EMG al di sotto dell' U_{crit} e con un significativo trend in diminuzione nel tempo. Inoltre, i *recovery test* evidenziavano una scarsa capacità di recupero dei pesci appartenenti al gruppo alimentato con la dieta di controllo. Fra i parametri plasmatici il cortisolo era significativamente più elevato a fine sperimentazione nel gruppo alimentato con il mangime biologico a più elevato contenuto di grassi, mentre il lisozima compariva in concentrazioni più elevate nel plasma delle spigole alimentate con la dieta più ricca di proteine. Gli altri parametri plasmatici così come quelli ematologici e i *biomarker* non mostravano variazioni significative. I valori di SGR, PER e FCR indicavano migliori *performance* per le spigole allevate con le diete biologiche rispetto alla dieta di controllo e in particolare la dieta biologica più ricca in proteine dava i migliori risultati.

In definitiva i risultati ottenuti monitorando 15 differenti parametri, mettevano in luce come solo la loro integrazione fosse in grado di delineare un quadro diagnostico meglio interpretabile. In particolare, U_{crit} , *recovery test* ed EMG, per la prima volta applicati alla spigola in un tale contesto sperimentale, avevano il vantaggio di descrivere una risposta integrata di tutto l'organismo a condizioni di stress e, quindi, esprimevano meglio la funzione di descrittori delle complesse dinamiche fisiologiche e metaboliche connesse con il benessere dei pesci in allevamento. In prospettiva, la possibilità di misurare gli effetti della risposta fisiologica integrata dell'organismo da un punto di vista funzionale può contribuire a delineare, anche per gli organismi allevati, i confini tra allostasi e ormesi (Schreck, 2010).

RIASSUNTO

Nel corso degli anni, lo studio del benessere animale ha assunto un significato sempre più importante, non solo per motivi etici, ma anche perché paradigmatico della qualità dell'ambiente e, più in generale, delle condizioni vitali in cui gli animali sono mantenuti. Opinione comune è che lo stress, di per sé, sia nocivo per gli esseri viventi. In realtà la risposta allo stress è una funzione normale ed essenziale per tutti gli organismi viventi, poiché è un meccanismo adattativo che consente, nello specifico a un pesce, di far fronte, mediante un complesso insieme di reazioni, agli stimoli destabilizzanti il normale equilibrio omeostatico del proprio organismo. Il grado di alterazione a carico dell'organismo è

strettamente correlato, tuttavia, all'intensità e alla durata dello stimolo stressante, nonché al grado d'importanza che il modulo comportamentale modificato riveste per la sopravvivenza. Tra le varie risposte allo stress che i pesci possono manifestare, i cambiamenti a livello dell'attività di nuoto hanno senz'altro suscitato notevole interesse scientifico. In termini ecologici è ormai opinione diffusa che la "velocità critica di nuoto" (U_{crit}) sia un buon indicatore fisiologico dell'impatto dei cambiamenti ambientali sull'organismo. Un indice di maggiore importanza ecologica, il "recovery test" si basa sull'idea che un pesce in buona salute possa ripetere, dopo un breve periodo di riposo dedicato a ristabilire le riserve di glicogeno, una prova di nuoto mantenendo invariato il proprio livello di prestazione. Anche la misura degli "elettromiogrammi" (EMG), ossia del segnale elettrico derivante dalla differenza di potenziale legata alla contrazione muscolare, si è rivelata utile per valutare il benessere animale in acquacoltura attraverso la stima della quantità di ossigeno consumata da un pesce in movimento "metabolic scope for activity", in contrapposizione con il consumo di ossigeno a livelli basali "standard metabolic rate". Un contributo significativo, in questo campo, è stato fornito dalla telemetria fisiologica che, attraverso l'impianto (interno o esterno) di un trasmettitore "wireless", consente di monitorare l'attività muscolare in pesci liberi di nuotare nel proprio ambiente.

