

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA-VITERBO

Dip. di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile

Tesi di Dottorato di Ricerca in Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche – XXII Ciclo

**Parassiti come indicatori biologici e livelli di
accumulo di Pb, Cd e Hg in un approccio
multidisciplinare nella caratterizzazione di *Xiphias
gladius* in acque europee**

Dottorando: dott. Simone Damiano

SSD: Ecologia BIO/07

Tutor: Dott. Simonetta Mattiucci

Coordinatore: Dott. Roberta Cimmaruta

Abstract

L'effetto sinergico delle attività naturali ed antropiche che agiscono sul bacino mediterraneo hanno portato nei decenni ad un depauperamento della popolazione di pesce spada (*Xiphias gladius*, L. 1758). L'uso dei parassiti è un valido approccio per la caratterizzazione di stock di specie ittiche sia demersali che pelagiche. I metalli pesanti sono contaminanti chimici che hanno effetti a lungo termine sui pesci, rappresentando un rischio sia per lo stock in se stesso, sia per l'uomo. La valutazione dei livelli d'infestazione da parassiti e dei valori di accumulo di metalli pesanti di uno stock, rappresenta un contributo per il monitoraggio dello stato di salute di una risorsa ittica sottoposta ad eccessivo sforzo di pesca come il pesce spada. Lo scopo del lavoro è tracciare un quadro generale della situazione dello stock mediterraneo di pesce spada attraverso l'utilizzo di parassiti come *biological tags* e delle differenze di concentrazioni di metalli pesanti quali Pb, Cd e Hg contenuti nei tessuti di campioni atlantici e mediterranei. 276 esemplari sono stati esaminati ed i risultati hanno mostrato significative differenze tra l'area mediterranea e quella atlantica, suggerendo il possibile utilizzo di alcune specie di parassiti, come i nematodi anisakidi o il cestode *Hepatoxylon squali*, come possibili indicatori biologici nella caratterizzazione degli stock di pesce spada. Parallelamente, alti livelli di contaminazione sono stati trovati per Pb, e Hg in tutti i siti di campionamento, con differenze rilevanti tra le due aree. Per il Cd le concentrazioni trovate non hanno superato i limiti massimi consentiti per il consumo.

Abstract

During the last decades, the combined effect of natural and human activities acting over the Mediterranean Sea basin have brought to a reduction of the swordfish (*Xiphias gladius*, L. 1758) population. The use of parasites as biological tags has shown to be a valid approach for the characterization of both pelagic and demersal fish stocks. Heavy metals, as chemical pollutants, have strong long-term effects on fish and constitute a high risk for the resource and the human consumption. Mediterranean swordfish is a highly exploited marine source. An evaluation of its parasites infestation levels and heavy metals accumulation can contribute to the monitoring of stock the health state. The aim is to characterize the Mediterranean stock in a comparative study with the Atlantic one. Parasites have been used as biological tags and accumulation levels of Pb, Cd, and Hg have been recorded. 276 fish, coming from both Atlantic and Mediterranean region have been examined. Significant differences between areas have been reported for parasite fauna composition and distribution. Results suggest that some parasites as anisakid nematodes and the cestode *Hepatoxylon squali* can be considered as valid biological tags for the swordfish stock characterization. High concentration levels for Pb and Hg have been found in all sampling localities with differences between areas. Cd concentrations were lower than the maximum level applied for the seafood by the European Commission.

Sommario

1. INTRODUZIONE	4
2. IL PESCE SPADA	8
BIOLOGIA DI <i>XIPHIAS GLADIUS</i>	8
METODI DI PESCA DEL PESCE SPADA	11
PESCA CON ARPIONE	12
PALANGARO	13
RETE DA POSTA	14
IL PESCE SPADA MEDITERRANEO	15
3. PARASSITI COME “BIO-INDICATORI” DI STOCK ITTICI	18
4. I METALLI PESANTI	20
I METALLI PESANTI NELL’AMBIENTE MARINO	20
PIOMBO	22
CADMIO	23
MERCURIO	24
LO STATO ATTUALE	25
5. MATERIALI E METODI	27
CAMPIONAMENTO DEL PESCE SPADA	27
ESAME PARASSITOLOGICO	28
MAE (MULTILOCUS ALLOZYME ELECTROPHORESIS)	28
ANALISI DEL GENE DELLA <i>COX2</i> (MTDNA)	30
PARAMETRI EPIZOOLOGICI	32
ANALISI DEI METALLI PESANTI	33
PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	33
SPETTROFOTOMETRIA AD ASSORBIMENTO ATOMICO (AAS)	34
MISURA DEL PIOMBO E CADMIO (ASSORBIMENTO ATOMICO A FORNETTO DI GRAFITE)	34
MISURA DEL MERCURIO (ASSORBIMENTO ATOMICO A GENERAZIONE DI IDRURI)	35
6. RISULTATI	36
COMPOSIZIONE DELLA FAUNA PARASSITARIA DI <i>X. GLADIUS</i>	36
NEMATODI	37
MONOGENEI	37
DIGENEI	38
CESTODI	39
CROSTACEI	40
<i>X. GLADIUS</i> MEDITERRANEO E ATLANTICO: PARASSITI INDICATORI DI STOCK	40
IL PESCE SPADA E L’ACCUMULO DI METALLI PESANTI	44
7. DISCUSSIONI	48
8. BIBLIOGRAFIA	56
ALLEGATO 1	67

1. Introduzione

L'espansione antropica determina una sempre maggiore pressione sugli oceani. Si assiste, da una parte, ad un aumento progressivo delle attività di pesca che comporta un allarmante declino degli stock di molte specie ittiche di interesse commerciale, dall'altra ad un aumento dell'inquinamento e degli effetti negativi che questo comporta. Si è quindi arrivati al punto di dover individuare linee di consumo sostenibile e sicuro, in modo da alleggerire la pressione antropica che agisce sulle risorse e da tutelare la salute del consumatore. Questi problemi richiedono continua vigilanza ed attenzione per ridurre lo sfruttamento delle risorse marine, nell'interesse stesso delle attività legate al mare. La Comunità Europea ha individuato come obiettivo fondamentale delle politiche ambientali, il corretto utilizzo delle risorse naturali, con peculiare attenzione verso quei settori produttivi a rischio come la pesca. Diventa prioritario in questa linea politica lo sviluppo di strategie che consentano di descrivere in modo sia qualitativo che quantitativo gli stock ittici, in particolar modo nell'area mediterranea, al fine di poterne individuare i punti deboli ed i punti di forza. La valutazione ed il monitoraggio costante dello stato delle risorse biologiche è la premessa imprescindibile per un loro responsabile sfruttamento.

La complessità dei fattori biotici e abiotici che legano una specie ittica al suo habitat, ancor più se pelagica, rende necessaria l'impostazione di uno studio, non solo multidisciplinare, ma soprattutto caratterizzato dalla scelta appropriata di scale di campionamento sia spaziali (copertura e densità delle analisi) che temporali (prolungate nel tempo). Inoltre non si può prescindere dalla conoscenza della fisiologia dell'area di studio, intesa come l'insieme di fattori geodinamici che la caratterizzano.

I parametri fino a pochi anni fa comunemente usati per descrivere una risorsa ittica ed i relativi stock lungo il suo areale di distribuzione, erano: il tasso di crescita, il reclutamento, il comportamento migratorio, la mortalità naturale e la mortalità dovuta all'effetto della pesca. Tutte informazioni queste che si ottenevano dall'elaborazione di dati biometrici e morfometrici dei singoli individui che compongono l'intera popolazione o "stock ittico", termine tecnico usato nel settore della pesca per indicare una sottopopolazione omogenea dal punto di vista biologico-gestionale. L'introduzione di un approccio multidisciplinare, aspetto innovativo nella gestione temporale e spaziale delle risorse da pesca, si è rivelato di grande aiuto nell'identificazione e caratterizzazione di uno stock. Un lavoro di questo genere trova le basi nella genetica che si rivela molto efficace nel fornire utili informazioni sia sullo stato di salute della risorsa in esame, in termini di riduzione della variabilità genetica della popolazione, sia sull'identificazione di sotto-popolazioni. Fra queste diverse metodologie che cercano di interpretare gli effetti della pesca e delle attività antropiche sull'ecosistema marino, vi è un unico filo conduttore che è quello della conoscenza dell'ecosistema stesso, in modo da individuarne i livelli di produzione compatibili con la stabilità ecologica delle comunità ittiche.

Secondo Bedd & Waldmann (1999) questo tipo di approccio, definito “olistico”, si avvale del principio della complementarità di vari metodi, sfruttando i vantaggi di diverse tecniche, per avere una migliore conoscenza della popolazione in esame, e quindi una maggiore attendibilità sulla corretta definizione di differenti stock ittici. Secondo gli Autori, le metodologie più frequentemente usate a tal fine su una stessa specie ittica, sono rivolte alla conoscenza di: *a*) caratteri morfologici, estrapolati da analisi meristiche, morfometriche e studi sugli otoliti e squame; *b*) caratteri biologici, ottenibili dall’esame dei dati di cattura (composizione per taglia e/o età), o dalle conoscenze sul ciclo biologico della specie ittica (caratteristiche riproduttive e preferenze trofiche); *c*) struttura genetica delle popolazioni mediante l’utilizzo di marcatori genetico-molecolari, sia nucleari che mitocondriali; *d*) caratteri biogeografici, ottenibili con tecniche satellitari, di marcaggio e ricattura degli individui, di analisi delle microcomponenti chimiche degli otoliti.

Infine, un’altra metodologia è recentemente entrata in questo tipo di studio olistico per il “fish stock assessment”, ed è quella di utilizzare i parassiti di specie ittiche come “indicatori biologici”. Un’analisi della parassitofauna, ovvero un’analisi sulla presenza/assenza di determinati parassiti, siano essi interni (endoparassiti) od esterni (ectoparassiti) alla specie ittica, permette di individuare subpopolazioni di quella specie ittica campionata in aree diverse comprese nel suo areale di distribuzione, tenendo conto degli aspetti biogeografici dei parassiti. La necessità di trovare un indicatore biologico che permettesse di seguire l’effetto di un inquinante o di un impatto su di un organismo o più in generale su una risorsa marina, fu evidenziata per la prima volta da McIntyre & Pearce (1980). Lo studio delle comunità parassitarie sta mostrando sempre più di poter dare un ottimo contributo al problema dell’identificazione e della caratterizzazione degli stock ittici (Mackenzie, 2002; Lester & Mackenzie, 2009).

Il pesce spada, essendo un teleosteo cosmopolita al top della rete trofica marina, è sempre stato ed è tuttora oggetto di particolare attenzione da parte degli operatori del settore ittico, sia per il suo elevato valore commerciale, sia per le sue eccezionali caratteristiche organolettiche, sia per le sue potenzialità di accumulo di contaminanti per effetto di bio-magnificazione. Il corrente lavoro, si inserisce in quest’ambito, in quanto, oltre ad avere come scopo l’individuazione di specie parassite che possano avere valore diagnostico per discriminare la popolazione di pesce spada (*Xiphias gladius*) atlantico da quello mediterraneo, cerca di dare una valutazione sullo stato di salute della popolazione mediterranea riportando i livelli di infestazione da parassiti patogeni e quelli di accumulo di metalli pesanti delle due popolazioni. Esso infatti rappresenta anche un contributo alla conoscenza dello “stato di salute” della risorsa ittica in acque europee, considerando un’analisi comparativa che finora non è stata mai condotta.

La parassitofauna di *X. gladius* è stata già precedentemente studiata sia relativamente alla popolazione atlantica (Garcia *et al.*, 2008; Hogans *et al.*, 1983; Castro-Papillón *et al.*, 2002) che quella mediterranea (Di Paolo *et al.*, 1994; Euzet e Quignard 1961). Tuttavia non è stata mai condotta un’analisi comparativa dei livelli d’infestazione parassitaria dei due stock tesa all’individuazione di parassiti come “biological tags”.

L'identificazione dei parassiti raccolti è stata effettuata a livello di specie, poiché, come ormai universalmente riconosciuto, per qualsiasi ricerca in campo epidemiologico è necessario stabilire un esatto riconoscimento delle entità tassonomiche coinvolte. Tale identificazione, tuttavia, è spesso imprecisa se basata solamente sull'analisi morfologica classica e può portare a risultati non esatti, in particolare nel caso di "*specie gemelle*" (specie con tratti morfologici molto simili ma riproduttivamente isolate). Pertanto per alcuni gruppi di parassiti, in particolare per i nematodi anisakidi, ci si è avvalsi delle metodologie genetico-molecolari per la loro identificazione a livello di specie. Infatti, poiché i nematodi appartenenti al genere *Hysterothylacium* e le forme larvali del genere *Anisakis* sono privi di caratteri morfologici distintivi, per la loro identificazione a livello specifico sono stati utilizzati marcatori genetici ottenuti dall'elettroforesi multilocus (Multilocus Allozyme Electrophoresis, MAE) e dall'analisi del gene della *cox2* del DNA mitocondriale. Negli ultimi anni, studi genetici ed ecologici condotti presso il DECOS¹ dell'Università degli Studi della Tuscia e presso il DSSP² Sezione di Parassitologia, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", hanno portato all'approfondimento delle conoscenze di questi gruppi di parassiti, sia da un punto di vista genetico che ecologico (Nascetti, *et al.*, 1986; Mattiucci, *et al.*, 1986, 1994, 1997, 2001, 2004; Mattiucci & Nascetti, 2006; Valentini *et al.*, 2006). Nello specifico si è riusciti ad ottenere informazioni più dettagliate sui loro cicli biologici, sugli ospiti definitivi, intermedi e/o paratenici, sulla loro distribuzione geografica. L'insieme dei dati ottenuti in questo lavoro, consente il potenziale uso delle specie di *Anisakis* e *Hysterothylacium* come indicatori biologici nello "stock assessment" di specie ittiche, parassitate da questi nematodi.

Il lavoro è stato articolato in due parti differenti. La prima è stata incentrata sullo studio della comunità parassitaria *in toto* del pesce spada, al fine di valutare eventuali differenze nei valori di infestazione negli esemplari-ospiti campionati nell'area atlantica e nell'area mediterranea. La valutazione dei livelli di parassitosi può difatti essere un contributo per monitorare sia la qualità dell'ambiente che lo stato di salute di specie ittiche demograficamente depauperate ed impoverite nelle loro risorse genetiche. L'aspetto epidemiologico è stato affrontato valutando per ogni parassita reperito, i livelli di infestazione mediante il calcolo della Prevalenza, Abbondanza ed Intensità Media. In questa fase si è anche proceduti all'individuazione di specie parassite che potessero confermare la presenza di due subpopolazioni, o "stock", di *X. gladius* separate, una mediterranea, l'altra atlantica. E' stato infatti recentemente dimostrato, mediante l'utilizzo di marcatori genetico-molecolari, sia nucleari (allozimi) che mitocondriali, che la popolazione di pesce spada mediterraneo appartiene ad uno stock ittico distinto da quello atlantico (Nascetti, 1997; Cimmaruta *et al.*, 1996, 1998; Reeb & Block, 2006; Lu *et al.*, 2006; Kotoulas *et al.*, 2006). Un'ulteriore separazione delle popolazioni atlantiche, riconosciuta dall'ICCAT che rappresenta l'organo ufficiale di controllo delle popolazioni di grandi pelagici, stabilisce a 5°N la suddivisione tra lo stock "nord" e "sud" Atlantico del pesce spada. Questo limite sembra poter essere spostato tra 0° e 10°N secondo i più recenti dati genetici su queste

¹ Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile

² Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica

popolazioni (ICCAT, 2006). Il passo successivo dell'analisi della parassitofauna è quello di approfondire i dati ottenuti sui parassiti patogeni per *X. gladius* al fine di metterli in correlazione con la riduzione di variabilità genetica ottenuta da lavori precedenti (Chow *et al.*, 1997; Cimmaruta *et al.*, 2006).

La seconda parte del lavoro è stata incentrata sulla ricerca e analisi di metalli pesanti (Hg, Pb e Cd) nei tessuti di pesce spada. Recentemente è stato già evidenziato come elevate concentrazioni di questi elementi risultino trovarsi in molti pesci di interesse commerciale del Mar Mediterraneo (Langston, 1990; Kalay *et al.*, 1999; Canli & Atli 2003; Papetti & Rossi, 2009). I valori di accumulo dei metalli pesanti sono un indicatore dello stato di salute della specie studio. Fossi *et al.* (2004) hanno infatti dimostrato gli effetti tossicologici degli endocrine disrupters¹ sulla popolazione mediterranea di *X. gladius*. Secondo l'ipotesi della "Regina Rossa" (Van Valen, 1973), popolazioni che presentano diminuzione dell'eterozigosi (o più in generale riduzione della variabilità genetica) sono più soggette a perdere le capacità di resistenza agli agenti esterni, compresi i parassiti. Alcuni metalli pesanti come il mercurio, oltre ad avere effetti sulla struttura nucleotidica del DNA, possono alterare le capacità riproduttive, comportando quindi una riduzione delle capacità di adattamento del pesce spada e con esse dello stato di salute. Nonostante sia quindi di fondamentale importanza venire a conoscenza della distribuzione dei contaminanti nel pescato, sono solo pochi i lavori in questa direzione svolti fino ad oggi sul pesce spada mediterraneo, sia su quelli inorganici (Storelli, *et al.*, 2005; Storelli & Marcotrigiano, 2001) che organici (Stefanelli, *et al.*, 2004)

Il lavoro ha avuto dunque il fine di: 1) ottenere dati parassitologici sull'infestazione da ecto, meso ed endoparassiti di *X. gladius* provenienti da diversi siti di raccolta del Mar Mediterraneo e del Nord-Est Atlantico; 2) ottenere dati sui livelli di infestazione da parassiti che hanno effetti patogeni gravi sugli individui; 3) determinare i livelli di accumulo da metalli pesanti (Pb, Cd e Hg).

¹ Agenti che agiscono sul sistema endocrino alterandone le normali funzioni. Nel caso del pesce spada sono stati riscontrati da Fossi *et al* i PCB, gli organo clorurati ed alcuni metalli pesanti (Pb, Hg, Cd)

2. Il pesce spada

Biologia di *Xiphias gladius*

- Classe: Actinopterygii
- Ordine: Perciformi
- Famiglia: Xiphiidae

Il nome del genere, *Xiphias* (in greco "spada", denominazione attribuitagli anticamente da Aristotele), è rimasto immutato per 2400 anni. Successivamente Linneo (1758) nell' introdurre la nomenclatura binomiale, aggiunse al nome greco il termine latino di *gladius* per indicare la specie (Fig. 2-1).

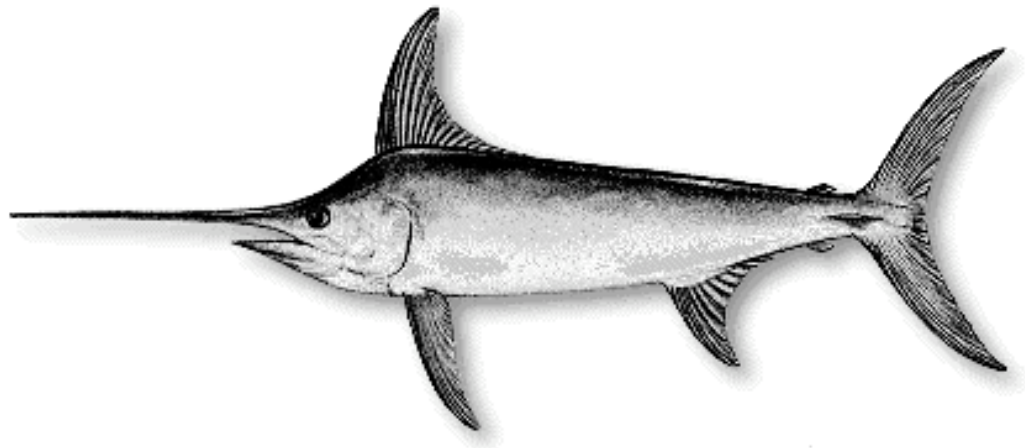


Fig. 2-1 *Xiphias gladius* (Linneus, 1758)

Tra i pesci più veloci esistenti, *X. gladius* è una specie pelagica di notevoli dimensioni, la cui caratteristica principale è la forma allungata delle mascelle. Quella superiore è contraddistinta dalla presenza di un rostro osseo, allungato ed appiattito in senso verticale con i bordi taglienti (spada), che è circa un terzo della lunghezza dell'intero animale e deriva dal prolungamento di diverse ossa sopra la mascella. Le pinne ventrali sono assenti. L'aspetto degli animali giovani è diverso da quello degli adulti, i primi hanno denti e piccole squame ruvide, che scompaiono progressivamente, ed una sola pinna dorsale che si modifica notevolmente negli adulti, dando luogo anche ad una seconda piccola pinna, che diviene alta e triangolare nella parte anteriore. La pinna caudale ha una caratteristica forma di mezzaluna, molto robusta ed adatta al nuoto veloce. Le pinne pettorali sono a forma di falce. Il pesce spada è il pesce munito di rostro con la distribuzione più ampia, si trova diffuso in tutto il mondo, nelle acque tropicali, subtropicali e nei mari temperati dalla latitudine 45°N a 45°S. La distribuzione presunta del pesce spada nel Pacifico Occidentale indica che gli adulti preferiscono acque fredde rispetto agli altri pesci dotati di rostro. È un pesce pelagico che vive in mare aperto

compiendo ampie migrazioni, nuota in superficie, sia in acque poco profonde sia in quelle moderatamente profonde, ma può scendere velocemente spostandosi sino a 650 m di profondità (Church, 1968). Tendono a concentrarsi lungo fronti di temperatura ricchi di pesce, in cui avviene la risalita di masse d'acqua dal fondo (upwelling).

Ha un comportamento fiero e aggressivo come testimoniano alcuni attacchi documentati a mezzi nautici. A tale proposito nel 1967 un esemplare di 2.45 metri attaccò, a una profondità di 610 metri, il sommergibile oceanografico Alvin, restando confitto con la spada in una giuntura dello scafo (Fig. 2-2).



Fig. 2-2: Pesce spada incastrato nel batiscafo Alvin (W.H.O.I.)

Gli individui giovanili hanno tendenze gregarie (schooling), mentre quelli adulti sono di solito solitari, anche se è possibile trovarlo in coppia durante il periodo riproduttivo quando si avvicina alla costa. Solo occasionalmente sono stati avvistati adulti in piccoli gruppi. Gli esemplari allo stadio larvale si cibano di zooplankton e larve di altre specie, gli stadi giovanili si nutrono invece di piccoli pesci. Il pesce spada adulto è un predatore opportunistico, è capace di utilizzare differenti risorse, cibandosi di calamari, totani, pesci pelagici, pesci demersali e talora di animali bentonici come alcuni crostacei. All'interno della nicchia trofica compete probabilmente con altri pesci dotati di rostro per le stesse risorse. Non ci sono attualmente informazioni sugli effetti che questa competizione ha sulla sua sopravvivenza, ma si suppone che questi siano minimi data l'elevata capacità di adattarsi a qualsiasi fonte di cibo. L'attività di predazione, prevalentemente in superficie, aumenta durante le ore della mattina e della sera mentre si riduce a mezzogiorno e la notte. La tecnica spesso utilizzata per uccidere le sue prede è quella di far oscillare il rostro da un lato all'altro, colpendo con violenza la preda e cibandosi poi di quest'ultima.

Le larve del *X. gladius* sono comuni prede di molti pesci pelagici ed anche dello stesso pesce spada, gli adulti hanno pochi nemici naturali, come l'orca e alcuni grandi squali. La distribuzione di

queste larve è strettamente associata alla temperatura della superficie, che deve essere compresa fra 24°C e 29°C (Taning, 1995). La maturità sessuale è raggiunta al termine del primo anno nei maschi, tra il secondo ed il terzo nelle femmine. Non sono note caratteristiche esterne che distinguono il maschio dalla femmina, eccetto il fatto che generalmente queste ultime sono più grandi dei maschi. Le proporzioni fra i sessi possono dipendere dalla temperatura, nelle acque fredde risulta maggiore il numero d'individui di sesso maschile. La mortalità naturale del pesce spada è bassa rispetto a quella che è stata riscontrata nelle altre specie di pesci con rostro (Arata, 1954).

