

Effetti della pulizia semiautomatica del fondo di vasche di allevamento su parametri ambientali e stato igienico sanitario di orata (*Sparus aurata*) mantenuta in condizioni intensive

V.1 (09/10/20)

RELAZIONE FINALE

**Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie
Alma Mater Studiorum - Università di Bologna
&
Il Vigneto S.R.L**

Introduzione

Presso l'allevamento "Il Vigneto SRL" di Ansedonia (GR) sono presenti e vengono utilizzate vasche per l'allevamento intensivo di branzini e orate. Attualmente, le vasche vengono periodicamente pulite dalla presenza di sedimento sul fondo grazie a interventi manuali da parte degli operatori in servizio presso l'allevamento.

Recentemente, sono stati proposti a livello commerciale dei sistemi di pulizia semi-automatica costituiti da macchinari subacquei semoventi. In particolare la ditta Idee e Prodotti srl di Milano ha proposto l'utilizzo di un robot cingolato chiamato "Apneo" in grado di muoversi mediante telecomando sul fondale delle vasche e rimuovere dalla vasca il particolato presente sul fondo mediante aspirazione.

Lo scopo della presente prova è testare l'efficacia del robot "Apneo" sullo stato di pulizia delle vasche rispetto alla pulizia manuale.

Il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna ha svolto una serie di campionamenti sulle acque per effettuare analisi microbiologiche (carica batterica totale – CBT, *Vibrio spp.* e *Aeromonas spp.*) e chimiche (azoto totale, fosforo totale, ammoniaca e nitriti) e lo stato sanitario dei pesci (presenza del parassita *Enteromyxum leei*). Il periodo di osservazione è stato da dicembre 2019 (controllo negativo prima della pulizia semi-automatica) a luglio 2020, con cadenza mensile dei campionamenti.



PARAMETRI AMBIENTALI (Giorgia Bignami)

Materiali e Metodi

Gruppi osservati

Gruppo H: pulizia con robot Apneo ogni 15 giorni (VASCA 1A E 2B campionate da febbraio a luglio): Le vasche contenenti pesci stabulati sono state pulite utilizzando il robot Apneo. La pulizia si è svolta ogni 15 giorni

Gruppo L: pulizia con robot Apneo ogni 30 giorni (VASCA 4A campionata da febbraio a luglio; VASCA 6A campionata da febbraio ad aprile, da aprile a luglio è stata sostituita con la VASCA 5A): le vasche contenenti pesci stabulati sono state pulite utilizzando il robot Apneo. La pulizia è stata fatta una volta al mese.

Gruppo C: pulizia con metodo consueto e frequenza random (PULIZIA RANDOM CON ALTRA POMPA): VASCA 1D E 2E da febbraio ad aprile; da maggio sono state sostituite dalle VASCHE 5D E 1E.): Le vasche vengono pulite manualmente secondo i protocolli aziendali.

Prelievo delle acque per analisi microbiologiche e chimiche

I campionamenti sono stati effettuati in dicembre (tempo zero senza l'uso di Apneo), febbraio, maggio, giugno e luglio. I campionamenti di marzo e aprile non sono stati effettuati a causa del *lockdown* determinato dal coronavirus.

I campioni di acqua venivano prelevati dallo scarico delle vasche e arrivavano in bottiglie da un litro riempite all'orlo, siglate con il nome della vasca di appartenenza e dopo 24 ore di viaggio. Il codice della vasca non dava dettagli dei Gruppi di appartenenza né vi era una legenda.

Al momento dell'arrivo in laboratorio, si è proceduto alle semine in piastra per spatolamento, per quanto riguarda le analisi batteriche nei terreni sopracitati, (TSA Oxoid per la conta batterica totale, TCBS Oxoid per i *Vibrio* spp e *Aeromonas* agar Oxoid per gli *Aeromonas* spp.) e alle analisi tramite spettrofotometro Nova della Merck e ICP massa PerkinElmer, per quanto riguarda quelle chimiche.

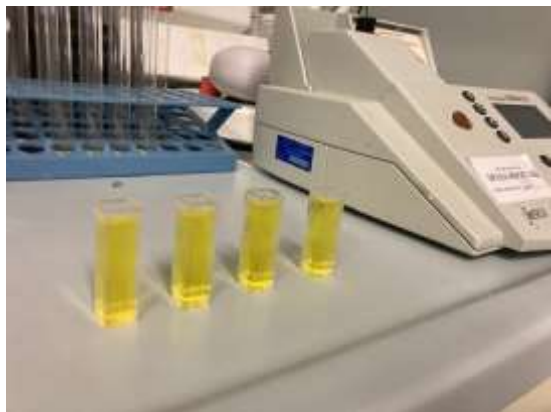
Analisi microbiologiche

Oltre alla conta batterica totale in TSA agar e alla conta batterica dei *Vibrio* spp in TCBS agar, abbiamo aggiunto il terreno selettivo per la conta quantitativa di *Aeromonas* spp. dal mese di maggio in poi. A tutti i terreni veniva aggiunto NaCl al 2,5 %. Dopo 48-72 ore di incubazione a 20°C si procedeva con le conte delle unità formanti colonia in piastra (UFC/ml).



Analisi chimiche

L'ammoniaca totale è stata analizzata mediante spettrofotometro. Sono state svolte effettuate le analisi di Azoto totale e Fosforo totale con ICP massa. I risultati delle analisi chimiche erano pressoché immediati dopo l'inserimento del campione nello strumento.

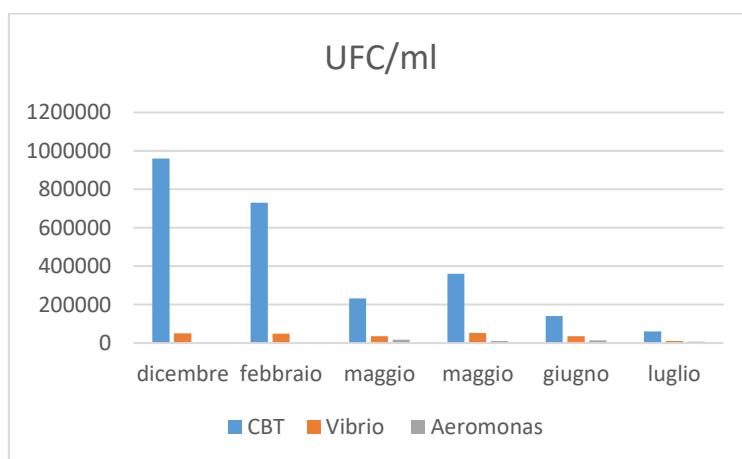


Risultati

Analisi microbiologiche

GRUPPO H – PULIZIA CON APNEO OGNI 15 GIORNI

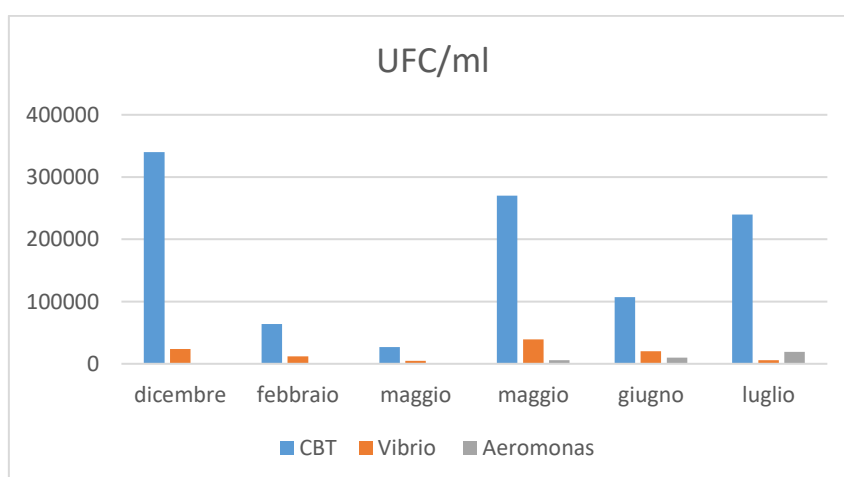
VASCA 1A



Nel grafico, la carica batterica totale (CBT), ha mostrato un abbassamento dei valori da dicembre a luglio, mentre la quantità di *Vibrio spp.* *Aeromonas spp.* è rimasta stabile.

Da notare, a margine dei risultati, che in piastra (TCBS e Aeromonas agar) si è notata la presenza di solfuri nei campioni prelevati da dicembre a maggio, probabilmente a causa della presenza di batteri solfuro riduttori nel pozzo che fornisce l'acqua alla vasca.