ABSTRACT

Changes in swimming activity can reflect the perception and the response to environmental variations from a fish perspective. Thus metrics such as U_{crit} , recovery test and muscular activity measured via electromyogram (EMG) were explored for their potential use as welfare indicators. Aquaculture experiments conducted on European sea bass demonstrated the usefulness of the U_{crit} to set the baseline of the swimming activity metrics. While the recovery test allowed to evaluate the impact of stress as a sign of possible physiological impairment. The sensitiveness of the EMG indicator was demonstrated by the underpin of the effects of different stocking densities on the sea bass welfare, when operationally monitored on-farm, using physiological telemetry (EMG-tag). In these trials EMG profiles enabled to detect that the fish reared at higher density used on average 25% more energy than at lower stocking density. Synchronous monitoring of red and white muscle electromyograms highlighted, however, that the scope for activity is not supported solely using aerobic metabolism, though the red muscle powers the majority of the swimming ability. The study of the EMG profiles were likewise used to estimate the impact of the diet on fish welfare. Long-term monitoring of muscle activity evidenced an increasing of EMG levels as a consequence of food composition and quality of a control diet versus an organic diet. Overall results from these studies supports the perspective of a composite framework of indicators, based on the performance of the whole organism, such as U_{crit} , recovery test and EMG, to further progress the diagnosis of fish welfare in aquaculture.

BIBLIOGRAFIA

ALSOP D.H., 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, pp. 2337-2346.

- BARCELLOS L.J.G., KREUTZ L.C., DE SOUZA C., RODRIGUES L.B., FIOREZE I., QUEVEDO R.M., CERICATO L., BENCK SOSO A., FAGUNDES M., CONRAD J. ET AL. (2006): *Hae-matological changes in jundiá (Rhamdia quelen Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects*, «Aquaculture», 237, pp. 229-236.
- BARTON B.A. (2002): *Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids*, «Integrated and Comparative Biology», 42, pp. 517-525.
- BEAMISH F.W.H. (1978): *Swimming Capacity*, in *Fish Physiology*, a cura di Hoar W.S., Randall D.J., New York, Academic Press, pp. 101-187.
- BRETT J.R. (1964): *The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon*, «Journal of Fisheries Research », 21, pp. 1183-1226.
- BRIDGER C.J., BOOTH R.K. (2003): *The effects of biotelemetry transmitter presence and attachment procedures on fish physiology and behaviour*, «Reviews in Fisheries Science», 11, pp. 13-34.
- BURGETZ I.J., ROJAS-VARGAS A., HINCH S.G., RANDALL D.J. (1998): *Initial recruitment of anaerobic metabolism during sub-maximal swimming in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, «The Journal of Experimental Biology», 201, pp. 2711-2721.
- CARBONARA P., SCOLAMACCHIA M., SPEDICATO M.T., LEMBO G., ZUPA W., MCKINLEY R.S. (2006): *Swimming performances as a well-being indicator of reared sea-bass Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758). Preliminary results*, «Biologia Marina Mediterranea», 13, pp. 488-491.
- CARBONARA P. (2009): *Un approccio metodologico integrato fra telemetria fisiologica e bio-marker per la valutazione del benessere animale nella spigola (Dicentrarchus labrax L.)* PhD Thesis, University of Siena, pp. 165.
- CARBONARA P., CORSI I., FOCARDI S., LEMBO G., ROCHIRA S., SCOLAMACCHIA M., SPEDICATO M.T., MCKINLEY R.S. (2010a): *The effects of stress induced by cortisol administration on the repeatability of swimming performance tests in the European sea bass (Dicentrarchus labrax L.)*, «Marine and Freshwater Behaviour and Physiology», 43 (4), pp. 283-296.
- CARBONARA P., SCOLAMACCHIA M., SPEDICATO M.T., ZUPA W., MCKINLEY R.S., LEMBO G. (2010b): *Muscle activity as a key indicator of welfare in farmed European sea bass*, «Fisheries Management and Ecology», in press.
- CHANDROO K.P., COOKE S.J., MCKINLEY R.S., MOCCIA R.D. (2005): *Use of electromyogram telemetry to assess the behavioural and energetic responses of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum) to transportation stress*, «Aquaculture Research», 36, pp. 1226-1238.
- CHATELIER A., MCKENZIE D.J., CLAIREUX G. (2005): *Effects of changes in water salinity upon exercise and cardiac performance in the European sea bass (Dicentrarchus labrax)*, «Marine Biology», 147, pp. 855-862.
- CHROUSOS G.P. (1998): *Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response*, «Annals of New York Academy Sciences», 851, pp. 311-335.
- COOKE S.J., CHANDROO K.P., BEDDOW T.A., MOCCIA R.D., MCKINLEY R.S. (2000): *Swimming activity and energetic expenditure of captive rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum), estimated by electromyogram telemetry*, «Aquaculture Research», 31, pp. 495-506.
- DE PEDRO N., ALONSO-GOMEZ A.L., GANCEDO B., VALENCIANO A.I., DELGADO M.J., ALONSO-BEDATE M. (1997): *Effect of alpha-helical-CRF[9-41] on feeding in goldfish: in-*

