

F. TULLI, M. BRUNO, M. MESSINA, G. CARDINALETTI, G. GIORGI¹, I. GALGANI¹,
M.R. TREDICI¹, G. CHINI ZITTELLI², B.M. POLI¹, E. TIBALDI

Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (Di4A), Università di Udine,
Via Sondrio, 2 - 33100 Udine, Italia.
francesca.tulli@uniud.it

¹Dip. di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze, Firenze, Italia.

²CNR-Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Firenze, Italia.

RISPOSTA DEL BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*) A DIETE CHE INCLUDONO MICROALGHE MARINE QUALI INGREDIENTI SOSTENIBILI

RESPONSE OF EUROPEAN SEA BASS (DICENTRARCHUS LABRAX) TO DIETS INCLUDING MARINE MICROALGAE BIOMASS AS SUSTAINABLE INGREDIENTS

Abstract - For a sustainable aquaculture industry, current levels of fish meals/oils in aquafeeds need to be drastically reduced and mostly replaced by alternate counterparts. In this context, the use of marine microalgae in aquafeeds has recently attracted much scientific attention due to their high protein content and lipid levels, including ω -3 long-chain PUFAs. In the present study, we investigated the growth performance and body composition of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L., 1758) in response to diets where graded levels of a blend of two marine microalgae (*Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) and *Tetraselmis suecica*) were included in low fish meal/oil diets. The microalgae-containing aquafeeds were also compared to a diet (negative control) with a 30:70 fish to vegetable protein-lipid ratios. Fish given the positive control feed and those fed diets including graded levels of microalgae showed similar growth performance and feed conversion ratios which were significantly better than those attained by fish fed the negative control diet (B.W. 420 vs 388 g, SGR 0.69 vs 0.61, FCR, 1.7 vs 1.9, $p < 0.05$). The effects of the dietary microalgae inclusion on fillet fatty acid composition and intestinal brush border enzyme activity were also considered.

Key-words: *Isochrysis* (T-ISO), *Tetraselmis suecica*, fish quality, growth performance, *Dicentrarchus labrax*.

Introduzione - Negli ultimi decenni la ricerca ha esplorato possibili alternative alle farine e agli oli di pesce impiegati nell'alimentazione delle specie ittiche ad uso commerciale. Tale interesse finora si è rivolto soprattutto verso ingredienti vegetali di origine terrestre spesso in competizione con l'uso diretto per l'alimentazione animale e umana o più recentemente per la produzione di biomasse a fini energetici (Kaushik *et al.*, 2004; Messina *et al.*, 2013; Tibaldi *et al.*, 2006). Grazie anche alle innovazioni tecnologiche che fanno presagire una disponibilità maggiore ed economicamente più sostenibile (Tredici e Rodolfi, 2004; Bosma *et al.*, 2010), di recente è stata considerata la possibilità di impiegare le microalghe quali possibili ingredienti nelle diete composte per l'alimentazione di specie ittiche (Tulli *et al.*, 2012; Valente *et al.*, 2006) al di là del loro impiego consolidato nelle avannotterie (Kiron *et al.*, 2012; Nandeeshia *et al.*, 2001; Palmegiano *et al.*, 2005; Vizcaino *et al.*, 2014; Walker e Berlinsky, 2011). In particolare due specie di microalghe marine presentano caratteristiche che rispondono allo scopo: *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher, 1959 e *Isochrysis galbana* Parke, 1949. La prima si caratterizza per un tenore proteico medio-elevato (49% sulla sostanza secca) e recenti ricerche ne hanno evidenziato le possibilità di impiego in parziale sostituzione della farina di pesce nell'alimentazione in fase giovanile di diverse specie ittiche sia onnivore che carnivore. Anche nel branzino, *T. suecica* è stata inclusa con successo nella formulazione dietetica fino a sostituire il 20% della proteina da farina di pesce senza alterarne le prestazioni produttive (Tulli *et al.*, 2012). *Isochrysis* sp., invece, abbina livelli medi di proteina (45% s.s.) con un alto tenore lipidico (27% s.s.) caratterizzato peraltro da un elevato

contenuto in acidi grassi polinsaturi a lunga catena (LC-PUFA), in particolare DHA. Recenti ricerche hanno evidenziato che tale biomassa algale può essere inclusa con successo nella dieta del branzino per sostituire fino al 20% della proteina e il 36% della quota lipidica apportata da fonti marine convenzionali (Tibaldi *et al.*, 2015). In questo contesto, lo scopo della presente ricerca è stato quello di valutare gli effetti dell'inclusione dietetica di una miscela di *T. suecica* e *I. aff. galbana* in sostituzione della farina e dell'olio di pesce sulle prestazioni di accrescimento e sul metabolismo del branzino.

