

***MESSA A PUNTO DI METODI
ECOTOSSICOLOGICI***

Dott. Federico Piovani

**Tutor:
Dott.ssa Stefania Balzamo**

INDICE

1 INTRODUZIONE	3
2 TEST ECOTOSSICOLOGICI	4
2.1 Fattori ambientali che caratterizzano le prove ecotossicologiche con particolare riferimento a quelle ittiotossicologiche:.....	7
2.2 Organismi acquatici cavia	8
3 CENNI SULLA SPECIE ITTICA DICENTRARCUS LABRAX (BRANZINO)	10
3.1 Biologia generale del branzino	10
3.2 Aspetti etologici	11
3.3 Riproduzione.....	11
3.4 Stadi larvali e giovanili	12
4 ALLEVAMENTO IN LABORATORIO DI STADI LARVALI DI D. LABRAX DA DESTINARSI ALL'ESECUZIONE DI SAGGI ECOTOSSICOLOGICI.....	13
4.1 Reperimento degli organismi	13
4.2 Strumentazione necessaria.....	13
4.3 Trasporto in laboratorio	14
4.4 Stabulazione	14
4.5 Struttura impiantistica	15
4.6 Regolazione e controllo dei parametri chimico-fisici.....	17
4.7 Alimentazione con <i>Artemia salina</i> e <i>Artemia nana</i>	17
4.8 Riattivazione delle cisti	17
4.9 Raccolta naupli	18
4.10 Mantenimento dell'allevamento	18
4.11 Controllo dell'idoneità degli organismi.....	18
5 SPERIMENTAZIONE	19
5.1 Comportamento ed evoluzione delle larve osservate	20
5.2 Osservazioni al microscopio.....	23
6 CONCLUSIONI	24
7 TOSSICO DI RIFERIMENTO DEI TEST ESEGUITI CON LARVE E GIOVANILI DI <i>Dicentrarchus Labrax</i> L.	25
8 TEST PRELIMINARE DI TOSSICITA' ACUTA CON LARVE DI <i>Dicentrarchus Labrax</i> L.	25
8.1 Protocollo operativo: fasi precedenti al test	26
8.2 Test preliminare e definitivo di tossicità acuta (48 - 96 h) con SLS	27
9 RISULTATI	33
10 TEST PRELIMINARI DI TOSSICITA' ACUTA CON GIOVANILI DI <i>Dicentrarchus Labrax</i> L.	34
10.1 Protocollo operativo	35
10.2 Test preliminare di tossicità acuta (48 h) con SDS	36
10.3 Test definitivo di tossicità acuta (48 h) con SDS	38
11 RISULTATI	39
11.1 Acclimatazione degli organismi	39
11.2 Parametri test acuto con tossico di riferimento (SDS).....	39
12 CONCLUSIONI	42
BIBLIOGRAFIA	43
1 ALLEGATO: Eutrofizzazione delle acque costiere dell'Emilia-Romagna	50

1.1 Introduzione.....	50
1.2 Materiali e Metodi	51
1.3 Risultati.....	54

1 INTRODUZIONE

Per una corretta e rapida valutazione dell'integrità biologica si va diffondendo l'uso di particolari indicatori, soprattutto nei confronti delle acque lotiche dolci, che generalmente fanno riferimento a specifiche comunità biologiche, ad esempio le comunità macrobentoniche, la fauna ittica (Bianco, 1990), la distribuzione del fitoplancton e della vegetazione acquatica (Klemm, 1993), e i parassiti dei pesci (Williams, 1994).

“L'indicatore è una risposta biologica in grado di stimare o prevedere gli effetti di varie cause di stress sull'ambiente” (Ghetti, 1997), e viene utilizzato anche come criterio di classificazione delle acque.

Anche nei confronti delle acque marine si stanno predisponendo procedure che consentano l'interpretazione dello stato ecologico marino attraverso indicatori idonei (Klemm, 1994; Chapman, 1995).

Dal punto di vista conoscitivo, si ritiene necessario affiancare agli indicatori di norma usati valutazioni di tipo ecotossicologico perché più adatte alla verifica di eventuali effetti tossici per gli organismi acquatici esposti (D. Lgs. 152/99).

Per quanto concerne gli organismi acquatici impiegati nello svolgimento di prove di tossicità, la gamma è estremamente ampia essendo in molti casi correlata alla disponibilità ed alla volontà di svolgere i test su animali autoctoni. Anche in questo campo è noto che, nell'ultimo ventennio, sono stati compiuti grossi sforzi per standardizzare gli organismi cavia almeno sotto il profilo delle specie da utilizzare.

La ricerca delle specie acquatiche più adatte allo svolgimento dei test ha impegnato per decenni gli operatori di Canada e Stati Uniti dove l'analisi tossicologica di acque e scarichi è ormai un consolidato strumento di controllo che affianca regolarmente l'analisi chimica (Hamilton, 1976; EPA, 1991).

A livello internazionale la gamma di organismi, impiegati nello svolgimento di tali prove, risulta estremamente ampia essendo in molti casi correlata alla disponibilità ed alla volontà di eseguire i test su specie animali autoctone (Hunn, 1989; APHA, 1995). Fra le caratteristiche che questi organismi devono possedere vi è, infatti, l'ampia disponibilità temporale e quantitativa di soggetti di taglia idonea oltre ad una elevata sensibilità.

Quest'ultimo requisito appare fondamentale al fine di rendere attendibile il risultato del test ecotossicologico (Klemm, 1994).

Sono state individuate, da Arpa Ferrara, nel latterino (*Atherina boyeri*, Risso) e nel nono (*Aphanius fasciatus*, Nardo) le specie più adatte allo svolgimento di test in ambiente marino. Questi pesci, autoctoni, presentano una spiccata affinità con gli organismi prescelti dall'EPA per la stesura delle metodiche in tema di ittiotossicologia in acque marine, *Menidia beryllina* e *Cyprinodon variegatus*, e da cui si potrebbero, pertanto, attingere preziose informazioni in fase di standardizzazione.

Nel nostro caso, è stato studiato il branzino (*Dicentrarchus labrax* L.), che per la sua presenza ed il facile reperimento di uova e stadi giovanili di taglie uniformi sul mercato (la produzione annua di avannotti in Italia ha superato i 60 milioni di pezzi nel 1999) può rappresentare un valido organismo per l'esecuzione di prove acute e croniche di ittiotossicità in ambiente marino sia in laboratorio che sul campo.

Le sperimentazioni condotte su queste specie da APAT e da ARPA Ferrara, seguendo le norme ufficiali adottate dal nostro Paese e riconosciute in sede internazionale, potrebbero rendere disponibili per l'Ente Pubblico una quantità di informazioni tali da consentire un eventuale aggiornamento dei limiti di legge oggi vigenti.

La scelta di sviluppare le attività di ricerca finalizzate al controllo delle acque marine utilizzando il branzino è riconducibile alla possibilità di riprodurre la specie in condizioni controllate e di poter acquisire, in tempi utili per le fasi sperimentali, tutti gli stadi di sviluppo della specie, dalle uova embrionate alle larve, agli avannotti ed infine ai pesci di diversa taglia.

Sono stati predisposti test ittiotossicologici a 24 - 48 - 96 ore utilizzando larve e giovanili di peso medio compreso tra gli 0,005 ed i 4,1 g , impiegando il SLS come tossico di riferimento ai fini della validazione del metodo. I risultati ottenuti sono stati confrontati con dati acquisiti precedentemente.

Inoltre, ai fini di una valutazione attendibile della sensibilità, gli effetti della tossicità del Sodio laurilsolfato sul branzino sono stati confrontati con quelli precedentemente osservati su *Artemia sp.*, ritenuto l'organismo test di riferimento in tossicologia per le acque salate (Gelli, 2001).

2 TEST ECOTOSSICOLOGICI

L'Ecotossicologia è una disciplina relativamente recente, così chiamata nel 1969 da Truhaut (1977) e nata come filiazione della tossicologia (in particolare della tossicologia

umana), dalla quale ha derivato principi, concetti e, almeno in una prima fase, metodi, coniugati però con l'Ecologia (Moriarty, 1983). Letteralmente, la tossicologia è la "scienza dei veleni"; l'Ecologia è "lo studio scientifico delle interazioni che determinano la distribuzione e l'abbondanza degli organismi": l'Ecotossicologia è dunque la scienza dei veleni per l'ambiente. In una accezione più estesa, l'Ecotossicologia comprende i fattori fisici (calore, radiazioni), chimici e biologici che sono potenzialmente fattori inquinanti (Ramade, 1977). L'Ecotossicologia applicata, invece, descrive i metodi utilizzati per verificare se e quanto un determinato veleno (= qualsiasi sostanza che, tramite interazioni fisico-chimiche con tessuti viventi, può causare danni e/o morte dell'organismo) può interferire con l'ambiente, e quali sono le soluzioni per evitare, alleviare o porre rimedio agli eventuali danni arrecati.

I test ecotossicologici rappresentano un importante strumento per valutare la presenza di sostanze tossiche nei confronti delle biocenosi acquatiche insediate in un determinato ambiente. Infatti, sulla base delle risposte ottenute, è possibile verificare le condizioni del corpo idrico o promuovere ulteriori indagini volte ad individuare interventi idonei a salvaguardare l'ecosistema.

Come noto, il recente D.lgs n.152 dell'11.5.1999 modificato con il D.Lgs 258/2000, abrogata la 319/1976, rende obbligatoria l'esecuzione del saggio di tossicità, prevedendo l'impiego di bioindicatori per valutare lo stato di qualità delle acque e degli scarichi. La nota dell'allegato 5, tab.3, par.51, specifica gli organismi che si possono utilizzare a questo scopo e delega l'APAT (Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente) ad individuarne altri appartenenti ai diversi livelli trofici della catena alimentare.

I test di tossicità risultano utili per molteplici aspetti:

- determinazione della risposta biologica degli organismi acquatici a sostanze chimiche di sintesi;
- studio di tali prodotti commercializzati e valutazione degli effetti ed eventuali danni biologici a lunga scadenza che il loro impiego può procurare agli ecosistemi;
- influenza sui parametri fisico_chimici dell'ambiente idrico (temperatura, pH, ossigeno disciolto, ammoniaca, torbidità);
- impiego ottimale dei prodotti testati ed individuazione della dose innocua per le forme di vita che interessano.

I test di tossicità possono essere classificati in base alla durata o tempo di esposizione in test a breve e lungo termine. I test a breve termine (test acuti) hanno una durata inferiore o uguale a 96 ore e sono condotti per determinare la presunta tossicità di effluenti o sostanze

a rapida azione. La mortalità è la principale risposta riscontrabile negli organismi trattati, che vengono esposti a concentrazioni, usualmente in dosi logaritmiche (ad es. 0.01, 0.1, 1, 10 e 100) allo scopo di includere la concentrazione che provoca la mortalità di una percentuale definita della biomassa.

I test a lungo periodo (test cronici) vengono condotti per determinare la concentrazione tossica di un prodotto che può essere presente in un corpo idrico ricevente senza causare danni significativi alla produttività ambientale. Il parametro ricercato (MATC = maximum allowable toxicant concentration) è determinato sull'intero arco del ciclo vitale, rilevandone gli effetti su accrescimento, crescita, maturità sessuale, riproduzione, deposizione ecc.)

Le principali metodiche di laboratorio adottabili per il test di tossicità si possono differenziare in base al tipo in:

- test statici: prevedono un'unica immissione del prodotto in acque stagnanti poste all'interno di contenitori adeguati nei quali vengono poi immessi gli organismi sui quali si intende testare prodotto;
- test in acque rinnovate: questo tipo di test è stato studiato per consentire l'esposizione di biomasse animali a dosi costanti di prodotti dotati di scarsa o scarsissima stabilità. La metodica prevede la sostituzione della soluzione contenente il prodotto ad intervalli prestabiliti in relazione alle caratteristiche del prodotto stesso. Tale sostituzione in genere avviene ad intervalli prestabiliti in relazione alle caratteristiche del prodotto stesso. Tale sostituzione in genere avviene ad intervalli di 24 – 48 ore con una metodica che prevede la disponibilità di numerosi contenitori identici in cui vengono immerse le soluzioni da testare alcuni minuti prima del trasferimento degli organismi da un contenitore all'altro. Questo tipo di test è stato aspramente contestato poiché l'azione stressante dovuta ai continui cambiamenti di ambiente, indipendentemente dalla tossicità del prodotto a cui vengono esposti gli organismi acquatici, supera in molti casi la tossicità intrinseca del prodotto falsando i risultati del test;
- test in acque circolanti: il test in questione corregge in larga parte gli aspetti negativi del tipo precedente consentendo il mantenimento delle concentrazioni richieste per tutta la durata delle prove. E' inoltre applicato nel caso di organismi molto sensibili non in grado di vivere in acque stagnanti o rinnovate. Le prove vengono in questo caso condotte utilizzando grandi vasche di accumulo in cui vengono preparate le soluzioni del tossico da saggiare dalle quali attraverso opportune condutture la soluzione viene trasferita con una velocità di ricambio prestabilita nelle vasche di prova. In tal modo si riesce a mantenere

costanti la concentrazione e l'ambiente acquoso, dal punto di vista dei parametri fisico-chimici e soprattutto dell'ossigeno disciolto, si mantiene in condizioni ottimali non andando incontro a brusche variazioni.

Le prove statiche vengono preferenzialmente condotte nei test a breve durata. Se la sostanza considerata è volatile ed è caratterizzata da un elevato B.O.D., è preferibile utilizzare la tecnica del ricambio idrico.

2.1 Fattori ambientali che caratterizzano le prove ecotossicologiche con particolare riferimento a quelle ittiotossicologiche:

T dell'acqua : per ogni specie esiste un range entro il quale l'utilizzazione dell'energia a scopi produttivi raggiunge i più alti valori. Temperature al di sopra o al di sotto di questo intervallo rientrano nella zona di resistenza; è noto che la temperatura corporea dei pesci (pecilotermi) segue le variazioni della temperatura ambientale, grazie a fenomeni di conduzione e convezione, che permettono una rapida capacità di adattamento. Un rapido ed elevato incremento termico può comunque compromettere l'attività fisiologica, ormonale ed enzimatica con accresciuto consumo di ossigeno disciolto e conseguente stress e cambiamento comportamentale dell'animale. Diversi autori hanno dimostrato che valori critici di temperatura interferiscono con le funzioni vitali del pesce, comportando aumento della permeabilità gassosa in concomitanza con la maggiore ventilazione e quindi maggiore assorbimento di eventuali sostanze tossiche presenti in soluzione.

Per l'esecuzione delle prove di laboratorio sui pesci si raccomanda una temperatura dell'acqua compresa tra 17-25°C per le specie d'acqua calda e 12-18°C per quelle d'acqua fredda.

Ossigeno: il livello di ossigeno disciolto deve essere controllato attentamente. Al fine di tenere un adeguato tenore di ossigeno, si ricorre sovente all'aerazione degli ambienti nei quali si conducono i test. Principalmente nei test ittiotossicologici è stato adottato un sistema di controllo al fine di mantenere la concentrazione di ossigeno disciolto superiore al 60% della saturazione alla temperatura prestabilita.

pH (concentrazione di ioni idrogeno): può rappresentare un elemento d'interferenza nell'andamento dei test. Il pH può modificare lo stato fisico delle molecole (ionizzazione) e compromettere la solubilità degli elementi nutritivi (Hunn 1989). Il pH può anche provocare cambiamenti sulla percentuale di degradazione (idrolisi) delle sostanze chimiche presenti.

2.2 Organismi acquatici cavia

La gamma degli organismi acquatici impiegati nello svolgimento di prove di tossicità è estremamente ampia essendo in molti casi correlata alla disponibilità ed alla volontà di svolgere i test su specie locali. Anche in questo campo nell'ultimo decennio sono stati compiuti grossi sforzi al fine di standardizzare gli organismi cavia almeno sotto il profilo della specie da utilizzare. Un interessante lavoro in questo campo è stato condotto dal Fish Central Laboratory (USA) nel 1989 che, dopo un'amplissima ricognizione su tutti gli organismi impiegati, ne ha fatto una approfondita disamina individuando le specie più adatte allo svolgimento dei test nelle diverse condizioni ambientali. E' stato stabilito che il Carassio dorato (*Carassius auratus*) nell'ambito dei pesci di acqua calda e la *Daphnia magna* nell'ambito degli invertebrati termofili, risultano gli organismi maggiormente utilizzati e maggiormente idonei sullo svolgimento di tali test. Per quel che riguarda gli organismi di acque fredde largamente impiegati sono i Salmonidi tra i quali primeggia la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*).

Una gamma abbastanza ampia di organismi acquatici può essere inoltre impiegata per l'individuazione di tossicità specifiche.

Il carassio dorato per la sua presenza pressoché cosmopolita, per la facilità di trasporto e per la presenza sul mercato di taglie uniformi è sicuramente la specie che meglio si presta all'esecuzione di prove ittiotossicologiche. Se a ciò si aggiunge un'ottima resistenza agli agenti stressanti ne risulta un quadro che indica come questo organismo risulti perfettamente idoneo allo svolgimento di test di tossicità. Unico neo la notevole rusticità che nel caso di prodotti a modesta azione tossica può fornire un quadro migliore rispetto a quello reale. Se comunque l'indagine viene portata a maggiori livelli di approfondimento anche questi effetti, impossibili da percepire ad occhio nudo, possono essere facilmente evidenziati.

Per la specie in questione come per tutti gli altri pesci impiegati in test tossicologici, sarebbe auspicabile una standardizzazione genetica che, al pari di quanto già avviene per la cavia, consentisse l'utilizzo nei diversi paesi dei medesimi ceppi o linee per l'esecuzione dei test di tossicità. Tale obiettivo è ancora lontano poiché i pesci sono dotati di una grande variabilità genetica e risulta piuttosto difficile l'individuazione e la stabilizzazione di linee pure. Il carassio dorato oggi utilizzato in Europa e Stati Uniti proviene sicuramente da un ceppo comune introdotto dall'Asia nel 1800 in Europa e successivamente naturalizzatosi in Italia, unico paese del Vecchio Continente in cui già ai primi del '900 la specie reperì un

ambiente idoneo alla vita ed alla riproduzione. Dal nostro paese carassi dorati di origine locale furono poi distribuiti su tutto il continente europeo ed in alcuni casi inviati nello stesso Nord-America.

La *Daphnia magna* è presente sul mercato materiale con caratteristiche genetiche abbastanza costanti ed uniformi. Ciò deriva dal fatto che questo crostaceo è largamente impiegato per studi biologici e la richiesta da parte del mercato di ceppi stabilizzati diviene sempre maggiore. La possibilità di produzione partenogenetica ha enormemente facilitato la uniformità genetica per cui si può ritenere che sussistano solo lievi differenze tra le Daphnie impiegate nei test tossicologici europei e USA.

A riguardo, l'A.R.P.A di Ferrara in collaborazione con A.P.A.T ed I.C.R.A.M, ha individuato nel branzino (*Dicentrarchus labrax* L.) una specie adatta allo svolgimento di test acuti e cronici in ambiente marino.

La scelta di sviluppare le attività di ricerca finalizzate al controllo delle acque marine utilizzando il branzino è riconducibile alla possibilità di riprodurre la specie in condizioni controllate e di poter acquisire in tempi utili per le fasi sperimentali tutti gli stadi di sviluppo della specie, dalle uova embrionate alle larve, agli avannotti ed infine ai pesci di diversa taglia.

3 CENNI SULLA SPECIE ITTICA DICENTRARCUS LABRAX (BRANZINO)

3.1 Biologia generale del branzino

Ordine: PERCIFORMI

Famiglia : Serranidae

Genere: *Dicentrarchus*

Specie: *Dicentrarchus labrax* (L.) 1758

Questo genere è caratterizzato dalla presenza di alcune spine rivolte in avanti al margine inferiore del preopercolo. Comprende due sole specie, la spigola comune (*D. labrax*) qui descritta e la spigola macchiata (*D. punctatus*). Le spigole a differenza di tutte le altre specie che appartengono alla famiglia Serranidae, hanno due pinne dorsali invece di una, la prima tutta formata da raggi spinosi e la seconda di raggi molli, ad eccezione del primo che è spinoso. Le pinne pettorali sono brevi e si inseriscono sopra le ventrali anch'esse modestamente sviluppate. La pinna anale è contrapposta alla seconda dorsale e la caudale è concava nel bordo posteriore. Grossi cromatofori sono localizzati sulla nuca ed alla base della pinna caudale. Corpo oblungo ma non fusiforme, fianchi leggermente compressi, squame di tipo ctenoide; il capo è robusto e subsonico, con mascella inferiore che sporge oltre quella superiore, la bocca è ampia e armata di denti disposti a formare una sorta di rozzo vello. L'opercolo porta posteriormente due spine, mentre il preopercolo ha il margine posteriore dentellato. La spigola può superare 1m di lunghezza ed i 12 Kg di peso, le taglie più frequenti sono comprese tra 30 e 60 cm. Domina la tinta argentea, il dorso è grigio nerastro o piombo, il ventre bianco. Le differenze di colorazione sono dovute ai diversi "habitat". E' specie gregaria particolarmente da giovane e nelle acque dove non è disturbata. Gli individui grossi vanno però più facilmente isolati o a coppie. Vive nelle acque costiere dove si spinge fino a bassissime profondità, specialmente nei periodi di mare mosso, pronta ad afferrare la preda in balia delle onde o della risacca. Diffusa nell'Atlantico orientale (dalle coste inglesi al Senegal, anche nel mare del Nord e nel Baltico) e nel Mediterraneo, nel periodo della riproduzione è solita portarsi nella foce dei fiumi.