VASCA 2B

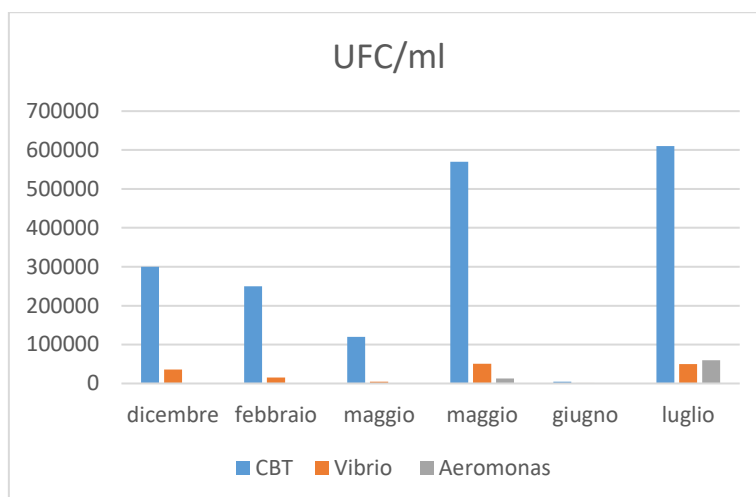


Il trend iniziale mostra un evidente abbassamento della carica batterica nel primo periodo. Dal secondo campionamento di maggio si nota un innalzamento di un logaritmo della CNT che si manterrà costante nei mesi estivi. La quantità di *Vibrio spp.* *Aeromonas spp.* è rimasta stabile. Anche in questo caso (TCBS e *Aeromonas* agar) si è notata la presenza di solfuri nei campioni.

GRUPPO L – PULIZIA CON APNEO OGNI 30 GIORNI

A questo Gruppo appartengono le vasche 4A, campionata per l'intero periodo, mentre la vasca 6 A è stata campionata fino ad marzo, per poi essere sostituita con la vasca 5A per esigenze di allevamento.

VASCA 4A

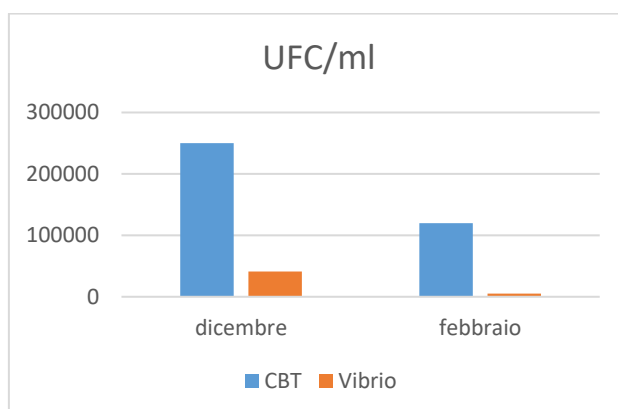


Nella vasca 4A si registra un incremento della CBT nel secondo campionamento di maggio e in quello di luglio, mentre a giugno si è registrata la CBT più bassa di tutto il periodo considerato.

La quantità di *Vibrio spp.* e *Aeromonas spp.* è sostanzialmente stabile con un aumento registrato nei mesi estivi.

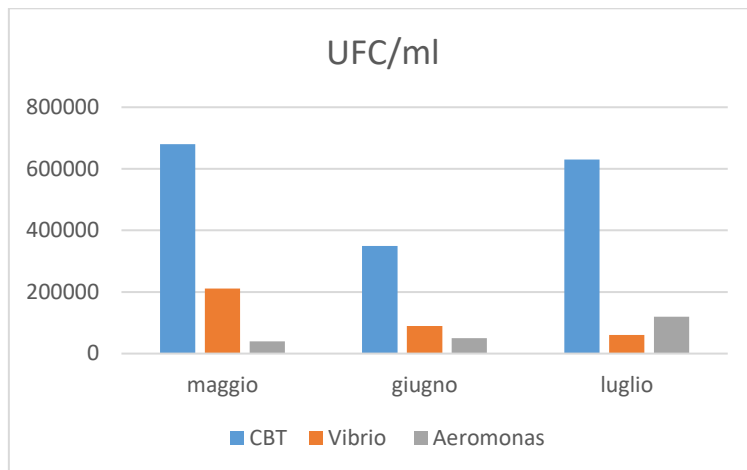
Anche in questa vasca, dal campionamento di maggio non si è registrata la presenza di solfuri in piastra (TCBS e *Aeromonas* agar) durante i mesi estivi (come vasca 1 A).

VASCA 6A



Questa vasca (campionata solo a dicembre senza l'uso di Apneo e a febbraio) mostra un calo di CBT e di *Vibrio spp.* dal primo al secondo campionamento. Anche in questo caso si è riscontrata la presenza di solfuri in piastra.

VASCA 5A



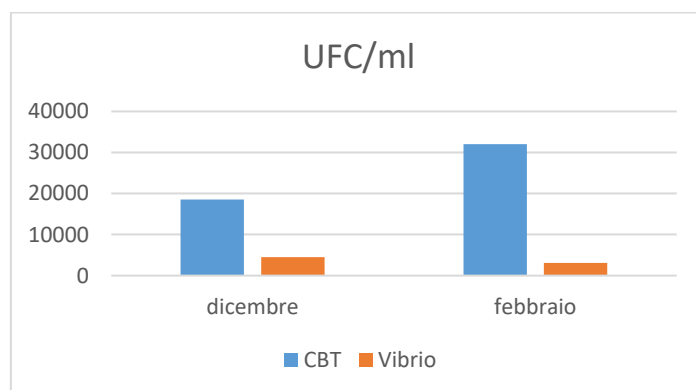
La CBT nei tre campionamenti effettuati mostra valori nel loro complesso in linea con le vasche dello stesso Gruppo con valori più bassi nel mese di giugno rispetto ai mesi di maggio e luglio.

La quantità di *Vibrio spp.* ha mostrato valori lievemente in calo dal primo all'ultimo campionamento mentre la presenza di *Aeromonas spp.* è lievemente cresciuta.

GRUPPO C – PULIZIA RANDOM CON ALTRA POMPA

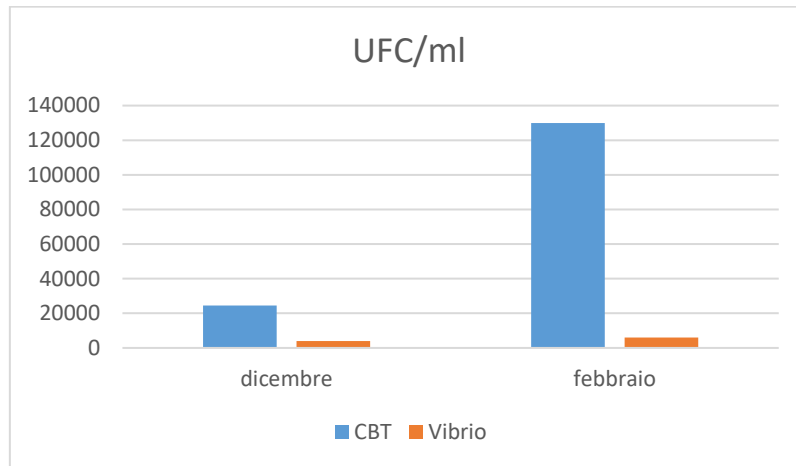
Questo Gruppo rappresenta il controllo negativo. In questo Gruppo, le vasche vengono pulite in base alle necessità e alle condizioni di allevamento, utilizzando una pompa standard con cadenza non programmata. Le vasche 1D e 2E sono state campionate a dicembre e febbraio; da maggio sono state sostituite dalle vasche 5D e 1E.

VASCA 1D



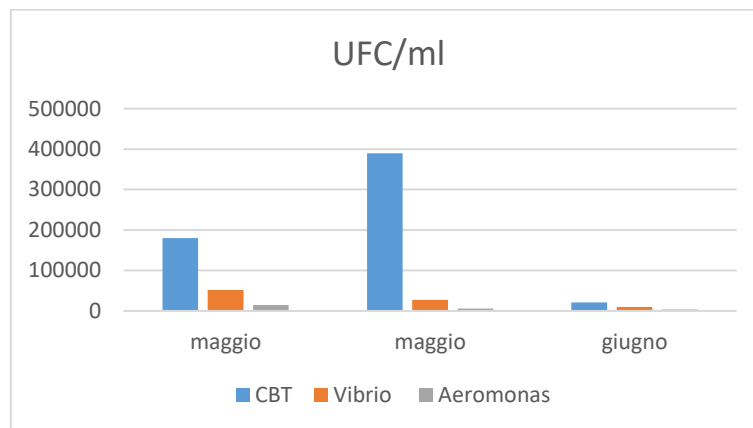
Il campionamento di febbraio mostra un lieve aumento della CBT da dicembre a febbraio mentre i *Vibrio spp* sono risultati bassi e stabili.

