

LARVE PLEROCERCOIDI DI *GYMNORHYNCHUS* (*CESTODA: TRYPANORHYNCHA*) IN *LEPIDOPUS CAUDATUS*: INTERFERENZA NELLA DETERMINAZIONE DI TMA-N E AVBT

PLEROCERCROID GYMNORHYNCHUS (CESTODA: TRYPANORHYNCHA) IN LEPIDOPUS CAUDATUS: INTERFERENCE ON TMA-N AND TVB-N DETERMINATION

Panebianco A., Signorino D., Muscolino D., Giarratana F.
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria – Università di Messina

SUMMARY

Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) and Trimethylamine Nitrogen (TMA-N) are the most important freshness indicators in fish. The present report demonstrates that the *Gymnorhynchus gigas* plerocercoid may interfere on TVB-N and TMA-N determination. The study was carried-out on 101 samples: 37 Mp (muscle portions around the parasite), 32 P (larvae of *Gymnorhynchus gigas* extracted from muscle) and 32 Mnp (muscle portions parasite-free), obtained from 10 specimens of *Lepidopus caudatus* kept at several temperature for different time. The TVB-N and TMA-N contents of each sample were measured using the Conway microdiffusion method. Statistically significant differences ($p < 0.05$) between Mp and Mnp for TMA-N were found from 24h of storage at 4 and 15°C. No significant differences ($p < 0.05$) between Mp and Mnp for TVB-N were observed from 48h of storage at 4 and 15°C. TVB-N and TMA-N content was variable in larvae.

KEYWORDS

TVB-N, TMA-N, fish, muscle parasite.

INTRODUZIONE

I valori di trimetilammina-azoto (TMA-N) e di Azoto Volatile Basico Totale (AVBT) sono importanti indicatori analitici dello stato qualitativo del pesce.

La TMA-N, sostanza responsabile del tipico odore di “stantio” del pesce, si forma in corso di refrigerazione a partire dall’ossido di trimetilammina (TMA-O) ad opera di batteri psicrotrofi, come *Shewanella spp.* e *Photobacterium spp.* considerati i più importanti Specific Spoilage Organism (SSOs). Tali microrganismi, in condizioni di anaerobiosi, utilizzano la TMA-O come accettore di elettroni per il loro metabolismo ossidativo, determinando la formazione di TMA-N (1, 2).

L’AVBT, universalmente indicato con l’acronimo anglosassone TVB-N, è invece un parametro aspecifico, in quanto costituito dalle varie fra-

zioni azotate (ammoniaca, trimetilammina, aminoacidi, ecc.) che durante lo stoccaggio del pesce si formano prevalentemente ad opera di enzimi tissutali autoctoni ed in misura minore di origine microbica.

Già il D. Lgs. n° 531 del 30/12/1992 al cap.V dell’allegato, proponeva tali parametri quali indicatori chimici di freschezza utilizzabili nel caso in cui l’esame organolettico avesse suscitato dubbi.

Attualmente nel Reg. CE 853/04, il Legislatore ha previsto che “i prodotti della pesca non trasformati non devono essere immessi sul mercato se le analisi chimiche rivelano che i limiti relativi all’ABTV o al TMA-N sono stati superati”. Questi ultimi figurano nel successivo Reg. CE 2074/05, limitatamente all’AVBT per alcune specie ittiche.

In effetti, le difficoltà nell’individuazione di limiti per l’AVBT nascono dalle notevoli variabi-

lità inter e intraspecifiche verosimilmente correlate all'alimentazione dei pesci, alla struttura e composizione chimica della loro muscolatura e al loro corredo enzimatico muscolare e intestinale, e chissà cos'altro ancora. Lo stesso dicasi per la TMA-N laddove anche le caratteristiche microbiologiche delle acque di provenienza, il sistema e la zona di pesca e non ultimo lo stato sanitario, possono essere, logicamente, fonti di variabilità anche intraspecifica. A tal proposito, è noto da tempo come, alcuni pesci, quali *Lepidopus caudatus* e *Brama raji*, allorché massivamente infestati a livello della muscolatura da larve di Cestodi del genere *Gymnorhynchus*, subiscono modificazioni dei caratteri organolettici durante la conservazione molto più velocemente rispetto a soggetti non infestati (3,4).