3.2 Aspetti etologici

I fattori che regolano la sua diffusione sono poco noti, dal momento che il branzino si può ritrovare in acque con caratteristiche totalmente diverse tra di loro. I più importanti di questi fattori sono:

a) Temperatura. Come specie euriterma, il branzino è presente in inverno in acque con temperature di 5 – 6 °C proprie delle lagune mediterranee del nord e in estate in acque con temperature di 27-29°C nelle lagune mediterranee del sud. Le temperature nei siti di riproduzione presentano delle variazioni più ristrette che vanno da 10 a 12,5°C, indipendentemente dalla latitudine. Sotto i 7°C smette di alimentarsi.

b) Salinità. Essendo specie eurialina si può incontrare in acque che variano di salinità da 0,5‰ a 90‰, anche se le condizioni ideali per il suo accrescimento oscillano tra 20 e 30‰.

c) Ossigeno disciolto. In circostanze normali l'ossigeno assunto dal pesce attraverso le branchie viene usato come carburante metabolico e nel caso la concentrazione di tale gas disciolto nell'acqua (O.D) sia bassa (ipossia), il metabolismo energetico ne viene negativamente influenzato. Per ottenere l'energia necessaria in carenza di ossigeno, viene creata una catena alternativa di reazioni, descritta come via anaerobica. I prodotti finali di questa via metabolica sono acidi organici che vengono accumulati nei tessuti. Nel caso la carenza di ossigeno perduri per lunghi periodi, può verificarsi la morte dell'animale. Sopra il 40% del valore di saturazione di O.D. ed a 22°C il rischio d'influenzare la crescita regolare della spigola rimane contenuto. Secondo gli studi condotti in un'area del Delta Padano sul regime alimentare degli avannotti di branzino, i giovani di dimensioni inferiori a 30mm di lunghezza standard si cibano prevalentemente di copepodi calanoidi (fra i quali più frequente è la specie *Acartia clausi*) e naupli di cirripedi. A taglie superiori le prede preferenziali sono rappresentate da misidacei e larve di decapodi. Le abitudini alimentari cambiano perciò in relazione alla taglia, passando da forme tipicamente mesoplanctoniche ad una dieta costituita in prevalenza da organismi macroplanctonici e macrobentonici, l'alimentazione di base consiste in crostacei, molluschi, policheti e piccoli pesci come *Atherina sp.*, sardine e piccoli cefali.

3.3 Riproduzione

Si riproduce nei mesi invernali da gennaio a marzo. Le uova sono galleggianti e gli stadi larvali e giovanili si trovano nel plancton da febbraio a giugno. Gli stadi post-larvali e

giovani si affollano all'imboccatura dei corsi d'acqua per risalire nelle acque dolci e salmastre. Ha carni molto gustose ed è oggetto di pesca in ogni stagione , in particolare durante l'inverno.

3.4 Stadi larvali e giovanili



Fig. Sezione al microscopio di una larva di branzino di 1 giorno (con sacco vitellino).

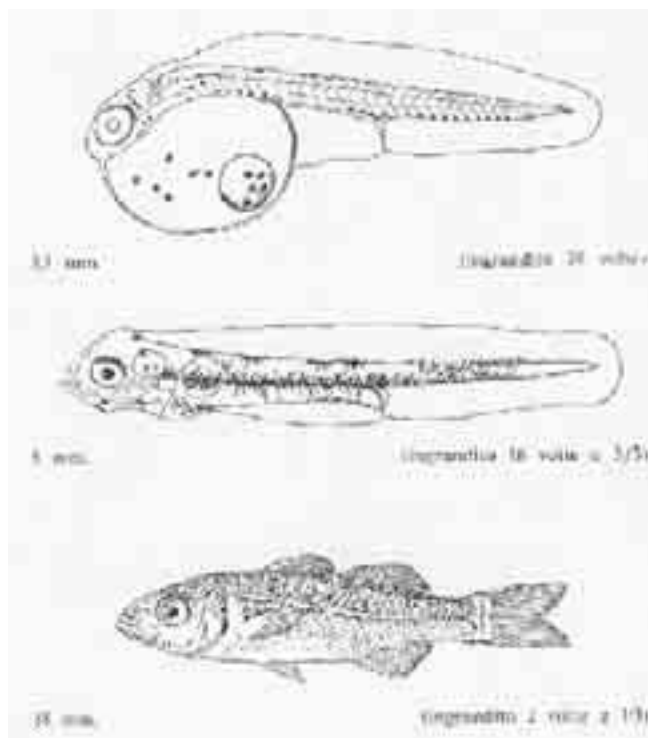


Fig. 1 Stadi post larvali e giovanili di branzino.

I primi stadi larvali hanno abitudini pelagiche per cui si catturano al largo in superficie, soprattutto di notte, mediante un retino a mano ed in presenza di una potente fonte luminosa.

4 ALLEVAMENTO IN LABORATORIO DI STADI LARVALI DI D. LABRAX DA DESTINARSI ALL'ESECUZIONE DI SAGGI ECOTOSSICOLOGICI

4.1 Reperimento degli organismi

La specie ittica *Dicentrarchus Labrax* è estremamente diffusa e reperibile in tutto l'anno nel bacino del Mediterraneo poiché viene prodotta in decine di milioni di esemplari nelle avannotterie commerciali presenti in Spagna, Francia, Italia, Grecia, Turchia e Nord Africa. Pertanto, per assicurare una regolare disponibilità di larve, postlarve e giovanili di branzino, è possibile schiudere in laboratorio uova embrionate provenienti da avannotterie commerciali. Le uova vengono messe ad incubare in vasche troncoconiche dove avviene la schiusa, e le larve trascorrono il loro primo periodo di vita fino alla metamorfosi. Per la gestione si seguono gli stessi accorgimenti usati nelle avannotterie commerciali. Vista la particolare laboriosità dovuta alla schiusa delle uova fino al riassorbimento del sacco vitellino e all'alimentazione, è preferibile partire da larve di 12 o più giorni di vita provenienti da avannotterie commerciali.

4.2 Strumentazione necessaria

- contenitore termico, sacchi in polietilene trasparente, elastici o fascette in plastica e bombola di ossigeno per il trasporto dall'avannotteria al laboratorio;
- impianto di stabulazione, costituito da vasche troncoconiche in plexiglas della capacità di 15 litri ciascuna, operanti in ciclo chiuso, in grado di garantire un ricambio idrico completo ogni ora, provviste di un sistema di filtrazione meccanica e biologica;
- pompa di potenza pari 600 l/h per permettere il ricircolo dell'acqua nell'impianto di stabulazione;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro che consenta di ottenere 500 – 1000 lux sul pelo d'acqua, controllato da un temporizzatore per la simulazione del fotoperiodo (16 ore di luce – 8 ore di buio);
- luxmetro per misurare l'intensità luminosa;
- ambiente termostato al mantenimento della temperatura di allevamento nell'ambito dei 20 ± 2 °C;
- ossimetro per la misurazione dell'ossigeno disciolto;
- salinometro ottico per la misurazione della salinità;
- pHmetro;
- kit diagnostici per ammoniaca, nitriti e nitrati;

- fonte di aria compressa a bassa pressione con pietre porose;
- cisti di *Artemia salina* con caratteristiche di idoneità per l'alimentazione delle fasi larvali del branzino;
- 2-4 imbusti separatori da 1 l in plastica atossica o vetro, per la schiusa delle cisti di *Artemia salina*; filtro nylon (maglia 150µm) per concentrare la artemie;
- sale di mare sintetico (*Istant Ocean®*) per la preparazione di acqua di mare;
- acqua bidistillata o deionizzata sterile, libera da sostanze organiche (sistema MilliQ- Millipore), con conducibilità < µs/cm;
- microscopio ottico e stereomicroscopio.
- Tutti gli accessori destinati ad entrare in contatto con l'acqua di allevamento non devono rilasciare sostanze tossiche.

4.3 Trasporto in laboratorio

Per il trasporto in laboratorio dall'avannotteria al laboratorio sono stati utilizzati sacchi di polietilene trasparenti, ben chiusi con elastici o fascette di plastica, contenenti acqua per 1/3 ed ossigeno per 2/3 ed inseriti in contenitori termici per ridurre variazioni repentine di temperatura. Le operazioni vanno effettuate cercando di limitare al massimo qualsiasi tipo di manipolazione e di mantenere i soggetti in acqua durante tutte le diverse fasi del trasferimento. Larve di branzino con età superiore ai 12 giorni, trattate con queste modalità, possono tollerare senza problemi viaggi della durata di 6-8 ore. Per quanto riguarda le uova, possono sopportare anche viaggi di 48 ore se si provvede ad inviarle a poche ore dalla fecondazione e di conservarle il più possibile, durante il trasporto, alla temperatura a cui erano mantenute nell'impianto di provenienza.

4.4 Stabulazione

Una volta arrivati, i branzini vanno acclimatati alle nuove condizioni di laboratorio. E' necessario, pertanto, informarsi per tempo presso l'avannotteria fornitrice riguardo alla salinità e alla temperatura di mantenimento degli organismi. Mentre il parametro salinità non presenta particolari problematiche di adeguamento (aggiunta di sale sintetico o di acqua deionizzata nell'impianto di laboratorio), il parametro temperatura richiede tempi di acclimatazione degli organismi piuttosto lunghi.

Tuttavia, durante il trasporto si assiste ad un naturale graduale aumento della temperatura originaria, per cui all'arrivo in laboratorio il gradiente risulta essere di trascurabile entità.

I pesci possono essere impiegati in saggi ecotossicologici dopo alcuni giorni dal loro arrivo in laboratorio.

4.5 Struttura impiantistica

La struttura impiantistica progettata per il mantenimento in laboratorio di larve di branzino è costituita da 2 vasche troncoconiche del volume di 15 l, operanti in ciclo chiuso, in grado di garantire un ricambio idrico completo ogni ora, provviste di un sistema di filtrazione meccanica e biologica, capace cioè di rimuovere i cataboliti che altrimenti si accumulerebbero. La densità di organismi che può essere mantenuta nelle vasche è molto legata alla capacità di depurazione del sistema di filtraggio biologico di cui esse devono essere dotate. E' comunque consigliato un numero di circa 150 organismi in una vasca da 15 l.

Il sistema di filtraggio biologico, è costituito comunemente da un modulo situato esternamente rispetto alla vasca stessa. L'acqua viene fatta fluire, per sfioramento, nell'unità esterna del filtro che è riempito con vari tipi di materiali inerti (lana di vetro, gusci di bivalvi) i quali, oltre all'azione filtrante di tipo meccanico, svolgono anche quella di supporto per la crescita dei microrganismi che operano la depurazione biologica. Il sistema di filtraggio biologico deve essere condizionato, come indicato nel seguito, prima che la vasca sia in grado di accogliere il numero di organismi desiderato. L'unità filtrante può considerarsi a regime quando si sono sviluppati batteri nitrificanti (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter*) in grado di convertire ammoniaca e nitriti, prodotti dai pesci e dai residui di mangime, a nitrati. La caduta al di sotto dei limiti di rilevabilità delle due sostanze tossiche sopra citate, ed il corrispondente aumento di nitrati, indica che il condizionamento del sistema filtrante è pressoché completato. A questo scopo si impiegano kit diagnostici, reperibili in commercio, che consentono in modo semplice e rapido il controllo giornaliero dei parametri.

L'innesco dei filtri biologici richiede, pertanto, un'accurata preparazione preliminare e tempi medi di 40 giorni necessari per l'insediamento delle popolazioni batteriche.

Come mezzo ambiente per l'allevamento si utilizza acqua di mare sintetica al 30 ± 1 ‰, preparata sciogliendo 30 gr di sale *Istant Ocean*® per litro d'acqua.

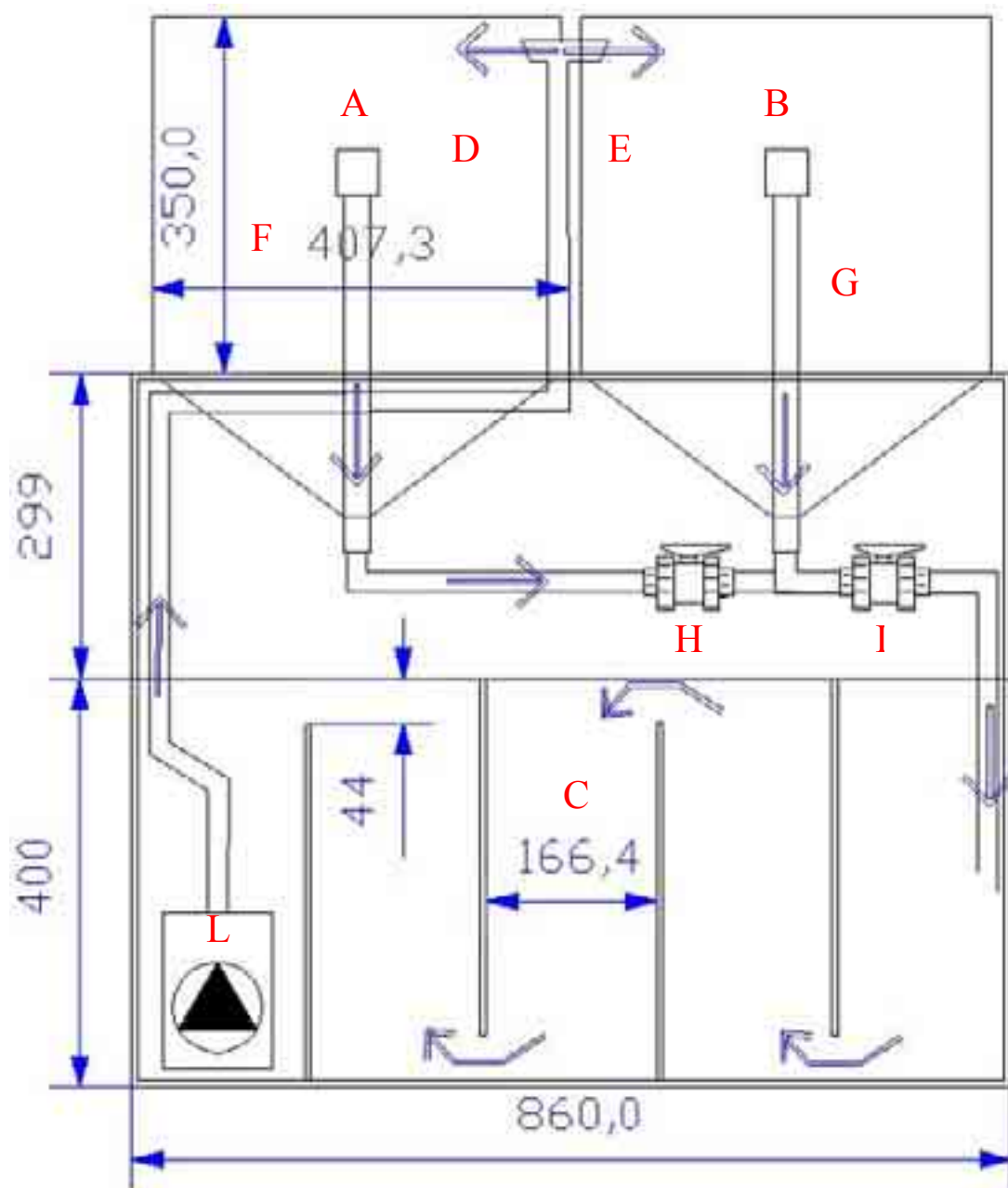


Fig.2 Progetto dell'impianto sperimentale pilota.

LEGENDA: A-B: incubatoi per la schiusa e l'allevamento larvale; C: filtro biologico; D-E: entrata dell'acqua; F-G: fitro con rete in nylon a dimensione variabile; H-I: valvole di scarico; L: serbatoio con pompa.

4.6 Regolazione e controllo dei parametri chimico-fisici

La temperatura per il mantenimento di *Dicentrarchus labrax* è di $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Le vasche troncoconiche di allevamento vengono illuminate con lampade fluorescenti che consentono di ottenere 500 – 800 lux a livello dell'acqua, con un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 di buio. La misura dell'intensità della luce viene effettuata con un luxmetro. Viene, inoltre, mantenuta una concentrazione di ossigeno disciolto superiore a 6 mg/l insufflando aria mediante diffusori (pietre porose).

Temperatura, salinità, pH ed ossigeno vanno rilevati giornalmente, mentre ammoniaca, nitriti e nitrati due volte alla settimana. Si tenga presente che valori di pH al di fuori dell'intervallo compreso tra 7,5 e 8,5 sono da considerarsi come potenzialmente causa di danno per gli organismi, mentre per quanto riguarda i nitrati, valori fino ad 80 mg/l sono ancora accettabili per la maggior parte dei pesci. Per abbassare il livello di nitrati è necessario un ricambio parziale dell'acqua di allevamento.

Tali parametri vengono registrati nelle scheda di registrazione, conservata in prossimità dell'apparato di stabulazione.

4.7 Alimentazione con *Artemia salina* e *Artemia nana*

Dopo il totale riassorbimento del sacco vitellino, e cioè a partire dal 12° giorno di vita, i branzini devono essere alimentati con alimento vivo, costituito da naupli di *Artemia salina* e, ancora meglio, nelle prime fasi di vita, da *Artemia nana*. L' *Artemia* è un piccolo crostaceo anostraco che, in particolari condizioni ambientali produce delle cisti quiescenti che permangono vitali per lunghi periodi di tempo, purchè conservate all'asciutto ed in condizioni anaerobiche. Reidratando le cisti in acqua di mare si riattiva lo sviluppo embrionale e, dopo circa 24 ore, ne schiudono le fasi larvali (naupli) al primo stadio di sviluppo. Per quel che riguarda l'*Artemia nana* si differenzia dalla normale in quanto più piccola e dal punto di vista alimentare più ricca ma rara da trovare.

4.8 Riattivazione delle cisti

Le cisti possono essere facilmente acquistate presso negozi di acquariologia.

La riattivazione avviene ponendo, per un tempo di circa 10 minuti, 0,8 – 1 g di cisti disidratate in 50 ml di acqua marina sintetica con salinità del 30-35‰. L'acqua marina si prepara aggiungendo ad acqua bidistillata o deionizzata sterile libera da sostanze organiche (sistema MilliQ – Millipore), 30-35 g/l di sale marino artificiale *Istant Ocean*®. L'acqua va poi areata per 24 ore prima dell'uso. Successivamente si versano le cisti in un imbuto separatore, contenente 800-1000 ml di acqua marina sintetica con salinità del 30-35 ‰. Si

area intensamente con un tubetto di plastica fornito all'estremità di pietra porosa del tipo da acquario posizionata in modo che la sua estremità sia sul fondo del cono.

Il tempo di schiusa, comunemente espresso come T_{90} (numero di ore necessario alla schiusa del 90% delle cisti), varia in relazione all'area geografica di provenienza e alla temperatura di incubazione. Con una temperatura di 22°C le uova schiudono in circa 38 ore.

4.9 Raccolta naupli

Una volta schiuse le cisti, si arresta l'aerazione. In questo modo i gusci ormai vuoti si portano in superficie, mentre i naupli si raccolgono sul fondo dal quale vengono prelevati mediante apertura del rubinetto dell'imbuto separatore. Sfruttando la fototassia positiva delle larve (Sorgeloos, 1980), la raccolta può essere agevolata oscurando la parte superiore del cono. Tale operazione non deve protrarsi oltre i 10-15 minuti, in quanto l'elevata concentrazione di organismi raggiunta sul fondo del contenitore fa sì che, sospeso il gorgogliamento, l'ossigeno disciolto venga rapidamente esaurito provocando la morte dei naupli. L'apertura alterna del rubinetto dell'imbuto separatore consente di rimuovere a più riprese i naupli appena schiusi. Questi verranno concentrati e lavati in acqua pulita al 30-35‰ con l'aiuto di un contenitore col fondo in rete (maglie di 150µm).

4.10 Mantenimento dell'allevamento

E' necessario evitare che nelle vasche si accumulino cibo non consumato, naupli di *Artemia salina* deceduti, feci o altro residuo organico. Pertanto, con frequenza settimanale o più spesso se necessario, si provvede a rimuovere dal fondo delle vasche i residui con un sifone. Anche l'eccessiva crescita di alghe deve essere controllata periodicamente mediante rimozione.

Per quanto riguarda il filtro meccanico-biologico, è necessario un rabbocco giornaliero con acqua deionizzata allo scopo di mantenere costante il livello dell'acqua nel comparto in cui pesca la pompa.

4.11 Controllo dell'idoneità degli organismi

Poiché il branzino è mantenuto in laboratorio per il suo successivo utilizzo in saggi ecotossicologici, è necessario sottoporre ogni nuovo lotto di organismi ad opportune verifiche per evidenziare condizioni sperimentali o lotti di organismi per qualche motivo anormali. A questo fine si saggia ogni lotto con una o più sostanze tossiche di riferimento

(cloruro di cadmio 2,5 idrato, sodio laurilsolfato, ecc.) di cui si determina la 24 h LC₅₀ nelle condizioni sperimentali indicate dalla istruzione operativa corrispondente.

La LC₅₀ ed i limiti fiduciali sono stati calcolati mediante sia la rappresentazione grafica che il metodo statistico, usufruendo del pacchetto software USEPA “ToxStat”, che utilizza il test TSK (Trimmed Spearman - Karber), il test Spearman - Karber e il test Probit.

I risultati dei saggi sono considerati accettabili se la sopravvivenza degli organismi di controllo è $\geq 90\%$ e se la concentrazione di ossigeno disciolto si è mantenuta $\geq 40\%$ del valore di saturazione nei diversi trattamenti. Pur senza porre ulteriori vincoli alla validità dei risultati, periodicamente si consiglia la conduzione di saggi in condizioni standard con un tossico di riferimento (Sodio laurilsolfato, Cloruro di cadmio, Bicromato di potassio, Propanil, ecc.).

5 SPERIMENTAZIONE

Luogo di reperimento degli organismi : stabilimento produttivo di Valle Cà Zuliani - Rovigo).

Età degli organismi : 1gg

N° organismi: circa 200 (100 per vasca tronco-conica da 15L).

Trasporto: come è stato precedentemente descritto.

Struttura impiantistica: quella precedentemente descritta.



Fig.3 Messa a punto di un apparato per l'incubazione e la schiusa delle uova e il mantenimento delle larve

Alimentazione: *Artemia nana* non appena si ha l'apertura della bocca.

Mantenimento: le larve sono state coperte con una sacco nero in modo tale da evitare il loro danneggiamento da parte dei raggi luminosi.

Osservazioni al microscopio: stereo – microscopio e microscopio ottico (bidimensionale).

5.1 Comportamento ed evoluzione delle larve osservate

Durante i giorni che seguono la schiusa le prelarve, con sacco vitellino ancora da riassorbire, subiscono intense modificazioni morfologiche. Il “risveglio” sensoriale ed i seguenti adattamenti comportamentali presentano alcune caratteristiche generalizzabili per molte specie, altre sono decisamente specie-specifiche. E’ possibile descrivere una cronologia delle evoluzioni comportamentali, ma occorre tenere conto che la velocità di passaggio tra i vari stadi è temperatura dipendente. La descrizione cronologica seguente pertanto è valida per una temperatura 19 -20°C come quella che abbiamo registrato giornalmente nelle nostre vasche di stabulazione. Questo primo periodo di vita della spigola è paragonabile a quello dell’orata. Le nostre osservazioni hanno confermato i dati di letteratura (Ettore Ribaldi, Acquacoltura 1983) figura sottostante.