Alla nascita hanno una lunghezza di circa 4,0 – 4,2 mm e le larve al quinto giorno sono lunghe 5.5 mm. circa, hanno un accrescimento molto rapido, secondo Arata di circa 0.6 mm. al giorno. Nel Pacifico le larve durante il primo anno di vita raggiungono la misura di 500-600 mm. (Fig.3-3).

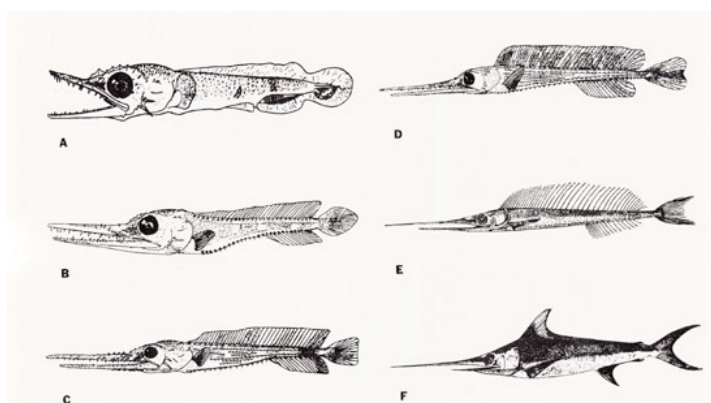


Fig. 2-3: Stadi larvali di *Xiphias gladius* (FAO, 1985)

L'incremento di peso del pesce spada in funzione dell'età è il seguente: I anno d'età - 4 Kg; II anno d'età - 15 Kg; III anno d'età - 40 Kg; IV anno d'età - 70 Kg; V anno d'età - 110 Kg. Si riscontra una notevole differenza tra l'accrescimento delle femmine e quello dei maschi, le prime divengono più grandi e si accrescono anche più rapidamente, inoltre a parità di lunghezza gli individui di sesso femminile pesano di più. La maggior parte dei pesci sopra i 140 Kg risulta essere femmine.

La massima taglia del pesce spada è 445 cm di lunghezza totale e 540 Kg di peso (l'esemplare più grande mai catturato risale al 1953, in Cile). Recenti ricerche condotte sul pesce spada al largo delle coste sud degli Stati Uniti indicano che il maschio matura a una taglia inferiore della femmina, circa 21 Kg per il maschio e 74 Kg per le femmine.

La femmina arriva a deporre fino a 80.000 uova, galleggianti, con una grossa goccia oleosa, sferiche (1,6-1,8 mm) e trasparenti. La deposizione generalmente avviene in acque tropicali dove le temperature superficiali sono maggiori di 20-22°C. Nell'Atlantico la deposizione avviene tutto l'anno nei Caraibi, Golfo del Messico e nelle acque al largo della Florida, con un picco nella stagione di deposizione da aprile a settembre (Arata, 1954). Zone aggiuntive di deposizione sono state segnalate nel Mar di Sicilia e nel Mar di Marmara; la più importante concentrazione d'uova si trova davanti allo

stretto di Messina (Sella, 1911). Nel Pacifico Orientale esemplari in attività di deposizione sono stati osservati in ogni mese dell'anno, ma sembra siano più abbondanti da marzo a luglio alle latitudini più settentrionali e intorno a gennaio alle latitudini meridionali (Kume & Joseph, 1969).

Studi condotti finora mediante diversi marcatori genetici e molecolari, hanno dimostrato che la popolazione mondiale del pesce spada non rappresenta uno stock distinto bensì è costituita da differenti sotto popolazioni caratterizzate da strutture genetiche ben definite (Kotoulas *et al.*, 1995; Rosel & Block, 1995; Alvarado-Bremer *et al.*, 1996, 2005; Chow & Takeyama, 2000; Kotoulas *et al.*, 2006; Cimmaruta *et al.*, 2006). La variabilità genetica dello stock mediterraneo di pesce spada, stimata mediante diversi marcatori come allozimi, mtDNA, RFLP, si è rivelata nettamente inferiore a quella delle popolazioni atlantiche. Le ipotesi più probabili sono che i differenti livelli di variabilità genetica possono essere o legati ad un evento storico (Alvarado Bremer, *et al.* 2005) piuttosto che ad un fenomeno di “erosione genetica” nel pool delle popolazioni mediterranee (Nascetti, 1997). Il sovra sfruttamento può causare la perdita di genotipi ed alleli rari per “deriva genetica”, riducendo rapidamente la variabilità genetica delle popolazioni.

Attualmente, il pesce spada pescato nel Mediterraneo, in forza del Regolamento CE 973/2001, non è più soggetto ad alcun limite di taglia; il Legislatore infatti, riferisce taglie minime di 125 cm (mandibola inferiore) o 25 Kg unicamente al pesce pescato nell'Oceano Atlantico. Le uniche limitazioni vigenti nel Mediterraneo sono relative alla lunghezza e larghezza degli ami utilizzati nei palangari. In sintesi la materia è disciplinata dal D.P.R. n. 1639/68 “Regolamento per l'esecuzione della Legge 14 Luglio 1965, n. 963, concernente la disciplina della pesca marittima” quando la stessa impone taglie maggiori a quelle previste dai regolamenti comunitari, quando questi ultimi non dispongono alcuna limitazione (es. pesce spada). il Regolamento CE 973/2001 stabilisce alcune “misure tecniche di conservazione per taluni stock di grandi migratori” – come modificato dal Regolamento CE 831/2004 – per i grandi migratori (tonno rosso e pesce spada).

Metodi di pesca del pesce spada

Il pesce spada è una preziosa risorsa di pesca mondiale, con in media circa 110 000 tonnellate annue (FAO, 2000-2005).

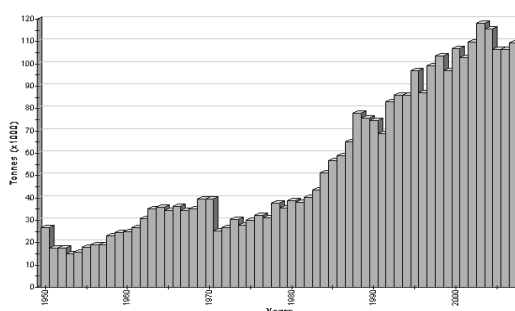


Fig. 2-4: Stima del pescato mondiale di *X. gladius* (Dati FAO)

La pesca nelle zone del Pacifico da sola costituisce circa il 40% del pescato totale. In Italia la pesca del pesce spada è praticata nel mare di Sicilia con circa il 64% del pescato e nel Tirreno con circa il 18%. La pesca professionale è praticata con diversi attrezzi. Un sistema molto selettivo, ormai in uso solamente per scopi turistici, è quello che viene effettuato con l'arpione, altri attrezzi utilizzati per pescare questa specie sono il "palangaro derivante" ad ami grandi e la spadara (rete da posta derivante).

Pesca con arpione

Questa tipologia di pesca veniva principalmente praticata nello stretto di Messina e si serviva di speciali imbarcazioni chiamate "feluche".

"Nel canale di Messina si fa la pesca del pesce spada, pesce di cinque piedi di lunghezza; la lama che porta all'estremità del naso, ha due piedi e mezzo di lunghezza per due pollici e mezzo di larghezza e per quattro o cinque di spessore. Essa è così forte da sfondare una barca con un colpo di questo corno, che è così duro che il ferro lo scalfisce appena. Questa pesca si fa soltanto lungo la costa del faro, dopo la lanterna, vicino al porto di Messina, fino ai dintorni di Scilla. Vi sono otto, dieci o dodici barche destinate a tal uso. In mezzo ad una di esse si alza un lungo albero, in cima al quale un uomo fa da sentinella, e guarda i segnali che gli fanno gli altri uomini arrampicati sulle rocce della riva o sul castello di Scilla, da dove, osservando il mare quasi perpendicolarmente si vede dove è il grosso pesce che si cerca; l'uomo posto in cima al palo ripete i loro segnali e indica agli uomini che sono nel battello, con grida e termini derivanti dall'antico greco, i giri che fanno i pesci". (Jean Howell, *Voyage pittoresque des isles de Sicilie, de Malta et de Lipari*, Paris, 1782-87).

Questa descrizione del pittore Jean Howell, ci indica come sia sempre stata forte l'attrazione per la pesca del pesce spada. Nello stretto di Messina il marinaio esperto, dopo l'avvistamento, deve effettuare l'inseguimento del pesce spada, con questo metodo si opera una pesca selettiva, poiché è possibile scegliere di catturare solo animali adulti, ma nel complesso l'utilizzo di questo attrezzo è ormai modesto, legato soprattutto alla tradizione. Questa pesca sfrutta un'abitudine del pesce a muoversi in superficie, a volte in coppia, maschio e femmina, la fedeltà di questa specie in epoca riproduttiva è ben nota ai pescatori siciliani che tentano di colpire con l'arpione prima la femmina, dal momento che il maschio, anche se rischia la cattura, non abbandona mai la compagna ferita.

La pesca al pesce spada con l'arpione nello stretto di Messina oggi è ormai in disuso, le poche unità da pesca rimaste sperano di trovare sostentamento in seguito ad iniziative di salvaguardia e recupero di questa antica tradizione. La pesca si serviva imbarcazioni chiamate: "feluca" e "ontro", avveniva con diverse modalità a seconda se ci si trovava sulle coste siciliane o su quelle calabresi dello Stretto.

In Sicilia inizialmente venivano impiegate le due imbarcazioni in questo modo, la feluca, una grossa imbarcazione di circa 10 tonnellate di stazza, veniva ancorata in punti precisi dello stretto chiamati “poste”. Le poste erano i punti destinati a ciascun equipaggio ed erano assegnati per sorteggio; ogni posta non veniva lasciata al sorteggiato per tutto il periodo di pesca ma ogni equipaggio doveva spostarsi giornalmente da sud verso nord fino ad occupare una posta diversa per ogni giornata e così a seguire riprendendo il giro una volta completato. La feluca era provvista di un albero di avvistamento alto oltre 20 m., e segnalava tramite la vedetta, “antinneri”, la presenza del pesce spada all’ontro. L’ontro a sua volta possedeva una seconda antenna di avvistamento, quattro rematori ed a poppa il lanciatore, il pescatore che doveva arpionare il pesce spada. La vedetta dalla feluca suggeriva gli spostamenti a quella dell’ontro fino alla cattura del pesce. Nelle acque siciliane i mesi dediti alla pesca del pesce spada erano luglio e agosto.

Palangaro

Si tratta di un attrezzo che impiega simultaneamente più ami. E’ costituito da un cavo principale, chiamato trave, lungo anche centinaia di metri. Sul trave o madre del palangaro sono montati gli ami ad intervalli regolari, mediante spezzoni di filo chiamati braccioli. La distanza tra un amo e l’altro è normalmente poco superiore al doppio della lunghezza dei braccioli. Gli ami hanno diversa forma e dimensione ed esche varie in relazione alle specie da catturare. Generalmente questo tipo di pesca viene effettuata di notte, si cala verso il tramonto e si salpa all’alba. I palangari possono essere calati in profondità, cosiddetti “palangari fissi”, (Fig. 2-6) per la cattura del pesce di fondo oppure possono essere calati a mezz’acqua o in superficie per la cattura dei grossi pesci pelagici come nel caso del pesce spada. I due tipi si differenziano tra loro, oltre che per il metodo di pesca, anche per la lunghezza dei braccioli e la grandezza degli ami.

Un tipico palangaro derivante (Fig. 2-7) da superficie per la cattura di pesci spada, tonnidi etc. è costituito da un trave pressoché simile a quello da fondo. I braccioli invece sono molto più lunghi, da 5 a 10 m., e sono formati in due parti: quella unita al trave è, come questo, in nylon o poliestere anche se di diametro un po’ inferiore mentre la seconda parte, quella unita all’amo, è quasi sempre in acciaio. Le due porzioni sono unite tra loro tramite un tornichetto che ne impedisce l’attorcigliamento al dimenarsi della preda.

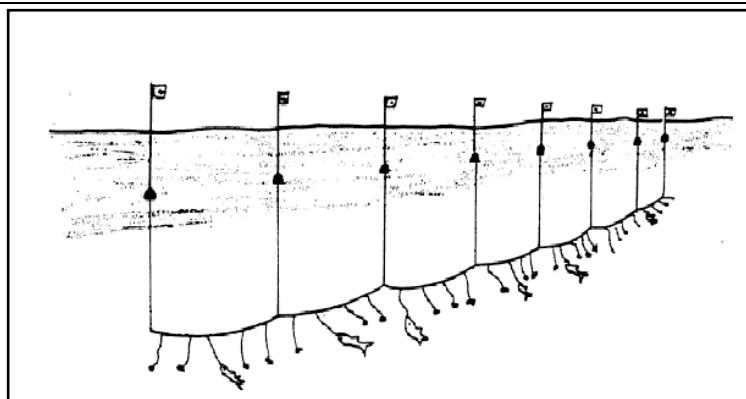


Fig. 2-6: Palangaro fisso

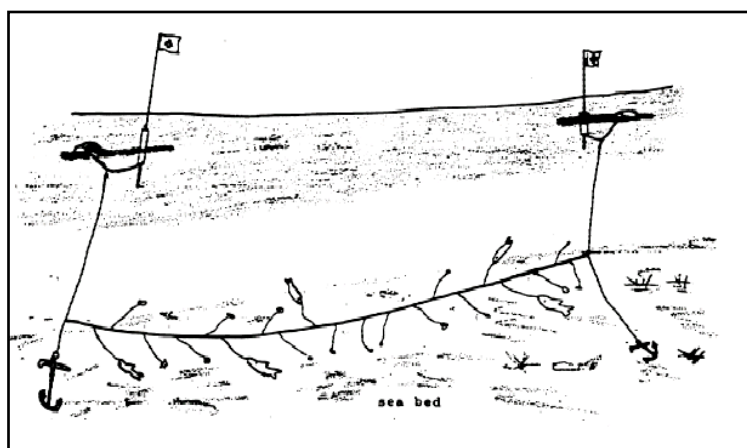


Fig. 2-7: Palangaro derivante di superficie

Nella pesca professionale per ottenere una cattura che ricompensi del lavoro sono necessari moltissimi ami. Negli ultimi tempi sono stati introdotti strumenti atti a ridurre la fatica e i tempi di lavoro in modo che si possono calare più ami e quindi si possa avere un rendimento superiore. Si hanno infatti strumenti per l'innescamento automatico mentre si cala con continuità, e strumenti che permettono il recupero più o meno automatico (salpapalangari).

Rete da posta

Le reti da posta sono quelle destinate a recingere o sbarrare spazi acquei, allo scopo di intercettare ed “ammagliare” i pesci; si suddividono in fisse e da deriva. Le prime sono ancorate al fondo, le seconde, invece, sono lasciate all'azione dei venti e delle correnti. Sono chiamate tutte anche “reti da imbrotto”, perché il pesce, urtando in esse rimane imbrigliato nelle maglie. Le reti da posta fisse sono mono o tristratificate, vengono calate per un tempo più o meno lungo, con uno dei capi il più delle volte attaccato alla terra e con l'altro variamente disposto; di solito vengono collocate alla sera e ritirate al mattino.

Le reti da posta da deriva, sono reti semplici, verticali, lunghe anche diverse centinaia di metri, abbandonate alla mercè dei venti e delle correnti. Queste reti, utilizzate in passato soprattutto per la

cattura del pesce spada, da cui anche il nome di “spadare”, sono state bandite a partire dall’anno 2002 con l’entrata in vigore del Regolamento CE 1239/98. Nel corso degli anni questo sistema di pesca è stato infatti oggetto di contestazioni e polemiche da parte di associazioni ambientaliste al punto di destare l’attenzione della Comunità Europea e del Governo Italiano. Vari studi promossi dai Governi Europei hanno accertato che tali reti lunghe oltre 5 miglia, profonde più di trenta metri e con apertura di maglie non inferiori a 350 mm., causavano, e causano, catture accidentali di specie protette o commercialmente non sfruttabili, quali delfini, squali e tartarughe marine, ma anche uccelli e balene.

La progressiva presa di coscienza della scarsa selettività della rete da posta derivante ha portato all’emanazione di numerosi provvedimenti nazionali e comunitari finalizzati alla drastica riduzione dell’uso di tale sistema di pesca fino ad arrivare alla definitiva messa al bando. Il Decreto Ministeriale del 23/05/1997 concernente il “piano volontario di razionalizzazione e riconversione” delle reti da posta derivanti, consentiva di usufruire del premio di riconversione. La maggior parte dei pescatori chiese l’autorizzazione al sistema “ferrettara”. Si trattava comunque di una rete da posta derivante, che rispetto alla “spadara” presentava caratteristiche dimensionali e d’impiego differenti, quali lunghezza non superiore ai 2 chilometri e una maglia della rete non superiore a 150 mm. Il 10/06/2004 il Ministero delle Politiche Agricole ha pubblicato un Decreto Ministeriale, “disciplina delle reti da posta”, al fine di procedere ad una definizione chiara delle caratteristiche tecniche, specificando che la superficie complessiva della rete non deve essere superiore a 20000 mq. (art.2). In ogni caso, la cattura del pesce spada effettuata con l’impiego di attrezzi fissi sembrerebbe garantire una discreta selettività, in quanto, il limitato sviluppo in altezza della rete stessa riduce drasticamente il rischio di cattura di specie non bersaglio.

Il pesce spada Mediterraneo

Recenti risultati elaborati durante l’ultimo convegno ICCAT¹ hanno dimostrato che il pesce spada mediterraneo fa parte di un unico stock separato dall’Atlantico. Nonostante le informazioni sulle linee di confine siano ancora incerte, l’area di separazione sembra essere all’altezza dello Stretto di Gibilterra. In ogni caso è ormai accettata la teoria per cui tra i due stock non ci siano rimescolamenti. Inoltre, in accordo con i dati Iccat (ICCAT, 2008), il pesce spada mediterraneo presenta caratteristiche biologiche distinte da quello atlantico. In particolare il tasso di crescita è differente e la maturità sessuale è raggiunta ad un’età più giovane rispetto a quello atlantico. I livelli di cattura del pesce spada mediterraneo sono rimasti piuttosto stabili negli ultimi anni, fluttuando tra 12.000 e 16.000 t di pesce (Fig. 2-9). Questi valori sono relativamente alti e simili a quelli riferiti ad aree di pesca più estese come quella atlantica. Questo potrebbe essere dovuto agli alti valori di reclutamento nel Mar Mediterraneo rispetto all’Oceano Atlantico, alle differenti strategie riproduttive (es. alto rapporto tra aree di riproduzione e area di distribuzione dello stock) o alla ridotta abbondanza di grandi predatori

¹ The International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas. Organizzazione inter-governativa di pesca per la tutela di tonni e altri grandi pelagici dell’Atlantico e mari adiacenti

pelagici (es. squali) nel Mediterraneo. I paesi mediterranei che hanno maggior impatto sullo stock di pesce spada sono, in ordine di tonnellate sbarcate: Grecia, Italia, Spagna e Marocco. Seguono Algeria, Cipro, Malta, Portogallo, Tunisia e Turchia. Catture più ridotte ma sempre consistenti sono dovute a: Albania, Croazia, Francia, Giappone e Libia. Ulteriori catture sono dovute a paesi come Egitto, Libano e Siria, di cui però ancora non si hanno dati pubblicati. Due diversi approcci, emersi dall'ultimo convegno Iccat, basati su modelli a lungo e breve termine, hanno fornito previsioni piuttosto negative sulla sostenibilità dello stock mediterraneo. In particolare hanno evidenziato un declino dell'abbondanza del pesce spada nel bacino mediterraneo (Fig. 2-10).

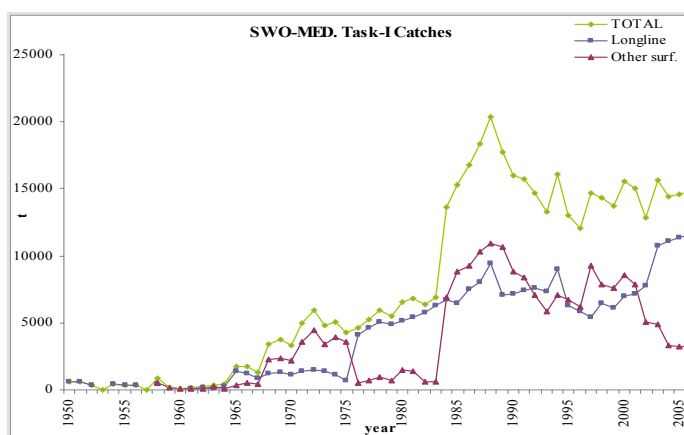


Fig. 2-9 Stima cumulativa delle catture di pesce spada negli ultimi cinquant'anni (in ton.) nel Mediterraneo divisa per metodi di pesca (dati Iccat, 2008)

Il primo approccio, impostato su serie di dati nel lungo termine, ha rilevato come nel 2005 il tasso di cattura fosse il 25% maggiore rispetto al valore considerato “limite” affinché lo stock possa mantenersi ad un livello sostenibile (MSY^1). I risultati di questi modelli indicano che lo sforzo di pesca (F) nel Mediterraneo ha incontrato un periodo di rapida espansione negli anni '80 andando probabilmente a ridurre la biomassa dello stock e superando quindi lo sforzo di pesca sostenibile ($F > F_{MSY}$).

¹ MSY : Maximum Sustainable Yield

MEDITERRANEAN SWORDFISH SUMMARY	
Maximum Sustainable Yield	14,250-15,500 ¹
Current (2005) Yield ²	14,600 t
Current (2007) Replacement Yield	~12,000-14,000 t ¹
Relative Biomass (B_{2005}/B_{MSY})	0.26-0.87 ¹
Relative Fishing Mortality	
F_{2005}/F_{MSY}	1.3 (0.6-2.5) ³
F_{2005}/F_{max}	2.9 (2.4->5) ⁴
$F_{2005}/F_{0.1}$	4.6 (3.7->5) ⁴
$F_{2005}/F_{20\%SPR}$	3.0 (2.6->5) ⁴
$F_{2005}/F_{30\%SPR}$	4.2 (3.6->5) ⁴
Management measures in effect	Driftnet ban (Rec. 03-04) One month fishery closure in 2008 (Rec. 07-01) ⁵
¹ Range indicated is average estimates from production models and age-structured models. The uncertainty in the estimates is broader than indicated.	
² The 2006 reported catch is considered incomplete and too provisional to use in this table.	
³ Based on production model analysis using a long time series of catch effort data for which we have less confidence, range represents approximately 80% confidence region for the model assumptions.	
⁴ Based on age-structured analysis using a shorter times-series of catch effort data for which we have greater confidence, range represents approximately 80% confidence region for the model assumptions.	
⁵ Various technical measures, such as closed areas, minimum size regulations and effort controls are implemented at the national level.	

Fig. 2-10: Quadro riassuntivo dei risultati ottenuti nell'ultimo rapporto Iccat (2008).

Stime dello stato dello stock basate su analisi di popolazioni virtuali che usano serie di dati di cattura e sforzo a breve termine indicano invece una diminuzione del 40% del tasso di deposizione uova e reclutamento negli ultimi 20 anni. Questa riduzione, se non controllata da interventi di abbattimento dello sforzo di pesca, potrebbe trascinare lo stock mediterraneo a livelli drastici di produttività entro una generazione.

