

Università degli Studi di Palermo

Facoltà Di Scienze MM.FF.NN

Dipartimento Di Scienze E Tecnologie Biologiche Chimiche E Farmaceutiche

SSD-BIO/05

Dottorato di Ricerca in Biologia Ambientale e Biodiversità

Indirizzo in Biologia Animale

Ciclo XXIX

***Composizione aminoacidica degli occhi di piccoli pesci pelagici
in relazione ai processi oceanografici negli habitat di
deposizione***

Tutor

Prof. Matteo Cammarata

Dottoranda: Falco Francesca

Co-Tutor

Dott. Salvatore Mazzola

Dott.ssa Angela Cuttitta

IAMC-CNR

Coordinatore Prof. Marco Arculeo

We are what we think, therefore think excellence

Indice

Indice.....	3
Obiettivo del lavoro.....	5
Capitolo 1	11
Introduzione	11
1.1 Origini del Mediterraneo e la circolazione superficiale	11
1.2 Circolazione intermedia.....	16
1.3 Circolazione profonda.	18
1.4 La circolazione nel Canale di Sicilia	20
Capitolo 2	24
Studio della specie.....	24
2.1 Piccoli pesci pelagici	24
2.2 Areale di distribuzione dei piccoli pesci pelagici.....	29
2.4 Morfometria.....	34
2.5 Macromolecole lipidi e carboidrati.	35
2.6 Gli amminoacidi.	36
2.7 Enzimi	39
Capitolo 3	42
Materiali e Metodi.....	42
3.1 Piano di Campionamento	42
3.2 Campionamento.....	42
3.2.1 <i>Sorting</i>	44
3.3 Morfometria.....	46
3.4 Lipidi e Carboidrati	48

3.5 Gli aminoacidi	50
3.5.1 Idrolisi acida con HCl	50
3.5.2 Analisi di amminoacidi con HPLC system	52
3.6 Gli Enzimi	54
3.6.3 Analisi dei dati	54
3.6.1 Valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina.....	55
3.6.2 Valutazione dell'attività perossidasi.....	55
3.7 Statistica	55
Capitolo 4.....	58
Risultati	58
4.1 Risultati sui dati morfometrici.....	58
4.2 Confronto dei dati morfometrici (2012- 2013-2015)	63
4.3 Risultati sulle analisi biochimiche.....	68
4.3.1 Esperimento preliminare per la determinazione dei Lipidi e Carboidrati	69
4.3.2 Analisi di lipidi e carboidrati.....	70
4.4 Discriminazione della composizione aminoacidica di due diverse specie (Sardina pilchardus e Danio rerio).....	73
4.5 Confronto dei dati tra le diverse specie	78
4.6 Risultati della composizione aminoacidica nella specie Engraulis encrasicolus (Linnaeus, 1758).....	79
4.7 Analisi enzimatica	93
4.8 Dati Ambientali	94
Capitolo V	96
Discussione	96
Conclusioni	109
Bibliografia	114

Obiettivo del lavoro

L'importanza dei piccoli pesci pelagici negli ecosistemi marini va ben oltre ciò che la loro dimensione suggerisce. Si tratta di specie che abitano molti degli ecosistemi riproduttivi del mondo e soprattutto le zone in cui si verificano fenomeni di risalita delle acque fredde oceaniche profonde “up-welling”, come nel Canale di Sicilia. Questi piccoli pesci planctotrofici svolgono un doppio ruolo nella dinamica della catena trofica degli ecosistemi marini: quello di tipo top-down (cioè controllano la struttura e la dinamica di una comunità dall’alto verso il basso, principalmente gli organismi planctonici) e quello di tipo bottom-up (funzione di regolazione dal basso verso l’alto), rivolta principalmente al controllo sui predatori (Cury *et al.*, 2000).

Nel Canale di Sicilia tra le specie di piccoli pesci pelagici di particolare importanza, sia dal punto di vista ecologico che dal punto di vista commerciale, le acciughe (*Engraulis encrasicolus*) e le sardine (*Sardina pilcardus*) sono le più rappresentate, sebbene sia presente in tale area una complessa comunità di pesci pelagici quali sgombri (*Scomber scombrus* e *Scomber Japonicus*), tracuri (*Trachurus trachurus* e *T. mediterraneus*), ecc. (Garcia *et al.*, 1996; Palomera *et al.*, 2007).

Oltre al loro importante ruolo ecologico, i piccoli pesci pelagici sono anche un elemento importante della pesca di tutto il mondo; essi infatti rappresentano oltre un terzo della resa globale di pesci marini e contribuiscono in modo significativo all'economia di molti paesi (Hunter e Alheit, 1995; Pikitch *et al.*, 2014). Molto spesso vengono utilizzati come indicatori ambientali (Peck *et al.*, 2013) perché rispondono rapidamente ai cambiamenti fisici dell’ambiente in cui vivono. La risposta ai cambiamenti ecosistemici dei piccoli pesci pelagici fornisce informazioni anche sulla dinamica degli stock ittici studiati. In questo complesso contesto si è scelto di focalizzare l’attenzione sulle aree di deposizione dell’acciuga europea (*Engraulis encrasicolus*) nel Canale di Sicilia, area ad

elevata dinamica dal punto di vista della circolazione delle masse d'acqua e sede di specifici fenomeni oceanografici. Attraverso studi precedenti, si è osservata la particolare influenza della variabilità ambientale sulla dinamica della popolazione durante i primi stadi di vita, soprattutto in termini di mortalità e crescita (Lasker, 1975; Crawford et al., 1987; Cury & Roy, 1989; Bakun, 1996; Schwartzlose et al., 1999; Takahashi & Watanabe, 2004a, 2004b; Palomera et al., 2007; Houde, 2008). Nel Canale di Sicilia, l'acciuga europea, il cui *habitat* si estende lungo la costa meridionale della Sicilia, ha sviluppato una strategia riproduttiva che è accoppiata alla circolazione superficiale della corrente Atlantica (AIS - Robinson et al., 1999). Dal punto di vista oceanografico, questa area mostra un sistema di circolazione a mesoscala complesso, caratterizzato dalla presenza di up-welling costiero, con vortici ciclonici ed anticiclonici nella parte sud occidentale (Banco Avventura) e da un fronte termoclinico situato nella parte sud-orientale del Canale sul Banco Maltese (Robinson et al., 1999 ; Beranger et al., 2004; Bonanno et al., 2006; Basilone et al., 2013).

Viste la complessità e la variabilità del sistema di circolazione nel Canale di Sicilia, in cui si trovano le popolazioni di piccoli pesci pelagici, si è scelto di effettuare uno studio che aiuti a comprendere e a spiegare in che modo la natura dell'ambiente possa influenzare la fisiologia della specie, al fine di determinare un rapido adattamento ad esso, evitando l'approccio conservazionistico basato sul trattamento separato dell'ambiente e della specie. L'obiettivo principale del presente studio è quello di valutare la composizione aminoacidica degli occhi di piccoli pesci pelagici in relazione ai processi oceanografici negli *habitat* di deposizione. La scelta di proporre uno studio sulla composizione aminoacidica degli occhi di *E. encrasicolus* è stata suggerita da studi pregressi che ne hanno evidenziato le potenzialità (Riveiro et al., 2011; Falco et al., 2016). In particolare, le misurazioni morfometriche e le analisi della composizione aminoacidica (AAC), degli enzimi, dei lipidi e carboidrati effettuati sulle larve di

acciuja, hanno permesso di valutare se le diverse caratteristiche ambientali delle due aree possono influenzare le larve di *Engraulis encrasicolus* all'interno del Canale di Sicilia. Nello sviluppo dello studio si è adottato un approccio fortemente multidisciplinare. Infatti, oltre alle variabili ambientali, sono state considerate anche l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina e della perossidasi e la composizione biochimica.

I risultati ottenuti dall'analisi biochimica hanno evidenziato come questa innovativa tipologia di studio può essere di supporto per accrescere le conoscenze sulla biologia dell'*E. encrasicolus*, in relazione all'ambiente in cui vive la specie. Lo studio ha permesso inoltre di valutare gli ambienti complessi che si generano all'interno del Canale di Sicilia, sotto l'influenza di masse d'acqua di origine atlantica che producono rimescolamenti delle acque superficiali con un forte impatto sulla vita dei piccoli pelagici.

L'obiettivo è stato raggiunto attraverso il conseguimento dei seguenti obiettivi specifici:

- Reperimento e studio della bibliografica;
- Studio dello stato dell'arte sulle larve di piccoli pelagici nel Canale di Sicilia e nel Mediterraneo;
- Analisi dei parametri morfometrici per la discriminazione dei gruppi di larve campionate nelle due principale sub-aree (Banco Avventura e Banco Maltese);
- Studio e valutazione delle condizioni delle aree spawning attraverso il confronto delle condizioni nutrizionali con la determinazione di lipidi e carboidrati;
- Messa a punto di test biochimici su tessuti oculari di due differenti specie di pesci (*Danio rerio* e *Sardina pilchardus*);

- Introduzione di nuovi test biochimici per la determinazione dell'ottimalità dell'area di deposizione, attraverso la composizione aminoacidica nel bulbo oculare di *Engraulis encrasicolus*;
- Studio delle correlazioni tra le variabili ambientali ed i parametri sopra indicati per l'individuazione di eventuali adattamenti a pattern ambientali caratteristici dell'area di spawning da parte della specie *E. encrasicolus*;
- Determinazione degli eventuali fattori di stress a cui la specie viene sottoposta nei differenti regimi idrografici che caratterizzano le due grandi aree all'interno del Canale, attraverso l'analisi enzimatica di fosfatasi alcalina e perossidasi.

Per quanto riguarda quest'ultimo punto, le concentrazioni enzimatiche sono state interpretate come risposta degli organismi ad eventuali fattori di stress, visto che le zone costiere sono in genere sottoposte a una serie di fattori stressogeni, sia naturali che antropici, che possono mettere in pericolo la salute e la forma fisica del biota residente. I fattori di stress possono essere diversi, come ad esempio la presenza di sostanze inquinanti, l'assenza di sostanze nutritive, l'ipossia, la torbidità della colonna d'acqua, i cambi repentini di temperatura e salinità o differenti regimi idrologici. Tutti questi processi possono avere un impatto sulle comunità che vivono in questi ambienti particolari, attraverso processi singoli, cumulativi o sinergici.

Il lavoro di ricerca effettuato durante il corso di dottorato ha tenuto conto degli studi pregressi, puntando ad approfondire e ad ampliare il repertorio di dati acquisiti negli anni precedenti. Non è stato un caso che, per testare i nuovi metodi applicativi, la scelta della specie sia ricaduta sull'*E. encrasicolus*; su quest'ultima, infatti, vi è un'ampia letteratura relativa alla biologia, al comportamento, alla distribuzione e all'area di riproduzione all'interno del Canale di Sicilia; informazioni che hanno supportato l'interpretazione dei dati analitici ottenuti nel presente studio.

Per recuperare gli esemplari larvali da sottoporre allo studio, sono stati organizzati una serie di campionamenti nel periodo estivo nel Canale di Sicilia, attraverso strumenti dedicati a questo tipo di campionamento, quali Bongo 90 e bongo 40, installati su imbarcazioni del CNR (“G. Dallaporta” e “Minerva Uno”).

L’area del Canale di Sicilia in questo studio è stata inizialmente suddivisa in cinque Zone, facendo riferimento a quanto trovato in letteratura da Cuttitta et al. (2004): le prime tre si trovano all’interno dell’isobata dei 200 m, mentre le Zone 4 e 5 individuano delle aree off-shore. In tale studio è stata, inoltre, aggiunta un’ulteriore Zona, denominata Maltese (Fig. 1).

In particolare, sono state individuate le seguenti zone:

- la Zona 1 rappresenta il tratto di mare all’interno dell’isobata di 200 m che si estende da Mazara del Vallo (37.70935 N-12.56556 E) a Sciacca (37.525N-13.046E);
- la Zona 2 rappresenta la parte costiera che si estende da Sciacca (37.525N-13.046E) a Gela (37.111N-14.211E);
- la Zona 3 rappresenta il tratto di mare che si estende da tra Gela (37.111N-14.210E) e Capo Passero (SR) (36.685N-15.140E);
- la Zona 4 si estende oltre l’isobata dei 200 m nelle acque del Mare Ionio;
- la Zona 5 rappresenta il tratto di mare denominato off-shore che si estende oltre l’isobata dei 200 m, tra Gela e Ragusa;
- la Zona di Malta invece, rappresenta la parte di mare intorno all’arcipelago Maltese (36.049N-14.172E) e (35.693N-14.897E).

La suddivisione aveva l’obiettivo di analizzare sia le aree di spawning che le possibili aree di ritenzione degli stadi larvali di *Engraulis encrasicolus*. Un’analisi attenta dei risultati ottenuti ha spinto a raggruppare le summenzionate aree e ad individuare due

grandi aree denominate: Banco Avventura (BA) e Banco Maltese (BM). Nello specifico:

- l'area del Banco Avventura comprendente le Zone 1, 2 e 5;
- l'area del Banco Maltese comprendente le Zone 3, 4 e Malta.

Questa suddivisione ha permesso di eseguire una serie di analisi statistiche su un numero di campioni significativo per potere dare maggiore robustezza ai risultati ottenuti.



Figura 1 Rappresentazione delle macroaree del Banco Avventura (in giallo) e del Banco Maltese (in Rosso)

Nell'ambito del corso di Dottorato è stato svolto uno stage presso il Dipartimento Kleberg Animal and Food Sciences Center (A&M University Texas) College Station; il lavoro ha riguardato la messa a punto della metodica per lo studio della composizione aminoacidica negli occhi di due differenti specie (*Danio rerio* e *Sardina pilchardus*) allo stadio larvale. I relativi risultati sono riportati nel paragrafo riguardante la sezione degli aminoacidi.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Origini del Mediterraneo e la circolazione superficiale

La comprensione dell'area di studio diventa di fondamentale importanza, per capire in quale luogo complesso viene svolto lo studio del presente lavoro. Il Mediterraneo ha delle caratteristiche geomorfologiche e una biogeografia tale da renderlo unico; E' la rappresentazione di una evoluzione complessa, la metamorfosi dell'antico oceano denominato Tetide, che disposto in senso equatoriale, separava il continente settentrionale (Laurasia) da quello meridionale (Gondwana).

Il Tetide rappresentava una connessione tra i due più grandi oceani: l'oceano Atlantico e l'Oceano Indo-pacifico. Vi furono una serie di cambiamenti geologici, legati all'avanzamento della placca Africana sotto quella Europea che portano la chiusura del versante orientale, portando alla formazione di un unico grande golfo. Nel miocene, dopo la separazione con il versante orientale, il Mediterraneo si trasformò in un grande lago salato. A causa della posizione equatoriale era caratterizzato da forti evaporazioni, così fu abitato da popolazioni che adesso sono dei fossili che ci ricordano il lungo periodo di chiusura (circa 13.MA). Fu proprio durante il periodo definito "crisi salina" che parte del biota Tetideo si estinse.

Nel Pliocene (5M di anni fa) avvenne nuovamente l'apertura dello Stretto di Gibilterra che ripristinò la popolazione del Mediterraneo, ma le specie erano di origine atlantica, caratterizzando la sua biogeografia in provincia Atlantica. Nel settore orientale, l'apertura del Canale di Suez (1869) unisce il Mediterraneo al Mar Rosso e all'Oceano Indiano. Questa nuova connessione portò a modificazioni della Biodiversità all'interno

del Canale di Sicilia. Infatti, L'apertura del Canale di Suez porto all'introduzione di specie aliene, tra cui ci sono: "il *Laocephalus scelleratus*un, un pesce tossico che può essere mortale per l'uomo, meduse, come la specie *Rhopilema nomadica*, che hanno provocato forti impatti nelle parte orientale del bacino del Mediterraneo, pesci predatori di altre specie pesci come il *Siganus luridus* e *Siganus rivulatus*, che sostituiscono gli 'autoctoni' del Mediterraneo provocando una cambiamento ambientale significativo". E ancora: *l'Upeneus moluccensis* ha sostituito la triglia *Mullus barbatus*. Alcuni gamberi alieni hanno rimpiazzato la specie autoctona *Melicertus kerathurus*.

Secondo una classificazione fatta da Bianchi & Morri (2000), tutta la Sicilia e Malta fanno parte del Bacino Occidentale, mentre le isole pelagie appartengono al Bacino Orientale. Il Mar Mediterraneo nel suo insieme costituisce una provincia della regione caldo-temperata Atlanto-Mediterranea. Dal punto di vista biogeografico, il Mediterraneo non è per nulla omogeneo, proprio a causa della complessità della sua storia geologica, ma anche la sua grande varietà climatica e idrografica, hanno recentemente portato al riconoscimento di tredici distinti settori biogeografici (Fig.1.1.1).

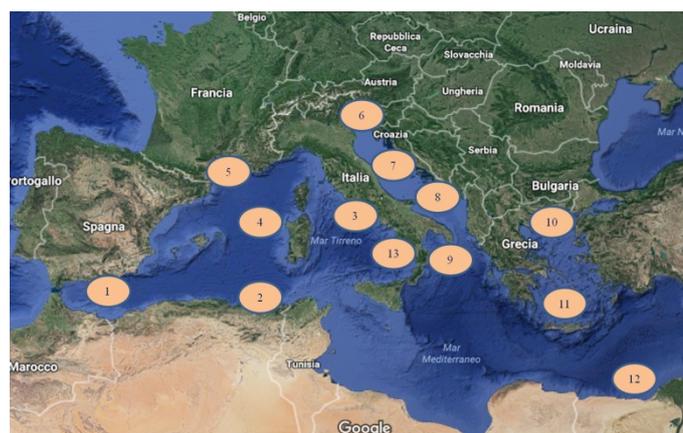


Figura 1.1.1 Settori biogeografici del mediterraneo

A causa delle differenze di temperature lungo il profilo termico possono essere distinte tre differenti zone: una meno profonda con temperature simili a quelle superficiali con

spessore variabile tra 50 e 200 m, dove l'azione del vento produce un rimescolamento delle masse d'acqua, detta "epilimnio"; una intermedia (tra i 200 e 500 m) caratterizzata da temperatura in rapida decrescita "termoclino" ed una profonda con temperatura lentamente decrescente, "l'ipolimnio" oltre i 500 m di profondità.

Le acque del Mediterraneo tendono naturalmente a riscaldarsi e ad evaporare nel percorso dallo Stretto di Gibilterra al Mar di Levante (bacino orientale), generando un gradiente di salinità e di temperatura da ovest verso est, permettendo l'ingresso superficiale di acqua più fredda e a più bassa salinità dall'Atlantico. Determinando così una circolazione profonda inversa, che porta le acque più dense e salate del bacino orientale ad uscire attraverso lo Stretto di Gibilterra.

Il clima nella regione Mediterranea è caratterizzato da estati calde e secche ed inverni freddi ed umidi. La temperatura marina superficiale media annuale mostra un'alta stagionalità e importanti gradienti da ovest ad est e da nord a sud.

Il profilo della salinità essendo strettamente correlato a quello della temperatura è più complesso.

Il Mar Mediterraneo presenta valori di salinità maggiori (38 ‰) rispetto a quelli dell'oceano, poiché l'evaporazione non è compensata sufficientemente dalle precipitazioni e dagli afflussi fluviali ma da correnti oceaniche. In corrispondenza dello Stretto di Gibilterra l'acqua Atlantica superficiale, meno salata, entra nel Mediterraneo ed una corrente più profonda, con direzione opposta asporta acqua più salata dal bacino (Fig.1.1.2).

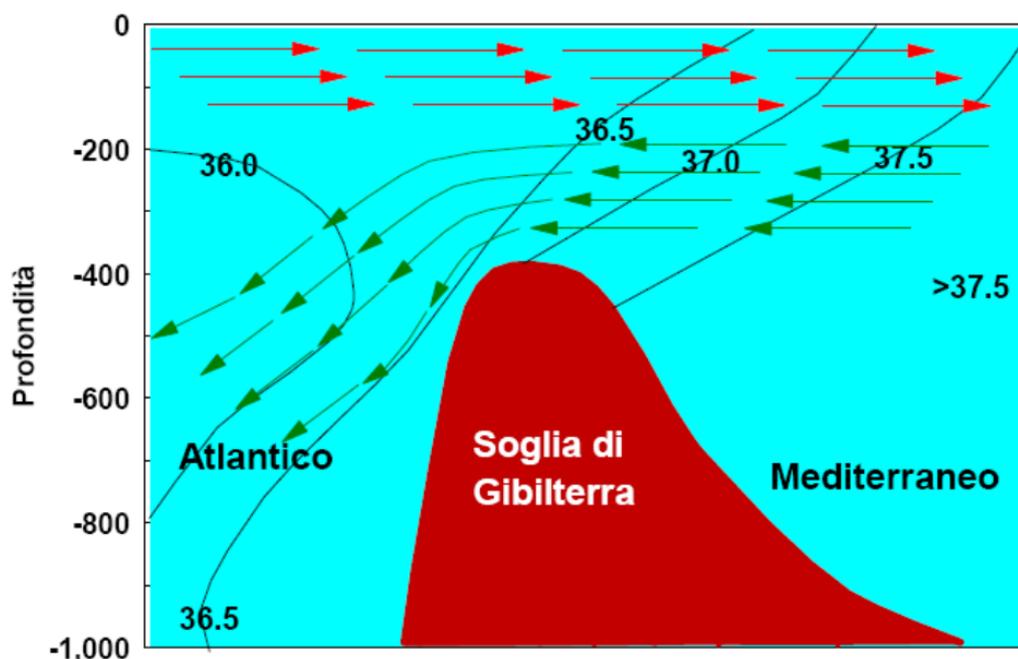


Figura. 1.1.2 - Schema di circolazione delle correnti superficiali e profonde nello Stretto di Gibilterra

Le correnti superficiali mediterranee hanno origine tutte dall'afflusso di acqua Atlantica e seguono in prevalenza degli andamenti di tipo ciclonico, cioè antiorario.

Attraverso la soglia di Gibilterra le acque dell'Atlantico entrano nel Mediterraneo e, benché più fredde, presentano una salinità più bassa tanto che le acque Atlantiche risultano più leggere e si propagano essenzialmente in superficie.

La corrente superficiale che ha origine nello Stretto di Gibilterra presenta un ramo principale che si dirige verso Est. Tale ramo viene spinto a Sud dalla forza di Coriolis e segue prevalentemente la costa Nord-Africana dando origine alla corrente Algerina, entra nel bacino Ionico attraverso lo Stretto di Sicilia e si dirige verso il bacino Levantino (verso le coste di Israele). Una parte della massa d'acqua, scontrandosi con la corrente anticiclonica del Mare di Alboran, si biforca verso Nord in direzione delle isole Baleari.

La corrente Algerina, nel suo corso, si biforca nuovamente: una parte prosegue verso il Canale di Sicilia, un'altra invece risale verso la Corsica e unendosi alla parte che fin dall'inizio si era diretta verso le Baleari dà origine alla corrente Ligure Provenzale

Catalana che scorre verso Ovest lambendo le coste Liguri, Francesi e Catalane e attraversando il Golfo del Leone. I bassi fondali del Canale di Sicilia fanno sì che la corrente Algerina si biforchi nuovamente, una parte risale infatti verso il Tirreno dando origine ad una corrente ciclonica che in parte lambisce le coste Liguri e si riunisce con la corrente Ligure-Provenzale Catalana.

La parte di corrente Algerina che riesce a valicare il Canale di Sicilia attraversa dapprima un'area prospiciente le coste della Tunisia e della Libia caratterizzata da correnti anticloniche (il Golfo della Sirte) e poi forma la corrente Africana che scorre lungo il mare di Levante dando origine alla corrente dell'Asia Minore che lambisce la costa Turca fino a Rodi. Nel suo complesso in entrambi i bacini, Occidentale e Orientale, la circolazione è ciclonica (verso antiorario) ma presenta delle eccezioni in corrispondenza del Golfo della Sirte, del Mar di Alboran e del Golfo di Gabes (circolazione anticiclonica).

Nell'Adriatico, nello Ionio e nell'Egeo vi sono altre correnti minori di tipo ciclonico. Oltre alle citate correnti costiere vi è la corrente Centro Mediterranea che scorre sopra la dorsale Mediterranea in direzione Creta e Cipro. Una descrizione generale delle correnti viene riportata in figura (1.1.3)

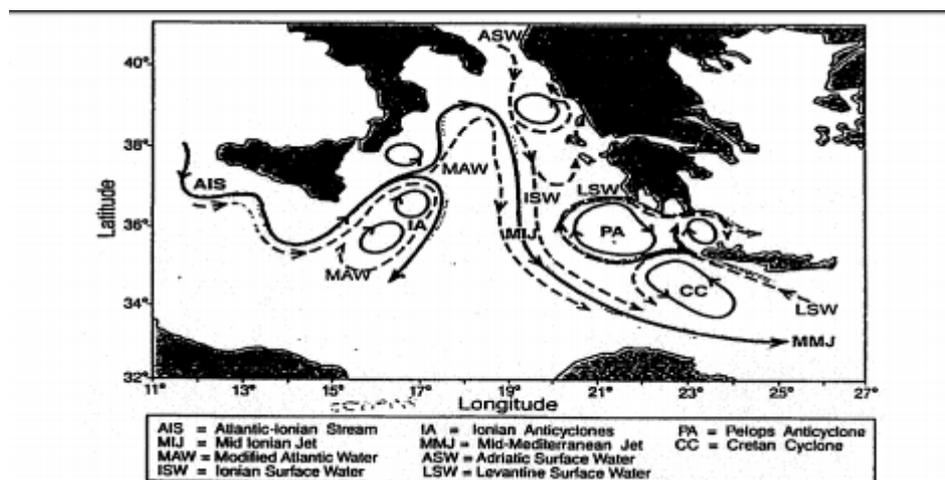


Figura 1.1.3 rappresentazione schematica della circolazione generale al di sopra del termocline nel 1987

(tratto da Malanotte-Rizzoli 1999)

Nella parte Occidentale del Mare di Alboran l'acqua Atlantica, entrando con velocità piuttosto forte in direzione Est Nord Est, viene deviata a Sud Est con conseguente formazione di una circolazione anticiclonica a Sud del bacino che da luogo ad una corrente che circola verso Ovest lungo le coste dell'Africa. Un caso analogo si verifica al largo della Sirte dove l'acqua Atlantica proveniente dal Canale di Sicilia, ostacolata dal massiccio promontorio della Cirenaica, penetra nel Golfo della Sirte e segue la costa, formando una controcorrente diretta verso ponente.

Le acque superficiali, nel loro movimento verso Est, incontrano temperature medie più elevate e venti dominanti caldi e secchi provenienti dai deserti Africani; si determina così un progressivo aumento della salinità superficiale che ha valori minimi di 36.5 ‰ presso lo Stretto di Gibilterra e supera il 39 ‰ nel bacino Levantino.

1.2 Circolazione intermedia

Lo strato d'acqua compreso fra i 200 e i 600 metri, è interessato da un movimento in senso opposto a quello delle correnti di superficie. Le acque dello strato intermedio si formano nel bacino Levantino, il tratto di Mediterraneo con i più elevati valori di salinità (si raggiunge qui il 39,1 ‰ di salinità). Una massa d'acqua trasformata, calda e salata nota come acqua superficiale levantina (Levantine Surface Water, LSW) è presente in tale bacino durante l'estate e l'autunno.

Nel periodo invernale, a causa del raffreddamento, la densità dell'acqua degli strati più superficiali aumenta e "comprime" lo strato d'acqua inferiore, dando origine alla corrente intermedia fino ai mesi di Febbraio e Marzo durante i quali si manifestano eventi di mixing profondo. In tale periodo la LSW viene miscelata con l'acqua sottostante fino a profondità di 200 - 400 m e dà luogo alla ben nota acqua intermedia levantina (Levantine Intermediate Water, LIW).

Questa corrente è divisa in un ramo principale che percorre l'intero Mediterraneo e due rami secondari che attraversano l'uno il Golfo della Sirte e l'altro, più cospicuo, lo Ionio fino a entrare nell'Adriatico dove incontra le fredde acque invernali per poi uscire nuovamente dallo Stretto di Otranto.

Il ramo principale si dirige verso il Canale di Sicilia dove, a causa dei fondali bassi e della portata della corrente di superficie, deve dividersi in due stretti passaggi laterali situati a quote diverse. L'acqua proveniente dal ramo più settentrionale si dirige verso il Tirreno dove fa un lungo giro antiorario e in gran parte esce per ricongiungersi col ramo secondario e risalire verso la Sardegna per poi seguire la costa francese e spagnola e uscire dallo Stretto di Gibilterra. Dalle analisi degli oceanografi pare che una goccia d'acqua entrata dallo stretto di Gibilterra impieghi circa 150 anni per compiere tutto il "giro" e ritornare, profondamente modificata nella composizione, all'Oceano Atlantico.

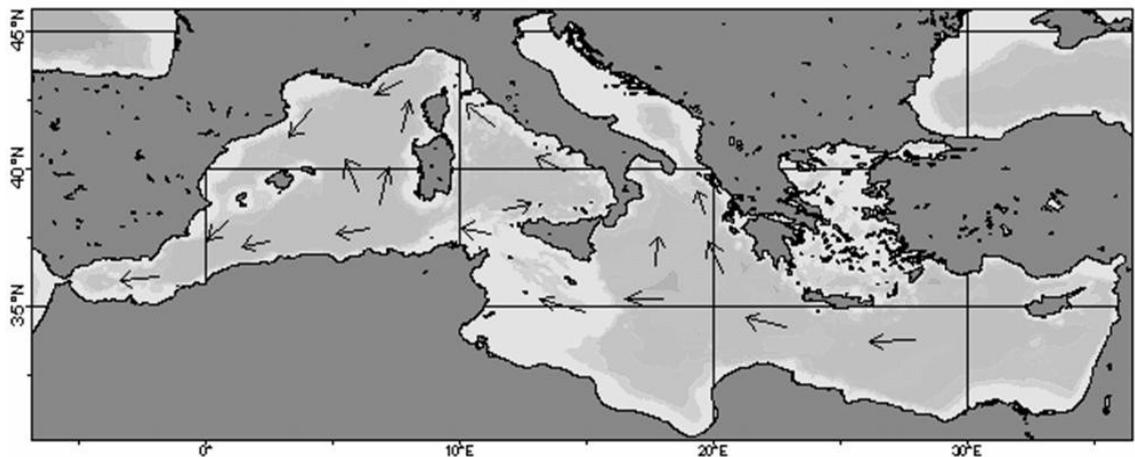


Figura 1.2.1 - Circolazione intermedia nel Mar Mediterraneo.

Alcuni ricercatori ritengono che la LIW sia la massa d'acqua prevalente nella regione del termoclino nel bacino Orientale del Mediterraneo. In quello occidentale la LIW si espande e si miscela con altre masse d'acqua ma rimane ben distinta e facilmente

individuabile. Tale strato è caratterizzato da valori di salinità di circa 38.7 ‰ e da una temperatura media di circa 14° C.

Il movimento generale delle acque levantine o intermedie è diretto verso Ovest e, in tale movimento, esse tendono a seguire traiettorie cicloniche nei vari bacini.

1.3 Circolazione profonda.

Le correnti di profondità interessano due aree del Mediterraneo, il bacino Ligure Provenzale e lo Ionio. In entrambi i casi le correnti originano nella stagione invernale in seguito ad un rapido raffreddamento delle acque provocato dal vento.

Nel primo caso il Mistral raffredda rapidamente le acque al centro del Golfo del Leone. In seguito all'aumento di densità l'acqua si dirige verso il fondo, sino ai 2000 metri di profondità, contribuendo al lento ricambio delle acque profonde. Nel bacino Orientale è la Bora che abbassando la temperatura delle acque nel Mare Adriatico origina una corrente diretta verso Sud che si inabissa oltre il Canale di Otranto e contribuisce al ricambio delle acque profonde dello Ionio.

L'unico modo di fare aumentare la salinità è avere un'evaporazione elevata dell'acqua, quindi per avere densità elevate dell'acqua di superficie è necessaria una forte evaporazione a basse temperature. Queste due condizioni si possono verificare d'inverno quando la temperatura atmosferica è molto bassa e in zone in cui il vento raggiunge velocità elevate, in modo da favorire l'evaporazione.

Se la densità in superficie è abbastanza elevata e rimane tale per un periodo sufficiente di tempo, l'acqua superficiale si inabissa fino a raggiungere il fondo oceanico. In tal caso nei profili verticali di temperatura e salinità nella zona di formazione di acqua di fondo, le due grandezze sono costanti ad ogni profondità, visto che l'acqua di superficie è scesa fino a mescolarsi con tutti gli strati sottostanti. A questo punto, grazie alla sua

densità elevata l'acqua scorre ricoprendo tutto il fondo oceanico e arrivando in profondità anche in zone molto lontane dalla zona di formazione.

L'acqua lontana dalla superficie è piuttosto isolata, infatti gli unici scambi termici incisivi sono quelli oceano-atmosfera a livello della superficie. In profondità gli scambi di calore e sali con le acque circostanti sono troppo lenti, e quindi una certa massa d'acqua conserva le sua identità, e le caratteristiche che aveva in superficie, più o meno fino all'inverno successivo. Quindi se si misura temperatura e salinità dell'acqua superficiale in una zona di formazione e sul fondo di tutto il resto del bacino, si trovano valori uguali anche diversi mesi dopo la formazione stessa dell'acqua. In questo modo si può scoprire dove sono le zone di formazione delle acque profonde.

Le acque dello strato profondo del Mediterraneo sono originate, specie nei mesi invernali, dall'affondamento delle acque superficiali divenute bruscamente più dense per l'azione dei venti freddi e secchi settentrionali (Tramontana, Maestrale e Bora). La formazione delle acque profonde è caratteristica di tre particolari regioni: il Golfo del Leone ed il Mar Ligure; il Mare Adriatico meridionale; la zona Cipro - Rodi. (Fig. 1.3.1).

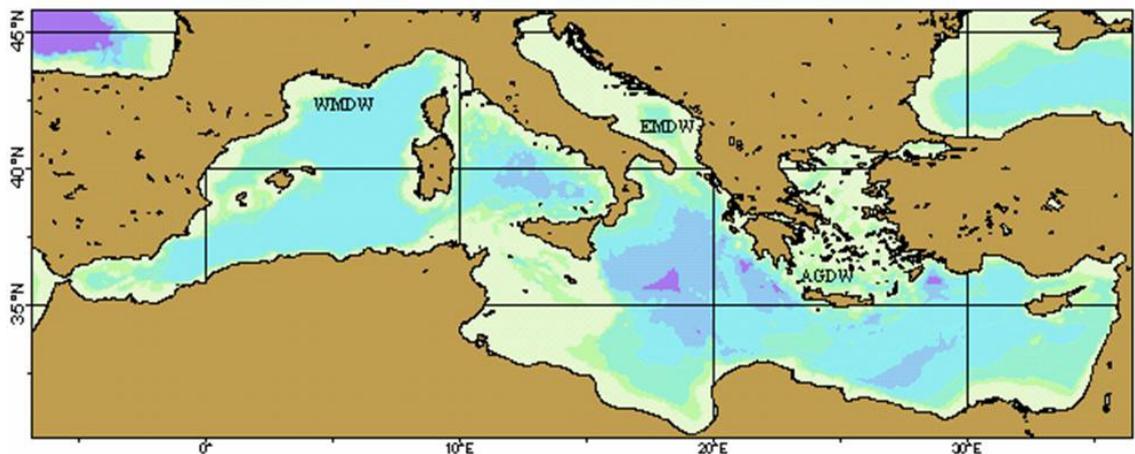


Fig. 1.3.1 - Siti di formazione dell'acqua profonda nel Mar Mediterraneo.

Western Mediterranean Deep Water (WMDW).

Il Golfo del Leone ed il Mar Ligure sono spesso interessati da forti venti che soffiano da settentrione (Tramontana e Maestrale). L'effetto di tali fenomeni è il raffreddamento dell'acqua superficiale e l'aumento della salinità in superficie a causa dell'elevata evaporazione. In alcune zone la densità (σ_t) supera il valore di 29.1 g/cm^3 alla superficie, valore che, essendo più elevato degli strati d'acqua inferiori, compromette la stabilità verticale della colonna d'acqua.

Si ha dunque un rimescolamento (mixing) che può interessare uno strato d'acqua che dalla superficie si estende fino a 2000 m. Il mixing di tale acqua superficiale e dell'acqua intermedia genera l'acqua profonda (*Deep Water* DW). Generalmente tale meccanismo si sviluppa nei mesi di Febbraio e Marzo.

Una volta che l'acqua nella colonna ha raggiunto le caratteristiche dell'acqua profonda, tende a distribuirsi e a portarsi al corrispondente livello di densità.