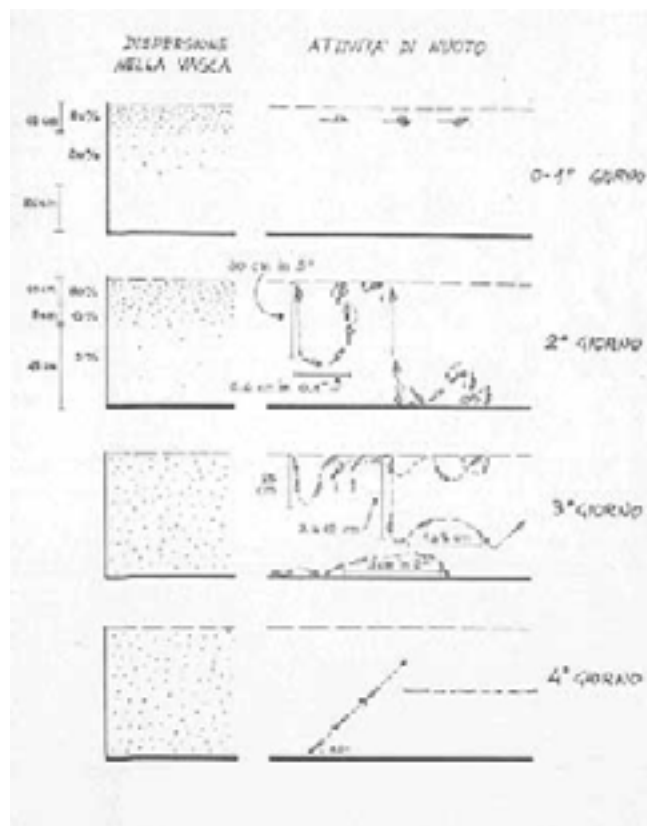


Fig. 4 Dispersione nella vasca ed attività di nuoto delle larve.

Inizio delle osservazioni: 29/3/05

1° giorno

E' caratterizzato da corti periodi di attività alternati da lunghi periodi d'immobilità. I movimenti sono spasmodici, la traiettoria nello spazio è aleatoria con movimenti semicircolari, raramente rettilinei. La postura di riposo è ventrale, con un grado di inclinazione che varia da specie a specie. La dispersione delle prelarve è principalmente superficiale ed esse non reagiscono a stimoli luminosi o meccanici.

2° giorno

E' ancora caratterizzato da lunghi periodi di riposo, alternati da improvvise migrazioni verticali, a testa in basso, controllate mediante cambiamenti di densità; con numerose rimonte rapide.

Le prelarve cominciano a reagire agli stimoli meccanici.

3° giorno

Compare il moto su di un piano obliquo, in corrispondenza compaiono le pinne pettorali ed inizia la pigmentazione degli occhi. Il risveglio sensoriale agli stimoli aumenta considerevolmente e la forma delle risposte si diversifica. A causa delle frequenti migrazioni, la densità superficiale diminuisce. Le postlarve cominciano a distribuirsi in tutto il volume della vasca.

4° giorno

Corrisponde all'inizio della vita nectonica. Gli occhi diventano funzionali, la bocca si apre ed il sacco vitellino è notevolmente ridotto, i movimenti diventano via via più coordinati. Le postlarve nuotano utilizzando sia le pinne pettorali che il quarto posteriore del corpo. Il comportamento si arricchisce di posture stazionarie mantenute grazie ai movimenti delle pinne pettorali e della coda. Le prelarve sono in grado di mantenere la propria posizione anche in presenza di deboli movimenti dell'acqua. Iniziano i movimenti esplorativi, caratterizzati da un nuoto a vibrazioni con frequenti cambiamenti di direzione. Qualche

prelarva inizia a ingerire le *Artemie nane* immesse nello stabulario, anche se molto probabilmente avrebbero preferito veliger di bivalvi e rotiferi di dimensioni inferiori.

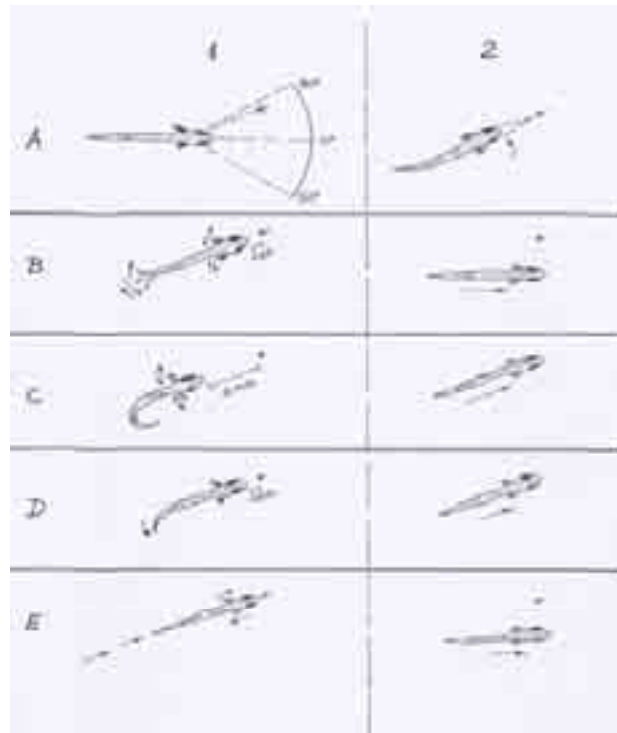


Fig. 5 Attività di caccia delle larve di *D. labrax*. La freccetta indica la preda (*Artemia nana*).

5° giorno

Le reazioni sensoriali ed il comportamento si affinano. L'apprendimento della caccia migliora sensibilmente. Il comportamento trofico assume una forma vicina a quella definitiva. Il tempo impiegato per l'esplorazione ricopre circa l'80%. La preda è percepita a distanza di 1-4 mm. L'attacco della preda avviene con movimento ascendente ($35^\circ - 45^\circ$) ma la percentuale di prede mancate è ancora elevata. Le prelarve, evitando e rigurgitando il mangime liofilizzato immesso, mostrano già un'intensa selettività alimentare.

8 - 9° giorno

In seguito alle bollicine d'aria ingerite per via orale la vescica natatoria inizia ad aver consistenza in alcune larve.

12° giorno

La vescica natatoria è completamente funzionale nelle larve sopravvissute. Le larve con vescica natatoria ben funzionante sono larve pronte per essere utilizzate in test ecotossicologici.

5.2 Osservazioni al microscopio

Fig. 6-7. larve di 5mm e 72 h. La bocca è ancora chiusa, il sacco vitellino si sta riassorbendo e la coda non presenta ancora alcun raggio.



Fig. 8. Larva di 5mm e 96h. La bocca si è aperta e la larva inizierà di lì a poco ad ingerire le prime prede.

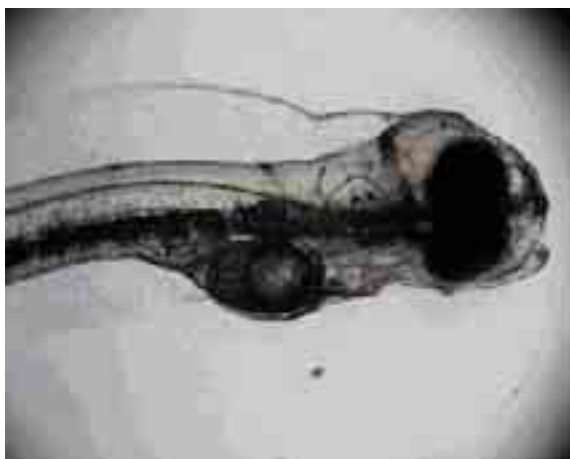


Fig. 9. Larva di Branzino dopo la formazione della vescica natatoria (10° giorno).



6 CONCLUSIONI

Dopo circa 12 giorni dalla schiusa delle uova, nelle vasche tronco-coniche sono rimaste in totale 21 larve delle 200 di partenza, questo ci dice che il mantenimento in laboratorio di larve così giovani è molto difficoltoso. Molto probabilmente, come è stato possibile notare ai microscopi ottico e stereoscopico, la formazione di un film oleoso sull'interfaccia acqua d'allevamento – aria ha influenzato il regolare sviluppo della vescica natatoria e quindi la sua funzionalità, causando la morte di una buona parte degli organismi. Altro fattore molto influente è stato sicuramente lo stress da trasporto che ha causato la morte di almeno il 40% degli organismi nei primi 2 giorni di stabulazione.

Per diminuire le morti dovute alla formazione di un film oleoso si potrà utilizzare in futuro un degrassatore che ha la funzione di concentrare l'olio in una zona poco estesa e quindi di lasciare interagire la maggior parte della superficie dell'acqua con l'aria sovrastante, vedi figura di sotto.



Fig. 10. Degrassatore Un getto d'aria che si dirige all'interno della U bianca direzionato dalla protuberanza presente al centro della figura ed alimentato da un compressore collegato ad una delle due estremità del tubo orizzontale per mettere di succhiare, convogliare e concentrare lo strato oleoso presente sulla superficie d'acqua circostante nella piccola area contenuta dal degrassatore.

La possibilità di riprodurre ed allevare larve di branzino o di qualsiasi altro organismo “cavia” permetterebbe una diminuzione dei costi dei test ecotossicologici. Le procedure, le metodiche e le strumentazioni a tal proposito sono notevolmente migliorate. Per limitare le spese sull'acquisto di larve di branzino conviene ancora acquistare larve di almeno 12 -14 giorni di età, aventi già la vescica natatoria ben formata e funzionante.

7 TOSSICO DI RIFERIMENTO DEI TEST ESEGUITI CON LARVE E GIOVANILI DI *Dicentrarchus Labrax* L.

Allo scopo di testare la stabilità della sensibilità degli animali e la conformità delle procedure sperimentali per i test è necessario selezionare ed adottare un tossico di riferimento. Il tossico testato è il Sodio laurilsolfato (SLS), già raccomandato da numerosi autori per il crostaceo *Artemia sp.* (Vanhaecke, 1980).

Il Sodio laurilsolfato (o Sodio Dodecil Solfato), con formula chimica $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$, è un detergente anionico preparato mediante solfatazione di lauril alcool seguita da neutralizzazione con sodio carbonato. Possiede proprietà tensioattive. Si può trovare sotto forma di cristalli, scaglie o polveri di colore bianco o crema. Un grammo si scioglie in 10 ml di acqua dando una soluzione opalescente. Abbassa la tensione superficiale di soluzioni acquose; emulsiona i grassi; è utilizzato come detergente, in particolare nell'industria tessile; è impiegato nella separazione elettroforetica di proteine e lipidi, e nella determinazione del peso molecolare delle proteine. È anche un ingrediente di dentifrici.

8 TEST PRELIMINARE DI TOSSICITA' ACUTA CON LARVE DI *Dicentrarchus Labrax* L..

Il lavoro affrontato in questo periodo di stage si è basato anche sullo sviluppo di metodi ecotossicologici per la valutazione della tossicità dell'SLS (Sodio laurilsolfato) come tossico di riferimento. Il principio del test è quello di verificare la sensibilità del lotto delle larve di branzino acquistate. A tal scopo si determina la concentrazione di un tossico, in questo caso SLS (inquinante molto diffuso in natura, i cui effetti sono conosciuti dall'uomo più di quelli di altri tossici) che causa la morte del 50% di una popolazione (LC 50), dopo un tempo di esposizione variabile da 24 a 96 h. Nello studio condotto è stato scelto un tempo di esposizione pari a 96 h con ricambio dell'acqua a 48h.

8.1 Protocollo operativo: fasi precedenti al test

Luogo di reperimento degli organismi : stabilimento produttivo di Valle Cà Zuliani - Rovigo).

Organismi test:

Età degli organismi : 20-30gg + 8 giorni di quarantena

N° organismi: circa 450 (150 per vasca tronco-conica da 15L dell'impianto pilota descritto prima e 150 in un impianto strutturato in egual modo al precedente ma posto all'interno di un acquario da 120L).

Trasporto: come è stato precedentemente descritto.

Struttura impiantistica: quella precedentemente descritta. L'acquario di volume unitario di 120 L opera in un ciclo chiuso in grado di garantire un ricambio idrico completo ogni ora è, inoltre provvisto di un dispositivo per la termoregolazione delle acque e di un sistema di filtrazione meccanica e biologica (2 filtri marathon da 800 l/h l'uno).

Mantenimento:

Il mantenimento è durato dal 19/4/05 al 26/4/05.

Alimentazione durante la quarantena: 2 volte/die fino a 24 h prima dell'inizio del test (2% in peso secco relativamente all'iniziale peso dell'animale). E' stata somministrata prima *Artemia nana* poi mangime fine per lo svezzamento. Questo perché le larve pronte per un test ecotossicologico sono soltanto quelle con vescica natatoria ben sviluppata, capacità di alimentazione e meglio ancora ma non necessariamente svezzate. Osservando il comportamento delle larve durante l'alimentazione si è notata la preferenza per le Artemie nane, che muovendosi nel mezzo vanno ad eccitare l'istinto di predazione del branzino. Questa preferenza è stata confermata dal fatto che la maggior parte del mangime andava a depositarsi sul fondo e dalle pance color arancione chiaro e non rosso mattone, colore del mangime.

Osservazioni al microscopio durante la quarantena: stereo – microscopio e microscopio ottico (bidimensionale). La vescica natatoria è ben formata in tutti gl'individui.

Sifonamento delle vasche: 2 volte al giorno in modo da evitare gli effetti putrefattivi dei morti ed un aumento dei nitriti causato dal mangime sul fondo.

Fattori chimico-fisici:

L'acqua in cui sono mantenuti gli organismi è la stessa che sarà utilizzata nel test.

Gli organismi sono stati mantenuti negli acquari di laboratorio 8 gg prima dell'inizio del test (paragrafo 10 modificato delle linee guida OECD 203) alle seguenti condizioni:

fotoperiodo	12L 12 B
Illuminazione	500-1000 lux
Temperatura	20±1 °C
Ossigeno	almeno 80% del valore di saturazione dell'aria (aerazione con setti porosi)

Salinità: aumentare progressivamente la salinità fino al 33‰ secondo il seguente schema:

Giorni	1	2	3	4	5	6	7
Salinità(‰)	30	30	31	31	32	33	33

N° morti dopo 8 giorni di mantenimento:

Vasca 1: 64 → mortalità: 42,7%

Vasca 2: 55 → mortalità: 36,7%

Vasca 3 (acquario da 120L): tutti dopo 24 ore. Questo significa che il sistema filtrante dell'acquario da 120L in questione non è sufficiente a garantire un chimica dell'acqua d'allevamento tale da permettere la sopravvivenza delle larve in laboratorio. Inoltre è stata dimostrata un'altra volta l'elevata sensibilità delle larve di *D.labrax*.

Il sistema pilota sperimentale per l'incubazione delle uova ed il mantenimento delle larve si è dimostrato nuovamente efficiente.

8.2 Test preliminare e definitivo di tossicità acuta (48 - 96 h) con SLS

Preparazione dell'acqua di diluizione

Come condizione generale, le diluizioni del campione da saggiare ed il campione di controllo sono preparati con la stessa acqua utilizzata per l'allevamento di *D. labrax*, ottenuta sciogliendo in 1000 ml di acqua deionizzata 30 - 33 g di una miscela di sali sintetici, denominata *Instant Ocean*®, contenente tutti gli elementi minerali maggiori e oligoelementi.

Gli organismi devono essere esposti alle diverse diluizioni del campione in esame senza che le differenti salinità delle soluzioni possano rappresentare una fonte di stress aggiuntivo a quello dei tossici eventualmente presenti nei campioni o più semplicemente una fonte di variabilità dei risultati.

Particolare attenzione va prestata al fatto che l'aggiunta di sali può modificare il pH del campione e, di conseguenza, modificare anche la tossicità dello stesso. In generale, è necessario ricordare che valori di pH al di fuori dell'intervallo compreso tra 7,5 e 8,5 sono da considerarsi come potenziale causa di danno per gli organismi. Se si dovesse procedere alla correzione della salinità, sarà necessario includere un ulteriore controllo con acqua preparata in modo analogo per aggiunta di sali, allo scopo di verificare che tale procedura non causi effetti negativi.

Alimentazione



Nei saggi a 24 ore gli organismi impiegati devono essere mantenuti digiuni per l'intera durata dei saggi. Nei saggi a 48 e 96 ore, allo scadere delle prime 24 ore, si provvede alla somministrazione di una sospensione concentrata di naupli di *Artemia nana*, per i test a 96

Fig. 11. Larva di Artemia (nauplio) al II-III stadio

ore le larve si alimentano 2 ore prima del rinnovo della soluzione che avviene alla 48esima ora.

Procedura di esecuzione del saggio per la valutazione della LC50

La procedura operativa seguita è riferita a quanto riportato nei metodi IRSA (Notiziari dei Metodi Analitici IRSA-CNR, a cura di Viganò, 1996 a; 1996 b; 1998 a; 1998 b).

Allo scopo di definire l'ambito di diluizione entro cui condurre il test definitivo, occorre considerare 5 diluizioni scalari del campione (ad esempio 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01%),

ed esporre 10 organismi ad ogni diluizione. I risultati dopo 24 ore, permetteranno di individuare l'ambito di tossicità.

Le soluzioni in esame devono presentare tenori alini simili a quelli dell'acqua di allevamento dei branzini, poiché eventuali variazioni di salinità possono rappresentare una fonte di stress aggiuntivo a quello dei tossici eventualmente presenti nel campione o più semplicemente una fonte di variabilità dei risultati. Come acqua di diluizione viene utilizzata quella disponibile nell'impianto di stabulazione, integrata con sale *Instant Ocean®*.

La prova definitiva deve indicare le diluizioni che determinano, dopo 24, 48 e 96 ore, percentuali di sopravvivenza inferiori (ma non nulle) e superiori (ma non totali) al 50%.

Per la conduzione di tale prova vengono testate diluizioni intermedie tra quelle ottenute dal saggio preliminare, secondo intervalli logaritmici (Klemm, 1994; IRSA, 1994 a; 1994 b; Guzzella, 1996).

Preparate le diluizioni scalari con le eventuali correzioni di salinità, viene misurata la concentrazione di ossigeno disciolto: se questa risultasse prossima, o inferiore, al limite del 40 % del valore di saturazione, i contenitori test dovranno essere aerati. Solo dopo che le soluzioni hanno raggiunto una concentrazione di ossigeno disciolto superiore al 40 % possono essere introdotti gli organismi per il saggio.

Ogni campione è saggiato in triplo, con ciascun replicato contenente 10 individui; il volume di lavoro è compreso tra 200 ml e 1000 ml a seconda delle dimensioni degli organismi testati (200 ml per larve di 15 giorni; 500 ml per branzini di 30 giorni; 800 – 1000 ml per giovanili di 60 giorni).

Gli animali vengono distribuiti secondo una sequenza casuale nei diversi contenitori sino al completamento del numero richiesto (10).

Per evitare diluizioni significative delle soluzioni del saggio, è opportuno minimizzare il volume d'acqua trasferito con gli organismi. A questo scopo, e per limitare al massimo situazioni di stress, si procede prelevando i pesci, con piccoli contenitori, direttamente dalle vasche di allevamento avendo cura di non danneggiarli. Prima di introdurre lentamente i campioni da saggiare nelle camere per il saggio, si provvede ad aspirare con un piccolo sifone quanta più acqua possibile, lasciando la quantità sufficiente a conservare gli animali immersi.

Per i saggi di 24 e 48 ore non è previsto alcun rinnovo delle soluzioni, mentre per i saggi a 96 ore la procedura prevede il rinnovo del campione da esaminare dopo 48 ore di esposizione. Durante il rinnovo, i pesci non vengono rimossi dai contenitori di saggio, e

pertanto si provvede alla pulizia dei contenitori stessi prima delle operazioni di ricambio e dopo circa 2 ore dalla somministrazione di naupli di *Artemia*. Con l'aiuto di una pipetta con bulbo in lattice, si rimuovono i naupli di *Artemia* non consumati e gli organismi deceduti, registrando come tali quelli che non reagiscono ad una leggera stimolazione. Raggiunto un volume residuo minimo che sia sufficiente a lasciare le larve immerse, si trasferisce lentamente nel contenitore di saggio il campione fresco da esaminare. Le nuove soluzioni vengono preparate rispettando le stesse condizioni descritte per l'allestimento della prova.

Il saggio di tossicità acuta termina allo scadere dei tempi prestabiliti: dopo 24, 48 e 96 ore si annotano le rispettive percentuali di sopravvivenza avendo cura di rimuovere dai contenitori, appena possibile, gli animali deceduti e si procede al calcolo della LC50. Diversamente, occorre ripetere la prova selezionando altri intervalli di diluizione, anche ricorrendo ad un diverso fattore di diluizione (purché sia comunque ≥ 0.5). Il saggio deve essere comunque ripetuto se: 1) nelle soluzioni di controllo gli organismi deceduti superano complessivamente il 10%; 2) quando, dopo le 24 ore della prova, la concentrazione di ossigeno disciolto risulterà inferiore al 40% di saturazione. In questo caso il nuovo saggio dovrà essere allestito equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazione che non diano luogo a turbolenze o ad altri inconvenienti dannosi per gli animali. Gli esemplari di branzino sopravvissuti alle prove tossicologiche non possono essere riutilizzati.

Calcolo della LC50

La LC50 ed i limiti fiduciali inferiore e superiore vengono calcolati sia mediante la rappresentazione grafica che con il metodo statistico (US EPA, 1993), usufruendo del pacchetto software USEPA "ToxStat", che utilizza il test TSK (Trimmed Spearman - Karber), il test Spearman - Karber e il test Probit.

Per la determinazione grafica della LC50 si utilizza un grafico normal-logaritmico, costruito calcolando le percentuali di sopravvivenza (0% e 100%) osservate a due diluizioni successive (diluizioni sulla scala logaritmica) durante il saggio.