VASCA 2E



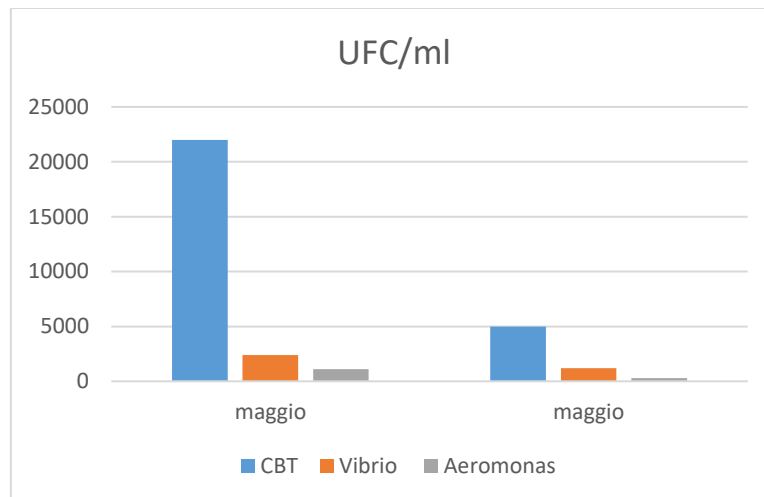
La CBT ha mostrato un aumento dal mese di dicembre al mese di febbraio mentre la quantità di *Vibrio spp.* è rimasta stabile.

VASCA 5D



In questa vasca, il secondo campionamento di maggio mostra un innalzamento della CBT e una drastica riduzione nel campionamento di giugno. Una lieve diminuzione si è anche registrata nella presenza di *Vibrio spp.* e di *Aeromonas spp.*

VASCA 1E

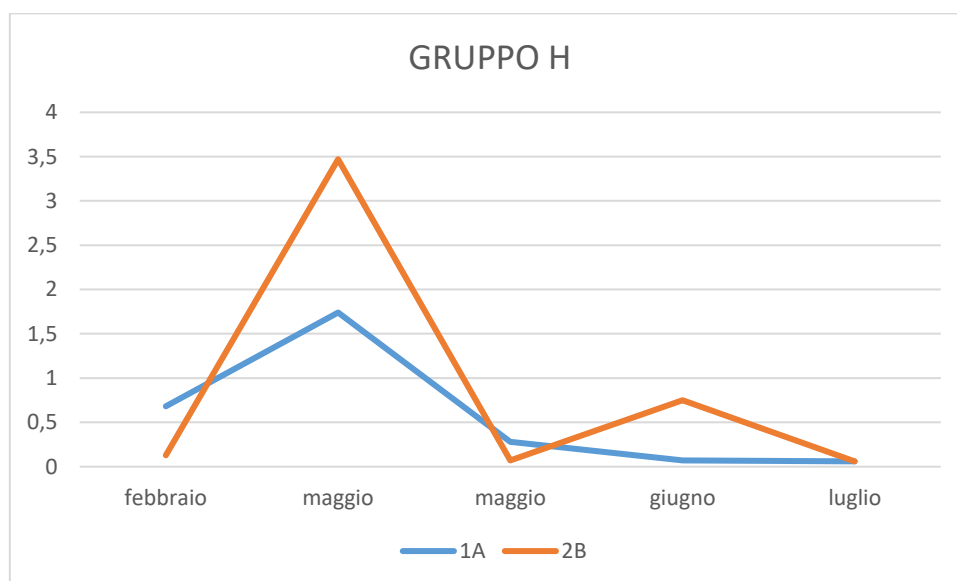


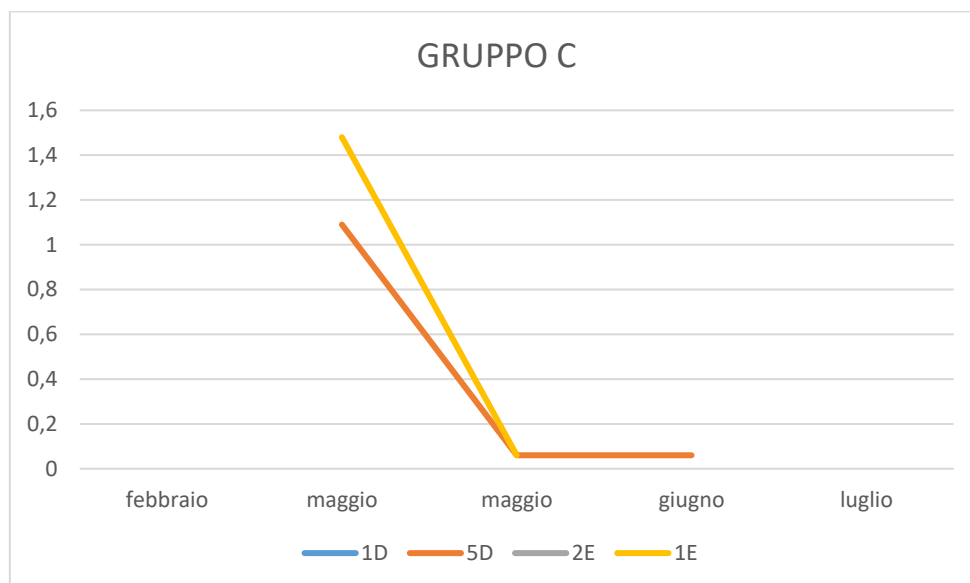
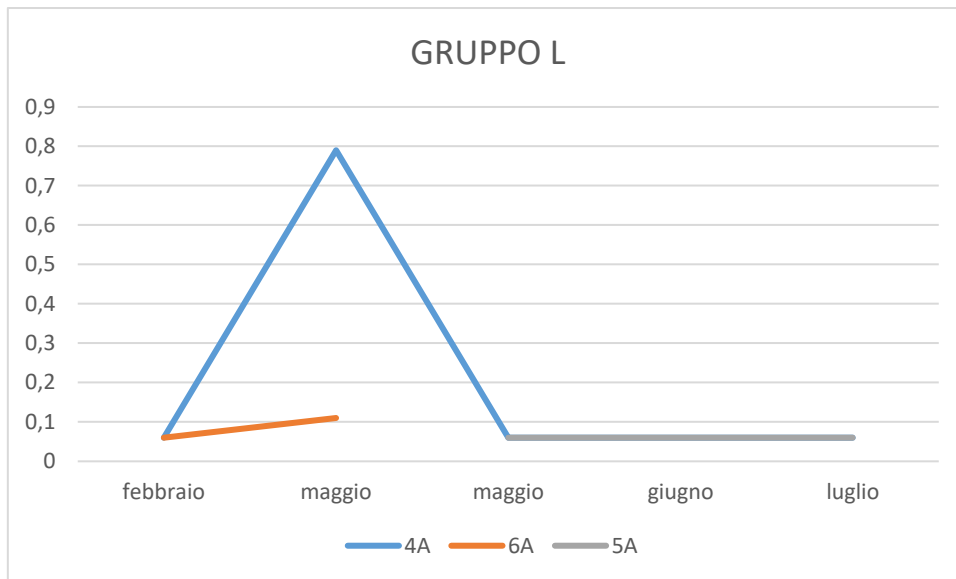
In questa vasca si osserva una diminuzione della CBT fra il primo e il secondo campionamento del mese di maggio. Anche *Vibrio spp.* e *Aeromonas spp.* mostrano una lieve diminuzione della carica.

Analisi chimiche

Ammoniaca

Di seguito vengono riportati i grafici riguardanti la concentrazione dell'ammoniaca dei 3 Gruppi, espressa in mg/l. I nitriti non vengono qui riportati in quanto sono stati un controllo interno e sono stati mandati alla azienda dopo ogni campionamento.

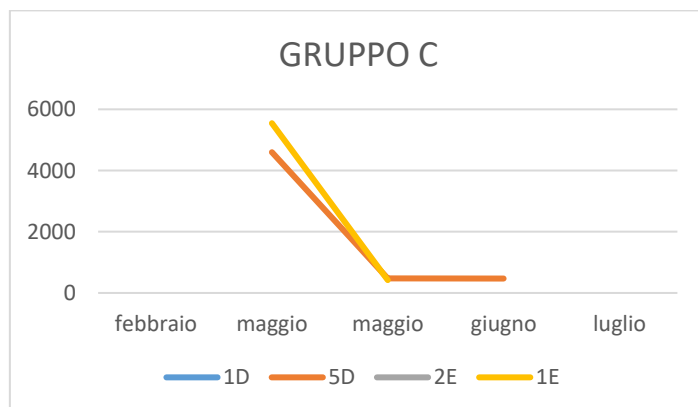
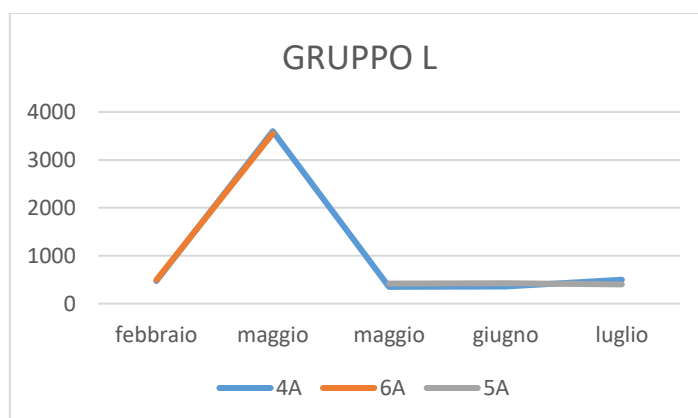
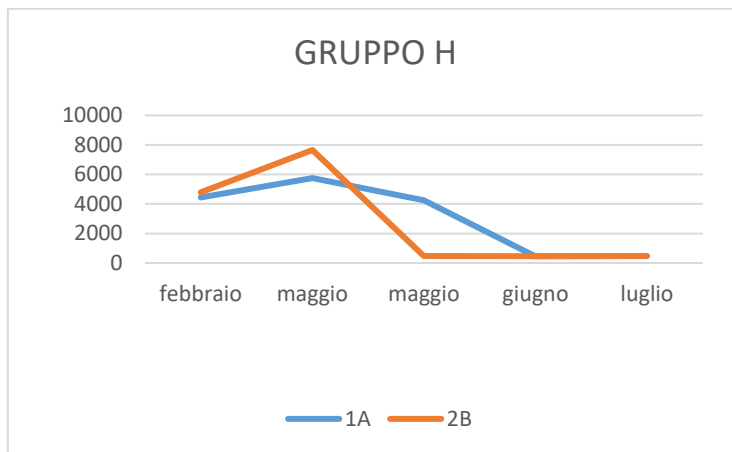