La formazione di acqua profonda nel Mediterraneo Nord-Occidentale è un processo che trasforma rapidamente l'acqua superficiale in quella profonda. In realtà si assiste contemporaneamente ad una risalita di nutrienti – *upwelling* – dagli strati più bassi a quelli più superficiali. Sembra che inverni più freddi abbiano prodotto un aumento delle catture di alcune specie di pesci pelagici proprio a seguito dell'aumentata disponibilità di cibo.

1.4 La circolazione nel Canale di Sicilia

Il Canale di Sicilia si estende dalla zona di mare che divide le coste di Capo Bon in Tunisia da quelle di Mazara del Vallo in Sicilia (distanza minima del Canale pari a circa 120 km) avanzando verso Est fino al Mar Ionio e raggiungendo la massima larghezza (distanza tra la costa Africana e quella Siciliana) di circa 500 km.

Il Canale è caratterizzato da un fondale poco profondo. La piattaforma continentale siciliana (il Banco Avventura, area con profondità sino a 200 m), ad Ovest, si estende fino in prossimità dell'isola di Pantelleria, nella parte centrale a sud della Sicilia si restringe, e raggiunge la fine dell'Isola estendendosi fin verso l'isola di Malta. La piattaforma continentale tunisina da Capo Bon si va estendendo verso Est e circonda l'isola di Lampedusa.

All'estremo Ovest tra Capo Bon e Capo Granitola vi sono due soglie, dove la profondità è massima: “*Main Western Sill*”, che raggiunge la profondità di circa 430 m e “*Secondary Western Sill*” dove la profondità non supera i 365 m circa. Procedendo verso est, superata Pantelleria, si trova un piccolo bacino la cui profondità raggiunge i 700-800 m circa; qui una stretta fossa segue l'asse del Canale raggiungendo profondità anche di 1700 m. All'estremo orientale il passaggio più profondo “*easternsill*” (560 m) è situato tra Malta e Banco Medina, vicino al meridiano 15°E.

La complessa morfologia del Canale di Sicilia comporta lo sviluppo di particolari dinamiche e processi fisici, chimici e biologici (Bethoux, 1980; Manzella *et al.*, 1988; Robinson *et al.*, 1999; Garcia Lafuente *et al.*, 2002).

Nel Canale di Sicilia la circolazione può essere schematizzata con un modello a due strati che prevede, il fluire verso Est della MAW (*Modified Atlantic Water*) nello strato più superficiale (fino a 200 m), che aumenta progressivamente la propria concentrazione salina (per evaporazione) e giunta nel giro di Rodi, sprofonda generando la LIW, ed il fluire verso Ovest della LIW nello strato più profondo, in controcorrente rispetto alla MAW (Béranger *et al.*, 2005).

Il modello di circolazione prevede inoltre che, in corrispondenza della parte più occidentale del Canale di Sicilia, la MAW si biforchi dando origine all’“*Atlantic Ionian Stream*” (AIS) (Robinson *et al.*, 1999), una corrente che trasporta acqua Atlantica, più

calda e meno salata, verso il mar Ionio e alla “Atlantic Tunisian Current” (ATC) che fluisce verso la costa tunisina (Béranger *et al.*, 2005) (Fig. 1.4.1).

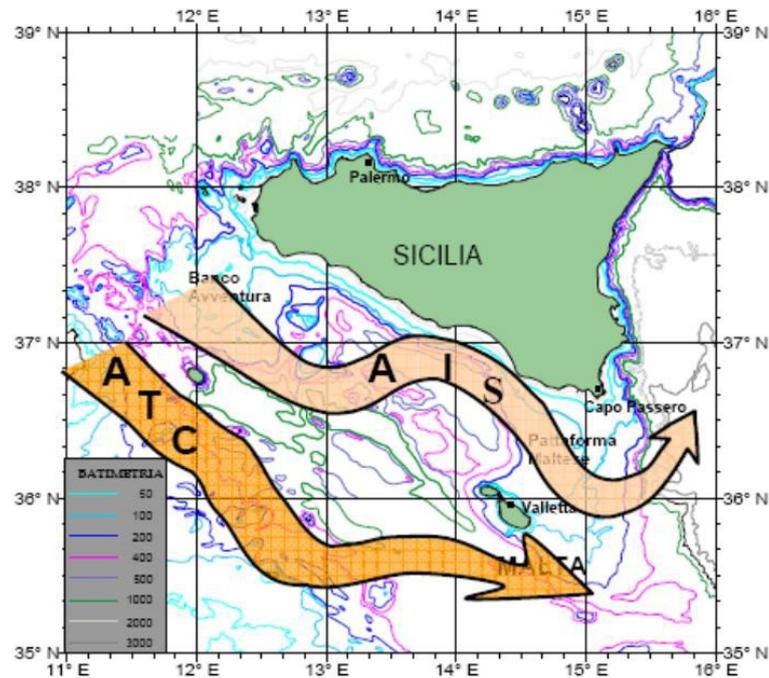


Figura 1.4.1 - Pattern di circolazione nel Canale di Sicilia, le due correnti ATC - Atlantic Tunisian Current ed AIS - Atlantic Ionian Stream, sono le diramazioni della MAW (Modified Atlantic Water)

Un tipico pattern di circolazione prevede che l'AIS entri nel Canale di Sicilia da Ovest, e che lungo la sua traiettoria, si distacchino due rami di corrente dando origine a due vortici: il primo, di tipo ciclonico, sul Banco Avventura (Adventure Bank Vortex, ABV) ed il secondo, anticiclonico, intorno alla piattaforma maltese poco a sud di Capo Passero (Ionian Shelf Break Vortex, IBV), mentre il ramo principale della corrente descrive un pronunciato meandro anticiclonico tra questi due vortici. Un terzo vortice ciclonico, sempre derivante dal ramo di corrente principale dell'AIS, si forma talvolta lungo la costa orientale della Sicilia, tra Capo Passero a sud e lo Stretto di Messina a nord (Messina Rise Vortex, MRV).

Il percorso dell'AIS determina importanti fenomeni idrografici nell'area, come l'upwelling, e nello stesso tempo influisce sulla temperatura superficiale (Robinson *et al.*, 1999). In queste aree dominate dalla circolazione ciclonica dove si verifica il

fenomeno dell'upwelling si assiste alla risalita di acque ricche di nutrienti (García Lafuente *et al.*, 2002) che fertilizzano gli strati superiori della colonna di acqua.

Naturalmente, il percorso dell'AIS presenta un'elevata variabilità a causa di forzanti esterne la cui scala temporale può variare da alcuni giorni (effetti di marea e fluttuazioni atmosferiche) a periodi più lunghi di carattere stagionale (ciclo solare) o interannuale.

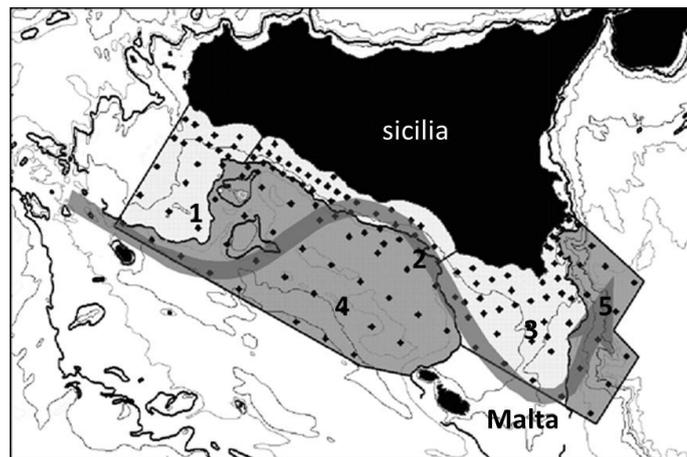


Figura. 1.4.2 – Zone di rilevanza (Cuttitta *et al.*, 2006)

Capitolo 2

Studio della specie

2.1 Piccoli pesci pelagici

Secondo una stima fatta da Bianchi e Morri, nel 2003 e successivamente rivista e discussa (Bianchi *et al.*, 2014) all'interno del Mediterraneo vi è una grande varietà di specie ittiche, oltre 8.500 che in proporzione con il resto del mondo rappresentano una percentuale che oscilla tra 4-18% (in base al gruppo considerato), nonostante esso occupi solo lo 0,82% della superficie e lo 0,32% del volume di tutti i mari.

Gli ecosistemi marini in tutto il mondo, sono popolati da specie di piccoli pelagici in particolare nel Mediterraneo, sono sei le principali specie appartenenti a questa categoria, quattro dei quali, l'acciuga (*Engraulis encrasicolus*), la sardina (*Sardina pilchardus*), l'alaccia (*Sardinella aurita*) e lo spratto (*Sprattus sprattus*), rappresentano il 50% dei pesci commercializzati in tutto il Mediterraneo (Leonart e Maynou, 2003). Non vengono generalmente considerate alla stregua di piccoli pelagici altre specie come lo sgombro (*Scomber scombrus*), il lacerto (*Scomber japonicus*), la boga (*Boop boops*) e il suro (*Trachurus spp.*), che evidenziano solo delle fasi biologiche più o meno lunghe con comportamento pelagico (Alvares *et al.*, 2003). Due di queste specie pelagiche, l'acciuga (*Engraulis encrasicolus*) e la sardina (*S. pilchardus*), rappresentano risorse importanti sia dal punto di vista della biomassa che dal punto di vista del valore commerciale nel Canale di Sicilia. (Figura 2.1.1). Esistono diverse definizioni di pesci pelagici, ma molto spesso fanno riferimento alla capacità di questi pesci di raggrupparsi, caratterizzati da una capacità di movimento lungo, sia orizzontale che verticale lungo le aree costiere della colonna d'acqua (Frèon, 2005).

Le specie pelagiche vengono distinte anche per l'esistenza di due diversi intervalli di misura, questo ci consente di ipotizzare due gruppi: "piccoli pelagici" e i "medio pelagici".

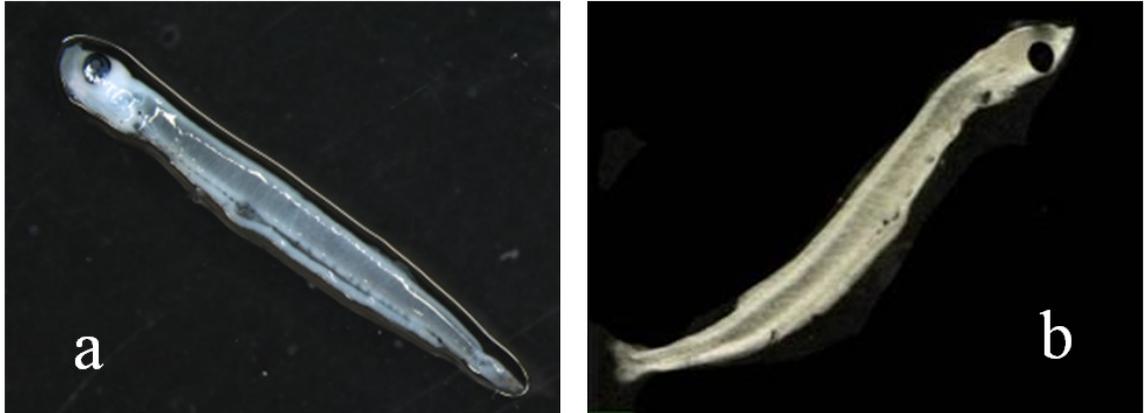


Figura 2.1.1 Microfotografie di larve di (a) *Sardinella aurita* 50 µm e (b) *Engraulis encrasicolus* 70µm

La distinzione viene fatta anche in riguardo alla posizione occupata dalle larve nelle aree di alimentazione: generalmente per i "piccoli pelagici" il foraggiamento, soprattutto per acciughe e sardine e sardinella comprende fitoplancton, meso-micro zooplancton, mentre il gruppo dei "medio pelagici" include per lo più specie di un intermedio livello trofico come: merluzzi, tonni e sugarelli che si nutrono di molluschi, macro zooplancton e ittioplancton (Frèon *et al.*, 2005).

I pelagici vivono nel dominio pelagico e si muovono lungo la colonna d'acqua dove spendono la maggior parte del loro tempo. Molti dei piccoli pesci pelagici sono specie epi-pelagiche cioè vivono nello strato più alto dell'oceano, generalmente tra 0 e 200 m di profondità. Anche se il limite di confine della profondità dipende dalla specie e dalla regione in cui essi vivono.

Dal punto di vista morfologico i piccoli pelagici sono caratterizzati da un corpo di forma affusolata e una pinna caudale bilobata. Queste caratteristiche li rendono dei buoni e veloci nuotatori nonostante le loro piccole misure. Un altro carattere fenotipico comune nei pesci pelagici è che hanno una colorazione discreta, che va dal grigio scuro

all'argento che li rende meno suscettibili agli attacchi dei predatori (Blaxter and Hunter, 1982).

I pesci pelagici hanno anche capacità di camuffarsi grazie alla regolazione di melanofori presenti sulla superficie del dorso.

Il periodo riproduttivo della specie *E. encrasicolus*, nel Mar Mediterraneo in generale, risulta estendersi da Primavera inoltrata all'autunno inoltrato, più specificatamente da Maggio a Novembre, (Rodríguez and Rubín, 1986; Rodriguez, 1990). Il massimo picco di deposizione spesso viene registrato durante il mese di Agosto, quando la Temperatura dell'acqua è tra 19°C and 23°C (Garcia *et al* 1996).

Le acciughe, come molti pesci pelagici, emettono le uova ogni 3-4 giorni negli strati superficiali delle acque (Varagnolo, 1965; Ghirardelli, 1967). Si calcola che essi possano emettere circa 500 uova per ogni grammo di peso; generalmente una femmina di 10 grammi può emettere circa 11.000 uova l'anno (Motos, 1996).

Una volta fecondate le uova diventano embrioni in 2-5 giorni e alla schiusa fuoriescono larve di circa 3-4 millimetro. Il sacco vitellino è oblungo, senza globulo oleoso (Russel, 1976) e viene assorbito quando la larva ha raggiunto la lunghezza di circa 5 mm; la lunghezza di flessione tra 9 e 10 mm, mentre la lunghezza di trasformazione o di acquisizione del mantello è intorno a 25 mm. Le larve nei primi stadi di vita presentano due melanofori sulla parete addominale dietro il piloro, due sulla papilla anale e uno o due sulla coda. Negli stadi avanzati invece, la larva presenta una riga di melanofori sulla parte superior dell'intestino. L'*Engraulis encrasicolus* emette la pinna pelvica intorno ai 15 mm. La pinna anale e la pinna dorsale sono sovrapposte. (Fage, 1920 and Russell, 1976). La prima alimentazione esterna è intorno a 4 mm (SL).

lo stadio pelagico è comune in tutto il ciclo di vita dei pesci pelagici ed inoltre ha delle implicazioni anche in termini di colonizzazione e successo di reclutamento. I pesci pelagici hanno una fecondità molto alta sia in termini di valori assoluti che in termini

relativi (Frèon *et al.*, 2005). Tipicamente le femmine emettono circa 50.000 uova durante la deposizione nelle aree temperate.

Dopo la deposizione generalmente non manifestano cure parentali, anzi è molto diffuso il cannibalismo (Alheit, 1987; Valdès Seinfeld *et al.*, 1987; Valdès Seinfeld, 1991). Un'altra caratteristica dei pesci pelagici è la durata della loro breve vita, che Frèon *et al.*, (2005) ha distinto in due categorie: le specie Engraulidae che hanno un intervallo di vita media che va da 2 a 5 anni e raggiungono la maturità sessuale durante il primo anno di vita; e le specie Clupeidae, hanno un intervallo di vita media che va da 5 a 8 anni, raggiungendo la maturità sessuale a entro il 1° - 2° anno di vita, ogni femmina emette da 50 - 60000 uova del diametro di 1,5 mm (Froese e Pauly, 2000).

La loro riproduzione, viene influenzata dai cambiamenti dei parametri oceanografici, infatti da diversi studi effettuati sulla distribuzione di uova e larve si è potuto effettuare una caratterizzazione della loro distribuzione nel Mediterraneo (Palomera *et al.*, 2007) in base alla diversa temperatura e salinità (Giannulaki *et al.*, 2013 e Basilone *et al.*, 2013).

Per quanto riguarda le sardine invece, queste preferiscono acque fredde con temperature comprese tra 12 e 14 °C per la deposizione delle uova, anche se in realtà essa può avvenire a temperature fino a 19 °C. L'habitat riproduttivo di queste due specie (acciughe e sardine), è chiaramente differenziato dalle caratteristiche della massa d'acqua riducendo la sovrapposizione tra i loro primi stadi di sviluppo. La distribuzione larvale è legata anche ai principali meccanismi produttivi e alla stagione di deposizione delle uova. Nonostante i diversi regimi ambientali in cui le larve di queste specie si sviluppano, i tassi di crescita sono abbastanza simili. Diversi autori hanno dimostrato che (Van der Lingen *et al.*, 2006; Van der Lingen *et al.*, 2009) sardine e acciughe sono troficamente distinte, ipotizzando che l'alterazione di alcune forze fisiche come (temperatura, direzione ed intensità del vento) dovute a cambiamenti climatici, possono

influenzare la produttività e la misura del plancton. E come conseguenza della variazione del fitoplanctonica sarebbe cambiata anche la struttura dello zooplancton. Questo cambiamento favorirebbe l'abbondanza di acciughe su sardina e vice versa. In questo scenario sembra che le condizioni del mediterraneo favoriscono le sardine sono rispetto acciughe.

2.2 Areale di distribuzione dei piccoli pesci pelagici

Nel Canale di Sicilia ci sono molte specie pelagiche, ma di loro solo 4 di sono considerate specie completamente pelagiche. In particolare le specie acciuga (*Engraulis encrasicolus*) e sardina (*Sardina pilchardus*) sono tra le specie pelagiche più importanti sia in termini di biomassa che di interesse commerciale (Palomera *et al.*, 2007), mentre *Sprattus sprattus* e *Sardinella aurita* sono presenti nella regione del Mediterraneo, ma non sono di grande interesse commerciale per via della loro bassa rappresentazione in termini di biomassa.

La loro distribuzione dei piccoli pelagici viene molto influenzata dalle caratteristiche del fondale. Infatti, studi idroacustici effettuati da D'Elia *et al.* (2009), trovarono che esistono delle associazioni con la natura del fondale.

Lo studio è stato condotto nella zona nord ovest e centro del Canale di Sicilia, e in particolare le aree sono state identificate come zona 1 e zona 2, corrispondenti alle stesse zone che Cuttitta *et al.* (2006), aveva già denominato e dove aveva trovato che vi era una maggiore distribuzione di uova e larve di *Engraulis encrasicolus* in particolar modo in zona 2. I modelli spaziali e temporali, proposti da Garcia Lafuente *et al.* (2002), sono coerenti con la teoria “ocean-triade” postulata da Bakun nel 1998, secondo cui i processi di arricchimento (miscelazione e *up-welling*), concentrazione (convergenza, formazione frontale, stabilità della colonna d'acqua), e ritenzione possono influenzare il reclutamento delle popolazioni marine che presentano stadi di uova e larve. Bakun ha identificato tre maggiori classi di processi fisici che possono influenzare l'habitat riproduttivo, chiamati “triade fondamentale”, come mostrato in Figura 2.1.1. Tra le tante specie del Mar Mediterraneo anche lo sviluppo dell'acciuga europea (*Engraulis encrasicolus*) è stato interpretato alla luce dell'*Ocean triade*

(Agostini e Bakun, 2002). Vista la breve vita delle di acciughe che si si limita a per pochi anni e l'alta variabilità di reclutamento, si traduce in rapide fluttuazioni nella abbondanza di popolazione (Borja et al., 1996; 1998). Questo concetto può essere valido per tutto l'Oceano Atlantico orientale e dei mari adiacenti. Nella loro revisione, Agostini e Bakun (2002) ipotizzano che la messa a confronto tra la riproduzione di acciughe e le dinamiche oceaniche avrebbe spiegato perché il Mediterraneo da sempre definito oligotrofico sarebbe in grado di produrre se pur inaspettatamente alti banchi di acciuga europea. Tuttavia, nel Canale di Sicilia, questi autori individuano alcune deviazioni dalla triade oceano: nonostante la mancanza di significativi deflusso da parte di fiume o deflussi di estuario come fonti di sostanze nutritive; La mancata frequenza di eventi che la concentrino o trattengano la produzione ittioplantonica, come turbolenza indotta dal vento; una forte corrente di superficie geostrofica, in particolare l'Atlantico Ionica Stream (AIS), che irrompe la natura chiusa di una *Ocean-triade*. Nel Canale di Sicilia, queste deviazioni dall'Oceano processi che governano triade di arricchimento, la concentrazione e la conservazione sono postulato per limitare la produttività della popolazione di acciughe della regione.

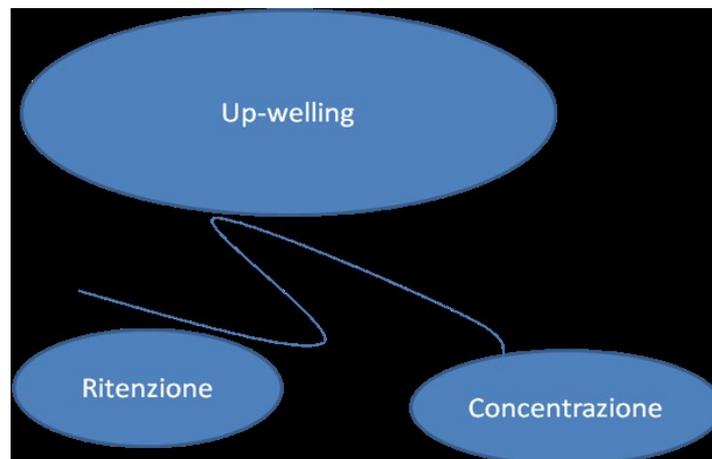


Figura 2.2.1 (Descrizione della teoria ocean triade di Bakun 1998)

La struttura spaziale e la distribuzione dei banchi di pesce sopra la piattaforma continentale (inferiore a 200 m) e la massa dell'acqua a metà della colonna d'acqua erano legati al tipo di fondale, infatti, la maggior distribuzione dei banchi di pesci pelagici insiste nella zona centrale a sud della costa siciliana (zona 2) dove il substrato del fondo è sabbioso. Le aree di *upwelling* nel Canale di Sicilia vengono caratterizzate dalla presenza di una striscia d'acqua relativamente fredda che suggerisca la risalita costante di acque sub superficiale (Piccioni *et al.*,1988) In particolare la costa meridionale della Sicilia è caratterizzata da frequenti eventi di *upwelling* indotti dal vento. Lo schema generale di circolazione superficiale è controllato localmente dal movimento della MAW, che si biforca nell' *Atlantic Ionian Stream* (AIS), una corrente di superficie serpeggiante che scorre verso il Mar Ionio, e la corrente atlantica tunisina (ATC) che scorre verso sud (Lermusiaux *et al.*, 2001; Sammari *et al.*,1999). Durante l'estate l'acqua dell'Atlantico viene convogliata dalla AIS a sud della Sicilia dove le acque sono più calde rispetto a quelle più a nord circostanti alla stessa profondità. Il movimento AIS produce un vortice ciclonico sulla Banca Adventure (Avventura Bank Vortex - ABV) ed una risalita quasi permanente lungo la costa meridionale dell'isola (Sammari *et al.*, 1999). L'AIS può influenzare l'estensione dell'area di *upwelling* e delle temperature dell'acqua, da cui dipende a sua volta la densità. Infatti, se il percorso dell'AIS è lontano dalla terraferma, lungo la costa di avrà una grande estensione dell'*upwelling* agendo come un riduttore dei drastici cambiamenti di temperatura dell'acqua superficiale che condizionano il Canale di Sicilia. Al contrario se l'AIS passa sottocosta influenza l'area di vortice che interessa il Banco Avventura (BA) e aumenta la temperatura della zona costiera.

Ma la teoria della triade non sempre trova riscontro infatti, Cuttitta *et al.*, 2006 da uno studio effettuato su campioni larvali di *Engraulis* per l'anno 2005 ha trovato una concentrazione maggiore di amminoacidi in zona 5 (zona largo) dove i fenomeni di

upwelling sono meno frequenti. Mentre Basilone *et al.*, 2013, ha pubblicato un data set di circa 10 anni d'informazioni dal (1998 al 2007), con lo scopo di interpretare la variabilità temporale e spaziale di strategia di deposizione della acciuga, in relazione ai parametri ambientali e ai pattern di circolazione superficiali. Nello stretto di Sicilia (figura 2.2.2) tenendo conto della teoria della triade Basilone, mostrò che quanto trovato nel suo lavoro era in parziale accordo con lo studio pubblicato da Garcia Laflaute *et al.*, 2002 nell'ambito della teoria triade, sull'influenza dell'AIS nelle aree di deposizione, infatti questa ipotesi risulta specifica ma non comune al profilo esposto dall'AIS (Basilone *et al.*, 2013). le condizioni dell'habitat di spawning erano state studiate su altri ecosistemi marini come la baia di Biscaglia (Bernal *et al.*, 2007; Planque *et al.*, 2007), le acque dell'Oceano a Sud dell'Africa (Van derLingen *et al.*, 2001; Twatwa *et al.*, 2005) anche a nord est e a Est del Mediterraneo (Garcia and Palomera, 1996; Somarakis *et al.*, 2004; Palomera *et al.*, 2007; Somarakis and Nikolioudakis, 2007);

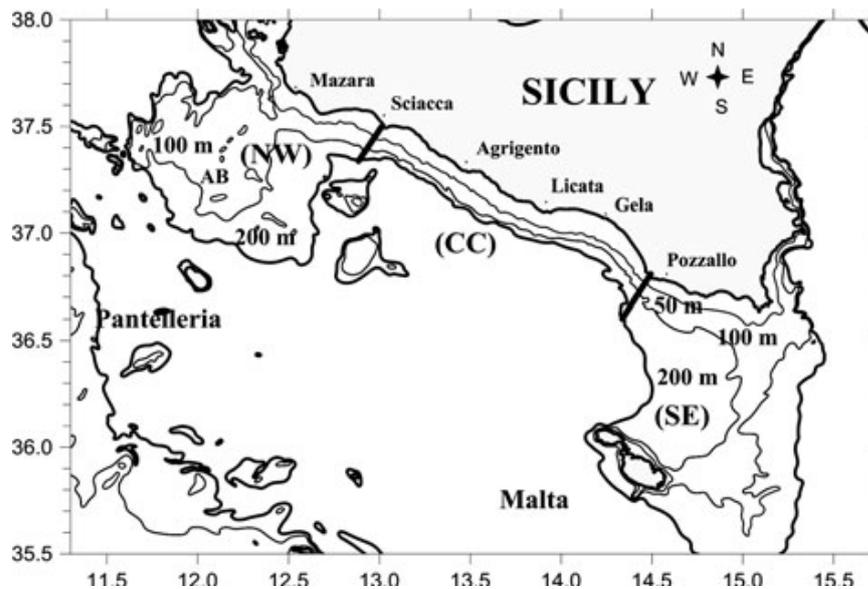


Figura 2.2.2. Area di studio lungo la costa sud della Sicilia (Basilone *et al.*, 2013). La costa è stata divisa in tre regioni Nord est NE- Regione centrale CC e la Regione Sud Est SE

Anche da Cuttitta et al.2016 i risultati (sui campioni di larve di *Engraulis encrasicolus* raccolti nel 2009) hanno mostrato una maggiore distribuzione in zona 1, 3, 5, hanno trovato una maggiore quantità di amminoacidi in zona 5.

In termini di pesci pelagici nel presente lavoro si farà una maggiore attenzione alla specie *E. encrasicolus*, in quanto i nostri campionamenti sono stati effettuati nel periodo di massima riproduzione della suddetta specie, per cui ci è stato possibile avere un numero congruo di larve su cui potere effettuare un maggior numero di indagini.

2.4 Morfometria

Prima di passare all' introduzione sul capitolo della Morfometria vorrei introdurre la parola fenotipo che dal greco *phainein*, che significa "apparire", e *týpos*, che significa "impronta") si intende l'insieme di tutte le caratteristiche manifestate da un organismo vivente, quindi la sua morfologia, il suo sviluppo, le sue proprietà biochimiche e fisiologiche comprensive del comportamento. Questo termine viene utilizzato in associazione al termine genotipo; dove per genotipo si intende la costituzione genetica di un individuo o di un organismo vivente. il fenotipo non è semplice manifestazione del genotipo: le caratteristiche fenotipicamente osservabili di un organismo sono il risultato dell'interazione tra il genotipo e l'ambiente. L'espressione genica può essere influenzata dall'interazione tra i geni e i loro prodotti (es: gli ormoni), da fattori ambientali (es: alimentazione, stile di vita) e da eventi che possono verificarsi in modo casuale durante lo sviluppo. In sintesi, è possibile definire il fenotipo come la manifestazione fisicamente osservabile del genotipo, che dipende dall'interazione tra espressione genica, fattori ambientali e casualità.

Per tale ragione è importante sottolineare che organismi con uno stesso genotipo non necessariamente presentano uguale fenotipo; bisogna infatti considerare l'influenza dei meccanismi sottostanti alle interazioni ambientali, oggetto di studio dell'epigenetica.

A tal proposito è stata considerata, come punto di partenza, l'analisi morfologica che è stata da sempre utilizzata come metodo classico per lo studio della popolazioni (Fage, 1911 and Fage, 1920; Aleksandrov, 1927; Shevchenko, 1981; Junquera and Pérez-Gándaras, 1993; Prouzet and Metzals-Sebedio, 1994). I caratteri morfometrici sono generalmente espressi come rapporti tra grandezze, e relativamente ad ognuno viene definito un range di valori che identifica la variabilità di quel carattere in una determinata specie. È stato osservato che le popolazioni si somigliano di più se la

distribuzione è più vicina tra loro e si differenziano di più se la distanza diventa più grande, come conseguenza dell'isolamento geografico derivante dalla diversità nelle condizioni ecologiche ed ambientali (De Sylva et al., 1956; Sawant et al.2009)

2.5 Macromolecole lipidi e carboidrati.

Comprendere la diversità molecolare e biochimica delle popolazioni ci consente di capire le basi della diversità biologica e soprattutto di distinguere diversi stock allo stadio larvale in funzione delle diverse strutture a mesoscala che caratterizzano l'area di studio (Leis and Carson- Ewart 2000; Richards 2006; Baldwin et al., 2009).

Il contenuto di lipidi, proteine e carboidrati é da tempo indicato come un parametro utile per conoscere lo stato di salute e relativo tasso di crescita per le larve di *Engraulis encrasicolus*, e in particolare il contenuto lipidico è un ottimo indice di vitalità delle larve in quanto viene utilizzato come riserva energetica primaria. Esso dipende dalla quantità e qualità del vitello e delle gocce oleose presenti nelle larve e può cambiare durante le fasi di sviluppo secondo gli eventi fisiologici e la relativa domanda di energia da parte degli embrioni (Rainuzzo *et al.*, 1997).

Il vitello oltre a contenere lipidi, contiene anche amminoacidi e carboidrati ed è dunque la riserva di energia metabolica durante lo sviluppo ontogenico dal passaggio da uovo a larva.

In generale, le larve hanno un basso livello di proteine, ma nel passaggio allo stadio adulto, sono in grado di mantenere un'alta proporzione nella sintesi delle loro proteine.

Lasker e Theilacker (1962) furono i primi a notare come nelle larve delle sardine (*Sardinops caerulea*) vi fosse una carenza di proteine prima del riassorbimento del sacco vitellino. Anche i carboidrati fanno parte dell'alimentazione dei pesci. Grazie alla capacità di secernere α -amilasi e glucosidasi, i pesci riescono ad assimilare gli amidi e il glucosio, che rappresentano una fonte di energia superiore rispetto a proteine.

2.6 Gli amminoacidi.

Unità costitutiva delle proteine, sono dei composti polifunzionali che hanno formula generale mostrata in figura 2.6.1

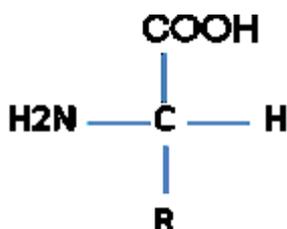


Figura 2.6.1 Formula generale di un amminoacido

sono composti organici appartenenti ad acidi carbossilici, nella struttura di un α -amminoacido si riconoscono:

- un atomo di carbonio chirale (asimmetrico)
- un gruppo amminico -NH_2
- il gruppo carbossilico -COOH
- il residuo laterale (gruppo -R), che è di natura eterogenea:

R può essere, alifatico o aromatico e più o meno complesso.

Numerosi metodi analitici sono stati sviluppati per la separazione enantiomerica e determinazione dei peptidi e amminoacidi. Come riportato da (Bączek e Radkowska 2007), la scelta del metodo analitico per la risoluzione enantiomerica diretta di amminoacidi dipende principalmente dalla struttura chimica degli amminoacidi (es peptide lunghezza di catena, sequenza peptidica) e anche dalle apparecchiature disponibili e dalla loro sensibilità nei confronti dell'analita (Martens e Bhushan, 1989). Esistono diverse tecniche per separare i singoli amminoacidi soprattutto tecniche cromatografiche quali GC (gas cromatografia), TLC (cromatografia su strato) e HPLC

(cromatografia ad alta prestazione), la complessità e le differenze esistenti all'interno di quest'ultima, singola, tecnica. cromatografica, ci permetteranno di effettuare le determinazioni amminoacidiche.

Lo sviluppo di colonne tecnologiche, la modificazione di fasi stazionarie e il progresso di moderni sistemi i HPLC-RP durante l'ultima decade del secolo, ha mostrato che questa tecnica risulta essere la più adatta alla separazione di singoli amminoacidi derivatizzati.

L'HPLC offre tempi brevi di analisi e alta risoluzione (Papadoyannis and Theodoridis, 2010; Silverman and Christenson, 1996; Matthew and van Holde, 1995).

Per la separazione in HPLC possono essere sviluppate due strategie: una con il metodo indiretto e l'altra con il metodo diretto.

Alcune lavori, suggeriscono che le analisi di amminoacidi in HPLC possono essere migliorate dal processo di derivatizzazione, che dipende da diversi fattori: come misura del campione, tempo di analisi, attrezzature specifiche e requisiti di applicazioni (Halpine, 2005). Le principali reazioni usate per il processo di derivatizzazione sono basate sulla formazione dei seguenti prodotti: amide, carbammati, urea e tiourea (Halpine, 2005; Ilisz *et al.*, 2008; Bhushan and Brückner, 2004, 2011).

Un sensibile sistema per l'analisi di amminoacidi fu archiviato attraverso l'uso di agente derivatizzante come l'OPA (o-phthalaldehyde) (Mauris *et al.*, 1988; Brückner *et al.*, 1995).

L'OPA non rappresenta l'unico reagente fluorogeno usato per la determinazione degli amminoacidi, diversi reagenti sono disponibili in commercio per la rilevazione fluorogenica di amminoacidi e proteine; ad esempio (FMOC-Cl) *9 fluorenimetil cloroformato*, (PIT) fenilisocianato, il (dansyl - Cl) *dimetilaminonaftalene-5sulfonil clorid*. Tutti questi reagenti possono essere usati sia attraverso derivatizzazione pre-colonna, sia attraverso la derivatizzazione post-colonna.

Da uno studio di valutazione effettuato da Furst *et al.*,1990 sono stati determinati i vantaggi e gli svantaggio nell'uso di questi fluorogeni nei diversi metodi.

Altre metodi per la determinazione degli amminoacidi possono far riferimento alle tecniche di derivatizzazione post- Colonna attraverso l'uso di un rilevatore UV-Vis. (Rigas,2013).

L'OPA rappresenta il reagente derivatizzante scelto per la determinazione degli amminoacidi dei campioni biologici che verranno analizzati in questo lavoro. Il 2 MCP verrà sostituito con il 3 mercaptopropionico acido (3-MCA) Figura 2.6.2, poiché da quanto riportato da (Furst *et al.*,1990), i problemi di scarsa risoluzione tra asparagina e serina e tra valina e metionina sono stati risolti attraverso l'uso di 3MCA, probabilmente, perché la reazione è stata favorita dall' introduzione di un gruppo α carbossilico, facendo si che gli amminoacidi vengano separati in poco tempo e anche a basse concentrazione. Da Furst *et al.*,1990 è stato trovato che il livello di sensibilità di questo metodo è di 10 picomole (pmol), mentre il limite di sensibilità strumentale era di 0,8 (pmol).

Questo limite non viene raggiunto per la lisina e istidina che presentano invece un limite di 3,5 e 2,5 pmol.