3. Parassiti come “bio-indicatori” di stock ittici

Il concetto di “stock”, ormai ampiamente utilizzato nel corso degli studi applicati a specie ittiche, veniva definito fino a qualche tempo fa, nell’ambito delle scienze della pesca, come “*una frazione della popolazione ittica potenzialmente catturabile in una data area*”. Moderne concezioni hanno poi introdotto il concetto di “stock genetico”, rilevando l’importanza dell’identificare e determinare la struttura di uno stock sulla base di analisi genetiche che stimano il flusso genico tra popolazioni intraspecifiche e ne quantificano il loro differenziamento genetico. Allo stato attuale, la definizione di “stock” si basa sull’applicazione di un approccio multidisciplinare. L’utilizzo di marcatori genetico-molecolari (sia nucleari che mitocondriali), dati morfometrici, biometrici e meristici, la tecnica di marcaggio e ricattura, l’applicazione di modelli matematici e statistici e l’uso dei parassiti come “indicatori biologici”, sono tutte metodologie adottate per descrivere in modo “qualitativo e quantitativo” la struttura degli stocks (Bedd & Waldmann, 1999). Sono studi che integrano metodiche basate su differenze genotipiche degli individui e metodiche relative a variazioni biologiche, in grado di descrivere l’evoluzione di una popolazione su base sia temporale che spaziale. Tra gli indicatori biologici, i parassiti occupano uno spazio rilevante. I primi lavori che prevedevano l’utilizzo dei parassiti come “*biological tags*” nello studio della popolazione di organismi marini risalgono ad oltre sessant’anni fa (per una review: Mackenzie, 2002). I parassiti sono stati ampiamente usati per definire diversi aspetti della biologia e dell’ecologia di organismi marini (pesci, mammiferi ed invertebrati) quali ad esempio l’integrità delle reti trofiche, o come indicatori della qualità di ecosistemi marini (Marcogliese, 2005). Tra i vari campi di applicazione dei parassiti come indicatori biologici, quello relativo alla caratterizzazione degli “stock” è uno dei più frequentemente usati nell’ambito degli studi riguardanti specie ittiche d’interesse economico (Williams *et al.*, 1992; (MacKenzie & Abaunza, 1998, 2005; Oliva, 2001; Oliva & Ballon, 2002; Oliva *et al.*, 2008; Timi 2003, 2007), sia specie demersali come il *Merluccius merluccius* che pelagiche come il *Trachurus trachurus* (Mattiucci *et al.*, 2007, 2008). Secondo Mackenzie e Abaunza (1998), il principio secondo il quale alcuni parassiti sono utilizzabili come indicatori di stocks ittici dipende dal fatto che i pesci acquisiscono una specie di parassita solo quando si trovano nell’areale di distribuzione di questa; quindi, dall’esame parassitologico dell’ospite, identificando le specie-parassita presenti e conoscendone sia il ciclo biologico sia la distribuzione geografica, si può dedurre con una buona probabilità la migrazione effettuata da quella popolazione ittica. Per essere considerato un buon “biological tag”, una specie parassita deve avere, secondo Lester & Mackenzie (2008), le seguenti caratteristiche: alti livelli d’infestazione nella specie ospite oggetto di studio in tutto il suo areale di distribuzione; essere una specie specialista; non deve essere eccessivamente patogeno per l’ospite, né causargli comportamenti anomali; essere di facile individuabilità ed identificabilità nell’ospite.

Tra le specie di parassiti solitamente usate come “biological tags”, i nematodi anisakidi del genere *Anisakis* e *Hysterothylacium*, parassiti eteroxeni con cicli biologici complessi, sono stati tra quelli più largamente utilizzati (Mackenzie, 1987; Sindermann, 1990). In particolare, le forme larvali

dei primi e gli stadi adulti dei secondi, soddisfano ampiamente quei parametri che li identificano come ottimi marcatori biologici, in quanto facilmente individuabili e prelevabili durante la dissezione del pesce; possiedono inoltre un elevato adattamento alla specie-ospite (specie-specificità) per cui non sono patogeni e non ne causano morte o comportamenti anomali; i nematodi del genere *Hysterothylacium* inoltre non vengono eliminati dal pesce spada, in quanto si localizzano nelle cavità viscerali, in particolare nello stomaco, o si incistano sulla parete esterna degli organi interni, determinando invece un processo di “bioaccumulo” durante la vita dell’ospite. Le metodologie applicate a studi di questo genere, affiancano sia metodologie genetico-molecolari, che permettono l’identificazione a livello di specie dei suddetti nematodi, sia analisi statistiche multivariate sulla parassito fauna reperita ed identificata.

4. I metalli pesanti

All'interno delle innumerevoli sostanze tossiche che si trovano all'interno dell'ambiente marino, i metalli pesanti rappresentano una delle categorie maggiormente studiate e controllate. Piombo (Pb), Mercurio (Hg), Cadmio (Cd) e Zinco (Zn) sono tra gli elementi non essenziali, fatta eccezione per lo zinco, che più di tutti hanno valore nel fornire dati di interesse ecotossicologico. È ormai noto che nel corso delle ultime decadi, le quantità di contaminanti immessi nell'ambiente dall'uomo, in particolare nel Mar Mediterraneo, sono andate sempre più aumentando, fino a raggiungere livelli di allerta che hanno richiesto studi approfonditi (es EMEP European Monitoring and Evaluation Programme) e interventi legislativi significativi (vedi box1).

Box 1

Iniziative volte a controllare ed eliminare l'inquinamento nella regione mediterranea.

Protocollo LBS: Protocollo relativo alla protezione del Mar Mediterraneo dall'inquinamento di origine tellurica adottato il 17 maggio 1980, entrato in vigore il 17 giugno 1983 e modificato il 7 marzo 1996. La versione modificata non è ancora entrata in vigore.

SAP: il piano d'azione strategico, adottato nel 1997, è un'iniziativa orientata all'azione nell'ambito del programma PAM/MEDPOL, che individua le principali categorie di sostanze e attività che devono essere eliminate o controllate da parte dei paesi mediterranei. Ciò deve essere fatto seguendo un calendario preciso per l'attuazione di misure e interventi specifici. Il programma SAP/MED costituisce il fondamento per l'attuazione del protocollo LBS da parte dei paesi mediterranei nei prossimi venticinque anni, a partire dal 2001.

NDA: l'analisi diagnostica nazionale è la prima fase nell'elaborazione di un piano d'azione nazionale (NAP) volto a combattere le fonti di inquinamento di origine tellurica. Si tratta di un'analisi integrata dei principali problemi legati alle fonti di inquinamento di origine tellurica nelle zone costiere, compresi i relativi impatti ambientali.

Specie che si trovano all'apice della catena trofica in ambiente marino, come ad esempio *X. gladius* nel Mar Mediterraneo, tendono ad accumulare grandi quantità di questi metalli pesanti all'interno dei tessuti. Inoltre queste specie, in quanto *top predator*, presentano attività metaboliche molto intense, che richiedono continuo supporto energetico. Di conseguenza il loro tasso di predazione e assunzione cibo è estremamente elevato, proprietà questa che contribuisce in modo decisivo all'accumulo di inquinanti nei tessuti. L'accumulo netto di metalli all'interno di un organismo è dato dalla differenza tra "assorbimento" ed "escrezione" (Canli & Atli, 2003).

I metalli pesanti nell'ambiente marino mediterraneo

Tutti i metalli come il cromo, il cadmio, il mercurio, il nichel, il piombo e l'arsenico sono inquinanti naturali. Vi sono zone sulla superficie terrestre il cui valore di fondo di questi metalli è naturalmente più elevato che in altre zone, con conseguente contaminazione di fondo della fauna e della flora locali. Da un punto di vista geochimico ad esempio, all'interno del Mar Mediterraneo ricadono vaste aree di anomalie mercurifere (Bernhard & Brondi, 1986). Queste anomalie rappresentano zone ad alta concentrazione di mercurio, solitamente associate a regioni di elevato

interesse minerario, che rappresentano la manifestazione più appariscente (livello III in Fig. 4-1) di vastissime aree anomale (II) rispetto alla condizione di fondo (I). Fenomeni di erosione e lisciviazione trasportano questi contaminanti direttamente nell'ambiente oceanico attraverso il sistema fluviale. Si ritiene che gli apporti di mercurio ai sedimenti della piattaforma siano principalmente dovuti agli apporti dei sedimenti fluviali delle aree generalmente anomale, nei quali le particelle sottili contengono in partenza elevate concentrazioni di tal elemento. In zone come quelle descritte (Fig. 4-2), solitamente oggetto di attività minerarie, le concentrazioni di mercurio sono considerate come dovute a fatti naturali, anche se l'attività estrattiva spesso rimette a disposizione dell'ambiente quantità di mercurio che altrimenti resterebbero isolate nel suolo. Le anomalie maggiori nel bacino del Mediterraneo sono quella del Monte Amiata, quella di Smirne e Konya in Turchia, le anomalie algerino-tunisine e quelle di Almaden in Spagna. Altre anomalie simili ma non manifestate da mineralizzazioni sono comunque probabilmente presenti.

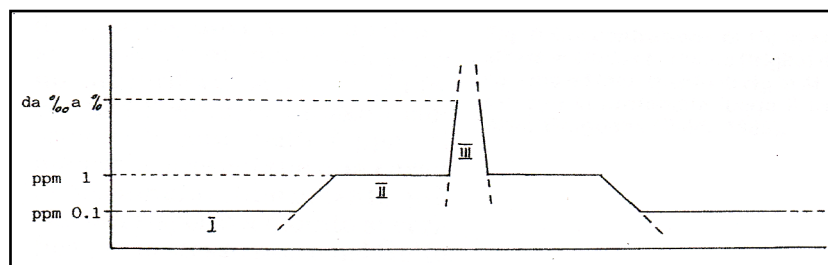


Fig. 4-1: Schematizzazione dei livelli di concentrazione che caratterizzano la situazione di fondo (I), le situazioni di anomalia mercurifera (II) e gli accumuli eccezionali corrispondenti alle mineralizzazioni (III)

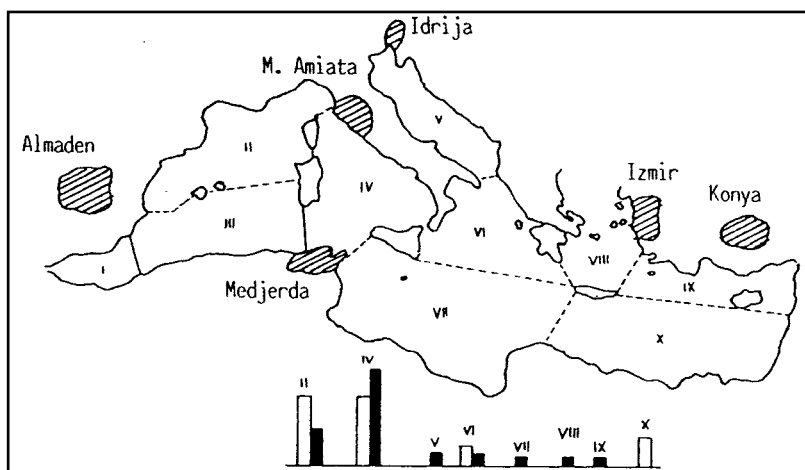


Fig. 4-2: Posizione delle anomalie mercurifere nel bacino mediterraneo con le rispettive aree di accumulo (da Bernhard & Brondi, 1986). Gli istogrammi sono relativi ai contenuti di Hg nella triglia (*Mullus barbatus*) e nello scampo (*Nephrops norvegicus*), risultati da uno studio di (Nauen et al., 1980).

Il Mar Mediterraneo inoltre è un bacino semichiuso e circondato da paesi tra i più popolati e industrializzati al mondo fin da tempi antichi. Questo comporta un tasso d'inquinamento da composti tossici costante nel tempo e nello spazio. Per questi motivi i grandi pelagici mediterranei come tonno e pesce spada possono presentare diversi livelli di accumulo di metalli pesanti rispetto alle popolazioni

atlantiche (Storelli *et al.*, 2005). Una componente significativa dei metalli pesanti presenti nell'ambiente marino mediterraneo è dovuta all'immissione diretta, nelle acque costiere, delle discariche urbane e degli scarichi industriali (Fig. 4-3).

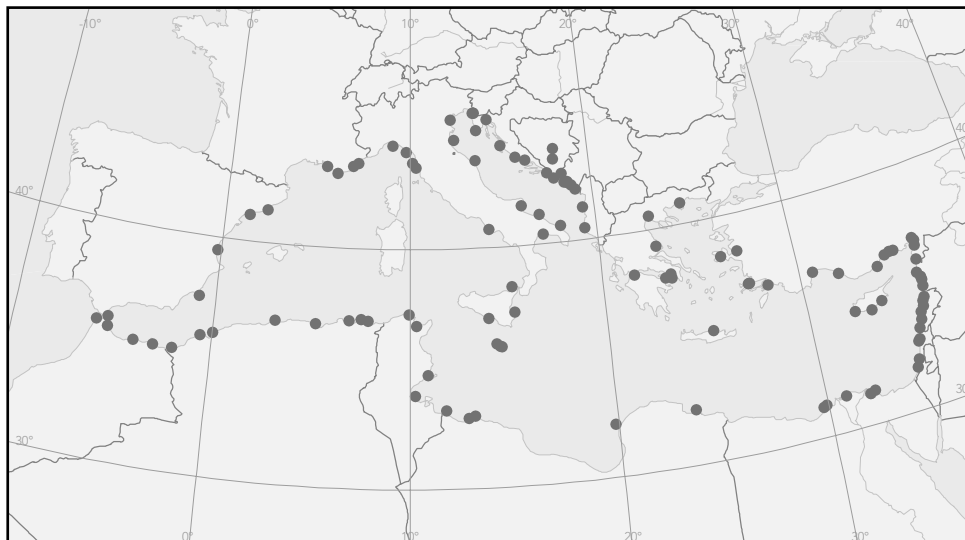


Fig. 4-3: Aree critiche con problemi di inquinamento lungo la costa mediterranea (dati HCMR)

Da anni la Comunità Europea, nella figura dell'EFSA¹, sta svolgendo un'indagine riguardo alla distribuzione e all'accumulo dei principali metalli pesanti nel pescato, con particolare attenzione alle specie di elevato valore commerciale quali salmone, aringa, acciuga, tonno, pesce spada, sgombero, trota e carpa. Oltre ai composti organici persistenti quali PCB, diossine, etc (Severino & Anastasio, 2006), anche alcuni metalli quali piombo, cadmio e, in particolare mercurio possono destare preoccupazioni per il consumatore in virtù della loro capacità di bioaccumulare e biomagnificare lungo la catena trofica.

Piombo

Il principale meccanismo che regola le concentrazioni di piombo nell'ambiente acquatico è l'assorbimento da parte di sedimenti o particolato (argille). Molto diffuso in natura, il **piombo** è solitamente rilasciato in atmosfera dalle industrie di smalti e vernici, durante i processi di fusione dell'acciaio, di combustione dei carburanti fossili, e, fino a non molto tempo fa, della benzina. Dagli anni novanta ha avuto una riduzione grazie agli interventi di riduzione sostenuti dalla CE.

¹ European Food Safety Authority

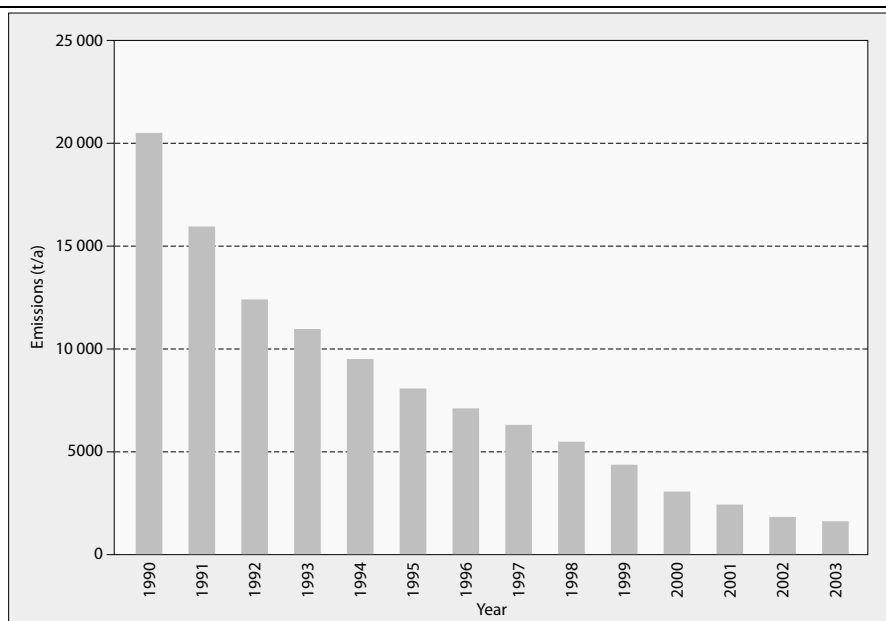


Tabella 4-1: Emissioni di Piombo nei 24 paesi delle regioni EMEP (dati WHO, 2007)

In mare giunge per effetto del dilavamento superficiale del suolo, anche se il contributo maggiore è attribuibile alle ricadute atmosferiche (*fall-out*). Negli ultimi anni, l'assunzione di tale contaminante per via alimentare è in diminuzione a seguito delle misure preventive intraprese a vari livelli.

Principali effetti sull'uomo: • Rottura della biosintesi di emoglobina e dell'anemia • Aumento nella pressione sanguigna, danni ai reni • Aborti, diminuzione di fertilità negli uomini con danni allo sperma • Danni al sistema nervoso e cerebrali • Disturbi comportamentali nei bambini, aggressività, iperattività, diminuzione delle capacità di apprendimento	Principali effetti sui pesci: • Disturbo delle funzioni metaboliche • Neurotossicità • Danni ai tessuti renali • Danni al sistema immunitario
---	---

Cadmio

Per quanto riguarda il **cadmio**, il 50% di tale metallo presente nel mare proviene dalle attività antropiche.

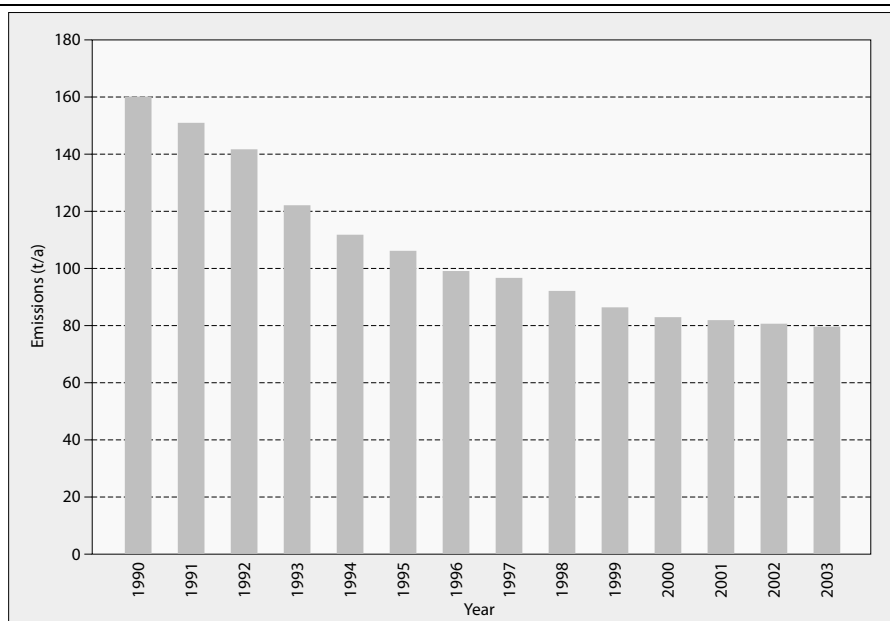


Tabella 4-2: Emissioni di Cadmio nei 24 paesi delle regioni EMEP (dati WHO, 2007)

Le principali fonti di contaminazione sono le attività minerarie, le industrie metallurgiche, l'uso di fertilizzanti prodotti con fosfati di origine minerale, le industrie di vernici e smalti e le industrie della galvanoplastica (WHO, 2007). Nelle acque marine si riscontra abbondantemente la presenza di ioni cadmio che formano complessi piuttosto stabili con gli ioni cloro. I molluschi tendono ad accumulare il cadmio in quantità notevolmente superiori agli altri organismi; ciò nonostante la catena alimentare acquatica ha un impatto limitato per il consumatore, salvo casi particolari e abitudini alimentari speciali. Nell'ambiente acquatico il cadmio viene trasferito dai sedimenti e si concentra specialmente nel fitoplancton, nelle macrofite e di conseguenza nei crostacei e nei molluschi. Nei pesci i fattori di accumulo sono più bassi e il metallo si concentra principalmente nel rene e in porzioni non edibili per il consumatore come le branchie e l'epatopancreas (Demirak *et al.*, 2006).

Principali effetti sull'uomo: • Diarrea, mal di stomaco e vomito • Problemi riproduttivi e di infertilità • Danni al sistema nervoso centrale • Danni al sistema immunitario, al DNA • Sviluppo del cancro • Disordini psicologici	Principali effetti sui pesci: • Danni epatici e intestinali • Danni al sistema nervoso • Danni al sistema immunitario
--	--

Mercurio

Il **mercurio** è un metallo pesante la cui presenza nell'ambiente è sia di origine naturale che antropica. Gli effluenti più pericolosi sono quelli dell'industria cartiera e degli impianti cloro-soda.

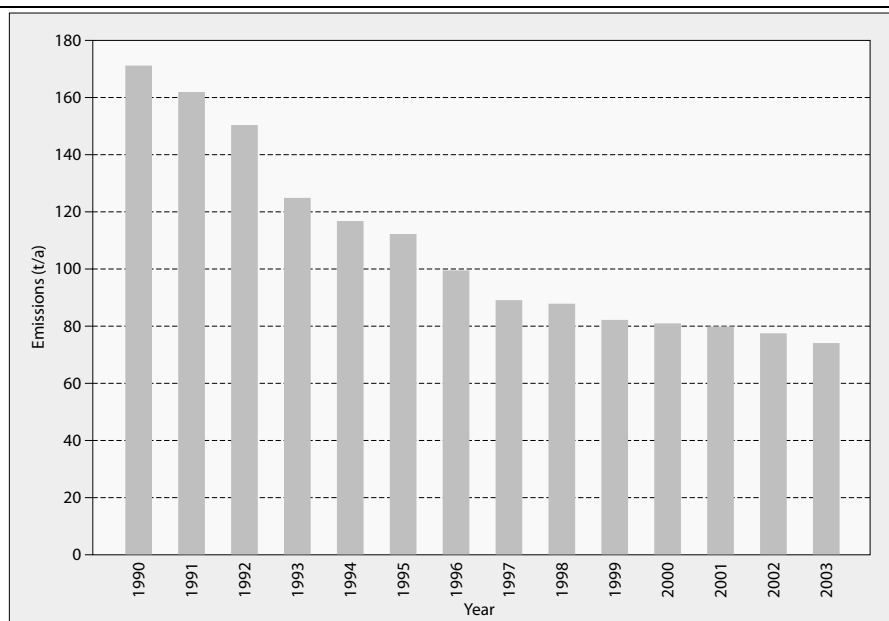


Tabella 4-3: Emissioni di Mercurio nei 24 paesi delle regioni EMEP (dati WHO, 2007)

Visto l'impatto diretto sulla catena alimentare, l'utilizzo industriale di mercurio è stato notevolmente ridotto (es. nel campo elettronico e farmaceutico) mentre è stato completamente bandito dal settore agricolo (ta. 4-3). La sua presenza nell'ambiente marino è tuttavia ancora elevata, data la sua persistenza nei sedimenti argillosi (Bernhard & Brondi, 1986). Qui subisce la trasformazione in composti organici, come il metilmercurio, ad opera di microrganismi negli strati superficiali dei sedimenti. Il metilmercurio entra nella catena alimentare attraverso il plancton, passa negli invertebrati e nei pesci situati ai più bassi livelli della catena trofica per accumularsi poi nei grandi predatori che si trovano al top (Storelli *et al.*, 2005).