Materiali e metodi - È stata formulata una dieta a base di farina di pesce (FM), farine vegetali convenzionali (glutine di frumento e farina di estrazione di soia), olio di pesce e olio di palma (dieta C+). A partire da tale formulazione sono state disegnate 4 ulteriori diete isoproteiche (47% s.s.) e isolipidiche (17,5% s.s.). Le diete IsoTetra15, IsoTetra30, IsoTetra45 prevedevano la sostituzione della proteina apportata dalla farina di pesce in quote pari al 15, 30 e 45%, con una miscela (2:1) di *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) e *Tetraselmis suecica*. Nella quarta dieta (C-), per simulare le formulazioni commerciali attualmente in uso, il livello di sostituzione della proteina da FM corrispondente alla dieta IsoTetra45, è stato ottenuto con la sola inclusione di farine vegetali convenzionali (Tab. 1). Le diete sono state offerte a sazietà a 180 branzini (*Dicentrarchus labrax*, L., 1758) di peso iniziale 204,3±1,08 g suddivisi in 15 vasche per 15 settimane in condizioni ambientali controllate (temperatura 21 °C; salinità 28 psu; ossigeno disciolto 6,14 mg/L; N-NH₃ 0,11 mg/L; N-NO₂ 0,09 mg/L; fotoperiodo 12L:12B) secondo un disegno sperimentale monofattoriale randomizzato con tre repliche per trattamento. Il consumo di alimento è stato registrato giornalmente. I pesci sono stati pesati per gruppo in condizioni di moderata sedazione (soluzione alcolica di olio di chiodi di garofano 70% v/v) a cadenza quindicinale dopo 24 ore di digiuno. Le biomasse microalgali sono state prodotte presso l'Istituto per lo studio degli Ecosistemi del CNR (FI) mediante fotobioreattori verticali Green Wall Panel (GWP®-I) (Chini Zittelli *et al.*, 2013; Tredici e Rodolfi, 2004), successivamente liofilizzate e conservate a -20 °C fino al loro impiego come ingredienti nelle formulazioni.

Tab. 1 - Caratteristiche delle diete sperimentali.

Characterization of the experimental diets.

	C+	IsoTetra15	IsoTetra30	IsoTetra45	C-
Lipidi da farina ed olio di pesce (%)	50	45	40	36	50
Lipidi da microalghe (%)	0	7	14	21	0
Proteina da FM (%)	50	44	38	32	30
Proteina da fonti vegetali convenzionali (%)	50	50	50	50	70
Proteina da microalghe (%)	0	6	12	18	0
Sostituzione della proteina da FM con proteine da microalghe (%)	0	15	30	45	0

Al termine della prova, sulla base dei rilievi ponderali e dei consumi di alimento per gruppo/vasca, sono stati valutati i principali parametri zootecnici (tasso di accrescimento specifico, TAS; indice di conversione alimentare, ICA) e 2 animali per vasca sono stati sacrificati per la caratterizzazione chimica della porzione edule [lipidi totali (Folch *et al.*, 1957) e acidi grassi mediante gascromatografia (Christie, 2003)] e per la valutazione dell'attività a livello dell'orletto a spazzola di alcuni enzimi (maltasi, saccarasi, fosfatasi alcalina, γ -glutamyl-transpeptidasi) in diversi tratti

(cieco pilorico, intestino anteriore e posteriore) del digerente (Tibaldi *et al.*, 2006). I dati sperimentali sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e, se opportuno, le medie sono state confrontate tramite il test di Duncan. Le differenze sono state considerate significative per $P < 0,05$.

Risultati - I parametri di accrescimento e di utilizzazione dell'alimento non sono stati influenzati dai trattamenti dietetici (peso finale, $420 \pm 14,5$ g, TAS, $0,68 \pm 0,003$, ICA, $1,7 \pm 0,11$, $P > 0,05$). La qualità della componente lipidica dei filetti, invece, è risultata sostanzialmente influenzata dai trattamenti dietetici. La caratterizzazione chimica degli acidi grassi del filetto ha messo in evidenza come le diete che includevano le biomasse microalgali sono risultate in un rapporto PUFA n3/n6 significativamente più elevato rispetto alla dieta C- ($1,4$ vs $1,2$; $P < 0,05$) (Tab. 2). La presenza delle microalghe non ha indotto, altresì, alterazioni delle capacità digestive e di integrità intestinale come evidenziato dai valori di attività enzimatica riscontrati nei diversi tratti del digerente ($5,71 \pm 0,78$ e $1,75 \pm 0,15$ U/mg proteina, rispettivamente per maltasi e saccarasi; $286,9 \pm 10,79$ e $3,07 \pm 0,55$ U/mg proteina, rispettivamente per fosfatasi alcalina e γ -glutamyl-transpeptidasi, $P > 0,05$).

Tab. 2 - Composizione (%) in acidi grassi del filetto di branzini alimentati con le diete sperimentali per 15 settimane.

Fillet muscle fatty acids composition (%) of sea basses fed with the test diets over 15 weeks.