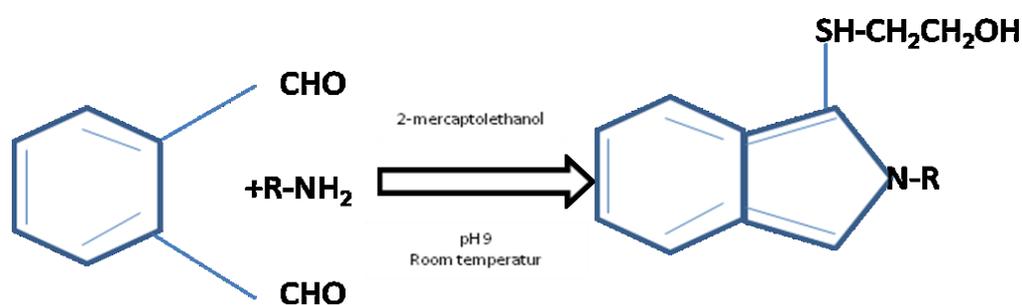


Figura 2.6.2 Reazione di derivatizzazione con OPA

2.7 Enzimi

Comprendere i meccanismi attraverso cui le variazioni dell'ambiente possano avere effetto sugli organismi in natura è di grande interesse per gli zoologi ed ecologi è ritenuto di particolare importanza, soprattutto a causa dei cambiamenti climatici a cascata, ma non solo. Infatti fenomeni di variazioni ambientali possono essere studiati a su scala regionale, portando ad un aumento delle conoscenze sui cambiamenti della fisiologia degli organismi animali in un contesto naturale (Wolcott,1973; Bayne and Widdows, 1978). Il successo di questi studi integrativi è stato lo sviluppo di indicatori biochimici dell'attività metabolica che rappresentano la componente chiave dei percorsi biochimici sintetici o metabolici direttamente o indirettamente collegati con la riproduzione e la sopravvivenza degli organismi.

Alcuni autori hanno studiato come. l'attività enzimatica varia in modo significativo perché sensibile alle perturbazioni e ai cambiamenti ambientali come temperatura (Parry e Pipe, 2004; Monari et al.,2007) salinità (Gagnaire et al., 2006; Martello et al., 2000; Matozzo et al., 2007), anossia (Pamparin et al., 2002; Matozzo et al., 2005) ipossia (Cheng et al., 2004a), pH (Bibby et al., 2008) concentrazione di nitriti e ammoni(Cheng et al., 2004b)

Inoltre, l'attività enzimatica è significativamente ridotta anche da una serie di fattori di stress antropico-indotto, come: disturbo meccanico dell' acquacoltura (Malagoli et al., 2007; La coste et al.,2002; Ballarin et al., 2003) l'inquinamento da idrocarburi policiclici aromatici (Wootton et al., 2003), pesticidi (Gargnaire et al., 2006) e metalli (Cotuer et al, 2004) tra cui: cadmio (Bouilly et al., 2006), rame (Pipe et al., 1999) e cloruro di mercurio (HgCl_2) e cloruro di metilmercurio (CH_3HgCl) (Foumier et al., 2001). Inoltre, l'attività enzimatica sembra essere particolarmente sensibile ai naturali adattamenti fisiologici degli organismi al cambio stagionale.

Duchemni et al., 2007 hanno mostrato, infatti che l'attività fagocitaria nell' ostrica del Pacifico, *Crassostrea gigas* era più bassa durante la deposizione delle uova nella tarda primavera, mentre la massima attività si verificava in autunno. Inoltre, da studi bibliografici è emerso che l'attività idrolitica veniva coinvolta anche in attività battericide, tra questi enzimi proteolitici come la fosfatasi acida per esempio (Chen et al., 2007) β -glucuronidasi (Pampin et al.,2002; Ballarin et al.,2003) esterasi (Gagnaire et al., 2006 a; Gagnaire et al., 2006 b; Gagnarine et al 2003; e Gagnaire et al., 2004), perossidasi (Mydlarz e Harvell,2007; Couch et al, 2008) aminopeptidase (Gagnaire et al., 2003; Gagnaire et al., 2004), lisozima (Monari et al., 2007; Matozzo et al.,2007; Wang et al., 2008a; Wang et al., 2008b) e un gruppo di proteasi (Gagnaire et al.,2003). In particolare sono state misurate le attività di fosfatasi alcalina e le perossidasi.

Le fosfatasi sono una classe di enzimi idrolasi che catalizzano la rimozione dei gruppi fosfato. Il processo opposto, cioè l'aggiunta di gruppi fosfato a molecole X viene condotto dalle fosforilasi e dalle chinasi, le quali aggiungono gruppi fosfato al loro substrato. I processi di fosforilazione e defosforilazione sono fondamentali per i cicli vitali degli organismi, poiché possono determinare l'attivazione o l'inattivazione di una molecola intervenendo sulla sua polarità. Le fosfatasi sono i catalizzatori biochimici della reazione di defosforilazione, che liberano l'acido fosforico dai due esteri e partecipano al metabolismo di glicidi, nucleotidi e fosfolipidi.

Le perossidasi sono ossidoriduttasi che catalizzano l'ossidazione di vari composti organici, utilizzando come donatore di elettroni il perossido di idrogeno (H_2O_2), idroperossidi organici, peracidi ed ossidi inorganici come ioni periodato o clorito.

Lo studio dell'attività enzimatica può essere effettuato anche attraverso la zimografia, una tecnica elettroforetica su gel di poliacrilammide che permette la visualizzazione del numero e del peso molecolare approssimativo delle proteasi in un campione, in base all'idrolisi del substrato specifico, incorporato nel gel.(Vandooren *et al.*, 2013).

Ci sono diverse forme di zimografia:

Zimografia in gel, dove le forme di enzimi vengono visualizzati in base al loro peso molecolare.

Zimografia in situ, l'attività proteolitica viene localizzata nei tessuti;

Zimografia in vitro, in grado di individuare i siti dell'attività proteolitica di un organismo intatto.

La tecnica zimografica può essere usata per alcune attività di idrolasiche su qualsiasi substrato biologico: proteine, peptidi, oligosaccaridi e polisaccaridi, lipidi e anche acidi nucleici. Alcuni tipi di campioni biologici possono essere analizzati includendo estratti di cellule e tessuti, secrezioni cellulari o tessuti apparentemente fluidi.

Il metodo zimografico fornisce informazioni sul peso molecolare e l'eventuale presenza di enzimi diversi o diverse forme di idrolizzati presente in un campione, consentendo così di individuare una forma specifica di un eventuale enzima da studiare e le attività ad essi correlabili.

Esistono diversi tipi di approcci zimografici per specifiche applicazioni portando infine a diverse informazioni.

Capitolo 3

Materiali e Metodi

3.1 Piano di Campionamento

Partendo dalla suddivisione del canale di sicilia in due grandi Macroaree, ognuna della quale raggruppa 3 zone, secondo lo schema riportato da Cuttitta et al., 2004, che è stato usato per la definizione delle due grandi aree di spawning.

Banco Avventura: zona 1-2-5

Banco Maltese: Zona 3-4-Malta.

La differenza rispetto al lavoro di Cuttitta et al., 2004, consiste nel raggruppare le zone all'interno delle due Aree Banco Avventura(BA) e Banco Maltese (BM), secondo schemi diversi, in più è stata aggiunta la Zona Maltese.

Una volta definito il piano di campionamento si è proseguito al campionamento stesso.

3.2 Campionamento

Gli studi analitici riportati di seguito sono stati effettuati su campioni prelevati, attraverso il campionamento effettuato durante la campagna oceanografica BANSIC 2012 e 2013 e 2015 condotta a bordo della N/O “Minerva” e “Dalla porta”, durante il periodo estivo compreso tra Luglio e Agosto in corrispondenza del periodo riproduttivo di molte specie ittiche demersali e pelagiche tra cui anche *E. encrasicolus*. L'estensione temporale della campagna riflette le esigenze di una adeguata copertura spaziale dell'area investigata (Stretto di Sicilia). L'area dello studio è lo Stretto di Sicilia tra 35° N e il 38° N di Latitudine e l'11° E e il 16°E di Longitudine. Le stazioni scelte per il campionamento fanno parte di un *grid* regolare costruito su una maglia di 4 miglia (Fig.3.21., Fig.3.2.2, Fig 3.2.3).

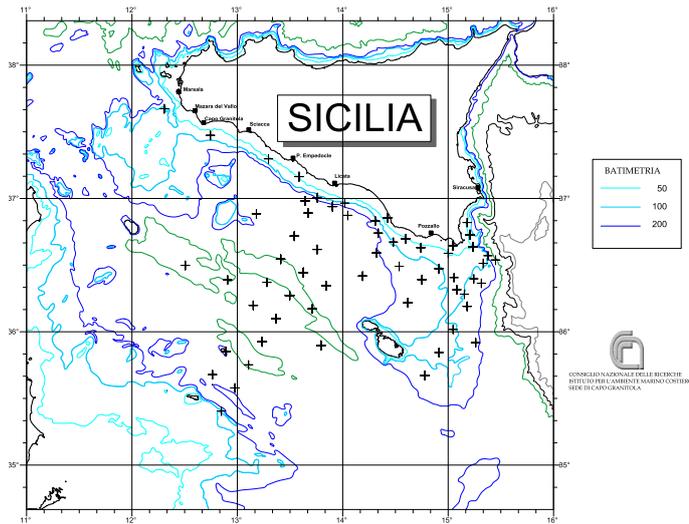


Figura 3.2.1 delle cale bongo 40 durante l'indagine BANSIC 2012 nel Canale di Sicilia

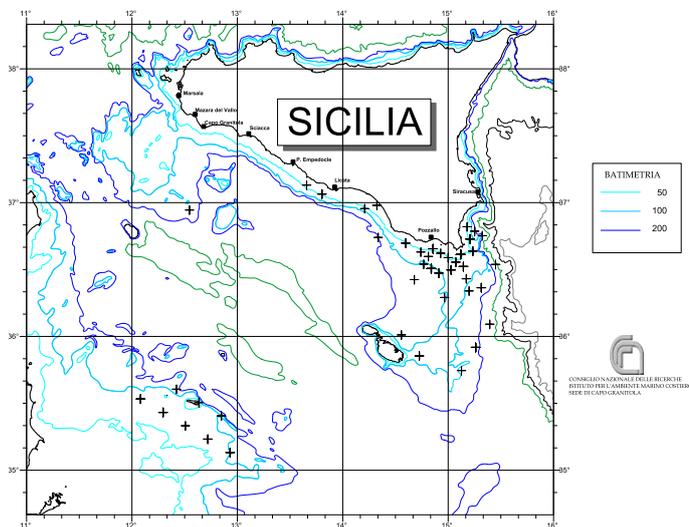


Figura 3.2.2 delle cale bongo 40 durante l'indagine BANSIC 2013 nel Canale di Sicilia

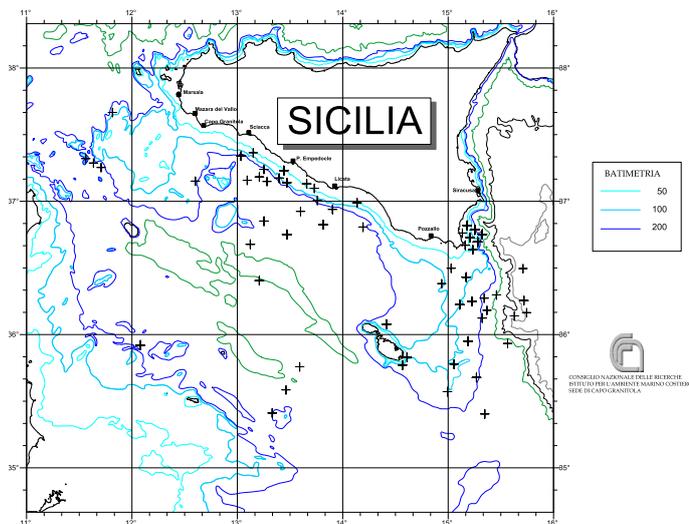


Figura 3.2.3 delle cale bongo 40 durante l'indagine BANSIC 2015 nel Canale di Sicilia

Le mappe sopra indicate, rappresentano la griglia di campionamento dei survey Bansic'12-13 -15, I punti rappresentano le cale positive nel periodo di campionamento delle specie target lungo il Canale di Sicilia, per il prelievo delle larve ci siamo serviti di appositi campionatori Bongo 40. In ogni stazione sono stati raccolti anche dati ambientali grazie al CDT, montati nella strutta del bongo. Il bongo 40 è un retino doppio con bocche di diametro 40 cm equipaggiate con flussimetri GO (general Oceanics) per la determinazione dei volumi d'acqua. Le cale con Bongo 40 vengono effettuate durante la navigazione ad una velocità di circa due nodi, il campionamento avviene in modo obliquo, con un'inclinazione target del cavo di 45°; da un minimo di 5 Metri dalla superficie fino ad un massimo di 100 metri di profondità. Le dimensioni delle maglie montate sui retini erano di 200 µm. Di conseguenza, in relazione a ciò che si intende campionare, vengono utilizzati retini con maglia differente (Tranter, 1974; Jacques, 1978; Magazzù *et al.*, 1983; Innamorati *et al.*, 1990).

A bordo della nave, dopo le fasi di campionamento e lavaggio dei retini del Bongo 40, i campioni meso-zooplanctonici venivano sottoposti al *sorting*, ovvero osservati allo stereo-microscopio binoculare per l'individuare ed isolare le larve della specie target "*Engraulis encrasicolus*", una volta raccolte venivano conservate in modalità diversa, a seconda dello scopo analitico a cui erano destinate. (alcol o azoto).

I campioni venivano stoccati presso le celle frigo l'IAMC-CNR di Capo Granitola. Per quanto riguarda le larve preventivamente messe in alcool venivano conservate direttamente in frigo a 4°C, in attesa di analisi, mentre le larve in azoto, venivano conservate nei congelatori alla temperatura di (-80°C).

3.2.1 Sorting

I campioni relativi ad ogni stazione venivano sottoposti alle operazioni di riconoscimento (*sorting*), questo veniva effettuato per mezzo di uno stereo-microscopio

binoculare. Le larve identificate venivano separate per specie, in particolare tutte le larve della specie *Engraulis encrasicolus* sono state raccolte singolarmente. Ad ogni larva è stata scattata una foto in modo che potessero essere effettuate anche la raccolta dei principali dati morfometrici. Successivamente sono stati conservati in apposite eppendorf sulle quali venivano riportati i dati di riferimento quali: il nome della campagna e rispettivo anno la stazione e l'ordine di cattura. In una fase preliminare prima delle analisi le conservate in alcool, destinate per analisi di lipidi carboidrati e aminoacidi (AA), sono state scelte in base alle analisi risultate positive e suddivise in parti suddivisa in parti (testa, corpo, occhi), ognuno delle quali è stata usata per le specifiche analisi contemplate in questo lavoro. Secondo lo schema riportato in Tab. 3.2.1 1

Alcool 70%		Azoto
Corpo senza testa	Occhi	Corpo intero
Carboidrati e lipidi	Aminoacidi	Attività enzimatica

Tabella 3.2.1.1 di distribuzione e conservazione dei campioni per analisi

3.3 Morfometria.

La morfometria essendo uno dei Metodi utilizzati nel campo multidisciplinare dell'identificazione di stock (Ihssen *et al.*, 1981), rappresenta lo studio delle variazioni della forma e delle sue co-variazioni con altre variabili, sia qualitative che quantitative. Tradizionalmente consiste nell'applicazione di metodi statistici multivariati ad un set di variabili quantitative misurate a partire dalla morfologia dell'oggetto di studio, come distanze lineari ma anche con angoli e rapporti. Tale approccio è detto morfometria tradizionale (Marcus, 1990; Reyment, 1991) o morfometria multivariata (Blackith e Reyment, 1971) e mira a quantificare le variazioni delle misure morfologiche tra e all'interno di gruppi. La tecnica verrà applicata in primo luogo per valutare eventuali differenze morfologiche presenti in larve provenienti da diverse zone dell'are di studio. Tali differenze potrebbero infatti essere la manifestazione fenotipica di differenze alleliche indicative della presenza di differenti sub-popolazioni all'interno del Canale di Sicilia; o semplicemente la manifestazione dell'effetto diretto dell'ambiente sui caratteri fenotipici.

L'approccio prevede un primo *step* di acquisizione di immagini TIFF di ogni larva ad ingrandimento variabile, proporzionale alla grandezza della stessa, attraverso l'ausilio di uno stereo-microscopio con fotocamera integrata.

I parametri morfometrici sono acquisiti a partire da foto attraverso l'uso del software dedicato di gestione ed elaborazione immagini Image Pro Plus© (IPP).

In questo studio si è scelto di utilizzare le distanze lineari rappresentate in figura 3.3.1.

Tali parametri sono stati individuati da Diaz *et. al* (2009) per le larve dell' *Engraulis anchoita*:

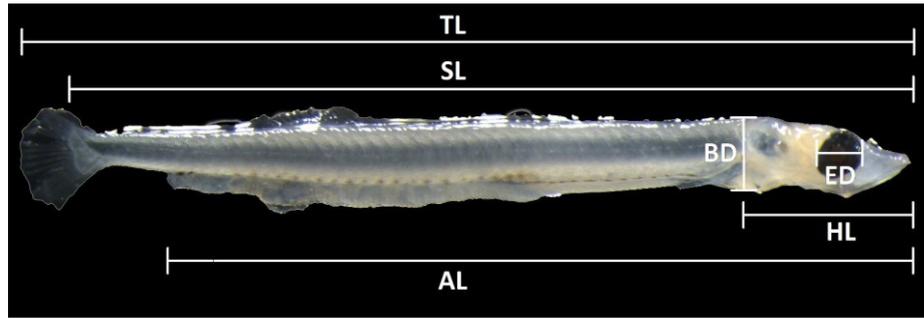


Figura.3.3.1 - Parametri morfometrici utilizzati per lo studio di morfometria tradizionale.

Lunghezza Totale (TL): dall'estremo anteriore della mandibola superiore all'estremità della pinna caudale.

Lunghezza Standard (SL): dall'estremo anteriore della mandibola superiore all'estremità della notocorda.

Lunghezza della testa (HL): Dall'estremo anteriore della mandibola superiore alla pinna pettorale.

Diametro del corpo (BD): Larghezza del corpo alla cleitra in direzione della pinna pettorale .

Diametro dell'occhio (ED).

Lunghezza anale (AL): dall'estremo anteriore della mandibola superiore all'estremità del tubo digerente.

L'ampiezza e il numero di classi di taglia sono individuate a posteriori in dipendenza del numero e del range di ampiezza nella quale fluttuano le osservazioni (N). Soliani (2002) suggerisce un minimo di 4-5 classi per un campione di 10-15 osservazioni, fino ad un massimo di 15-20 classi per N superiori a 100. Per stimare un numero oggettivamente proporzionato sul numero di osservazioni si è scelto di utilizzare il metodo di Sturges (1926), il quale propone la seguente formula:

$$C = 1 + 10/3 \times \log_{10} (N)$$

C indica il numero di classi di taglia. L'ampiezza di ogni classe (h) è inversamenteproporzionale al numero di classi (C) e si calcola seguendo la relazione:

$$h = (\text{valore massimo} - \text{valore minimo}) / C$$

3.4 Lipidi e Carboidrati

I campioni di *Engraulis encrasicolus*, per le analisi di lipidi e carboidrati, sono stati scelti accuratamente al fine raggiungere l'obiettivo generale di questo lavoro, come viene mostrato in figura 3.4.1. Nella mappa le stazioni del 2012 sono segnati in blu, le stazioni del 2013 sono segnati in rosso e quelli relativi all'anno 2015 sono segnati in verde.

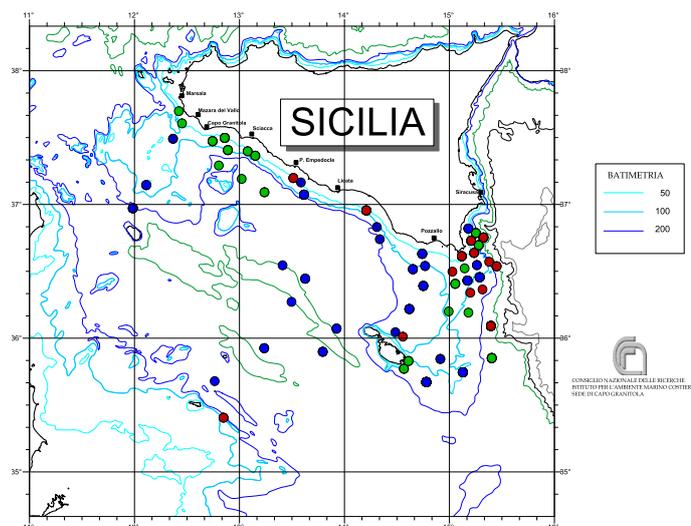


Figura 3.4.1. - mappa dei campioni sottoposti ad analisi biochimiche (2012-2013-2015)

Per la preparazione del campione, le larve sono state omogeneizzate e portate a volume con una quantità di acqua bi-distillata (1000 μ l), in seguito effettuato il prelievo di un volume specifico per ogni determinazione, così come previsto dai suddetti metodi gli omogeneizzati sono stati trattati con i vari reattivi al fine di ottenere una reazione colorimetrica quindi consentire un facile rilevamento attraverso lo spettrofotometro, utilizzando Valori di assorbanza per la componente biochimica a differenti lunghezze d'onda: 485 nm (CHO) e 530 nm (LIP).

Per l'analisi di ogni componente è stato necessario preparare una retta di taratura ed effettuare la determinazione quantitativa attraverso la preparazione di una Serie di standard a varie concentrazioni 5-10-20-100 ppm per l'analisi di lipidi, invece 2-5-10-20-30 ppm per l'analisi dei carboidrati. Gli standard utilizzati sono stati preparati

utilizzando materiali certificati. Più precisamente, per i lipidi il colesterolo *MERCK* e per i carboidrati il Glucosio *MERCK*. Il dato finale è stato ricavato inserendo il valore della determinazione all'interno della retta di taratura.

Le suddette analisi sono state effettuate attraverso l'ausilio di uno spettrofotometro UV mini *Shimadzu*. figura 3.4.2



Figura 3.4.2 Spettrofotometro uv-visibile (IAMC-CNR) Capo Granitola.

3.5 Gli aminoacidi

Nel periodo di stage presso un laboratorio straniero, come previsto nel ciclo del Dottorato sono state effettuate determinazioni di tipo preliminare allo scopo di usare gli aminoacidi come possibili marcatori nella discriminazione di specie. Si è trattato di un lavoro di base con lo scopo di accertare che la composizione aminoacidica degli occhi di due specie geneticamente distinte quali, *Danio rerio* (Zebrafish) e *Sardina pilchardus* (Sardina), potesse essere usata come strumento di discriminazione confermando la specificità del tessuto nelle specie, come era stato riscontrato per gli adulti di altre specie pelagiche (Riveiro 2011). La tecnica usata è stata quella messa appunto nei nostri laboratori neitaliani, ed usata per la determinazione di aminoacidi in occhi larvali di *Engraulis encrasicolus* di seguito la descritta.

3.5.1 Idrolisi acida con HCl

I dettagli delle condizioni di idrolisi acida può essere trovata in numerosi articoli classici.

Il trattamento con acido cloridrico è un metodo di idrolisi molto comune, (Moore *et al.*, 1963; Melzer, *et al.*, 1987; Ozols, 1990; Davidson, 1997; Hanessian, 1997; Weiss *et al.*, 1998) probabilmente per la convenienza dell'applicazione di questo reagente, viene usato in forma liquida ed evaporato in seguito, affinché l'idrolizzato venga recuperato in piccoli volumi.

Le analisi effettuate su piccoli campioni di substrato, presenta un fattore di criticità legato al fatto che la disponibilità di campione è veramente poco. In questo studio, il metodo utilizzato è stato quello dell'idrolisi acida (Wu, *et al.* (1999), adattandolo alle nostre esigenze. La scelta di questo metodo non è stata a caso, infatti prima delle analisi

sono state effettuate una serie di test di comparazione con altri metodi, i cui risultati sono stati riportati su (Falco et al., 2015). Per le analisi dei campioni si è proceduto nel seguente modo: abbiamo usato una concentrazione *6M di HCl* mantenendo il campione sotto corrente di azoto per un minuto. A questo punto come da protocollo sono stati mantenuti chiusi con tappi in teflon e conservati per 24 h in stufa alla temperatura di 110°C. Trascorso il suddetto periodo di reazione i campioni sono stati asciugati sotto corrente di N₂ (figura 3.5.1.1) e portati ad un volume finale di 1 ml con H₂O MillQ.

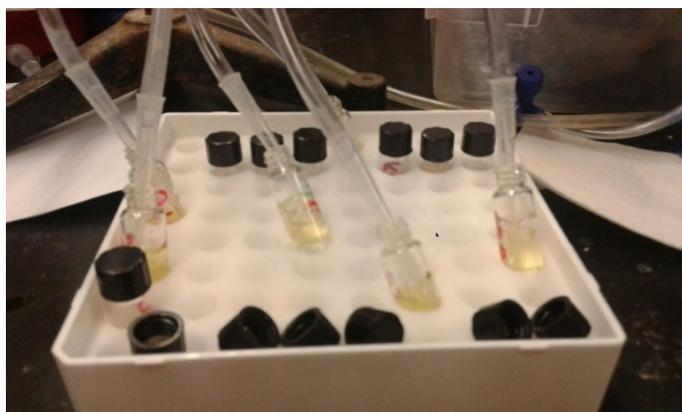


Figura 3.5.1.1. - Asciugatura dei campioni, preventivamente idrolizzati, in corrente di azoto.

L'asparagina (Asn) e la Glutamina (Gln), attraverso questo metodo, non vengono completamente idrolizzati in acido Glutammico (Glu) e Acido Aspartico (Asp), per cui avremo una somma delle due forme, infatti, tali aminoacidi verranno indicati come (Asn+Asp) e (Gln+Gly). La cisteina, invece non può essere direttamente determinata.

3.5.2 Analisi di amminoacidi con HPLC system

La determinazione degli amminoacidi è stata eseguita sugli occhi dei campioni larvali, dopo essere stati idrolizzati con il metodo appena descritto. Una volta ottenuti i campioni prima di essere usati sono stati filtrati attraverso delle *vials (nanosept MF centrifugal with GHP membrane)* e usati per la preparazione del campione da sottoporre all'analisi strumentale in HPLC descritto di seguito:

Sistema HPLC

Per l'applicazione del Metodo è stato usato un sistema HPLC di cui ne vengono riportate le caratteristiche.

HPLC Shimadzu

degasatore DGU-20A5;

pompa LC-20AD;

autocampionatore SIL-20ACHT con pretrattamento;

termostato colonna CTO-20°;

detector fluorescenza RF-10XLD;

sistema di controllo CBM-20°;

Derivatizzazione con OPA

La reazione di derivatizzazione è stata ottenuta seguendo il derivatizzazione aggiungendo i reagenti richiesti dal Metodo precedentemente descritto (Z.dai et al.2014), seguendo uno schema di reazioni descritto in figura 3.5.2.2

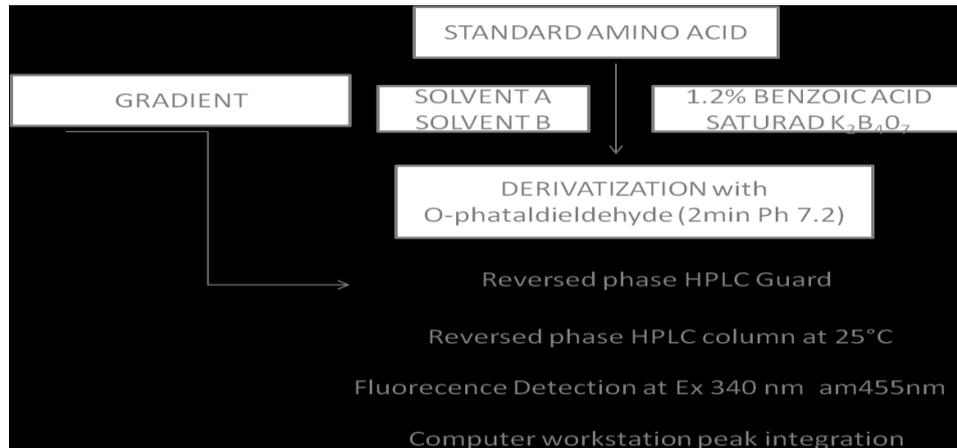


Figura 3.5.2.2. - Schema di trasporto dell'eluente all'interno del sistema HPLC Shimadzu.

La reazione è avvenuta all'interno del sistema grazie alla presenza di un autocampionatore, in figura (3.5.2.3) viene riportato il sistema usato per le analisi aminoacidiche eseguite in questo studio.



Figura 3.5.2 3 - Sistema HPLC usato per le analisi di aminoacidi.

3.6 Gli Enzimi

Sui campioni larvali di *Engrulis encrasicolus*, separati sulla base alla stazione di campionamento, è stato effettuato anche uno screening enzimatico. Il campione risultava formato da un gruppo di 5 larve e in totale sono stati preparati 10 campioni per Area. In particolare la perossidasi e la fosfatasi alcalina; le larve in un primo momento sono state omogeneizzate in 400 μ l di acqua distillata e successivamente centrifugare a 9000 g/S;

il surnatante veniva prelevato e sottoposto ad analisi proteica con metodo di “Bradford”; la concentrazione proteica delle larve veniva diluita a 200 μ g/ml.

3.6.3 Analisi dei dati

I dati ottenuti delle unità di fosfatasi sono stati elaborati con l'applicazione Sigmaplot, al fine di ricavare i valori di Abs/min tramite il coefficiente angolare della retta di regressione applicata al grafico tempo Vs - Abs derivante dall'attività fosfataseica (Fig. 3.6.3.1)

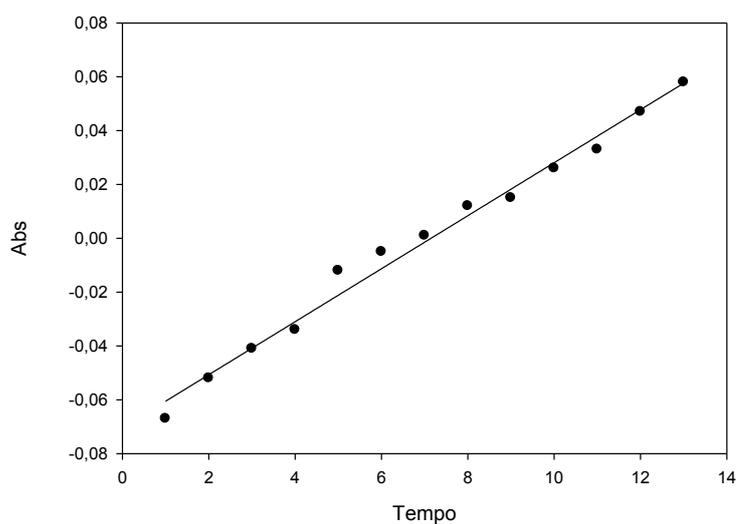


Fig.3.6.3.1 : Grafico a dispersione per la determinazione dell'attività enzimatica della fosfatasi alcalina.

Il valore di Abs/min è stato elaborato secondo la formula:
 $(\text{Abs/min}) \cdot (1000/E \cdot b) \cdot (V_f/V_i)$.

Il valore di E indica il coefficiente di estinzione molare (18,45 per la fosfatasi), mentre il valore di “b” indica il cammino ottico delle cuvette, ed è pari a 0,067. Il valore finale è espresso in U.L./mg di proteina. Pertanto il valore U.L./ml di ogni singolo campione è stato diviso per la concentrazione proteica (espressa in mg/ml).

Infatti: $(U.L./ml)/(mg/ml) = U.L./mg$ di proteina.

Il valore di assorbanza infine è stato moltiplicato per il volume finale del pozzetto (200 μ l), quindi: $ABS * v_f = U.L./ml$.

3.6.1 Valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina

Per valutare l'attività della fosfatasi alcalina, i campioni sono stati incubati in un volume uguale di 4 mM p-nitrofenil fosfato liquido in 100 mM di bicarbonato di ammonio contenente 1 mM di MgCl₂ (pH 7.8) come descritto da Ross et al. (2000).

L'aumento della densità ottica è stata misurata ad intervalli regolari di 1 minuti per 1h a 405nm con un lettore per micro piastre (LABSYSTEM UNISKAN I). Una unità (U) 51 di attività è stata definita come la quantità di enzima necessaria per liberare 1 micromole di *p-nitrofenolo* prodotto in 1 min.

3.6.2 Valutazione dell'attività perossidasi

L'attività perossidasi, è stata determinata secondo il metodo di Ross et al., (2000). Un volume di 10 μ l di campione è stato incubato con 40 ml di HBSS e addizionato con 100 μ l di MBS; dopo 30' è stato aggiunto H₂SO₄ (2M). L'aumento della densità ottica è stata a 405nm con un lettore per micro piastre (LABSYSTEM UNISKAN I). L'attività è stata determinata come per la fosfatasi alcalina.

3.7 Statistica

In generale per tutti i dataset (AA, Lipidi e carboidrati e morfologie complessive) sono state osservati range di lunghezza differenti tra le due aree. In particolare sul banco di

Malta si osserva un range di lunghezze più ampio che sul banco Avventura. Tale caratteristica è comune a tutti i dataset, compreso quello delle morfologie complessive in cui sul banco di Malta abbiamo un range compreso tra 2 e 20 mm mentre sul banco Avventura tale range è compreso tra 2 e 14 mm).

Su tutti i dataset è stato effettuato un controllo per l'individuazione di osservazioni anomale (*outliers* statistici o valori errati) e alcune osservazioni sono state rimosse.

Inoltre, al fine di effettuare confronti coerenti tra le due aree in termini di AA (aminoacidi), lipidi e carboidrati, tali dataset sono stati ridotti ad un *range* di lunghezze comuni (2-12mm). In tal modo i confronti non risentiranno di possibili bias introdotti nel confrontare valori relativi a range di lunghezza differenti. Infatti sebbene non siano emerse forti correlazioni tra LS e valori di amminoacidi, lipidi e carboidrati, non è possibile escludere che gli organismi molto vicini allo stato post-larvale non presentino variazioni nei processi metabolici e fisiologici che potrebbero alterarne i valori.

Nell'analisi PCA i valori dei parametri morfologici sono stati standardizzati rispetto alla Lunghezza Standard al fine di evitare che il pattern dominante nella PCA fosse quello tra dimensione della larva e parametri morfometrici.

Le analisi di questo lavoro sono state effettuate attraverso software Statistici, in particolare è stato usato Statistica 10.

I metodi applicati ci hanno consentito di effettuare uno screening di tipo descrittivo.

Tra i metodi usati: *discriminant function analysis*, analisi multivarita (*kruskal wallis* anova).

Il test di Kruskal-Wallis è un metodo non parametrico (**non** si assume l'ipotesi che i dati provengano da una popolazione normale o gaussiana) che ha consentito di verificare l'uguaglianza delle mediane dei diversi gruppi di dati che sono stati confrontati, nello stesso tempo ci ha consentito di verificare se tali gruppi provengano da una stessa popolazione (da popolazioni con uguale mediana). (W.H. Kruskal et al., 1952)

La discriminant function analysis è un insieme di metodi volti a stabilire l'appartenenza di una nuova unità statistica ad uno dei (g) gruppi (popolazioni identificate) in base al valore che essa assume su (p) variabili quantitative. Tali gruppi vengono identificati a priori sulla base delle osservazioni delle (p) variabili su un campione di (n) unità provenienti da diverse popolazioni. (<http://www2.stat.unibo>), permettendo di attribuire i singoli individui analizzati ai diversi parametri di uno o più gruppi. Si tratta di un metodo esplorativo (Fabbris,1997) ovvero di statistica descrittiva multidimensionale (Lebart, et al, 1982) che parte dal presupposto espresso chiaramente nella frase di uno dei maggiori esponenti della scuola francese di analisi dei dati: “il modello deve seguire i dati, non viceversa” (Benzecri, 1980).

Capitolo 4

Risultati

4.1 Risultati sui dati morfometrici

Lo studio dei dati morfometrici è stato condotto sulle larve di *Engraulis encrasicolus* catturate durante i *survey* Bansic 2012, 2013 e 2015; la loro distribuzione è stata molto disomogenea. Come si può notare dalla figura 4.1.1, esiste una netta differenza in termini di biomassa tra il numero di campioni catturati nelle due Aree: Banco Avventura (BA) e Banco Maltese (BM) (Tabella 4.1.1)

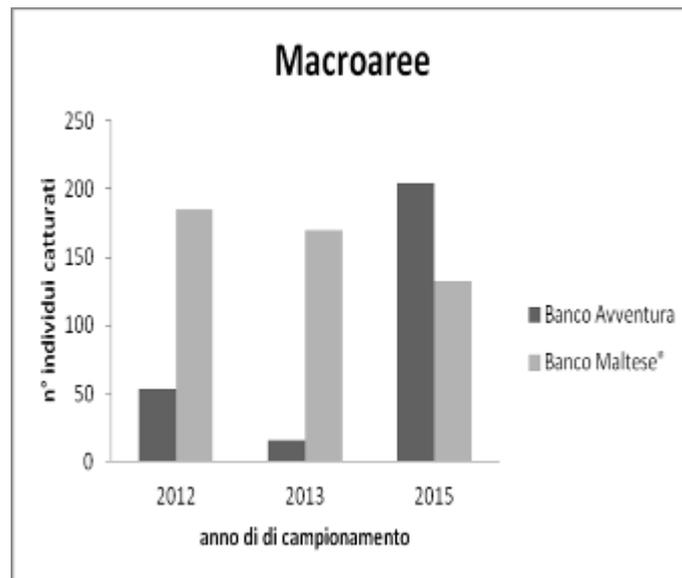


Tabella 4.1.1 - Differenza degli individui campionati nei tre anni di campionamento.