Principali effetti sull'uomo: • Distruzione del sistema nervoso • Danneggiamento delle funzioni cerebrali • Danni al DNA e danni cromosomici che possono causare mongolismo • Reazioni allergiche, che risultano in chiazze cutanee, stanchezza ed emicranie	Principali effetti sui pesci: • Danni ai reni, • Danni alle pareti dello stomaco e dell'intestino • Problemi riproduttivi • Alterazione del DNA
--	---

Lo stato attuale

La tossicità di piombo, cadmio e mercurio nell'uomo si manifesta, come descritto precedentemente, in primo luogo a carico di rene, fegato e sistema nervoso; in particolare il metilmercurio, se assunto da donne durante il periodo della gravidanza, compromette in maniera irreversibile lo sviluppo del sistema nervoso del feto (Counter & Buchanan, 2002; Prasher, 2009). In

allegato 1 vengono riportati i valori limite imposti dalla Comunità Europea per le concentrazioni dei metalli pesanti nel pescato. I primi studi incentrati sui metalli pesanti nei grandi pelagici del Mediterraneo furono effettuati poco meno di dieci anni fa (Fossi *et al.*, 2001; 2004; Kalay *et al.*, 1999). Fossi *et al.* (2001) avevano sondato gli effetti di organo clorurati e metalli in traccia (Hg, Pb e Cd) nel pesce spada mediterraneo, evidenziando come le elevate concentrazioni riscontrate potessero comprometterne le capacità riproduttive. Indagini successive condotte più recentemente da Storelli *et al.* (2005) sul pesce spada hanno evidenziato presenza di piombo, cadmio e mercurio nei tessuti, con concentrazioni che rientrano nei limiti di sicurezza imposti dalla CE. In uno studio comparativo tra tonno e pesce spada, gli Autori riscontrarono basse concentrazioni dei metalli nei tessuti a peso umido (Hg=0.07 μ g/g, Cd = 0.005 μ g/g, Pb = 0.05 μ g/g.). Papetti & Grossi (2009) invece, durante un lavoro di campionamento su due aree di pesca del Tirreno, hanno trovato alti valori di piombo nel pesce spada di Terracina (Pb=0.979 $\pm$ 0.011 mg/kg), superando i limiti CE. Non hanno riscontrato invece concentrazioni pericolose di Hg e Cd (Hg=0.0144 $\pm$ 0.002 mg/kg, Cd=0.1501 $\pm$ 0.023). In generale tutti i lavori portati avanti finora sui livelli di accumulo da metalli pesanti nei grandi pelagici mediterranei hanno evidenziato una situazione di allerta sia per lo stato di salute delle popolazioni, sia sui rischi per il consumo umano.

5. Materiali e metodi

Sono stati esaminati in totale 276 esemplari di *Xiphias gladius*, di diversa taglia e provenienti da diversi siti di raccolta del Mediterraneo e dell'Oceano Atlantico. La Tabella 5-1 mostra il numero degli esemplari esaminati per ogni stazione di campionamento. Il materiale proveniente dall'Atlantico è stato campionato dal Dottor Miguel N. Santos (Istituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (CRIPSUL-IPIMAR, Olhão, Faro, Portugal), nell'ambito della collaborazione istituita con il DECOS e il DSSP.

Area di campionamento	Codice	N	Località di sbarco del pescato	Metodo di cattura
Mar Ionio	IOS	54	San Cesareo	Palangaro derivante
Mar Tirreno Meridionale	STS	49	Marina di Camerota Messina	Palangaro derivante Pesca con arpione
Mar Tirreno Centrale	CTS	85	Civitavecchia Isola di Ponza	Attrezzature sportive Palangaro derivante
Atlantico Nord-occidentale	NWA	42	Isole Azzorre	Palangaro derivante Palangaro fisso
Atlantico Centro-nord	NCA	46	Isole Azzorre	Palangaro derivante
TOT		276		

Tabella 5-1: Aree di campionamento per *X. gladius* con rispettivi codici, individui pescati (N) e metodi di cattura

Campionamento del pesce spada

Il campionamento è stato effettuato prevalentemente per mezzo di imbarcazioni per la pesca professionale. Al momento della cattura per ogni esemplare si annotava: la data, il sito di cattura (coordinate) e la lunghezza (LJFL¹). Gli esemplari venivano poi esaminati esternamente allo scopo di rinvenire, contare e raccogliere eventuali meso e/o ectoparassiti sulla loro superficie esterna. I crostacei ectoparassiti, quali copepodi della famiglia Pennellidae, venivano rimossi tramite l'uso di pinzette e per le forme strettamente aderenti, venivano effettuate dissezioni del tessuto dell'ospite avendo cura di rimuovere intatti gli organi di attacco del parassita. Prima dell'eviscerazione le cavità del corpo venivano osservate ad occhio nudo al fine di individuare l'eventuale presenza di nematodi anisakidi sulla superficie esterna del fegato, dello stomaco, delle gonadi, dei mesenterici. Gli organi interni (stomaco, apparato gastro-intestinale) e le branchie venivano asportati e congelati a -30°C per un esame accurato presso il laboratorio del DSSP. Da ogni esemplare pescato, venivano inoltre prelevati pezzi di tessuto (muscolo circa 10g) dalla coda o dalla pinna caudale per l'esame genetico e dei metalli pesanti. I tessuti venivano poi conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

¹ Lower Jaw Fork Length: è la distanza tra la parte apicale della bocca (escluso il rostro) ed il centro della coda.

Esame parassitologico

Nella prima fase l'esemplare era sottoposto ad un'attenta analisi delle superfici esterne e della cavità branchiale per la ricerca di ectoparassiti e mesoparassiti eventualmente presenti.

Le branchie, recise nel punto di attacco delle arcate branchiali, erano poste in contenitori sterili contenenti acqua distillata ed esaminate per mezzo di stereoscopio, per la ricerca di monogenei e crostacei ectoparassiti. Ogni branchia veniva raschiata e lavata, per rimuoverne eventuali parassiti e il risultato del lavaggio veniva poi diluito con una soluzione salina fisiologica (0.9% NaCl) ed osservato nuovamente sotto uno stereoscopio.

Ogni porzione del canale alimentare (esofago, stomaco pilorico, intestino, retto) era posta separatamente in grandi vassoi, lavata con soluzione salina (0.9% NaCl), aperta ed esaminata per ricerca di parassiti nel lume, sulle pareti e all'interno di queste ultime. Si raschiava poi contenuto del tubo digestivo per deporlo in capsule di Petri, e successivamente si stemperava con soluzione fisiologica, osservando anch'esso sul fondo scuro e poi al microscopio binoculare. Tutti i parassiti raccolti venivano conservati in bottigliette di vetro contenenti alcool a 70°C, ad eccezione delle forme larvali ed adulte dei nematodi anisakidi (*Anisakis* e *Hysterothylacium*) che venivano lavati in soluzione fisiologica e congelati a -80°C. Su ogni bottiglietta veniva segnato il nome della specie ospite, l'area di provenienza, la localizzazione del parassita ed infine la data dell'esame parassitologico.

Per le forme larvali del genere *Anisakis* e adulte del genere *Hysterothylacium*, non presentano caratteri morfologici tali da consentire la loro identificazione a livello di specie, ma solamente a livello di genere, si è proceduto all'identificazione mediante marcatori genetici (allozimi e mtDNA *cox2*). Le estremità cefaliche e caudali di alcuni esemplari, rimanevano invece montate in lattofenolo per permetterne l'osservazione al microscopio ottico.

MAE (Multilocus Allozyme Electrophoresis)

Le ricerche sulla struttura genetica dei nematodi anisakidi hanno permesso di individuare e caratterizzare geneticamente numerose specie di *Anisakis* e *Hysterothylacium* (Mattiucci *et al.*, 1986; 1994, 1997; 1998; 2001; 2002; 2005, 2008a, 2008b; Nascetti *et al.*, 1986; Paggi *et al.*, 1998). L'identificazione delle forme larvali del genere *Anisakis* e degli stadi adulti del genere *Hysterothylacium* è possibile solo mediante l'utilizzo dei marcatori genetici ottenuti dall'elettroforesi multilocus, che permettono la loro precisa identificazione a qualsiasi stadio di sviluppo ed in entrambi i sessi. In particolare, i diversi alleli osservati ai loci enzimatici diagnostici quali *Mdh-1*, *Icdh*, *Aat*, *Adk-2*, *Pep B*, *Pep C-1* esistenti nelle specie di *Anisakis* finora studiate, sono stati utilizzati nel presente lavoro per l'identificazione di tutte le larve di *Anisakis* rinvenute (Mattiucci *et al.*, 1997, 2005) (Tab. 5-2). Inoltre l'utilizzo dei marcatori genetici (allozimi) ha consentito di identificare esemplari di *Hysterothylacium* provenienti da tutte le località di cattura del pesce spada. Nello studio

degli esemplari adulti appartenenti al genere *Hysterothylacium*, l'analisi elettroforetica è stata effettuata sulla base dei 17 loci enzimatici di Mattiucci *et al.*, 1994.

Enzima/proteina	Numero di classificazione internazionale	Loci codificanti
Idditolo-deidrogenasi	E.C.1.1.1.14	<i>Iddh</i>
Malico-deidrogenasi	E.C.1.1.1.37	<i>Mdh-1; Mdh-2</i>
Isocitrico-deidrogenasi	E.C.1.1.1.42	<i>Icdh</i>
6-Fosfogluconico deidrogenasi	E.C.1.1.1.43	<i>6Pgdh</i>
Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi	E.C.1.2.1.12	<i>Gapdh</i>
NADH-deidrogenasi	E.C.1.6.99.3	<i>NADH-dh</i>
Superossido dismutasi	E.C.1.15.1.1	<i>Sod-1; Sod-2</i>
Nucleoside fosforilasi	E.C.2.4.2.1	<i>Np</i>
Aspartico-amino transferasi	E.C.2.6.1.1	<i>Aat-2</i>
Adenilato chinasi	E.C.2.7.4.3	<i>Adk-2</i>
Esterasi colorimetrica	E.C.3.1.1.1	<i>cEst-1; cEst-2</i>
Esterasi fluorescente	E.C.3.1.1.1	<i>fEst</i>
Leucinaminopeptidasi	E.C.3.4.11	<i>Lap-1; Lap-2</i>
Peptidasi (Leu-Leu)	E.C.3.4.11	<i>PepB</i>
Peptidasi (Leu-Ala)	E.C.3.4.11	<i>PepC-1; PepC-2</i>
Mannosio-fosfato isomerasi	E.C.5.3.1.9	<i>Mpi</i>
Glucosio-fosfato isomerasi	E.C.5.3.1.9	<i>Gpi</i>
Fosfoglucomutasi	E.C.4.5.2.2	<i>Pgm-1; Pgm-2</i>

Tabella 5-2: Enzimi nell'identificazione dei nematodi anisakidi studiati e rispettivi loci codificanti

Con l'utilizzo dei complessi enzima/proteina riportati in tab. 6-2, l'analisi elettroforetica è stata condotta seguendo le procedure di Richardson *et al.*, 1986. La migrazione elettroforetica avveniva in cella termostata alla temperatura di +5°C. Le soluzioni per la colorazione erano solidificate con agar 0.8% in soluzione tampone tris-HCL 0.05M pH=8, oppure usate allo stato liquido. I gels colorati venivano poi incubati alla temperatura di +37°C fino alla comparsa delle bande.

Analisi del gene della *cox2* (mtDNA)

Il DNA mitocondriale (mtDNA) è un marcatore che si è rivelato molto efficace per lo studio delle strutture genetiche di popolazioni animali e della filogenetica, presentando caratteristiche particolari come l'alto tasso di mutazione, l'assenza di ricombinazione, l'ereditarietà materna e l'assenza di introni (Gyllensten *et al.*,1985). Negli eucarioti quasi tutto il DNA si trova nel nucleo, tuttavia una porzione di DNA è presente nei mitocondri. In media il citoplasma di una cellula contiene migliaia di mitocondri e ognuno di essi contiene 1-2 molecole di DNA (talora fino a 5). Le molecole di mtDNA vengono ereditate secondo la divisione del citoplasma, per cui ciascun mitocondrio si ritroverà in una delle due cellule figlie a seconda della posizione che occupa rispetto al piano della citodieresi.

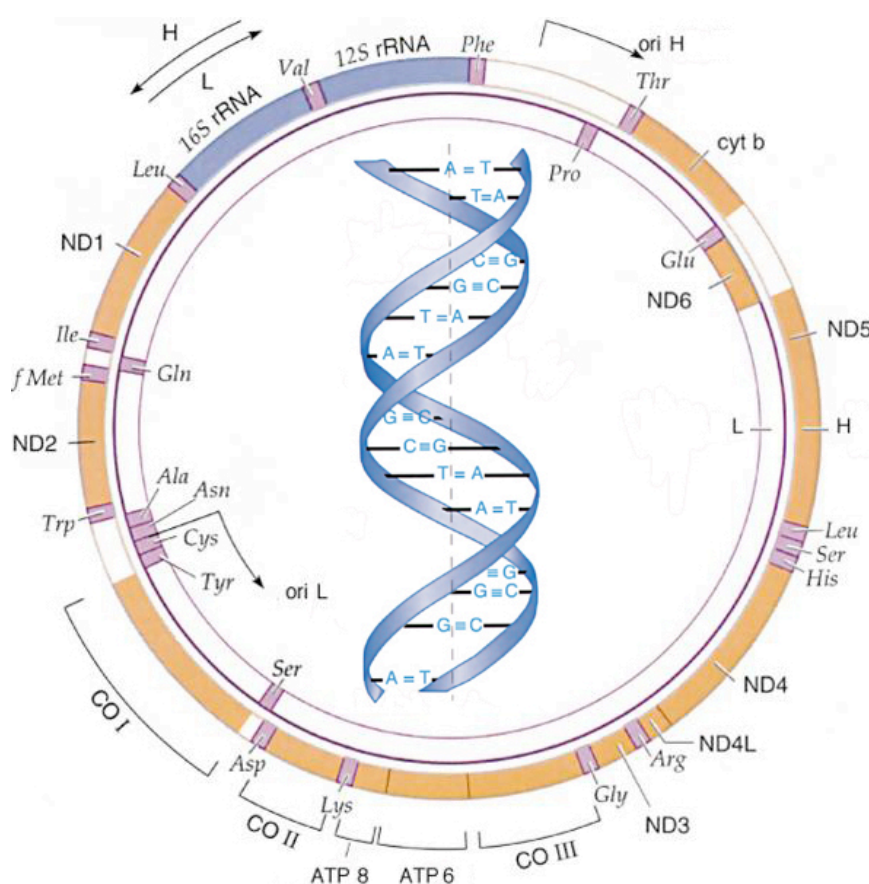


Fig. 5-1: Rappresentazione schematica della molecola di DNA mitocondriale (ipvgen.unipv.it)

I mitocondri di un individuo derivano tutti dai mitocondri della madre, in quanto si ritiene che al momento della fecondazione i mitocondri presenti nello spermatozoo non entrano nel citoplasma ovulare (Gyllensten *et al.*,1985). Per questa ragione si parla di "ereditarietà matrilineare", un tipo di trasmissione del materiale genetico che procede attraverso la linea materna. I geni mitocondriali possiedono quindi alcune caratteristiche che li differenziano in modo netto dai geni nucleari: 1) assenza di introni, per cui la gran parte delle basi nei geni mitocondriali è effettivamente codificante;

2) ridotte dimensioni, per cui i geni mitocondriali sono estesi al massimo per circa 1.000 bp; 3) presenza di geni sovrapposti sullo stesso filamento, per cui le stesse basi vengono utilizzate per codificare amminoacidi differenti, a seconda del punto di inizio della traduzione. Queste caratteristiche del genoma mitocondriale lo rendono suscettibile a mutazioni relativamente frequenti e quindi molto utile negli studi di identificazione genetica di specie, in particolare nematodi anisakidi (Valentini *et al.*, 2006). Anche se statisticamente queste mutazioni dovrebbero essere rare considerando la ridotta estensione della molecola, l'alta percentuale di basi codificanti fa sì che un cambiamento casuale di sequenza riguardi con maggiore probabilità una base codificante, e quindi più facilmente possa avere un effetto sul fenotipo.

Il DNA totale è stato estratto secondo il metodo CTAB/fenolo-cloroformio descritto da Murray & Thompson (1980). Per ogni individuo è stata analizzata una quantità di circa 200 mg di tessuto. La soluzione ottenuta è molto eterogenea contenendo molecole sia di DNA che di RNA, di lunghezza e provenienza diverse (DNA nucleare e mitocondriale, RNA di varia natura). Tale soluzione di acidi nucleici viene successivamente sottoposta alla tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction). La reazione a catena della DNA polimerasi (Saiki *et al.*, 1988) permette sia l'amplificazione selettiva di porzioni specifiche di DNA mediante l'utilizzo di opportuni oligonucleotidi d'innesco (primers), sia la produzione di un elevatissimo numero di copie del prodotto desiderato.

La disponibilità di un alto numero di copie di un frammento rende possibile sia la visualizzazione mediante tecniche non specifiche (come il bromuro di etidio, il silver staining, il gel red), molto più economiche e di più sicura manipolazione rispetto ai metodi basati su onde radioattive specifiche, sia il sequenziamento di tale frammento. La PCR costituisce pertanto una valida alternativa alle tecniche di clonaggio del DNA.

In questo studio È stato amplificato un frammento di mtDNA utilizzando due coppie di primers; in particolare, È stato amplificato un frammento interno del gene della cox-2 ottenuto dalla combinazione dei due primers ripresi da Nadler & Hudspeth (2000), 211F (5'-TTT TCT AGT TAT ATA GAT TGR TTY AT-3') e 210R (5'- CAC CAA CTC TTA AAA TTA TC-3'); la PCR ha permesso di amplificare un frammento di DNA lungo 519 paia di basi. La reazione di PCR è stata realizzata utilizzando un Thermal Cycler Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) in 50 µl di soluzione con: 5-20 ng di DNA totale, 2,5 µl di Taq polymerase (Promega) con il tampone di reazione fornito dal produttore, 0,2 µl di ciascun primer, 5 µl di MgCl₂ (2,5 mM) e 1 µl di dNTP (0,2 mM) e 1µl di DMSO (dimetilsolfossido). Il programma di reazione, per la regione amplificata, è il seguente:

Fase iniziale di 4 minuti a 94°C (per garantire la completa denaturazione di tutto il DNA a doppio filamento inizialmente presente)

35 cicli costituiti da 1' a 94°C (fase di denaturazione)

1' a 50°C (annealing)

1' a 72°C (estensione)

Un ciclo di 10' a 72°C (per permettere il completamento dell'attività di sintesi dei frammenti incompleti eventualmente ancora presenti).

Il prodotto di reazione è stato controllato sottoponendo 5 μ l dello stesso a migrazione elettroforetica su gel di agarosio al 2% in TBE (0,045 M tris-borato; 0,001 M EDTA, pH 8) contenente 3 μ l di GelRed. Quest'ultimo si intercala alle basi di DNA e risulta fluorescente quando è posto su una sorgente di luce ultravioletta di opportuna lunghezza d'onda. I frammenti di DNA appaiono, quindi, come bande luminose sullo sfondo scuro del gel. Le dimensioni del frammento possono essere stabilite in maniera approssimativa facendo migrare nello stesso gel un marcatore di peso, ovvero una miscela di frammenti di DNA di lunghezza nota.

I prodotti di PCR degli individui saggiati sono stati successivamente spediti alla ditta MacroGen Inc. in Korea dove sono stati purificati e quindi sequenziati. Il principio del sequenziamento automatico è una modificazione del sequenziamento descritto da Sanger *et al.* (1977), basato sulla terminazione controllata della replicazione enzimatica in vitro del DNA. La reazione risulta essere analoga alla PCR sopra descritta, ma con l'utilizzazione di un solo primer, viene sintetizzato un solo filamento usando l'altro come stampo (templato); di conseguenza non si verifica un aumento esponenziale del prodotto, caratteristico della PCR. Sono stati utilizzati gli stessi primers della reazione di PCR (211F e 210R per le sequenze del gene della *cox-2*). Per ogni campione entrambi i filamenti vengono sequenziati in modo da effettuare un accurato controllo della lettura della sequenza mediante la procedura dell'allineamento e del controllo reciproco da cromatogramma.

Le sequenze sono state controllate direttamente dal cromatogramma per entrambi i filamenti mediante il programma CHROMAS versione 2.01 (McCarthy-Technelysium Pty. Ltd., 1998-2005) e successivamente sono state allineate con il programma Clustal X versione 1.81 secondo le procedure di Thompson *et al.* (1997).

Parametri epizootologici

La valutazione dei livelli di infestazione parassitaria di ciascuna area di campionamento è stata calcolata mediante i parametri descritti da Rosza *et al.* (2000), di seguito riportati:

Prevalenza (P), espressa usualmente in percentuale, è data dal rapporto tra il numero totale di ospiti parassitati ed il numero totale di ospiti esaminati.

Abbondanza (A), espressa come il rapporto tra il numero totale di esemplari di una specie parassita ritrovati nel campione della specie ospite, e il numero di ospiti esaminati.

Intensità media (I_m), esprime il rapporto tra il numero totale di esemplari di una specie parassita ritrovata nel campione della specie ospite e il numero di ospiti parassitati da quella specie.

Analisi statistiche: le differenze statistiche nei valori di Prevalenza sono state assegnate mediante l'utilizzo del test del χ^2 come suggerito da Rosza *et al.* (2000) con un livello di significatività per $p < 0.05$. La significatività delle differenze nei valori di Intensità media è stata invece calcolata con il test di Kruskal-Wallis sempre secondo Rosza *et al.* (2000). Anche in questo caso sono state considerate significative le differenze con $p < 0.05$. Il coefficiente di correlazione di Spearman (r_s) è stato utilizzato per valutare la significatività della correlazione tra l'età dell'ospite ed i valori di Prevalenza e Intensità media delle infestazioni parassitarie (intervallo di confidenza al 95%). Le analisi statistiche multivariate (MDS e PCA) sono state effettuate mediante l'utilizzo del software PAST : Paleontological Statistics Software (Hammer *et al.*, 2001).

Diversità: l'indice utilizzato per la valutazione della diversità biologica è l'*indice di Simpson* (Simpson, 1949).

$$H_s = 1 - \sum (p_i)^2, \text{ dove }^1$$

Similarità: è stato applicato l'*Indice di Jaccard* (Southwood, 1978) che permette di effettuare confronti qualitativi tra le diverse aree di raccolta.

$$J = j / (a + b - j), \text{ dove }^2$$

Analisi dei metalli pesanti

Preparazione del campione

L'analisi dei campioni per i metalli pesanti è stata eseguita presso il Laboratorio di Merceologia dell'Università degli Studi di Cassino. Una volta in laboratorio, il tessuto (muscolo) veniva prima omogeneizzato e essiccato in forno a 105°C per 5 ore. La mineralizzazione è stata effettuata attraverso il metodo umido seguendo le procedure di Papetti & Rossi (2009). 0.2-0.3 g peso secco di tessuto venivano ridotti in 3 ml di HNO₃ (65%) e 0.5 ml di H₂O₂ per 6-8 ore rispettando il metodo FAO (Yilmaz 2003). Dopo il raffreddamento, il prodotto risultante era portato a volume 10 ml. I campioni così preparati venivano poi analizzati allo spettrometro ad assorbimento atomico a fornello di grafite (HGA 500) per il Pb e Cd e allo spettrometro ad assorbimento atomico a generazione di idruri (FIAS³) per il Hg. Le concentrazioni dei metalli pesanti è stata espressa in milligrammi per chilo peso umido (mg/Kg wet wt). La calibrazione è stata effettuata utilizzando le apposite diluizioni di stock solution di Pb, Cd e Hg (1000 ppm). Per ogni campione sono state effettuate cinque ripetizioni

¹ $p = N_i / N$; N_i = numero di parassiti nel campione che appartiene alla specie i ; N = numero totale di parassiti del campione;
 S = numero di specie totali presenti nel campione.

² a = numero di specie nell'habitat A; b = numero di specie nell'habitat B; j = numero di specie comuni ai due habitat.

³ Flow Injection Analysis Sistem

con relativo calcolo di Deviazione Standard (SD) e Deviazione Standard Percentuale (RSD%). Per garantire l'accuratezza del metodo, le stesse analisi sono state effettuate su campioni controllo certificati (IEAE-407) con un valore di recupero del 95% del metallo analizzato. Per la determinazione dei metalli pesanti sono stati applicati i fattori di conversione secco-umido riferito al pesce cotto ($f_{wd} = 0,6$) come richiesto dal D.M. del 9 dicembre 1993.

Spettrofotometria ad Assorbimento Atomico (AAS)

La spettrofotometria di assorbimento atomico si basa sull'assorbimento, da parte degli atomi degli elementi, di alcune radiazioni di una determinata lunghezza d'onda. L'assorbimento atomico, seguito da un processo di rilassamento che avviene per via non radiante (termica) o radiante (emissione di radiazioni), è direttamente proporzionale all'intera popolazione di atomi presenti nel cammino ottico e quindi alla concentrazione dell'elemento nel campione. Lo spettrometro per assorbimento atomico funziona per emissione di un raggio che attraversa il sistema di atomizzazione (Fig. 5-2), dove è contenuto il campione analita allo stato di gas atomico, e arriva al monocromatore (M), che elimina le radiazioni che non interessano. Infine la radiazione monocromatica passa al rivelatore (R). La luce dalla sorgente viene modulata mediante un chopper. La modulazione viene fatta in modo da distinguere la luce emessa dalla lampada dalla luce emessa dall'atomo eccitato.