Protocollo sperimentale

1. Tipo di saggio:	statico
2. Temperatura:	20±1°C
3. Intensità della luce:	500 - 1000 lux

4. Fotoperiodo:	16 ore di luce e 8 ore di buio
5. Dimensioni della camera per il saggio:	400 - 1000 ml
6. Volume di soluzione per il saggio:	250 ml (larve fino a 15 gg.); 500 ml (larve 30 gg.) ; 800 ml (giovani 60 gg.)
7. Organismi per ogni camera e per il controllo:	10
8. Camere replicate per ogni concentrazione:	3
9. N° totale delle camere:	9
10. N° totale larve:	90
11. Alimentazione:	Presente
12. Aerazione:	Aria a microbolle (no setti porosi ma beccucci terminali in plastica per evitare un danneggiamento delle larve dovuto ad elevata turbolenza)
13. Acqua di diluizione:	Acqua d'allevamento
14. Tossico di riferimento	Sodio dodecil solfato (SDS)
15. Durata del saggio:	48 (prolungato a 96 ore)
16. Effetti valutati:	Morte
17. Condizioni di accettabilità:	Morte nel controllo $\leq 10\%$

Tab. Condizioni applicate per l'esecuzione dei saggi di tossicità con larve di *Dicentrarchus labrax*.



Inizio test: ore 10.30 del 27/3/05

1. Organismo test:

Fig. 12. Larva di *D. labrax* di circa 30 gg (0,005 g) alimentata con *Artemia nana* (stereo 12X).

2. Preparazione delle soluzioni di SDS alle seguenti concentrazioni:

7,08 3,55 1,78 mg/L (concentrazioni estrapolate dal Metodo 8010 A “Metodi analitici per le acque, 1994)

Soluzione madre (SM): pesare 500mg di SDS e scioglierli in 0,5 L di acqua d'allevamento

Camere di saggio:

7,08 mg/L	3,54 ml di SM in 2 L di acqua d'allevamento
3,55 mg/L	1,775 ml di SM in 2 L di acqua d'allevamento
1,78 mg/L	0,890 ml di SM in 2 L di acqua d'allevamento

3. Preparazione e siglatura delle camere di saggio come da schema:

B	B	B	Bianco
SDS 7,08	SDS 7,08	SDS 7,08	Nome del tossico + valore della concentrazione (mg/l)
SDS 3,55	SDS 3,55	SDS 3,55	
SDS 1,78	SDS 1,78	SDS 1,78	In totale 9 contenitori

Fig. 13. Esempio di predisposizione di un test di tossicità acuta con stadi larvali di branzino.



4. Le fasi fino al calcolo dell'LC50 sono descritte precedentemente. Avendo come riferimento molte esperienze di Arpa Ferrara il test preliminare ha acquisito la valenza di test definitivo.

9 RISULTATI

Le seguenti tabelle riportano il numero di morti degli organismi alle diverse concentrazioni nelle tre repliche.

Inizio test: 10:30 del 27/3/05

Tabella 1-2-3. morti.

Test acuto preliminare/definitivo – SLS					
Replica I					
Conc. (mg/l)	org. morti (1h 30 min)	org. morti (2h)	org. morti (24h)	org. morti (48h)	org. morti (96h)
1,78	-	-	1	1	1
3,55	-	7	9	9	9
7,08	10	10	10	10	10

Test acuto preliminare/definitivo – SLS					
Replica II					
Conc. (mg/l)	org. morti (1h 30 min)	org. morti (2h)	org. morti (24h)	org. morti (48h)	org. morti (96h)
1,78	-	-	-	-	-
3,55	-	6	8	8	8
7,08	10	10	10	10	10

Test acuto preliminare/definitivo – SLS					
Replica III					
Conc. (mg/l)	org. morti (1h 30 min)	org. morti (2h)	org. morti (24h)	org. morti (48h)	org. morti (96h)
1,78	-	-	1	1	1
3,55	-	6	8	8	8
7,08	10	10	10	10	10

Sulla base dei risultati di mortalità ottenuti nelle prove è stata calcolata l'LC₅₀ a 48h e 96h.

Tabella 4. Risultati di LC50 dopo 48h.

Replica	Metodo utilizzato	LC50 48h (SLS)	Limite fiduciale inferiore	Limite fiduciale superiore
I	TSK (Trimmed Spearman-Kärber)	2.51 mg/L	2.24 mg/L	2.82 mg/L
I	EPA Probit analysis	2.51 mg/L	1.96 mg/L	3.22 mg/L
II	TSK (Trimmed Spearman-Kärber)	2.89 mg/L	2.42 mg/L	3.44 mg/L
III	TSK (Trimmed Spearman-Kärber)	2.68 mg/L	2.18 mg/L	3.30 mg/L

Tabella 5. Risultati di LC50 dopo 96h.

Replica	Metodo utilizzato	LC50 96h (SLS)	Limite fiduciale inferiore	Limite fiduciale superiore
I	TSK (Trimmed Spearman-Kärber)	2.51 mg/L	2.24 mg/L	2.82 mg/L
I	EPA Probit analysis	2.51 mg/L	1.96 mg/L	3.22 mg/L
II	TSK (Trimmed Spearman-Kärber)	2.89 mg/L	2.42 mg/L	3.44 mg/L
III	TSK (Trimmed Spearman-Kärber)	2.68 mg/L	2.18 mg/L	3.30 mg/L

10 TEST PRELIMINARI DI TOSSICITA' ACUTA CON GIOVANILI DI *Dicentrarchus Labrax* L..

Il test si basa sul protocollo OECD 203 "Fish, Acute Toxicity Test", che definisce la procedura del test statico. Il principio del test è quello di verificare la sensibilità del lotto di giovanili di branzino acquistato. A tal scopo si determina la concentrazione di un tossico, in questo caso SLS, che causa la morte del 50% di una popolazione (LC 50), dopo un tempo di esposizione variabile da 24 a 96 h. Nello studio condotto è stato scelto un tempo di esposizione pari a 48 h.

10.1 Protocollo operativo

Trasporto dei pesci in laboratorio

Possono essere utilizzati sacchi di polietilene contenenti acqua per 1/3 e ossigeno per 2/3. I sacchi vanno inseriti in contenitori termici per limitare le variazioni di temperatura.

Mantenimento dei pesci in laboratorio prima dell'esecuzione dei test

I pesci devono essere mantenuti in laboratorio in acquari del volume unitario di 120 L operanti in ciclo chiuso in grado di garantire un ricambio idrico completo ogni ora, provvisti di un dispositivo per la termoregolazione delle acque e di un sistema di filtrazione meccanica e biologica. La densità massima di organismi è pari a 1g/L.

L'acqua in cui sono mantenuti gli organismi deve essere di qualità uguale a quella che sarà utilizzata nel test.

Gli organismi vanno quindi mantenuti negli acquari di laboratorio per almeno 7 gg prima dell'inizio del test (paragrafo 10 modificato delle linee guida OECD 203) alle seguenti condizioni:

fotoperiodo	12L 12 B
Illuminazione	500-1000 lux
Temperatura	20±1 °C
Ossigeno	almeno 80% del valore di saturazione dell'aria

Salinità: aumentare progressivamente la salinità fino al 33‰ secondo il seguente schema:

Giorni	1	2	3	4	5	6	7
Salinità(‰)	30	30	31	31	32	33	33

Taglia degli organismi: Giovanili (lunghezza totale: 3,1 – 4,0 cm; peso: 0,15 – 0,41 g)

Età degli organismi: circa 60gg + quarantena

Alimentazione: 2 volte/die fino a 24 h prima dell'inizio del test (2% in peso secco relativamente all'iniziale peso dell'animale)

Procedere alla registrazione della mortalità ogni 48 h sul modulo RM.AMB.MET

Al termine dei 7 giorni verificare:

mortalità > 10% il lotto di organismi va eliminato

mortalità compresa tra 5 e 10%	l'acclimatazione in laboratorio deve proseguire per
altri 7 gg	
mortalità < 5%	il lotto di organismi può essere utilizzato per i test

10.2 Test preliminare di tossicità acuta (48 h) con SDS

Camere di saggio	Becker in Pyrex 3L
Acqua	Deionizzata o Milli Q+ Miscela di sali Instant Ocean
Salinità	33‰ (825 g di miscela Instant Ocean in 25 L di acqua deionizzata)
Tossico di riferimento	Sodio dodecil solfato (SDS)
N° totale pesci	118
fotoperiodo	12L 12 B
Illuminazione	500-1000 lux
Temperatura	20±1 °C
Ossigeno	> 60% del valore di saturazione dell'aria
Alimentazione	Assente

Data inizio del test: 16/05/05

1. Preparazione delle soluzioni di SDS alle seguenti concentrazioni (ricordare di misurare il pH della soluzione madre, e fare in modo che questo risulti uguale a quello dell'acqua di allevamento senza la sostanza test. Utilizzare NaOH o HCl per gli eventuali aggiustamenti come da paragrafo 14 della OECD 203):

le concentrazioni delle soluzioni sono 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mg/L.

Soluzione madre (SM): pesare 500mg di SDS e scioglierli in 0,5 L di acqua d'allevamento

Camere di saggio:

10 mg/L	20 ml di SM in 2 L di acqua d'allevamento
5 mg/L	10 ml di SM in 2 L di acqua d'allevamento
2.5 mg/L	5 ml di SM in 2 L di acqua d'allevamento
1.25 mg/L	2.5 ml di SM in 2 L di acqua d'allevamento

Repliche: 3

2. Preparazione e siglatura delle camere di saggio come da schema:

B	B	B	Bianco
SDS 20	SDS 20	SDS 20	Nome del tossico + valore della concentrazione
SDS 10	SDS 10	SDS 10	
SDS 5	SDS 5	SDS 5	
SDS 2.5	SDS 2.5	SDS 2.5	
SDS 1,25	SDS 1,25	SDS 1,25	In totale 18 contenitori

3. Immissione del SDS alle diverse concentrazioni nelle camere di saggio

4. Areazione delle soluzioni

5. Misura dell'ossigeno disciolto: deve essere > 60%

Controllo della Temperatura: deve essere 20 ± 1 °C

6. Introduzione degli organismi nelle camere di saggio: **7 organismi/camera**

la distribuzione deve avvenire in modo casuale, con parziale copertura delle camere di saggio.

Il test viene condotto in assenza di alimentazione, evitando qualsiasi disturbo esterno per gli animali.

7. Registrare allo scadere delle 24 e 48 h i seguenti parametri:

- pH
- O₂ disciolto
- T
- N° pesci morti

Utilizzare per la registrazione il modulo RM.AMB.MET

I pesci sono considerati morti secondo quanto riportato al paragrafo 19 delle linee guida OECD 203.

8. Elaborazione dati e calcolo dell'LC₅₀: TSK (Trimmed Spearman-Kaber) e Metodo di Interpolazione Grafica

9. Definizione delle concentrazioni di SDS da utilizzare nel test definitivo

10.3 Test definitivo di tossicità acuta (48 h) con SDS

Camere di saggio	Becker in Pyrex 3L
Acqua	Deionizzata o Milli Q+ Miscela di sali Instant Ocean
Salinità	33‰ (825 g di miscela Istant Ocean in 25 L di acqua deionizzata)
Tossico di riferimento	Sodio dodecil solfato (SDS)
N° totale pesci	118
fotoperiodo	12L 12 B
Illuminazione	500-1000 lux
Temperatura	20±1 °C
Ossigeno	> 60% del valore di saturazione dell'aria
Alimentazione	Assente

Data inizio del test: 19/05/05

1. Preparazione delle soluzioni di SDS alle seguenti concentrazioni : 7,5, 6, 5, 4, 2,5 mg/L.

Preparazione soluzione madre (SM) : SDS va preparato nuovo tutte le volte

Repliche: 3

2. Preparazione e siglatura delle camere di saggio come mostra lo schema del precedente punto 2.

3. Immissione del SDS alle diverse concentrazioni nelle camere di saggio

4. Areazione delle soluzioni

5. Misura dell'ossigeno disciolto: deve essere > 60%

Controllo della Temperatura: deve essere 20 ±1 °C

6. Introduzione degli organismi nelle camere di saggio: **7 organismi/camera**

La distribuzione deve avvenire in modo casuale

7. Con parziale copertura delle camere di saggio

Il test viene condotto in assenza di alimentazione, evitando qualsiasi disturbo esterno per gli animali

9. Registrare allo scadere delle 24 e 48 h i seguenti parametri:
- pH
 - O₂ disciolto
 - T
 - N° pesci morti

Utilizzare per la registrazione il modulo RM.AMB.MET

I pesci sono considerati morti secondo quanto riportato al paragrafo 19 delle linee guida OECD 203.

10. Elaborazione dati e calcolo dell'LC₅₀ a 48h: TSK (Trimmed Spearman-Kaber)

11 RISULTATI

11.1 Acclimatazione degli organismi

Per l'acclimatazione degli organismi è stata seguita la procedura esposta precedentemente. Sotto in tabella, sono riportati i valori medi dei parametri dell'acqua di allevamento nel periodo che precede il test che va dal 27/4/05 al 16/5/05 .

Tab.6 – Valori medi dei parametri dell'acqua di allevamento

Parametri degli stabulatori	Vasca A	Vasca B
pH	7,61	7,63
Salinità (per mille)	29	29
Temperatura (°C)	20,4	20,1
Ossigeno (%)	71,5	79,7
Nitriti	0,08	0,04
Nitrati	20,3	17,4
Ammoniaca	-	-

11.2 Parametri test acuto con tossico di riferimento (SDS)

I valori dei parametri misurati nelle tre repliche del test statico acuto con l'SDS risultano appartenere ai range ottimali per il mantenimento della specie in esame.

pH: [7,5 – 8,5]

T: [20±1°C]

Salinità: [30 – 33‰]

O₂: >60% val. riferito alla saturazione dell'aria

Le seguenti tabelle, invece, riportano il numero di morti degli organismi alle diverse concentrazioni nelle tre repliche.

Inizio test: 12:35 del 16/5/05

Test acuto preliminare – SLS			
Replica I – II - III			
Conc. (mg/l)	org. morti (1h 20 min)	org. morti (24h)	org. morti (48h)
1,25	-	-	-
2,5	-	-	-
5	-	7	7
10	7	7	7
20	7	7	7

Inizio test: 14:00 del 18/5/05

Tabella 7-8-9. morti

Test acuto definitivo – SLS			
Replica I			
Conc. (mg/l)	org. morti (1h 20 min)	org. morti (24h)	org. morti (48h)
2,5	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7,5	3	7	7

Test acuto definitivo – SLS			
Replica II			
Conc. (mg/l)	org. morti (1h 20 min)	org. morti (24h)	org. morti (48h)
2,5	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7,5	-	7	7

Test acuto definitivo – SLS			
Replica III			
Conc. (mg/l)	org. morti (1h 20 min)	org. morti (24h)	org. morti (48h)
2,5	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7,5	4	7	7

Sulla base dei risultati di mortalità ottenuti nelle prove, l'LC₅₀ è stata calcolata con i metodi riportati nelle seguenti tabelle per mezzo del programma in linguaggio DOS ToxStat, di cui vediamo alcuni risultati nella finestra di sotto:

Fig.14

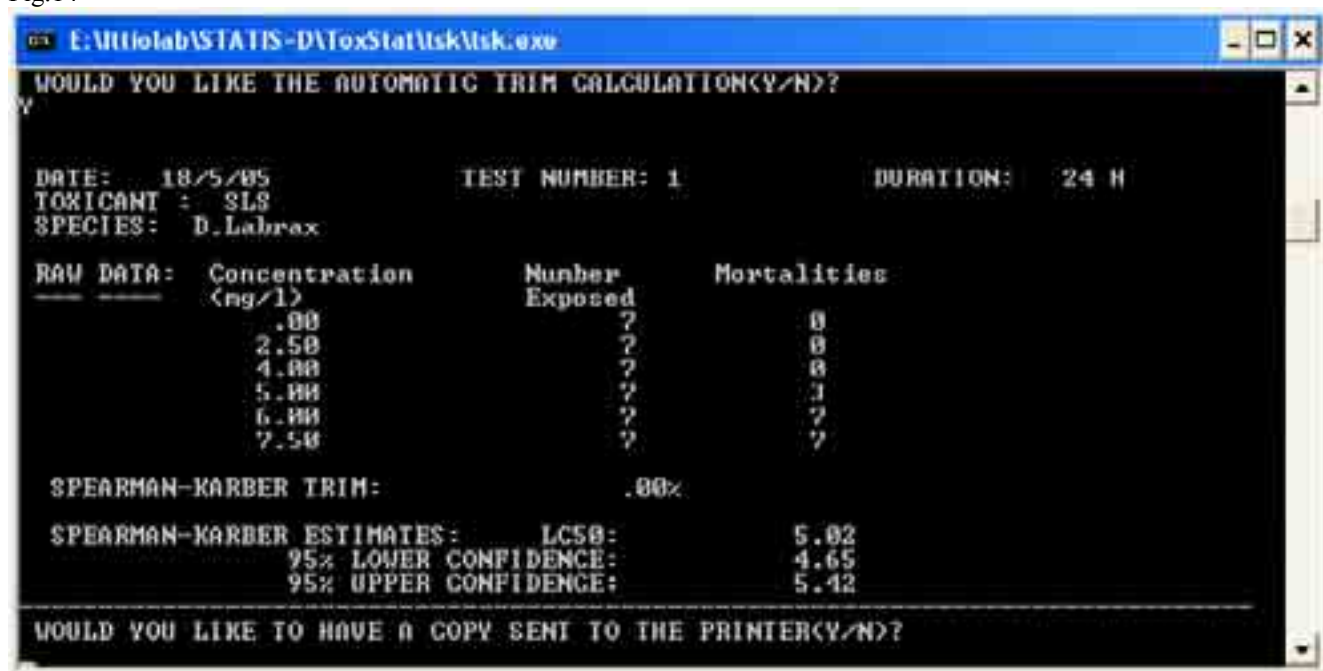


Tabella 10– Risultati di LC50 dopo 24h calcolati per il saggio acuto definitivo con SLS.

Replica	Metodo utilizzato	LC50 24h (SLS)	Limite fiduciale inferiore	Limite fiduciale superiore
I	TSK (Trimmed Spearman-Karber)	5.02 mg/L	4.65 mg/L	5.42 mg/L
II	TSK (Trimmed Spearman-Karber)	5.48 mg/L	-	-
III	TSK (Trimmed Spearman-Karber)	4.88 mg/L	4.52 mg/L	5.26 mg/L

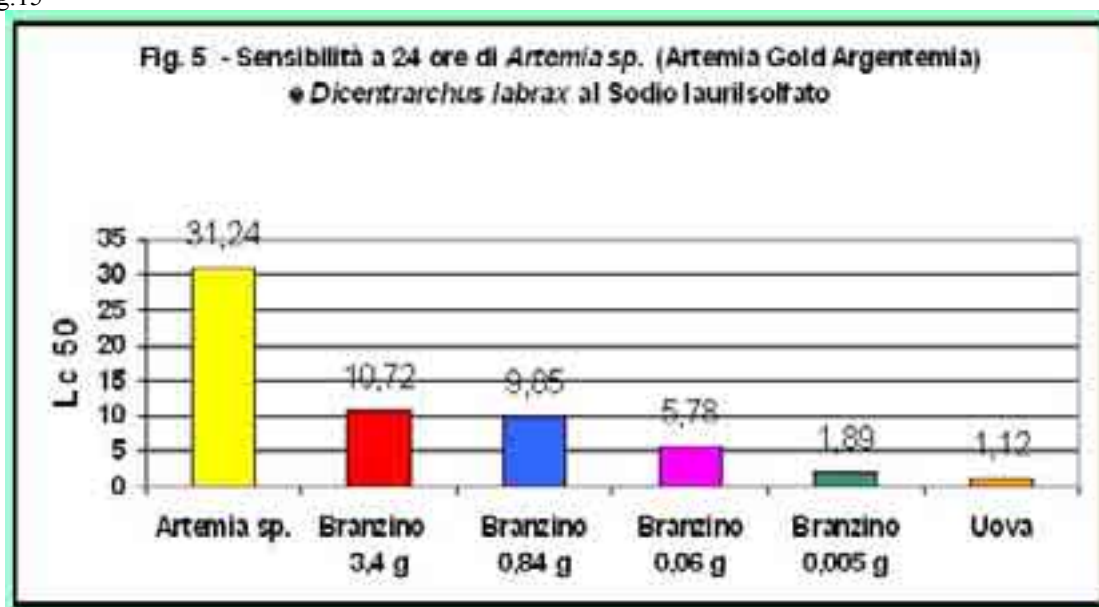
Tabella 11– Risultati di LC50 dopo 48h calcolati per il saggio acuto definitivo con SLS.

Replica	Metodo utilizzato	LC50 48h (SLS)	Limite fiduciale inferiore	Limite fiduciale superiore
I	TSK (Trimmed Spearman-Kärber)	5.02 mg/L	4.65 mg/L	5.42 mg/L
II	TSK (Trimmed Spearman-Kärber)	5.48 mg/L	-	-
III	TSK (Trimmed Spearman-Kärber)	4.88 mg/L	4.52 mg/L	5.26 mg/L

12 CONCLUSIONI

Rifacendomi alle esperienze passate di Arpa Ferrara, vedi figura sotto, ho ottenuto dei risultati congrui coi precedenti.

Fig.15



Questi valori indicano chiaramente come i nauplii siano a 24 ore molto più tolleranti al Sodio laurilsolfato rispetto a tutte le taglie di branzino saggiate, in particolar modo se confrontati con larve e uova embrionate.

Il test con *Artemia* sp. (*Artemia* Gold *Argentemia*) utilizzato come confronto, ha confermato una bassa sensibilità ai tossici di riferimento, se si considera il criterio vita-morte (Vanhaecke, 1980).

I nostri dati sperimentali, infatti, evidenziano come il crostaceo *Artemia* sp. risulti essere da 3 a 10 volte meno sensibile del branzino al Sodio laurilsolfato.

La serie di test di tossicità effettuati ha dimostrato che, tra tutte le fasi larvali e giovanili saggiate, le larve di 30 e 90 giorni sono quelle che hanno dato migliori risultati, sia nei confronti della sensibilità al tossico che per la facilità di esecuzione delle prove. Pertanto il *Dicentrarchus labrax*, è un organismo che riteniamo essere idoneo per la valutazione di una ampia varietà di composti tossici, previa verifica della sensibilità al principio attivo.