L'ammoniaca, tranne che in un picco di 3,5 mg/l nella vasca 2B nel mese di maggio, ha mostrato range da 0,06 a 1,74 mg/l in tutti i Gruppi osservati, rimanendo quindi a livelli non pericolosi per il benessere degli animali e comunque nei range previsti quando si hanno condizioni ambientali e di biomassa in vasca variabili come accade in allevamento. Non si sono notate differenze fra i Gruppi, ma nel tempo un trend positivo poiché la quantità di ammoniaca disciolta in acqua ha mostrato un andamento della curva in diminuzione, come mostrato nei grafici.

Azoto totale

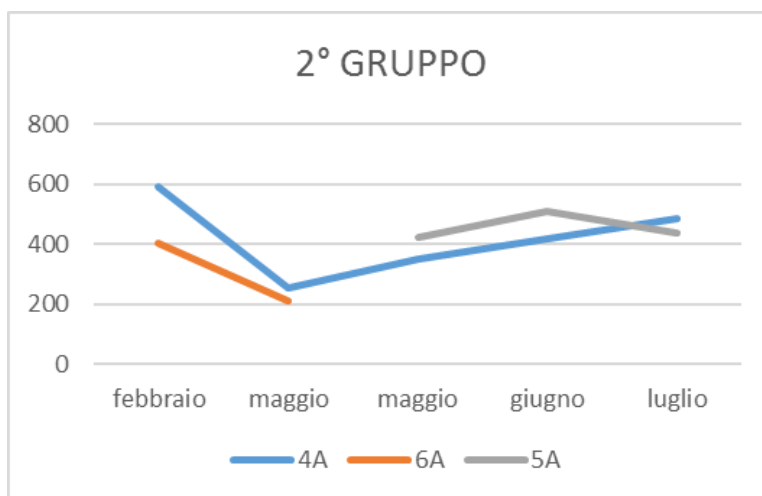
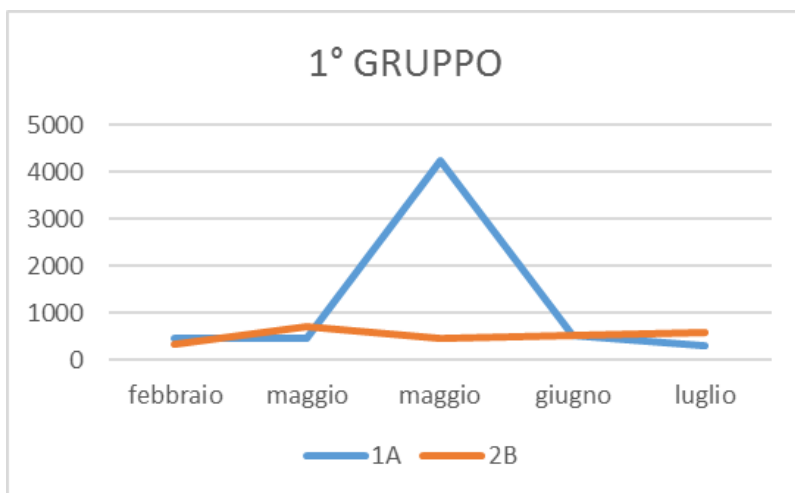
Di seguito vengono riportati i grafici riguardanti la concentrazione dell'azoto totale dei 3 Gruppi, espressa in $\mu\text{g/l}$.



Il trend relativo alle concentrazioni di azoto totale nelle vasche ha seguito l'andamento dell'ammoniaca, mostrando una diminuzione tendenziale nei tre Gruppi nel corso dei mesi di campionamento.

Fosforo totale

Di seguito vengono riportati i grafici riguardanti la concentrazione del fosforo totale dei 3 Gruppi, espressa in µg/l.





Per quanto riguarda il fosforo, non si notano particolari trend all'interno dei Gruppi osservati. In generale le concentrazioni sono al di sotto dei range considerati critici per il benessere dei pesci.

OSSERVAZIONI SULL'ANDAMENTO DELLO STATO DI SALUTE DELLE ORATE IN VASCA DURANTE LA SPERIMENTAZIONE (Maria Letizia Fioravanti – Monica Caffara)

Introduzione

In accordo con i responsabili dell'azienda Il Vigneto s.r.l., si è stabilito di condurre le osservazioni sullo stato di salute delle orate stabulate nelle vasche in sperimentazione dedicando specifica attenzione all'Enteromyxosi, una malattia parassitaria storicamente presente nell'allevamento in studio e di primaria importanza nella maricoltura mediterranea. Tale scelta è stata supportata anche dalle caratteristiche dell'agente eziologico, trasmissibile direttamente da pesce a pesce per via oro-fecale e fortemente influenzato da condizioni ambientali (*in primis* la temperatura) e gestionali (es. elevata densità di biomassa, inadeguate misure igienico-sanitarie, ecc.).

Cenni sull'Enteromyxosi da *Enteromyxum leei*

Le malattie parassitarie sostenute da Myxozoa stanno assumendo un ruolo di crescente rilievo nella maricoltura mediterranea quale causa di mortalità e peggioramento delle performance produttive negli stock ittici allevati. In particolare la Enteromyxosi da *Enteromyxum leei* è responsabile, nelle orate (*Sparus aurata*) ed in altri sparidi d'allevamento, di enteriti parassitarie che possono determinare seri problemi sanitari e notevoli perdite economiche, che possono arrivare anche ad incidere per il 20% sulla produzione annuale dei lotti di orata colpiti. Questo parassita è stato inoltre causa dell'abbandono dell'allevamento del sarago pizzuto (*Diplodus puntazzo*) in alcune aree del Bacino del Mediterraneo per le conseguenze devastanti causate nei lotti colpiti, con mortalità che possono raggiungere il 100%.

L'emergenza clinica della malattia si registra in genere in orate adulte di taglia superiore a 100-150 grammi, con un decorso caratterizzato da grave enterite, anoressia, anemia, emaciazione fino a cachessia (aspetto "a lama di rasoio" o "a coltello", in inglese rispettivamente *razor blade* o *knife syndrome*) con esito spesso fatale. Nell'orata è in grado inoltre di determinare un significativo ritardo della crescita, pur in presenza di indici contenuti di mortalità, sia negli allevamenti in gabbia che nei sistemi in vasche a terra.

Sebbene il ciclo vitale dei parassiti Myxozoa coinvolga generalmente due ospiti alternati, un pesce ed un invertebrato acquatico, la trasmissione spontanea diretta da pesce a pesce per via oro-fecale è stata dimostrata per le specie appartenenti al genere *Enteromyxum* in diversi pesci marini, inclusa l'orata, in condizioni di ambiente confinato (Sitjà-Bobadilla et al., 2007; Sitjà-Bobadilla & Palenzuela, 2012) (Fig. 1). In particolare, *E. leei* si trasmette direttamente da pesce a pesce per convivenza tra animali infetti e animali sani, contaminazione dell'acqua da parte di stadi infettanti del parassita o ingestione di materiale derivato da carcasse infette. Gli stadi responsabili dell'infezione da pesce a pesce non sono le tipiche mixospore (Fig. 2), ma stadi di sviluppo che vengono rilasciati dal pesce infetto nelle feci, insieme a detriti epiteliali intestinali (Fig. 3). Questo rilascio può essere abbondante a causa della risposta infiammatoria catarrale innescata dalla presenza di parassiti nell'epitelio intestinale. Questa modalità unica di trasmissione orizzontale favorisce la diffusione di questo parassita negli stock ittici d'allevamento. Sebbene il tempo di sopravvivenza di stadi di sviluppo infettanti per i pesci nell'acqua di mare sia stimato essere inferiore a 24 ore, è certamente sufficiente per garantire la trasmissione diretta, soprattutto in condizioni di alta densità di biomassa, scarso scambio idrico e permanenza di materiale infetto nella vasca/gabbia d'allevamento. Al contrario, le mixospore sono stadi più resistenti e possono sopravvivere per periodi più lunghi, ma non sono infettanti in via diretta per i pesci e si presume necessitino di un ospite invertebrato idoneo (ancora sconosciuto) per completare il loro sviluppo attraverso fasi di riproduzione sessuale.