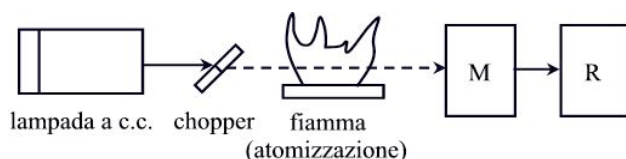


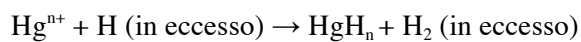
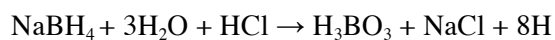
Fig. 5-2: Rappresentazione schematica del funzionamento di uno spettrometro ad assorbimento atomico

Misura del Piombo e Cadmio (Assorbimento atomico a fornetto di grafite)

Il sistema di atomizzazione è un a fornetto di grafite. Si tratta di un sistema che consente di abbassare notevolmente (1000 volte) i limiti di rilevabilità rispetto ai metodi classici da atomizzazione a fiamma, consentendo di lavorare su aliquote molto piccole di campione. Un piccolo volume di campione viene introdotto nel tubo di grafite che si trova posto sul cammino ottico della radiazione emessa dalla sorgente. Nel tubo fluisce un gas inerte, che espelle l'aria rendendo l'atmosfera non ossidante e quindi adatta a far rimanere gli atomi del campione allo stato fondamentale. Il tubo viene riscaldato elettricamente secondo un programma a tre stadi (evaporazione, incenerimento, atomizzazione) condotti a temperature crescenti. La misura di assorbimento viene fatta sui vapori atomici che si liberano rapidamente nello stadio finale del riscaldamento. Il segnale che si ottiene è un picco la cui area (altezza) è direttamente proporzionale alla massa dell'analita. Per l'analisi del Piombo è stata utilizzato una linea di assorbimento di 283.3 nm, mentre per il Cadmio 228.8 nm.

Misura del Mercurio (Assorbimento atomico a generazione di idruri)

La tecnica si basa sul sistema di campionamento a idruri volatili. Gli idruri di mercurio sono preparati per reazione con boro idrato di sodio (NaBH_4) secondo la reazione seguente:



Gli idruri sono poi trascinati, mediante correnti di Argon, su una fiamma argon-idrogeno. Il segnale è un picco, la cui altezza è direttamente proporzionale alla concentrazione del metallo nel campione. Con questa tecnica i limiti di rilevabilità si abbassano fino al di sotto dei $\mu\text{g/l}$. La linea di assorbimento usata per il Mercurio è 253.7 nm.

6. Risultati

Composizione della fauna parassitaria di *X. gladius*

Nel corso dell'indagine sono state identificate 19 specie di parassiti di *Xiphias gladius* (Tab. 6.1). In tutto sono state riconosciute rispettivamente: due specie di monogenei, una di crostacei, due specie di digenei, tre di cestodi, incluse forme larvali di Tetraphyllidea, una specie di acantocefali, dieci specie di nematodi. I dati ottenuti in questa indagine rappresentano un contributo non solamente alla conoscenza della composizione della fauna parassitaria di *X. gladius* nel Mediterraneo e nell'Atlantico, ma anche alla valutazione dei livelli di infestazione dalle diverse specie parassite rinvenute. Alcune specie sono risultate essere dominanti, cioè presenti con alti livelli di infestazione, nei campioni sia del Mediterraneo che dell'Atlantico. Specie dominanti sono risultate gli ectoparassiti *Tristoma integrum* e *T. coccineum* e gli endoparassiti *Hysterothylacium* spp., *Fistulicola plicatus*. Altre specie sono risultate invece rare, con valori di infestazioni molto bassi come ad esempio gli endoparassiti *Prosorhynchoides* sp., *Hirudinella ventricosa*, *Oncophora melanocephala* e *Bolbosoma* sp. Per alcuni parassiti, come quelli appartenenti ai generi *Prosorhynchoides* e *Bolbosoma*, non è stata possibile l'identificazione a livello specifico, poiché i pochi esemplari disponibili erano in parte danneggiati o si trattava di forme immature, che non possedevano ancora i caratteri morfologici distintivi.

Parassita	r_s	Stadio	Sito di infestazione	Mediterraneo			Atlantico	
				CTS	STS	IOS	NCA	NWA
<i>Tristoma coccineum</i>	-0,64 [^]	A	Be	•	•	•	•	•
<i>Tristoma integrum</i>	-0,92 [^]	A	Bi	•	•	•	•	•
<i>Pennella instructa</i>	1,00 [^]	A	M/Oi	•	•	•	•	•
<i>Prosorhynchoides</i> sp.	-	A	S		•	•		
<i>Hirudinella ventricosa</i>	-0,13 [^]	A	S				•	•
<i>Hepatoxylon squali</i>	0,32 [^]	P	I	•			•	•
Tetraphyllidea	0,91 [^]	P	I	•	•	•	•	•
<i>Fistulicola plicatus</i>	-0,44	A	I	•	•	•	•	•
<i>Bolbosoma</i> sp.	-	C	I				•	
<i>Anisakis paggiae</i> *	-0,12	L ₃	S/Cc					•
<i>Anisakis brevispiculata</i> *	0,47	L ₃	S/Cc					•
<i>Anisakis pegreffii</i> *	0,43	L ₃	S/Cc	•	•	•		
<i>Anisakis simplex</i> (s.s.)*	-0,33	L ₃	S/Cc				•	•
<i>Anisakis ziphidarum</i>	0,48	L ₃	S/Cc					•
<i>Anisakis physeteris</i> *	0,18	L ₃	S/Cc	•	•		•	•
<i>Hysterothylacium incurvum</i> *	0,40 [^]	A	S	•	•	•	•	•
<i>Hysterothylacium corrugatum</i> (s.l)*	-	A	S	•	•	•	•	•
<i>Hysterothylacium petteri</i> *	0,56 [^]	A	S	•		•		
<i>Oncophora melanocephala</i>	0,23	A	S	•	•		•	

*= identificato mediante marcatori genetici

Tab. 6-1: Parassiti rinvenuti nei campioni di *Xiphias gladius* pescati nelle differenti aree, stadio di sviluppo (L=larva; P=pleroceroide; C=cistacanto; A=adulto), coefficiente di correlazione di Spearmann tra la prevalenza e la taglia (r_s , [^]=p < 0,05) e localizzazione nell'ospite (Be=branchia esterna; Bi= branchia interna; M= muscolo; Oi= organi interni; S=stomaco; I= intestino; Cc= Cavità del corpo).

In Tab. 6-1 sono riportate inoltre le informazioni riguardanti gli stadi di sviluppo dei parassiti nel momento in cui è avvenuta l'identificazione e le loro localizzazioni preferenziali all'interno dell'ospite. *Hysterothylacium petteri* e *Proisorhynchoides* sono ritrovamenti nuovi nel pesce spada del mediterraneo.

Nematodi

L'uso dei marcatori genetici (allozimi e mtDNA) ha permesso l'identificazione delle larve di *Anisakis* di Tipo I e di Tipo II e degli adulti di *Hysterothylacium* campionati in *X. gladius* (tab. 6-2). In particolare, sono state raccolte e identificate 610 larve di *Anisakis* e 710 adulti di *Hysterothylacium*, nei campioni del Mediterraneo e dell'Atlantico.

Come già anticipato, le larve di *Anisakis* tipo I e tipo II (*sensu* Berland, 1961) non possono essere identificate a livello specifico mediante microscopio ottico, in quanto mancanti di caratteri morfologici distintivi (Mattiucci & Nascetti, 2006). L'utilizzo dei marcatori genetici, ha permesso l'identificazione a livello di specie delle larve di tipo I e di quelle di tipo II. Le larve di *Anisakis* di tipo I campionate sono state identificate geneticamente come appartenenti alla specie *A. pegreffii*, *A. simplex s.s.* e *A. ziphidarum*. All'interno del gruppo di larve tipo II sono state invece trovate *A. paggiae*, *A. brevispiculata* ed *A. physeteris*. L'infestazione da forme larvali di *Anisakis* nel pesce spada sembrerebbe essere accidentale più che paratenica¹, in quanto il nematode non termina il ciclo vitale, essendo l'ospite un predatore al culmine della catena alimentare. Il pesce spada rappresenterebbe, dunque, un ospite occasionale nel suo ciclo biologico. L'infestazione viene presumibilmente acquisita da questo grande pesce pelagico, tramite la predazione di altre specie ittiche e/o cefalopodi, parassitate dalle larve L3 di *Anisakis*. Le specie *A. pegreffii* ed *A. physeteris* erano state già precedentemente riportate come parassita di *X. gladius* del Mediterraneo, mentre risultano specie nuove per l'ospite *A. paggiae*, *A. brevispiculata* ed *A. simplex (s.s.)*.

Nel caso dei nematodi adulti ritrovati nello stomaco di *X. gladius*, la caratterizzazione genetica ha permesso di identificare a livello di specie tutti gli individui appartenenti al genere *Hysterothylacium* (tab.7.2). In particolare tre specie sono state campionate tre specie: *H. incurvum*, *H. corrugatum (s.l.)* e *H. petteri* (Petter & Maillard, 1987). Quest'ultima specie, morfologicamente descritta da She'enko nel 1991 e ritrovata nel pesce spada dell'Oceano Pacifico, rappresenta un nuovo record per il Mediterraneo.

Monogenei

In tutti i pesci spada analizzati sono stati ritrovati altissimi livelli di infestazione del parassita branchiale *Tristoma* (Fig. 6-1). Due specie di monogenei sono state identificate come appartenenti a

¹un ospite paratenico è un ospite attraverso il quale l'agente è trasferito meccanicamente e nel quale non compie alcuno sviluppo. Il termine viene utilizzato esclusivamente in elmintologia.

questo genere, il *T. coccineum*, che predilige la parete delle lamelle esterne delle branchie; *T. integrum* che tende ad occupare quelle interne (Euzet & Quignard, 1961).

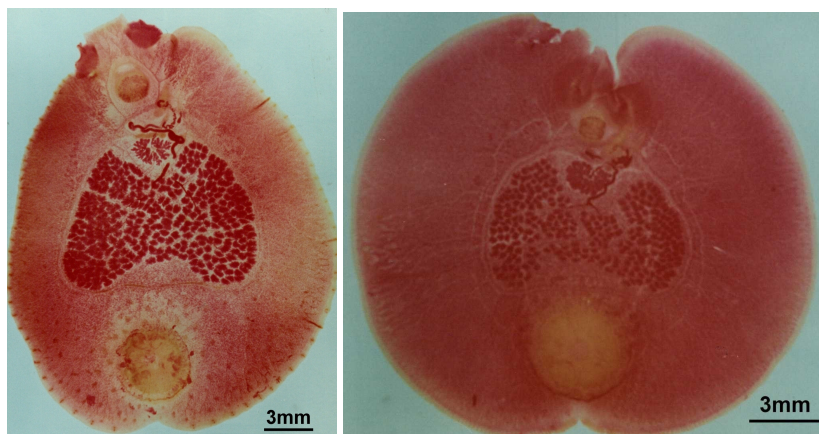


Fig. 6-1: *T. coccineum* e *T. integrum* isolati dalle branchie di *X. gladius*

Questo monogeneo ha presentato in tutti i campioni, una correlazione negativa fra la taglia dell'ospite e l'infestazione (coefficiente di Spearman, $r_s = -0.9$, $P < 0.05$). Gli individui-ospite di taglia più piccola sono risultati maggiormente parassitati, rispetto agli individui di taglia superiore. In particolare, gli esemplari di *X. gladius* di taglia compresa tra 50-77 cm sono risultati maggiormente infestati. Questo potrebbe essere messo in relazione con le abitudini di schooling¹ del pesce spada durante i primi stadi di sviluppo, che potrebbe facilitare la trasmissione, per vicinanza o contatto, dei parassiti; in questo caso sarebbe favorita l'infestazione di *X. gladius* da parte delle forme larvali ciliate (oncomiracidio) di *Tristoma* spp.

Digenei

Il monogeneo *Hirudinella ventricosa* (Fig. 6-2) che ha una distribuzione cosmopolita già segnalata in molti ospiti (Gibson & Bray, 1977), non ha presentato relazioni con la taglia dell'ospite ($r_s = -0.1$, $P < 0.01$). Trovato e descritto precedentemente nel tonnetto striato *Katsuwonus pelamis* (Lester *et al.*, 1985), è un parassita con un ciclo biologico molto breve, il che lo rende difficilmente utilizzabile come indicatore biologico. Ciò nonostante è stato utilizzato in altri studi come indicatore di brevi migrazioni di popolazioni di pesce spada (Smith *et al.*, 2004). Limitato per l'ospite, non presenta nessun significato riguardo l'appetibilità e la pericolosità per il consumatore.

¹ fenomeno comune a pesci e calamari. Una mutua aggregazione fra gli individui di una stessa specie, che porta i singoli individui a beneficiare della protezione del gruppo dalla predazione.



Fig. 6-2: *Hirudinella ventricosa* campionata nello stomaco di *X. gladius* (barra = 10µm)

Cestodi

Il cestode *Fistulicola plicatus* è stato ritrovato in tutte le aree di campionamento ed ha inoltre presentato livelli molto elevati di infestazione, risultando pertanto una specie dominante in tutti i campioni di pesce spada sia atlantici che mediterranei. Si tratta di un parassita che può raggiungere notevoli dimensioni e che attraversa la parete dell'intestino dell'ospite, affondando fino a 3-4 mm nella parete stessa. Ciò porta alla formazione di cisti granulomatoze di dimensioni rilevanti intorno allo scolice del cestode che esercitano un notevole effetto patogeno per l'ospite (Iles, 1971). Nei campioni provenienti dal Mediterraneo è stato osservato un aumento dei livelli di infestazione fino alla seconda taglia; da questa in poi, i valori si riducono notevolmente. Ciò potrebbe essere legato ai sistemi di difesa immunitaria dell'ospite, che aumentano con la crescita dell'animale.

Il cestode *Hepatoxylon squali* è stato campionato solamente nell'area atlantica, ad eccezione del mar Tirreno centrale dove è stato trovato un solo individuo. Rinvenuto nell'intestino dell'ospite allo stadio plerocecoide, non presenta effetti patogeni di rilievo sul pesce spada (Hogans *et al.*, 1983; Gomez-Cabrera, 1988).

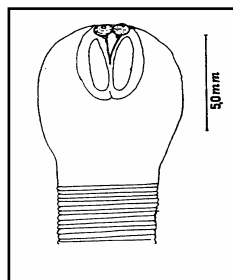


Fig. 6-3: Scolice di *Hepatoxylon squali*

Il copepode *Pennella instructa* è risultato specie dominante nei campioni di *X. gladius* provenienti dal Mar Mediterraneo. Questo parassita ematofago, dopo una vita planctonica, si attacca all'ospite ed entra all'interno dei tessuti con il cefalo torace in cerca di organi irrorati di sangue. Nella sua migrazione, protrude all'esterno con gli organi riproduttori, provocando nell'ospite delle notevoli ferite. I danni inferti all'ospite possono andare da alterazioni locali nei tessuti adiacenti al sito di attacco alla riduzione del peso corporeo, riduzione delle gonadi o addirittura alla morte dell'ospite (Lester & Roubal, 1995). Inoltre i pennellidi sono conosciuti come forme invasive del sistema circolatorio, organi di senso e visceri (Hogan *et al.*, 1985). *P. instructa* è stata campionata in tutti gli esemplari-ospiti in ognuno dei tre i siti di raccolta mediterranei. Al contrario, nei campioni atlantici, i valori di infestazione risultano piuttosto bassi, in particolare, quelli provenienti dalle Azzorre Orientali. Lo stesso parassita inoltre mostra un trend positivo dell'infestazione all'aumentare della taglia dell'ospite ($r_s=1.0$; $P<0.01$).

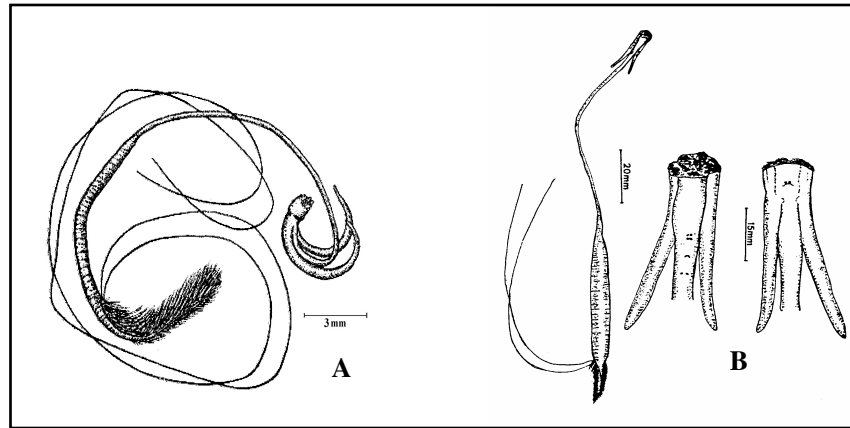


Fig. 6-4: Disegno di *Pennella instructa* (A) ed estremità cefaliche (B)

***X. gladius* Mediterraneo e Atlantico: parassiti indicatori di stock**

Dall'analisi della parassito fauna del pesce spada, alcune specie come *T. integrum*, *T. coccineum*, *Hysterothylacium* spp., *F. plicatus* e *Anisakis* spp. sono risultate dominanti, mentre altre specie rare, o comunque con valori di infestazioni molto bassi; sono un esempio *Proisorhynchoides* spp., *H. ventricosa*, *O. melanocephala* e *Bolbosoma* spp. (Tab. 6-2).

Tra le specie dominanti, alcune hanno rivelato interessanti valori di Prevalenza e Intensità Media, tali da poter essere usati come potenziali indicatori di stock. Tra questi, quelli che presentano variazioni significative tra l'area mediterranea e quella atlantica sono stati: alcuni nematodi appartenenti al genere *Anisakis* e *Hysterothylacium*, l'acantocefalo *Hepatoxylon squali* ed il copepode *Pennella instructa*.

Parassita	CTS		STS		IOS		NCA		NWA	
	P	Im	P	Im	P	Im	P	Im	P	Im
Crustacea										
<i>Pennella instructa</i>	100.0	5.5 (1-25)	100.0	12.7 (1-85)	100.0	5.2 (1-10)	6.5	1.0 (1)	1.5	1.0 (1)
Monogenea										
<i>Tristoma coccineum</i>	31.4	3.2 (1-12)	27.0	5.5 (1-24)	69.5	2.5 (1-7)	57.1	1.3 (1-3)	63.1	7.1 (1-23)
<i>Tristoma integrum</i>	50.6	3.3 (1-13)	37.8	4.2 (1-14)	84.6	3.7 (1-19)	21.4	1.4 (1-2)	64.6	7.1 (1-38)
Digenea										
<i>Hirudinella ventricosa</i>	-	-	-	-	-	-	2.2	3.0 (3)	32.3	1.8 (1-4)
<i>Prosorhynchoides</i> sp.	-	-	2.7	13.0 (13)	2.5	40.0 (40)	-	-	-	-
Cestoda										
<i>Fistulicola plicatus</i>	68.2	12.4 (1-71)	75.7	7.4 (1-22)	82.5	3.5 (1-13)	67.4	3.4 (1-14)	83.1	5.1 (1-24)
<i>Hepatoxylon squalii</i>	1.2	1 (1)	-	-	-	-	56.5	5.6 (1-74)	64.6	5.0 (1-28)
Tetraphyllidea larvae	8.2	1.9 (1-4)	54.1	80.0 (1-27)	10.0	12.5 (1-43)	34.8	6.2 (1-37)	4.6	3.0 (1-7)
Acanthocephala										
<i>Bolbosoma</i> sp.	-	-	-	-	-	-	4.3	1.0 (1)	1.5	1.0 (1)
Nematoda										
<i>Anisakis pegreffii</i>	24.7	3.6 (1-12)	5.4	45.5 (11-80)	52.5	10.6 (1-27)	-	-	-	-
<i>Anisakis simplex</i> (s.s.)	-	-	-	-	-	-	6.5	1.3 (1-2)	13.8	7.0 (1-40)
<i>Anisakis ziphidarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5	1.0 (1)
<i>Anisakis physeteris</i>	28.2	3.8 (1-18)	5.4	3.5 (1-6)	-	-	15.2	2.3 (1-7)	20.0	2.4 (1-4)
<i>Anisakis brevispiculata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	7.7	1.8 (1-3)
<i>Anisakis paggiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5	1.0 (1)
<i>Hysterothylacium incurvum</i>	9.4	2.3 (1-6)	24.3	11.0 (1-50)	10.0	1.8 (1-4)	30.4	4.7 (1-16)	18.5	9.7 (1-30)
<i>Hysterothylacium corrugatum</i> (s.l.)	9.4	7.0 (1-16)	24.3	6.3 (1-27)	10.0	3.0 (1-6)	10.8	2.8 (1-5)	10.8	9.6 (2-53)
<i>Hysterothylacium petteri</i>	8.2	6.7 (1-20)	2.7	1.0 (1)	2.5	1.0 (1)	-	-	-	-
<i>Oncophora melanocephala</i>	3.5	1.0 (1-2)	5.4	1.5 (1-2)	-	-	4.3	1.0 (1)	1.5	1.0 (1)

Tab. 6-2 Prevalenza (P) e Intensità media (Im) secondo Rozsa *et al.*, (2000) delle infestazioni dalle diverse specie parassite trovate in *X. gladius* provenienti dalle aree di campionamento del Mar Mediterraneo e dell'Oceano Atlantico.

Fra i nematodi del genere *Anisakis*, un parassita ritrovato e identificato solamente nello stock del Mediterraneo è risultato *A. pegreffii* (larve). Totalmente assente nel campione Atlantico, questo Anisakide ha presentato valori di Prevalenza elevati nei campioni provenienti dal Mar Tirreno Centrale (P=24.7%) fino ai valori massimi nel Mar Ionio (P=52.5%). Nello stock Atlantico è stata invece rinvenuta la specie gemella *Anisakis simplex* s.s. (Nascetti *et al.*, 1986; Mattiucci *et al.*, 1997) in tutti i siti di raccolta, anche con valori di Prevalenza e Intensità media variabili tra le diverse aree (Azzorre Orientali P=6.5%; I=1.3; Azzorre Occidentali P=13.8, Im=7.0). Nei tre siti atlantici di raccolta è stata inoltre identificata la specie *A. physeteris*, con valori di Prevalenza e Intensità media più elevati di quelli osservati unicamente nel campione del Tirreno Centrale. Nel campione dell'Atlantico sono inoltre state identificate le specie *A. brevispiculata*, *A. ziphidarum* ed *A. paggiae*, che mostrano livelli di infestazione bassi nei campioni delle Azzorre occidentali e orientali, ma assenti nell'area mediterranea. Quindi i campioni mediterranei sono caratterizzati da alte frequenze relative di *A. pegreffii* mentre quelli atlantici da *A. simplex* (s.s.) (Tab. 6-3). La distribuzione di *A. ziphidarum*, *A. brevispiculata* e *A. paggiae* è limitata all'Oceano Atlantico Occidentale. Queste tre specie caratterizzano il campione differenziandolo dagli altri.

	CTS	STS	IOS	NCA	NWA
<i>A. pegreffii</i>	44.0	93.0	100.0	-	-
<i>A. simplex</i> (s.s.)	-	-	-	61.0	50.7
<i>A. ziphidarum</i>	-	-	-	-	2.9
<i>A. physeteris</i>	56.0	7.0	-	39.0	28.6
<i>A. brevispiculata</i>	-	-	-	-	16.4
<i>A. paggiae</i>	-	-	-	-	1.4
P	***	***	NC	***	***
<i>H. incurvum</i>	17.0	60.0	29.0	73.0	40.0
<i>H. corrugatum</i> (s.l.)	44.0	36.0	58.0	27.0	60.0
<i>H. petteri</i>	39.0	4.0	13.0	-	-
P	***	***	***	***	***

Tab. 6-3: Frequenze relative (%) dei nematodi anisakidi (*Anisakis* e *Hysterothylacium*) trovati nei campioni di *X. gladius* e livello di significatività (P) ottenuta nel test del χ^2 . ***= $P < 0.0001$

Tra i nematodi del genere *Hysterothylacium*, quelli che hanno mostrato livelli interessanti di infestazione è *H. petteri*. Infatti questo parassita dello stomaco è stato reperito esclusivamente nell'area mediterranea, anche se con livelli bassi di Prevalenza e Intensità media (Tab. 6-2). Il suo areale di distribuzione sembra essere limitato, nei campioni considerati, al Mar Mediterraneo, oltre che all'Oceano Pacifico dove fu trovato da Petter e Maillard (1987). La presenza di questo nematode in un campione di pesce spada marca quindi la provenienza mediterranea dell'ospite.