L'area BA presenta un minor numero di larve per il 2012 e il 2013, mentre si ha un notevole aumento del numero di esemplari nel 2015.

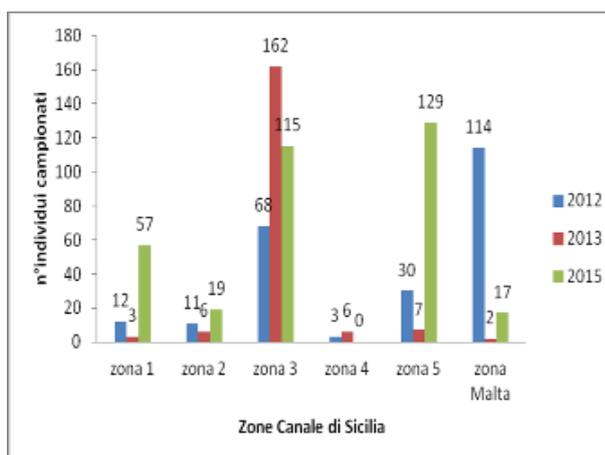


Figura.4.1.2 - Numero di larve utilizzate per le analisi morfometriche 2012 -2013 – 2015 per zona.

Come si può osservare dalla figura 4.1.2, la Zona 3, rappresenta quella con un maggior numero di larve sia per il 2012 -2013 e 2015, seguita dalla Zona Maltese e Zona 5 nel 2012. Nel 2013 non vengono evidenziate altre Zone di particolare abbondanza. Nel 2015 la Zona 5 ha addirittura un numero maggiore di larve rispetto alla Zona 3, seguita dalla Zona 1.

Morfometrie 2012 (Classi di taglia)

Nell'anno 2012 sono stati analizzati per l'analisi morfometrica 222 larve, e sono state identificate 11 classi di taglia (Tabella 4.1.3) costruite applicando la formula di Sturges (1926) (Vedasi capitolo 3.3).

Classe di taglia	Intervallo (mm)
1	1-2
2	2-4
3	4-6
4	6-8
5	8-10
6	10-12
7	12-14
8	14-16
9	16-18
10	18-20
11	20-22

Tabella. 4.1.3 – Classi di taglia

Le misure delle lunghezze standard delle larve hanno riportato un valore minimo di 1.95 mm ed un valore massimo 21.02 mm.

Morfometrie 2013 (classi di taglia)

Nell'anno 2013 sono state analizzate per l'analisi morfometrica 184 larve. Le classi di taglia identificate sono state 10, seguendo la stessa procedura descritta per il 2012 è stato calcolato un *range* di ampiezza (h) pari a 1.78 mm. Anche in questo caso il *range* della classe di taglia è stato arrotondato a 2 mm. Le misure di lunghezza standard delle larve variavano da un minimo di 2.02 mm e un massimo di 19.3 mm.

Morfometrie 2015 (Classi di taglia)

Le larve sottoposte ad analisi morfometriche erano 316. Sono state identificate 11 classi di taglia, con *range* di ampiezza Δ (h) pari a 1.86 mm. Anche in questo caso si è adottato un arrotondamento per eccesso di 2 mm. Le misure delle lunghezze standard variavano da 2.1 mm a 20.7 mm.

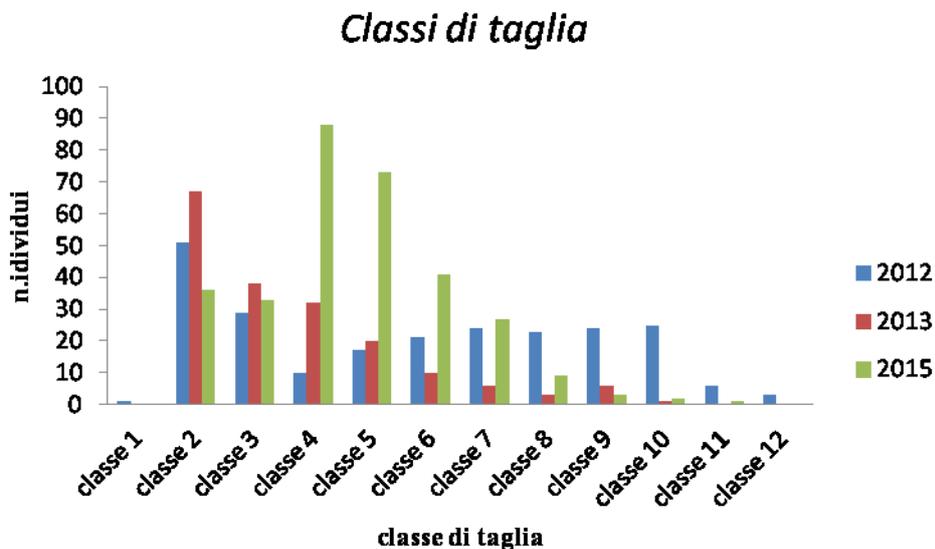


Figura 4.1.6 – Distribuzione in classi di taglia della larve campionate (2012-2013-2015)

Dalla Figura 4.1.6 si nota come la distribuzione delle classi di taglia cambi durante gli anni. Infatti, nel 2012 abbiamo sicuramente un numero maggiore di larve nelle classi di taglia comprese tra 6 e 10, nel 2013 risulta una maggiore distribuzione di larve nelle classi di taglia 1-2-3, mentre nel 2015 si è in presenza di un'altra distribuzione

differente rispetto ai due anni precedenti, ovvero una distribuzione con un maggior numero di larve distribuite nelle classi di taglia 4-5-6. Un altro risultato evidenziato dalla sovrapposizione dei diagrammi è la totale mancanza di classe di taglia 10 e 11 nel 2013 e la mancanza di classe di taglia 11 nel 2015. Attraverso il grafico a torta (Figura 4.1.7-a,b,c), si può apprezzare meglio questa differenza riportata in percentuale.

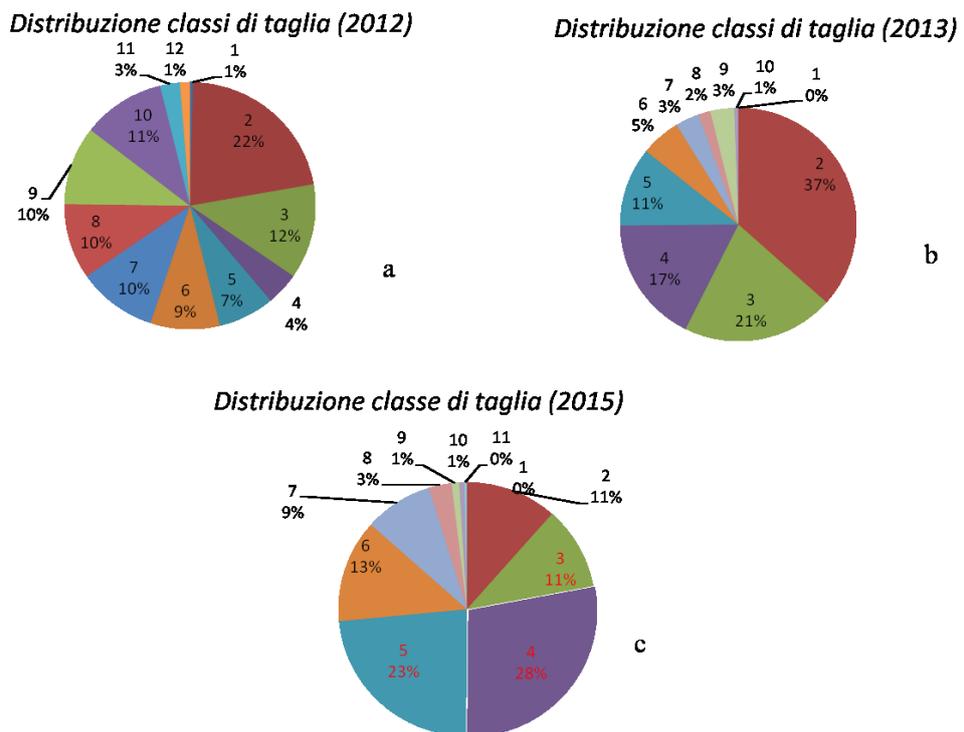


Figura.4.1.7 – (Grafico della distribuzione percentuale della classe di taglia (2012-a, 2013 b, 2015 c).

Dalla suddivisione del grafico a torta riportato per ogni anno si evidenzia che nell'anno 2012 il 22% degli individui campionati appartenevano alla classe di taglia 2, il 12% alla classe di taglia 3 e l'11% alle classe 10.

Per il 2013 si osserva che il 37% degli individui campionati appartenevano alla classe di taglia 2, mentre il 21% alla classe di taglia 3 e il 17% alla classe di taglia 4.

Per l'anno 2015, è stato evidenziato uno scenario differente nella distribuzione delle percentuali, infatti solo 11% delle larve campionate sono state attribuite alla classe di taglia 2, il 28% alla classe di taglia 4 ed il 23% alla classe 5. La classe di taglia con una

alta distribuzione risulta essere la 3, infatti appare comune in tutti gli anni di campionamento.

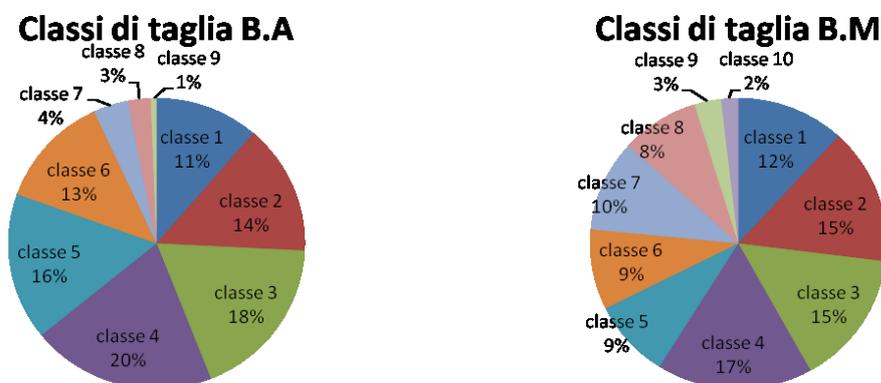


Figura 4.1.8 - Classi di taglia nell'area del BM e del BA (2012-2013-2015)

Dalla distribuzione percentuale delle classi di taglia nei due banchi si vede innanzitutto una diversa distribuzione delle classi: il BA presenta 9 classi di taglia, mentre il BM 10 classi di taglia.

Il BM ha una maggiore percentuale di larve di classe 4, mentre per il Banco Avventura non ci sono larve di *Engraulis encrasicolus* nelle classe di taglia 10 e 11. La maggior parte delle larve prelevate nel BA appartengono per il 18 % alle classi di taglia 3 e il 20% alla classi 4.

Nel BM la distribuzione nelle classi di taglia 1-2-3 (12-15-15%) è paragonabile a quella nel BA, in cui abbiamo una distribuzione delle classi di taglia 1-2-3 con 11-14-18%. Infine nel BA è presente una maggiore percentuale di larve appartenenti alle classi 5 e 6 (16-13%), rispetto al BM con rispettivamente (9-9%) nelle classi 5-6.

Oltre alla Lunghezza Standard (LS), sono state eseguite le misurazioni di altri parametri morfometrici delle larve di *Engraulis encrasicolus* nell'area del Banco Maltese e nell'area del Banco Avventura

4.2 Confronto dei dati morfometrici (2012- 2013-2015)

Nella Tabella 4.2.1 vengono riportati il numero di larve misurate per zona, il *range* di lunghezza *standard* (*Max-min*), la media e la mediana in (mm), relativi ad ogni anno di campionamento.

Zona	N° Larve			LS Range (min-max) (mm)			Media (mm)			Mediana (mm)		
	2012	2013	2015	2012	2013	2015	2012	2013	2015	2012	2013	2015
1	12	2	52	2,57-8,88	2,54-3,08	2,72-13,73	4,52	2,54	8,52	4,23	2,54	8,32
2	11	6	19	1,95-16,69	2,88-13,53	2,06-18,00	5,22	2,88	7,43	2,94	2,88	6,28
3	67	161	105	2,44-21,02	2,02-19,35	2,24-20,66	6,94	7,49	8,61	4,66	7,49	8,14
4	3	6	-	5,87-12,13	5,42-16,16	-	12,12	5,42	-	9,58	5,42	-
5	31	7	122	2,22-25,10	3,89-17,99	2,06-19,43	8,13	3,89	7,77	4,59	3,89	7,59
Malta	114	0	17	2,58-28,09	-	2,26-14,71	14,00	0,00	9,21	14,62	0,00	8,76

Tabella.4.2.1-Numero di larve analizzate e range di lunghezza-media-mediana per zona. 2012-2013-2015)

Come si può osservare dalla tabella 4.2.1, la media per le larve campionate a Malta nel 2012 e nel 2015 risulta essere la maggiore rispetto alle altre Zone, con valori minimo e massimo rispettivamente di 14,00 e 9,21 mm. Le larve più piccole sono state trovate nella Zona 1 (Banco Avventura) nel 2012 e nel 2013, con valori medi di 4,52 e 2,54. I parametri morfometrici misurati in tutte le larve catturate nei tre anni sono stati analizzati per le due aree principali (Tabella 4.2.2).

Variabile	Banco Avventura				Banco Maltese			
	Numero esempleri	Media (mm)	Min - Max (mm)	Dev. Standard	Numero esempleri	Media (mm)	Min - Max (mm)	Dev. Standard
SL	281	7,95	2,06-19,43	3,80	469	8,64	1,95-21,02	4,79
HL	281	1,56	0,34-4,72	0,80	469	1,59	0,29-11,66	1,06
ED	248	0,43	0,09-1,07	0,17	391	0,46	0,12-2,74	0,22
BD	281	0,69	0,16-7,08	0,52	470	0,68	0,10-6,26	0,45
AL	279	6,00	1,65-16,30	2,74	468	6,28	1,28-15,59	3,20

Tabella 4.2.2 - Valori di SL medio min-max (mm) e deviazione standard.

In particolare, nell'area del Banco Avventura sono state misurate circa 281 larve di *Engraulis encrasicolus* mentre nel Banco Maltese il numero di larve sottoposte ad analisi morfometriche nei tre anni risulta essere pari a 469.

Per le due aree non sembrano esserci delle forti differenze per i parametri SL, BD e AL; solamente HL e ED sembrano presentare delle differenze.

Sulla base degli scatterplot tra LS e i parametri morfometrici e dei boxplot delle morfometrie per area, sono state individuate ed eliminate le osservazioni che mostravano valori anomali. Nella figura 4.2.1, vengono riportati gli scartepplot relativi ai principali parametri morfometrici rilevati nei tre anni di campionamento.

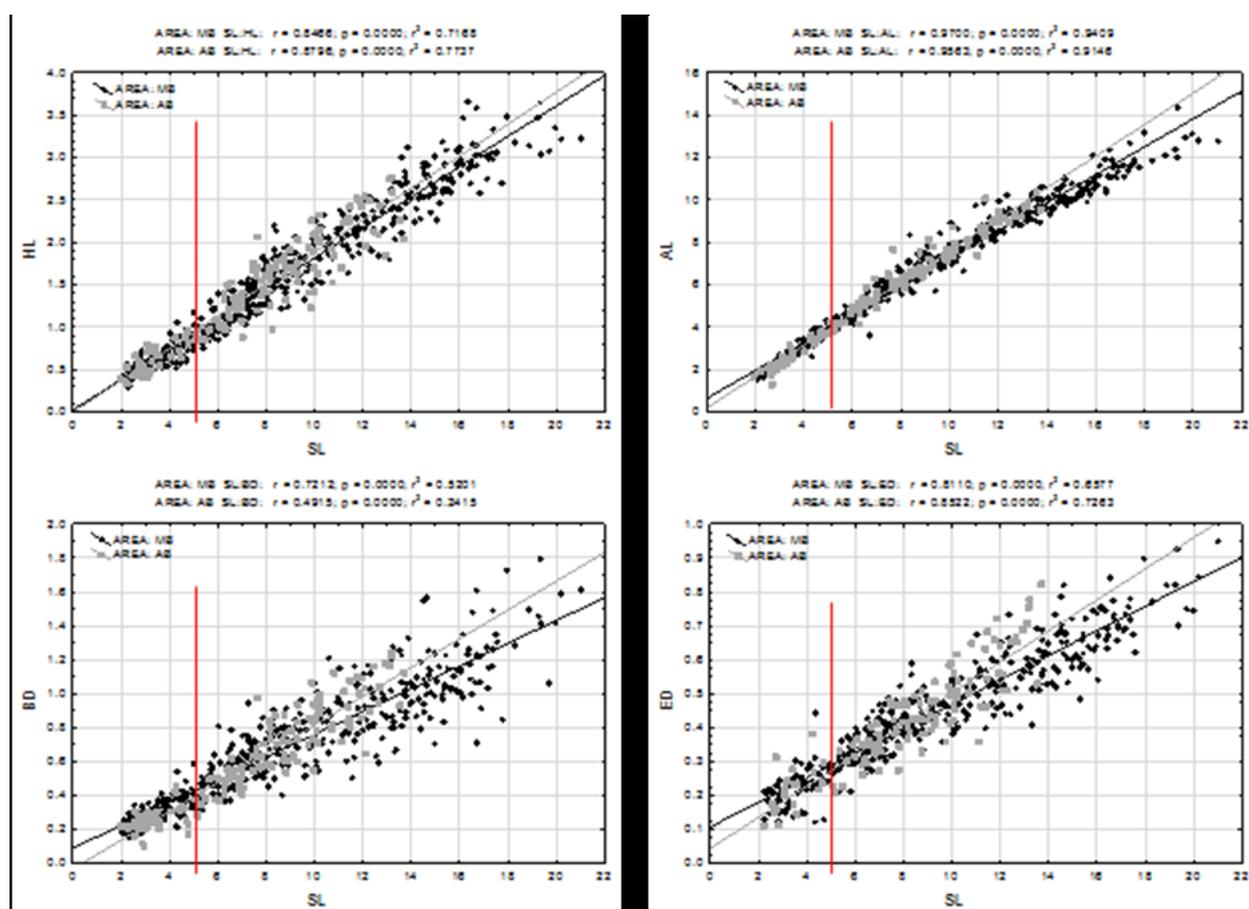


Figura 4.2.1. -Scatterplot delle principali lunghezze morfometriche dell'intero dataset (2012-2013-2015)

Al fine di valutare eventuali differenze tra le due aree in relazione ai parametri morfometrici BD, HL, AL e ED, è stato utilizzato il test ANCOVA, in modo da tener

conto della relazione di tali parametri con la lunghezza. Ciascun modello è stato prima valutato contemplando la possibile interazione tra Area e lunghezza proprio al fine di verificare l'omogeneità delle pendenze delle rette. Nel caso in cui le interazioni non sono risultate significative, il termine di interazione è stato rimosso dal modello. In particolare si è riscontrata una differenza significativa in termini di intercette per HL, mentre per i rimanenti parametri è stata evidenziata una differenza significativa nelle pendenze delle rette (come è possibile osservare dagli scatterplot precedenti).

Si riportano di seguito in tabella 4.2.3 i risultati dell'ANCOVA.

Response: HL				
	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
AREA	0.16	1	4.1041	0.04326 *
SL	331.49	1	8715.3611	< 2e-16 ***
Residuals	20.92	550		

Response: ED				
	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	0.00065	1	0.184	0.6681
AREA	0.07165	1	20.192	8.831e-06 ***
SL	1.87790	1	529.205	< 2.2e-16 ***
AREA:SL	0.11774	1	33.179	1.522e-08 ***
Residuals	1.66426	469		

Response: BD				
	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	0.0270	1	1.747	0.1868070
AREA	0.2183	1	14.111	0.0001907 ***
SL	8.2161	1	531.001	< 2.2e-16 ***
AREA:SL	0.3454	1	22.321	2.932e-06 ***
Residuals	8.5101	550		

Response: AL				
	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	0.58	1	3.3139	0.06924 .
AREA	2.94	1	16.7517	4.903e-05 ***
SL	603.48	1	3434.8869	< 2.2e-16 ***
AREA:SL	5.95	1	33.8534	1.012e-08 ***
Residuals	96.10	547		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tabella 4.2.3: Risultati del test ANCOVA per ciascuno dei parametri morfometrici

In particolare, per la variabile HL si osservano dimensioni maggiori sul Banco Avventura rispetto al Banco di Malta, mentre per le altre variabili si osservano valori più bassi sul Banco Avventura in corrispondenza delle classi di lunghezza minori, ma la differenza nelle pendenze delle rette fa sì che per le classi di lunghezza maggiori sia vero l'opposto.

Al fine di valutare la presenza di eventuali pattern nei dataset in relazione anche ai parametri ambientali, si è utilizzata l'Analisi delle Componenti Principali (PCA).

In tale contesto le variabili morfometriche sono state standardizzate per la LS, mentre la clorofilla è stata trasformata utilizzando la funzione logaritmo in modo da ridurre lo sbilanciamento positivo tipico delle distribuzioni di frequenza di tale variabile (Figura 4.2.3).

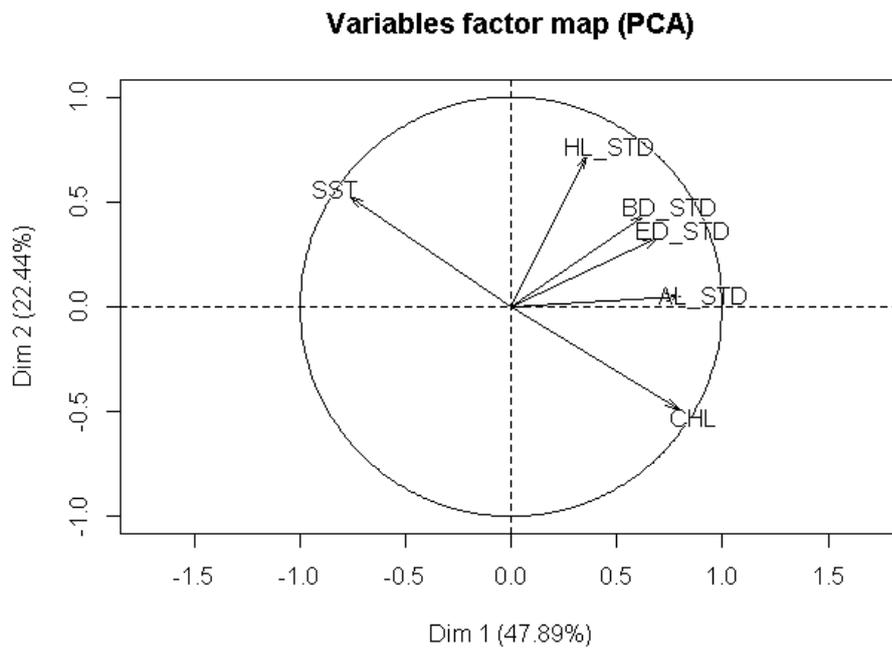


Figura 4.2.3 Grafico delle coordinate fattoriali dei parametri morfometrici e ambientali

I risultati relativi al dataset delle morfometrie complessive mostrano la presenza di un pattern che lega valori maggiori dei parametri morfometrici a valori più bassi di temperatura e CHL più alti. Tale risultato conferma quanto osservato precedentemente analizzando il dataset delle morfometrie complessive, ovvero parametri morfologici

maggiori sul Banco Avventura (caratterizzato da basse temperature e alta clorofilla) rispetto al Banco di Malta.

I valori della correlazione sono stati riportati nella tabella 4.2.4.

	Dim.1	Dim.2
HL_STD	0.357	0.724
ED_STD	0.693	0.327
BD_STD	0.633	0.435
AL_STD	0.798	0.051
SST	-0.77	0.529
CHL	0.797	-0.494

Tabella 4.2.4: Valori di correlazione tra le variabili e gli assi della PCA. Il primo asse (che spiega circa il 50% della variabilità del dataset) mette in relazione valori maggiori di ED, BD e AL con più alti valori di CHL e acque più fredde.

4.3 Risultati sulle analisi biochimiche

I lipidi e i carboidrati, determinati nei tessuti muscolari delle larve di *Engraulis encrasicolus*, sono stati estratti dagli stessi campioni larvali ai quali è stata asportata la testa per consentire il prelievo degli occhi che sono stati utilizzati per la determinazione della composizione aminoacidica della larva stessa (4.3.2). Oltre alle morfometrie e alla composizione aminoacidica, sullo stesso campione sono state raccolte anche informazioni che riguardano lo stato nutrizionale della larva (Hakanson, 1989).

La determinazione lipidica e carboidratica ha permesso di valutare lo stato nutrizionale delle larve prese in esame, ma soprattutto usate come *dataset* di riferimento per la valutazione dell'area o delle relative zone che ne hanno rappresentato l'*habitat* fino al momento della cattura (Bonanno *et al.*, 2012).

Prima di mostrare i dati relativi a queste analisi, verrà di seguito descritta un'attività sperimentale preliminare, ritenuta necessaria al fine di mostrare una corretta valutazione della concentrazione totale dei lipidi e dei carboidrati relativa all'intero corpo larvale di *Engraulis encrasicolus*. Questa esigenza nasce dalla necessità di ottimizzare la quantità di campione biologico disponibile, visto il difficoltoso reperimento durante le attività di campionamento. Sulla stessa larva sono state eseguite diverse tipologie analitiche. In particolare, la testa è stata usata per l'estrazione delle microsaggitte, che in questo contesto non sono state prese in considerazione, e per l'estrazione degli occhi su cui è stata determinata la composizione aminoacidica.

Per stabilire una relazione tra la concentrazione biochimica (in μg) e la grandezza della larva, è stato effettuato un lavoro di analisi preliminare al fine di determinare una relazione tra la concentrazione contenuta nella porzione di corpo analizzata e l'intero corpo larvale.

4.3.1 Esperimento preliminare per la determinazione dei Lipidi e Carboidrati

Nella fattispecie sono state selezionate circa venti larve dai campioni conservati in alcool durante la campagna oceanografica 2012. Gli esemplari sono stati sottoposti inizialmente ad analisi d'immagine per la misurazione di alcuni parametri morfometrici e successivamente al taglio per le analisi biochimiche. Le larve sono state sezionate con un taglio all'altezza della pinna pettorale, facendo particolare attenzione a non estrarre gli otoliti. Le analisi di lipidi e carboidrati sono state effettuate sui due pezzi anatomici ottenuti.

I risultati relativi alle analisi di carboidrati (carb.) e lipidi (lip) sono riportati in tabella 4.3.1.1

Parti analizzate	Media (μg)		D.ST		Mediana		%	
	Carb.	Lip	Carb.	lip	Carb.	lip	Carb.	lip
Corpo senza testa	6,2	39,7	3,0	29,8	5,1	39,2	39,8	69,0
Testa	2,8	60,2	1,7	51,2	2,6	51,4	60,2	31,0

Tabella 4.3.1.1 - Valori medi dei dati analitici sperimentali.

Dalla tabella si nota chiaramente che le percentuali di lipidi e carboidrati non sono perfettamente distribuite nelle due parti del corpo, avendo appurato che i carboidrati presenti nel corpo senza testa sono pari ad una percentuale di 39,8% mentre soltanto nella testa abbiamo una percentuale di carboidrati pari al 60,2 %.

I lipidi, sembrano mostrare una distribuzione inversa, con una percentuale maggiore nel corpo senza testa pari al 69% e una percentuale minore nella testa pari al 31, %.

Per ogni analita determinato (lipidi e carboidrati) è stata calcolata la concentrazione totale teorica, sommando i valori delle concentrazioni ottenute dalla due porzioni anatomiche realmente determinate. A questo punto abbiamo messo in relazione i dati

teorici ottenuti con i valori realmente misurati nel corpo, ottenendo una relazione la cui regressione risultava essere positiva con un R^2 di 0,9116 per i carboidrati e di 0,8416 per i lipidi (figura 4.3.1.1).

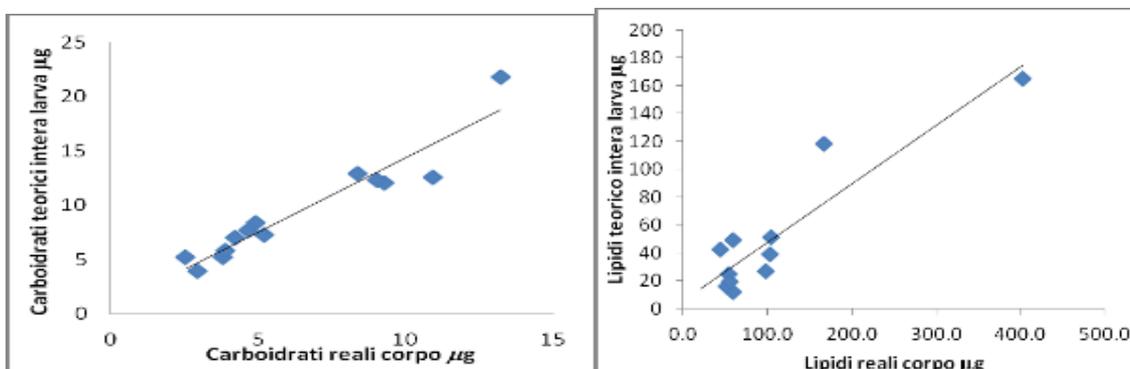


Figura 4.3.1.1.- Relazione tra concentrazioni calcolate sul corpo intero e quelle ottenute dall'analisi effettuata sulla porzione di corpo

Vista la relazione positiva tra i valori realmente analizzati ed i totali calcolati (corpo-testa) riportati nei grafici, sono stati determinati i dati relativi alla concentrazione lipidica e carboidratica dell'intero corpo larvale dei campioni studiati, applicando l'equazione della retta ottenuta.

4.3.2 Analisi di lipidi e carboidrati

Nella tabella 4.3.2.1 vengono riportati i dati medi che sono stati determinati dalle analisi biochimiche in tutti gli anni di studio(2012-2013-2015)

<i>Analita</i>	<i>Numero di casi</i>	<i>Media in µg</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>dev.stand</i>
<i>Carboidrati</i>	215	21,71	0,22	86,65	17,51
<i>Lipidi</i>	201	13,01	0,48	99,06	12,91

Tabella 4.3.2.1. Medie (µg) valori min e massimi di lipidi e carboidrati (2012-2013-2015)

Come si osserva nella tabella 4.3.2.1. i campioni sottoposti ad analisi biochimica nei tre anni sono stati circa 215 per carboidrati e 201 per lipidi; con valori medi rispettivamente 21,71 e 13,01. valori medi

Lipidi e Carboidrati 2012

I risultati analitici di lipidi e carboidrati totali su corpi dei campioni larvali di *Engraulis encrasicolus* nel 2012, sono stati riportati nella tabella 4.3.2.2.

Anno	Area	Zona	n° individui	Valore medio carboidrati $\mu\text{g}/\text{larva}$	Valore medio lipidi $\mu\text{g}/\text{larva}$	Valore medio carboidrati $\mu\text{g}/\text{larva Area}$	Valore medio lipidi $\mu\text{g}/\text{larva Area}$
2012	BA	1	8	11,58	13,88	16,13	13,72
		2	8	12,67	17,27		
		5	15	18,53	12,28		
2012	BM	3	30	12,46	13,42	18,53	12,28
		4	3	15,57	13,74		
		Malta	45	19,00	12,75		

Tabella 4.3.2.2 - Valori medi di lipidi e carboidrati riferito alle zone e alle Aree BA e BM 2012)

Lipidi e Carboidrati 2013

Le analisi di macromolecole (lipidi e carboidrati)sono state ripetute anche su campioni di *Engraulis encrasicolus* del 2013, vi sono delle differenze.tabella 4.3.2.3,

anno	Area	Zona	Nr. individui	Valore medio carboidrati $\mu\text{g}/\text{larva}$	Valore medio lipidi $\mu\text{g}/\text{larva}$	Valore medio carboidrati $\mu\text{g}/\text{larva Area}$	Valore medio lipidi $\mu\text{g}/\text{larva carb. Area}$
2013	BA	1	-	-	-	6,22	16,15
		2	8	2,26	19,76		
		5	15	7,98	13,05		
2013	BM	3	30	8,63	17,22	8,80	15,80
		4	6	9,25	12,24		
		Malta	-	-	-		

Tabella4.3.2.3 - Valori medi di lipidi e carboidrati riferito alle zone e alle macroaree B. A e B. M 2013

In termini di macroarea esiste una netta differenza per quanto riguarda il valore medio espresso $\mu\text{g}/\text{larva}$ dei carboidrati, 6,22 per il BA, mentre 8,80 per BM.

Lipidi e Carboidrati 2015

I Valori di lipidi e carboidrati totali che sono stati analizzati nel 2015, sono stati riportati in tabella 4.3.2.4.

Anno	Area	Zona	Nr. Individui	Valore medio carboidrati $\mu\text{g}/\text{larva}$	Valore medio lipidi $\mu\text{g}/\text{larva}$	Valore medio carboidrati $\mu\text{g}/\text{larva}$	Valore medio lipidi $\mu\text{g}/\text{larva}$ Area
2015	BA	1	15	51,13	3,72	35,68	9,73
		2	6	28,71	5,45		
		5	25	29,71	14,56		
2015	BM	3	30	30,34	13,81	28,79	13,21
		4	0	-	-		
		Malta	6	21,31	10,32		

Tabella 4.3.2.4 - Valori medi di lipidi e carboidrati riferito alle zone e alle macroaree BA e BM 2015)

Per quanto riguarda le due Macroaree, si osserva che valori più alti in termini di carboidrati sono stati riscontrati nel BA (35,68 $\mu\text{g}/\text{larva}$), mentre valori di lipidi erano più bassi rispetto a quelli riportati nel BM.

Nel BA le concentrazioni più basse dei lipidi appartengono alle zone 1 e 2. Risulta evidente che nella zona 1 vi è anche una concentrazione carboidratica molto più alta rispetto alle altre zone, con un valore di 51,13 $\mu\text{g}/\text{larva}$. Nel BM è la zona Malta che mostra di avere concentrazioni di carboidrati e lipidi più bassi (21,31 $\mu\text{g}/\text{larva}$ e 10,32 $\mu\text{g}/\text{larva}$)

Analisi Lipidi e carboidrati.

Anche in questo dataset si osserva una maggiore ampiezza del range di lunghezze sul Banco di Malta.

Al fine di ridurre lo sbilanciamento in termini di numero di osservazioni per area ed evitare possibili bias nei risultati dovuti ai differenti range di lunghezza, le osservazioni relative al banco di Malta con SL>14mm sono state rimosse in modo da uniformare i range di lunghezza.

I boxplot evidenziano distribuzioni di frequenza lievemente sbilanciate e disomogeneità delle varianze. Si utilizza dunque un test non-parametrico (Mann-Whitney U Test) nella valutazione della significatività delle differenze osservate tra le due aree.

I risultati mostrano che non esistono differenze significative tra le due aree in termini di lipidi o carboidrati (Tabella 4.3.2.5)

	Rank Sum MB	Rank Sum AB	U	Z	p-value	Z	p-value	Valid N MB	Valid N AB	2*1sided p
Carboidrati	6670.0	3200.0	1917.0	-0.759	0.448	-0.759	0.448	97	43	0.449
Lipidi	6176.5	2601.5	1655.5	1.250	0.211	1.250	0.211	89	43	0.211

Tabella 4.3.2.5 Test U Mann Whitney risultati delle differenze del contenuto di lipidi e carboidrati tra le due aree.

Di seguito sono stati riportati i boxplot relativi, alla distribuzione tra le due aree, di lipidi e carboidrati (figura 4.3.2.1).