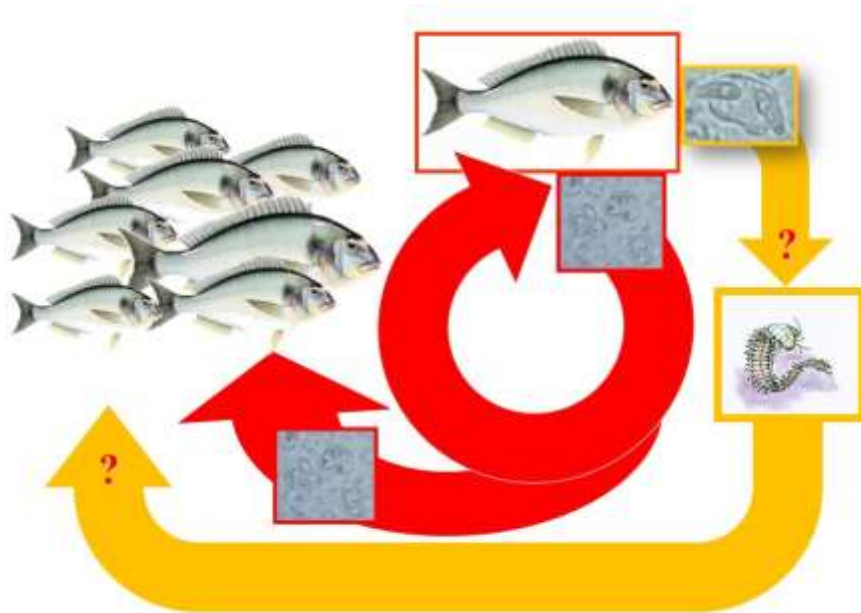


Figura 1: schema del ciclo biologico di *Enteromyxum leei* (freccie rosse: trasmissione diretta per via oro-fecale; freccia gialla: trasmissione naturale con passaggio obbligato attraverso un ospite invertebrato)



Figura 2: mixospore di *Enteromyxum leei* (barra = 10 μ m)

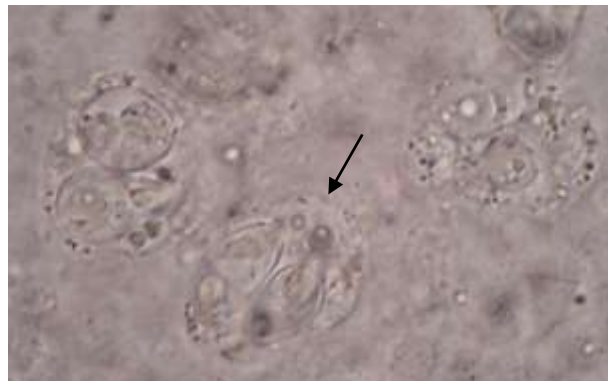


Figura 3: elemento infettante (freccia) responsabile della trasmissione diretta all'interno di stadi di sviluppo di *E. leei*

La t critico nella trasmissione del parassita e nell'insorgenza di Enteromyxosi. In condizioni di allevamento, la temperatura minima per lo sviluppo di Enteromyxosi clinica nell'orata di solito varia da 18 °C a 22 °C seppure focolai di malattia siano stati osservati soprattutto sopra i 20 °C, essendo ottimale per lo sviluppo del parassita un range compreso tra 20-25 °C. L'inizio della malattia viene ampiamente ritardato o addirittura soppresso a temperature inferiori a 15 °C, tuttavia il parassita può rimanere latente durante il periodo più freddo e riemergere quando la temperatura dell'acqua aumenta. Ciò ha importanti conseguenze epidemiologiche, in quanto in questo modo l'infezione può rimanere latente durante i periodi più freddi e dare picchi di mortalità elevati durante le stagioni più calde (Le Breton *et al.*, 1995; Rigos *et al.*, 1999).

Nell'orata produce una malattia cronica nei giovani e negli adulti, con mortalità dipendente dall'ospite e da fattori ambientali. In questa specie ittica l'emergenza clinica dell'infezione da *E. leei* è caratterizzata da anoressia e perdita di peso fino ad emaciazione e/o cachessia, che è evidente per la marcata atrofia del muscolo epiaissiale e le ossa prominenti della testa nei pesci gravemente colpiti. La presenza di ascite può in alcuni casi manifestarsi in rigonfiamento addominale. Macroscopicamente l'intestino appare con pareti semi trasparenti, zone congeste e muco luminale di consistenza liquida (Fig. 4). I tassi di mortalità direttamente connessi all'infezione parassitaria sono correlabili in gran parte alla tipologia della struttura d'allevamento e ad altri fattori gestionali ed ambientali, presentando valori contenuti in alcuni sistemi in gabbia a mare fino a raggiungere valori elevati in allevamenti a terra e soprattutto in sistemi chiusi che utilizzano acqua riscaldata. Molto spesso l'infezione causa un significativo ritardo della crescita, con peggioramento dell'Indice di Conversione, e mortalità negli esemplari adulti (generalmente > 100 g) in tutte le tipologie d'allevamento.

L'Enteromyxosi da *E. leei* è stata descritta in tutti i tipi di allevamenti ittici (RAS, vasche in cemento o PVC, vasche con fondo in terra e gabbie a mare). Negli allevamenti di orata, i principali fattori di rischio sono: alte



Figura 4: a sinistra orata affetta da Enteromyxosi con palese dimagrimento; a destra quadro di enterite da *E. leei*.

temperature dell'acqua durante tutto il ciclo di produzione; alta densità di biomassa; scarso ricambio di acqua e / o riutilizzo di acqua contaminata; inadeguate procedure igienico-sanitarie; sistemi di ricircolo; cicli d'allevamento estesi per la produzione di pesci di grandi dimensioni; non frequente rimozione dei morti e / o loro smaltimento inadeguato; bassi tassi di alimentazione che possono aumentare il cannibalismo. L'Enteromyxosi è stata anche associata alla sovralimentazione e all'uso di diete ad alto contenuto di grassi (Rigos *et al.*, 1999), in particolare alcune diete ricche di oli vegetali (Estensoro *et al.*, 2011) hanno dimostrato di aggravare la progressione e l'impatto della malattia nell'orata.

Le misure di biosicurezza da applicare per la prevenzione ed il controllo della Enteromyxosi si basano essenzialmente sui seguenti punti. In tutti i sistemi di allevamento, sarebbe necessario eseguire la quarantena ed il controllo dei pesci di nuova introduzione prima che vengano messi in contatto con altri pesci presenti nella struttura. Gli stock ittici provenienti da aree enzootiche dovrebbero essere sempre testati prima di introdurli in siti indenni da malattie. Inoltre, dovrebbero essere eseguiti controlli parassitologici durante l'intero ciclo produttivo per rilevare tempestivamente l'infezione e attuare adeguate misure di controllo. Il trattamento dell'acqua in ingresso e la disinfezione dei mezzi di trasporto e delle attrezzature aiuta a ridurre il rischio di trasmissione del parassita. Si dovrebbe evitare l'alimentazione dei pesci con diete inadeguate basate su un'elevata inclusione di componenti vegetali, selezionando mangimi proteici di alta qualità. Anche la sovralimentazione ed il sovraffollamento estremo dovrebbero essere evitati. I pesci deceduti dovrebbero essere rimossi il prima e il più frequentemente possibile. Negli allevamenti a terra è

essenziale evitare il ricircolo o il riutilizzo dell'acqua attraverso una corretta progettazione e posizionamento dei punti di presa e di scarico dell'acqua. Nei sistemi in gabbia, le gabbie dovrebbero essere preferibilmente esposte ad un'adeguata corrente, rispettando un'ampia distanza tra gabbie contenenti lotti diversi. Le reti dovrebbero essere pulite / cambiate con una frequenza maggiore nei periodi più a rischio (Fioravanti et al., 2020).

Nel caso dovesse essere diagnosticata l'Enteromyxosi, bisognerebbe ridurre la conduzione di procedure stressanti (come la manipolazione e il trasporto), diminuire la densità della biomassa, aumentare la frequenza di rimozione di carcasse ed il livello delle misure igienico-sanitarie. I pesci che si riprendono dall'Enteromyxosi sono resistenti alla reinfezione, il che rende ipotizzabile lo sviluppo futuro di strumenti di immunoprofilassi. Non ci sono attualmente trattamenti registrati efficaci contro *Enteromyxum leei*. Una combinazione di amprolium e salinomina ha dimostrato di essere parzialmente efficace in alcuni studi. Sono attualmente disponibili alcune soluzioni nutraceutiche per mitigare l'Enteromyxosi, come il butirrato di sodio BP-70® (Norel), Shield™ (Skretting) e Sanacore®GM (Adisseo) (Palenzuela et al., 2020).