Altro dato interessante, come precedentemente discusso, è la possibilità di schiudere e svezzare le larve in laboratorio o di reperire i soggetti di interesse presso avannotterie specializzate che consentano di avere a disposizione materiale idoneo durante l'intero arco dell'anno. Tra i vantaggi dell'eventuale adozione di questo test non va sottovalutato l'aspetto economico, infatti abbiamo potuto verificare costi abbastanza contenuti.

BIBLIOGRAFIA

A.P.H.A. (1995) - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington DC, 8/1-8/25.

BARAHONA-FERNANDES M.H. (1978) – Effect of aeration on the survival and growth of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae: a preliminary study. *Aquaculture*, 14: 67-74.

BARAHONA-FERNANDES M.H. (1979) – Some effects of light intensity and photoperiod on the sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax* (L.)) reared at the centre oceanologique de Bretagne. *Aquaculture*, 17: 311-321.

BARATELLI L., V. VAROTTO, G. BADARACCO, G. MURA, B. BATTAGLIA, C. BARIGOZZI (1990) - Biological data on the brine shrimp *Artemia* living the Italian saltwork. *Atti Acc. Lincei Rend. Fis.*, 9(2): 45-53.

BARNABÉ G. (1972) - Contribution à l'étude de la biologie du loup (*Dicentrarchus labrax*) de la région de Sète. Thèse 3^e cycle, Univ. Sci. Tech. Lanquedoc, Montpellier, 160 p.

BARNABÉ G. (1976) - Contribution à la connaissance de la biologie du loup [*Dicentrarchus labrax* (L.)](poisson Serranidae) de la regio de Sète. Thèse d'Etat, Univ. Sci. Tech. Lanquedoc, Montpellier, 426 p.

BARNABE' G. (1976) – Elevage larvaire du loup (*Dicentrarchus labrax* (L.); Pisces, Serranidae) a l'aide d'aliment sec compose. *Aquaculture*, 17: 311-321.

BARNABE' G. (1990) – Rearing bass and gilthead bream. In: Barnabe G. (ed), *Aquaculture*, vol. 2, Ellis Horwood Limited, England.

BARNABE' G., GUISSI A. (1994) - Adaptations of the feeding behaviour of larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), to an alternating live-food/compound-food feeding regime. *Aquaculture and Fisheries Management* 25: 537-546.

BENEDETTI P., PINNA A., COLOMBO L. (1995) – Isolamento di sonde per l'analisi unilocus di DNA minisatellite nel branzino *Dicentrarchus labrax* L.. In: Berletti M., Rossi R., Spreafico E. (eds), *Ricerche e sperimentazioni 1988-1994*, Piani Integrati Mediterranei per le zone lagunari dell'Adriatico settentrionale, Venezia: 27-34.

BROMAGE N.R., ROBERTS R.J. (1995) – Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). In: *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science Ltd, University Press Cambridge G.B.: 138-168.

CASTRIC J., DE KINKELIN P. (1984) – Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*), to viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture*, 41: 203-212.

CESCHIA G., GIORGETTI G., LIBERATORE U. (1995) – Principali malattie batteriche del branzino (*Dicentrarchus labrax*) e dell'orata (*Sparus aurata*) allevati nelle acque esterne della regione Friuli- Venezia-Giulia. In: Berletti M., Rossi R., Spreafico E. (eds), *Ricerche e sperimentazioni 1988-1994*, Piani Integrati Mediterranei per le zone lagunari dell'Adriatico settentrionale, Venezia: 286-289.

CHAPMAN G.A., DENTON D.L., LAZORCHAK J.M. (1995) - Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. EPA-600/R-95/136, Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.

CHATAIN B. (1986) – La Vessie Natatoire chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus auratus*: aspects morphologiques du développement. *Aquaculture*, 53: 303-311.

CHATAIN B. (1987) – La Vessie Natatoire chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus auratus*: Influence des Anomalies de Développement sur la Croissance de la Larve. *Aquaculture*, 65: 175-181.

COGNETTI G., MALTAGLIATI F. (2000) – Biodiversity and Adaptive Mechanisms in Brackish Water Fauna. *Marine Pollution Bulletin*, 40 (1): 7-14.

COPPI S., MARCHESINI C., VILLANI B. (2000) - Sostanze chimiche, diffusione inquinanti e aree contaminate. Relazione sullo stato dell'ambiente '99 (Regione Emilia Romagna): 91-106.

DALLOCCIO F., MATTEUZZI M., PREGNOLATO L., GELLI F. (1995) – Indicatori di stress: variazione dei parametri ematici, produzione di malondialdeide, ed espressione di proteine specifiche in *Dicentrarchus labrax*. In: Berletti M., Rossi R., Spreafico E. (eds), *Ricerche e sperimentazioni 1988-1994*, Piani Integrati Mediterranei per le zone lagunari dell'Adriatico settentrionale, Venezia: 298-308.

DEVAUCHELLE N.&D. COVES (1988a) - Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reproduction in captivity: gametogenesis and spawning. *Aquat. Living Resour.* 1:215-222.

DEVAUCHELLE N.&D. COVES (1988b) - The characteristics of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs: description, biochemical composition and hatching performances. *Living Resour.* 1:223-230.

DIVANACH P., KENTOURI M., PARIS J. (1981) – Etapes du développement embryonnaire et larvaire du sar, *Diplodus sargus* L., en élevage. *Aquaculture*, 27: 339-353.

EPA (Environmental Protection Agency) (1991) - Technical Support Document for Water Quality-Based Control. EPA-505/2-90-001 (PB91-127415), Washington DC.

FLÜCHTER J. (1982) – Substance essential for metamorphosis of fish larvae extracted from *Artemia*. *Aquaculture*, 27: 83-85.

GALETTI M., DEL GRANO N., VOLPATTI D., VOLPELLI L.A., CESCHIA G., GIORGETTI G., ADAMS S., RICHARDS R. (1995) – Studio patogenetico della pasteurellosi ittica nel branzino (*Dicentrarchus labrax*). In: Berletti M., Rossi R., Spreafico E. (eds), *Ricerche e sperimentazioni 1988-1994*, Piani Integrati Mediterranei per le zone lagunari dell'Adriatico settentrionale, Venezia: 309-323.

GANDOLFI G., ZERUNIAN S., TORRICELLI P., MARCONATO A. (1991) – I pesci delle acque interne italiane. Ministero dell'Ambiente, U.Z.I., Istituto Poligrafico dello Stato.

GHETTI P.F. (1997) – Indice Biotico Esteso (I.B.E.). I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque correnti. Manuale di applicazione. Provincia Autonoma di Trento.

GIORGETTI G., ZANINI M., DE DOMINIS S., CESCHIA G., SORGELOOS P., DEHASQUES M., CIUCHINI F., MACRI' A. (1995) – Vaccinazione orale negli avannotti di branzino mediante bioincapsulazione nelle artemie e/o integrazione nel mangime di antigene *Vibrio anguillarum* inattivato. In: Berletti M., Rossi R., Spreafico E. (eds), *Ricerche e sperimentazioni 1988-1994*, Piani Integrati Mediterranei per le zone lagunari dell'Adriatico settentrionale, Venezia: 21-26.

GNES A. (1995) – Maturazione indotta di riproduttori catturati nelle valli di Comacchio. In: Berletti M., Rossi R., Spreafico E. (eds), *Ricerche e sperimentazioni 1988-1994*, Piani Integrati Mediterranei per le zone lagunari dell'Adriatico settentrionale, Venezia: 21-26.

HUNN J.B. (1989) - History of acute toxicity tests with fish, 1863-1987. In: *Investigation and Fish Control*, (Fish & Wildlife Service, ed.), National Fisheries Research Center, LaCrosse, Wisconsin, pp. 1-10.

ICRAM (2001) – Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003). *Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Servizio Difesa Mare*. Sedimenti – scheda 11.

IRSA (1994 a) - 8010 - Metodi di valutazione della tossicità con acque con pesci. In: Metodi analitici per le acque, *Quad. Ist. Ric. Acque*, 100, 332-336.

JOHNSON D.W., KATAVIC I. (1984) – Mortality, growth and swim bladder stress syndrome of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae under varied environmental conditions. *Aquaculture*, 38: 67-78.

JOHNSON D.W., KATAVIC I. (1986) – Survival and growth of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae as influenced by temperature, salinity and delayed initial feeding. *Aquaculture*, 52: 11-19.

KLEMM D.J., MORRISON G.E., NORBERG-RING J.J., PELTIER W.H., HEBER M.A. (1994) - Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. EPA-600/4-91/003, Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.

KLEMM D.J., STOBBER Q.J., LAZORCHAK J.M. (1993) – Fish field and laboratory methods for evaluating the biological integrity of surface waters. EPA 600/R-92/111, Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio.

MARANGOS C., HIROKI Y., CECCALDI H.J. (1986) – Role de la temperature et de la salinite sur le taux de survie et la morphogenese au cours du developpement embryonnaire chez les oeufs du loup de mer *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Pisces, Teleostei, Serranidae). *Aquaculture*, 54: 287-300.

MELOTTI P., AMERIO M., GENNARI L., RONCARATI A. (1992) - Valutazioni comparative sull'impiego di alcune diete inerti nello svezzamento del branzino (*Dicentrarchus labrax* L.). *Zoot. Nutr. Anim.* 3-4: 191-200.

MELOTTI P., RONCARATI A., R. IMPICCINI (1992) – Presenza dell'Atemia salina nel comprensorio di Comacchio. Fratello sale, Nuova Alfa Editoriale, Bologna: 15-20.

MELOTTI P., GENNARI L., RONCARATI A., MORDENTI O., DEES A. (1995) - Prove di microincapsulazione di diete artificiali impiegate nello svezzamento del branzino (*Dicentrarchus labrax* L.). *Atti XI Congr. Naz. A.S.P.A.*, Grado: 37-38.

MELOTTI P., GENNARI L., RONCARATI A., MORDENTI O., DEES A. (1997) - Prove di microincapsulazione di diete artificiali impiegate nello svezzamento del branzino. *Atti XI Cong.Naz.ASPA*: 37-38

MELOTTI P., MORDENTI O., RONCARATI A., DEES A. (1996) - Evaluation of microencapsulated artificial diets for seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae weaning. *Atti World Aquaculture '96*: 259-261.

MELOTTI P., RONCARATI A., GENNARI L., NOVELLI A. (1998) – Riproduzione controllata del branzino e dell'orata mediante manipolazione ecofisiologica. *Biol. Marina Mediterranea, (parte 2°) Acquacoltura*, Società Italiana di Biologia Marina, vol. 5, fasc. 3.

MELOTTI P., RONCARATI A., MORDENTI O. (1999 a) - L'acquacoltura oggi e domani: quadro mondiale, europeo e situazione italiana. Acquacoltura e pesca tra i due millenni. *I Georgofili. Quaderni*, II: 41-64.

PAPERNA I., BAUDIN LAURENCIN F. (1979) – Parasitic infections of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and gilt head sea bream, *Sparus aurata*, in mariculture facilities in France. *Aquaculture*, 16: 173-175.

PINOSA M., VOLPELLI L.A., BERALDO P., TULLI F. (1995) – Alimentazione degli stadi larvali di pesci eurialini con particolare riferimento all'orata e al branzino. In: Berletti M., Rossi R., Spreafico E. (eds), *Ricerche e sperimentazioni 1988-1994*, Piani Integrati Mediterranei per le zone lagunari dell'Adriatico settentrionale, Venezia: 109-121.

SORGELOOS P., M. DEHASQUE, P. DHERT, P. LAVENS (1994) - Larviculture of marine finfish: the current status. *INFOFISH International*, 4: 49-54.

TORTONESE E. (1985) – Interesse scientifico e pratico di una famiglia di pesci ossei: gli Aterinidi. *Quaderni dell'Ente Tutela Pesca, Rivista di Limnologia*, Udine: n. 10.

TRIEFF N.M. (1980) – Toxicity of haevy metals, oils and other organics on *Artemia*. In: Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E. (eds), *The Brine Shrimp Artemia, vol. 1, Morfology, Genetics, Radiobiology, Toxicology*, Universa Press, Wetteren, Belgium: 253-262.

US EPA (1993) - Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-90/027F, Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.

STIEN X., PERCIC P., GNASSIA-BARELLI M., ROMEO M., LAFAURIE M. (1998) – Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*, 99 (3): 339-345.

TESTO AGGIORNATO DEL DECRETO LEGISLATIVO 11 maggio 1999, n. 152, recante: “Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole”, a seguito delle disposizioni correttive ed integrative di cui al decreto legislativo 18 agosto 2000, n. 258. Supplemento ordinario n. 172/L alla "*Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*", n. 246 del 20 ottobre 2000 - Serie generale.

TIBALDI E., TULLI F., PAPP Z.G., PINOSA M. (1995) – Fabbisogno in aminoacidi ed essenzialità dei PUFA ω -3 nell'avannotto di branzino (*Dicentrarchus labrax*). In: Berletti M., Rossi R., Spreafico E. (eds), *Ricerche e sperimentazioni 1988-1994*, Piani Integrati Mediterranei per le zone lagunari dell'Adriatico settentrionale, Venezia: 83-95.

TORTONESE E. (1975) – Osteichthyes – Fauna d'Italia. Calderini, Bologna.

US EPA (1993) - Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-90/027F, Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.

VANHAECKE P., PERSOONE G., CLAUS C., SORGELLOOS P. (1980) – Research on the development of short term standard toxicity test with *Artemia* nauplii. In: Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E. (eds), *The Brine Shrimp Artemia*, vol. 1, *Morfology, Genetics, Radiobiology, Toxicology*, Universa Press, Wetteren, Belgium: 263-285.

WATANABE T., KITAJIMA C., FUJITA S. (1983) – Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34: 115-143

WILLIAMS H., JONES A. (1994) – *Parasitic worms of fish*. Taylor & Francis London Ltd..

1 ALLEGATO: Eutrofizzazione delle acque costiere dell'Emilia-Romagna

Un'altra esperienza svolta durante il periodo di stage è stata la partecipazione al programma “Eutrofizzazione delle acque costiere dell'Emilia-Romagna” gestito da Arpa Emilia – Romagna.

1.1 Introduzione

La Struttura Oceanografica Daphne, operativa fin dal 1978 sulla base delle direttive indicate nella L.R. 39/78, si è affermata come Struttura specialistica nel campodel monitoraggio marino, configurandosi in Arpa con la missione specifica di produrre servizi e studi al fine di presidiare, controllare le risorse marine e sviluppare conoscenze sull'ecosistema marino – costiero. In tale contesto si colloca la produzione del rapporto annuale, che nel tempo si è rivelato un valido strumento tecnico scientifico per la divulgazione delle informazioni inerenti i fenomeni trofici e dei conseguenti effetti a livello di ecosistema marino.

I dati riportati in questo rapporto si riferiscono principalmente al programma di monitoraggio sull'eutrofizzazione delle acque marine costiere dell'Emilia – Romagna, integrati dalle osservazioni derivanti dal programma di sorveglianza sugli aggregati mucillagginosi.

Tali piani di monitoraggio, oltre ad una mirata azione di controllo sull'ecosistema marino, rivestono un importante ruolo nella ricerca e nello studio dei fattori casuali.

Tra i principali obiettivi si evidenziano:

- definizione dell'intensità e dell'estensione delle fioriture microalgali nell'area compresa fra il delta del Po e cattolica su un territorio di 2600 Km²;
- determinazione e conteggio delle specie fitoplanctoniche che sostengono le fioriture;
- controllo degli effetti derivanti dalle diverse fasi dell'evoluzione del fenomeno (ipossie ed anossie nei fondali, morie di organismi bentonici, caratteristiche organolettiche delle acque);
- determinazione della concentrazione dei nutrienti (fosforo e azoto) e loro andamenti temporali e spaziali;
- determinazione dei principali parametri fisico-chimici delle acque (temperatura, salinità, ossigeno disciolto, pH, clorofilla "a" e trasparenza), loro andamenti temporali e spaziali in relazione agli eventi meteorologici ed ai fenomeni eutrofici (anche ai fini della classificazione dello stato qualitativo delle acque costiere previsto dal D.lgs 152/99 integrato con D.lgs 258/00);
- presenza di aggregati mucillagginosi, loro distribuzione spaziale e dinamica di formazione.

Oltre che i citati programmi istituzionali, la Struttura realizza progetti collaterali ad integrazione dei precedenti, tra cui si annovera il monitoraggio finalizzato al controllo degli ecosistemi marini regolato da una convenzione triennale con il Ministero Ambiente (L.979/82).

Complessivamente le uscite della "Daphne II" ad es nel 2003 sono state 142.

1.2 Materiali e Metodi

Il programma di monitoraggio condotto è stato in gran parte finalizzato alla caratterizzazione delle acque costiere fino ai 10 Km dalla costa, in un reticolo formato da 32 stazioni distribuite nel tratto di costa compreso fra i bagni di Volano e Cattolica (fig.). La frequenza di campionamento è stata settimanale.

Oltre alle stazioni citate sono state monitorate mensilmente due stazioni poste a 20 Km dalla costa sul prolungamento delle direttrici di porto Garibaldi e di Cesenatico. Nelle previste stazioni, oltre ai normali profili verticali dei parametri fisico – chimici, vengono raccolti campioni per la determinazione dei nutrienti (componenti dell'azoto, del fosforo e silice reattiva) in superficie e sul fondo.

Sempre e solo in questi transetti vengono analizzate sul filtrato, oltre alla frazione solubile dell'azoto, del fosforo, anche quella totale solubile.

In ogni stazione vengono inoltre prelevati, a 0,5 m dalla superficie, campioni di acqua per le analisi dei nutrienti e per le determinazioni quali – quantitative del fitoplancton.

Inoltre, poiché i D. Lgs 152/99 e 258/00 affidano alla regione la caratterizzazione qualitativa delle acque marino costiere, il programma di monitoraggio è stato predisposto tenendo conto anche di questa esigenza e pertanto l'ubicazione delle stazioni, la frequenza dei prelievi ed i parametri controllati sono conformi a quanto prescritto dalle norme. I dati raccolti vengono comunicati anche al Ministero della Sanità in accordo alle disposizioni di legge in tema di balneazione (DPR 470/820e successive integrazioni).

Le determinazioni dei parametri idrologici vengono effettuate mediante la strumentazione installata a bordo del battello oceanografico “Daphne II”.

Per l'esecuzione dei profili verticali di temperatura, salinità, ossigeno disciolto, pH, torbidità e clorofilla “a” si utilizza la sonda multiparametrica Idronaut mod. Ocean Seven 316 che, azionata da un verricello, viene calata sulla verticale. I dati acquisiti sono trasmessi con telemetria al computer di bordo, mediati e registrati su supporto magnetico.

La concentrazione di clorofilla “a” è determinata col metodo fluorimetrico, mediante l'impiego di un fluorimetro TURNER 10 AU installato a bordo del battello. Per i profili verticali di questo parametro si utilizza un fluorimetro della “Sea Point” abbinato alla sonda multiparametrica della “Idronaut”.

La torbidità viene misurata lungo la colonna d'acqua mediante un trasmissometro della “Sea Teck” con cammino ottico di 25 cm abbinato alla sonda “Idronaut”.

La trasparenza dell'acqua è misurata mediante disco di Secchi.

Vengono inoltre utilizzate nel programma di monitoraggio telecamere filoguidate (Fulgor Mare e Telesub Lanterna) con lo scopo di seguire la eventuale formazione degli aggregati mucillagginosi nel tempo ed i loro spostamenti sulla colonna d'acqua.



Fig.16

1.3 Risultati

Questi sono i risultati ottenuti dalla Daphne II il 2 e 3/5/05. I dati ottenuti i giorni 1-2/8/05, invece, non sono presenti.