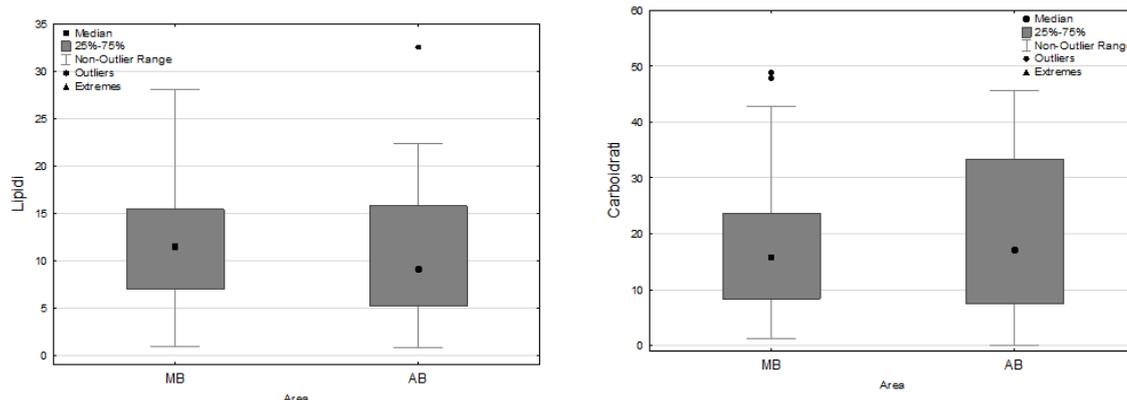


Figura 4.3.2.1 Box-plot della distribuzione di lipidi e carboidrati nelle due aree

Si può osservare un più ampio range di distribuzione del contenuto di carboidrati e lipidi nel banco Avventura

4.4 Discriminazione della composizione aminoacidica di due diverse specie (*Sardina pilchardus* e *Danio rerio*)

E' stato analizzato il contenuto totale di aminoacidi degli occhi di due specie di pesci: zebrafish (*Danio rerio*) e sardine (*Sardina pilchardus*) allo stadio larvale. I valori medi e mediani della composizione aminoacidica espressa in (g/100 g di aminoacidi) negli occhi delle due specie ittiche sono riportati in Tabella 4.4.1.

Aminoacido (g/100 g amino acids; %)	Danio rerio (n=11)				
	Mediana	Quartile range	min-max	Media	E.S.
Asp + Asn (%)	7,9	1,4	5,5-9,7	7,80	0,32
Glu + Gln (%)	11,3	2,4	8,9-13,5	11,16	0,46
Ser (%)	13,1	10,7	6,6-22,8	14,04	1,66
His (%)	3,1	2,5	1,7-5,8	3,31	0,41
Gly (%)	6,2	1,4	4,2-9,4	6,15	0,40
Thr (%)	4,1	1,4	3,1-5	4,02	0,21
Arg (%)	6,3	3,6	3,9-8,5	6,39	0,51
Ala (%)	5,8	2,0	4,8-8,1	6,19	0,35
Tyr (%)	5,0	1,5	4-6,3	5,03	0,24
Met (%)	4,6	1,3	2,2-6,2	4,65	0,36
Val (%)	4,7	1,1	3,7-5,9	4,76	0,22
Phe (%)	5,7	0,9	4,8-6,8	5,63	0,20
Ile (%)	4,2	1,6	3-5,9	4,29	0,28
Leu (%)	7,7	2,0	5,8-9,7	7,52	0,39
Lys (%)	8,9	2,1	6,4-10,9	9,07	0,42
Pro (%)	4,0	1,3	3,6-5,4	4,22	0,44
Try (%)	0,3	0,1	0,2-0,3	0,29	0,02
Cys (%)	1,6	0,7	0,7-1,8	1,39	0,24

Aminoacido (g/100 g amino acids; %)	Sardina pilchardus (n=12)				
	Mediana	Quartile range	min-max	Media	E.S

Asp + Asn (%)	10,0	2,3	2,7-11,8	9,34	0,69
Glu + Gln (%)	14,1	1,6	6,2-14,7	13,33	0,70
Ser (%)	4,4	0,4	4,1-4,9	4,46	0,08
His (%)	3,2	0,3	1,1-3,7	3,02	0,19
Gly (%)	7,4	1,3	6,6-11,6	7,95	0,39
Thr (%)	5,1	0,3	4,3-5,3	5,03	0,08
Arg (%)	11,5	0,8	10,7-15,9	11,96	0,39
Ala (%)	5,5	0,5	4,7-6,1	5,51	0,11
Tyr (%)	4,9	0,4	4,3-5,7	4,97	0,11
Met (%)	0,5	0,7	0,1-2,3	0,80	0,21
Val (%)	5,8	0,1	5,6-6,0	5,76	0,03
Phe (%)	6,5	0,4	5,9-8	6,59	0,15
Ile (%)	5,0	0,2	5-5,3	5,08	0,03
Leu (%)	8,4	0,6	7,5-9,8	8,49	0,18
Lys (%)	7,5	1,1	6,2-11	7,72	0,37
Pro (%)	3,0	2,0	2,1-5,4	3,33	0,64
Try (%)	0,1	0,1	0-0,2	0,08	0,02
Cys (%)	0,7	0,4	0,5-1,4	0,83	0,16

Figura 4.4.1 Valori relativi a media mediana e deviazione standard di Sardina e Zebrafish

I valori riportati nei box-plot in tabella 4.4.1 mostrano che la concentrazione mediana trovata negli occhi di Sardina è generalmente maggiore di quelle ritrovata in Zebrafish ($p < 0,05$). Sono evidenziati soprattutto (Asp-Asn), (Glu-Gln), Gly, Thr, Arg, Phe, Val e Leu.

Al contrario gli aminoacidi in Zebrafish che avevano una percentuale media superiori, rispetto a Sardina erano Ser, Met, e Lys. Inoltre, appare evidente che la percentuale di AAC, mostra maggiore variabilità in zebrafish piuttosto che in Sardina (come mostrato dall'intervallo dei quartili mostrato figura 4.1.1).

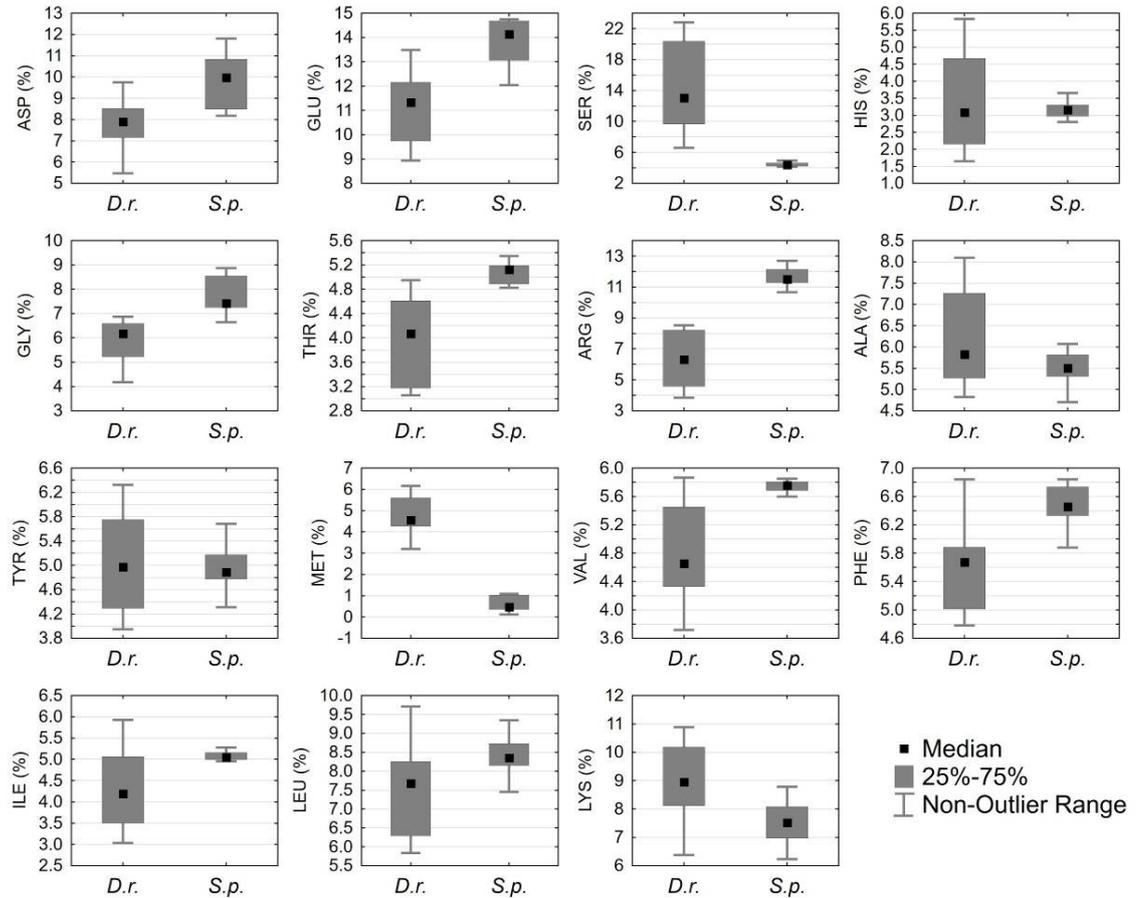


Figura4.4.1. - Box plot confronto della composizione aminoacidica (g/100g aminoacidi;%)

Test statistici sono stati applicati allo scopo di valutare le differenze significative in termini di aminoacidi (tabella 4.4.2)

<i>aminoacido</i>	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>Z Adj</i>	<i>p-value</i>	<i>differenza mediana</i>
<i>Asp+Asp</i>	19	-2,862	-2,862	0,004	2,1
<i>Glu+Gln</i>	17	-2,985	-2,985	0,003	2,8
<i>SER</i>	0	4,031	4,031	0,000	8,7
<i>HIS</i>	61	-0,277	-0,277	0,782	0,1
<i>GLY</i>	12	-3,293	-3,293	0,001	1,3
<i>THR</i>	8	-3,539	-3,539	0,00	1,1
<i>ARG</i>	0	-4,031	-4,031	0,00	5,2
<i>ALA</i>	50	0,954	0,954	0,340	0,3
<i>TYR</i>	61	0,277	0,277	0,782	0,1
<i>MET</i>	2	3,908	3,908	0,00	4,1
<i>VAL</i>	20	-2,800	-2,800	0,005	1,1
<i>PHE</i>	19	-2,862	-2,862	0,004	0,8
<i>ILE</i>	31	-2,123	-2,123	0,034	0,9
<i>LEU</i>	28	-2,308	-2,308	0,021	0,7
<i>LYS</i>	29	2,246	2,246	0,025	1,4
<i>Cys</i>	2	1,837	1,837	0,066	0,9
<i>Pro</i>	6	0,857	0,857	0,391	1,0
<i>Trp</i>	0	2,327	2,327	0,02	0,2

Tabella 4.4.2 - Test U di Man-Whitney, risultati delle differenze aminoacidi negli occhi larvali di *D. rerio* e *S. pilchardus*.

In particolare, dal Man-Whitney U test è emersa la non omoschedasticità, requisito fondamentale per i test parametrici; infatti il test di Levene's (non mostrato), evidenzia una significativa differenza di varianza tra i due gruppi di pesci per gli stessi aminoacidi. Il test mostrato in tabella 4.4.2 evidenzia che His, Ala, e Tyr non erano significativamente differenti ($p > 0.05$) tra le due specie considerate; mentre Ser, Arg e Met mostrano una grande differenza nei valori mediani rispetto alla composizione aminoacidica della stessa specie.

4.5 Confronto dei dati tra le diverse specie

una volta messo a punto il test per la determinazione degli aminoacidi nel tessuto oculare di due distinte specie, mostrate al paragrafo precedente (*Danio rerio* e *Sardina pilchardus*); è stato effettuato un confronto con la specie *engraulis encrasicolus* Tabella 4.5.1

Aminoacido (g/100 g amino acids; %)	<i>D. rerio</i>	<i>s.pilchardu</i>	<i>e.encrasicolus</i>
	<i>v.medio</i>	<i>v.medio</i>	<i>v.medio</i>
Asp+Asn	7.16	8.94	10.2
Glu+Gln	10.2	12.4	13.0
Ser	15.6	4.49	5.60
His	3.82	3.21	4.02
Gly	6.30	7.64	5.65
Thr	3.57	4.76	4.76
Arg	6.36	11.6	7.98
Ala	5.45	4.99	8.11
Tyr	5.10	4.65	3.04
Met	4.82	1.16	2.85
Val	4.37	5.48	5.58
Phe	5.51	6.33	6.33
Ile	3.92	4.78	5.74
Leu	7.12	7.96	9.45
Lys	8.93	7.36	9.10

Tabella 4.5.1 Confronto delle medie percentuali tra le tre differenti specie

Dai risultati mostrati si evidenziano differenze tra le specie, effettuato dei boxplot, e agli aminoacidi che risultavano avere dei valori di $p < 0.05$ abbiamo applicato il test nonparametrico (Kruskal wallis) che ha permesso di constatare le differenze significative tra i gruppi di specie, in tabella 4.5.2, in rosso sono stati riportati relativi al gruppo di specie confrontate.

variabile indipendente	specie		
	<i>D.rerio-S.pilchardu</i> p-values	<i>D.rerio- E.encrasicolus</i> p-value	<i>S.pilchardus -E.encrasicolu</i> p-values
Asp+Asn	0.769001	0.000339	0.044308
Glu+Gln	0.153346	0.004670	1.000000
Ser	0.000000	0.000003	0.006588
His	1.000000	0.597990	0.185144
Gly	0.066273	1.000000	0.018278
Thr	0.043018	0.028985	1.000000
Arg	0.000000	0.002939	0.000007
Ala	1.000000	1.000000	0.702925
Tyr	1.000000	0.000003	0.000002
Met	0.000056	0.000315	0.161656
Val	0.051442	0.005083	1.000000
Phe	0.038176	0.022614	1.000000
Ile	0.574691	0.002321	0.278685
Leu	0.361293	0.241967	1.000000
Lys	0.666006	0.064357	1.000000

Tabella 4.5.2 i valori di p, per il confronto multiplo tra aminoacidi e gruppi di specie.

Dalla tabella 4.5.2 si osserva che differenze maggiori si hanno tra *D. rerio* e le due specie pelagiche, mentre minori differenze tra le due specie pelagiche che differiscono per Ser, Gly, Arg, Tyr,

Dall'altra parte invece si osservano differenze significative tra *D. rerio* e *E. encrasicolus* che oltre avere differenze con aminoacidi in comune con la specie *S. pilchardus* ha differenze con (Asp+Asn), (Glu+Gln), Tyr, Val, Ile.

4.6 Risultati della composizione aminoacidica nella specie *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758)

Per poter effettuare le analisi della componente amminoacidica, sono stati usati in totale 170 campioni larvali: 52 larve per l'anno 2012, 33 larve per il 2013 e 85 larve per l'anno 2015, distribuite nelle due zone del Canale di Sicilia, come viene mostrato in Figura 4.6.1.

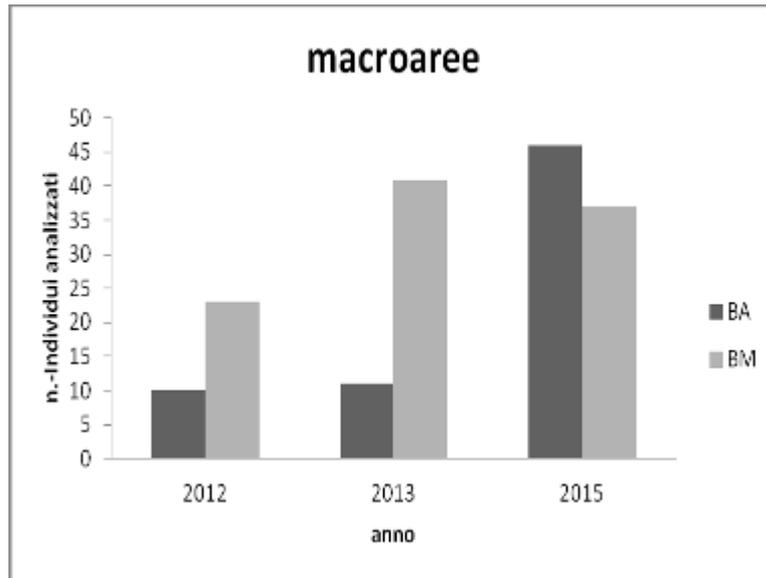


Figura 4.6.1 - Bilancio di individui analizzati nelle due grandi areedi spawning per anno (2012-2013-2015)

La distribuzione delle larve analizzate in ogni zona viene mostrata in figura 3.4.1

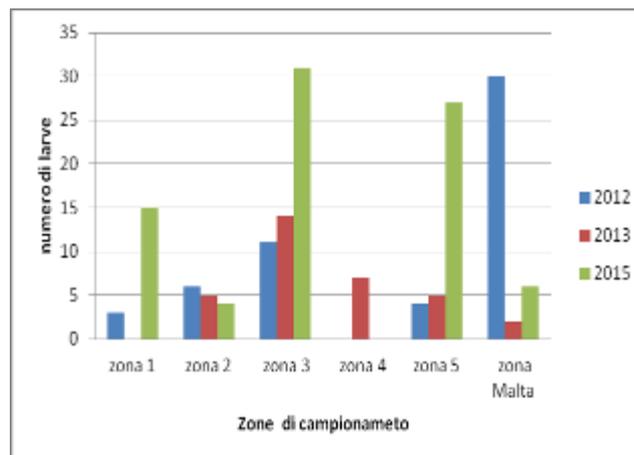


Figura 4.6.2 - distribuzione delle larve per l'analisi degli aa per il 2012-2013-2015

Sono state analizzate un numero di larve diverso per Zona, determinato dalla presenza o meno della specie *Engraulis encrasicolus*. Infatti, la Zona1 viene coperta negli anni 2012 e 2015, mentre nella zona 4 i campioni erano presenti solo per l'anno 2013. La zona Maltese presenta un numero di larve diverso per ogni anno di campionamento: circa 30 larve sono state analizzate nel 2012, solo 2 nel 2013 e 6 larve nel 2015.

Di seguito nelle figure 4.6.3 e 4.6.4 sono riportate le percentuali medie dei principali aminoacidi analizzati negli occhi di *Engraulis encrasicolus* del Canale di Sicilia

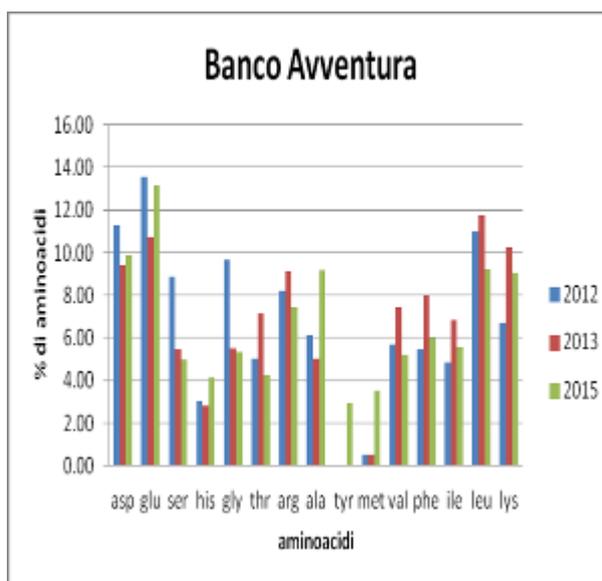


Figure 4 6.3 - Distribuzione dei singoli aminoacidi nell'Area BA (2012-2013-2015)

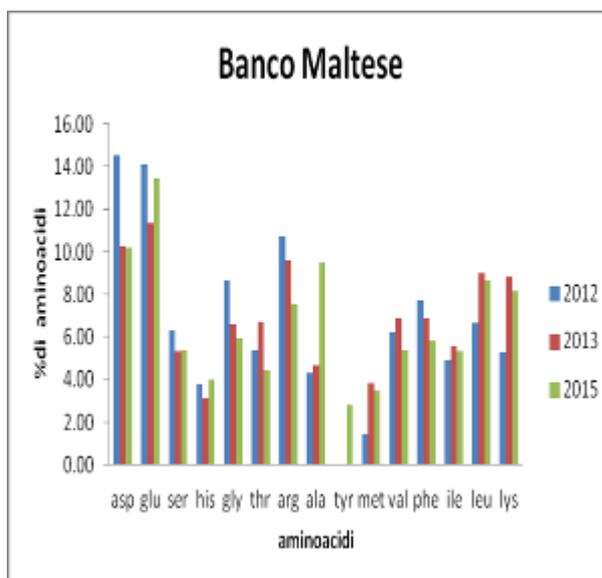


Figure 4.6.4 - Distribuzione di frequenza dei singoli aminoacidi nell'Area del BM (2012-2013-2015)

I valori relativi alle medie percentuali dei singoli aminoacidi sono mostrati nella tabella 4.6.1 da cui si può vedere le differenze in termini di percentuale relative alle due Aree (Banco Avventura e il Banco Maltese).

<i>aminoacido%</i>	<i>Banco avventura (n=) 45</i>					
	<i>media</i>	<i>mediana</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>range quartile</i>	<i>deviazione standard</i>
Asp+Asn	9.29	10.81	2.56	13.78	6.31	3.55
Glu+Gln	12.31	13.58	4.24	17.59	4.83	3.32
ser	5.31	5.03	1.73	15.40	2.04	2.78
his	3.87	3.52	1.15	11.98	1.50	1.84
gly	5.42	5.56	0.80	11.88	2.97	2.56
thr	4.58	4.45	2.02	8.47	2.01	1.69
arg	7.80	7.80	4.52	10.85	2.03	1.62
ala	8.35	7.64	0.16	18.07	5.56	4.30
tyr	3.14	2.85	0.91	5.98	1.51	1.25
met	3.21	1.81	-0.67	11.93	3.34	3.49
val	5.53	5.50	1.17	18.83	1.52	2.60
phe	6.09	5.75	2.90	10.24	1.20	1.46
ile	5.64	5.34	-0.52	9.48	1.55	1.76
leu	10.23	9.65	2.45	16.31	3.88	2.86
lys	10.15	8.16	4.14	27.93	5.08	5.57

<i>aminoacido%</i>	<i>Banco Maltese(n=96)</i>					
	<i>media</i>	<i>mediana</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>range quartile</i>	<i>deviazione standard</i>
Asp+Asn	12.21	12.34	3.41	18.53	3.64	3.30
Glu+Gln	13.48	14.57	0.32	18.12	3.16	3.19
ser	5.89	5.52	0.69	23.34	1.35	2.52
his	3.82	3.42	1.63	18.85	1.13	2.17
gly	6.87	7.06	1.94	12.16	3.17	2.20
thr	5.26	4.98	2.25	13.63	1.63	1.62
arg	9.24	9.19	1.01	14.65	2.75	2.27
ala	6.30	6.48	-6.73	13.06	5.19	3.39
tyr	2.95	2.89	1.76	5.05	0.50	0.59
met	2.32	1.18	-0.84	58.81	2.20	6.14
val	5.94	5.88	2.91	8.98	1.42	1.19
phe	6.92	6.67	2.63	10.95	2.02	1.40
ile	5.30	5.36	-9.17	9.03	0.89	1.94
leu	8.01	7.86	0.31	14.26	2.65	2.28
lys	7.01	6.55	-1.74	28.89	4.03	3.75

Tabella 4.6.1 - Valori medi percentuali relativi al BA e al BM (2012-2013-2015)

In particolare, possiamo vedere che il profilo della composizione degli aminoacidi si mantiene molto simile all'interno delle due aree, anche se si nota qualche piccola differenza in termini di percentuale media, principalmente per (Asp+Asn), (Gly+Gln), Thr, Arg, Ala, Leu.

(Asp+Asn), (Gly+Gln) e Arg sono in maggiore percentuale nell'Area del Banco Avventura mentre Thr, Ala e Leu, si trovano in percentuale maggiore nelle larve del Banco Maltese.

Anche la differenza delle percentuali misurate nelle larve prelevate nei campionamenti annuali sono state riportate nella tabella 4.6.2 (statistica descrittiva). Da tali risultati emerge che vi sono state delle differenze negli anni tra le due Aree in termini di composizione percentuale degli AA che compongono la struttura proteica degli occhi di larve (evidenziate in rosso). In particolare, si osserva che (Asp+Asn) e (Gly+Gln) sono gli aminoacidi che si sono mantenuti a percentuali più alte nel Banco Maltese, mentre Leu, Lys sembrano mostrare percentuali più alte nelle larve catturate nell'Area del Banco Avventura. Il resto degli AA non sembrano mostrare alcuna particolare differenza tra le due Aree.

Anno	Area	Asp+Asn	Glu+Gln	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Met	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
2012	BA	11,29	13,55	8,88	3,03	9,65	5,05	8,25	6,09	-	0,53	5,70	5,48	4,83	10,96	6,71
2012	BM	14,54	14,14	6,31	3,78	8,64	5,39	10,75	4,30	-	1,40	6,22	7,71	4,90	6,67	5,26
2013	BA	9,44	10,74	5,43	2,79	5,52	7,13	9,10	5,04	-	0,53	7,44	7,99	6,82	11,74	10,29
2013	BM	10,26	11,36	5,31	3,13	6,59	6,71	9,63	4,68	-	3,84	6,87	6,87	5,56	9,03	8,80
2015	BA	9,88	13,16	4,95	4,12	5,35	4,27	7,46	9,21	2,95	3,50	5,22	6,01	5,57	9,26	9,09
2015	BM	10,21	13,45	5,37	4,03	5,91	4,42	7,56	9,47	2,83	3,44	5,38	5,83	5,33	8,62	8,15

Tabella 4.6.2. vengono riportati i dati in % media riferiti alle macroaree BA e BM(2012-2013-2015)

Determinazione Aminoacidica 2012

La composizione aminoacidica media del 2012 viene riportata in tabella 4.6.3

Zone	Asp+Asn	Glu+Gln	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Met	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
Zona 1	11.14	14.09	9.67	3.15	10.64	4.99	7.80	6.10	0.63	5.66	5.06	4.40	10.00	6.67
Zona 2	11.40	13.15	8.29	2.94	8.90	5.10	8.58	6.09	0.46	5.73	5.79	5.15	11.67	6.74
Zona 3	15.36	15.65	6.17	3.67	8.21	5.16	9.94	3.87	1.11	6.17	7.76	4.98	6.75	5.20
Zona 4	13.43	15.68	7.57	3.66	7.70	4.49	9.11	4.49	1.84	7.28	8.30	5.48	6.29	4.68
Malta	14.54	13.85	6.20	3.84	8.76	5.55	11.10	4.36	1.33	6.08	7.58	4.76	6.67	5.38

Tabella 4.6.3 - Media percentuale degli aminoacidi nel 2012

I dati riportati nella tabella sopra, sono riferiti alla percentuale AA media dei singoli aminoacidi riferiti alle larve campionate per zona nell'anno 2012. In rosso sono stati evidenziati alcuni aminoacidi che si differenziano per la diversa %, come ad esempio (Gly+Gln), (Ser,Arg,Ala,Met,Leu). La (Gly+Gln) e Arg risultano con percentuale più alta nelle zone (3-4-M). La Ser, Ala e Leu ha Valori percentuali più alti in zona (1-2), mentre la Met, risulta avere una percentuale più bassa nelle zone (1-2) rispetto alla alle altra zone.

Determinazione Aminoacidica 2013

Nella tabella 4.6.4 vengono riportati i valori percentuali degli aminoacidi riferiti al 2013. In rosso sono state evidenziati gli aminoacidi che presentavano valori percentuali differenti rispetto alle altre aree.

Zona	Asp+Asn	Glu+Gln	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Met	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
Zona3	11,59	12,82	5,62	3,66	7,24	6,93	10,26	4,24	0,66	6,98	6,80	5,51	8,68	9,00
Zona4	8,50	9,62	5,35	2,30	6,31	7,15	9,77	6,75	1,16	7,72	7,95	6,68	11,11	9,62
Zona5	9,40	11,15	5,43	3,14	5,26	6,84	8,93	4,17	0,57	7,17	8,31	7,00	11,98	10,65
Zona 2	9,52	9,92	5,43	2,08	6,02	7,71	9,45	6,78	0,45	7,98	7,35	6,47	11,26	9,57

Tabella4.6.4 - Percentuale media degli aminoacidi nel 2013

La (Gly+Gln) e l'Arg, sembra presentare una percentuale maggiore nelle zone (3-4) rispetto alle zone (2-5) investigate lo stesso anno. Met e mostra Valori più bassi nelle zone (2-5), mentre nelle stesse zone percentuali più alte in termini di Leu e Lys.

Determinazione Aminoacidica 2015

Anche nel 2013 è stata effettuata una media delle percentuali in tabella 4.6.5

Zona	Asp+Asn	Glu+Gln	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Met	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
Zona1	10,13	12,99	4,51	4,19	3,69	3,73	7,01	9,53	3,58	3,27	5,08	6,50	6,22	10,40	9,17
Zona2	7,32	12,22	3,72	5,61	2,80	4,02	7,29	4,39	2,19	1,95	4,09	6,39	6,31	12,95	18,75
Zona3	10,55	13,63	5,54	4,17	5,23	4,47	7,41	9,31	3,01	2,92	5,11	6,16	5,60	8,93	7,96
Zona5	7,20	10,93	4,82	3,86	5,97	4,13	7,75	11,13	2,97	1,65	5,67	5,35	5,00	8,57	10,21
Malta	11,88	15,04	7,39	4,52	4,97	4,30	7,36	8,75	2,54	0,99	5,68	5,73	5,18	8,27	7,40

Tabella 4.6.5 - Percentuale media degli aminoacidi nel 2015

Anche in questo *dataset* la (Glu+Gln) mostra valori percentuali più alti nelle Zone 3 e Malta rispetto alle Zone 1-2-5; mentre Leu e Lys evidenziano in rosso per le zone (1-2-5-) rispetto alla zona 3 e zona 4. Nella tabella 4.5.6 vengono riportati i valori di p-Value del test di Kruskal Wallis, visto che il dataset non rispettava l'assunzione di distribuzione normale e non si è potuto applicare un'ANOVA; attraverso questo test abbiamo potuto effettuare un confronto tra zone usando gli AA come variabile dipendente.

In tabella 4.6.6. è stata applicata una Kruskal wallis tra gli aminoacidi differenziandoli per zona, come si osserva in rosso sono stato riportati i valori di $p < 0.05$, che mostrano particolari differenze in termini di aminoacidi tra le zone confrontate, si evince chiaramente che solo Glu + Gln non risultava significativo in nessuna zone di confronto.

Analisi statistica (2012-2013-2015)

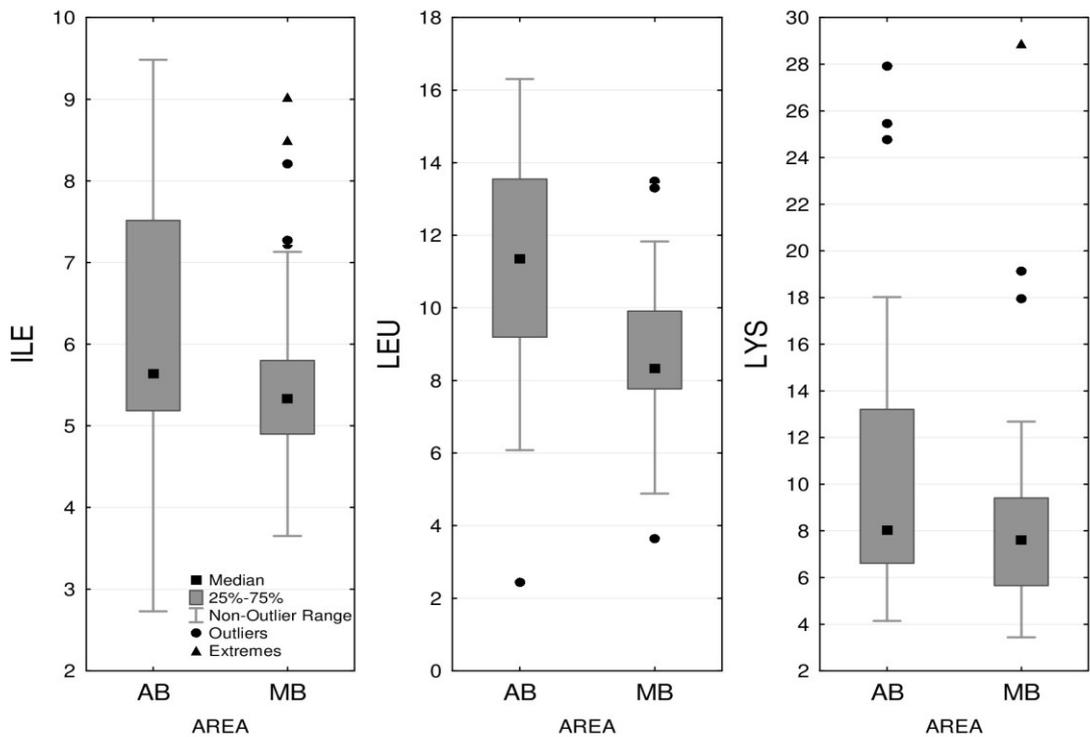
Variable	Zone														
dipendente	1_2	1_3	1_4	1_5	1_M	2_3	2_4	2_5	2_M	3_4	3_5	3_M	4_5	4_M	5_M
Asp+Asn	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	0,01099	1,00000	1,00000	1,00000	0,00216	1,00000	0,80957	0,00831	1,00000	0,72588	0,00001
Ser	1,00000	1,00000	0,21720	1,00000	0,01589	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	0,11304	1,00000	1,00000	0,00141
Gly	1,00000	1,00000	0,09250	1,00000	0,00001	1,00000	1,00000	1,00000	0,02915	1,00000	1,00000	0,00026	0,83573	1,00000	0,00044
Arg	1,00000	0,27816	0,02722	1,00000	0,00000		1,00000	1,00000	0,01812	1,00000	1,00000	0,00022	0,74806	1,00000	0,00018
Ala	0,47908	1,00000	0,63396	1,00000	0,03039	1,00000	1,00000	0,05827	1,00000	1,00000	1,00000	0,03091	0,11277	1,00000	0,00020
Met	0,30409	1,00000	1,00000	1,00000	0,25639	0,90324	1,00000	0,05429	1,00000	1,00000	1,00000	0,77384	1,00000	1,00000	0,01422
Val	1,00000	1,00000	0,00021	1,00000	1,00000	1,00000	0,00310	1,00000	1,00000	0,00031	1,00000	1,00000	0,00126	0,00699	1,00000
Phe	1,00000	1,00000	0,01979	1,00000	0,01677	1,00000	0,06578	1,00000	0,11801	0,02165	0,91143	0,00553	0,00040	0,02165	0,00001
Leu	1,00000	0,24115	1,00000	0,29731	0,01254	0,02045	0,26297	0,02784	0,00001	1,00000	1,00000	0,01254	1,00000	0,76077	0,05923
Lys	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	0,42767	0,42635	0,53889	1,00000	0,00206	1,00000	1,00000	0,16442	1,00000	1,00000	0,02807

Tabella 4 6.6 Confronto multiplo tra le zone e con relativiaminoacidi, in rosso i valori $p < 0.05$, particolarmente significativi tra le zone confrontate.

Evidenze statistiche (2012-2013-2015 Banco Avventura e Banco Maltese)

Come nei casi precedenti si osserva una maggiore ampiezza del range di lunghezze sul Banco di Malta. Per ridurre lo sbilanciamento in termini di numero di osservazioni per area ed evitare possibili bias nei risultati dovuti ai differenti range di lunghezza, le osservazioni relative al banco di Malta con $SL > 12\text{mm}$ sono state rimosse in modo da uniformare i range di lunghezza.