Per quanto sin qui ricordato ci è sembrato interessante valutare l'eventuale interferenza delle localizzazioni di larve di *Gymnorhynchus spp.*, nella determinazione della TMA-N e AVBT nella muscolatura di *Lepidopus caudatus*.

MATERIALI E METODI

Per la presente indagine sono stati utilizzati 10 esemplari di *Lepidopus caudatus*, pescati con palangari nelle acque antistanti la città di Messina. Gli esemplari venivano prelevati e trasportati a temperatura di refrigerazione presso i nostri laboratori.

I 10 esemplari venivano condizionati a differenti temperature ed esaminati a 0, 24 e 48 ore, come di seguito riportato:

- 2 esemplari ad ora 0;
- 2 esemplari a 4°C per 24 ore;
- 2 esemplari a 15° C per 24 ore;
- 2 esemplari a 4° C per 48 ore;
- 2 esemplari a 15° C per 48 ore.

Al momento della processazione, i pesci venivano sfilettati al fine di evidenziare le localizzazioni parassitarie che si rivelavano presenti in tutti gli esemplari. Non si procedeva ad identificazione microscopica delle larve, considerata la nota, assoluta, prevalenza di *Gymnorhynchus spp.* in *Lepidopus caudatus* nell'ambito dei macroparassiti muscolari, non disgiunta dalle caratteristiche macroscopiche delle localizzazioni e delle larve.

Da ogni esemplare si procedeva al prelievo dei seguenti campioni:

- Mp: porzione di muscolatura immediatamente circostante la localizzazione parassitaria (1 grammo);
- P: larva/e estratta/e dalla porzione di muscolatura parassitata;
- Mnp: porzione di muscolatura non infestata, prelevata ad almeno 5 cm di distanza dalle localizzazioni parassitarie (1 grammo).

Si otteneva così un totale di 101 campioni costituito da 37 Mp, da 32 Mnp e da 32 P come specificato nella Tabella 1.

Ogni campione veniva preliminarmente tritato, pesato con bilancia di precisione Precisa A180 (d= 0,0001) ed omogeneizzato con 4 ml di acido tricloroacetico (TCA) (Carlo Erba) al 4% in soluzione acquosa, ed infine centrifugato a 3000 rpm per 10 minuti.

La valutazione di TVB-N e di TMA-N veniva effettuata con il metodo della microdiffusione con cella Conway, secondo quanto descritto da Mahmud et al (2007).

La scelta della microdiffusione, che il Reg. CE 2074/05 riporta tra i metodi applicabili, rispetto a quello di riferimento della stessa norma (distillazione in corrente di vapore su 10 gr di muscolatura), è dettata dalla capacità di tale metodica di lavorare anche su piccoli quantitativi di muscolatura (anche < 1 gr), vista la nostra necessità di processare porzioni esigue di muscolatura e soprattutto degli stessi parassiti.

La titolazione veniva effettuata con HCl 0,01 N (Carlo Erba) con microburetta (precisione 1 µl), dopo incubazione a 40° C per 1h.

RISULTATI

I valori dell'AVBT (Tabella 2) mostrano una differenza significativa tra i campioni di muscolatura saggiati (Mp e Mnp), che perde significatività a partire dalle 48 ore limitatamente ai pesci incubati a 15° C. I parassiti presentano valori estremamente variabili, con valori medi quasi sempre al di sotto di quelli della muscolatura non parassitata.

I dati relativi alla TMA-N dei campioni muscolari (Tabella 3) evidenziano una differenza significativa a partire dalle 24 ore di conservazione, sia a 4° che a 15° C. Le larve dei cestodi, anche nel caso della TMA-N, mostrano una certa variabilità, con valori medi superiori sia alla muscolatura sana che a quella parassitata.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I più alti valori di AVBT nella muscolatura parassitata rispetto a quella indenne possono essere verosimilmente correlati ai processi involutivi tissutali indotti dall'azione compressiva del parassita, dalla flogosi e dai disturbi di circolo conseguenti. Altrettanto importanti potrebbero risultare sia l'attivazione di proteasi endogene in seguito alla lisi delle fibrocellule muscolari causate dal parassita, che la nota attività proteolitica di tipo collagenasico, delle larve stesse (6, 7). Detta attività proteolitica delle larve di *Gymnorhynchus gigas* da studi condotti da Giuffrida et al (2002) appare elevata all'ora 0

riducendosi notevolmente dopo 5 giorni. Tale dato risulta in accordo con quanto da noi osservato alle 48 ore a 15°C, in cui si evidenziava una perdita di significatività tra i differenti valori di AVBT di Mp e di Mnp, correlabili sia alla progressiva diminuzione dell'attività proteolitica dei parassiti che all'incremento di quella tissutale.