Staz	Data	Mea.Time	Depth	Temp	Cond	Sal	SigmaTau
1002	02/05/2005	12.21.15	0,5	17,535	40,492	30,778	22,15582
1002	02/05/2005	12.22.03	1	17,657	40,093	30,351	21,80136
1002	02/05/2005	12.22.03	2	17,516	41,281	31,465	22,69243
1002	02/05/2005	12.22.03	3	17,259	43,331	33,423	24,25754
1002	02/05/2005	12.22.03	4	17,284	44,116	34,079	24,75862
1002	02/05/2005	12.22.03	5	16,592	43,93	34,507	25,25322
1002	02/05/2005	12.22.03	6	13,064	42,021	35,953	27,14548
1002	02/05/2005	12.22.03	7	12,52	42,369	36,811	27,92559
1002	02/05/2005	12.22.03	8	12,209	42,32	37,07	28,19319
1002	02/05/2005	12.22.03	9	11,844	42,254	37,37	28,50378
1002	02/05/2005	12.22.03	9,37	11,75	42,226	37,436	28,57383
1004	02/05/2005	10.55.47	0,5	19,352	34,831	24,917	17,25321
1004	02/05/2005	10.57.15	1	18,77	38,139	27,991	19,73646
1004	02/05/2005	10.57.15	2	17,365	42,349	32,499	23,51938
1004	02/05/2005	10.57.15	3	15,255	42,65	34,532	25,56826
1004	02/05/2005	10.57.15	4	13,307	41,691	35,409	26,66561
1004	02/05/2005	10.57.15	5	12,503	41,658	36,138	27,39764
1004	02/05/2005	10.57.15	6	12,21	41,43	36,199	27,50718
1004	02/05/2005	10.57.15	7	11,542	41,082	36,508	27,88121
1004	02/05/2005	10.57.15	8	11,095	41,019	36,891	28,2679
1004	02/05/2005	10.57.15	9	10,688	41,018	37,303	28,66924
1004	02/05/2005	10.57.15	10	10,303	40,887	37,563	28,9467
1004	02/05/2005	10.57.15	11	10,212	40,797	37,566	28,96903
1004	02/05/2005	10.57.15	12	10,176	40,787	37,592	29,00085
1004	02/05/2005	10.57.15	13	10,174	40,78	37,587	29,00138
1004	02/05/2005	10.57.15	14	10,171	40,778	37,587	29,0066
1004	02/05/2005	10.57.15	15	10,175	40,773	37,577	29,00354
1004	02/05/2005	10.57.15	15,84	10,175	40,78	37,585	29,01289
1009	02/05/2005	9.28.25	0,5	16,065	45,111	36,023	26,52323
1009	02/05/2005	9.29.37	1	16,066	45,11	36,022	26,52406
1009	02/05/2005	9.29.37	2	16,077	45,175	36,069	26,56272
1009	02/05/2005	9.29.37	3	15,734	44,738	35,988	26,58263
1009	02/05/2005	9.29.37	4	14,29	43,275	35,981	26,90182
1009	02/05/2005	9.29.37	5	13,94	43,045	36,093	27,0678
1009	02/05/2005	9.29.37	6	13,742	42,869	36,114	27,13052
1009	02/05/2005	9.29.37	7	13,411	42,594	36,167	27,24454
1009	02/05/2005	9.29.37	8	12,951	42,23	36,257	27,41346
1009	02/05/2005	9.29.37	9	12,112	41,512	36,373	27,67461
1009	02/05/2005	9.29.37	10	11,253	41,07	36,783	28,16291
1009	02/05/2005	9.29.37	11	10,647	40,946	37,27	28,65954
1009	02/05/2005	9.29.37	12	10,372	40,891	37,495	28,89044
1009	02/05/2005	9.29.37	13	10,361	40,884	37,5	28,90022
1009	02/05/2005	9.29.37	14	10,359	40,88	37,497	28,90274
1009	02/05/2005	9.29.37	14,88	10,367	40,886	37,494	28,90318
1014	03/05/2005	8.32.02	0,5	18,021	45,012	34,229	24,68087
1014	03/05/2005	8.33.07	1	18,057	44,951	34,147	24,60994
1014	03/05/2005	8.33.07	2	17,941	45,478	34,696	25,06395

1014	03/05/2005	8.33.07	3	17,22	46,252	35,992	26,23681
1014	03/05/2005	8.33.07	4	16,812	45,894	36,041	26,37669
1014	03/05/2005	8.33.07	5	15,501	44,455	35,944	26,6102
1014	03/05/2005	8.33.07	6	14,214	43,338	36,11	27,02711
1014	03/05/2005	8.33.07	7	13,69	42,884	36,177	27,19424
1014	03/05/2005	8.33.07	8	12,848	42,134	36,265	27,4406
1014	03/05/2005	8.33.07	9	12,77	42,6	36,789	27,867
1014	03/05/2005	8.33.07	10	12,693	42,385	36,655	27,78271
1014	03/05/2005	8.33.07	11	11,909	41,99	37,042	28,24398
1014	03/05/2005	8.33.07	12	11,812	41,998	37,146	28,34859
1014	03/05/2005	8.33.07	12,27	11,812	42,03	37,178	28,3745
1019	03/05/2005	9.55.35	0,5	17,501	47,043	36,429	26,49375
1019	03/05/2005	9.56.36	1	17,465	46,958	36,387	26,47177
1019	03/05/2005	9.56.36	2	17,408	46,879	36,369	26,47629
1019	03/05/2005	9.56.36	3	17,356	46,837	36,379	26,50128
1019	03/05/2005	9.56.36	4	16,995	46,493	36,403	26,61114
1019	03/05/2005	9.56.36	5	15,101	44,832	36,659	27,25218
1019	03/05/2005	9.56.36	6	14,533	44,407	36,804	27,49442
1019	03/05/2005	9.56.36	7	14,074	44,129	36,984	27,73748
1019	03/05/2005	9.56.36	8	13,625	43,96	37,258	28,04986
1019	03/05/2005	9.56.36	9	12,752	42,962	37,156	28,15504
1019	03/05/2005	9.56.36	10	11,463	41,88	37,381	28,58964
1019	03/05/2005	9.56.36	11	11,386	41,812	37,391	28,61648
1019	03/05/2005	9.56.36	12	11,343	41,791	37,413	28,64582
1019	03/05/2005	9.56.36	13	11,341	41,786	37,409	28,64773
1019	03/05/2005	9.56.36	13,83	11,339	41,841	37,467	28,69668
102	02/05/2005	11.59.40	0,5	19,84	25,4	17,397	11,43088
102	02/05/2005	12.00.31	1	19,327	29,394	20,777	14,11935
102	02/05/2005	12.00.31	2	17,423	39,629	30,148	21,70706
102	02/05/2005	12.00.31	3	16,47	41,602	32,568	23,78517
102	02/05/2005	12.00.31	4	14,268	40,745	33,658	25,11346
102	02/05/2005	12.00.31	4,42	14,174	40,993	33,967	25,37298
104	02/05/2005	11.23.51	0,5	20,405	26,141	17,717	11,53839
104	02/05/2005	11.24.54	1	20,225	27,687	19,013	12,56663
104	02/05/2005	11.24.54	2	17,738	39,22	29,653	21,25607
104	02/05/2005	11.24.54	3	13,659	41,655	35,063	26,31886
104	02/05/2005	11.24.54	4	12,832	41,867	36,024	27,23919
104	02/05/2005	11.24.54	5	12,658	41,842	36,167	27,38934
104	02/05/2005	11.24.54	5,75	12,34	41,847	36,479	27,69793
106	02/05/2005	13.11.11	0,5	20,537	26,54	17,958	11,68938
106	02/05/2005	13.12.08	1	20,751	25,592	17,175	11,04708
106	02/05/2005	13.12.08	2	19,568	32,569	23,149	15,86858
106	02/05/2005	13.12.08	3	17,363	41,257	31,575	22,81688
106	02/05/2005	13.12.08	4	15,462	42,948	34,624	25,59733
106	02/05/2005	13.12.08	5	13,037	42,028	35,986	27,17104
106	02/05/2005	13.12.08	6	11,705	41,328	36,594	27,91194
106	02/05/2005	13.12.08	7	11,145	41,201	37,024	28,35831
106	02/05/2005	13.12.08	7,38	11,067	41,225	37,126	28,45382
108	02/05/2005	13.41.33	0,5	20,944	35,628	24,607	16,62132
108	02/05/2005	13.42.28	1	20,995	35,632	24,581	16,58959
108	02/05/2005	13.42.28	2	20,686	35,971	25,029	17,01232
108	02/05/2005	13.42.28	3	18,017	41,328	31,163	22,34512
108	02/05/2005	13.42.28	4	16,56	42,83	33,57	24,53828

108	02/05/2005	13.42.28	5	14,445	42,555	35,182	26,2522
108	02/05/2005	13.42.28	6	12,311	41,957	36,615	27,81146
108	02/05/2005	13.42.28	6,36	12,211	41,856	36,614	27,83095
109	02/05/2005	9.03.46	0,5	19,42	37,427	26,94	18,77414
109	02/05/2005	9.05.19	1	19,49	37,799	27,191	18,94941
109	02/05/2005	9.05.19	2	19,328	40,561	29,55	20,78924
109	02/05/2005	9.05.19	3	17,195	43,918	33,985	24,70345
109	02/05/2005	9.05.19	4	17,224	45,521	35,35	25,74754
109	02/05/2005	9.05.19	5	15,312	44,528	36,188	26,83821
109	02/05/2005	9.05.19	6	13,898	43,356	36,426	27,33838
109	02/05/2005	9.05.19	7	12,089	41,678	36,56	27,81429
109	02/05/2005	9.05.19	7,87	11,184	41,1	36,882	28,24373
111	02/05/2005	8.27.19	0,5	18,989	38,648	28,207	19,84459
111	02/05/2005	8.28.13	1	18,77	38,988	28,635	20,22471
111	02/05/2005	8.28.13	2	18,583	39,775	29,41	20,86604
111	02/05/2005	8.28.13	3	17,353	42,448	32,6	23,60385
111	02/05/2005	8.28.13	4	16,443	43,501	34,258	25,09395
111	02/05/2005	8.28.13	5	14,521	43,109	35,613	26,57278
111	02/05/2005	8.28.13	5,21	14,351	43,072	35,735	26,70394
11	02/05/2005	8.24.34	0,5	18,498	36,868	27,087	19,10976
11	02/05/2005	8.25.11	1	18,395	37,239	27,46	19,41954
11	02/05/2005	8.25.11	2	18,039	39,841	29,86	21,3407
11	02/05/2005	8.25.11	3	15,943	42,507	33,854	24,89239
11	02/05/2005	8.25.11	3,25	15,484	43,112	34,747	25,68489
114	03/05/2005	8.05.37	0,5	18,748	42,276	31,353	22,30228
114	03/05/2005	8.06.29	1	18,783	42,24	31,297	22,25213
114	03/05/2005	8.06.29	2	18,728	43,14	32,087	22,874
114	03/05/2005	8.06.29	3	17,036	44,299	34,451	25,0984
114	03/05/2005	8.06.29	4	16,203	45,214	35,991	26,48096
114	03/05/2005	8.06.29	4,99	13,787	43,535	36,7	27,57004
117	03/05/2005	11.09.42	0,5	18,629	44,732	33,492	23,96571
117	03/05/2005	11.10.31	1	18,798	44,634	33,273	23,75787
117	03/05/2005	11.10.31	2	17,673	45,759	35,171	25,493
117	03/05/2005	11.10.31	3	16,865	45,813	35,923	26,26919
117	03/05/2005	11.10.31	4	16,247	45,589	36,284	26,69645
117	03/05/2005	11.10.31	5	15,309	44,918	36,543	27,1156
117	03/05/2005	11.10.31	6	14,047	43,953	36,844	27,63048
117	03/05/2005	11.10.31	7	13,094	43,151	37,005	27,95962
117	03/05/2005	11.10.31	7,79	12,781	42,956	37,124	28,11952
119	03/05/2005	10.19.52	0,5	16,731	46,248	36,429	26,67953
119	03/05/2005	10.20.44	1	16,662	46,204	36,452	26,71519
119	03/05/2005	10.20.44	2	15,426	45,229	36,719	27,21142
119	03/05/2005	10.20.44	3	14,806	44,727	36,842	27,45032
119	03/05/2005	10.20.44	4	14,348	44,289	36,872	27,5782
119	03/05/2005	10.20.44	5	14,141	44,212	36,998	27,72478
119	03/05/2005	10.20.44	6	13,891	44,088	37,121	27,87813
119	03/05/2005	10.20.44	6,04	13,885	44,064	37,105	27,8677
12	02/05/2005	8.13.53	0,5	16,328	42,846	33,78	24,73848
12	02/05/2005	8.14.55	1	16,396	42,654	33,554	24,55
12	02/05/2005	8.14.55	2	16,382	42,51	33,439	24,46922
12	02/05/2005	8.14.55	3	16,08	43,536	34,605	25,44058
12	02/05/2005	8.14.55	3,49	15,985	43,742	34,87	25,66738
14	03/05/2005	7.57.34	0,5	18,478	42,805	31,999	22,8631

14	03/05/2005	7.58.18	1	18,482	42,848	32,033	22,88858
14	03/05/2005	7.58.18	2	18,129	43,316	32,704	23,49266
14	03/05/2005	7.58.18	3	17,195	44,604	34,578	25,15798
16	03/05/2005	11.53.01	0,5	18,495	43,3	32,4	23,16407
16	03/05/2005	11.53.53	1	18,481	43,278	32,392	23,16321
16	03/05/2005	11.53.53	2	18,415	43,778	32,865	23,54582
16	03/05/2005	11.53.53	3	17,722	44,888	34,376	24,87621
16	03/05/2005	11.53.53	4	16,499	45,39	35,881	26,32836
16	03/05/2005	11.53.53	4,33	16,224	45,437	36,169	26,61572
17	03/05/2005	11.12.27	0,5	18,068	45,178	34,331	24,7459
17	03/05/2005	11.13.20	1	18,429	45,089	33,956	24,37255
17	03/05/2005	11.13.20	2	17,52	45,789	35,327	25,64968
17	03/05/2005	11.13.20	3	16,923	45,876	35,927	26,25856
17	03/05/2005	11.13.20	4	15,768	45,31	36,474	26,95451
17	03/05/2005	11.13.20	4,44	15,383	45,094	36,635	27,16775
18	03/05/2005	10.45.30	0,5	18,267	46,068	34,919	25,14797
18	03/05/2005	10.46.15	1	18,467	46,123	34,798	25,00619
18	03/05/2005	10.46.15	2	17,601	46,092	35,517	25,77525
18	03/05/2005	10.46.15	3	16,895	45,932	36,001	26,32223
18	03/05/2005	10.46.15	4	16	45,601	36,521	26,93639
18	03/05/2005	10.46.15	4,05	15,96	45,577	36,537	26,95876
19	03/05/2005	10.30.32	0,5	16,393	46,051	36,563	26,86214
19	03/05/2005	10.30.59	1	16,39	46,047	36,562	26,86385
19	03/05/2005	10.30.59	2	16,134	45,813	36,589	26,94868
19	03/05/2005	10.30.59	3	15,327	45,237	36,818	27,31537
19	03/05/2005	10.30.59	4	14,816	44,767	36,87	27,47399
19	03/05/2005	10.30.59	4,72	14,654	44,745	37,003	27,61609
2004	02/05/2005	10.31.08	0,5	17,303	44,293	34,217	24,84536
2004	02/05/2005	10.32.52	1	17,342	43,873	33,822	24,53405
2004	02/05/2005	10.32.52	2	17,27	44,01	34	24,69252
2004	02/05/2005	10.32.52	3	17,176	44,618	34,607	25,18464
2004	02/05/2005	10.32.52	4	16,058	43,902	34,95	25,71401
2004	02/05/2005	10.32.52	5	15,27	43,852	35,609	26,40446
2004	02/05/2005	10.32.52	6	14,591	43,262	35,689	26,62019
2004	02/05/2005	10.32.52	7	13,644	42,606	35,958	27,03496
2004	02/05/2005	10.32.52	8	13,392	42,654	36,242	27,31111
2004	02/05/2005	10.32.52	9	12,844	42,103	36,239	27,42492
2004	02/05/2005	10.32.52	10	11,35	41,166	36,789	28,14763
2004	02/05/2005	10.32.52	11	10,198	40,816	37,6	28,99846
2004	02/05/2005	10.32.52	12	10,065	40,72	37,638	29,05663
2004	02/05/2005	10.32.52	13	9,99	40,674	37,669	29,09883
2004	02/05/2005	10.32.52	14	10,036	40,822	37,774	29,1771
2004	02/05/2005	10.32.52	15	10,168	40,958	37,775	29,15874
2004	02/05/2005	10.32.52	16	10,174	40,965	37,776	29,16232
2004	02/05/2005	10.32.52	25,63	10,117	41,156	38,028	29,41401
2014	03/05/2005	8.51.31	0,5	16,909	46,048	36,092	26,37802
2014	03/05/2005	8.53.08	1	16,939	46,06	36,075	26,35975
2014	03/05/2005	8.53.08	2	16,911	46,034	36,077	26,37222
2014	03/05/2005	8.53.08	3	16,891	46,015	36,078	26,38212
2014	03/05/2005	8.53.08	4	16,798	45,898	36,058	26,39374
2014	03/05/2005	8.53.08	5	16,051	45,057	35,985	26,51684
2014	03/05/2005	8.53.08	6	14,576	43,546	35,965	26,83654
2014	03/05/2005	8.53.08	7	13,864	42,874	36,004	27,02366

2014	03/05/2005	8.53.08	8	13,422	42,428	35,999	27,11653
2014	03/05/2005	8.53.08	9	12,992	42,079	36,073	27,26676
2014	03/05/2005	8.53.08	10	12,767	41,834	36,052	27,30082
2014	03/05/2005	8.53.08	11	12,612	41,692	36,063	27,34435
2014	03/05/2005	8.53.08	12	12,434	41,526	36,073	27,3924
2014	03/05/2005	8.53.08	13	12,038	41,245	36,18	27,55739
2014	03/05/2005	8.53.08	14	11,355	41,082	36,691	28,08975
2014	03/05/2005	8.53.08	15	10,796	40,878	37,047	28,47616
2014	03/05/2005	8.53.08	16	10,386	40,936	37,526	28,92849
2014	03/05/2005	8.53.08	21	10,168	41,069	37,886	29,27483
2014	03/05/2005	8.53.08	21,52	10,174	41,069	37,881	29,26997
2	02/05/2005	11.56.31	0,5	20,325	23,693	15,938	10,21202
2	02/05/2005	11.57.13	1	20,228	24,981	16,934	10,99035
2	02/05/2005	11.57.13	2	18,413	34,626	25,531	17,95833
2	02/05/2005	11.57.13	3	15,909	41,246	32,719	24,02738
2	02/05/2005	11.57.13	3,68	15,028	41,008	33,242	24,62836
302	02/05/2005	12.05.08	0,5	19,713	29,564	20,615	13,89964
302	02/05/2005	12.06.06	1	19,443	32,5	23,087	15,84412
302	02/05/2005	12.06.06	2	17,929	42,672	32,325	23,2517
302	02/05/2005	12.06.06	3	17,424	43,953	33,821	24,52275
302	02/05/2005	12.06.06	4	14,761	42,167	34,539	25,68144
302	02/05/2005	12.06.06	5	12,751	41,708	35,948	27,20117
302	02/05/2005	12.06.06	6	12,402	41,852	36,423	27,64368
304	02/05/2005	11.18.01	0,5	20,133	25,513	17,361	11,33446
304	02/05/2005	11.19.15	1	20,02	26,177	17,914	11,78151
304	02/05/2005	11.19.15	2	17,689	39,523	29,865	21,42787
304	02/05/2005	11.19.15	3	16,779	41,706	32,41	23,59296
304	02/05/2005	11.19.15	4	15,089	41,901	34,008	25,20491
304	02/05/2005	11.19.15	5	13,05	41,687	35,649	26,90839
304	02/05/2005	11.19.15	6	12,046	41,883	36,804	28,00919
304	02/05/2005	11.19.15	7	11,658	41,844	37,15	28,3582
304	02/05/2005	11.19.15	8	11,298	41,498	37,166	28,44447
304	02/05/2005	11.19.15	8,87	11,118	41,381	37,232	28,53332
306	02/05/2005	13.16.54	0,5	20,36	30,648	21,124	14,12937
306	02/05/2005	13.17.58	1	20,412	30,173	20,758	13,841
306	02/05/2005	13.17.58	2	18,775	36,432	26,602	18,68063
306	02/05/2005	13.17.58	3	17,133	41,257	31,752	23,0064
306	02/05/2005	13.17.58	4	16,233	43,188	34,167	25,07182
306	02/05/2005	13.17.58	5	14,635	42,98	35,39	26,37417
306	02/05/2005	13.17.58	6	12,742	41,807	36,053	27,28812
306	02/05/2005	13.17.58	7	11,519	41,289	36,738	28,0641
306	02/05/2005	13.17.58	8	10,924	41,183	37,23	28,56429
306	02/05/2005	13.17.58	9	10,784	41,16	37,349	28,68786
306	02/05/2005	13.17.58	9,39	10,779	41,142	37,335	28,67903
308	02/05/2005	13.36.32	0,5	20,774	34,268	23,663	15,94944
308	02/05/2005	13.37.40	1	20,921	33,554	23,049	15,44811
308	02/05/2005	13.37.40	2	19,991	39,032	27,872	19,34757
308	02/05/2005	13.37.40	3	17,335	42,126	32,336	23,40541
308	02/05/2005	13.37.40	4	16,47	43,038	33,829	24,75802
308	02/05/2005	13.37.40	5	15,935	43,578	34,768	25,60655
308	02/05/2005	13.37.40	6	13,967	42,272	35,346	26,48789
308	02/05/2005	13.37.40	7	11,657	41,456	36,771	28,06397
308	02/05/2005	13.37.40	7,49	11,248	41,371	37,091	28,39285

309	02/05/2005	9.09.46	0,5	18,453	39,352	29,154	20,6965
309	02/05/2005	9.11.44	1	18,571	38,369	28,266	19,99149
309	02/05/2005	9.11.44	2	17,873	42,522	32,26	23,21636
309	02/05/2005	9.11.44	3	17,147	45,325	35,247	25,68302
309	02/05/2005	9.11.44	4	17,067	45,72	35,661	26,02468
309	02/05/2005	9.11.44	5	15,78	45,256	36,413	26,90801
309	02/05/2005	9.11.44	6	14,994	44,507	36,461	27,12779
309	02/05/2005	9.11.44	7	13,474	42,976	36,47	27,46471
309	02/05/2005	9.11.44	8	11,781	41,522	36,708	27,99451
309	02/05/2005	9.11.44	9	10,948	40,898	36,916	28,31913
309	02/05/2005	9.11.44	9,18	10,826	40,777	36,918	28,3441
311	02/05/2005	8.32.58	0,5	18,662	40,152	29,664	21,03513
311	02/05/2005	8.35.17	1	18,61	40,395	29,901	21,22984
311	02/05/2005	8.35.17	2	18,771	40,164	29,599	20,96497
311	02/05/2005	8.35.17	3	17,265	44,589	34,512	25,09094
311	02/05/2005	8.35.17	4	16,043	44,561	35,552	26,18113
311	02/05/2005	8.35.17	5	14,221	43,248	36,022	26,95183
311	02/05/2005	8.35.17	6	12,311	41,958	36,617	27,81019
311	02/05/2005	8.35.17	7	11,381	41,258	36,844	28,17299
311	02/05/2005	8.35.17	8	11,374	41,23	36,822	28,1619
311	02/05/2005	8.35.17	8,75	11,373	41,204	36,797	28,14587
314	03/05/2005	8.11.00	0,5	19,413	42,017	30,644	21,5964
314	03/05/2005	8.12.17	1	19,348	42,352	30,966	21,85912
314	03/05/2005	8.12.17	2	19,066	42,85	31,585	22,40643
314	03/05/2005	8.12.17	3	18,135	44,487	33,723	24,2756
314	03/05/2005	8.12.17	4	15,84	45,227	36,333	26,82822
314	03/05/2005	8.12.17	5	14,687	44,342	36,598	27,29677
314	03/05/2005	8.12.17	6	13,986	43,706	36,67	27,50888
314	03/05/2005	8.12.17	7	13,324	43,097	36,728	27,6978
314	03/05/2005	8.12.17	8	12,94	42,813	36,829	27,86021
314	03/05/2005	8.12.17	8,36	12,891	42,787	36,852	27,88873
317	03/05/2005	11.03.49	0,5	18,442	46,417	35,066	25,21602
317	03/05/2005	11.04.55	1	18,433	45,97	34,696	24,93756
317	03/05/2005	11.04.55	2	17,806	46,904	36,037	26,1242
317	03/05/2005	11.04.55	3	17,625	47,106	36,371	26,42978
317	03/05/2005	11.04.55	4	16,491	45,992	36,419	26,74323
317	03/05/2005	11.04.55	5	15,259	44,717	36,404	27,0189
317	03/05/2005	11.04.55	6	14,707	44,567	36,786	27,44227
317	03/05/2005	11.04.55	7	14,597	44,556	36,881	27,54389
317	03/05/2005	11.04.55	8	13,946	44,096	37,075	27,8401
317	03/05/2005	11.04.55	9	13,17	43,252	37,026	27,96853
317	03/05/2005	11.04.55	9,91	12,499	42,822	37,272	28,30128
319	03/05/2005	10.13.28	0,5	17,193	46,077	35,863	26,13415
319	03/05/2005	10.14.31	1	17,174	46,07	35,874	26,14814
319	03/05/2005	10.14.31	2	16,509	45,71	36,154	26,52637
319	03/05/2005	10.14.31	3	15,614	45,232	36,545	27,04006
319	03/05/2005	10.14.31	4	15,076	44,715	36,577	27,1898
319	03/05/2005	10.14.31	5	14,495	44,228	36,674	27,39786
319	03/05/2005	10.14.31	6	14,074	43,877	36,747	27,54946
319	03/05/2005	10.14.31	7	13,768	43,643	36,819	27,67544
319	03/05/2005	10.14.31	8	13,487	43,381	36,842	27,7559
319	03/05/2005	10.14.31	9	12,797	42,915	37,067	28,07733
319	03/05/2005	10.14.31	10	12,602	42,968	37,311	28,31132