L'Enteromyxosi non può essere diagnosticata solo sulla base dei segni clinici ed anatomo-patologici in quanto questi non sono patognomonic. Vanno quindi condotte tecniche diagnostiche volte ad evidenziare la presenza del parassita (mixospore o stadi di sviluppo) a livello intestinale mediante esami microscopici e/o analisi molecolari condotti su materiale prelevato dal tratto terminale dell'intestino ed in particolare dall'ampolla rettale.

Materiali e Metodi

Come già illustrato nella parte introduttiva della presente relazione, la sperimentazione volta a valutare gli effetti della pulizia semiautomatica del fondo di vasche di allevamento su parametri ambientali e stato igienico sanitario di orata (*Sparus aurata*) mantenuta in condizioni intensive è stata condotta da febbraio a luglio 2020 in vasche suddivise nei seguenti Gruppi sperimentali:

- ✓ Gruppo H - vasche 1A e 2B, in cui impiegare il robot Apneo per le operazioni di pulizia a cadenza quindicinale;
- ✓ Gruppo L - vasche 4A e 6A/5A, in cui impiegare il robot Apneo per le operazioni di pulizia a cadenza mensile;
- ✓ Gruppo C- vasche 1D/5D e 2E/1E, in cui condurre la pulizia del fondo secondo i normali protocolli aziendali ed identificate come controllo.

In previsione della sperimentazione prevista per i primi mesi del 2020, in accordo con l'azienda Il Vigneto s.r.l. nel mese di dicembre 2019 sono stati condotti due campionamenti di orate (per un totale di 30 esemplari) al fine di valutare preliminarmente la presenza di *E. leei* nelle vasche individuate per la prova. I dettagli relativi ai due campionamenti preliminari sono riportati nella tabella 1.

Data	N. vasca	N. esemplari	Peso medio (grammi)
4/12/2019	1A (H)	5	510
11/12/2019	2B (H)	7	285
4/12/2019	6A (L)	5	423
4/12/2019	4A (L)	5	336
11/12/2019	1D (C)	5	350
11/12/2019	2E (C)	3	400

Tabella 1: dettagli dei campionamenti effettuati in dicembre 2019.

Il periodo di sperimentazione è iniziato in febbraio 2020 e ha previsto campionamenti mensili di orate dalle vasche incluse nei 3 Gruppi sperimentali fino a luglio 2020. Nel corso della prova sono stati esaminati in totale 199 esemplari.

In tabella 2 sono riportati i dettagli dei campionamenti condotti durante la prova.

	Febbraio 11/02	Marzo 23/03	Aprile 20/04		Maggio 11/05	Giugno 16/06	Luglio 27/07
Vasca 1A/H	Peso g.	Peso g.	Peso g.		Peso g.	Peso g.	Peso g.
	557	672	324		591	141	530
	275	584	375		425	317	540
	490	633	326		549	497	659
	379	607	247		680	683	820
	244	376	367		394	995	523
		800	268		847		
			294				
			321				
			261				
N. esaminati	5	6	9		6	5	5
Vasca 2B/H	150	205	383		538	508	314
	335	475	461		606	279	310
	429	232	378		487	588	471
	405	245	330		259	303	447
	245	297	301		561	473	535
	251	482	335			317	
		490	270			350	
			258				
			307				
N. esaminati	6	7	9		5	7	5
Vasca 6A/L	504	849	280	5A/L	313	367	140
	572	367	329		284	304	165
	199	608	175		214	381	173
	428	416	158		209	336	194
	382	456	300		220	334	402
	387	700	269		243	271	
					170	217	

N. esaminati	6	6	6		7	7	5
Vasca 4A/L	480	286	360		435	555	327
	568	245	410		166	334	250
	441	322	323		297	550	372
	392	500	208		275	552	602
	502	200			573	419	669
		600				567	
		290					
		426					
		300					
		334					
N. esaminati	5	10	4		5	6	5
Vasca 1D/C	438	490	700	5D/C	555	414	
	397	531	820		299	454	
	166	522	717		436	469	
	170	564	509		407	389	
	286	425			541	509	
	524						
	610						
N. esaminati	7	5	4		5	5	
Vasca 2E/C	306	530	275	1E/C	724		
	504	450	476		503		
	538	420	281		548		
	495	472	456		742		
	681	587	532		529		
	424	372	441				
		445	456				
			455				
N. esaminati	6	7	8		5		
Totale esaminati	35	41	40		33	30	20

Tabella 2: dettagli dei campionamenti effettuati da febbraio a luglio 2020 (vasca/gruppo, data, peso di ogni esemplare esaminato, totale delle orate esaminate per ogni campionamento mensile).

A causa dell'emergenza COVID-19, i pesci campionati in marzo e aprile sono stati congelati subito dopo il campionamento direttamente in impianto e poi conferiti al laboratorio nel mese di maggio. Si è comunque deciso di estendere la durata della prova al fine di raccogliere ulteriori dati e consentire il completamento delle altre analisi in corso. Va inoltre evidenziato come, per esigenze gestionali e commerciali, nel corso della sperimentazione si siano dovute sostituire alcune vasche con altre; in questi casi si sono scelte vasche e lotti con caratteristiche sovrapponibili a quelle inserite nel protocollo.

La ricerca di *E. leei* è stata condotta mediante prelievo di una piccola goccia del contenuto dell'ampolla rettale mediante vetrino coprioggetto seguito da osservazione microscopica (10×-40 ×). Con questa metodica si possono osservare sia spore mature che stadi di sviluppo del parassita. In caso di negatività si procedeva a raschiare un più ampio tratto del retto con successiva osservazione microscopica.

Alcuni campioni dubbi all'esame microscopico, nonché alcuni esemplari di lotti inizialmente risultati positivi e poi negativi, sono stati sottoposti ad indagine molecolare mediante PCR con l'impiego di primers specie specifici che amplificano una porzione del 18S rRNA. In particolare è stata prelevata una piccola porzione dell'ampolla rettale da cui è stato estratto il DNA mediante kit del commercio (dati non pubblicati).

Risultati

Per quanto riguarda il campionamento preliminare condotto in dicembre 2019 a scopo conoscitivo, in tabella 3 sono riportati i risultati della ricerca di *E. leei* con indicazione del numero di positivi e relative percentuali di positività.

N. vasca	N. esemplari esaminati	N. esemplari positivi per <i>E. leei</i>
1A (H)	5	0
2B (H)	7	5 (71,4%)
6A (L)	5	0
4A (L)	5	3 (60%)
1D (C)	5	3 (60%)
2E (C)	3	0

Tabella 3: risultati delle analisi condotte per l'individuazione di *E. leei* nei campioni esaminati in dicembre 2019 a scopo conoscitivo.

Per quanto concerne i risultati ottenuti durante la sperimentazione, in tabella 4 vengono riportati i dati di positività per *E. leei* in riferimento alle singole vasche ed ai mesi di campionamento.

Vasca	Febbraio		Marzo		Aprile		Vasca	Maggio		Giugno		Luglio	
	E/P	%	E/P	%	E/P	%		E/P	%	E/P	%	E/P	%
1A (H)	5/0	0	5/0	0	9/0	0		6/0	0	5/0	0	5/0	0
2B (H)	6/6	100	7/5	71,4	9/4	44,4		5/0	0	7/2	28,6	5/0	0
6A (L)	6/0	0	6/0	0	6/0	0	5A (L)	7/6	85,7	7/3	42,8	5/1	20
4A (L)	5/0	0	10/8	80	4/0	0		5/1	20	6/0	0	5/1	20
1D (C)	7/6	85,7	5/0	0	4/0	0	5D (C)	5/0	0	5/0	0	-	-
2E (C)	6/5	83,3	7/0	0	8/4	50	1E (C)	5/0	0		-	-	-

Tabella 4: risultati delle analisi condotte per l'individuazione di *E. leei* nei campioni esaminati nel corso della sperimentazione (E/P=esaminati/positivi; %=percentuale di positività).

Al fine di condurre una valutazione dei risultati delle analisi parassitologiche anche in rapporto ad elementi di carattere gestionale e ambientale, sono stati raccolti i dati mensili relativi a temperatura, ossigeno disciolto, densità della biomassa e chilogrammi (kg) di morti per ogni vasca in studio, come dettagliato nella tabella 5.