- volvement of cortisol and catecholamines*, «Behavioral Neuroscience», 111, pp. 398-403.
- DEMERS N.E., BAYNE C.J. (1997): *The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout*, «Developmental & Comparative Immunology», 21, pp. 363-373.
- DI BATTISTA J.D., ANISMAN H., WHITEHEAD M., GILMOUR K.M. (2005): *The effects of cortisol administration on social status and brain monoaminergic activity in rainbow trout Oncorhynchus mykiss*, «Journal of Experimental Biology», 208, pp. 2707-2718.
- ELLIS T., NORTH B., SCOTT A.P., BROMAGE N.R., PORTER M., GADD D. (2002): *The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout*, «Journal of Fish Biology», 61, pp. 493-531.
- FAWC (1979): *Five Freedoms*, <http://www.fawc.org.uk/pdf/fivefreedoms1979.pdf>.
- FSBI (2002): *Fish welfare*, Briefing paper 2. Cambridge: Fisheries Society of the British Isles, Granta Information Systems, 2002.
- FARRELL A.P., GAMPER K., BIRTHWELL I.K. (1998): *Prolonged swimming, recovery and repeat swimming performance of mature sockeye salmon Onchorhynchus nerka exposed to moderate hypoxia and pentachlorophenol*, «Journal of Experimental Biology», 201, pp. 2183-2193.
- GEORGALAS V., MALAVASI S., FRANZOI P., TORRICELLI P. (2006): *Analisi della velocità di nuoto in larve di spigola allevate nei grandi volumi: effetto dell'ontogenesi e della densità di prede*, «Biologia Marina Mediterranea», 13, pp. 507-509.
- GREGORY R.T., 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, pp. 286-295.
- GREGORY T.R., WOOD C.M. (1998): *Individual variation and interrelationships between swimming performance, growth rate, and feeding in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, «Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences», 55, pp. 1583-1590.
- GRUTTER A.S., PANKHURST N.W. (2000): *The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish Hemigymnus melapterus*, «Journal of Fish Biology», 57, pp. 391-401.
- HALE M.E. (1999): *Locomotor mechanics during early life history: effects of size and ontogeny on fast-start performance of salmonids fishes*, «Journal of Experimental Biology», 202, pp. 1465-1479.
- HAMMER C. (1995): *Fatigue and exercise test with fish*, «Comparative Biochemistry and Physiology (A)», 112, pp. 1-20.
- IWAMA G., AFONSO L.O.B., VIJAYAN M.M. (2004): *Stress in fish*, AquaNet Workshop on Fish Welfare, Campbell River, B.C. Canada, 2004.
- JAIN K.E., BIRTHWELL I.K., 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, pp. 1488-1496.
- JAIN K.E., FARRELL A.P. (2003): *Influence of seasonal temperature on the repeat swimming performance of rainbow trout Onchorhynchus mykiss*, «Journal of Experimental Biology», 206, pp. 3569-3579.
- JEPSEN N., KOED A., THORSTAD E.B., BARAS E. (2002): *Surgical implantation of telemetry transmitters in fish: how much we have learned?*, «Hydrobiologia», 483, pp. 239-248.
- 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, pp. 700-710.