319	03/05/2005	10.14.31	10,5	12,679	43,203	37,463	28,41739
3	02/05/2005	11.47.20	0,5	19,761	24,714	16,914	11,08298
3	02/05/2005	11.48.13	1	19,775	26,052	17,919	11,84226
3	02/05/2005	11.48.13	2	16,785	37,402	28,786	20,81248
3	02/05/2005	11.48.13	3	14,624	40,838	33,445	24,8671
3	02/05/2005	11.48.13	4	13,597	41,25	34,724	26,07653
3	02/05/2005	11.48.13	5	13,008	41,602	35,603	26,88189
3	02/05/2005	11.48.13	5,17	12,841	41,632	35,79	27,06078
4	02/05/2005	11.32.58	0,5	20,899	23,39	15,505	9,74766
4	02/05/2005	11.33.40	1	20,993	24,291	16,127	10,19577
4	02/05/2005	11.33.40	2	18,902	37,016	27,05	18,98847
4	02/05/2005	11.33.40	3	13,982	41,639	34,775	26,03027
4	02/05/2005	11.33.40	3,34	13,299	41,957	35,668	26,86538
5	02/05/2005	12.53.29	0,5	20,987	22,584	14,892	9,26337
5	02/05/2005	12.54.14	1	20,998	22,368	14,733	9,14183
5	02/05/2005	12.54.14	2	19,501	29,804	20,955	14,21615
5	02/05/2005	12.54.14	3	17,567	37,486	28,369	20,31672
5	02/05/2005	12.54.14	4	12,491	41,185	35,693	27,04944
5	02/05/2005	12.54.14	4,74	12,07	41,311	36,218	27,54355
602	02/05/2005	12.12.00	0,5	17,557	41,498	31,615	22,79041
602	02/05/2005	12.12.56	1	17,821	36,93	27,633	19,68928
602	02/05/2005	12.12.56	2	17,512	39,928	30,377	21,86421
602	02/05/2005	12.12.56	3	17,086	44,062	34,2	24,89443
602	02/05/2005	12.12.56	4	16,684	43,842	34,348	25,10444
602	02/05/2005	12.12.56	5	13,186	42,049	35,87	27,05097
602	02/05/2005	12.12.56	6	12,367	42,203	36,8	27,94378
602	02/05/2005	12.12.56	6,94	12,105	42,151	37,007	28,16007
604	02/05/2005	11.08.41	0,5	18,706	34,336	24,909	17,40093
604	02/05/2005	11.10.37	1	18,927	33,529	24,142	16,76645
604	02/05/2005	11.10.37	2	17,838	40,689	30,732	22,05555
604	02/05/2005	11.10.37	3	16,791	41,835	32,515	23,66975
604	02/05/2005	11.10.37	4	14,146	41,446	34,42	25,72583
604	02/05/2005	11.10.37	5	12,845	41,637	35,792	27,06022
604	02/05/2005	11.10.37	6	11,765	41,276	36,482	27,81359
604	02/05/2005	11.10.37	7	11,328	41,385	37,024	28,32386
604	02/05/2005	11.10.37	8	10,898	41,278	37,351	28,66335
604	02/05/2005	11.10.37	9	10,759	41,161	37,374	28,71102
604	02/05/2005	11.10.37	10	10,673	41,133	37,433	28,77761
604	02/05/2005	11.10.37	11	10,621	41,101	37,454	28,80779
604	02/05/2005	11.10.37	11,67	10,608	41,084	37,449	28,80977
609	02/05/2005	9.18.55	0,5	16,477	45,234	35,76	26,22601
609	02/05/2005	9.20.01	1	16,471	45,163	35,703	26,18448
609	02/05/2005	9.20.01	2	16,546	45,612	36,034	26,42605
609	02/05/2005	9.20.01	3	16,076	45,089	35,993	26,50848
609	02/05/2005	9.20.01	4	14,782	43,761	35,973	26,78845
609	02/05/2005	9.20.01	5	14,506	43,937	36,393	27,17852
609	02/05/2005	9.20.01	6	14,194	43,549	36,325	27,19652
609	02/05/2005	9.20.01	7	13,422	42,644	36,205	27,27161
609	02/05/2005	9.20.01	8	12,568	41,747	36,162	27,41673
609	02/05/2005	9.20.01	9	11,618	41,232	36,582	27,93324
609	02/05/2005	9.20.01	10	11,229	41,08	36,817	28,19423
609	02/05/2005	9.20.01	11	10,982	40,977	36,96	28,35682
609	02/05/2005	9.20.01	11,46	10,974	41,02	37,011	28,3995

614	03/05/2005	8.19.33	0,5	18,462	44,46	33,399	23,93624
614	03/05/2005	8.20.47	1	19,045	42,181	31,051	21,99961
614	03/05/2005	8.20.47	2	19,028	42,797	31,575	22,40842
614	03/05/2005	8.20.47	3	17,365	46,005	35,658	25,94351
614	03/05/2005	8.20.47	4	16,067	45,628	36,483	26,89239
614	03/05/2005	8.20.47	5	15,241	44,803	36,503	27,09958
614	03/05/2005	8.20.47	6	14,507	44,285	36,716	27,43197
614	03/05/2005	8.20.47	7	14,134	43,948	36,756	27,54837
614	03/05/2005	8.20.47	8	13,158	43,018	36,813	27,80215
614	03/05/2005	8.20.47	9	12,276	42,34	37,023	28,14831
614	03/05/2005	8.20.47	9,73	12,13	42,293	37,122	28,25681
619	03/05/2005	10.04.45	0,5	16,935	46,517	36,48	26,67021
619	03/05/2005	10.05.47	1	16,927	46,51	36,481	26,67441
619	03/05/2005	10.05.47	2	16,936	46,504	36,468	26,66674
619	03/05/2005	10.05.47	3	16,709	46,175	36,383	26,66022
619	03/05/2005	10.05.47	4	15,745	45,333	36,515	26,99077
619	03/05/2005	10.05.47	5	14,787	44,437	36,593	27,27061
619	03/05/2005	10.05.47	6	14,138	44,006	36,807	27,58202
619	03/05/2005	10.05.47	7	14,119	44,188	36,995	27,73613
619	03/05/2005	10.05.47	8	13,314	43,021	36,667	27,65637
619	03/05/2005	10.05.47	9	12,148	42,27	37,081	28,21819
619	03/05/2005	10.05.47	10	11,819	42,427	37,565	28,66364
619	03/05/2005	10.05.47	11	11,794	42,399	37,563	28,6715
619	03/05/2005	10.05.47	12	11,783	42,409	37,583	28,69393
619	03/05/2005	10.05.47	12,14	11,783	42,419	37,593	28,7022
6	02/05/2005	13.08.02	0,5	21,027	22,771	15,012	9,34459
6	02/05/2005	13.08.56	1	20,987	22,798	15,047	9,38204
6	02/05/2005	13.08.56	2	19,257	33,699	24,196	16,73877
6	02/05/2005	13.08.56	3	17,266	41,086	31,496	22,77963
6	02/05/2005	13.08.56	4	14,972	42,275	34,457	25,57685
6	02/05/2005	13.08.56	4,88	12,326	41,765	36,413	27,64546
8	02/05/2005	13.44.37	0,5	21,009	34,242	23,515	15,77734
8	02/05/2005	13.45.40	1	21,261	33,436	22,772	15,15182
8	02/05/2005	13.45.40	2	21,071	34,144	23,426	15,70062
8	02/05/2005	13.45.40	3	17,693	42,295	32,203	23,21852
8	02/05/2005	13.45.40	3,55	16,453	43,114	33,909	24,82111
9	02/05/2005	8.54.11	0,5	18,864	35,643	25,862	18,08891
9	02/05/2005	8.55.29	1	18,83	35,459	25,735	18,00152
9	02/05/2005	8.55.29	2	18,256	39,91	29,784	21,23267
9	02/05/2005	8.55.29	3	16,957	44,518	34,708	25,31472
9	02/05/2005	8.55.29	4	16,775	44,722	35,045	25,62035
9	02/05/2005	8.55.29	5	15,937	44,331	35,439	26,12321
9	02/05/2005	8.55.29	5,42	15,513	44,031	35,55	26,30666
Anem	03/05/2005	9.14.56	0,5	16,998	45,961	35,936	26,23728
Anem	03/05/2005	9.16.56	1	17,007	45,966	35,932	26,23312
Anem	03/05/2005	9.16.56	2	17,141	46,351	36,148	26,3714
Anem	03/05/2005	9.16.56	3	17,021	46,285	36,198	26,44358
Anem	03/05/2005	9.16.56	4	16,692	45,98	36,226	26,54792
Anem	03/05/2005	9.16.56	5	16,089	45,477	36,327	26,7711
Anem	03/05/2005	9.16.56	6	15,08	44,427	36,308	26,9901
Anem	03/05/2005	9.16.56	7	14,205	43,851	36,598	27,41043
Anem	03/05/2005	9.16.56	8	14,066	43,909	36,783	27,5882
Anem	03/05/2005	9.16.56	9	13,664	43,554	36,835	27,71768

Anem	03/05/2005	9.16.56	10	12,966	43,026	37,009	28,0023
Anem	03/05/2005	9.16.56	11	12,627	43,062	37,377	28,36116
Anem	03/05/2005	9.16.56	12	10,922	41,275	37,322	28,65363
Anem	03/05/2005	9.16.56	13	10,28	40,863	37,562	28,96371
Anem	03/05/2005	9.16.56	14	10,133	40,791	37,64	29,05585
Anem	03/05/2005	9.16.56	15	10,101	40,815	37,698	29,11054
Anem	03/05/2005	9.16.56	16	10,106	40,831	37,709	29,12255
Anem	03/05/2005	9.16.56	17	10,107	40,832	37,709	29,12697
Anem	03/05/2005	9.16.56	18	10,11	40,836	37,708	29,13064
Anem	03/05/2005	9.16.56	19	10,129	40,875	37,728	29,14722
Anem	03/05/2005	9.16.56	20	10,14	40,911	37,754	29,16949
Anem	03/05/2005	9.16.56	21	10,157	40,963	37,788	29,19824
Anem	03/05/2005	9.16.56	22	10,163	40,986	37,807	29,21686
Anem	03/05/2005	9.16.56	22,32	10,163	41,008	37,829	29,23517
Feni	02/05/2005	14.19.59	0,5	18,634	44,497	33,29	23,81034
Feni	02/05/2005	14.20.49	1	18,626	44,511	33,309	23,82809
Feni	02/05/2005	14.20.49	2	18,04	44,908	34,126	24,60296
Feni	02/05/2005	14.20.49	3	16,168	45,039	35,866	26,38864
Feni	02/05/2005	14.20.49	4	14,816	44,107	36,262	27,0047
Feni	02/05/2005	14.20.49	5	14,246	43,682	36,401	27,24072
Feni	02/05/2005	14.20.49	6	13,659	43,045	36,358	27,33683
Feni	02/05/2005	14.20.49	7	12,625	42,202	36,547	27,70002
Feni	02/05/2005	14.20.49	8	12,047	41,814	36,732	27,96278
Feni	02/05/2005	14.20.49	9	11,426	41,415	36,955	28,25976
Feni	02/05/2005	14.20.49	10	11,187	41,289	37,069	28,39887
Feni	02/05/2005	14.20.49	10,82	11,135	41,322	37,154	28,47839
Gar	02/05/2005	10.01.36	0,5	16,145	44,749	35,627	26,20065
Gar	02/05/2005	10.03.24	1	16,28	44,83	35,58	26,13365
Gar	02/05/2005	10.03.24	2	16,521	44,881	35,409	25,95077
Gar	02/05/2005	10.03.24	3	15,057	43,617	35,594	26,43002
Gar	02/05/2005	10.03.24	4	14,091	43,195	36,092	27,03075
Gar	02/05/2005	10.03.24	5	13,91	43,07	36,145	27,11442
Gar	02/05/2005	10.03.24	6	13,74	42,957	36,199	27,1966
Gar	02/05/2005	10.03.24	7	13,659	42,928	36,248	27,25605
Gar	02/05/2005	10.03.24	8	13,409	42,699	36,268	27,32803
Gar	02/05/2005	10.03.24	9	12,765	42,138	36,348	27,52605
Gar	02/05/2005	10.03.24	10	12,27	41,838	36,537	27,77638
Gar	02/05/2005	10.03.24	11	12,17	41,788	36,585	27,83707
Gar	02/05/2005	10.03.24	12	12,211	42,18	36,928	28,10083
Gar	02/05/2005	10.03.24	13	12,132	42,485	37,307	28,41484
Gar	02/05/2005	10.03.24	14	11,895	42,392	37,452	28,57856
Gar	02/05/2005	10.03.24	15	11,665	42,132	37,426	28,60735
Gar	02/05/2005	10.03.24	16	11,259	41,972	37,679	28,88603
Gar	02/05/2005	10.03.24	24,86	9,694	40,794	38,1	29,54172
PCC	02/05/2005	9.40.23	0,5	16,589	45,725	36,095	26,45665
PCC	02/05/2005	9.41.52	1	16,522	45,652	36,091	26,47053
PCC	02/05/2005	9.41.52	2	16,419	45,524	36,07	26,48323
PCC	02/05/2005	9.41.52	3	16,328	45,439	36,076	26,51412
PCC	02/05/2005	9.41.52	4	16,105	45,127	36	26,51113
PCC	02/05/2005	9.41.52	5	14,804	43,975	36,15	26,92495
PCC	02/05/2005	9.41.52	6	14,449	43,856	36,372	27,17896
PCC	02/05/2005	9.41.52	7	13,915	43,251	36,309	27,24921
PCC	02/05/2005	9.41.52	8	13,138	42,462	36,301	27,40951

PCC	02/05/2005	9.41.52	9	13,026	42,542	36,484	27,5788
PCC	02/05/2005	9.41.52	10	12,052	41,621	36,537	27,81721
PCC	02/05/2005	9.41.52	11	10,92	41,004	37,051	28,43822
PCC	02/05/2005	9.41.52	12	10,54	40,944	37,377	28,76735
PCC	02/05/2005	9.41.52	13	10,233	40,832	37,579	28,98501
PCC	02/05/2005	9.41.52	14	10,177	40,814	37,618	29,02977
PCC	02/05/2005	9.41.52	15	10,167	40,818	37,632	29,047
PCC	02/05/2005	9.41.52	16	10,128	40,774	37,626	29,05387
PCC	02/05/2005	9.41.52	17	10,067	40,717	37,631	29,07318
PCC	02/05/2005	9.41.52	18	10,02	40,664	37,625	29,08093
PCC	02/05/2005	9.41.52	19	10,051	40,76	37,691	29,13195
PCC	02/05/2005	9.41.52	20	10,071	40,828	37,74	29,17109
PCC	02/05/2005	9.41.52	21	10,071	40,829	37,74	29,17686
PCC	02/05/2005	9.41.52	21,4	10,071	40,828	37,74	29,17787
PCWA	02/05/2005	13.25.44	0,5	19,347	36,33	26,111	18,16121
PCWA	02/05/2005	13.27.09	1	19,266	37,027	26,721	18,64625
PCWA	02/05/2005	13.27.09	2	17,831	40,203	30,334	21,75243
PCWA	02/05/2005	13.27.09	3	16,616	42,964	33,64	24,57505
PCWA	02/05/2005	13.27.09	4	16,014	43,035	34,216	25,15986
PCWA	02/05/2005	13.27.09	5	15,012	42,999	35,065	26,04162
PCWA	02/05/2005	13.27.09	6	13,234	42,144	35,908	27,07594
PCWA	02/05/2005	13.27.09	7	11,96	41,487	36,499	27,79306
PCWA	02/05/2005	13.27.09	8	11,04	41,18	37,108	28,44753
PCWA	02/05/2005	13.27.09	9	10,635	41,026	37,365	28,72721
PCWA	02/05/2005	13.27.09	10	10,473	40,931	37,433	28,81443
PCWA	02/05/2005	13.27.09	11	10,455	40,913	37,433	28,82246
PCWA	02/05/2005	13.27.09	11,29	10,455	40,915	37,436	28,82536

Staz	O2%	O2ppm	pH	Chl-a	Tr%
1002	113,4	8,99	8,336	1,44	54,8
1002	123,6	9,8	8,332	1,43	64,56
1002	129,5	10,23	8,327	1,32	73,04
1002	130,6	10,24	8,317	1,12	85,23
1002	131,5	10,27	8,279	1,41	89,72
1002	129,4	10,21	8,248	1,8	89,05
1002	127,8	10,74	8,189	1,86	86,84
1002	120	10,15	8,11	1,85	85,15
1002	113,8	9,67	8,069	1,02	58,19
1002	91,3	7,79	7,975	0,63	52,02
1002	77,7	6,65	7,935	0,46	61,1
1004	129,4	10,25	8,447	3,41	24,8
1004	133,5	10,5	8,4	3,11	33,99
1004	135	10,62	8,315	2,42	60,21
1004	134,1	10,87	8,26	1,54	85,91
1004	131,1	10,99	8,206	1,44	89,8
1004	127,2	10,8	8,174	1,67	93,79
1004	122,1	10,43	8,192	1,61	98,72
1004	117,7	10,18	8,164	1,65	102,55
1004	112,6	9,8	8,147	1,43	104,39
1004	108,2	9,47	8,122	1,31	105,73
1004	102,3	9,02	8,094	0,98	100,1
1004	96,9	8,56	8,072	0,85	85,8
1004	90,9	8,04	8,043	0,59	91,78

1004	85,3	7,54	8,026	0,4	96,38
1004	80,6	7,13	8,022	0,38	96,83
1004	78,1	6,91	8,018	0,56	98,49
1004	67,8	5,99	8,018	0,55	97,2
1009	104,2	8,23	8,23	0,25	89,3
1009	104,2	8,24	8,229	0,24	91,99
1009	104,5	8,25	8,227	0,27	99,28
1009	105,5	8,4	8,226	0,3	102,24
1009	107	8,77	8,24	0,29	101,83
1009	108,5	8,94	8,251	0,32	101,79
1009	109,7	9,08	8,257	0,36	101,77
1009	110,8	9,23	8,26	0,43	101,27
1009	111,5	9,37	8,252	0,51	100,57
1009	111,7	9,55	8,244	0,58	100,47
1009	111,7	9,7	8,226	0,63	100,82
1009	110	9,64	8,191	0,64	101,55
1009	106,9	9,42	8,121	0,73	97,59
1009	98,4	8,67	8,079	0,87	94,83
1009	90,6	7,98	8,071	0,97	93,38
1009	78,7	6,93	8,072	1,12	80,3
1014	104,6	8,04	8,248	1,26	78,5
1014	104,2	8,02	8,243	1,28	80,06
1014	105,3	8,09	8,239	1,38	84,57
1014	106,5	8,23	8,227	0,8	96,66
1014	107,9	8,4	8,226	0,59	101,3
1014	109,4	8,75	8,236	0,51	102,68
1014	109,9	9,01	8,249	0,51	102,81
1014	110,2	9,13	8,258	0,52	102,9
1014	111	9,35	8,262	0,63	102,33
1014	111,6	9,39	8,26	0,76	101,76
1014	112,8	9,51	8,256	0,85	102,12
1014	112,5	9,62	8,239	1,03	100,71
1014	113,8	9,74	8,214	0,47	102,2
1014	114,1	9,77	8,213	0,53	102
1019	101,8	7,81	8,195	0,25	94,9
1019	102,3	7,85	8,193	0,27	96,59
1019	103	7,91	8,191	0,28	103,34
1019	104,3	8,02	8,191	0,31	103,43
1019	105,7	8,19	8,193	0,39	103,55
1019	107,2	8,6	8,205	0,34	104,43
1019	107,8	8,74	8,213	0,31	104,6
1019	109,1	8,92	8,212	0,33	104,56
1019	110,2	9,08	8,204	0,35	104,56
1019	110,5	9,27	8,177	0,41	104,28
1019	109,7	9,44	8,138	0,45	104,41
1019	106,1	9,15	8,122	0,46	104,76
1019	103,7	8,95	8,113	0,64	103,6
1019	101,5	8,76	8,11	0,63	103,34
1019	97,3	8,4	8,114	0,73	102,7
102	182,6	14,99	8,551	14,05	8
102	179,4	14,58	8,495	12,95	9,23
102	171,7	13,69	8,351	11,16	25,29
102	157,6	12,62	8,256	7,9	66,01