Vasca 1A	T°	O ₂	BioM	Kg morti	Vasca 2B	T°	O ₂	BioM	Kg morti
Febbraio	21	4-6,3	43,7	20	Febbraio	21	6,6-8	32,9	500
Marzo	22	5,2-6	45,7	25	Marzo	22	5,8-7	33,2	345
Aprile	22	5,5-6,5	36,6	15	Aprile	22	6-7	34,1	70
Maggio	23	4,5-7	38,3	15	Maggio	23	6,5-7	36	30
Giugno	24	4,5-6,5	39,5	13	Giugno	24	5,6-7	38,3	14
Luglio	25	5,5-6,8	37	11	Luglio	25	5-6,5	41	13
Vasca 6A	T°	O ₂	BioM	Kg morti	Vasca 4A	T°	O ₂	BioM	Kg morti
Febbraio	21	6-7	39,6	50	Febbraio	21	5,6-7	33,4	250
Marzo	22	5-7	41	25	Marzo	22	6-6,5	34,3	180
Aprile	22	5,4-7,5	33,1	140	Aprile	22	5-6,8	34,1	100
Maggio 5A	23	4-5	34,4	65	Maggio	23	5,5-7,5	32,2	40
Giugno 5A	24	4,4-5,2	35,5	680	Giugno	24	5,5-6,5	35,1	30
Luglio 5A	25	5-6	39,4	605	Luglio	25	4,5-6	37,5	35
Vasca 1D	T°	O ₂	BioM	Kg morti	Vasca 2E	T°	O ₂	BioM	Kg morti
Febbraio	20	5,2-6,2	32,7	600	Febbraio	19	5-6,5	47,2	100
Marzo	21	4,8-6,4	33,3	565	Marzo	20	6,4-6,7	49,7	40
Aprile	22	5-5,7	35	330	Aprile	21	-	-	30
Maggio 5D	22	5-6,4	38,3	65	Maggio 1E	21	6,8-8	38	0
Giugno 5D	22	6-8,2	37,9	21					

Tabella 5: dati relativi a temperatura, ossigeno disciolto, densità della biomassa (BioM) e kg di morti per vasca e mese di sperimentazione.

Discussione dei risultati e considerazioni conclusive

In termini generali, sulla base dei risultati ottenuti dalle indagini condotte sull'andamento dell'infezione da *Enteromyxum leei* nelle vasche dei diversi Gruppi sperimentali, si può evincere che l'applicazione del sistema semiautomatico di pulizia mediante robot Apneo può presentare notevoli vantaggi nelle pratiche routinarie volte a migliorare la qualità igienico-sanitaria dell'ambiente di allevamento anche ai fini della riduzione della carica parassitaria in vasca.

In particolare, nelle due vasche (1A e 2B) del Gruppo H, in cui si è applicato un protocollo di pulizia del fondo mediante robot con cadenza quindicinale, si è assistito ad un mantenimento della situazione di negatività riscontrata fin dalle indagini preliminari nella vasca 1A, mentre nella vasca 2B si è osservato un abbassamento della percentuale di positività per *E. leei* da valori del 100% riscontrati in febbraio a valori progressivamente inferiori nell'ultimo periodo della prova.

Per quanto concerne le vasche del Gruppo L, in cui il protocollo di pulizia mediante robot è stato applicato con cadenza mensile, si sono avuti risultati analoghi in quanto nella vasca 6A la negatività riscontrata in febbraio si è mantenuta fino ad aprile e nella vasca 5A (che l'ha sostituita nei mesi successivi) si è assistito ad un decremento della percentuale di positività dall'85,7 al 20%. L'altra vasca del Gruppo L (4A) ha mostrato un andamento altalenante dei valori di positività ma con un abbassamento notevole negli ultimi 4 mesi, con valori massimi del 20%.

Di più difficile interpretazione risultano essere i risultati ottenuti nelle vasche del Gruppo C, in cui si sono applicate le procedure di pulizia routinarie (manualmente e random), in quanto nella vasca 1D si è assistito ad un abbassamento della percentuale di positività mentre nella vasca 5D (che l'ha sostituita nella prova negli

ultimi 2 mesi) non sono risultati positivi gli animali esaminati; nella vasca 2E i valori di positività, seppur altalenanti, hanno mostrato un mantenimento dell'infezione a valori del 50% anche dopo 3 mesi mentre nella 1E (che l'ha sostituita in maggio) non si è evidenziata positività.

I risultati ottenuti nel Gruppo H assumono maggiore rilievo quando posti in relazione ai dati relativi ai tassi di mortalità registrati nelle vasche 1A e 2B (Grafico 1 e 2): in entrambe le vasche si è infatti osservata nel corso della sperimentazione una diminuzione più o meno evidente della quantità di morti parallelamente al mantenimento della negatività (es. vasca 1A, da 20 a 11 kg/mese) o al decremento delle percentuali di positività (es. vasca 2B, da 500 a 13 kg/mese).

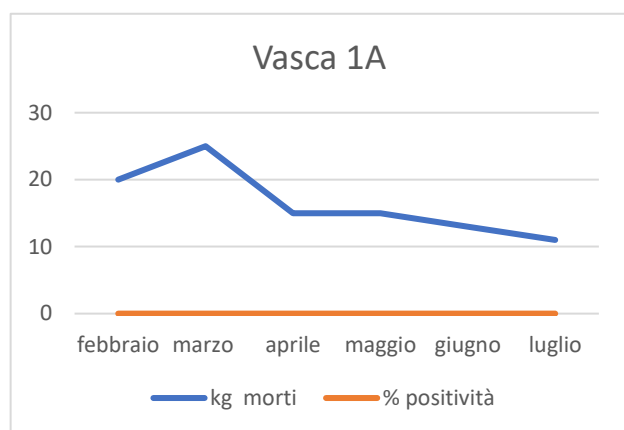


Grafico 1: andamento della percentuale di positività per *E. leei* e della mortalità mensile in vasca 1A.

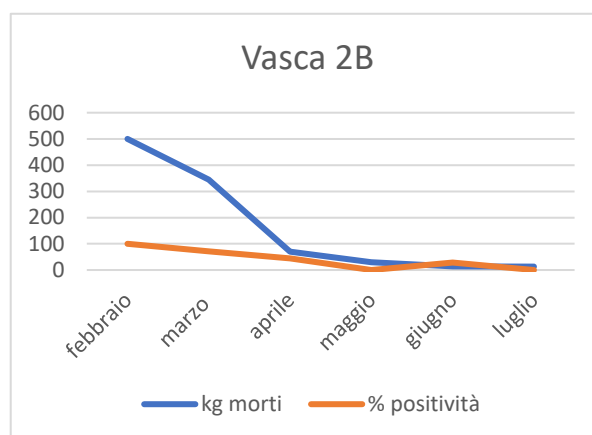


Grafico 2: andamento della percentuale di positività per *E. leei* e della mortalità mensile in vasca 2B

Similmente, nel Gruppo L si è registrato un progressivo decremento dei valori di mortalità durante la sperimentazione per quanto concerne la vasca 4A, parallelamente alla diminuzione delle percentuali di positività per *E. leei*, mentre nelle vasche 6A e 5A si sono osservati andamenti non correlabili ai valori di positività in quanto nella 6A le orate non sono mai risultate positive per il parassita, con un numero mensile di morti altalenante ma contenuto, mentre nella 5A i dati di mortalità hanno mostrato un andamento inverso rispetto alla diminuzione della percentuale di positività nei tre mesi di studio. Va però evidenziato come, in base ai dati forniti su nostra richiesta dal personale dell'azienda, nei mesi successivi al termine della sperimentazione in questa vasca si sia assistito ad un forte decremento della mortalità, registrando 60 kg nella seconda metà d'agosto e solo 5 kg nei primi 20 giorni di settembre. Tale andamento potrebbe indicare il progressivo ma lento miglioramento delle condizioni di salute della popolazione in vasca che, presentando valori di positività per *E. leei* molto alti all'inizio dell'applicazione del trattamento di pulizia semiautomatica, nei primi tre mesi sono comunque andati incontro alle manifestazioni cliniche della malattia con una

diminuzione della mortalità solo dopo che gli esemplari maggiormente colpiti erano andati incontro a morte e progressivo miglioramento dei tassi d'infezione e dello stato di salute nella popolazione rimanente. Va poi evidenziato, in relazione alle osservazioni condotte nelle vasche dei Gruppi H e L, come in queste vasche si siano raggiunti nel corso della sperimentazione valori di densità della biomassa molto elevate, fino a 45,7 Kg/m³ nella vasca 1A, 41 Kg/m³ nelle vasche 2B e 6A/5A, e la temperatura sia arrivata a 25°C in tutte

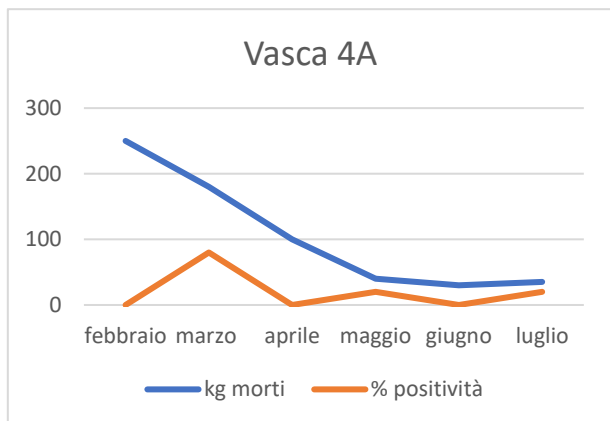


Grafico 3: andamento della percentuale di positività per *E. leei* e della mortalità mensile in vasca 4A.