L'estrema variabilità dei valori di AVBT, riscontrati nelle larve, non ci pare possa essere spiegata se non pensando a diversità biologiche (età, dimensione, stato di vitalità).

Nel caso della trimetilammina, invece, l'accertata variabilità crediamo possa essere influenzata dalla nota presenza di batteri nella cuticola o all'interno del corpo larvale. Al riguardo, Panebianco et al (1997) hanno isolato da larve di *Gymnorhynchus gigas* diversi batteri Gram negativi, sia patogeni (*Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis*) che alteranti (*Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Erwinia* sp.) pienamente appartenenti agli SSOs responsabili della formazione di TMA-N. Peraltro, la stessa loro moltiplicazione potrebbe essere favorita dalla presenza all'interno delle larve, di sostanze inibenti naturali, ovviamente più attive verso i Gram positivi (9).

La presenza di batteri sulla cuticola e all'interno del corpo rende dunque la presenza larvale pregiudizievole non solo nel contesto della localizzazione ma anche durante le fasi di migrazione (8).

Tali considerazioni sono in accordo con quanto emerso dall'elaborazione statistica dei nostri dati relativi alla TMA-N del muscolo parassitato e di quello sano. Si osserva, infatti, una differenza significativa solo a partire dalla 24ma ora di conservazione correlabile, verosimilmente, ad una moltiplicazione batterica.

Alla luce di quanto osservato e considerato che le larve di *Gymnorhynchus* spp., specie se giovani, sono caratterizzate da un colorito pressoché indistinguibile da quello della muscolatura di *Lepidopus caudatus*, è presumibile che la loro involontaria processazione possa interferire nella quantizzazione analitica di AVBT e di TMA-N, specie laddove si operi su piccole quantità.

BIBLIOGRAFIA

1. Gram L., Trolle G., Huss H.H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 4, 65-72.
2. Dalgaard P., Gram L., Huss H.H. (1993). Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 19, 283-294.
3. Panebianco F. (1952). Brama raji (BI.). *Biologia, Caratteri morfologici e strutturali, metodi di pesca, parassitosi, linea di condotta nella i. c.*. Il Progresso Veterinario anno VII n° 8, 277-281.
4. Panebianco F. (1953). *Lepidopus caudatus* (Euphr). *Biologia, Caratteri morfologici e strutturali, metodi di pesca, parassitosi, linea di condotta nella i. c.*. Il Progresso Veterinario anno VIII n° 2, 65-69.
5. Mahmud M.M., Hossain M.A., Ahani. J., Banerjee P., Rahaman M.A. (2007). Effect of delayed icing on the quality characteristics of Bagda (*Peneus monodon* Fabricius, 1798). *International Journal of Sustainable Crop Production* 2(5), 24-30.
6. Vazquez-Lopez C., Gimenez-Pardo C., Rodriguez-Caabeiro F. (2000). Proteolytic activity of the *Gymnorhynchus gigas* plerocercoid: purification and properties of a collagenase from the crude extract. PMID: 9950230 [PubMed – index for MEDLINE]
7. Giuffrida A., Pennisi L., Bottari T., Panebianco A. (2002). Indagine sull'attività proteolitica di *Gymnorhynchus gigas* e della muscolatura infestata di *Lepidopus caudatus*. *Atti Associazione Italiana Veterinari Igienisti* vol XII, 305-306.
8. Panebianco A., Giuffrida A., Mancuso R. (1997). Isolamento di batteri da larve di *Gymnorhynchus gigas* (Cuvier, 1817). *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie* LI, 759-760
9. Panebianco A., Giuffrida A. (1996). Sul potere antibatterico delle larve di *Anisakis simplex* e *Gymnorhynchus gigas*. Accertamenti preliminari e considerazioni igienico-sanitarie. *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie* vol L, 185-186.