Sono stati effettuati dei boxplot (figura 4.6.7) che hanno mostrato deviazioni nella normalità ed eteroschedasticità delle distribuzioni di frequenza. Di conseguenza, si è adottato un test non parametrico nella valutazione della significatività delle differenze



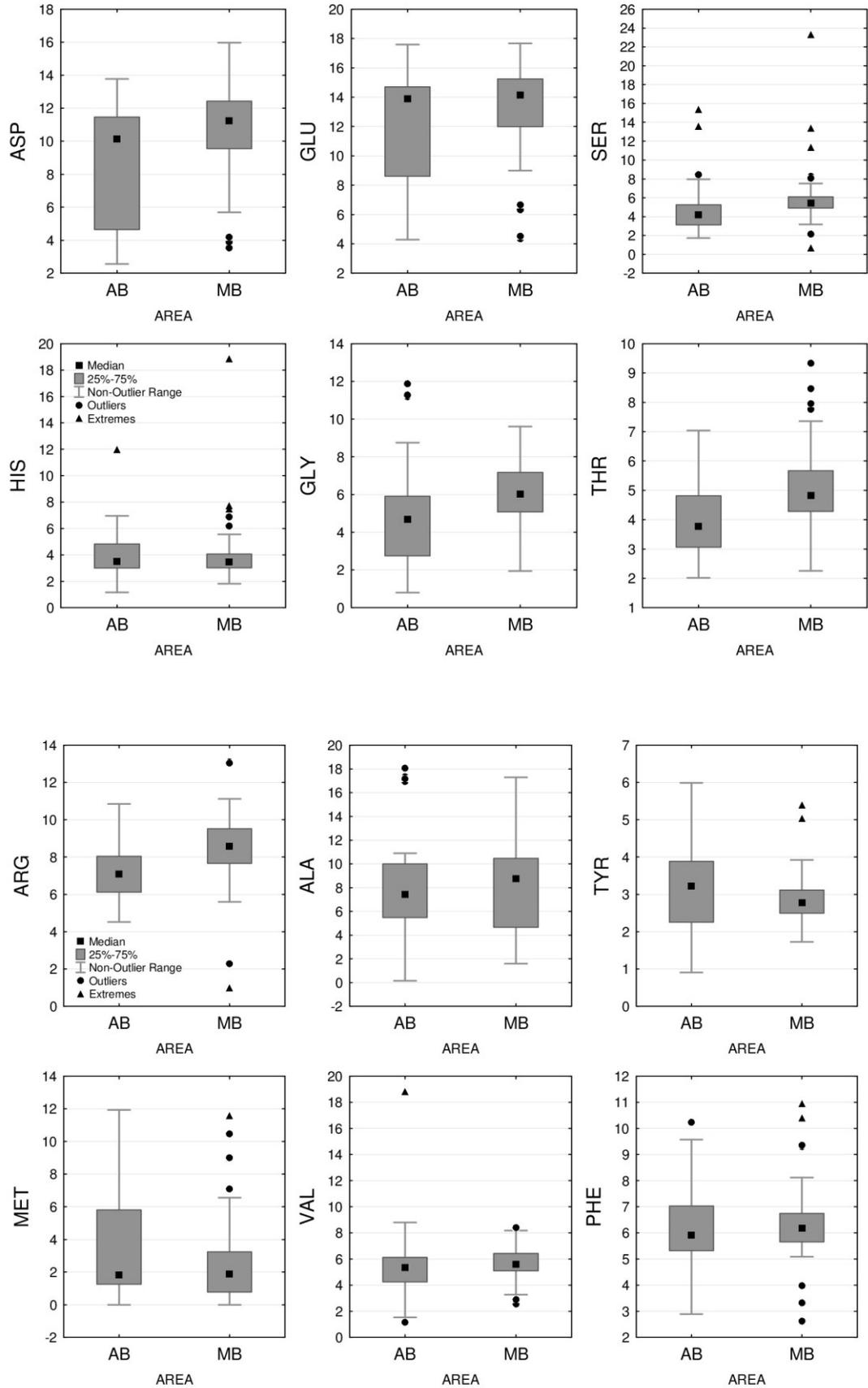


Figura 4.6.7 box plot relativi alla distribuzione degli aminoacidi nelle due aree di studio BM e BA

I risultati mostrano differenze significative in Asp, Ser, Gly, Thr, Arg con valori più alti sul Banco di Malta e in Ile e Leu con valori più alti sul Banco Avventura. Di seguito viene riportato il test U Mann Whitney tabella (4.6.7) in cui i valori di $p < 0,05$ sono stati evidenziati in rosso evidenziando gli aminoacidi significativamente differenti tra le due aree.

	Rank Sum AB	Rank Sum MB	U	Z	p-value	Z	p-value	Valid N AB	Valid N MB	2*1sided
Asp	1080.0	3198.0	645.0	-2.252	0.024	-2.252	0.024	29	63	0.024
Glu	1173.0	3105.0	738.0	-1.471	0.141	-1.471	0.141	29	63	0.142
Ser	962.0	3316.0	527.0	-3.244	0.001	-3.244	0.001	29	63	0.001
His	1404.0	2874.0	858.0	0.462	0.644	0.462	0.644	29	63	0.646
Gly	984.0	3294.0	549.0	-3.059	0.002	-3.059	0.002	29	63	0.002
Thr	976.0	3302.0	541.0	-3.126	0.002	-3.126	0.002	29	63	0.002
Arg	927.0	3351.0	492.0	-3.538	0.000	-3.538	0.000	29	63	0.000
Ala	1266.0	2829.0	831.0	-0.458	0.647	-0.458	0.647	29	61	0.649
Tyr	899.0	1246.0	385.0	1.448	0.148	1.448	0.148	24	41	0.149
Met	1410.0	2595.0	704.0	1.321	0.187	1.321	0.187	28	61	0.188
Val	1142.5	3135.5	707.5	-1.727	0.084	-1.727	0.084	29	63	0.083
Phe	1276.0	3002.0	841.0	-0.605	0.545	-0.605	0.545	29	63	0.547
Ile	1531.0	2564.0	611.0	2.236	0.025	2.236	0.025	28	62	0.025
Leu	1786.0	2492.0	476.0	3.672	0.000	3.673	0.000	29	63	0.000
Lys	1557.0	2721.0	705.0	1.748	0.080	1.748	0.080	29	63	0.080

Tabella 4.6.7 test U Mann Whitney, con evidenziati i valori degli aminoacidi significativamente differenti tra

BM e il BA

La PCA applicata al dataset degli aminoacidi (figura 4.6.8) mette in evidenza (primo asse) le relazioni esistenti tra alcuni aminoacidi, ovvero alti valori di Ala, Met e Lys sono legati a valori più bassi di Glu, Thr e Arg. Il secondo asse invece evidenzia che in corrispondenza di alti valori di SST e bassi valori di CHL si hanno alti valori di HL, ED, Ser e Gly, e bassi valori di Phe, Ile e Leu

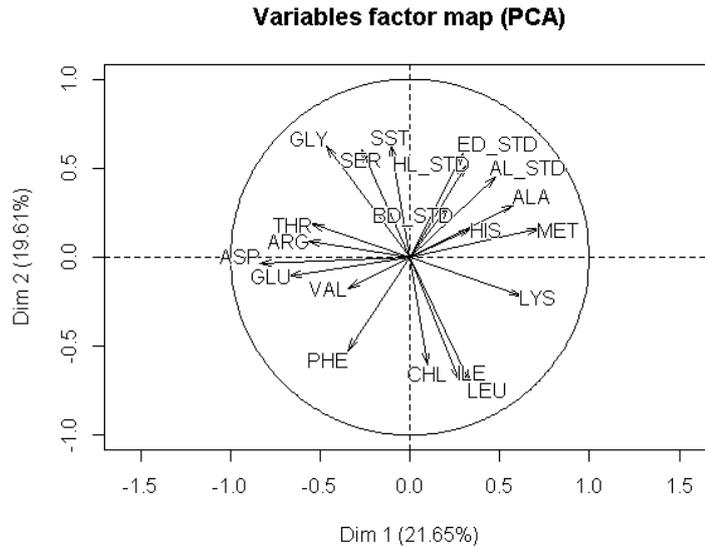


Figura 4.6.8 PCA relativa ai dati morfometrici –aminoacidi e parametri ambientali

Di seguito in figura 4.6.9 sono stati riportati solo i principali scatterplot che abbiano una correlazione significativa con valori di $r > 0.4$

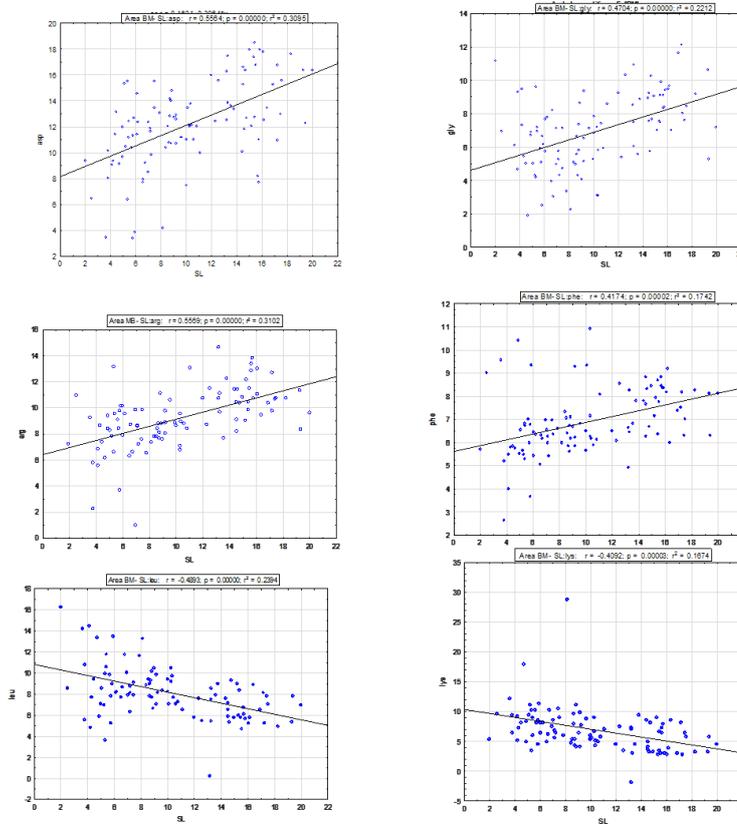


Figura 4.6.9 scatterplot degli aminoacidi che hanno una correlazione significativa con la lunghezza standard (SL) nel

BM

Dagli scatterplot si osserva che solo Asp+Asn, Gly, Arg e Phe hanno una correlazione significativa con la LS, mentre Leu e Lys risultano avere una correlazione negativa con la lunghezza nel BM; I dati del BA non sono stati riportati perché nessun aminoacido risultava avere una correlazione >-0.4 e 0.4 ;

4.7 Analisi enzimatica

Dai risultati dell'analisi enzimatica eseguita sulle larve di *Engraulis encrasicolus* è emerso che esistono delle differenze nel contenuto di enzimi. Infatti, differenze di concentrazione sono state riportate in Tabella 4.7.1.

Le attività enzimatiche misurate riguardavano la fosfatasi alcalina e la perossidase

Fosfatasi alcalina (U.L/mg proteina)							
Area	Nr. Campioni	Media	Min	Max	I Quartile	II quartile	D. Standard
BA	9	34,65	10,88	87,36	12,88	64,37	32,90
BM	11	23,62	4,88	84,94	7,00	50,34	27,56
perossidasi (U,L/mg proteina)							
Area	Nr. Campioni	Media	Min	Max	I quartile	II quartile	D, Standard
BA	11	6,66	1,50	18,10	2,00	11,90	5,70
B,M	9	9,00	9,41	2,85	24,80	3,10	8,40

Tabella 4.7.1 - dati medi – mediani e Varianza della Fosfatasi alcalina e della perossidase

I valori riportati in tabella mostrano chiaramente come ci siano state nette differenze di concentrazione sia per quanto riguarda la concentrazione della fosfatasi alcalina che la perossidasi tra le due aree studiate. I dati sono stati sottoposti anche ad una valutazione statistica mediante l'analisi della varianza (ANOVA), questo ha permesso di determinare le differenze tra i le Aree (Banco Maltese e il Banco Avventura). I box-plot riportati in figura (4.7.1), mostrano che differenze significative erano solo per i valori di fosfatasi alcalina con KW-H (1;20)= 4.3651; p 0,0367

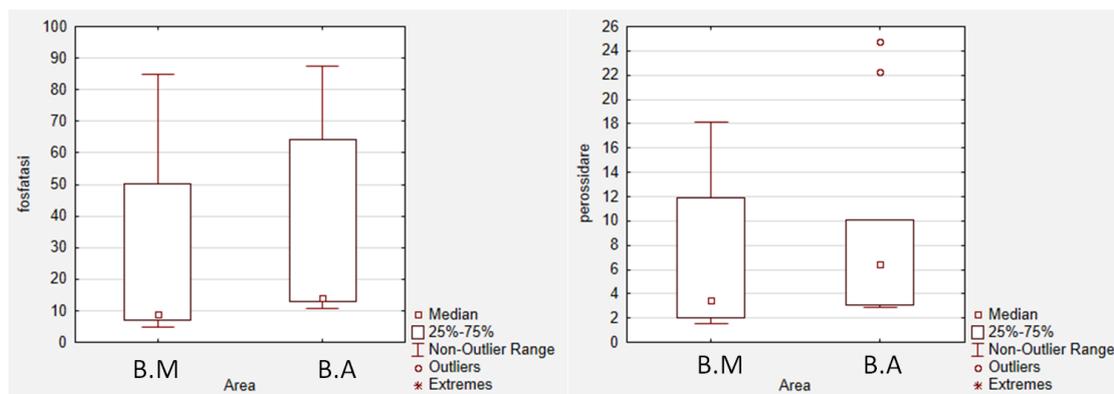


Figura 4.7.1 - Box plot fosfatasi alcalina U.L/mg proteina (BM e BA) 2015-2016.

Dai box plot si nota che ci sono ampie variazioni in termini di varianza, per quanto riguarda la fosfatasi alcalina, sia per BM che per BA. Invece per i valori di perossidase la varianza è maggiore nell'Area BM piuttosto che nel BA.

4.8 Dati Ambientali

Al fine di valutare le differenze tra il Banco Avventura e il Banco di Malta in termini di temperatura e clorofilla, sono stati scaricati dal portale del progetto Copernicus (<http://marine.copernicus.eu/>) i dataset di clorofilla e temperatura superficiale relativi al Mar Mediterraneo.

In particolare, a partire dalle immagini giornaliere sono state calcolate per ciascun parametro e ciascun anno (2012, 2013 e 2015) i valori medi nel periodo Giugno-Agosto.

Di seguito vengono riportate per ciascun anno le mappe medie relative all'area dello Stretto di Sicilia. Figure 4.8.1. e 4.8.2

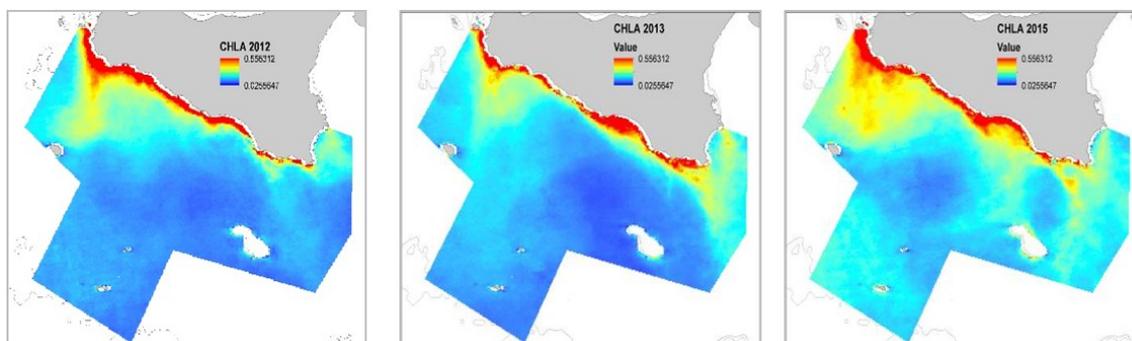


figura4.8.1 Distribuzione superficiale della clorofilla nei tre anni di studio (2012-2013 e 2015).

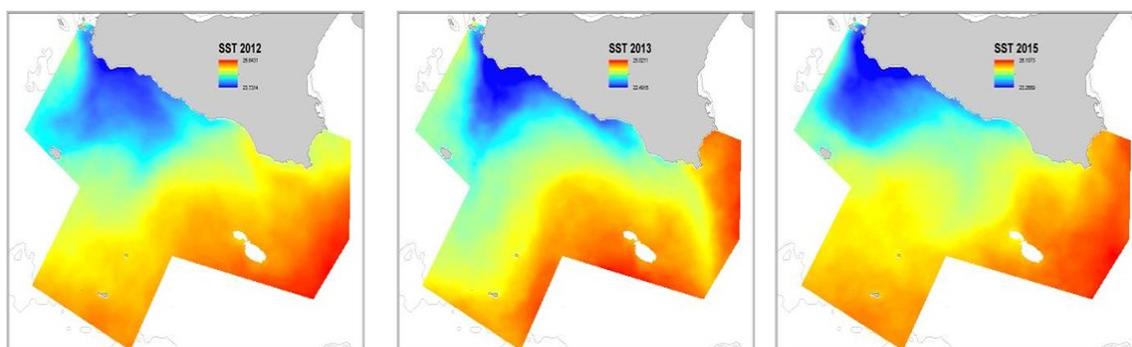


Figura 4.8.2 Distribuzione della temperatura superficiale nei tre anni di studio (2012-2013-2015).

Le mappe evidenziano i pattern medi presenti nell'area di studio durante il periodo estivo, legati principalmente alla presenza dell'upwelling sul banco Avventura e del fronte termoclinico sul banco di Malta.

Nelle tabelle 4.8.1 e 4.8.2 sono stati riportati i parametri medi, minimo e massimo il quartile superiore e il quartile inferiore e la relativa deviazione standard, rispettivamente temperatura e clorofilla.

AREA	YEAR	Mean	Minimum	Maximum	Lower Quartile	Upper Quartile	Quartile range	Std.Dev.
AB	2012	24.44	23.73	25.38	24.12	24.75	0.63	0.37
	2013	23.40	22.49	24.05	23.13	23.70	0.57	0.37
	2015	24.26	23.27	25.01	23.95	24.59	0.64	0.39
MB	2012	26.10	25.36	26.64	25.90	26.33	0.43	0.30
	2013	24.49	23.72	24.90	24.33	24.66	0.32	0.23
	2015	25.73	24.96	26.11	25.59	25.92	0.32	0.22

Tabella 4.8.1 Parametri statistici di base relativi ai valori di SST (°C) rilevati sul Banco di Malta (MB) e sul Banco Avventura (AB) negli anni considerati.

AREA	YEAR	Mean	Minimum	Maximum	Lower Quartile	Upper Quartile	Quartile range	Std.Dev.
AB	2012	0.460	0.377	0.556	0.383	0.495	0.112	0.078
	2013	0.320	0.196	1.217	0.217	0.319	0.103	0.207
	2015	0.263	0.197	0.536	0.219	0.285	0.066	0.062
MB	2012	0.042	0.034	0.051	0.040	0.044	0.004	0.003
	2013	0.058	0.033	0.748	0.045	0.067	0.023	0.025
	2015	0.055	0.040	0.397	0.051	0.059	0.008	0.008

Tabella 4.8.2 Parametri statistici di base relativi ai valori di Clorofilla (mg/m³) rilevati sul Banco di Malta (MB) e sul Banco Avventura (AB) negli anni considerati.

Capitolo V

Discussione

L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di trovare, attraverso le analisi biochimiche, un *marker* innovativo che potesse essere usato come indicatore dell'ottimalità nell'area di deposizione dell'acciuga europea.

A tale scopo, sono state impiegate diverse tipologie di analisi come strumenti per sostenere ed irrobustire i risultati ottenuti. La specie di piccoli pesci pelagici oggetto di studio in questo lavoro era l'*Engraulis encrasicolus*, studiata attraverso i principali parametri morfologici e morfometrici delle larve (Shevchenko, 1980; Tudela, 1999; Caneco *et al.*, 2004; Traina *et al.*, 2011), i dati ambientali sull'habitat di deposizione (Patti *et al.*, 2004; Bonanno *et al.*, 2014; D'Elia *et al.*, 2009), ed è stata caratterizzata dal punto di vista biochimico, in termini di lipidi carboidrati e composizione aminoacidica. L'analisi dei dati morfometrici ha evidenziato piccole differenze sulle larve appartenenti alla stessa classe di taglia.

Un grafico a torta, relativo alle misure morfometriche delle larve campionate durante i survey, ha evidenziato un'identica distribuzione percentuale nelle prime classi di taglia da 1 a 3; fattore che conferma la presenza di due aree di spawning (figura 5.1), come dimostrato da Cuttitta *et al.* (2004; 2006) e Basilone *et al.* (2013).

Le larve appartenenti alla prima classe di taglia erano presenti per il 12% nel BM e 11% nel BA; in questa classe di taglia sono state raggruppate larve di circa 3 mm di LS, corrispondente alla taglia di schiusa.

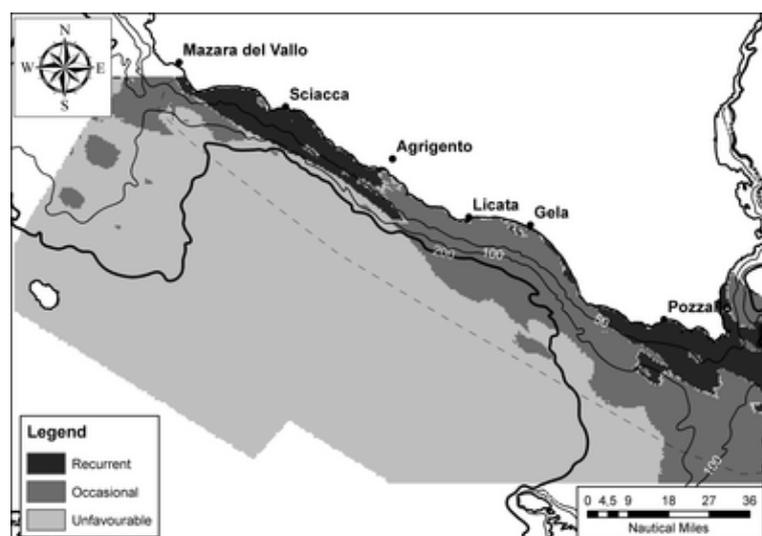


Figura 5.1 Habitat di Spawning per European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) lungo le Costa Sud della Sicilia Reclutamento, occasionale e sfavorevoli Aree di spawning, tratto da (Basilone et al.,2013).

Per avere maggiore certezza è stata calcolata l'età in modo indiretto applicando la relazione trovata da Aldanondo (2008). I risultati di questa relazione, sono stati ottenuti considerando la variazione del tempo di schiusa e della LS rispetto alla temperatura dell'acqua registrata al momento della cattura.

temperatura	Equazione
T=16°C -19.3°C	$y=2.88+0.15*Age$
T=19.3°C-20.8°C	$y=2.21+0.26*Age$
T=20.81°C-22.3°C	$Y=2.4+0.33*Age$
T=22.31°C-30°C	$y=2.69+0.29*Age$

Tabella delle relazioni tra LS ed età in relazione alla Temperaturra

I dati hanno confermato che le misure della 1^a classe di taglia trovate in questo studio coincidono con la misura di schiusa intorno ai 2,8 mm di LS, in accordo con quanto riportato da Aldanondo (2008), schiusa anticipata rispetto a quanto riportato da (Re e Meneses 2009; Re 1986; Russell, 1976; and D'Ancona, 1931). Si ipotizza che il periodo di schiusa potrebbe essere stato anticipato dalla variazione di temperatura; infatti alcuni studi hanno dimostrato che la temperatura superficiale dell'acqua (SST) e la salinità

sono fattori importanti che influenzano la schiusa e la distribuzione spaziale delle larve (Lee et al., 1995).

Dal grafico sopra citato, sono state osservate anche le differenze tra i due banchi, sia in termini di classi di taglia che in percentuale di campioni in esse contenute, rilevando che nel BA ci sono 9 classi di taglia, mentre nel BM 10 classi di taglia. E' importante evidenziare l'aumento graduale della distribuzione di un numero maggiore di larve nelle classi di taglia tra 3 e 6 e una diminuzione nelle classi >6 nel BA, classi quest'ultime che aumento di percentuale nel BM. Tale fenomeno potrebbe essere spiegato attraverso l'esperimento effettuato da Faleiro *et al.* (2016), che ha dimostrato come le larve di *Sardina pilchardus* reagivano ai cambi di temperature; alcune delle larve morivano al 31° giorno di vita (LS~11mm), probabilmente perché questo rappresenta un momento critico dal punto di vista metabolico e fisiologico. Infatti, molte larve non riuscivano a superare i cambi termici, relativi anche ad un solo grado C, aumentando il tasso di mortalità. Difficilmente in questo contesto potremmo spiegare se la minore percentuale nelle classi di taglia >6 nel BA può essere legata ai cambi di temperatura e salinità a cui vengono sottoposte le larve durante i periodi di risalita delle profonde, fredde e dense masse d'acqua (up-welling), o se i fattori di idrodinamicità del Canale di Sicilia e la presenza dell' AIS, che si sposta da Nord-ovest verso Sud-Est alla velocità di 22 km Day⁻¹ (Garcia Laflente *et al.*, 2002), abbiano potuto favorirne lo spostamento verso il BM. Quest'ultimi dati sono stati confermati dall'analisi del *dataset* sulle temperature superficiali ricavati dal portale del progetto Copernicus (<http://marine.copernicus.eu/>) relativi al Mar Mediterraneo. In particolare, a partire dalle immagini giornaliere sono state calcolate per ciascun parametro e ciascun anno (2012, 2013 e 2015) i valori medi nel periodo Giugno-Agosto. La diminuzione di temperatura è tra le cause naturali più importanti nei pesci poichilothermici che influenza il tasso delle loro funzioni fisiologiche (Hayward *et al.*, 2009); questo potrebbe aiutare a capire perché la

distribuzione e l'abbondanza possono fluttuare nei piccoli pesci pelagici (Coombs *et al.*, 2006; Planque *et al.*, 2007; Bellido *et al.*, 2008; Alheit *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013; Montero-Serra *et al.*, 2015). Ad esempio, nel Sud-Est del Pacifico, la prima reazione dei piccoli pelagici al fenomeno "El Niño" è quello di spostarsi verso sud, lontano dalle acque calde (Lehodey *et al.*, 2006), mentre le popolazioni di piccoli pelagici del Nord Atlantico sono fluttuanti in sincronia con oscillazioni di temperatura del mare, fluttuando verso i poli (Alheit *et al.*, 2012).

Anche se le zone di upwelling occupano solo l'1% della superficie dell'oceano, contribuiscono per circa il 20% alla produttività della pesca (Cury *et al.*, 2000). Nel Canale di Sicilia, che rappresenta una delle principali zone di deposizione per le acciughe in Sicilia, i cui livelli di biomassa sostengono economicamente una numerosa comunità (Mazzola *et al.*, 2002, García La Fuente *et al.*, 2002), i fenomeni di upwelling sono registrati principalmente sotto le coste del BA (Bonanno *et al.*, 2014).

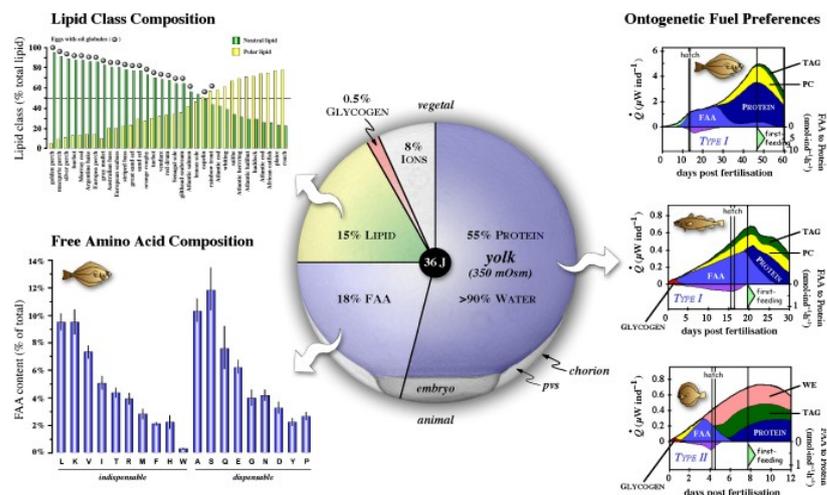
La temperatura, che contribuisce alla variazione della distribuzione e l'accrescimento larvale, potrebbe diventare un fattore selettivo se contestualizzata durante i processi di up-welling, che da un lato favoriscono la ritenzione, arricchimento e concentrazione (Bakun, 1996), dall'altro tendono a sottoporre le larve ad un forte stress, amplificato anche dalla circolazione superficiale dell'AIS che genera avvezione di vorticità positiva, portando alla formazione di due vortici ciclonici (Robinson *et al.*, 1999).

I risultati mostrano una più omogenea presenza di larve sul BM, confermata anche da Basilone (2011) e Lafuente *et al.* (2002). Tali omogeneità nella distribuzione percentuale dei diversi stadi di sviluppo larvale mostrano l'influenza positiva che i parametri ambientali, un po' più stazionari, eserciterebbero sullo sviluppo e l'accrescimento di *Engraulis encrasicolus* nell'area del BM. In particolare, anche l'area di Capo Passero potrebbe essere adatta per sostenere alti tassi di produzione primaria, soprattutto nei primi stadi di vita in cui è stato osservato che temperature maggiori

potrebbero favorire la crescita morfometrica delle larve di acciuga (Cuttitta *et al.*, 2003; 2005).

Cuttitta *et al.* (2005) e Basilone *et al.* (2011) trovarono una differente distribuzione di classe di taglie tra le due Aree di spawning, ipotizzando che l'area BM potesse essere individuata anche come area di ritenzione, viste le dimensioni delle lunghezze standard delle larve di *Engraulis encrasicolus*.

Lo scatterplot in figura 4.2.1, tra le lunghezze principali e la LS, ha evidenziato una differenza significativa nella pendenza delle rette relative ai principali parametri morfometrici. Osservando le rette di regressione, sembra che le larve presentino due tipologie di accrescimento nei due banchi, quelle del BM sembrerebbero avere delle misure morfometriche maggiori rispetto a quelli del BA, soprattutto in termini di BD, ED e AL nel periodo che va dalla schiusa fino a 5 mm LS; mentre, al contrario, la situazione sembra cambiare quando le larve hanno superato una $LS > 5$ mm. Quest'ultima misura coincide con il periodo in cui la specie *E. encrasicolus* riassorbe il sacco vitellino (Fage, 1920; Re, 1986; 1989). Ciò farebbe presupporre che il fattore fenotipico dipenda dalla disponibilità di nutrienti contenuti nel tuorlo, che in generale nei teleostei marini, dovrebbe essere costituito come segue:



Composizione approssimativa delle uova di teleostei (Roderici Finn & Hans Jorgen Fyhn, 2010)

Secondo quanto riportato da Finn e Fyhn (2010) per le uova di teleostei marini, la sintesi delle proteine durante i primi stadi embrionali dipende interamente dalla nutrizione materna. Secondo questi autori il contenuto lipidico cambia con la specie, infatti, per uova che contengono meno del 15% di lipidi si tratta principalmente di lipidi polari, mentre se hanno un contenuto >15% sono costituiti da lipidi neutri. La PCA, attraverso il primo asse, che spiega il 50% della variabilità del dataset, mostra la presenza di un pattern che lega valori maggiori di morfometria delle larve appartenenti al BA (aventi LS oltre i 5 mm) a valori di temperatura superficiale (SST) più bassi e clorofilla (CHL) più alta.

In tale contesto si è determinata anche la componente Biochimica su *Engraulis encrasicolus* con lo scopo di capire se in qualche modo le differenze trovate tra le due aree fossero anche legate allo stato nutrizionale. Zenitani (1995) ha mostrato che le condizioni dell'Habitat hanno influenza anche sul reclutamento larvale, e che tale influenza può essere studiata anche attraverso il contenuto lipidico e di carboidrati, usato come indice delle condizioni nutrizionali.

Dai risultati descritti nei boxplot riportati in figura 4.3.2.1 si è subito notato una disomogeneità delle varianze, per questo è stato utilizzato un test non parametrico, in particolare il Mann Whitney U test, mettendo in evidenza che complessivamente nei tre anni di studio non ci sono differenze significative tra le due aree in termini di Lipidi e Carboidrati. Sembrerebbe che l'area del BA e quella BM, nonostante le differenze in termini di eterogeneità idrografica, le diverse batimetrie e la differente produttività in termini di clorofilla (Peterman e Bradford, 1987; Bakun e Parrish, 1991; borjia et al., 1996; tsai et al., 1997; Painting et al., 1998; Lloret et al., 2004) possano garantire dal punto di vista alimentare la stessa quantità di sostanze nutritive per la dieta.

La disponibilità di una quantità di cibo molto spesso non coincide con la sua qualità. La comunità mesozooplanctonica costituisce il primo livello di integrazione idroclimatico forzando la rete alimentare pelagica (Banse, 1995); tali forzanti colpiscono soprattutto il metabolismo degli individui (Båmstedt, 1986; Kleppel, 1993), portando a cambiamenti globali nel funzionamento dell'intera comunità (Alcaraz et al., 2007). Nel tentativo di valutare le caratteristiche principali di questo funzionamento globale, altri autori hanno proposto l'uso di strumenti biochimici come l'attività enzimatica (Bergeron, 1983; 1986; 1995). In questo studio è stata proposta ed utilizzata come strumento innovativo, la variazione della componente aminoacidica negli occhi di *Engraulis encrasicolus*, che viene considerata specie specifica (Falco et al., 2016; Riveiro et al., 2011). Si tratta di metodi che alcuni autori considerano discutibili (Bergeset et al., 1993), ma il loro utilizzo rimane un metodo semplice e poco costoso per valutare le variazioni a mesoscala di alcune importanti caratteristiche metaboliche nelle specie di pesci (Packard et al., 1996).

Dal confronto delle analisi delle tre specie riportate in tabella 4.5.2 riscontriamo le differenze in termini di percentuale aminoacidica, in accordo con quanto trovato da Riveiro et al. (2011) e Falco et al. (2016), evidenziando netti profili di differenze tra le due specie pelagiche (*E. encrasicolus* e *S. pilchardus*) e la specie di allevamento *D. rerio*. Tra queste tre specie, sono state evidenziate differenze significative in termini di Ser, Thr, Arg, Met, Phe, di cui Thr, Arg, Met e Phe risultano appartenenti al gruppo di aminoacidi essenziali che probabilmente variano in funzione alla dieta.

Le differenze significative tra le due specie pelagiche riguardavano Ser, Gly, Arg, Tyr, di cui solo l'Arg è un amminoacido essenziale. Purtroppo non è stato possibile stabilire se le differenze trovate nella composizione aminoacidica delle tre differenti specie, siano dovute alle differenti proteine introdotte con la dieta (Falco et al., 2016) o alle diverse tipologie ambientali in cui gli animali vivono. È stato dimostrato che Ser, Arg e

Met hanno un maggiore effetto insulinotropico nei pesci rispetto al glucosio (Andoh, 2007; Zinalla e Hall, 2008) perciò potrebbero essere coinvolti nelle reazioni metaboliche principali; inoltre la Met promuove gli effetti della crescita sulla trota iridea (Rodehutschord *et al.*, 1995). Nei piccoli pelagici è stato riscontrato che la Gly e la (Asp + Asn) hanno concentrazioni più alte rispetto al *Danio rerio*, perciò non viene escluso che la specificità della composizione aminoacidica nei tessuti oculari dei pesci possa essere legato a questi aminoacidi, ma rimane ancora da confermare.

Dai boxplot di figura 4.5.5, effettuati sugli aminoacidi, sono state evidenziate differenze significative nella composizione aminoacidica tra le larve campionate nel BM e quelle campionate nel BA.

In particolare, le differenze sono state osservate applicando il test non parametrico Mann Whitney U test, che ha messo in evidenza particolari differenze in termini di aminoacidi tra le due aree. Infatti, i risultati hanno mostrato che (Asp+Asn), Ser, Gly, Thr e Arg erano in percentuale maggiore nelle larve del BM piuttosto che nelle larve del BA dove invece risultavano percentuali più alte di Ile e Leu. Nonostante la composizione biochimica ed aminoacidica negli occhi delle larve sia specie specifica (Guisande *et al.*, 1998), variazioni all'interno della specie sono state osservate in accordo con Guisande *et al.* (1998) e Riveiro *et al.* (2000). Si ritiene che le variazioni stagionali e spaziali possono essere dovute alla dieta degli adulti o alle strategie parenterali. In particolare, la composizione aminoacidica è influenzata dai cambiamenti della composizione degli alimenti nella dieta degli individui (Silversand *et al.*, 1996; Pereira *et al.*, 1998). Secondo Leibold (1995) la nicchia trofica di una specie dovrebbe essere suddivisa per 'esigenza di nicchia'. La composizione aminoacidica risulterebbe così anche un buon indicatore della qualità aminoacidica richiesta nell'alimentazione delle larve (Ketola, 1982; Conceição *et al.*, 1998).

La variazione aminoacidica rilevata nel presente studio riguarda la differenza tra individui della stessa specie in due differenti aree sottoposte a differenti condizioni oceanografiche. I risultati inducono a pensare che la composizione aminoacidica potrebbe essere usata come indicatore della competizione trofica che si verifica dentro le specie; queste differenze probabilmente sono dovute alla diversa composizione biochimica dello zooplancton, ingerita dalle larve nelle due differenti aree (Riveiro *et al.*, 2003; Alvarez e Alemany, 1992), o probabilmente alle diverse risposte metaboliche attivate nei piccoli pelagici in relazione ai processi oceanografici a cui vengono sottoposti anche all'interno della stessa area.

Tra gli aminoacidi trovati significativamente differenti ($p < 0.05$), ed appartenenti al gruppo di aminoacidi definiti essenziali (EAA), la Thr e l'Arg si trovavano in quantità minore nelle larve del BA, mentre Ile e Leu erano in quantità minore nel BM. Si tratta di aminoacidi che non possono essere sintetizzati direttamente nelle cellule, ma devono essere provvisti attraverso la dieta.