- KOUMOUNDOUROS G., SFAKIANAKIS D.G., DIVANACH P., KENTOURI M. (2002): *Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles*, «Journal of Fish Biology», 60, pp. 923-932.
- LEMBO G., CARBONARA P., SCOLAMACCHIA M., SPEDICATO M.T., MCKINLEY R.S. (2007): *Use of muscle activity indices as a relative measure of well-being in cultured sea bass Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)*, «Hydrobiologia», 582, pp. 271-280.
- LEMBO G., CARBONARA P., SCOLAMACCHIA M., SPEDICATO M. T., BJØRNSSEN J. E., HOLLAND B., MCKINLEY R. S. (2008): *Introduction of a new physiological acoustic electromyogram transmitter*, «Fisheries Management and Ecology», 15, pp. 333-338.
- LUPI P., VIGIANI V., MECATTI M., BOZZI R. (2005): *First haematic results for the sea bass (Dicentrarchus labrax) metabolic profile assessment*, «Italian Journal of Animal Sciences», 4, pp. 167-176.
- McFARLANE W.J., CUBITT K. F., WILLIAMS H., ROWSELL D., MOCCIA R., GOSINE R., MCKINLEY R.S. (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, pp. 467-484.
- MCKENZIE D.J. (2001): *Effects of the dietary fatty acids on the respiratory and cardiovascular physiology of fish*, «Comparative Biochemistry and Physiology (A)», 128, pp. 607-621.
- MCKENZIE D.J., HIGGS D.A., DOSANJH B., DEACON G., RANDALL D.J. (1998): *Dietary lipid composition influences swimming performance in Atlantic salmon (Salmo salar) in sea water*, «Comparative Physiology and Biochemistry», 19, pp. 111-122.
- MILLIGAN C.L. (2003): *A regulatory role of cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout Oncorhynchus mykiss Walbaum*, «Journal of Experimental Biology», 206, pp. 3167-3173.
- MOMMSEN T.P., VIJAYAN M.M., MOON T.W. (1999): *Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation*, «Reviews in Fish Biology and Fisheries», 9, pp. 211-268.
- MORALES A.E., CARDENETE G., ABELLÁN E., GARCÍA-REJÓN L. (2005): *Stress-related physiological responses to handling in common dentex (Dentex dentex Linnaeus, 1758)*, «Aquaculture Research», 36, pp. 33-40.
- MÖCK A., PETERS G. (1990): *Lysozyme activity in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution*, «Journal of Fish Biology», 37, pp. 873-885.
- NELSON J.A., TANG Y., 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, pp. 1295-1309.
- PLAUT I. (2001): *Critical swimming performance: its ecological relevance*, «Comparative Biochemistry and Physiology (A)», 131, pp. 41-50.
- POLI B.M. (2009): *Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality*, «Italian Journal of Animal Sciences», 8, pp. 137-160.
- QUINTELLA B.R., ANDRADE N.O., KOED A., ALMEIDA P.R. (2004): *Behavioural patterns of sea lampreys' spawning migration through difficult passage areas, studied by electromyogram telemetry*, «Journal of Fish Biology», 65, pp. 961-972.
- ROCHE H., 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, pp. 27-43.