I risultati relativi L'*Hepatoxylon squali* hanno permesso di evidenziare questo cestode come potenziale e buon indicatore di stock ittici di pesce spada (Fig. 6-5).

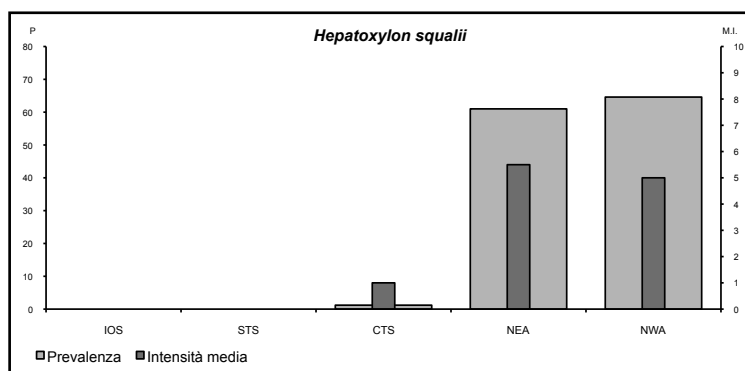


Fig. 6-5: Rappresentazione dei valori di Prevalenza e Intensità media del cestode *H. squali* nei campioni di *X. gladius*

Riscontrato, infatti, in un solo individuo del Mar Mediterraneo (CTS: P=1.2, Im=1.0), ha mostrato elevati valori di P e Im in tutti i campioni atlantici (NCA: P=56.0, Im=5.6; NWA: P=64.6, Im=5.0). L'assenza di questo parassita nel mar Mediterraneo, potrebbe essere dovuta alla mancanza dell'ospite definitivo che in questo caso è rappresentato dai pesci cartilaginei.

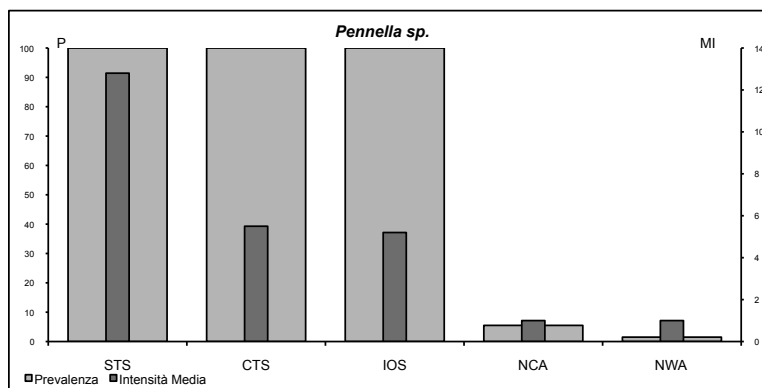


Fig. 6-6: Rappresentazione dei valori di Prevalenza e Intensità media del copepode *P. instructa* nei campioni di *X. gladius*

Stesso comportamento di *H. squali* ma con trend esattamente opposto è stato osservato nel copepode *Pennella instructa* (Fig. 6-6). Questo crostaceo, parassita del muscolo, è stato campionato su tutti i pesci dell'area mediterranea (P=100%), diventando una specie rara nell'Oceano Atlantico. Molti dei pesci pescati nel mar Mediterraneo durante questa indagine presentavano infestazioni da questo parassita talmente alte che ne impedivano lo sfruttamento dell'ospite da un punto di vista commerciale. La *P. instructa*, infatti, penetrando all'interno della muscolatura dell'ospite, stimola da parte di questo la formazione di granulomi intorno al cefalotorace, alterando le proprietà organolettiche della zona adiacente (Lester & Roubal, 1995). Anche

se la distribuzione di questo parassita non è limitata esclusivamente all'area mediterranea, i valori di Prevalenza e Intensità media sembrano suggerire una mancanza di adattamento (risposta immunitaria) di *X. gladius* mediterraneo a questo copepode altamente patogeno.

Il Pesce spada e l'accumulo di metalli pesanti

Per monitorare i livelli di accumulo di metalli pesanti nel pesce spada sono stati analizzati frammenti di muscolo. Sebbene il fegato sia di solito associato a concentrazioni di contaminanti chimici più alti, in questo studio non è stato analizzato in quanto, non essendo parte edibile del pesce, non rappresenta un rischio per la salute dell'uomo. Nonostante i dati ottenuti riportino un'alta variabilità nei livelli di concentrazione di metalli pesanti, significative differenze sono state riscontrate tra i vari elementi considerati.

In tutto 56 individui sono stati analizzati per il Cadmio, Piombo e Mercurio: 11 pesci dall'Atlantico Nord Occidentale (NWA), 11 dall'Atlantico Centro Nord e 34 individui dall'area mediterranea (rispettivamente 12 dallo Ionio, 12 dal Tirreno centrale, 10 dal Tirreno meridionale). In tabella 7-4 sono riportati i dati relativi alle concentrazioni di Cd, Pb e Hg, espresse in mg/kg di peso fresco, in *X. gladius* nelle varie aree. Sia per il Piombo che per il Cadmio, sono risultate esserci forti differenze tra le due aree studio (Tab. 6-4), con valori medi di concentrazione significativamente più bassi nel campione Atlantico Nord Occidentale (NWA: Cd=0,045 ± 0,032, Pb=1,078 ± 0,495) e in quello Atlantico Centro Nord (NCA: Cd=0,042 ± 0,041, Pb=0,968 ± 0,646) rispetto ai tre campioni del Mediterraneo (IOS: Cd=0,158 ± 0,080, Pb=1,049 ± 0,358; CTS: Cd=0,116 ± 0,134, Pb=1,358 ± 0,916; STS: Cd=0,101 ± 0,054, Pb=1,160 ± 0,747). I valori massimi di accumulo sono stati trovati nell'area del Tirreno Centrale sia per il Cadmio (0,445 mg/kg ww) che per il Piombo (3,887 mg/kg ww), entrambe sullo stesso individuo che rappresenta anche il pesce tra quelli di taglia maggiore campionati in Mediterraneo (LJFL=140cm).

	IOS	STS	CTS	NWA	NCA
Cd	0,158 ± 0,080	0,101 ± 0,054	0,116 ± 0,134	0,045 ± 0,032	0,042 ± 0,041
Pb	1,049 ± 0,358	1,160 ± 0,747	1,358 ± 0,916	1,078 ± 0,495	0,968 ± 0,646
Hg	1,580 ± 0,710	2,414 ± 1,623	1,040 ± 0,613	0,887 ± 0,186	0,658 ± 0,333

Tab. 6-4: Concentrazioni medie (mg/kg peso fresco) e Deviazioni standard di Cd, Pb e Hg in *X. gladius* dalle cinque aree di campionamento.

Sempre nella stessa area tirrenica sono emersi i valori minimi di accumulo di Cadmio, mentre il minimo riscontrato per il Piombo è stato in un pesce spada del Mar Tirreno Meridionale con 0,02 mg/kg. Per il Cadmio (Fig. 6-7), nonostante alcuni individui abbiano presentato alti livelli di accumulo, le concentrazioni medie riscontrate non superano i tenori massimi decisi dalla CE come detto nel capitolo 5 (vedi allegato 1).

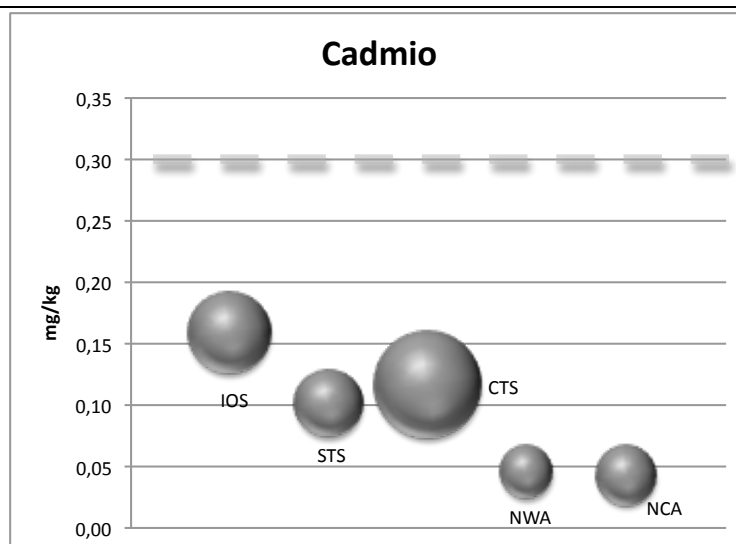


Fig. 6-7: Grafico delle concentrazioni di Cadmio (mg/kg peso fresco) ritrovato nelle cinque aree studio. Il raggio delle sfere rappresenta la deviazione standard. La linea tratteggiata indica il tenore massimo imposto dalla CE

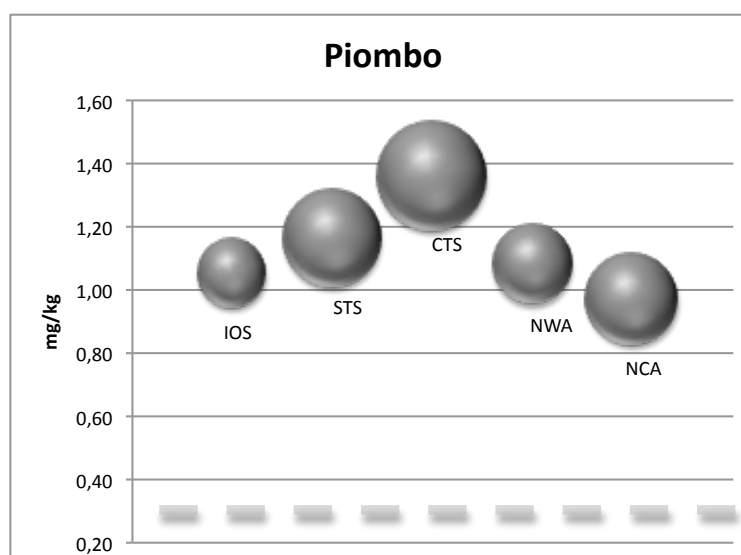


Fig. 6-8: Grafico delle concentrazioni di Piombo (mg/kg peso fresco) ritrovato nelle cinque aree studio. Il raggio delle sfere rappresenta la deviazione standard. La linea tratteggiata indica il tenore massimo imposto dalla CE

Per il Piombo invece (Fig. 6-88), tutti gli individui analizzati hanno mostrato alte concentrazioni e accumuli notevolmente superiori ai 0,30 mg/kg imposti come limite massimo (limiti Reg. CE 1881/2006), ad eccezione di soli due pesci del Tirreno meridionale. Questi risultati sono conformi a quelli riportati da Papetti & Rossi (2009) sulla stessa specie e da Ylmaz (2003) su specie simili (*Mugil cephalus* e *Trachurus mediterraneus*), entrambe sul pescato del Mediterraneo. I valori sono invece più alti rispetto al lavoro di Storelli *et al.* (2005) che in uno studio comparativo dell'accumulo di metalli tra *Thunnus thynnus* e *Xiphias gladius* trovarono livelli medi di Cd e Pb più bassi. In media le concentrazioni maggiori di Pb e Cd sono state trovate rispettivamente in area centro-tirrenica ed in area ionica.

L'area che maggiormente è risultata presentare i livelli più alti di Mercurio è stata quella mediterranea, con livelli altissimi nei campioni del Tirreno Meridionale (Fig. 6-99). I valori medi dei campioni provenienti da quest'area superano notevolmente i tenori massimi consentiti, con la concentrazione massima (4,036 mg/kg peso fresco) riscontrata in un pesce spada di taglia grande (150 cm). Anche nel Mar Ionio i livelli medi di accumulo si sono rivelati elevati, mentre nel campione del Tirreno Centrale, nonostante alcuni pesci contengano livelli di Mercurio superiori ai tenori massimi consentiti, i valori medi ($1,040 \pm 0,613$) rimangono accettabili. Entrambe i campioni atlantici hanno al contrario valori medi al di sotto della soglia di rischio, con una diminuzione delle concentrazioni nel campione atlantico centrale rispetto a quello occidentale.

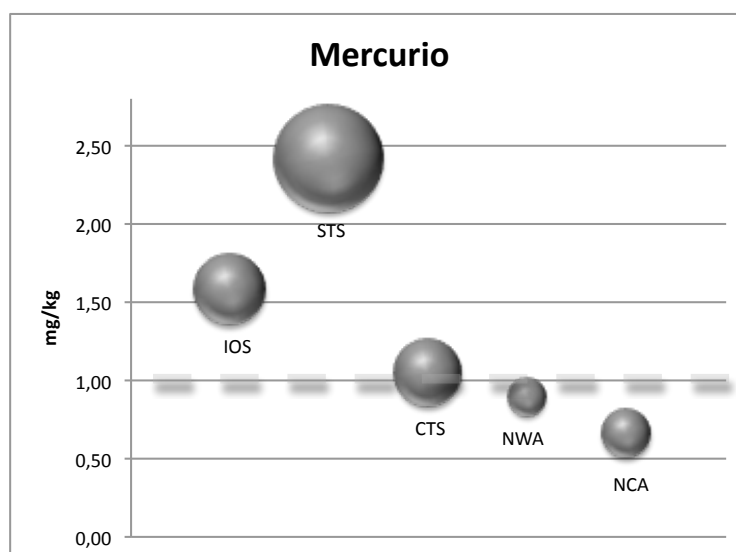


Fig. 6-9: Grafico delle concentrazioni di Mercurio (mg/kg peso fresco) ritrovato nelle cinque aree studio. Il raggio delle sfere rappresenta la deviazione standard. La linea tratteggiata indica il tenore massimo imposto dalla CE

Per quanto riguarda la relazione tra la taglia del pesce e gli accumuli di metalli pesanti (Fig. 6-1010, Fig. 6-1111 e Fig. 6-12) *X. gladius* ha presentato una correlazione significativamente positiva tra la taglia del pesce e le concentrazioni dei tre metalli pesanti. Cd: $r = 0,46$, $p < 0,001$; Pb: $r = 0,45$, $p < 0,001$; Hg: $r = 0,37$, $p < 0,01$). Questi risultati rispecchiano il processo di bio-magnificazione risalendo la catena trofica, oltre alle alte assunzioni di contaminati dovuti agli elevati livelli metabolici dei grandi predatori. Individui più grandi hanno mostrato più elevati livelli di concentrazione di metalli pesanti come era stato già precedentemente riscontrato da altri autori in studi sugli inquinanti chimici dei pesci (Anderson & Depledge, 1997; Mendez *et al.* 2001; Storelli *et al.*, 2002).

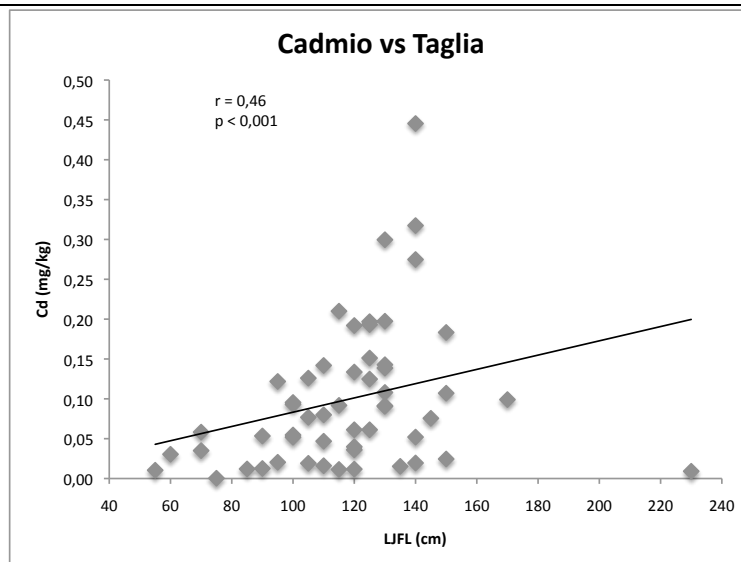


Fig. 6-10: Confronto tra la taglia di *X. gladius* e le concentrazioni di Cd riscontrate

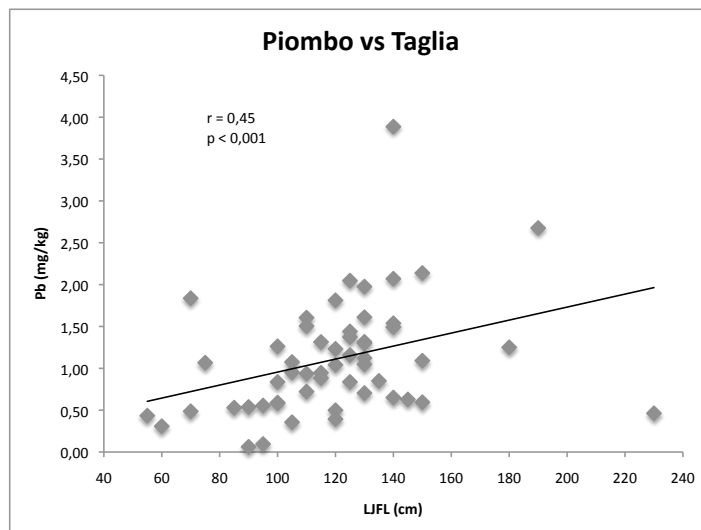


Fig. 6-11: Confronto tra la taglia di *X. gladius* e le concentrazioni di Pb riscontrate

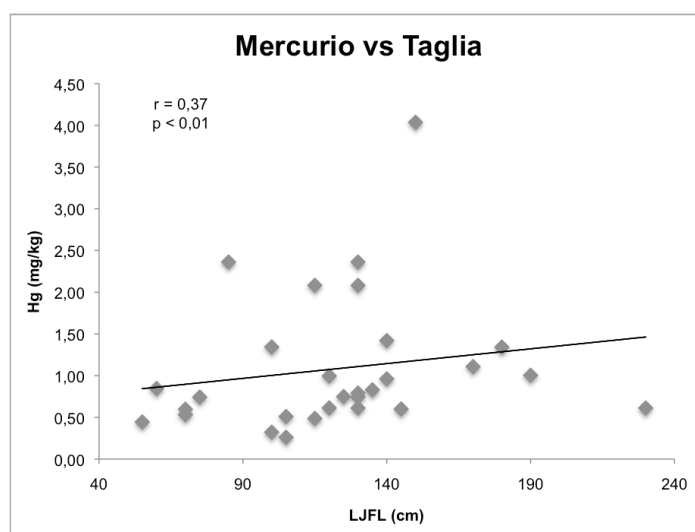


Fig. 6-12: Confronto tra la taglia di *X. gladius* e le concentrazioni di Hg riscontrate

7. Discussioni

La priorità principale in materia di gestione degli stock ittici nel bacino del Mediterraneo è quella di garantire un corretto sfruttamento della risorsa. La diversità delle culture che si affacciano sul Mediterraneo ed il livello di antropizzazione presente, rendono difficile interventi mirati alla salvaguardia ambientale e degli stock. La stessa legislazione internazionale in materia di pesca del Mar Mediterraneo è applicata con pesi diversi a seconda delle diverse realtà su cui agisce, sia sociali che economiche. Per proteggere l'ambiente mediterraneo, su cui attualmente gravano pressioni diverse a scapito degli habitat costiero e marino, è sempre più necessario, oltre che attuare e applicare le leggi ambientali esistenti, adottare anche approcci integrati basati sulla conoscenza degli ecosistemi al fine di comprenderne al meglio l'organizzazione ed il funzionamento. Gli aspetti più importanti di cui tener conto sono: 1) l'inquinamento prodotto dall'urbanizzazione e dalle attività industriali; 2) la sostenibilità dello sfruttamento delle risorse della pesca e dell'acquacoltura; 3) la presenza di meccanismi sia regolamentari sia informativi non adeguati (prevalentemente, la non applicazione della legge). La maggior parte delle aree costiere del Mediterraneo ospitano industrie chimiche ed estrattive, che generano quantità considerevoli di rifiuti industriali tra i quali metalli pesanti e altre sostanze pericolose e persistenti che raggiungono, direttamente o indirettamente, il Mar Mediterraneo (attraverso i fiumi e le acque di dilavamento). Il risultato di questi fattori è un ecosistema in cui la sopravvivenza di specie ittiche è delicatamente dipendente dall'intervento umano. Questo studio vuole cercare di fornire un quadro delle complesse variabili che ad oggi agiscono sulla popolazione di pesce spada del Mar Mediterraneo, intesa sia come risorsa ittica di grande valore commerciale, sia come simbolo di un ecosistema che vive ormai al di sotto dei limiti di sostenibilità. Lo studio comparativo tra la popolazione mediterranea e quella atlantica di *X. gladius* ha permesso di trovare differenze tra due aree soggette ad impatto antropico diverso, se non altro per la differente dispersione geografica di cui godono. La popolazione mondiale di pesce spada risulta geneticamente strutturata suggerendo un ridotto flusso genico tra i vari bacini oceanici, nonostante l'assenza di barriere geografiche (Chow *et al.*, 1997). In particolare Chow *et al.* (1997) affermano la presenza di quattro distinte popolazioni di pesce spada sulla base di analisi degli RFLP del mtDNA: pacifica, nord atlantica, sud atlantica e mediterranea. Studi genetici, biologici e morfometrici, condotti sulle due popolazioni atlantica e mediterranea, hanno evidenziato inoltre una separazione dei due stock all'altezza dello stretto di Gibilterra (Cimmaruta *et al.*, 2006; Kotoulas *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006; Mattiucci *et al.*, 2007; Reeb & Block, 2006). Mancava però ad ora uno studio comparativo degli effetti di questa separazione con le variabili che possono mettere a rischio la salute della popolazione di pesce spada come ad esempio i metalli pesanti.