I pesci hanno particolarmente bisogno di elevate quantità di Arg, introdotta attraverso la dieta, perché alcune proteine sono legate a questo aminoacido che addirittura funge anche da serbatoio di ATP (sono anche attivatori di AMP nelle proteina chinase e nelle rapamicina bersaglio). Si tratta di un aminoacido che non viene sintetizzato *ex-novo*, tuttavia ci sono alcuni elasmobranchi e teleostei che attraverso la sintetasi argininosuccinati e la liasi, convertono la citrullina in Arg (Mommsen *et al.*, 2001), ma non è noto se tutti i pesci sono in grado di fare ciò.

Inoltre, l'Arg può stimolare il rilascio di vari ormoni come l'insulina, ormoni della crescita e glucagone ed è anche un potente attivatore di questo ormone, consentendo al pesce di rilasciare insulina dal glucosio (Mommsen *et al.*, 2001). Quanto appena detto consentirebbe alle larve di potersi sviluppare fino ad adulti garantendo loro anche il successo riproduttivo (giocano un ruolo nella riproduzione). Inoltre è stato osservato

che nelle sogliole senegalesi la concentrazione di Arg si riduceva non appena queste venivano sottoposte ad uno stress acuto (Aragao *et al.*, 2008). Probabilmente anche le larve del BA assorbono una quantità ottimale attraverso la dieta, ma probabilmente il decremento di questo aminoacido potrebbe essere legato alle fluttuazioni ambientali; tutto ciò potrebbe indurre a pensare che possa esserci un legame tra il contenuto EAA e la maggiore dimensione morfometrica delle larve nei primissimi stadi di vita <5 mm di LS trovate nel BM.

Per quanto riguarda la Thr, è stato visto che bassi livelli di questo EAA nella dieta può influenzare il sistema immunitario nei mammiferi (Li *et al.*, 1999; 2007). Infatti, aumentando i livelli di Thr con la dieta, si è notato un aumento dei livelli IgG nel siero delle scrofe (Cuaron *et al.*, 1984). Si tratta, inoltre, di un componente che si trova principalmente nella mucina nell'intestino tenue, che svolge un ruolo da regolatore della barriera batterica intestinale garantendone la funzionalità.

La Gly è un importante aminoacido che insieme ad altri aminoacidi promuove la crescita e lo sviluppo degli animali acquatici. Molto spesso accade che Gly e Ser vengono sintetizzate nel tuorlo, fornendo un eccesso di questi aminoacidi allo stadio larvale. Questi due aminoacidi partecipano alla gluconeogenesi, al metabolismo degli AA solforati (come Met e Cys), ed alla digestione dei grassi (Fang *et al.*, 2002), stimolando l'assunzione di cibo per molti pesci (Shamushaki *et al.*, 2007). La Gly ha un ruolo critico nelle risposte di osmoregolazione nei pesci in risposta a stress ambientale, vedasi le ostriche che assorbono facilmente Gly libera dall'acqua e sintetizzano Gly quando si trovano ad affrontare rapidi cambiamenti di salinità. Per mantenere l'osmolarità e il volume cellulare, i pesci marini si basano sull'uso di osmoliti organici, poiché l'uso di ioni inorganici potrebbe essere incompatibile con le funzioni proteiche a lunga durata (Yancey 2001b); questi osmoliti organici sono composti essenzialmente a base di azoto, come la Gly, β -alanina, e taurina (Yancey 2001a).

Tale ruolo potrebbe spiegare il basso contenuto di Gly nelle larve ritrovate sul BA che affrontano repentini sbalzi di salinità generati dai fenomeni di up-welling. Bonanno *et al.* (2014) hanno evidenziato in quest'area nel 2012 valori anomali in termini di salinità legati a forti eventi di up-welling. Tali fenomeni sono influenzati da anomalie della circolazione e dal regime dei venti (Olita *et al.*, 2007).

I primi stadi di vita infatti risultano essere i più vulnerabili al cambio improvviso delle temperature e della salinità (Faleiro, 2016; Jackson, 1992; Aragao, 2008), convertendo così il BA, fino ad oggi considerato favorevole all'accrescimento larvale, in area stressogena per le caratteristiche oceanografiche. A supporto di tale osservazione è stato trovato che le larve del Banco Maltese avevano un aumento di Ile e Leu, due aminoacidi essenziali che sembrerebbero essere legati all'aumento della salinità nel mare. Aragao *et al.* (2008) trovarono un aumento di questi aminoacidi durante l'aumento di salinità nei loro esperimenti in ambiente controllato, mentre non notavano cambiamenti nel contenuto di altri aminoacidi essenziali come Phe, Met e His, in accordo con quanto riscontrato nel presente studio.

Anche i valori di Asp e Asn hanno mostrato differenze; per i pesci sono i principali precursori di importanti substrati energetici di reazioni glicogeniche (Mommsen *et al.*, 1980). La maggior parte dell'Asp è sintetizzato dal muscolo scheletrico (Wu, 1998). È stato notato inoltre che l'aspartato aminotransferasi è regolato nelle branchie, nei muscoli bianchi e rossi (Bystriansky *et al.* 2007), e nel fegato (Aas-Hansen *et al.*, 2005) durante l'acclimatazione alla salinità o la migrazione.

I cambiamenti osservati nella composizione tra le larve del BM e quello del BA nel presente lavoro potrebbe avere importanti implicazioni in termini di aminoacidi necessari alle larve durante lo svolgimento delle proprie funzioni metaboliche, che risultano fortemente influenzate dalle condizioni oceanografiche in cui vivono (Wilson, 1986). Piccoli squilibri nei parametri fisici potrebbero aumentare la perdita di

aminoacidi, influenzando l'efficienza di conversione e aumentando i tassi metabolici (Conceição *et al.*, 1998). Recenti studi indicano che alcuni aminoacidi e i loro metaboliti sono importanti regolatori di vie metaboliche fondamentali, necessarie per la conservazione, la crescita, l'assunzione di cibo, l'utilizzo dei nutrienti, l'immunità, il comportamento, la metamorfosi larvale, la riproduzione, così come la resistenza ai fattori di stress ambientali e agli organismi patogeni in vari pesci (Liù *et al.*, 2008). Inoltre, la risposta del sistema immunitario del pesce può essere fortemente influenzata da vari fattori esterni come temperatura, luce, qualità dell'acqua, salinità e da diversi induttori di stress (Magnadottir, 2010). Negli ultimi 15 anni vi è stato un crescente interesse per il ruolo degli aminoacidi nella funzione immunitaria di mammiferi, uccelli, pesci e altre specie (Roch, 1999; Calder, 2006; Grimble, 2006; Kim *et al.*, 2007).

A tal proposito in questo lavoro sono state effettuate anche le analisi enzimatiche, in particolare perossidasi (POD) e la fosfatasi alcalina (AKP). L'analisi dei risultati evidenzia differenze significative di fosfatasi alcalina tra i due banchi $p < 0,05$. Le principali differenze significative tra le due aree sono state solo per la fosfatasi alcalina (AKP) che risulta maggiore nel BA.

Gli enzimi sono macromolecole che controllano i processi metabolici degli organismi, quindi variazioni delle attività enzimatiche possono influenzare lo stato di salute degli organismi (Roy, 2002). L'incremento in questi enzimi potrebbe suggerire un accumulo di "rodlet cells" dovuto a situazioni di stress e conseguentemente al rilascio del loro contenuto nel muco. Vari enzimi litici, che possono agire singolarmente o a cascata, sono stati individuati nei pesci e fungono da importanti elementi di difesa specialmente contro i batteri; tra questi ricordiamo la perossidasi e la fosfatasi. In particolare, la fosfatasi si incrementa nei pesci dopo stress fisico, chimico, dopo infezione batterica, mentre un incremento di perossidasi potrebbe significare un'esposizione ad alte concentrazioni di metalli nell'ambiente in cui vivono. I valori di perossidasi determinati

in questo studio dimostrano che la temperatura e la salinità non sono fattori che possono influenzare l'attività enzimatica, in accordo anche con Faleiro *et al.* (2016) che trovarono valori stabili durante i cambi di temperatura nei loro esperimenti.

E' importante che i pesci vivano in condizioni ambientali adatte alla loro fisiologia, visto che anche il tasso di crescita viene influenzato dall'attività enzimatica. Di contro, per quanto riguarda l'influenza della salinità sull'attività della fosfatasi alcalina ci sono pareri discordanti. Secondo Fang *et al.* (2014) l'attività fosfatase non risulterebbe influenzata dalla salinità, mentre Feng *et al.* (2007) hanno trovato piccole variazioni di tale attività enzimatica, attività AKP nel siero di cobia *Rachycentron canadum* che aumentava con la variazione di range di salinità. Cio sarebbe in accordo con quanto trovato in questo studio. Tuttavia, si è trovato che l'aumento della salinità all'interno di certi range migliora l'attività AKP nei giovanili che durante lo sviluppo migliorano il metabolismo epatico, avendo a disposizione una maggiore energia da riservare alle condizioni di stress a lungo termine. Negli organismi marini la AKP, oltre ad essere influenzata dalla temperatura, sembra avere un ruolo chiave nella degradazione di molecole biochimiche quali proteine, carboidrati e lipidi durante i periodi di stress (Liu *et al.*, 2004; Ottaviani, 1984; Pipe *et al.*, 1993; Xue and Renault, 2000). In questo lavoro, la presenza di una concentrazione più alta di AKP nell'area del BA ha probabilmente il ruolo di mantenere il metabolismo energetico in equilibrio e garantire così un migliore accrescimento e la sopravvivenza (Zang *et al.*, 2012).

Inoltre, si osserva come tutti i risultati ottenuti in questo lavoro tendano a convergere verso un'unica ipotesi che sembrerebbe enfatizzare come le caratteristiche di idrodinamismo ed i fenomeni di upwelling rendano il BA particolarmente stressante per la vita dei piccoli pelagici durante i primi stadi di vita.

Conclusioni

La complessità dei sistemi marini, l'elevata variabilità, la loro intrinsecità e l'influenza di molteplici fattori ambientali o di stress suggeriscono che nessuna singola misura è adeguata per valutare gli effetti molteplici a cui sono sottoposti gli organismi pelagici, che in questo caso di studio sono rappresentati dalla specie *E. encrasicolus*.

La struttura della popolazione di *Engraulis encrasicolus* è stata naturalmente studiata attraverso i principali parametri di crescita (Levi *et al.*, 1994), variazioni morfologiche e morfometriche (Shevchenko, 1980; Tudela, 1999; Caneco *et al.*, 2004; Traina *et al.*, 2011) e dati acustici (Patti *et al.*, 2004; Bonanno *et al.*, 2005; D'Elia *et al.*, 2009); in questo contesto ci si è avvalsi anche della composizione biochimica (Guisande *et al.*, 1998; Riveiro *et al.*, 2003) e amminoacidica (Riveiro *et al.*, 2011; Falco *et al.*, 2016).

Nello specifico, sono state studiate le morfometrie, determinati i lipidi e carboidrati, composizione amminoacidica negli occhi e gli enzimi, oltre allo studio parallelo delle variabili ambientali dell'habitat in cui le larve sono state campionate.

Studi precedenti hanno dimostrato che questi metodi possono essere usati per definire la struttura di popolazioni di piccoli pesci pelagici come *Engraulis encrasicolus* (Bembo *et al.*, 1996; İşmen, 2001; Magoulas *et al.*, 2006; Pollar *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2009; Viñas *et al.*, 2014).

In questo lavoro la suddivisione in classi di taglie ha permesso di interpretare la loro distribuzione e l'eventuale presenza di aree di deposizione, mentre lo studio dei fenomeni a mesoscala ha permesso di interpretare i possibili trasporti all'interno del Canale.

I risultati delle analisi biochimiche di lipidi (Vetter *et al.*, 1993) e carboidrati (Fhyhn, 1989; Ronnestad *et al.*, 1994) per i due gruppi larvali indicano la presenza di una buona quantità di cibo.

Attraverso lo studio idrologico dell'area è stato dimostrato che la distribuzione delle acciughe allo stadio larvale rimane molto legata alla dinamicità delle acque superficiali, che vengono controllate dall' AIS (Atlantic Ionian Stream - Robinson *et al.*, 1999).

Con il presente studio è stata avanzata l'ipotesi che la presenza di classi di taglia più piccola nel Banco Avventura potrebbe essere spiegata dalle variabilità ambientali a cui questa parte del Canale viene continuamente sottoposta e i continui cambi di masse di acqua, potrebbero giocare un ruolo chiave nelle differenze della composizione aminoacidica, determinata negli occhi di *Engraulis encrasicolus*, evidenziata in questo studio. La presenza dei fenomeni di up-welling, caratteristici soprattutto nell'area del BA, che generano continui cambi di acqua superficiale, potrebbero essere considerati fattori di stress a cui le larve tenderebbero ad acclimatarsi a livello molecolare; questo concetto potrebbe trovare riscontro nella scarsa presenza di larve appartenenti alle classi di taglia >6 nel BA.

Un importante contributo è stato dato anche dall'analisi morfometrica che ha evidenziato la presenza di differenze significative tra i campioni larvali di *Engraulis encrasicolus* delle due aree, dimostrando che probabilmente i campioni provenienti dall'area del BM avevano condizioni climatiche (salinità e temperature) più stabili che hanno permesso un più rapido accrescimento.

Questo concetto ha trovato riscontro anche nei risultati dei dati enzimatici che hanno mostrato una più alta percentuale di fosfatasi alcalina nelle larve appartenenti al BA. Oltre la morfometria, un utile indicatore di benessere si è dimostrata la composizione aminoacidica determinata negli occhi di *Engraulis encrasicolus*, la cui scelta è stata ponderata grazie a studi precedenti che ne hanno mostrato la specificità nella specie

(Falco *et al.*, 2016; Riveiro *et al.*, 2011). Le differenze nella composizione aminoacidica trovate in questo lavoro riguardavano principalmente Asp, Ser, Gly, Thr e Arg che sono stati trovati in quantità maggiore nelle larve del BM piuttosto che in quelle del BA che invece avevano un maggiore contenuto di Ile e Leu, dando enfasi al fatto che Thr, Arg, Leu, e Ile sono tra quelli classificati essenziali (Liu *et al.*, 2011). Si tratta di aminoacidi che non possono essere sintetizzati dal corpo, ma devono essere introdotti con la dieta (Wu *et al.*, 1998); una carenza di questi aminoacidi, potrebbe spiegare la loro partecipazione alle principali reazioni metaboliche attivate in situazioni di stress, come cambi di salinità e temperatura. Infatti gli ectotermi adattati o acclimatati a diverse temperature mostrano spesso i tassi di attività metabolica più alti rispetto a quelli che vivono in ambienti stabili. E' stato trovato inoltre, che gli aminoacidi sono importanti molecole che prendono parte nelle reazioni anaboliche e cataboliche dei periodi larvali (Fyhn, 1993).

Somero (2004) ha trovato che gli aminoacidi sono coinvolti nell'adattamento a cambi di temperature, infatti negli studi effettuati su proteine ortologhe di lattato deidrogenasi ha evidenziato che bastano poche sostituzioni aminoacidiche. Inoltre è stato osservato che in *solea senegalese* le concentrazioni di Arg si riducono non appena queste vengono sottoposte ad uno stress acuto (Aragao *et al.*, 2008), probabilmente anche le larve del BA assorbono una quantità ottimale di questo aminoacido attraverso la dieta ed il loro decremento potrebbe essere legato alle fluttuazioni ambientali insieme ad altri aminoacidi che, pur essendo non essenziali, giocano un ruolo importante nella regolazione ed espressione genetica e nella regolazione cellulare (Bazer *et al.*, 2012). Si pensa ad esempio che la Gly abbia un ruolo critico nelle risposte di osmoregolazione nei pesci in risposta a stress ambientale e che possa in qualche modo essere usata dalle larve del BA durante i processi di acclimatazione, quando si trovano ad affrontare rapidi cambiamenti di salinità, dovuti ai cambi delle masse d'acqua.

Le condizioni ambientali durante i primi stadi di sviluppo possono influenzare sia la morfologia (Winans, 1984) che la composizione aminoacidica che serve per la sintesi di proteine specifiche all'adattamento a cambiamento di caratteristiche ambientali. Nonostante lo stato nutrizionale sia collegato all'ambiente, sembra che la concentrazione biochimica non vari durante i periodi di studio, garantendo che nelle due aree vi sia un buon livello di produzione primaria. Probabilmente le caratteristiche fin qui evidenziate possono essere collegate ai fenomeni di adattamento o acclimatazione visto che si trovano nello strato di acqua conosciuto come altamente variabile.

I risultati ottenuti in questo lavoro potrebbero avere importanti implicazioni per la comprensione degli aminoacidi necessari alle larve della specie in esame per le loro funzioni metaboliche, considerando il fatto che i prodotti di deposizione si trovano in due zone con habitat influenzati da diverse caratteristiche oceanografiche e quest'ultime possono fortemente influenzare i primi stadi del loro sviluppo.

Si ritiene il presente studio un modello "start-up" che possa servire da riferimento per aprire un nuovo campo di indagine soprattutto nello studio della biochimica e, in particolar modo, dei singoli aminoacidi e della loro relazione sugli aspetti metabolici delle larve dei pesci pelagici. In futuro questa metodologia di studio potrebbe essere applicata ad individui giovanili e adulti di specie pelagiche, al fine di comprendere quanto e come l'ambiente esterno influisca sulla variazione aminoacidica del singolo individuo. I risultati della ricerca hanno stabilito che le variazioni aminoacidiche possono essere legate anche a particolari situazioni di stress. Ricerche mirate in futuro potrebbero aiutare a comprendere la relazione tra le condizioni di stress e gli effetti che questo può generare sul singolo aminoacido durante la crescita e lo sviluppo oppure quali potrebbero essere i legami con l'adattamento e come il metabolismo degli aminoacidi intervenga in tale contesto.

L'insieme di questo complesso studio ha portato sicuramente ad una maggiore conoscenza della biologia della specie *Engraulis encrasicolus*, almeno nella fase larvale, che non era stata indagata mai ad ora attraverso la composizione biochimica. Lo studio vuole essere anche un contributo per gli studi sulla valutazione degli stock di specie alieutiche del Canale di Sicilia. Infatti, uno dei problemi ancora irrisolti riguarda la definizione e la delimitazione spaziale degli stock di piccoli pelagici in diverse aree del Mediterraneo. Nel quadro di un approccio ecosistemico alla gestione della pesca, gli studi sugli aminoacidi, insieme a quelli di genetica, di biologia ed ecologia della specie, e di oceanografia potrebbero fornire un insieme di strumenti che in maniera sinergica potrebbero aiutare ad identificare le unità gestionali per le popolazioni di piccoli pesci pelagici.

Bibliografia

- Aas-Hansen O, Vijayan MM, Johnsen HK, Cameron C, Jorgensen EH (2005) Resmoltification in wild, anadromous Arctic char (*Salvelinus etabol*): a survey of osmoregulatory, metabolic, and endocrine changes preceding annual seaward migration. *Can J Fish Aquat Sci* 62:195–204
- Agostini V.N., Bakun A., 2002. „Ocean triads“ in the Mediterranean Sea: physical mechanisms potentially structuring reproductive habitat suitability (with example application to European anchovy, *Engraulis encrasicolus*). *Fisheries Oceanography* 11 (3), 129–142
- Alcaraz, M., Calbet, A., Estrada, M., Marrasé, C., Saiz, E., & Trepát, I. (2007). Physical control of zooplankton communities in the Catalan Sea. *Progress in Oceanography*, 74(2), 294-312.
- Aldanondo, N., Cotano, U., Etxebeste, E., Irigoien, X., Álvarez, P., de Murguía, A. M., & Herrero, D. L. (2008). Validation of daily increments deposition in the otoliths of European anchovy larvae (*Engraulis encrasicolus* L.) reared under different temperature conditions. *Fisheries research*, 93(3), 257-264.
- Alexandrov, A.I. 1927. Anchovy from AzovBlack Sea basin and it origin and taxonomy. *Proc. Kerch Fish. Stn.*, 1/2 and 3:43 pp.
- Alheit J, Pohlmann T, Casini M, Greve W, Hinrichs R, Mathis M, O’Driscoll K, Vorberg R, Wagner C (2012) Climate variability drives anchovies and sardines into the North and Baltic Seas. *Prog Oceanogr* 96: 128–139.
- Alheit, J., Egg cannibalism versus egg predation: their significance in anchovies. In: Payne, A.I.L., Gulland, J.A., Brink, K.H. (Eds.), 1987 “The Benguela and Comparable Ecosystems. South African” *Journal of Marine Science*, 5, 467–470.
- Alvares F., Cingolani N., Kallianiotis A., 2003. Piccoli pelagici: gestione futura delle risorse condivise in Mediterraneo. *Il Pesce* 5, 57-65.

- Alvárez F, Alemany F (1992) Regional growth differences in sardine (*Sardina pilchardus* Walb.) larvae from Cantabrian and Galician coast. ICES-CM 1992/H:9
- Aragao, C., Corte-Real, J., Costas, B., Dinis, M. T., & Conceição, L. E. C. (2008). Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Amino Acids*, 34(1), 143-148.
- Bączek T and Radkowska M. Predictions of peptide retention in HPLC with the use of amino acids retention data obtained in a TLC system. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology* 2007; 30:2963–2974.
- Bahri, Tarúb, and Pierre Fréon. "Spatial structure of coastal pelagic schools descriptors in the Mediterranean Sea." *Fisheries research* 48.2 (2000): 157-166.
- Bailey, R. M., & Smith, G. R. (1981). Origin and geography of the fish fauna of the Laurentian Great Lakes basin. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38 (12), 1539-1561.
- Bakun, A. & Parrish, R. H. (1991). Comparative studies of coastal pelagic fish reproductive habitats: the anchovy (*Engraulis anchoita*) of the southwestern Atlantic. *ICES Journal of Marine Science* 48, 342–361.
- Bakun, A. 1996. Patterns in the ocean: ocean processes and marine population dynamics. University of California Sea Grant (in cooperation with Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, La Paz, Baja California Sur, Mexico), San Diego. 323 p.
- Bakun, A., 1998. 'Ocean triads' and radical interdecadal stock variability: bane and boon for fishery management science. In: Pitcher, T.J., Hart, P.J.B., Pauly, D. (Eds.), *Reinventing Fisheries Management*. Chapman and Hall, London, pp. 331–358.
- Bayne BL, Widdows J. 1978. The physiological ecology of two populations of *Mytilus edulis* L. *Oecologia* 37:137– 62
- Baldwin C, Mounts C, Smith J. H, Weigt D, G L. A. 2009 Genetic identification and color descriptions of early life-history stages of Belizean *Phaeoptyx* and *Astrapogon* (Teleostei: Apogonidae) with comments on identification of adult *Phaeoptyx*. *Zootaxa* 2008 1 22

Ballarin L, Pampanin DM, Marin GM. Mechanical disturbance affects haemocyte functionality in the Venus clam *Chamelea gallina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 2003;136:631e40.

Båmstedt, U., 1986. Chemical composition and energy content. In: Corner, E.D.S., O'Hara, S.C.M. (Eds.), *The Biological Chemistry of Marine Copepods*. Clarendon Press, Oxford, pp. 1–58.

Banse, K. (1995) Zooplankton: pivotal role in the control of ocean production. *ICES J. Mar. Sci.*, 52, 265–277.

Bariche, M., N. Alwan, and M. El-Fadel. "Structure and biological characteristics of purse seine landings off the Lebanese coast (eastern Mediterranean)." *Fisheries research* 82.1 (2006): 246-252.

Bas, C., Morales, E., Rubio', M. 1955. *La Pesca en España*. I. Cataluña. Instituto de Investigaciones Pesqueras, CSIC, Barcelona.

Basilone, G., et al. "Spawning site selection by European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in relation to oceanographic conditions in the Strait of Sicily." *Fisheries Oceanography* 22.4 (2013): 309-323.

Basilone, G., Guisande, C., Patti, B., Mazzola, S., Cuttitta, A., Bonanno, A., Vergara, A.R., Maneiro, I. Effect of habitat conditions on reproduction of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Strait of Sicily (2006) *Fisheries Oceanography*, 15 (4), pp. 271-280.

Basilone, G., Guisande, C., Patti, B., Mazzola, S., Cuttitta, A., Bonanno, A., & Kallianiotis, A. (2004). Linking habitat conditions and growth in the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Fisheries Research*, 68(1), 9-19.

Bazer, F. W., Song, G., Kim, J., Dunlap, K. A., Satterfield, M. C., Johnson, G. A., ... & Wu, G. (2012). Uterine biology in pigs and sheep. *Journal of animal science and biotechnology*, 3(1), 1.

Bellido JM, Brown AM, Valavanis VD, Giráldez A, Pierce GJ, Iglesias M, Palialexis A (2008) Identifying essential fish habitat for small pelagic species in Spanish Mediterranean waters. *Hydrobiologia* 612: 171–184

Bembo, D.G., Carvalho, G.R., Cingolani, N., Arneri, E., Giannetti, G. and Pitcher, T.J. (1996) Allozymic and morphometric evidence for two stocks of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* in the Adriatic waters. *Mar. Biol.* 126:529–538.

Benson RJ, Hare EP (1975) *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:619–622

Benzecri, F. "Introduction à l'analyse des correspondances d'après un exemple de données médicales. *"Les cahiers de l'analyse des données"* 5.3 (1980): 283-310.

Benzécri, Jean-Paul, and F. Benzécri. *Analyse des Correspondances: exposé élémentaire*. Dunod, 1980.

Béranger K., Mortier L. & Crépon M., (2005) - Seasonal variability of water transport through the Straits of Gibraltar, Sicily and Corsica, derived from a highresolution model of the Mediterranean circulation. *Progress in Oceanography* 66, 341-364.

Berdegue, J. A. 1958. Biometric comparison of the anchoveta, *Cetengraulis mysticetus* (Gunther), from ten localities of the Eastern Tropical Pacific Ocean. *Inter-American Tropical Tuna Commission Bulletin* 3:1-53.

Bergeron, J. P. (1983) Approche systémique des potentialités de production secondaire pélagique: l'évolution printanière en province néritique. *Oceanol. Acta*, vol. sp. no. 4, 15–19.

Bergeron, J. P. (1986) Approche systémique des potentialités de production secondaire pélagique: inférences de fluctuations interannuelles. *Oceanol. Acta*, 9, 291–303.

Bergeron, J. P. (1995) Aspartate transcarbamylase activity for the assessment of mesozooplankton production: new aspects from oceanic areas. *ICES J. Mar. Sci.*, 52, 305–313

Berges, J. A., Roff, J. C. and Ballantyne, J. S. (1993) Enzymatic indices of respiration and ammonia excretion: relationships to body size and food levels. *J. Plankton Res.*, 15, 239–254

Bernal, M., Stratoudakis, Y., Coombs, S., Ange'lico, M. M., Lago de Lanzo's, A., Porteiro, C., Sagarminaga, Y., et al. 2007. Sardine spawning off the European Atlantic

coast: characterization of and spatio-temporal variability in spawning habitat. *Progress in Oceanography*, 74: 210–22

Bethoux J.P., (1980) - Mean water fluxes across sections in the Mediterranean Sea evaluated on the basis of water and salt budgets and of observed salinities. *Oceanol. Acta* 3:79±88.

Bhushan R and Brückner H. Marfey's reagent for chiral amino acid anaLysis. A review. *Amino Acids* 2004; 27: 231–247.

Bhushan R and Brückner H. Use of Marfey's reagent and analogs for chiral amino acid anaLysis. Assessment and applications to natural products and biological systems. *Journal of Chromatography B* 2011; 879: 385–395

Bianchi, C. N., & Morri, C. (2000). Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Marine pollution bulletin*, 40(5), 367-376.

Bianchi, C. N., et al. "Thirty years after-dramatic change in the coastal marine habitats of Kos Island (Greece), 1981-2013. "*Mediterranean Marine Science* 15.3 (2014): 482-497.

Bianchi, Carlo Nike, and Carla Morri. "Indicatori biologici ed ecologici nell'ambiente marino." *Studi per la creazione di strumenti di gestione costiera: Golfo del Tigullio* (2003): 111-120.

Bibby R, Widdicombe S, Parry H, Spicer J, Pipe R. Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Biology* 2008;2:67e74.

Blackburn S, in: S. Blackburn (Ed.), *Amino Acid Determination*, Marcel Dekker, New York, 2nd ed., 1978, p. 8.

Blackith, R. E., & Reyment, R. A. (1971). *Multivariate morphoMetrics*.

Blackwell, Fishing News Book, (1999) *fisheries and stock assessment*. London. 348 p.

Blaxter, J.H.S., Hunter, J.R., 1982. The biology of Clupeoid fishes. *Advances in Marine Biology* 20, 1–223.

Bonanno, A., et al. "Influence of environmental variability on anchovy early life stages (*Engraulis encrasicolus*) in two different areas of the Central Mediterranean Sea." *Hydrobiologia* 701.1 (2013): 273-287;

Bonanno, A., Patti, B., Goncharov, S. et al. (2005) Fluctuation of sardine and anchovy abundance in the Strait of Sicily investigated by acoustic surveys. *MedSudMed Tech. Doc.* 5:39–47.

Bonanno, A., Patti, B., Goncharov, S. et al. (2005) Fluctuation of sardine and anchovy abundance in the Strait of Sicily investigated by acoustic surveys. *MedSudMed Tech. Doc.* 5:39–47.

Borja, A., Uriarte, A., Egana, J., Motos, L. and Valencia, V. (1998) Relationships between anchovy (*Engraulis encrasicolus*) recruitment and the environment in the Bay of Biscay (1967–1996). *Fish. Oceanogr.* 7:375–380.

Borja, A., Uriarte, A., Valencia, V., Motos, L. and Uriarte, A. (1996) Relationships between anchovy (*Engraulis*

Borme, D., Tirelli, V., Brandt, S. B., Umani, S. F., & Arneri, E. (2009). Diet of *Engraulis encrasicolus* in the northern Adriatic Sea (Mediterranean): ontogenetic changes and feeding selectivity. *Marine Ecology Progress Series*, 392, 193-209.

Bouilly K, Gagnaire B, Bonnard M, Thomas-Guyon H, Renault T, Miramand P, et al. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* 2006;78:149e56Pi.

Bradford M. (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254

Brückner H, Westhausser T and Godel H. Liquid chromatographic determination of d- and l-amino acids by derivatization with o-phthalaldehyde (OPA) and N-isobutyl-L-cysteine. Application with reference to the analysis of peptidic antibiotics, toxins, drugs and pharmaceutically used amino acids. *Journal of Chromatography A* 1995; 711: 201–215.

Buha, S. M., Panchal, A., Panchal, H., Chambhare, R., Kumar, S., Jain, M., & Patel, P. R. (2011). HPLC-FLD for the simultaneous determination of primary and secondary amino acids from complex biological sample by pre-column derivatization. *Journal of Chromatographic Science*, 49(2), 118-123.

Bystriansky JS, Frick NT, Ballantyne JS (2007) Intermediary metabolism of Arctic char *Salvelinus etabol* during short-term salinity exposure. *J Exp Biol* 210:1971–1985

Calder PC (2006) Branched-chain amino acid and immunity. *J Nutr* 136, 288S– 293S

Caneco, B., Silva, A. and Morais, A. (2004) Morphometric variation among anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) populations from the Bay of Biscay and Iberian waters. *ICES J. Mar. Sci.* 60:1352–1360

Caneco, B., Silva, A. and Morais, A. (2004) Morphometric variation among anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) populations from the Bay of Biscay and Iberian waters. *ICES J. Mar. Sci.* 60:1352–1360

Cappuccinelli, Roberto. "Caratteristiche qualitative ed indici somatici di specie ittiche di interesse commerciale e monitoraggio dell'attività di pesca a circuizione nel mare della Sardegna nord-occidentale." (2012): 1-114.

Casavola, N., E. Hajderi and G. Marano, 1998. Relationship between the density of *Engraulis encrasicolus* eggs and zooplanktonic biomass in the southern adriatic sea. *Biol. mar. Mediterr.* 5: 56–62.

Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., & Zhao, S. (2007). Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture*, 271(1), 479-487.

Cheng W, Hsiao IS, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* (2004)b;17:193e202.

Cheng W, Juang FM, Chen JC. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology* (2004)C;16:295e306.

Cheng W, Li CH, Chen JC. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* (2004) a; 232:103e15.

Childress JJ, Somero GN. 1979. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Mar. Biol.* 52:273–83

Conceição LEC, Ozório ROA, Suurd EA, Verreth JAJ (1998) Amino acid profiles and amino acid utilization in larval African catfish (*Clarias gariepinus*): effects of ontogeny and temperature. *Fish Physiol Biochem* 19:43–58

Coombs SH, Smyth TJ, Conway DVP, Halliday NC, Bernal M, Stratoudakis Y, Alvarez P (2006) Spawning season and temperature relationships for sardine (*Sardina pilchardus*) in the eastern North Atlantic. *J Mar Biol Assoc UK* 86: 1245–1252.

Coteur G, Danis B, Wantier P, Pernet P, Dubois P. Increased phagocytic and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology* 2004;69:311e25.

Cuaron JA, Chapple RP & Easter RA (1984) Effect of lysine and threonine supplementation of sorghum gestation diets on nitrogen balance and plasma constituents in first-litter gilts. *J Anim Sci* 58, 631–637.

Cury P., Bakun, A., Crawford, R.J.M., Jarre, A., Quinones, R.A., Shannon, L.J.H., Verheye, M., 2000. Small pelagic in *upwellings* systems: patterns of interaction and structural changes in ‘wasp-waist’ ecosystems. *ICES Journal of Marine Science* 57, 603–618.

Cury P., Fontana, A., 1988. Competition et stratégies démographiques comparées de deux espèces de sardinelles (*Sardinella maderensis* et *Sardinella taylori*) des côtes ouest-africaines. *Aquatic and Living Resources* 1, 165–180.

Cuttitta A., Guisande C., Riveiro I., Maneiro I., Patti B., Vergara A.R., Basilone G., Bonanno A., Mazzola S., 2006. Factors structuring reproductive habitat suitability of *Engraulis encrasicolus* in the south coast of Sicily. *Journal of Fish Biology*, 68: 264-275;

Cuttitta, A., Arigo, A., Basilone, G., Bonanno, A., Buscaino, G., Rollandi, L., ... & Patti, B. (2004). Mesopelagic fish larvae species in the Strait of Sicily and their relationships to main oceanographic events. *Hydrobiologia*, 527(1), 177-182.

Cuttitta, A., Carini, V., Patti, B., Bonanno, A., Basilone, G., Mazzola, S., ... & Rollandi, L. (2003). Anchovy egg and larval distribution in relation to biological and physical oceanography in the Strait of Sicily. In *Migrations and Dispersal of Marine Organisms* (pp. 117-120). Springer Netherlands.

Cuttitta, A., *et al.*, "Trends of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) condition factor and gonadosomatic index in the Sicilian Channel." *Biol. mar. Mediterr* 6 (1999): 566-568.

Cuttitta, A., *et al.*, "Factors structuring reproductive habitat suitability of *Engraulis encrasicolus* in the south coast of Sicily." *Journal of fish biology* 68.1 (2006): 264-275.

Cuttitta, A., Patti, B., Maggio, T., Quinci, E. M., Pappalardo, A. M., Ferrito, V., ... & Musco, M. (2015). Larval population structure of *Engraulis encrasicolus* in the Strait of Sicily as revealed by morphometric and genetic analysis. *Fisheries Oceanography*, 24(2), 135-149..

D'Ancona, U., Lo Bianco, S., (1931-1933). Fauna e flora del Golfo di Napoli. Monografia No. 38. (1956). Tavole.

Davidson I *Methods Mol. Biol.*, 64 (1997), p. 119

De Sylva, D. P. H. B. Stearns and D. C. Tabb. 1956. Populations of the black mullet (*Mugil cephalus* L.). Florida State Board Cons Technical Series 19: 1-45.

D'Elia, M., Patti, B., Sulli, A., Tranchida, G., Bonanno, A., Basilone, G., Giacalone, G., Mazzola, S. Distribution and spatial structure of pelagic fish schools in relation to the nature of the seabed in the Sicily Straits (Central Mediterranean) (2009) *Marine Ecology*, 30 (SUPPL.1), pp. 151-160

Diaz, M.V., Pajaro, M. and Sanchez, R.P. (2009) Employment of morphometric variables to assess nutritional condition of Argentine anchovy larvae (*Engraulis anchoita*). *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 44:539–549.

Duchemin MB, Fournier M, Auffret M. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 2007;264:73e81

Dulčić J., 1997. Growth of anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.), larvae in the Northern Adriatic Sea. *Fisheries Research*, 31: 189-195.

Dulcic, J., 1997. Growth of anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.), larvae in the Northern Adriatic Sea. *Fisheries Research* 31, 189–195.

Dunkelberger, D. G., Dean, J. M., & Watabe, N. (1980). The ultrastructure of the otolithic membrane and otolith in the juvenile mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Morphology*, 163(3), 367-377

Fabbris L., 1997, *Statistica multivariata*, Milano, McGraw-Hill

Fabbris, Luigi. *Statistica multivariata: analisi esplorativa dei dati*. McGraw-Hill Libri Italia, 1997;

FAGE, L. 1911. Recherches sur la biologie de l'anchois *Engraulis encrasicolus* (L.) *Ann. Inst. Oceanography*, Monaco, 2(4):1-40.