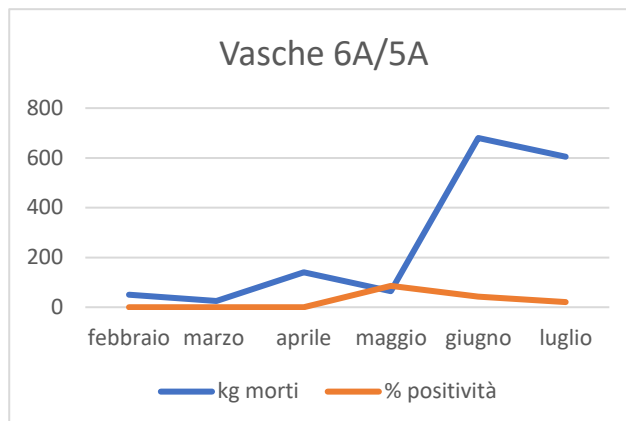


Grafico 4: andamento della percentuale di positività per *E. leei* e della mortalità mensile nelle vasche 6A/5A.

queste vasche, con valori minimi di 21°C. Poiché l'elevata densità di biomassa e l'elevata temperatura dell'acqua (>20 °C) rappresentano i fattori condizionanti più importanti per lo sviluppo di *E. leei* e per l'emergenza clinica della Enteromyxosi, appaiono essere ben supportati i risultati ottenuti dall'applicazione periodica del robot Apneo ai fini del controllo e/o della mitigazione di questa malattia parassitaria. Per quanto concerne le vasche del Gruppo C, risulta difficile porre in relazione l'andamento della parassitosi con il decremento della mortalità osservato nel corso della prova in quanto le orate allevate nelle vasche che hanno dovuto necessariamente sostituire quelle incluse inizialmente nella sperimentazione (1D e 2E) sono risultate negative per *E. leei*.

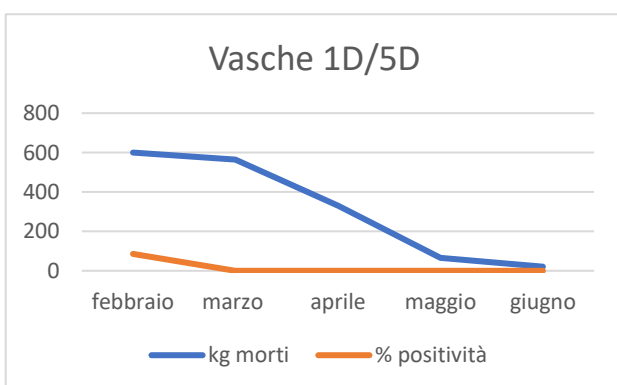


Grafico 5: andamento della percentuale di positività per *E. leei* e della mortalità mensile nelle vasche 1D/5D.

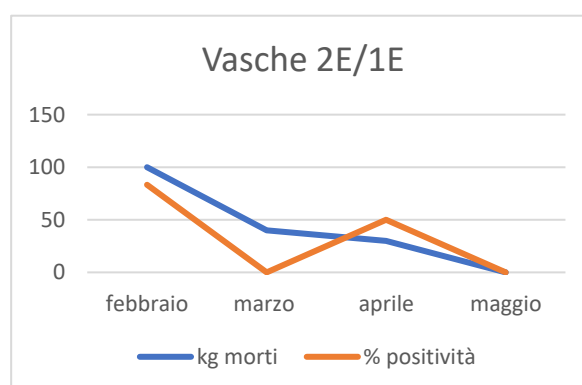


Grafico 6: andamento della percentuale di positività per *E. leei* e della mortalità mensile nelle vasche 2E/1E.

La forte influenza della temperatura dell'acqua sull'andamento dell'infezione e sulla gravità clinica della Enteromyxosi non può far escludere che i valori di temperatura registrati in queste vasche, sempre inferiori

di almeno un paio di gradi rispetto a quelli rilevati nelle vasche dei Gruppi H e L, abbiano potuto condizionare il decorso clinico della malattia.

Discussioni e Conclusioni

L'osservazione e le analisi effettuate durante il periodo di utilizzo del robot Apneo hanno interessato da una parte la qualità delle acque, per concentrazione batteriche e dei principali patogeni e caratteristiche chimiche, dall'altro lo stato sanitario degli animali.

Per quanto riguarda la concentrazione batterica, sono molti i fattori che ne determinano la quantità in acqua: la biomassa dei pesci, la quantità di alimento somministrato, da quantità mangime non consumato, la quantità di sedimento oltre a temperatura e ai ricambi di acqua. Per quanto riguarda questo specifico studio



anche il momento di campionamento rispetto all'ultima pulizia può essere un fattore che influenza la carica batterica a fronte della movimentazione del sedimento del fondo che può certamente modificare i risultati delle analisi.

Dai risultati delle analisi batteriche, non emergono particolari e chiare differenze fra i Gruppi osservati, con oscillazioni quantitative che non evidenziano trend, né legati alla modalità di pulizia né legati al momento stagionale dei campionamenti. Si può tuttavia ritenere nel complesso che la carica batterica in acqua risulti nei range di concentrazioni compatibili con un adeguato benessere degli animali.

Anche la quantità degli analiti analizzati legati al metabolismo dei pesci quali ammoniaca, azoto totale e fosforo ha mostrato nel complesso valori che descrivono una condizione di tipo ambientale compatibile e favorente il benessere degli animali. Si registra in un solo campionamento una concentrazione anomala di ammoniaca pari a 3,5 mg/l che risulta particolarmente alta e potenzialmente dannosa per gli animali. Non si sono notati effetti peggiorativi o migliorativi da parte delle varie tecniche di produzione su nessuno degli analiti considerati.

Per quanto riguarda lo stato sanitario dei pesce, pur dovendo rilevare come questa sperimentazione, essendo inserita nel ciclo produttivo di un'azienda, abbia dovuto rispettare alcune opzioni (ad esempio la numerosità campionaria ed il cambiamento di vasca al termine di un ciclo di produzione) ed il fatto che lo studio degli effetti positivi dell'applicazione del robot Apneo sull'andamento dell'Enteromyxosi in allevamento potrebbe trovare maggiori evidenze in sperimentazioni di più lungo corso, si possono senz'altro evidenziare dai risultati di questo studio vantaggi sia sanitari che economici derivanti dall'utilizzo routinario di questo sistema semiautomatico di pulizia. La sua applicazione sistematica permette infatti, oltre al raggiungimento di un maggiore rapporto costi-benefici delle operazioni di pulizia in vasca, di ridurre la quantità ed i tempi di permanenza in acqua degli stadi infettanti di *E. Ieei* e quindi di mitigare gli effetti patogeni del parassita in condizioni di allevamento intensivo.

In conclusione, l'uso del robot Apneo in sostituzione alle attività standard di pulizia manuale non ha determinato evidenti peggioramenti o compromissioni delle qualità dell'acqua sia microbiologica sia chimica e dello stato sanitario dei pesci.

Se si considera che l'uso del robot può sostituire l'attività manuale di un operatore che normalmente deve svolgere questo tipo di lavoro immerso in acqua per molte durante la giornata e in tutte le stagioni dell'anno,

si può concludere che l'automatizzazione della pulizia del fondo vasche rappresenta un valido e innovativo strumento per ridurre il carico orario finalizzato a questa attività permettendo inoltre un miglioramento delle condizioni e qualità lavorative degli operatori impegnati in impianto.

Cesenatico 09/10/2020

Il Responsabile della Ricerca

Alessio Bonaldo

Handwritten signature of Alessio Bonaldo in blue ink.

Bibliografia

Estensoro I., Benedito-Palos L., Palenzuela O., Kaushik S., Sitjà-Bobadilla A., Pérez-Sánchez J. (2011). The nutritional background of the host alters the disease course in a fish-myxosporean system. *Veterinary Parasitology* **175**: 141-150.

Fioravanti M.L., Mladineo I., Palenzuela O., Beraldo P., Massimo M., Gustinelli A., Sitjà-Bobadilla A. (2020). Fish farmer's guide to combating parasitic infections in European sea bass and gilthead sea bream aquaculture. A series of ParaFishControl guides to combating fish parasite infections in aquaculture. Guide 4. Eds. Sitjà-Bobadilla, A. & Bello-Gómez, E. e-NIPO: 833-20-104-5.

Rigos G., Christophilogiannis P., Yiagnisi M., Andriopoulou A., Koutsodimou M., Nengas I., Alexis M. (1999). Myxosporean infections in Greek mariculture. *Aquaculture International* **7**: 361–364.

Sitjà-Bobadilla A., Palenzuela O. (2012). *Enteromyxum* species In: Fish Parasites: Pathobiology and Protection Editors: Woo, PTK. & Buchmann K. pp. 163 - 176. CABI Publishing, 2012.

Sitja-Bobadilla, A., Diamant, A., Palenzuela, O., Alvarez-Pellitero, P. (2007). Effect of host factors and experimental conditions on the horizontal transmission of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) to gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., and European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **30**: 243-250.

Palenzuela O., Del Pozo R., Piazzon M.C., Isern-Subich M.M., Ceulemans S., Coutteau P., Sitjà-Bobadilla A. (2020). Effect of a functional feed additive on mitigation of experimentally induced gilthead sea bream *Sparus aurata* enteromyxosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, **138**: 111–120.