- ROCHE H., BOGÉ G. (2000): *In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish* (*Dicentrarchus labrax*), «Comparative Biochemistry and Physiology (C)», 125, pp. 345-353.
- RONCARATI A., MELOTTI P., DEES A., MORDENTI O., ANGELOTTI L. (2006): *Welfare status of cultured seabass* (*Dicentrarchus labrax* L.) *and seabream* (*Sparus aurata* L.) *assessed by blood parameters and tissue characteristics*, «Journal of Applied Ichthyology», 22, pp. 225-234.
- ROTLANT J., TORT L. (1997): *Cortisol and glucose response after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress*, «Journal of Fish Biology», 51, pp. 21-28.
- RUGLYS M.P. (1985): *The secondary immune response of young carp*, *Cyprinus carpio* L., *following injection of cortisol*, «Journal of Fish Biology», 26, pp. 429-434.
- SCHRECK C.B. (2000): *Accumulation and long-term effects of stress in fish*, in *The Biology of animal Stress*, a cura di G. P. Moberg, J.A. Mench, CABI Publishing, pp. 147-158.
- SCHRECK C.B. (2010): *Stress and fish reproduction. The roles of allostasis and hormesis*, «General Comparative Endocrinology», 165 (3), pp. 549-556.
- SCHRECK C.B., OLLA B.L., DAVIS M.W. (1997): *Behavioral responses to stress*, in *Fish Stress and Health in Aquaculture*, a cura di G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter, C.B. Schreck, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 119.
- THORSTAD E.B., NÆSJE T.F., FISKE P., FINSTAD B. (2003): *Effect of hook and release on Atlantic salmon in the river Alta, northern Norway*, «Fisheries Research», 60, pp. 293-307.
- THORSTAD E.B., ØKLAND F., FINSTAD B. (2000): *Effects of telemetry transmitters on swimming performance of adult Atlantic salmon*, «Journal of Fish Biology», 57, pp. 531-535.
- VAZZANA M., CAMMARATA M., COOPER E.L., PARINIELLO N. (2002): *Confinement stress in sea bass* (*Dicentrarchus labrax*) *depress peritoneal leucocyte cytotoxicity*, «Aquaculture», 210, pp. 231-243.
- WAGNER G.N., BALFRY S.K., HIGGS D.A., LALL S.P., FARRELL A.P. (2004): *Dietary fatty acids composition affects the repeat swimming performance of Atlantic Salmon in seawater*, «Comparative Biochemistry and Physiology (A)», 137, pp. 567-576.
- WANG W.B., LI A. H., CAI T.Z., WANG J.G. (2005): *Effects of intraperitoneal injection of cortisol on nonspecific immune functions of Ctenopharyngodon idella*, «Journal of Fish Biology», 67, pp. 779-793.
- WARDLE C.S., VIDELER J.J., ALTRINGHAM J.D. (1995): *Tuning in to fish swimming waves: body form, swimming mode and muscle function*, «The Journal of Experimental Biology», 198, pp. 1629-1636.
- WEBB P.W. (1984): *Body form, locomotion and foraging in aquatic vertebrates*, «American Zoologist», 24, pp. 107-120.
- WEDEMEYER G.A., BARTON B.A., MCLEAY D.J. (1990): *Stress and acclimation*, in *Methods for fish biology*, a cura di C.B. Schreck, P.B. Moyle, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp. 451-489.
- WEDEMEYER G.A., MCLEAY D.J. (1981): *Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors*, in *Stress and fish*, a cura di A.D. Pickering, Academic Press, New York, pp. 247-275.
- WEST T.G., BRAUNER C.J., HOCHACHKA P. (1994): *Muscle glucose utilization during sustained swimming in the carp* (*Cyprinus carpio*), «The American Journal of Physiology», 267, pp. 1226-1234.
- WEYTS F.A., COHEN N., FLIK G., VERBURG-VAN KEMENADE B.M. (1999): *Interaction between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish*, «Fish and Shellfish Immunology», 9, pp. 1-20.

- WOLTER C., ARLINGHAUS R. (2003): *Navigation impacts on freshwater fish assemblages: the ecological relevance of swimming performance*, «Reviews in Fish Biology and Fisheries», 13, pp. 63-89.
- WOOD A.W., JOHNSTON B.D., FARRELL A.P., KENNEDY C.J. (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, pp. 2424-2432.