Fage. L. (1920). *Engraulidae, Clupeidae*. Rep. Dan.

Falco F, *Analisi Comparativa Degli Stock LarVali Di Engraulis Encrasicolus* (Linnaeus, 1758) Nel Canale Di Sicilia, Palermo, 8 ottobre, 2013, (30-34).

Falco, F., Barra, M., Cammarata, M., Cuttitta, A., Jia, S., Bonanno, A., ... & Wu, G. (2016). Amino acid composition in eyes from zebrafish (*Danio rerio*) and sardine (*Sardina pilchardus*) at the larVal stage. *SpringerPlus*, 5(1), 1.

Falco, Francesca and Stincone, Paolo and Cuttitta, Angela and Cammata, Matteo and Torri, Marco and Maneiro, Isabel and Armeri, Grazia Maria and De Luca, Biagio and Patti, Carlo and Bennici, Carmelo and Mazzola, Salvatore (2015) *Scelta di un Metodo in HPLC per la determinazione della composizione aminoacidica applicabile a campioni larVali di piccoli pelagi* Technical Report. IAMC-CNR, Capo Granitola.

Faleiro, F., Pimentel, M., Pegado, M. R., Bispo, R., Lopes, A. R., Diniz, M. S., & Rosa, R. (2016). Small pelagics in a changing ocean: biological responses of sardine early stages to warming. *Conservation Physiology*, 4 (1), cow017.

Fang YZ, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 8:872–879

Fang Z.H., Tian X.L., Dong S.L., Dai C. & Wang G.D.(2014) Effects of salinity on the activity of non-specific immune enzymes of juvenile tongue sole cultured in various salinities. *Journal of Ocean University of China* 44,46–53 (in Chinese with English abstract).

Fang, W., Zhang, P., Zhang, G., Jin, S., Li, D., Zhang, M., & Xu, X. (2014). Effect of alkaline addition on anaerobic sludge digestion with combined pretreatment of alkaline and high pressure homogenization. *Bioresour. Technol.*, 168, 167-172.

Feng J., Xu L.W., Lin H.Z., Guo Z.X. & Guo G.X. (2007) Effects of salinity on growth and several immune parameters of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Journal of Fishery Science of China* 14, 120–125 (in Chinese with English abstract).

FENG, J., XU, L. W., LIN, H. Z., GUO, Z. X., & GUO, G. X. (2007). Effects of salinity on growth and several immune parameters of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1, 016.

Finn, R. N., & Fyhn, H. J. (2010). Requirement for amino acids in ontogeny of fish. *Aquaculture Research*, 41 (5), 684-716.

Fiorino A, Frigo G, Cucchetti E (1989) *J Chromatogr* 476:83–92

Fréon P. and Misund O.A. (1999) *Dynamics of Pelagic Fish Distribution and Behaviour: Effects on Fisheries and Stock Assessment*. Blackwell Science, Oxford, 348 pp.

Fréon, P., Cury, P., Shannon, L., Roy, C. Sustainable exploitation of small pelagic fish stocks challenged by environmental and ecosystem changes: A review (2005) *Bulletin of Marine Science*, 76 (2), pp. 385-462.

Froese, R. and D. Pauly. 2000. FishBase 2000: concepts, design and data sources. ICLARM, Los Baños. 344 p.

Furst, P., Pollack, L., GraSer, T. A., Godel, H., & Stehle, P. (1989). HPLC analysis of free amino acids in biological material - an appraisal of four pre-column derivatization Methods. *Journal of Liquid Chromatography*, 12(14), 2733-2760.

Furst, P., Pollack, L., GraSer, T. A., Godel, H., & Stehle, P. (1990). Appraisal of four pre-column derivatization Methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. *Journal of Chromatography*, 499, 557-569.

Fyhn, H. J. (1989). First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of energy?. *Aquaculture*, 80(1), 111-120.

G. Wu, T.L. Ott, D.A. Knabe, F.W. Bazer, J. Nutr. 129 (1999) 1031–1038.

Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon H, Renault T. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology* 2006;20:536e47.

Gagnaire B, Renault T, Bouilly K, Lapègue S, Thomas-Guyon H. Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Current Pharmaceutical Design* 2003; 8:99 e 110.

Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeott T, Renault T. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology* 2006;22:1e14.

Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 2004;16:501e12.

García A., Palomera I., Anchovy early life history and its relation to its surrounding environment in the Western Mediterranean basin *Scientia Marina*, 60S2 (1996), pp. 155 – 166

García Lafuente J., García A., Mazzola S., Quintanilla L., Delgado J., Cuttitta A., Patti B., 2002. Hydrographic phenomena influencing early life stages of the Sicilian Channel anchovy. *Fisheries Oceanography* 11(1), 31-44.

García, D. Cortés, T. Ramírez Daily larVal growth and RNA and DNA contents of the NW Mediterranean anchovy *Engraulis encrasicolus* and their relations to the environment *Marine Ecology Progress Series*, 166 (1998), pp. 237–245

García-Lafuente J., García A., Mazzola S., Quintanilla L., Delgado A., Cuttitta A. & Patti B., 2002) - Hydrographic phenomena influencing early life stages of the Sicilian Channel anchovy. *Fisheries Oceanography* 11: 31-44.

Garcia S.M., Staples D.J., Chesson J. (2000) - The FAO guidelines for the development and use of indicators of sustainable development of marine capture fisheries and an Australian example of their application. *Ocean and Coastal Management*, 43: 537-556.

Garofalo, G. Ceriola, L. Gristina, M., Fiorentino, F. and Pace, R. (2010) Nurseries, spawning grounds and recruitment of *Octopus vulgaris* in the Strait of Sicily, central Mediterranean Sea *ICES J. Mar. Sci.* 67(7):1363–1371.

Gasparini, G.P., Ortona, A., Budillon, G., Astraldi, M., Sansone, E., 2005. The effect of the Eastern Mediterranean Transient on the hydrographic characteristics in the Strait of Sicily and in the Tyrrhenian Sea. *Deep-Sea Res. I* 52, 915–935

Ghirardelli, E. "I fattori che regolano la microdistribuzione superficiale del plancton: la temperatura." *Boll. Soc. Adriatica Sci* 55 (1967): 18-86.

Giannoulaki, Marianna, et al.,. "Characterizing the potential habitat of European anchovy *Engraulis encrasicolus* in the Mediterranean Sea, at different life stages." *Fisheries Oceanography* 22.2 (2013): 69-89.

Grimble RF (2006) The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *J Nutr* 136, 1660S–1665S.

Guardiola FA, Cuesta A, Arizcun M, Meseguer J, Esteban MA. Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunol* 2014;36:545–51.

Guardiola, F. A., González-Párraga, M. P., Cuesta, A., Meseguer, J., Martínez, S., Martínez-Sánchez, M. J., & Esteban, M. A. (2013). Immunotoxicological effects of inorganic arsenic on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquatic Toxicology*, 134, 112-119.

Hakanson, J. L. "AnaLysis of lipid components for determining the condition of anchovy larvae, *Engraulis mordax*." *Marine Biology* 102.2 (1989): 143-151;

Halpine SM. Amino Acids: AnaLysis by HPLC: Advanced techniques. In *Encyclopedia of Chromatography*, 2nd edn, Cazes J (ed.). Taylor & Francis: New York, 2005; 63–67

Hayward CJ, Bott NJ, Nowak BF (2009): Seasonal epizootics of sea lice, *Caligus* spp., on southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau), in a long-term farming trial. *Journal of Fish Disease* 32, 101–106.

Hirs H.W. (Ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 11 Academic Press, New York (1967), p. 197

Hirs, C. H. W. (1967). Determination of cystine as cysteic acid. *Methods in enzymology*, 11, 59-62.

Hirs, C. H. W. (1967). Reduction and carboxyMethylation of proteins. *Methods in enzymology*, 11, 199-203.

Holdway, Douglas A. "The role of biomarkers in risk assessment." (1996): 263-267.

http://www2.stat.unibo.it/pillati/_doc/An_Discr.pdf;

Hunter, J.R., Alheit, J., 1995. International GLOBEC small pelagic fishes and climate change program. GLOBEC Report No. 8, 72 pp

Ihssen, P. E., Booke, H. E., Casselman, J. M., McGlade, J. M., Payne, N. R., & Utter, F. M. (1981). Stock identification: materials and methods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38 (12), 1838-1855.

Ihssen, P. E., H. E. Booke, J. M. Casselman, J. M. McGlade, N. R. Payne, and F. M. Ut-
8 ter. 1981. Stock identification: Materials and methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*
38:1838-1855;

Ilisz L, Berkecz R and Péter A. Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; 47: 1–15.

Innamorati M., Ferrari I., Marino D. & Ribera D'Alcalà M., 1990. Metodi nell'ecologia del plancton. *Nova ThAlassia*. 11, 1-372.

Ishida Y, Fujita T, Asai K (1981) *J Chromatogr* 204:143–148

Ismail, S. B., Sammari, C., Gasparini, G. P., Beranger, K., Brahim, M., & Aleya, L. (2012). Water masses exchanged through the Channel of Sicily: evidence for the presence of new water masses on the Tunisian side of the Channel. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 63, 65-81.

Ismen, A. (2001) Use of a discriminant function for the morphometric and meristic separation of whiting stocks, *Merlangius merlangus euxinus*, along the Turkish Black Sea Coast. *Turk J. Zool.* 25:297–304.

James, A., J. W. Pitchford and J. Brindley, 2003. The relationship between plankton blooms, the hatching of fish larvae, and recruitment. *Ecol. Model.* 160: 77–90.

Junquera S., Pérez-Gándaras G. Population diversity in Bay of Biscay anchovy (*Engraulis encrasicolus* L. 1758) as revealed by multivariate analysis of morphometric and meristic characters. *ICES Journal of Marine Science* 1993;50:383-391.

Ketola HG (1982) Amino acid nutrition of fishes: requirements and supplementation of diets. *Comp Biochem Physiol* 73: 17–2

Kim SW, Mateo RD, Yin YL & Wu G (2007) Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. *Asian-Aust J Anim Sci* 20, 295 –306

King, T. L., & Ludke, J. L. (1995). A National Biological Service perspective on defining unique units in population conservation. In *American Fisheries Society Symposium AM. FISH. SOC. SYMP.* 1995

Kleppel, G.S., 1993. On the diets of calanoid copepods. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 99, 183–195

Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621.

Lacoste A, Malham SK, Gélébart F, Cueff A, Poulet SA. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* 2002; 26:1 e 9.

Lasker, R., & Theilacker, G. H. (1962). The fatty acid composition of the lipids of some Pacific sardine tissues in relation to ovarian maturation and diet. *Journal of Lipid Research*, 3(1), 60-64.

Lebart, L., and A. Morineau. "Fenelon." (1982).

Lebart, L., Morineau, A., & Casares, N. T. (1982). *Techniques de la description statistique: méthodes et logiciels pour l'analyse des grands tableaux*;

Lee, K. H; Qi, G. H; Sim, J. S., 1995. Metabolizable energy and amino acid availability of full-fat seeds, meals, and oils of flax and canola. *Poult Sci.*, 74 (8): 1341-1348

Lehodey P, Alheit J, Barange M, Baumgartner T, Beaugrand G, Drinkwater K, Fromentin JM, Hare SR, Ottersen G, Perry RI et al (2006) Climate variability, fish, and fisheries. *J Clim* 19: 5009–5030.

Leibold MA (1995) The niche concept revisited: mechanistic models and community context. *Ecology* 76:1371–1382

Leis J. M. , and Carson-Ewart B. M. (2000). ‘The Larvae of Indo-Pacific Coastal Fishes: An Identification Guide to Marine Fish Larvae.’ (Brill: Leiden, The Netherlands.);

Lepri L and Cincinelli A. Enantiomers: TLC separations. In *Encyclopedia of Chromatography*, 3rd edn, Cazes J (ed.). Taylor & Francis: New York, 2010b; 751–753.

Lermusiaux PFJ, Robinson AR (2001) Caratteristiche di variabilità a mesoscala, modelli di circolazione dominanti e dinamica nel Canale di Sicilia. *Profondo-Sea Res I* 48: 1953-1997.

Levi, D., Andreoli, M.G., Arneri, E., Giannetti, G. and Rizzo, P. (1994) Otolith reading as a tool for stock identification. *Fish. Res.* 20:97–107.

Li Z., Korzh V. & Gong Z. (2007) Localized rbp4 expression in the yolk syncytial layer plays a role in yolk cell extension and early liver development. *BMC Developmental Biology* 7, 117 doi:10.1186/1471-213X-7-117.

Liu, S. L., Jiang, X. L., Hu, X. K., Gong, J., Hwang, H. M., and Mai, K. S., 2004. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904). *Aquaculture Research*, 35: 678-682.

Liu, Y., Wang, J., Wei, Y., Zhang, H., Xu, M., & Dai, J. (2008). Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver. *Aquatic toxicology*, 89(4), 242-250.

Lleonart, J., Maynou, F., 2003. Fish Stock assessments in the Mediterranean: State of the art. *Scientia Marina* 67S1, 37–49.

Lloret, J., Palomera, I., Salat, J. & Sole, I. (2004). Impact of freshwater input and wind on landings of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) in shelf waters surrounding the Ebre (Ebro) River delta (north-western Mediterranean). *Fisheries Oceanography* 13, 102–110.

Magazzù G., Bruni V., Piccioni A., Platt T., Iwin B. & Subba Rao v.- 1983- Picoplankton: contribution to phytoplankton production in the Straits of Messina. Fifth Conference of the European Soc. for comparative Physiol. And Biochem. Int. Symp. On Physiological and Biochemical Aspects of Marine Biology. Taormina, September 5-8, 27-28

Magnadottir, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine biotechnology*, 12(4), 361-379.

Magoulas, A., Castilho, R., Caetano, S., Marcato, S. and Patarnello, T. (2006) Mitochondrial DNA reveals a mosaic pattern of phylogeographical structure in Atlantic and Mediterranean populations of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39:734–746

Malagoli D, Casarini L, Sacchi S, Ottaviani E. Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology* 2007;23: 171e7.

Malanotte-Rizzoli, P., Manca, B. B., d'Alcala, M. R., Theocharis, A., Brenner, S., Budillon, G., & Ozsoy, E. (1999). The Eastern Mediterranean in the 80s and in the 90s: the big transition in the intermediate and deep circulations. *Dynamics of Atmospheres and Oceans*, 29(2), 365-395.

Manzella G.M.R., Gasparini G.P. & Astraldi M., (1988) - Water exchange between the Eastern and Western Mediterranean through the Strait of Sicily. *Deep-Sea Res.* 35:1021-1035.

Maravelias, Christos D. "Habitat selection and clustering of a pelagic fish: effects of topography and bathymetry on species dynamics." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56.3 (1999): 437-450.

Marcus L. F., 1990 - Traditional morphometrics. In Rohlf, F. J., & Bookstein, F. L. (1990). *Proceedings of the Michigan morphometrics workshop*. University of Michigan Museum of Zoology.

Martello LB, Friedman CS, Tjeerdema RS. Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on phagocytic and chemotactic function in two species of abalone. *Aquatic Toxicology* 2000; 49:213e25.

Martens J and Bhushan R. TLC enantiomeric separation of amino acids. *International Journal of Peptide Protein Research* 1989; 34: 433–444

Matozzo V, Monari M, Foschi J, Papi T, Cattani O, Marin GM. Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina* I. Effects on immune responses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2005;325:163e74.

Matozzo V, Monari M, Foschi J, Serrazanetti GP, Cattani O, Marin GM. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses. *Marine Biology* 2007;151:1051e8.

Matthew CK, and Van Holde KE. *Biochemistry*, 2nd Benjamin-Cummings:MenloParck,CA,1995;129-214.

Maurs M, Trigalo F and Azerad R. Resolution of α -substituted amino acid enantiomers by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of o-phthalaldehyde. Application to Glutamic acid analogues. *Journal of Chromatography A* 1988; 440: 209–215.

Mazzola S., García A., García Lafuente J., 2002. The Sicilian Channel anchovy fishery and the underlying oceanographic and biological processes conditioning their interannual fluctuations. DGXIV MED 98/070 Final Report.

Meltzer N.M, G.I. Tous, S. Gruber, S. Stein *Anal. Biochem.*, 160 (1987), p. 356

Merino, M., & Monreal-Gómez, M. A. (2009). Ocean currents and their impact on marine life. *Marine Ecology. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, 1, 52-47.

Mommsen, T. P. (2001). Paradigms of growth in fish. *Comparative biochemistry and physiology part B: Biochemistry and molecular biology*, 129(2), 207-219.

Mommsen, T. P., French, C. J., & Hochachka, P. W. (1980). Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon. *Canadian Journal of Zoology*, 58(10), 1785-1799.

Monari M, Matozzo V, Foschi J, Cattani O, Serrazanetti GP, Marin GM. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish & Shellfish Immunology* 2007;22:98e114.

Montero-Serra I, Edwards M, Genner MJ (2015) Warming shelf seas drive the subtropicalization of European pelagic fish communities. *Glob Change Biol.* 21: 144–153.

Moore, S., Stein, A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. (1954) *The Journal of biological chemistry*, 211 (2), pp. 907-913.

Motos, L. (1996). Reproductive biology and fecundity of the Bay of Biscay anchovy population (*Engraulis encrasicolus* L.). *Scientia Marina*, 60(2), 195-207.

Mugiya Y., 1987. Phase difference between calcification and organic matrix formation in the diurnal growth of otoliths in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish. Bull. US* 85, 395±401
Gauldie et al., 1995

Mydlarz LD, Harvell CD. Peroxidase activity and inducibility in the sea fan coral exposed to a fungal pathogen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 2007;146:54e62.

Navarro, J. C., McEvoy, L. A., Amat, F. & Sargent, J. R. (1995). Effects of diet on fatty acid composition of body zones in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax*: a chemometric study. *Marine Biology* 125, 177–183.

Nevárez-Martinez, M. O., Lluch-Belda, D., Cisneros-Mata, M. A., Santos-Molina, J. P., De los Angeles Martinez-Zavala, M., & Lluch-Cota, S. E. (2001). Distribution and abundance of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) in the Gulf of California and their relation with the environment. *Progress in Oceanography*, 49(1), 565-580.

Olita, A., Sorgente, R., Natale, S., Ribotti, A., Bonanno, A., & Patti, B. (2007). Effects of the 2003 European heatwave on the Central Mediterranean Sea: surface fluxes and the dynamical response. *Ocean Science*, 3(2), 273-289.

Ottaviani, E., 1984. Composition of the serum haemolymph of *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78B: 227-239.

Ozols, J. (1990). Amino acid anaLysis. *Methods in enzymology*, 182, 587-601.

Packard, T. T., Berdalet, E., Blasco, D., Roy, S. O., St-Amand, L., Lagacé, B., Lee, K. and Gagné, J. P. (1996) Oxygen consumption in the marine bacterium *Pseudomonas nautica* predicted from ETS activity and bisulfate enzyme kinetics. *J. Plankton Res.*, 18, 1819–1835.

Painting, S. J., Hutchings, L., Hugger, J. A., Korrubel, J. L., Richardson, A. J. & Verheye, H. M. (1998). Environmental and biological monitoring for forecasting anchovy recruitment in the southern Benguela upwelling region. *Fisheries Oceanography* 7, 364–374.

Palomera, I., 1992. Spawning of anchovy *Engraulis encrasicolus* in the North Western Mediterranean relative to hydrographic features in the region. *Marine Ecology Progress Series* 79, 215–223.

Palomera, I., Olivar, M. P., Salat, J., Sabatés, A., Coll, M., García, A., & Morales-Nin, B. (2007). Small pelagic fish in the NW Mediterranean Sea: an ecological review. *Progress in Oceanography*, 74(2), 377-396.

Palomera, I., Olivar, M.P., 1996. Nearshore ichthyoplankton off the Costa Brava (Northwest Mediterranean). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 22, 71–76.

Palomera, I., Rubie's, P., 1979. Ichthyoplankton de la mer Catalane. Larves de poissons récoltées sur des stations fixes devant Barcelona au cours d'un cycle annuel (1975–1976). *Rapports et Procès-verbaux des Réunions, Commission Internationale Exploration Scientifique Mer Méditerranée*, 25/26, pp 201–206.

Pampanin DM, Ballarin L, Carotenuto L, Marin GM. Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* haemocytes: effects on haematocrit, adhesion, phagocytosis and enzyme contents. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 2002;131:605e14.

Pannella G., 1971. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science* 173, 124-1127.

Papadoyannis IN and Theodoridis GA. Amino acids: analysis by HPLC: an introduction. In *Encyclopedia of Chromatography*, 3rd edn, Cazes J(ed.). Taylor & Francis: New York, 2010; 68–74.

Parry, H. E., & Pipe, R. K. (2004). Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic toxicology*, 69(4), 311-325.

Patti, B., Bonanno, A., Basilone, G. et al. (2004) Interannual fluctuations in acoustic biomass estimates and in landings of small pelagic fish populations in relation to hydrology in the Strait of Sicily. *Chem. Ecol.* 20:365–375.

Patti, B., Bonanno, A., Basilone, G. et al. (2004) Interannual fluctuations in acoustic biomass estimates and in landings of small pelagic fish populations in relation to hydrology in the Strait of Sicily. *Chem. Ecol.* 20:365–375.

- Peck MA, Reglero P, Takahashi M, Catalán IA (2013) Life cycle ecophysiology of small pelagic fish and climate-driven changes in populations. *Prog Oceanogr* 116: 220–245.
- Pereira JOB, Reis-Henriques MA, Sánchez JL, Costa JM (1998) Effect of protein source on the reproductive performance of female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac Res* 29:751–760
- Peterman, M. R. & Bradford, M. J. (1987). Wind speed and mortality rate of a marine fish, the northern anchovy (*Engraulis mordax*). *Science* 235, 354–356.
- Piccioni A., Gabriele M., Salusti E., Zambianchi E., 1988. Wind-induced upwellings off the southern coast of Sicily. *Oceanol. Acta* 11, 309-314.
- Pikitch EK, Rountos KJ, Essington TE, Santora C, Pauly D, Watson R, Sumaila UR, Boersma PD, Boyd IL, Conover DO et al. (2014) The global contribution of forage fish to marine fisheries and ecosystems. *Fish Fish* 15: 43–64
- Pipe RK, Coles JA, Carissan FMM, Ramanathan K. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 1999;
- Pipe, R. K., Porte, C., and Livingstone, D. R., 1993. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and hemolymph of the mussels *Mytilus edulis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 3: 221-233.
- Planque, B., Bellier, E., and Lazure, P. 2007. Modelling potential spawning habitat of sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Bay of Biscay. *Fisheries Oceanography*, 16: 16 –30.
- Platt, C., & Popper, A. N. (1981). Fine structure and function of the ear. In *Hearing and sound communication in fishes* (pp. 3-38). Springer New York.
- Pollar, M., Jaroensutasinee, M. and Jaroensutasinee, K. (2007) Morphometric analysis of *Tor tambroides* by stepwise discriminant and neural network analysis. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 9:111–115.
- Power, M. (1997). Assessing the effects of environmental stressors on fish populations. *Aquatic Toxicology*, 39(2), 151-169.

Prouzet P., Metzals-Sebedio K. I. Population structure and reproductive biology. Stock discrimination studies using morphometric and genetic data. In: Cendrero O., editor. Improvement of Stock Assessment by Direct Methods, its Application to the Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Bay of Biscay. Final Report of the EC FAR Project 1991–1993, Contract No. MA 2495 EF (mimeo); 1994. p. 44-58.

Quade, M.J., Roth, J.A., 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine

Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I., & Olsen, Y. (1997). The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155(1), 103-115.

Ré, P. (1986). Sobre a identificação dos primeiros estados

Ré, P. (1999). Ictioplâncton estuarino da Península Ibérica

Ré, P., Meneses, I., (2009). Early stages of marine fishes occurring in the Iberian peninsula. IPMAR/IMAR, 282 pp.

Reyment R. A., 1991 - Multidimensional paleobiology. Pergamon

Reyment, Richard ARA. *Multidimensional palaeobiology*. No. 56: 57 REY. 1991;

Rice, J., 1995. Food web theory, marine food webs and what climate changes may do to northern marine fish populations. In: Beamish,

Richards W. J. (2006). 'Early Stages of Atlantic Fishes: An Identification Guide for Western Central North Atlantic.' (Taylor and Francis: Boca Raton, FL.);

Rigas, Pantelis G. "tecniche di etichettatura post-colonna in analisi degli amminoacidi mediante cromatografia liquida". *analitica e chimica bioanalytical* 405,25 (2013): 7957-7992.

Riveiro, I., Guisand, C., Franco, C., Lago do Lanzós, A., Maneiro, I., Vergara, A.R., 2003. Egg and larval amino acid composition as indicators of niche resource partitioning in pelagic fish species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 260, 255–262.

Riveiro, I., Guisande, C., Iglesias, P., Basilone, G., Cuttitta, A., Giráldez, A., ... & Maneiro, I. (2011). Identification of subpopulations in pelagic marine fish species using amino acid composition. *Hydrobiologia*, 670(1), 189-199.

Robinson A. R., Sellschopp J., Warn-Varnas A., Leslie W. G., Lozano C. J., Haley P. J., Anderson L. A. & Lermusiaux P.F J., (1999) - The Atlantic Ionian Stream. *Journal of Marine Systems* 20: 113-128.

Roch P (1999) Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125 – 145.

Rodríguez, Alejandro, M. Esteban, and José Meseguer. "Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) Leucocytes in response to yeast cells." *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 272.1 (2003): 415-423

Rodríguez, J.M. – 1990. Contribución al conocimiento del ictioplancton del mar de Alborán. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 6: 1-20.

Rodríguez, J.M. and J.P. Rubín. – 1986. The sardine and anchovy ichthyoplankton captured in nine fixed stations located at the Bay of Málaga from May to December of 1977. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, 30, 2

Ronnestad I., Koven W.M., Tandler A., Harel M. & Fyhn H.J. (1994) Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Marine Biology* 120, 187-196.

Ross NW, Firth KJ, Wang A, Burka JF, Johnson SC. (2000). Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Dis Aquat Organ* 41, 43–51.

Roy, K., Ivana, L., & Imbalzano, A. N. (2002). The myogenic basic helix-loop-helix family of transcription factors shows similar requirements for SWI/SNF chromatin remodeling enzymes during muscle differentiation in culture. *Journal of Biological Chemistry*, 277, .

Russell, F.S. (1976) *The Eggs and Planktonic Stages of British Marine Fishes*. London: Academic Press, 524 p.

Russell, F.S., (1976). *The eggs and planktonic stages of british marine fishes*. Academic Press, London, UK, 524 pp

Sabatés, A., Olivar, M. P., Salat, J., Palomera, I., & Alemany, F. (2007). Physical and biological processes controlling the distribution of fish larvae in the NW Mediterranean. *Progress in Oceanography*, 74(2), 355-376.

Sammari C, Millot C, Taupier-létage I, Stefani A, Brahim M (1999) caratteristiche idrologiche nella zona Tunisia-Sardegna-Sicilia durante la primavera del 1995 *Profondo-Sea Res I* 46: 1671-1703

Sammari, C., Millot, C., Taupier Letage, I., Stefani, A., Brahim, M., 1999. Hydrological characteristics in the Tunisia–Sardinia–Sicily area during spring 1995. *Deep-Sea Res. I* 46, 1671–1703

Santos MB, González-Quirós R, Riveiro I, Iglesias M, Louzao M, Pierce GJ (2013) Characterization of the pelagic fish community of the north-western and northern Spanish shelf waters. *J Fish Biol* 83: 716–738.

Sawant, P. B., & Raje, S. G. (2009). Morphometry and length weight relationship of the Catfishes *Arius caelatus* (Valenciennes, 1840) and *Arius thalassinus* (Ruppell, 1837) off Mumbai, Veraval and Vishakhapatnam coasts. *Asian Fisheries Science*, 22(1), 215-228.

Shamushaki VAJ, Kasumyan AO, Abedian A, Abtahi B (2007) Behavioural responses of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) juveniles to free amino acid solutions. *Mar Fresh Behav Physiol* 40:219–224

Shevchenko, N.F. (1980) Geographical changing of anchovy *Engraulis encrasicolus* (L.) in the Mediterranean basin (in Russian). *Ichthyol. J.* 20:20–30

SHEVCHENKO, N.F. 1980. Geographical changing of anchovy *Engraulis encrasicolus* (L.) in the Mediterranean basin (in Russian). *Ichthyol. J.*, 20(1/120):20-30

Silverman LM and Christenson, RH. Amino acids and proteins. In *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 4th edn, Burtis CA, Ashwood ER (eds). W. B. Saunders: Philadelphia, PA, 1996.

Silversand C, Norberg B, Haux C (1996) Fatty-acid composition of ovulated egg from wild and cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to yolk and oil globule lipids. *Mar Biol* 125:269–278

Somarakis, S. and Nikolioudakis, N. (2007) Oceanographic habitat, growth and mortality of larval anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the northern Aegean Sea (eastern Mediterranean). *Mar. Biol.* 152:1143–1158.

Somarakis, S., Palomera, I., Garcia, A. et al. (2004) Daily egg production of anchovy in European waters. *ICES J. Mar. Sci.* 61:944–958.

Stoney Simons S., , David F Jr.. Johnson The structure of the fluorescent adduct formed in reaction of o-PhthAlaldehyde and thiols with amines. *Journal of the American Chemical Society* October 27, 1976 98:22.

Sturges, H. A. (1926). The choice of a class interVal. *Journal of the American Statistical Association*, 21(153), 65-66.

Sturges, Herbert A. "The choice of a class interVal." *Journal of the American Statistical Association* 21.153 (1926): 65-66;

Tikhonova, I., O. Arino, G. Ivanitskii, H. Malchow and A. Medvinskii, 2000. The dependence of fish school movement and plankton spatial distributions on the phytoplankton growth rate. *Biofizika* 45: 352–359.

Tortonese E., 1967. Differenziazioni infraspecifiche nelle acciughe (*Engraulis encrasicolus* L., Pisces, Clupeiformes) della Sicilia Orientale. *Atti. Accad. Gioenia, Catania* 34: 58-65

Traina, A., Basilone, G., Saborido-Rey, F. et al. (2011) Assessing population structure of European Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Central Mediterranean by means of traditional morphometry. *Adv. Oceanogr. Limnol.* 2:141–153

Tranter D.J., 1974. Zooplankton sampling. UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology.

Tsai, C. F., Chen, P. Y., Chen, C. P., Lee, M. A., Shiah, G. Y. & Lee, K. T. (1997). Fluctuation in abundance of larval anchovy environmental conditions in coastal waters off south-western Taiwan as associated with the El Niño-Southern Oscillation. *Fisheries Oceanography* 6, 238–249.

Tudela, S. (1999) Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Fish. Res.* 42:229–243.

Tudela, S. (1999) Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Fish. Res.* 42:229–243

Torres JJ, Somero GN. 1988-a. Metabolism, enzymic activities and cold adaptation in Antarctic mesopelagic fishes. *Mar. Biol.* 98:169–80

Torres JJ, Somero GN. 1988-b. Vertical distribution and metabolism in Antarctic mesopelagic fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B* 90:521–28

Twatwa, N., van der Lingen, C. D., Drapeau, L., Moloney, C., and Field, J. E. 2005. Characterising and comparing the spawning habitats of anchovy *Engraulis encrasicolus* and sardine *Sardinops sagax* in the southern Benguela upwelling ecosystem. *African Journal of Marine Science*, 27: 487 –499

Valde's, E.S., Shelton, P.A., Armstrong, M.J., Field, J.G., 1987. Cannibalism in South African anchovy: egg mortality and egg consumption rates. In: Payne, A.I.L., Gulland, J.A., Brink, K.H. (Eds.), *The Benguela and Comparable Ecosystems*. *South African Journal of Marine Science*, 5, 613–622.

Valdés Seinfeld, E. S. 1991. Cannibalism and intraguild predation in clupeoids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 79: 17–26.

Van der Lingen C.D., Bertrand A., Bode A., Brodeur R., Cubillos L., Espinoza P., Friedland K., Garrido S., Irigoien X., Möllman C., Rodriguez-Sanchez R., Tanaka H., Temming A. 2009. Trophic dynamics. In: Checkley D.M., Roy C., Alheit J., Oozeki Y. (eds), *Climate change and small pelagic fish*. GLOBEC Project Office, Plymouth (UK): 112-157.

Van der Lingen C.D., Hutchings L., Field J.G. 2006. Comparative trophodynamics of anchovy *Engraulis encrasicolus* and sardine *Sardinops sagax* in the southern Benguela: are species alternations between small pelagic fish trophodynamically mediated *Afr. J. Mar. Sci.* 29 (3 and 4): 465-477.

Van der Lingen, C. D., Hutchings, L., Merkle, D., Van der Westhuizen, J. J., & Nelson, J. (2001). Comparative spawning habitats of anchovy (*Engraulis capensis*) and sardine (*Sardinops sagax*) in the southern Benguela upwelling ecosystem. *Spatial processes and management of marine populations*, 185-209.

Vandooren, J., Geurts, N., Martens, E., Van den Steen, P. E., & Opdenakker, G. (2013). Zymography Methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods*, 10(3), 211-220.

Vandooren, J., Geurts, N., Martens, E., Van den Steen, P. E., & Opdenakker, G. (2013). Zymography Methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods*, 10 (3), 211-220.

Varagnolo S. (1965) Alcune osservazioni sulla distribuzione delle uova galleggianti di Teleostei nell'Alto Adriatico. *Boll. Zool.* 32 (2): 849-858

Varagnolo, Sergio. Osservazioni sulla riproduzione dell' *Engraulis encrasicolus* L.(Acciuga) dell'alto Adriatico. *Jugoslavenskamminoacidikademijanauka i umjetnosti*, 1969.

Vetter R.D., Hodson R.E. & Arnold C. (1983) Energy metabolism in a rapidly developing marine fish egg, the red drum (*Sciaenops ocellata*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40,627-634.

Vinas, J., Sanz, N., Peñarrubia, L. et al. (2014) Genetic population structure of European anchovy in the Mediterranean Sea and the Northeast Atlantic Ocean using sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *ICES J. Mar. Sci.* 71:391–397.

Wang F, Yang H, Gao F, Liu G. Immune condition of *Apostichopus japonicus* during aestivation. *Aquaculture* 2008 a ;285:238-43.

Wang F, Yang H, Gao F, Liu G. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 2008 b;151:491-8.

William H. Kruskal and W. Allen Wallis. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47 (260): 583–621, December 1952.

Wilson, R. P., & Halver, J. E. (1986). Protein and amino acid requirements of fishes. *Annual Review of Nutrition*, 6(1), 225-244.

Wilson RP (2002) Amino acids and proteins. In: Halver JE, Hardy RW (eds) Fish nutrition. Elsevier Science, San Diego, pp 144–179

Yancey PH (2001a) Nitrogen compounds as osmolytes. In: Wright PA, Anderson AJ (eds) Nitrogen excretion. Fish physiology, vol 20. Academic Press, San Diego, pp 309–341

Yancey PH (2001b) Water stress, osmolytes and proteins. *Am Zool* 41:699–709

Winans, G. A. (1984). Multivariate morphometric variability in Pacific salmon: technical demonstration. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41(8), 1150-1159.

Wootton EC, Dyrzynda EA, Pipe RK, Ratcliffe NA. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology* 2003;65:13e25.

Wu G (1998) Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr* 128:1249–1252

Xue, Q., and Renault, T., 2000. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76: 155-163.

Zahradnicková H, Hartvich P, Simek P and Husek P. Gas chromatographic analysis of amino acid enantiomers in Carbetocin peptide hydrolysates after derivatization with pentafluoropropyl chloroformate. *Amino Acids* 2008; 35: 445–450

Zenitani, Y., Inari, K., Sahoda, S., Uehara, M., Akimitsu, J., Kubota, N., & Ayabe, M. (1995). Superconductivity in $(\text{Ca}, \text{Na})_2\text{CaCu}_2\text{O}_{4-x}\text{Cl}_x$ The new simplest double-layer cuprate with apical chlorine. *Physica C: Superconductivity*, 248(1), 167-170.

Zhang, W., Trachootham, D., Liu, J., Chen, G., Pelicano, H., Garcia-Prieto, C., ... & Keating, M. J. (2012). Stromal control of cystine metabolism promotes cancer cell survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature cell biology*, 14(3), 276-286.

Zumwalt R.W., Absheer J.S., KaiSer F.E, Gehrke C.W. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70 (1987), p. 147

Wolcott T.G. 1973. Physiological ecology and intertidal zonation in limpets (Acmaea): a critical look at 'limiting factors.' Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole 145:389–422