102	124,7	10,36	8,119	8,78	64,4
102	97,3	8,08	8,048	8,53	60,8
104	132	10,7	8,47	9,29	10,9
104	144,2	11,64	8,489	9,06	11,8
104	155,4	12,35	8,356	11	41,62
104	147,6	12,31	8,179	7,63	81,17
104	132,9	11,22	8,03	5,57	84,56
104	113,8	9,63	7,937	3,4	84,26
104	55	4,68	7,908	3,71	78,2
106	166,1	13,41	8,606	12,77	11
106	172,2	13,91	8,612	11,9	10,5
106	184,3	14,7	8,569	14,19	14,08
106	193,9	15,35	8,351	15,18	46,98
106	195,2	15,75	8,23	6,23	82,6
106	196,9	16,55	8,159	4,25	94,48
106	197,1	16,97	8,11	2,43	98,86
106	187,3	16,27	8	1,74	75,76
106	159,3	13,85	7,981	1,24	69,6
108	161,9	12,48	8,492	4,73	16,4
108	165,4	12,74	8,487	4,92	16,67
108	171,7	13,26	8,47	5,34	23,19
108	163,5	12,81	8,256	6,69	64,92
108	144,3	11,47	8,209	4,66	74,89
108	133,9	10,99	8,163	4,15	76
108	108,1	9,19	8,098	4,25	77,92
108	97,3	8,28	8,088	4,2	77,8
109	133,9	10,47	8,36	7,2	37,3
109	133,8	10,43	8,356	7,25	38,01
109	135,5	10,46	8,299	8,3	53,32
109	131,4	10,28	8,232	5,57	74,87
109	122,7	9,52	8,21	2,78	90,6
109	117,1	9,38	8,166	1,95	92,37
109	111	9,14	8,132	1,38	89,93
109	109,5	9,36	8,136	1,65	78,26
109	66,8	5,8	8,036	4,59	36,8
111	113,6	8,89	8,263	4,53	48,6
111	113,9	8,93	8,26	4,84	51,16
111	114,5	8,97	8,254	5,44	53,89
111	116,7	9,18	8,239	5,79	55,98
111	117,4	9,31	8,214	3,85	78,95
111	109,2	8,92	8,145	2,41	63,17
111	101	8,27	8,131	2,26	57,1
11	110,8	8,81	8,235	3,57	47,5
11	110,3	8,77	8,23	3,49	45,84
11	110,8	8,74	8,222	4,81	58,72
11	105,5	8,46	8,141	4,73	69,78
11	98,1	7,91	8,099	4,45	73,9
114	107,9	8,32	8,218	5,1	72,5
114	108,8	8,39	8,216	4,98	67,66
114	110,9	8,53	8,209	4,99	75,7
114	112,5	8,81	8,176	3,18	89,42
114	115,3	9,09	8,192	1,86	93,77
114	103,8	8,55	8,137	0,93	91,1

117	112,5	8,59	8,176	0,93	68,1
117	112,4	8,57	8,177	0,99	70,91
117	115	8,86	8,153	1,04	81,73
117	115,6	9	8,145	0,78	88,57
117	116,3	9,15	8,158	0,7	87,11
117	116,8	9,34	8,151	0,86	91,58
117	115,4	9,45	8,145	0,64	96,77
117	113	9,43	8,128	0,66	93,48
117	112,5	9,44	8,157	1,08	85,6
119	100,5	7,82	8,115	0,22	84,4
119	100,9	7,86	8,114	0,22	84,59
119	102,9	8,2	8,126	0,25	96,22
119	104,8	8,45	8,126	0,25	98,3
119	106	8,62	8,133	0,27	99,52
119	106,5	8,7	8,129	0,31	100,07
119	103,9	8,52	8,106	0,4	98,71
119	102,5	8,41	8,108	0,45	99,2
12	109,5	8,73	8,177	0,94	76,5
12	110,6	8,82	8,174	0,97	78,49
12	111,5	8,89	8,173	0,92	81,66
12	106,5	8,49	8,122	1,67	58,31
12	101	8,05	8,08	1,97	48,2
14	106,5	8,23	8,103	2,25	80,5
14	106,2	8,2	8,109	2,39	75,24
14	106,7	8,26	8,113	2,55	65,99
14	113,4	8,84	8,108	1,97	90,8
16	114,4	8,82	8,215	0,94	74,1
16	114,9	8,86	8,209	0,94	75,16
16	116,1	8,94	8,196	0,99	80,32
16	120,2	9,29	8,203	1,07	82,89
16	102,2	8,01	7,989	0,64	87,78
16	83,7	6,58	7,892	0,33	90,9
17	106,2	8,16	8,184	0,96	22,4
17	112,7	8,62	8,174	0,87	69,01
17	115,7	8,93	8,156	0,84	83,27
17	116,5	9,06	8,155	0,66	89,15
17	108,3	8,58	8,098	0,79	91,09
17	100	7,98	8,051	0,9	93,7
18	108	8,23	8,152	0,61	68,5
18	109,6	8,33	8,157	0,67	75,9
18	112,4	8,65	8,14	0,68	85,41
18	115,1	8,95	8,157	0,64	86,91
18	108,5	8,56	8,124	0,6	92,9
18	100,4	7,93	8,097	0,67	93,9
19	100,9	7,9	8,111	0,32	99,1
19	101,1	7,92	8,112	0,36	99,15
19	101,7	8	8,113	0,38	99,75
19	101,9	8,13	8,112	0,43	101,26
19	102,3	8,25	8,123	0,46	100,66
19	100,6	8,13	8,138	0,54	97,6
2004	117,4	9,15	8,272	0,84	70,8
2004	126,5	9,89	8,301	0,87	67,29
2004	136	10,62	8,299	0,75	77,17

2004	132,3	10,32	8,278	0,75	85,77
2004	128,3	10,2	8,243	0,56	96,8
2004	124,8	10,04	8,226	0,61	95,93
2004	122,3	9,97	8,222	0,53	101,36
2004	119,9	9,95	8,227	0,47	103,72
2004	117,8	9,81	8,221	0,53	103,29
2004	116,3	9,79	8,198	0,7	102,32
2004	114	9,88	8,171	0,86	102,4
2004	108,8	9,61	8,121	0,61	106,61
2004	103,7	9,19	8,109	0,38	105,07
2004	99,7	8,85	8,104	0,36	95,7
2004	96	8,5	8,099	0,47	91,77
2004	92,4	8,16	8,095	0,54	97,23
2004	90,3	7,97	8,093	0,5	96,06
2004	77,8	6,87	8,063	1,1	75
2014	105,1	8,16	8,225	0,29	93,8
2014	104,9	8,15	8,221	0,28	94,49
2014	105,4	8,19	8,219	0,28	102,65
2014	106,1	8,25	8,219	0,32	103,39
2014	107,2	8,35	8,219	0,34	103,5
2014	108,3	8,56	8,22	0,35	103,92
2014	109,1	8,89	8,229	0,35	103,57
2014	109,5	9,05	8,241	0,39	103,18
2014	110,5	9,21	8,247	0,43	102,81
2014	111,2	9,34	8,25	0,46	102,89
2014	111,4	9,41	8,253	0,5	103,12
2014	111,8	9,47	8,256	0,59	103,11
2014	112,1	9,54	8,259	0,69	102,92
2014	112,4	9,63	8,263	0,81	102,48
2014	113,1	9,8	8,236	0,94	102,09
2014	110,6	9,68	8,18	0,98	102,84
2014	105,8	9,32	8,15	1,12	102,76
2014	87,5	7,72	8,119	1,17	98,48
2014	87,4	7,72	8,12	1,33	97,9
2	176,5	14,48	8,612	13,06	8,5
2	178,2	14,56	8,572	11,78	9,83
2	177,6	14,28	8,413	11,78	23,71
2	160,7	12,99	8,227	7,31	72,11
2	103	8,45	8,095	7,34	68,7
302	147,2	11,88	8,432	7,66	12
302	157,9	12,63	8,431	7,97	15,38
302	165	12,86	8,324	7,94	30,28
302	157,1	12,25	8,236	3,7	75,02
302	148,6	12,16	8,199	3,71	84,1
302	136,4	11,54	8,082	3,72	80,3
302	65,9	5,6	7,863	0,79	86,6
304	196,2	16,02	8,629	15,63	8,5
304	194,5	15,87	8,622	15,8	8,94
304	196	15,57	8,444	15,53	21,94
304	182,7	14,55	8,294	9,89	69,02
304	163,1	13,3	8,237	6,86	77,79
304	146,6	12,34	8,135	6,38	85,62
304	132,1	11,27	8,062	3,13	85,68

304	119,8	10,29	8,027	1,01	84,3
304	105,9	9,17	7,915	0,65	88,01
304	37,1	3,22	7,805	0,42	79,7
306	172,2	13,69	8,614	8,53	11,3
306	185,1	14,74	8,625	8,16	10,7
306	204,2	16,21	8,544	10,84	11,25
306	197,2	15,66	8,374	10,84	46,42
306	173,1	13,78	8,24	6,72	81,2
306	151,2	12,34	8,195	3,9	94,27
306	138,8	11,73	8,18	2,96	94,96
306	129,9	11,22	8,131	2,55	99,31
306	118,8	10,36	8,056	1,65	96,12
306	91,1	7,96	7,998	0,8	83,85
306	72	6,29	7,994	0,82	83,5
308	153,3	11,91	8,485	5,51	14,8
308	167	12,99	8,525	5,47	13,67
308	173,5	13,35	8,374	5,57	34,67
308	150,4	11,85	8,236	5,77	64,36
308	137,8	10,95	8,221	4,04	80,08
308	135,6	10,83	8,204	3,65	82,24
308	136,1	11,26	8,187	3,41	82,06
308	112,4	9,67	8,099	2,53	70,88
308	73,8	6,4	8,017	2,02	55,5
309	130,1	10,23	8,352	6,39	40,8
309	136,3	10,75	8,378	6,46	37,56
309	143,2	11,18	8,33	6,5	56,78
309	134,8	10,48	8,23	3,59	89,6
309	122,6	9,52	8,21	1,67	96,68
309	115,4	9,15	8,205	1,16	99,95
309	112,4	9,05	8,203	1,14	97,2
309	111,3	9,24	8,174	1,11	93,15
309	107,7	9,25	8,15	0,97	93,58
309	100,5	8,78	8,095	1,31	67,13
309	68	5,95	8,035	1,78	67,7
311	115,7	9,04	8,294	3,4	50,1
311	115,6	9,02	8,286	3,28	53,04
311	116,3	9,06	8,295	3,58	55,56
311	118,7	9,25	8,247	3,34	65,62
311	118,2	9,37	8,207	1,53	89,66
311	117,2	9,62	8,153	1,38	79,85
311	113,5	9,64	8,118	1,52	62,61
311	106,5	9,22	8,095	1,35	47,15
311	99,2	8,59	8,095	1,45	48,91
311	79	6,84	8,118	1,95	48,2
314	107,1	8,2	8,269	4,51	54
314	109	8,34	8,26	4,8	54,9
314	113,3	8,68	8,25	5,25	61,94
314	116,4	8,96	8,237	4,68	65,61
314	113,8	9,02	8,199	2,13	97,93
314	112,6	9,11	8,181	1,3	99,2
314	112,7	9,25	8,18	1,23	100,59
314	112,1	9,32	8,186	1,13	101,85
314	109,2	9,15	8,171	1,8	88,38

314	106	8,89	8,166	2,1	85,1
317	104	7,9	8,187	0,72	60
317	109,7	8,35	8,177	0,81	72,99
317	111,4	8,51	8,175	0,66	94,97
317	110,6	8,46	8,176	0,53	102,08
317	110,2	8,62	8,186	0,46	103,39
317	110,3	8,83	8,199	0,39	103,86
317	110	8,89	8,205	0,37	104,39
317	110,8	8,97	8,202	0,37	105,32
317	110,6	9,06	8,198	0,35	105,47
317	110,7	9,21	8,191	0,49	103,82
317	105,9	8,93	8,157	0,86	101,3
319	104,2	8,06	8,145	0,43	83,7
319	105	8,12	8,144	0,46	86,55
319	107	8,38	8,156	0,42	95,02
319	107,8	8,57	8,179	0,2	102,85
319	108,6	8,72	8,188	0,16	103,25
319	109,1	8,86	8,179	0,17	103,54
319	109,8	8,99	8,176	0,2	103,52
319	109,7	9,04	8,168	0,21	104,03
319	109,7	9,09	8,17	0,22	103,51
319	110,1	9,24	8,15	0,25	100,44
319	109,8	9,24	8,137	0,32	91,19
319	107,5	9,02	8,138	0,76	79,9
3	137,8	11,36	8,455	7,47	17,2
3	146,9	12,04	8,484	7,5	18,83
3	153,4	12,48	8,288	8,92	19,43
3	138,5	11,44	8,087	11,66	56,73
3	117,5	9,83	8,003	11,07	58
3	77,3	6,51	7,911	7,62	59,45
3	62,7	5,3	7,901	5,89	57,3
4	157,8	12,84	8,484	8,17	14,1
4	151,3	12,25	8,445	7,68	14,78
4	142,2	11,22	8,229	9,08	18,85
4	96	7,95	7,906	5,7	80,78
4	64,6	5,41	7,889	2,99	87,5
5	205,2	16,72	8,726	16,33	8,4
5	209,9	17,12	8,733	16,33	8,57
5	215,8	17,46	8,586	16,33	8,57
5	212,3	17,07	8,406	15,95	23,78
5	180,1	15,33	8,059	7,3	92,17
5	74,2	6,35	7,911	3,77	95,2
602	122,8	9,68	8,319	2,59	33,6
602	131,4	10,57	8,361	3,5	26,05
602	142,9	11,36	8,337	3,3	45,95
602	138,6	10,85	8,251	1,58	91,82
602	131,9	10,41	8,23	1,56	96,19
602	127,2	10,66	8,155	1,67	76,55
602	117,3	9,94	8,058	1,12	52,24
602	72,7	6,19	7,948	0,53	82,4
604	140,2	11,25	8,43	5,18	19,2
604	147,8	11,87	8,451	5,56	19,83
604	158,5	12,49	8,405	6,25	29,48

604	156,2	12,43	8,313	5,45	63,8
604	146,5	12,15	8,226	6,09	77,06
604	135,7	11,47	8,188	4,23	90,39
604	128,3	11,04	8,157	2,77	99,32
604	119,2	10,32	8,066	1,63	96,27
604	85,7	7,48	7,965	1,34	80
604	79,3	6,94	7,987	0,92	71,94
604	76	6,65	8,001	0,8	72,87
604	73,8	6,46	7,996	0,75	80,67
604	53,7	4,71	7,972	0,29	76,4
609	102	8,01	8,231	0,38	94,1
609	103	8,09	8,227	0,37	93,85
609	104	8,14	8,221	0,38	98,14
609	105,1	8,3	8,217	0,26	102,36
609	106	8,59	8,226	0,25	102,75
609	105,8	8,6	8,223	0,31	101,64
609	106,6	8,73	8,218	0,36	100,68
609	107	8,91	8,233	0,38	101,47
609	106,9	9,06	8,209	0,45	98,17
609	105,5	9,1	8,15	0,6	90,33
609	101,4	8,8	8,111	0,7	81,48
609	87,6	7,64	8,088	1,04	77,41
609	76,8	6,7	8,085	1,26	77,4
614	111,7	8,56	8,284	4,48	58
614	114,1	8,77	8,294	4,56	54,59
614	116,8	8,96	8,288	5,1	63,74
614	115,5	8,92	8,212	4,43	90,9
614	113,2	8,92	8,189	1,75	97,95
614	113	9,06	8,203	0,92	100,56
614	112,1	9,1	8,2	1	101,59
614	111,3	9,1	8,183	1,04	101,69
614	110,8	9,24	8,19	1,05	101,37
614	109,3	9,28	8,17	1,26	97,72
614	90,5	7,7	8,133	1,47	84,4
619	102,6	7,95	8,191	0,25	80,8
619	102,9	7,97	8,187	0,27	86,63
619	103,4	8,01	8,184	0,27	92,79
619	104,3	8,12	8,187	0,26	98,7
619	105,5	8,37	8,19	0,19	104,06
619	106,7	8,62	8,188	0,22	103,99
619	107,7	8,8	8,184	0,23	103,97
619	108,2	8,84	8,208	0,25	104,18
619	109,6	9,12	8,219	0,3	103,46
619	111,4	9,47	8,218	0,36	102,22
619	111,2	9,49	8,179	0,49	103,28
619	109,7	9,37	8,147	0,47	104,65
619	106,7	9,11	8,135	0,55	104,82
619	103,6	8,85	8,137	0,7	104,8
6	187,3	15,24	8,516	16,33	11,9
6	191	15,55	8,484	15,68	11,81
6	193,9	15,47	8,446	16,18	18,74
6	177,9	14,12	8,267	13,91	70,26
6	148,3	12,09	8,137	7,01	87,83

6	95,8	8,15	8,089	3,95	88,6
8	179,5	13,9	8,566	8,39	12
8	179,6	13,91	8,567	7,65	14,73
8	185,5	14,36	8,564	12,46	18,12
8	171,5	13,43	8,185	5,7	71,71
8	109,5	8,7	8,067	2,64	78,6
9	124,1	9,88	8,368	6,08	35,5
9	126,8	10,1	8,364	5,92	35,45
9	131	10,3	8,337	6,4	38,14
9	128,8	10,08	8,228	3,77	72,3
9	122	9,56	8,212	3,12	86,9
9	111,4	8,85	8,192	2,5	85,03
9	100,6	8,06	8,176	2,53	81,1
Anem	103,3	8,02	8,24	0,41	98
Anem	104,4	8,1	8,234	0,4	97,69
Anem	105,2	8,14	8,222	0,39	99,38
Anem	105,4	8,17	8,216	0,36	101,78
Anem	105,6	8,24	8,215	0,37	102,99
Anem	106,1	8,37	8,214	0,38	103,54
Anem	106,4	8,57	8,215	0,38	103,98
Anem	106,7	8,72	8,218	0,42	104,13
Anem	107	8,76	8,215	0,44	104,49
Anem	107,4	8,86	8,212	0,44	104,92
Anem	107,3	8,97	8,219	0,56	104,13
Anem	107,9	9,07	8,21	0,58	104,53
Anem	108	9,41	8,194	0,55	105,25
Anem	105,2	9,28	8,172	0,5	105,63
Anem	102,4	9,05	8,166	0,47	106,53
Anem	100,2	8,87	8,155	0,52	105,82
Anem	97,2	8,6	8,131	0,59	103,49
Anem	93,9	8,3	8,125	0,64	102,51
Anem	91,6	8,1	8,124	0,63	102,76
Anem	90,1	7,97	8,12	0,61	101,95
Anem	88,9	7,86	8,115	0,69	93,84
Anem	88	7,77	8,114	0,79	87,32
Anem	85,9	7,59	8,115	0,93	79,2
Anem	85,1	7,52	8,116	0,99	76,3
Feni	114,1	8,72	8,228	0,79	73,8
Feni	115,2	8,81	8,227	0,82	74,16
Feni	116,5	8,96	8,217	0,77	78,5
Feni	117,3	9,26	8,198	0,39	89,53
Feni	116,3	9,41	8,199	0,22	102,56
Feni	114,6	9,37	8,198	0,22	103,98
Feni	113,5	9,39	8,195	0,29	101,99
Feni	113,1	9,55	8,184	0,38	101,39
Feni	111,5	9,52	8,159	0,43	99,31
Feni	108,5	9,38	8,126	0,6	89,38
Feni	104,2	9,04	8,095	0,54	63,61
Feni	90	7,82	8,08	0,59	70,6
Gar	113,4	8,97	8,27	0,21	94,8
Gar	113,8	8,99	8,271	0,22	91,77
Gar	114,2	8,98	8,274	0,23	97,83
Gar	115,1	9,31	8,273	0,2	101,49

Gar	115,6	9,5	8,276	0,2	102,82
Gar	116,1	9,58	8,274	0,25	103,34
Gar	116,4	9,63	8,273	0,23	103,58
Gar	116,2	9,62	8,269	0,26	103,71
Gar	115,9	9,65	8,264	0,32	103,37
Gar	115,4	9,73	8,263	0,37	103,36
Gar	114,7	9,76	8,258	0,44	103,08
Gar	114,3	9,75	8,253	0,52	102,83
Gar	114,3	9,72	8,243	0,63	102,71
Gar	114	9,69	8,214	0,68	102,96
Gar	112,5	9,6	8,191	0,72	103,98
Gar	111	9,52	8,184	0,76	104,06
Gar	109,8	9,48	8,177	0,75	104,37
Gar	63,7	5,67	7,998	2,39	77,5
PCC	102,2	7,99	8,228	0,19	86,3
PCC	102,8	8,05	8,227	0,21	87,99
PCC	103,8	8,15	8,225	0,22	99,67
PCC	104,6	8,22	8,226	0,26	100,78
PCC	105,3	8,32	8,227	0,31	101,8
PCC	106,3	8,61	8,233	0,24	103,32
PCC	106	8,64	8,237	0,23	103,21
PCC	107,2	8,83	8,241	0,3	102,33
PCC	107,8	9,02	8,25	0,36	102,33
PCC	107,8	9,04	8,239	0,41	101,46
PCC	109,1	9,33	8,21	0,54	99,57
PCC	107,5	9,38	8,187	0,57	100,93
PCC	104,5	9,18	8,181	0,54	102,14
PCC	102,6	9,06	8,146	0,66	102,33
PCC	99	8,75	8,109	0,71	103,16
PCC	94,9	8,39	8,103	0,78	102,66
PCC	91,4	8,08	8,098	0,92	101,98
PCC	88,5	7,85	8,09	0,99	99,65
PCC	85,6	7,6	8,077	0,93	97,27
PCC	82,3	7,29	8,059	0,85	87,39
PCC	79	6,99	8,041	1,02	77,45
PCC	73,3	6,49	8,037	1,12	77,02
PCC	69,3	6,14	8,038	1,2	76,6
PCWA	170	13,38	8,516	8,01	12,5
PCWA	180,6	14,19	8,518	8,06	13,25
PCWA	189,4	14,97	8,445	9,09	24,98
PCWA	177,5	14,08	8,262	4,06	75,39
PCWA	155,7	12,45	8,229	2,79	85,59
PCWA	147	11,93	8,2	3,63	82,36
PCWA	140,4	11,75	8,163	4,04	84,69
PCWA	131,8	11,29	8,118	3,23	83,58
PCWA	122	10,62	8,068	1,94	90,6
PCWA	109,8	9,63	8,049	2,05	93,16
PCWA	101,1	8,89	8,025	1,68	90,01
PCWA	83,9	7,38	8,008	1,42	89,74
PCWA	69,7	6,13	8,011	1,62	89

La temperatura ($^{\circ}\text{C}$), la trasparenza (m), la salinità (psu), Ossigeno.Disciolto superiore e di fondo (mg/l), il pH e la clorofilla ($\mu\text{g/l}$) vengono inseriti in un bollettino periodico emesso a frequenza settimanale. I valori sono medi e si riferiscono a tre zone, A, B, C, in cui è stata divisa l'area costiera emiliano-romagnola. Il bollettino è risultato molto utile per la gestione della pesca a livello regionale.