I risultati relativi allo studio della comunità parassitaria di *X. gladius* hanno messo in evidenza alcuni parassiti come indicatori biologici in due approcci differenti: il primo

considerando la parassito fauna *in toto*, il secondo considerando le singole specie come potenziali “*biological tags*”. Come infatti suggerito da Lester & MacKenzie (2008), non tutti i parassiti possono essere utilizzati come indicatori biologici nella discriminazione di stock ittici. Di solito si associa a differenti composizioni delle faune parassitarie differenti stock ittici; in realtà quello che si sta osservando sono diverse distribuzioni di parassiti associate a diverse aree geografiche. Secondo gli Autori, elemento non trascurabile per l'utilizzo di parassiti come indicatori di stock è la permanenza all'interno dell'ospite e l'eteroxenicità del ciclo biologico. Tra tutte le specie parassite identificate in *X. gladius*, solamente alcune hanno risposto positivamente ai requisiti richiesti per un buon indicatore biologico. *Pennella instructa*, *Hepatoxylon squali*, *Bolbosoma* sp., *Anisakis* spp. e *Hysterothylacium* spp. sono specie permanenti in quanto, incistandosi nel caso in cui l'ospite intermedio non sia adatto al loro ciclo biologico, hanno periodo di rimanenza superiore ad un anno (Speare, 1995). Questi parassiti, superando quindi la stagionalità della migrazione, forniscono maggiori informazioni sulla distribuzione spaziale dell'ospite (Khan & Tuck, 1995) e sono stati per questo già utilizzati in passato come indicatori biologici di stock di pesce spada (Mattiucci *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2008). La parassitofauna dei pesci spada catturati nelle diverse aree è stata valutata usando l'analisi multivariata. I valori sono stati assegnati tramite scale multidimensionali non-metriche (MDS) basate su matrici di similarità calcolate con il coefficiente di Bray-Curtis (Fig. 7-1). Nell'analisi gli individui dell'area mediterranea (croci) e quelli dell'area atlantica (rettangoli) presentano una distribuzione diversa. Solamente un pesce spada campionato nelle Azzorre occidentali è stato assegnato nell'analisi alla popolazione mediterranea, mentre due campioni catturati nel Tirreno Meridionale hanno mostrato una parassito fauna più caratteristica delle zone atlantiche. Questo potrebbe essere dovuto allo spostamento della linea di confine tra le due popolazioni che secondo alcuni studi non ricadrebbe esattamente all'altezza dello stretto di Gibilterra, ma piuttosto nell'area a sud della Sardegna intorno ai 10° di longitudine Est (Kotoulas *et al.*, 2006)

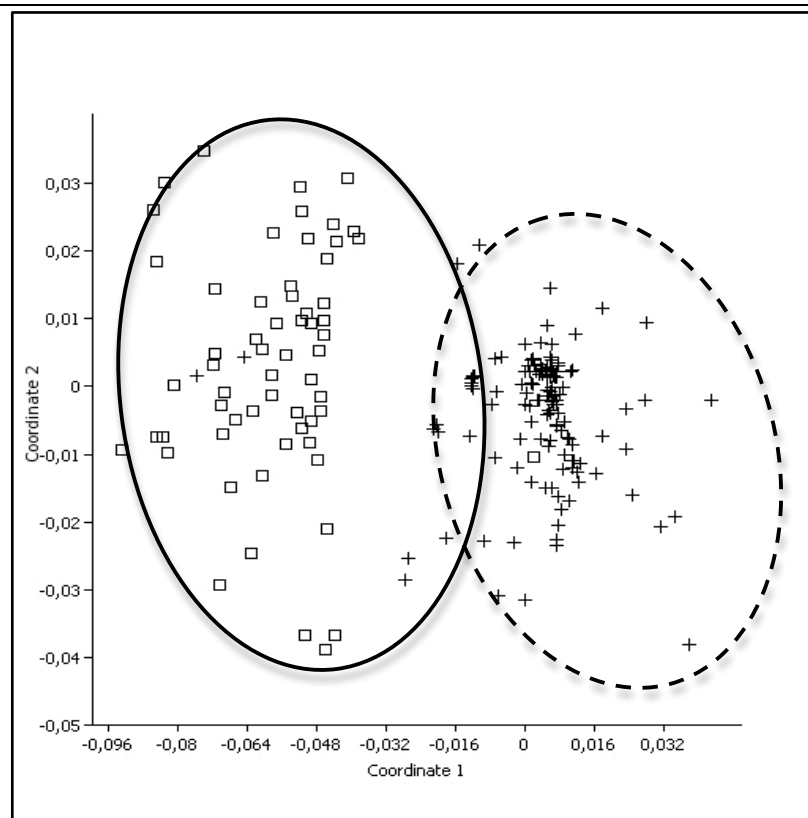


Fig. 7-1: MDS ottenuto dai valori di similarità di Bray-Curtis sulle specie parassite rinvenute in *X. gladius* del Mar Mediterraneo (linea tratteggiata) e dell'Oceano Atlantico (linea continua).

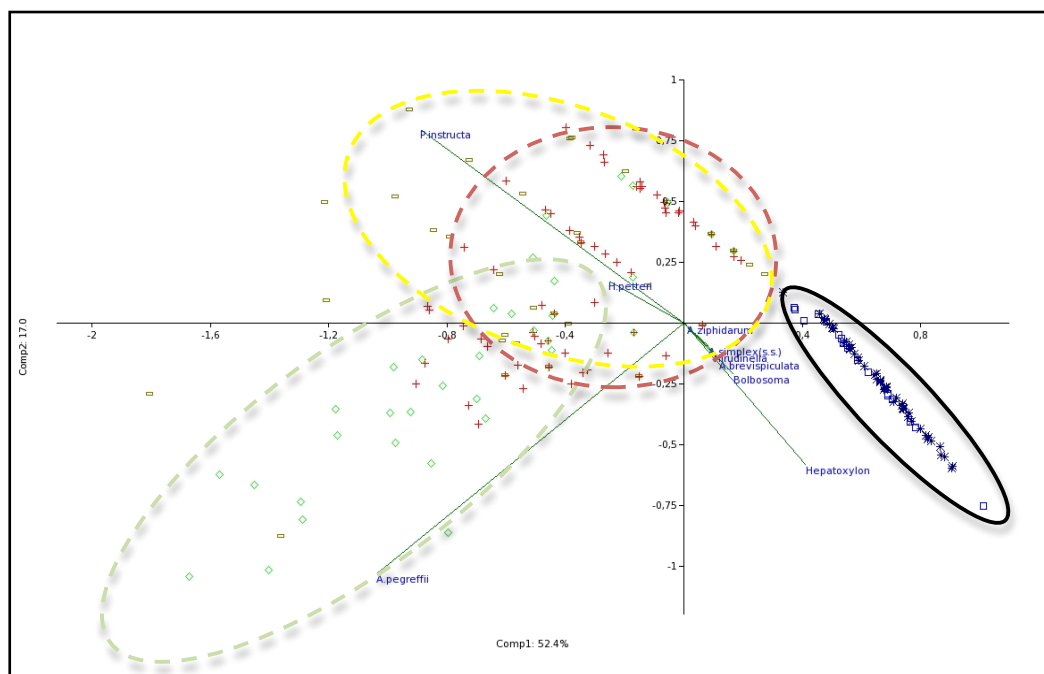


Fig. 7-2: Analisi delle Componenti Principali (PCA) basata sulle abbondanze delle specie parassite in *X. gladius*. (+:STS; △:CTS; ◇:IOS; *:NWA; □:NCA)

L'analisi delle componenti principali (Fig. 7-2) è stata utilizzata per trovare delle correlazioni tra le variabili (specie parassite) che pesano maggiormente come indicatori della distribuzione geografica delle popolazioni di *X. gladius*. I risultati di questa analisi mostrano chiaramente che i pesci spada provenienti dalle cinque aree rappresentano unità distinte, oltre a evidenziare le tre aree mediterranee più simili tra loro. I valori delle abbondanze sono stati utilizzati dopo trasformazione in $\log(x+1)$ e le due componenti insieme spiegano il 69,4% della varianza. Le specie parassite che contribuiscono in maniera maggiore alla separazione dei campioni sono le stesse suggerite come buoni indicatori biologici. *H. squali* è la specie parassita campionata che incide maggiormente come indicatore della popolazione atlantica (cerchio in linea continua). *A. ziphidarum*, *A. simplex* (s.s.), *A. brevispiculata* e *Bolbosoma* sp. contribuiscono a discriminare lo stock atlantico, rispetto a quello mediterraneo, anche se con un'influenza minore. Le specie che pesano maggiormente nell'area mediterranea sono invece il copepode *P. instructa* ed il nematode anisakide *A. pegreffii*. È evidente, sulla componente 2 della PCA, la separazione all'interno della macroarea mediterranea delle due zone ionica (in verde) da quelle tirreniche (STS: in giallo; CTS: in rosso), caratterizzate da *A. pegreffii* la prima e da *P. instructa* e *H. petteri* le seconde. Le tecniche di analisi multivariata applicate sulle specie dominanti e idonee come indicatori biologici hanno dunque evidenziato l'esistenza di due popolazioni distinte ed indipendenti. Questi risultati sono congruenti con quelli ottenuti in altri lavori con l'utilizzo di altri marcatori. Già Cimmaruta *et al.* (2006) sulla base di marcatori molecolari (allozimi e RFLP del D-Loop), aveva trovato una separazione delle popolazioni di *X. gladius* tra le stesse aree del Mediterraneo e le Isole Azzorre; risultati questi confermati dai lavori di Reeb *et al.* (2003) (Reeb, Arcangeli e Block 2003) sui micro satelliti e da Mattiucci *et al.* (2007) sugli allozimi dei nematodi anisakidi. I valori ottenuti corroborano l'elevato valore dei parassiti considerati come indicatori biologici nella discriminazione di stock ittici. Ulteriori informazioni che ci fornisce l'analisi comparativa della comunità parassitaria di *X. gladius* è relativa allo stato di salute della popolazione. La parassitofauna si è dimostrata caratterizzata dalla presenza di specie dominanti e specie rare. Se le prime, come abbiamo visto, forniscono utili informazioni sulla distribuzione spaziale degli stock, le seconde contribuiscono notevolmente alla diversità biologica in termini di numero di specie parassite presenti nel campione. In generale, è stata osservata una maggiore biodiversità (Indice di Simpson) nei campioni atlantici rispetto a quelli mediterranei (Fig. 7-). In particolare la stazione che ha mostrato un più ridotto numero di specie parassite è stato il Mar Ionio ($H_s=0,51$) mentre la popolazione atlantica occidentale si è mostrata la maggiormente eterogenea ($H_s=0,87$). Dall'analisi della parassitofauna abbiamo quindi un'indicazione sulla situazione ecologica della popolazione mediterranea di pesce spada. Se infatti una diminuzione di biodiversità (a vari livelli) è un indice di impoverimento del sistema ecologico in studio (Noss, 1990), la curva di diversità delle specie parassite sopra riportata rappresenta un campanello di allarme sullo stato di salute della popolazione mediterranea di *X. gladius*. Inoltre fenomeni di erosione genetica potrebbero interessare lo stock mediterraneo.

Alcuni Autori hanno infatti messo in evidenza, sulla base di analisi degli RFLP del mtDNA e degli allozimi, come questo presenti valori di variabilità genetica significativamente più bassi rispetto alla popolazione atlantica (Chow *et al.*, 1997; Cimmaruta *et al.*, 2006), in seguito all'overfishing, che può aver portato ad un forte calo demografico della popolazione ittica nel Mediterraneo. Ulteriormente, numerose ricerche basate sull'utilizzo di biomarkers hanno recentemente dimostrato gli effetti ecotossicologici degli endocrine disruptors¹ sulla popolazione mediterranea di *X. gladius* (Kannan *et al.*, 2002; Fossi *et al.*, 2004). L'effetto sinergico di questi fattori, potrebbe aver favorito un indebolimento di capacità adattative della popolazione verso gli attacchi da patogeni. Secondo O'Brien & Evermann (1988) infatti, popolazioni ospiti che mostrano livelli di variabilità genetica ridotti, o comunque un aumento dell'omozigosi, possono essere più suscettibili all'infezione da patogeni ("Red queen Hypothesis", Van Valen, 1973) come ad esempio da ectoparassiti.

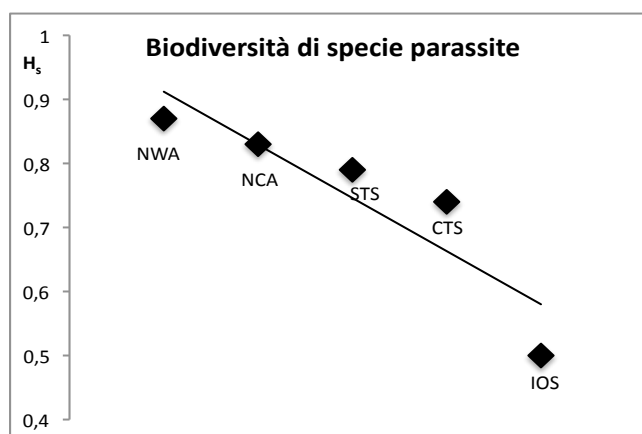


Fig. 7-3: Curva di biodiversità delle specie che parassitano *X. gladius* nelle cinque popolazioni. H_s= Indice di Simpson (Simpson 1949)

Particolarmente interessanti in questo contesto si sono rivelati i risultati ottenuti dall'analisi dei valori di infestazione dell'ectoparassita *Pennella instructa* (Fig. 7-a). Questo copepode ematofago esercita un notevole effetto patogeno sull'ospite (Lester & Roubal, 1995). Infatti, dopo una prima fase platonica (larvale), allo stadio giovanile (copepodite) si attacca alla superficie dell'ospite, penetrando poi in fase adulta nella muscolatura e raggiungendo gli organi interni (fegato, stomaco, cuore e gonadi) maggiormente irrorati dal sangue. A questi si ancora con il cefalotorace inducendo da parte dell'ospite la formazione di un granuloma (Fig. 7-4: (a) Valori di infestazione (P e Im) del parassita patogeno *Pennella instructa* in *X. gladius* atlantico e mediterraneo. (b) *P. instructa* e reazioni granulomatoze da parte dell'ospite (foto originale) Fig. 7-b), mentre la rimanente parte del parassita, contenente l'apparato respiratorio e riproduttore, protrude all'esterno. È noto che i danni inferti dai copepodi pennellidi possono andare da

¹ Agenti che agiscono sul sistema endocrino alterandone le normali funzioni.

alterazioni locali nei tessuti adiacenti al sito d'attacco, fino alla riduzione del peso corporeo, delle gonadi, quindi con problemi negli stadi riproduttivi, o addirittura portare alla morte dell'ospite. Inoltre queste lacerazioni che provoca nel tessuto dell'ospite, rappresentano una via d'ingresso per agenti patogeni come batteri (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Escherichia* etc.) o virus. La *P. instructa* è stata reperita in tutti gli individui di *X. gladius* esaminati nel Mediterraneo (P=100% nelle tre località), mentre in Atlantico è stata campionata solamente in pochi campioni (P_{NCA}= 6.5%; P_{NWA}=1.5%), dimostrando come il pesce spada mediterraneo non ha forse sviluppato forme di risposta efficace ai suddetti patogeni.

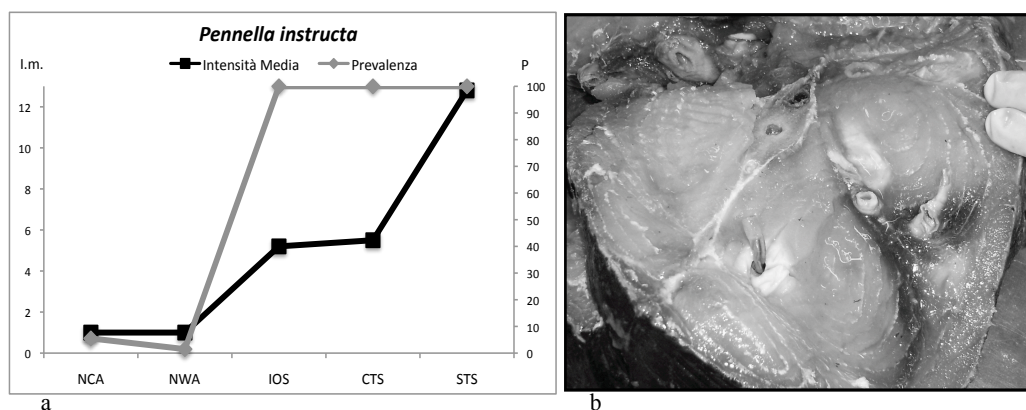


Fig. 7-4: (a) Valori di infestazione (P e Im) del parassita patogeno *Pennella instructa* in *X. gladius* atlantico e mediterraneo. (b) *P. instructa* e reazioni granulomatose da parte dell'ospite (foto originale)

Confermata quindi la separazione dello stock mediterraneo di pesce spada da quello atlantico, osservata nel primo la maggior presenza di parassiti che posso compromettere la salute dell'ospite, l'investigazione sui metalli pesanti ha contribuito ad approfondire maggiormente, a questo punto, lo stato di salute generale della popolazione mediterranea di pesce spada. Innanzi tutto è necessario premettere che la scelta del muscolo in questa investigazione, piuttosto che il fegato o l'epatopancreas, come fatto da altri Autori (es. Storelli *et al.*, 2005), è stata dettata dalla necessità di rapportare questi dati in primo luogo con la salute dello stock ittico, ma soprattutto con gli effetti che questi contaminanti posso avere sul consumo umano. Infatti il muscolo, oltre a costituire uno dei principali dipartimenti di "accumulo" dei metalli, entra a far parte della nostra dieta. Al contrario, il fegato e l'epatopancreas sono riconducibili ai compartimenti di "smaltimento" di questi elementi e forniscono quindi informazioni sulla disponibilità ambientale dei metalli (Renzoni *et al.* 1993). Un forte accumulo di metalli pesanti è stato riscontrato nei pesci provenienti da tutte le stazioni (Fig. 7-5). In particolare le località del Mar Tirreno hanno presentato i valori maggiori di deviazione standard sia per il Pb che per il Cd. Le prime notizie di presenza elevata di metalli pesanti nei prodotti ittici mediterranei rispetto a quelli oceanici risalgono alla fine degli anni settanta (Renzoni *et al.*, 1979). Questo tipo di notizie ebbero al tempo ripercussioni pesanti sull'opinione pubblica, giustificate dal primo e più famoso caso di

avvelenamento da Hg, il disastro di Minamata che avvenne nel febbraio del 1959 in Giappone (Maruyama, 1996).

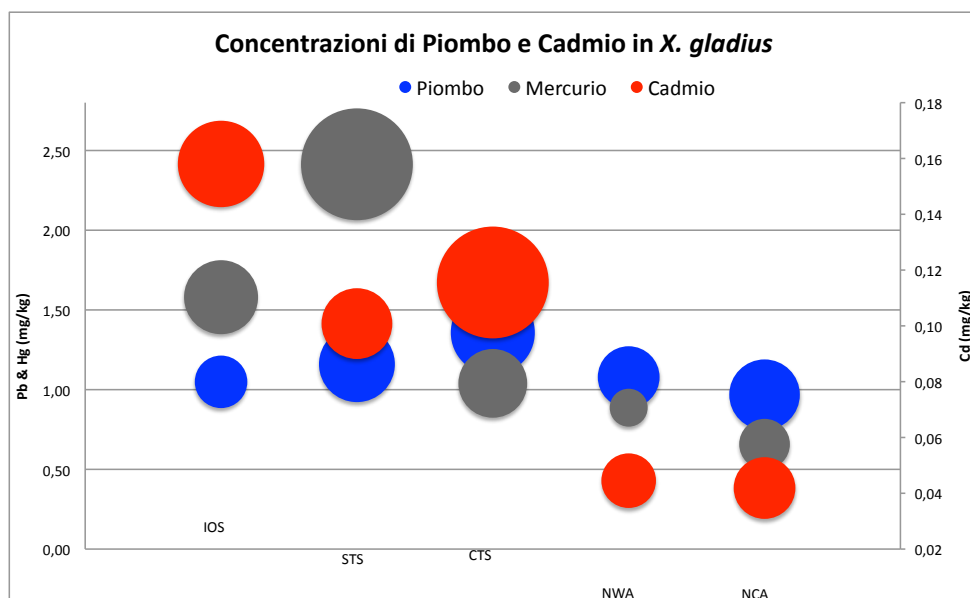


Fig. 7-5: Grafico riassuntivo delle concentrazioni di Pb, Cd e Hg in *X. gladius*

Per l'uomo, la via principale di assunzione di metalli pesanti è costituita dai prodotti ittici. Infatti fenomeni di accumulo si verificano anche negli ecosistemi terrestri (es. funghi), ma in questi casi i metalli si trovano nella loro forma inorganica e quindi sono facilmente eliminabili. Nella catena trofica marina, invece, la biomagnificazione di questi metalli è determinata da composti di difficile smaltimento (es. metilmercurio, composto altamente tossico e difficilmente eliminabile). Nonostante alcuni lavori passati avessero mostrato un miglioramento dei livelli di accumulo da metalli pesanti nel pesce rispetto agli anni precedenti (Capelli *et al.*, 2004), studi di monitoraggio più recenti hanno dato esito differente evidenziando il superamento dei livelli massimi fissati per piombo, cadmio e mercurio (Storelli *et al.*, 2005). Effetti di avvelenamento per assunzione di metalli da prodotti ittici non sono però mai stati trovati. Questo, forse, perché l'alto contenuto di selenio naturalmente presente nei pesci agisce da antagonista della tossicità di alcuni metalli, dando luogo ad una forma di immunità naturale (Reilly, 1996). È necessario precisare, che i livelli di accumulo che sono stati riscontrati nei pesci spada, sia in questo che in altri lavori, non possono essere considerati indicativi di presenza di rischio per l'uomo. Il rischio maggiore deriva infatti dall'autoconsumo di pesci stanziali (legati al fondo) nelle località ad elevata concentrazione di metalli come ad esempio nelle aree di anomalie geochimiche (Bernhard & Brondi, 1986). In molti dei paesi che vivono di pesca, infatti, gran parte della dieta è basata sul pesce pescato localmente; questo comporta accumuli maggiori di metalli pesanti nei tessuti e nel fegato. Ad ogni modo, in queste popolazioni, non sono mai state ad ora riscontrati effetti di intossicazione da metalli pesanti, in quanto l'assunzione di tali metalli risultata al di sotto delle dosi massime consigliate dagli esperti FAO/WHO (PTWI: Provisional Tolerable Weekly Intake),

vale a dire le quantità cui l'uomo può essere esposto anche per tutta la vita senza andare incontro ad effetti tossici manifesti (Tab. 7-1). In particolare, per il piombo è stato stabilito un PTWI pari a 25 µg/kg di peso corporeo; per il cadmio è stato fissato un PTWI pari a 7 µg/kg p.c.; per il mercurio totale un PTWI pari a 5 µg/kg p.c.; mentre per la quota di metilmercurio, il JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) nel 2004 ha ridotto il PTWI da 3,3 a 1,6 µg/kg. Nella valutazione della sicurezza dei prodotti ittici, il gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare (CONTAM) dell'EFSA ha riesaminato un'ampia gamma di contaminanti concludendo che quelli per i quali i grandi consumatori di pesce potrebbero superare la dose settimanale tollerabile sono metilmercurio, diossine e PCB diossina-simili.

Provisional tolerable weekly intake (PTWI) Per piombo, cadmio e mercurio		
Metallo	PTWI	Riferimento
Pb	25 µg/kg p.c.	(JECFA, 1993)
Cd	7 µg/kg p.c.	(JECFA, 1989)
Hg	5 µg/kg p.c. di cui non più di 1,6 µg/kg p.c. per il metilmercurio	(JECFA, 1972; JECFA, 2004)

Tab. 7-1: Livelli tollerabili di assunzione settimanale per i metalli pesanti considerati

Se dunque da una parte le concentrazioni di metalli pesanti come Cd, Pb e Hg non rappresentano un problema reale per il consumo umano, dall'altra il quadro mostra una risorsa ittica fortemente a rischio. Alcuni studi hanno infatti dimostrato come un elevato numero di contaminanti chimici alterano i processi riproduttivi dei pesci interferendo con le funzioni endocrine (Donaldson, 1990). Tra questi contaminanti vi sono anche alcuni metalli pesanti come il Cadmio e Mercurio (Murphy *et al.*, 2005). Questi "endocrine disruptors", portano a disfunzioni delle sistema riproduttivo del pesce spada mediterraneo, alterando le capacità di adattamento agli agenti patogeni come il parassita *P. instructa*, indebolendo ulteriormente la popolazione e portandola verso un vortice di riduzione della risorsa ittica. Il pesce spada mediterraneo risente quindi sia di un impatto antropico che naturale. La pressione della pesca e la presenza di contaminanti di origine umana si sovrappongono alle condizioni ambientali sfavorevoli come l'isolamento genetico, la bassa risposta ai patogeni e la presenza di una provincia geochimica con elevate concentrazioni di fondo di mercurio. Per una gestione corretta dello stock non è quindi possibile prescindere dal considerare la pluralità delle cause ma è indispensabile affrontare il problema in un approccio multi metodologico.

8. Bibliografia

- Alvarado-Bremer, J.R., Viñasa, J., Mejuto, J., Ely, B., Pla, C. (2005). Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36**: 169-187.
- Alvarado-Bremer, J.R., Mejuto, J., Greig, T.W., Ely B. (1996). Global population structure of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) as revealed by analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of Marine Biology and Ecology* **197**: 295-310.
- Anderson, J.L., Depledge, M.H. (1997). A survey of total mercury and methylmercury in edible fish and invertebrates from Azorean waters. *Marine Environmental Research* **44**: 331.
- Arata, G.F. (1954). Contribution to the life history of the swordfish (*Xiphias gladius*) from the South Atlantic coast of the United States and Gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Sciences for Carribe* **4**: 183-243.
- Bedd, G., Waldmann, G.R. (1999). An holistic approach to fish stock identification. *Fisheries Research* **43**: 35-44.
- Bernhard, M., Brondi, A. (1986). Mercurio in organismi del mediterraneo. *Acqua-Aria*, nov.-dic.: 1063-1075.
- Brickle, P., MacKenzie, K. (2007). Parasites as biological tags for *Eleginops maclovinus* (Teleostei: Elegendinopidae) around the Falkland Islands. *Journal of Helminthology* **81**: 147–153.
- Canese, S., Garibaldi, F., Orsi Relini, L., Greco, S. (2008). Swordfish tagging with pop-Up satellite tags in the Mediterranean Sea. *ICCAT*.
- Canli, M., Atli, G. (2003). The relationship between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution* **121**, n.1: 129–136.