	C+	IsoTetra15	IsoTetra30	IsoTetra45	C-	ESM (g.l. 40)
SFA	31,6 ^{bc}	33,3 ^a	32,4 ^{ab}	32,7 ^{ab}	31,1 ^c	1,40
MUFA	33,5 ^a	32,4 ^{ab}	31,0 ^c	31,7 ^{bc}	33,5 ^a	1,58
n-6PUFA	13,6 ^{bc}	13,1 ^c	13,8 ^b	14,0 ^b	14,6 ^a	0,71
n-3PUFA	18,3 ^{ab}	18,3 ^{ab}	18,8 ^a	18,6 ^{ab}	17,8 ^b	2,00
n-3/n-6	1,3 ^{ab}	1,4 ^a	1,4 ^a	1,33 ^{ab}	1,2 ^b	0,15

Conclusioni - Le biomasse microalgali marine possono contribuire a contenere l'impiego di farine ed oli di pesce nell'alimentazione delle specie ittiche carnivore senza inficiarne le prestazioni produttive e migliorando alcuni aspetti della qualità del prodotto. Considerata la risposta integrata del branzino, l'impiego dietetico di una miscela che combina i pregi nutrizionali di entrambe le specie microalgali oggetto del presente studio si è dimostrato idoneo a sostituire i derivati del pesce in misura superiore rispetto all'impiego quale ingrediente dietetico della sola *T. suecica* (Tulli *et al.*, 2012) o *Isochrysis* (T-ISO) (Tibaldi *et al.*, 2015) sia in termini di accrescimento che di qualità nutrizionale del prodotto.

Ringraziamenti: Si desidera ringraziare G.P. Martincig del Dip. di Scienze Agroambientali, Ambientali e Animali dell'Università di Udine per l'assistenza tecnica durante la sperimentazione.

Bibliografia

- BOSMA R., VERMUË M.H., TRAMPER J., WIJFFELS R.H. (2010) - Towards increased microalgal productivity in photobioreactors. *Int. Sugar J.*, **112** (1334): 74-85.
- CHINI ZITTELLI G., RODOLFI L., BASSI N., BIONDI N., TREDICI M.R. (2013) - Photobioreactors for microalgal biofuel production. In: Borowitzka M.A., Moheimani N.R. (eds), *Algae for Biofuels and Energy*. Springer, London: 115-131.
- CHRISTIE W.W. (2003) - *Lipid Analysis: isolation, separation, identification and structural analysis of lipids*. 3rd ed. The Oily Press: 416 pp.
- FOLCH J., LEES M., SLOANE STANLEY G.H. (1957) - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**: 497-509.

- KAUSHIK S.J., COVÈS D., DUTTO G., BLANC D. (2004) - Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **230**: 391-404.
- KIRON V., PHROMKUNTHONG W., HUNTLEY M., ARCHIBALD I., DE SCHEEMAKER G. (2012) - Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. *Aquacult. Nutr.*, **18**: 521-531.
- MESSINA M., PICCOLO G., TULLI F., MESSINA C.M., CARDINALETTI G., TIBALDI E. (2013) - Lipid composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fed diets containing wheat gluten and legume meals as substitutes for fish meal. *Aquaculture*, **376-379**: 6-14.
- NANDEESHA M.C., GANGADHARA B., MANISSERY J.K., VENKATARAMAN L.V. (2001) - Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.*, **80**: 117-120.
- PALMEGIANO G.B., AGRADI E., FORNERIS G., GAI F., GASCO L., RIGAMONTI E., SICURO B., ZOCCARATO I. (2005) - *Spirulina* as a nutrient source in diets for growing sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquac. Res.*, **36** (2): 188-195.
- TIBALDI E., CHINI ZITTELLI G., PARISI G., BRUNO M., GIORGI G., TULLI F., VENTURINI S., TREDICI M.R., POLI B.M. (2015) - Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp. (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*, **440**: 60-68.
- TIBALDI E., HAKIM Y., UNI Z., TULLI F., DE FRANCESCO M., LUZZANA U., HARPAZ S. (2006) - Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, **261**: 182-193.
- TREDICI M.R., RODOLFI L. (2004) - Reactor for industrial culture of photosynthetic microorganisms. PCT Patent WO 2004/074423 A2.
- TULLI F., CHINI ZITTELLI G., GIORGI G., POLI B.M., TIBALDI E., TREDICI M.R. (2012) - Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, **21**: 1-11.
- VALENTE L.M.P., GOUVEIA A., REMA P., MATOS J., GOMES E.F., PINTO I.S. (2006) - Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, **252**: 85-91.
- VIZCAÍNO A.J., LÓPEZ G., SÁEZ M.I., JIMÉNEZ J.A., BARROS A., HIDALGO L., CAMACHO-RODRÍGUEZ J., MARTÍNEZ T.F., CERÓN-GARCÍA M.C., ALARCÓN F.J. (2014) - Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*, **431**: 34-43.
- WALKER A.B., BERLINSKY D.L. (2011) - Effects of partial replacement of fish meal protein by microalgae on growth, feed intake, and body composition of Atlantic cod. *N. Am. J. Aquacult.*, **73**: 76-83.

La ricerca è stata finanziata da Progetti di Ricerca Scientifica delle Università di Firenze e Udine, Finanziamento EX 60%-2010.