-
- Capelli, R., Drava, G., Siccardi, C., De Pellegrini, R., Minganti, V. (2004). Study of distribution of trace elements in six species of marine organisms of the Ligurian Sea (north-western Mediterranean) – comparison with previous findings. *Annali di Chimica* **94**, n.7-8: 533-546.
- Castro-Papillón, J., Soto-Buía, M., Rodríguez-Domínguez, H., Mejuto-García, J., Arias-Fernández, C., García-Estévez, J. (2002). Selecting parasites for use in biological tagging of the Atlantic swordfish (*Xiphias gladius*). *Fisheries Research* **59**: 259-262.
- Chow, S., Takeyama, H. (2000). Nuclear and mitochondrial DNA analyses reveal four genetically separated breeding units of the swordfish. *Journal of Fish Biology* **56**: 1087-1098.
- Chow, S., Okamoto, H., Uozumi, Y., Takeuchi, Y., Takeyama, H. (1997). Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Marine Biology* **127**: 359-367.
- Church, R.E. (1968). Broadbill swordfish in deep water. *Sea Front* **14**: 246-249.
- Cimmaruta, R., Nascetti, G., Bullini, L. (1998). Fisheries and gene diversity conservation: the case of swordfish and bluefin tuna in the Mediterranean Sea. *INTECOL*. Firenze.
- Cimmaruta, R., Nascetti, G., Bullini, L. (1996). Primi dati sulla struttura genetica di alcune specie di grandi pelagici del Mediterraneo. *Biologia Marina Mediterranea* **3**: 400-406.
- Cimmaruta, R., Paoletti, M., Bondanelli, P., Santos, M.N., Garcia, A., G Nascetti, G. (2006). Genetic structure of Mediterranean and Atlantic swordfish: current status, controversies and future directions. *ICCAT - Swordfish Stock Structure Workshop*. Crete, 2006. Collection Volume of the Scientific Papers of ICCAT.
- Counter, S.A., Buchanan, L.H. (2002). Neuro-ototoxicity in andean adults with chronic lead and noise exposure. *Journal for the Occupational Environment Medicine* **44**: 30-38.
- Demirak, A., Yilmaz, F., Levent Tuna A, Ozdemir, N. (2006). Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. *Chemosphere* **63**, n.9: 1451-1458.
-

-
- Di Paolo, M., D'Amelio, S., Mattiucci, S., Paggi, L., Orecchia, P., Cianchi, R., Nascetti, G., Bullini, L. (1994). Helminth parasites of swordfish (*Xiphias gladius* L.) caught off Ustica island (South Tyrrhenian Sea). *Parassitologia* **36**: 48.
- Donaldson, E.M. (1990). Reproductive indices as measures of the effects of environmental stressors in fish. *American Fisheries Society Symposium* **8**:109-122.
- Euzet, L., Quignard, J.P. (1961). Sur deux parasites de *Xiphias gladius* L. *Commission International de l'Exploration Scientifique del Mediterrane*. 321-323.
- Fitzgerald, W.,F., Engstrom, D.R., Mason, R.P., Nater, E.A. (1998). The case for atmospheric Mercury contamination in remote areas. *Environmental Science and Technology* **32**, n.1.
- Fossi, M.C., Ancora, S., Casini, S., Moscatella, A., Ausili, A., Notarbartolo-di-Sciarra, G. (2001). Do endocrine disrupting chemicals threaten Mediterranean swordfish? Preliminary results of vitellogenin and Zona radiata proteins in *Xiphias gladius*. *Marine Environmental Research* **52**: 477-483.
- Fossi, M.C., Casini, S., Marsili, L., Ancora, S., Mori, G., Neri, G., Romeo, T., Ausili, A. (2004). Evaluation of ecotoxicological effects of endocrine disrupters during a four-year survey of the Mediterranean population of swordfish (*Xiphias gladius*). *Marine Environmental Research* **58**: 425-429.
- Garcia, A., Santos, M.N., Damiano, S., Nascetti, G., Mattiucci, S. (2008). The metazoan parasites of swordfish from Atlantic tropical–equatorial waters. *Journal of Fish Biology* **73**: 2274–2287.
- Gibson, D.I., Bray, R.A. (1977). The Azygiidae, Hirudinellidae, Ptychogonimidae, Sclerodistomidae and Syncoeliidae of fishes from the north-east Atlantic. *Bulletin of British Museum (Natural History)* **32**, n.6: 167-245.
- Gomez-Cabrera, C. (1988). Cestode parasites of *Xiphias gladius* L. (Pisces: Xiphiidae) in Spanish coastal waters. *Revista iberica de Parassitología* **47**, n.4: 347-350.
- Gyllesten, U., Wharton, D., Wilson, A.C. (1985). Maternal inheritance of mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice. *Journal Hered* **76**: 321-324 .

-
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001). PAST: PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS. *Palaeontologia Electronica* **4**, n.1: 9.
- Hogan, W.E., Bratney, J., Hurlbut, T.R. (1985). *Pennella filosa* and *Pennella instructa* (Copepoda: Pennellidae) on Swordfish (*Xiphias gladius* L.) from the Northwest Atlantic Ocean. *Journal of Parasitology* **71**, n.1: 111- 112.
- Hogan, W.E., Bratney, J., Uhazy, L., Hurley, P. (1983). Helminth parasites of swordfish (*Xiphias gladius* L.) from the Northwest Atlantic Ocean.» *Journal of Parasitology* **69**: 1178–1179.
- ICCAT. (2008). *ICCAT ANALYSIS OF MEDITERRANEAN SWORDFISH MANAGEMENT MEASURES*. Analysis SWO-MED Management Measures, Madrid.
- ICCAT. (2006). REPORT OF THE 2006 ICCAT WORKSHOP ON SWORDFISH STOCK STRUCTURE.» Crete, 1-23.
- Iles, C. (1971). *Fistulicola plicatus* (Cestoda) and *Tristoma* spp. (Trematoda) on Swordfish from the Northwest Atlantic. *Journal Fisheries Research Board of Canada* **28**: 31-34.
- Kalay, M., Ay, Ö., Canli, M. (1999). Heavy metal concentrations in fish tissues from the Northeast Mediterranean Sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **63**: 673–681.
- Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Oehme, G., Focardi, S., Giesy, J.P. (2002). Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in marine mammals, fishes and birds from coast of the Baltic and Mediterranean Seas. *Environmental Science Technology* **35**, n.15: 3210-3216.
- Khan, R.A., Tuck, C. (1995). Parasites as biological indicators of stocks of Atlantic cod (*Gadus morhua*) off Newfoundland, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**: 195-201.
- Kotoulas, G., Magoulas, A., Tsimenides, N., Zouros, E. (1995). Marked mitochondrial DNA differences between Mediterranean and Atlantic populations of the swordfish, *Xiphias gladius*. *Molecular Ecology* **4**: 473-481.

-
- Kotoulas, G., Mejouto, J., Kasapidi, P., Tserpes, G., Antoniou, A., Garcia-Cortes, B., Peristeraki, P., Oikonomaki, K., Magoulas, A. (2006). Genetic structure of the swordfish *Xiphias gladius* stock in the Atlantic using microsatellite DNA analysis. *ICCAT - Swordfish Stock Structure Workshop*. Crete, 2006. Collection Volume of the Scientific Papers of ICCAT.
- Kume, S., Joseph, J. (1969). Size composition and sexual maturity of billfish caught by the Japanese longline fishery in the Pacific Ocean east of 130°W. *Bulletin of the Far Seas Fisheries Research Laboratory* **2**:115-162.
- Langston, W.J. (1990). In *Toxic effects of metals and the incidence of marine ecosystems*, di Furness R.W. e Rainbow P.S.. New York: CRC Press.
- Lester, R.J.G., Mackenzie, K. (2009). The use and abuse of parasites as stock markers for fish.» *Fisheries Research* in press.
- Lester, R.J.G., Barnes, A., Habib, G. (1985). Parasites of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*: fishery implications.» *Fishery Bulletin* **83**:343-356.
- Lester, R.J.G., Roubal, F.R. (1995). Copepoda: Pennellidae in: Fish Disease and Disorders. Vol. 11, in *Protozoan And Metazoan Infections*, 808. Wo P.T.K.
- Lu, C.P., Mejuto, J., Yeh, S.Y. (2006). Atlantic swordfish stock structure inferred by mitochondrial control region DNA sequence characters. *ICCAT - Swordfish Stock Structure Workshop*. Crete, 2006. Collection Volume of the Scientific Papers of ICCAT.
- Mackenzie, K. (2002). Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. *Parasitology* **124**:153-163.
- Mackenzie, K. (1987). Parasites as indicators of host populations. *International Journal for Parasitology* **17**:345-352.
- Mackenzie, K., Abaunza, P. (1998). Parasites as biological tags for stock discrimination of marine fish: a guide to procedures and methods. *Fisheries Research* **38**:45-56.
- MacKenzie, K., Abaunza, P. (2005). Parasites as biological tags. In *Stock Identification Methods. Applications in Fisheries Science*, di Cadrin, S. X., Friedland, K.D., Waldman, J.R. 211–226. San Diego: Academic Press.

-
- Marcogliese, D.J. (2005). Parasites of the supeorganism: are they indicators of ecosystem health? *International Journal for Parasitology* **35**, n.7: 705-716.
- Maruyama, S. (1996). Response to Minamata disease. In *The Long road to recovery*, di Mitchell, J.K. 41-59. Tokyo: United Nation University Press.
- Mattiucci, S., Nascetti, G. (2006). Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update.» *Parasité* **13**: 99-113.
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Ishikura, H., Kikuchi, K., Sato, N., Cianchi, R., Bullini, L. (1998). Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contracaecum*, and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). *Systematic Parasitology* **40**: 81-92.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Dailey, M., Webb, S.C., Barros, N.B., Cianchi, R., Bullini, L. (2005). Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology* **61**: 157-161.
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Portes Santos, C., Costa, G., Di Benedetto, A.P., Ramos, R., Argyrou, M., Cianchi, R., Bullini, L. (2002). Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845. *Systematic Parasitology* **51**: 159-170.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Damiano, S., Webb, S.C., George-Nascimento, M., Berland, B., Garcia, A., Nascetti, G. (2008a). New genetic and ecological data on *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae), with evidence for new sibling species. *Parassitologia* **50**:20.
- Mattiucci, S., Abaunza, P., Damiano, S., Garcia, A., Santos, M.N., Nascetti, G. (2007). Distribution of *Anisakis* larvae, identified by genetic markers, and their use for stock characterization of demersal and pelagic fish from European waters: an update. *Journal of Helminthology* **81**:117-127.
- Mattiucci, S., Abaunza, P., Ramadori, L., Nascetti, G. (2004). Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stocks recognition. *Journal of Fish Biology* **65**, n.2: 495-510.

-
- Mattiucci, S., D'Amelio, S., Di Paolo, P., Orecchia, P., Cianchi, R., Nascetti, G., Bullini, L. (1994). Genetic data supporting the existence of two species within *Hysterothylacium corrugatum* (Ascaridida, Anisakidae) from the swordfish. *Parassitologia* **36**: 91.
- Mattiucci, S., Farina, V., Campbell, N., Mackenzie, K., Ramos, P., Pinto, A.L., Abaunza, P., Nascetti, G. (2008b). *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fisheries Research* **89**:146-151.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Bullini, L., Orecchia, P., Paggi, L. (19686). Genetic structure of *Anisakis physeteris* and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae). *Parasitology* **93**: 383-387.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Cianchi, R., Paggi, L., Margolis, J., Webb, S.C., D'Amelio, S., Orecchia, P., Bullini, L. (1997). Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Journal of Parasitology* **83**: 401-416.
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Abollo, E., Webb, S.C., Pascual, S., Cianchi, R., Bullini, L. (2001). Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *International Journal for Parasitology* **31**: 9-14.
- McIntyre, A.D., Pearce, J.B. (1980). Biological Effects of Marine Pollution and the Problems of Monitoring. *ICES - Rapports et Procés Verbaux des Reunions*. Copenhagen: J.B., Editors.
- Mendez, E., Giudice, H., Pereira, A., Inocente, G., Medina, D. (2001). Total Mercury content fish-weight relationship in swordfish (*Xiphias gladius*) caught in the southwest Atlantic Ocean. *Journal of Food Composition and Analysis* **14**: 453-460.
- Murphy, C.A., Rose, K.A., Thomas, P. (2005). Modeling vitellogenesis in female fish exposed to environmental stressors: predicting the effects of endocrine disturbance due to exposure to a PCB mixture and cadmium. *Reproductive Toxicology* **19**, n.3: 395-409.

-
- Murray, M.G., Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**: 4321-4325.
- Nadler, S.A., Hudspeth, D.S.S. (2000). Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *Journal of Parasitology* **86**: 380-393.
- Nascetti, G. (1997). Genetic Erosion and parasitic infections: new tools for the evaluation of the state of blue fin tuna and swordfish in the Mediterranean Sea. Final Report EC, CFP, 1997-96.
- Nascetti, G., Paggi, L., Orecchia, P., Smith, J.W., Mattiucci, S., Bullini, L. (1986). Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North East Atlantic. *International Journal for Parasitology* **16**: 633-640.
- Nauen, C., Tomassi, G., Santaroni, G.P. (1980). Mercury levels in selected marine organisms from the Mediterranean. *UNEP/FAO/WHO Meeting of experts on environmental quality criteria for mercury in Mediterranean seafood*. Geneva: UNEP, 1980-6.
- Noss, R.F. (1990). Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology* **4**: 355-364.
- O'Brien, S.J., Evermann, J.F. (1988). Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* **3**, n.10: 254-259.
- Oliva, M.E., Fernandez, I., Oyarz, C., Murillo, C. (2008). Metazoan parasites of the stomach of *Dissostichus eleginoides* Smitt 1898 (Pisces: Notothenidae) from southern Chile: A tool for stock discrimination? *Fisheries Research* **91**: 119-122.
- Oliva, M.E., (2001). Metazoan parasites of *Macruronus magellanicus* from southern Chile as biological tags. *Journal Fish Biology* **58**: 1617-1622.
- Oliva, M.E., Ballon, I. (2002). Metazoan parasites of the Chilean hake *Merluccius gayi* as a tool for stock discrimination. *Fisheries Research* **56**: 313-320.

-
- Paggi, L., Mattiucci, S., D'Amelio, S., Nascetti, G. (1998). Nematodi del genere *Anisakis* in pesci, cefalopodi e cetacei del Mar Mediterraneo, dell'Oceano Atlantico e Pacifico. *Biologia Marina Mediterranea* **5**, n.3: 1585-1592.
- Papetti, P. Rossi, G. (2009). Heavy metals in the fishery products of low Lazio and the use of metallothionein as a biomarker of contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, (accepted): DOI 10.1007/s10661-008-0725-4.
- Petter, A.J., Maillard, C. (1987). *Ascarides de Poisson de Méditerranée occidentale. Bulletin of the Museum of Natural History, Paris* **4**, n.9: 773-798.
- Prasher, D. (2009). Heavy metals and noise exposure: health effects. *Noise and Health* **11**, n.44: 141-144.
- Reeb, C.A., Block, B.A. (2006). Ten microsatellite loci show that Mediterranean swordfish are genetically unique from other populations worldwide. *ICCAT - Swordfish Stock Structure Workshop*. Crete, 2006. Collection Volume of the Scientific Papers of ICCAT.
- Reeb, C.A., Arcangeli, L., Block, B.A. (2003). Development of 11 microsatellite loci for population studies in the swordfish, *Xiphias gladius* (Teleostei: Scombridae). *Molecular Ecology Note*. **3** n.1: 147-149.
- Reilly, C. (1996). *Selenium in food and health*. London: Chapman & Hall.
- Renzoni, A., Bacci, E., Bargagli, R., Focardi, S., Gaggi, G., Leonzio, C., Mattei, N. (1993). Diffusione e trasferimento dei contaminanti persistenti nelle catene trofiche dell'arcipelago toscano. In *Progetto Mare*, di Nuccio, C. 65-102. Firenze: Lab Ecol. Dip. Biol. Veget. Università degli Studi di Firenze.
- Renzoni, A., Bernhard, M., Sara, R., Stoeppler, M. (1979). Comparison between the Hg concentration of *Tunnus thynnus* from the Mediterranean and the Atlantic.» *IV Journées Etudes Pollution*. Antalya. 255-260.
- Richardson, R.H., Baverstock, P.R., Adams, M. (1986). *Allozyme electrophoresis. A Handbook for Animal Systematics and Population Studies*. New York: Academic Press.
- Rosel, P., Block, B.A. (1995). Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Marine Biology* **125**: 11-22.

-
- Ròsza, L., Reiczigel, J., Majoros, G. (2000). Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology* **86**: 228-232.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491 .
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R.A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeds of Natural Academy of Sciences U.S.A.* **74**: 5463-5467.
- Sella, M. (1911). Contributo alla conoscenza della riproduzione e dello sviluppo del pesce spada (*Xiphias gladius* L.). *Regio Comitato Talassografico Italiano, Memoria* **2**: 1-16.
- Severino, L., Anastasio, A. (2006). I contaminanti organici persistenti nel pesce allevato e pescato. *Il Pesce* **5**.
- Simpson, E.H. (1949). Measurement of diversity. *Nature* **163**: 688.
- Sindermann, C.J. (1990). *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish*. San Diego: Academic Press.
- Smith, P.J., B Diggles, B., Kim, S. (2004). *Evaluation of parasite markers to access swordfish stock structure*. WCPFC-SC3-BI SWG/ IP - 1, Hnolulu: National Institute of Water and Atmosphere Research.
- Southwood, T.R.E. (1978). *Ecological Methods*. 2nd Ed. London: Chapman & Hall.
- Speare, P., (1995). Parasites as biological tags for sailfish *Istiophorus platypterus* from east coast Australian waters. *Marine Ecology Progress Series* **118**: 43-50.
- Stefanelli, P., Ausili, A., Di Muccio, A., Fossi, C., Di Muccio, S., Rossi, S., Colasanti, A. (2004). Arsenic accumulation in the Organochlorine compounds in tissues of swordfish (*Xiphias gladius*) from Mediterranean Sea and Azores islands. *Marine Pollution Bulletin* **49**: 938–950.
- Storelli, M.M., Marcotrigiano, G.O. (2001). Total mercury level muscle tissue of swordfish (*Xiphias gladius*) and bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the Mediterranean Sea (Italy). *Journal of Food Protection* **64**: 1058–1061.

-
- Storelli, M.M., Giacomini-Stuffer, R., Storelli, A., Marcotrigiano, G.O. (2005). Accumulation of mercury, cadmium, lead and arsenic in swordfish and bluefin tuna from the Mediterranean Sea: A comparative study. *Marine Pollution Bulletin* **50**: 993-1018.
- Storelli, M.M., Giacomelli-Stuffer, R., Marcotrigiano, G.O. (2002). Total and methylmercury residues in cartilaginous fish from Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* **44**: 1354–1358.
- Taning, A.V. (1995). On the breeding areas of the Swordfish (*Xiphias gladius* L.). *Paper in Marine Biology and Oceanography* **3**: 438-450.
- Thompson, J., Gibson, D.T.J, Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, n.24: 4876-4878.
- Timi, J.T. (2007). Parasites as biological tags for stock discrimination in marine fish from South American Atlantic waters. *Journal of Helminthology* **81**: 107–111.
- Timi, J.T. (2003). Parasites of Argentine anchovy in the south-west Atlantic: latitudinal patterns and their use for discrimination of host populations. *Journal of Fish Biology* **63**: 90–107.
- Valentini, A., Mattiucci, S., Bondanelli, P., Webb, S., Mignucci-Giannoni, A., Colom-Lavina, M., Nascetti, G. (2006). Genetic relationships among *Anisakis* species. (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial cox-2 sequences, and comparison with allozyme data. *Journal of Parasitology* **92**, n.1: 156 – 166.
- Van Valen, L. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* **1**: 1-30.
- WHO. (2007). Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution. World Health Organization.
- Williams, H.H., Mackenzie, K., McCarthy, A.M. (1992). Parasites as biological indicators of the population biology, migrations, diet, and phylogenetics of fish. *Review in Fish Biology and Fisheries* **2**: 144-176.
- Ylmaz, A.B. (2003). Levels of heavy metals (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb, and Zn) in tissue of *Mugil cephalus* and *Trachurus mediterraneus* from Iskenderun Bay, Turkey. *Environmental Research* **92**: 277–281.

Allegato 1

PRODOTTO	TENORE MASSIMO
PIOMBO	
Muscolo di pesce¹	0.30
Crostacei ad eccezione delle carni scure del granchio, della testa e del torace di aragosta e analoghi grossi crostacei (<i>Nephropidae e Palinuridae</i>)	0.50
Molluschi bivalvi	1.50
Cefalopodi senza visceri	1.00
CADMIO	
Muscolo di pesce ¹ , escluse le specie elencate al punto successivo	0.05
Muscolo dei seguenti pesci ¹ : acciuga (<i>Engraulis species</i>), palamita (<i>Sarda sarda</i>), sarago fasciato comune (<i>Diplodus vulgaris</i>), anguilla (<i>Anguilla anguilla</i>), cefalo (<i>Mugil labrosus labrosus</i>), suro o sugarello (<i>Trachurus species</i>), luvaro o pesce imperatore (<i>Lutjanus imperialis</i>), sardina (<i>Sardina pilchardus</i> e <i>Sardinops species</i>), tonno e tonnetto (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> e <i>Katsuwonus pelamis</i>), sogliola cuneata (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	0.10
Muscolo di pescce spada (<i>Xiphias gladius</i>)	0.30
Crostacei ad eccezione delle carni scure del granchio, della testa e del torace di aragosta e analoghi grossi crostacei (<i>Nephropidae e Palinuridae</i>)	0.50
Molluschi bivalvi	1.00
Cefalopodi senza visceri	1.00
MERCURIO	
Prodotti della pesca e muscolo di pesce ¹ escluse le specie elencate al punto successivo. Il tenore massimo si applica ai crostacei, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (<i>Nephropidae e Palinuridae</i>)	0.50
Muscolo dei seguenti pesci ¹ : rana pescatrice (<i>Lophius species</i>), pesce lupo (<i>Anarhichas lupus</i>), palamita (<i>Sarda sarda</i>), anguilla (<i>Anguilla anguilla</i>), pesce specchio (<i>Hoplostethus species</i>), pesce topo (<i>Coryphaenoides rupestris</i>), ipoglosso (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>), marlin (<i>Makaira species</i>), rombo del genere <i>Lepidorhombus</i> (<i>Lepidorhombus species</i>), triglia (<i>Mullus species</i>), luccio (<i>Esox lucius</i>), palamita bianca (<i>Orcynopsis unicolor</i>), cappellano (<i>Tricopterus minutes</i>), squalo portoghese (<i>Centroscymnus coelolepis</i>), razze (<i>Raja species</i>), scorfano del genere <i>Sebastes</i> (<i>Sebastes marinus</i> , <i>S. mentella</i> , <i>S. viviparus</i>), pesce vela del Pacifico (<i>Istiophorus platypterus</i>), pesce sciabola (<i>Lepidopus caudatus</i> , <i>Aphanopus carbo</i>), pagello (<i>Pagellus species</i>), squali (tutte le specie), tirsite (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettus pretiosus</i> , <i>Gempylus serpens</i>), storione (<i>Acipenser species</i>), pescce spada (<i>Xiphias gladius</i>), tonno e tonnetto (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> e <i>Katsuwonus pelamis</i>)	1.00

Allegato 1: Limiti di Pb, Cd e Hg (mg/kg di peso fresco) nei prodotti della pesca come da Regolamento CE n. 1881/2006.

¹= quando il pesce deve essere consumato intero, il tenore massimo si applica al pesce intero.