

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA
Corso di laurea Specialistica a Ciclo Unico in
Medicina Veterinaria

Tesi di laurea

Spiaggiamento di massa di 7 capodogli (*Physeter macrocephalus*) sul Gargano. Ruolo del mercurio.

Relatore: Dr. Sandro Mazzariol

Laureanda: Stefania Visin

Matricola: 440888

Anno Accademico 2009-2010

Alla mia meravigliosa famiglia...

INDICE

1. Introduzione	1
1.1. I cetacei nel Mediterraneo: il capodoglio (<i>Physeter macrocephalus</i>).....	1
1.1.1. Descrizione morfologica e peculiarità anatomiche.....	3
1.1.2. Distribuzione nel Mediterraneo	5
1.1.3. Aspetti biologici ed ecologici del capodoglio (<i>Physeter macrocephalus</i>)	7
1.1.3.1. Dieta.....	8
1.1.3.2. Spostamenti.....	9
1.1.4. Filogenesi	10
1.2. Gli spiaggiamenti	11
1.3. Gli spiaggiamenti di capodogli nel Mar Mediterraneo: la situazione in Italia.....	11
1.3.1. Gli spiaggiamenti di massa dei capodogli.....	16
1.3.2. Ruolo dell'uomo negli spiaggiamenti di massa: inquinamento chimico ed acustico	18
1.3.3. Lo spiaggiamento di massa di 7 Capodogli del 12 Dicembre 2009.....	25
2. Scopo	33
3. Materiali e metodi	35
3.1. Campioni inseriti nell'elaborato.....	36
3.2. Protocollo necroscopico.....	38
3.3. Prelievo e conservazione dei campioni.....	43
3.3.1. Istopatologia	43
3.3.2. Citologia	44
3.3.3. Batteriologia	44
3.3.4. Parassitologia.....	44
3.3.5. Tossicologia.....	44
3.4. Valutazione dell'età e del peso	45
3.5. Emboli gassosi e lipidici.....	45

3.6.	Biotossine algali	46
3.7.	Prove biologiche.....	46
3.8.	Preparati istologici: preparazione dei campioni	48
3.8.1.	Riduzione dei preparati	48
3.8.2.	Inclusione in paraffina (processazione).....	48
3.8.3.	Taglio	49
3.8.4.	Colorazione di base con ematosslinina-eosina (EE).....	49
3.9.	Colorazioni specifiche	50
3.10.	Microscopio elettrico a scansione (ESEM)	52
4.	Risultati	55
4.1.	Report necroscopici capodogli	59
4.2.	Rilievi patologici <i>post-mortem</i>	71
4.2.1.	Esami microbiologici, virologici e sierologici	73
4.2.2.	Contenuti stomacali	73
4.2.3.	Emboli gassosi e lipidici	76
4.3.	Biotossine algali	77
4.4.	Esami tossicologici.....	77
4.4.1.	Metalli pesanti	77
4.4.2.	Esami eco-tossicologici.....	90
4.4.3.	Prove biologiche	99
5.	Discussione e conclusione	101
6.	Appendice 1	113
6.1.	Balenottera comune del Mediterraneo (<i>Balaenoptera physalus</i>)	114
6.2.	Grampo (<i>Grampus gryseus</i>)	115
6.3.	Tursiope (<i>Tursiops truncatus</i>).....	118
7.	Appendice 2	121
7.1.	Protocolli per le colorazioni istochimiche.....	121
7.1.1.	Colorazione di Gram	121
7.1.2.	Colorazione di Giemsa.....	122
7.1.3.	Colorazione Pas.....	122
7.1.4.	Colorazione Schmorl (Lipofuscina)	123

7.1.5.	Colorazione Mercurio	124
7.1.6.	Colorazione Sali di Piombo (secondo Lielle)	125
8.	Bibliografia	127
9.	Siti web	138
10.	Ringraziamenti	139



1. Introduzione

1.1. I cetacei nel Mediterraneo: il capodoglio (*Physeter macrocephalus*)

I cetacei sono animali che si sono adattati in maniera unica all'habitat marino in cui vivono che risulta essere a loro particolarmente sfavorevole e difficile. Il mare rappresenta, infatti, un ambiente potenzialmente ostile per i mammiferi a sangue caldo, come sono balene e delfini. La dispersione termica è più veloce che nell'aria, il cibo è spesso reperibile solo a grandi profondità, il mezzo in cui si muovono gli animali presenta concentrazioni di sali particolarmente elevati che determinano

Introduzione

una rilevante disidratazione. I mammiferi marini hanno però evoluto nel corso dei secoli dei meccanismi adattivi che permettono loro di sopravvivere anche in queste condizioni (Evans & Raga, 2001).

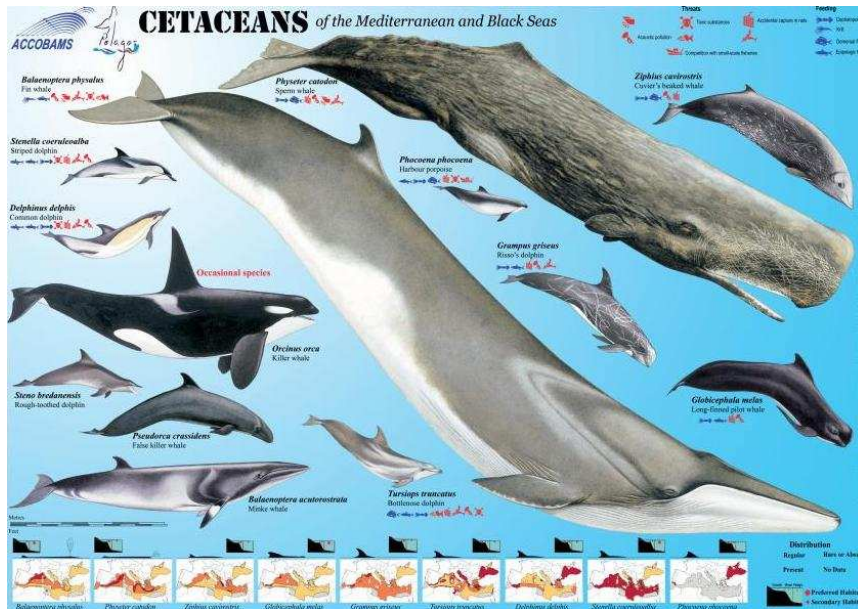


Figura 1: Cetacei presenti nel Mar Mediterraneo e nel Mar Nero (<http://www.accobams.org>)

L'ordine Cetacea comprende circa 85 specie, quasi tutte marine, 24 delle quali sono presenti nel Mar Mediterraneo e nel Mar Nero (**Figura n.1**). Le specie sono suddivise in due sottordini: Mysticeti ed Odontoceti. Esiste un terzo sottordine, Archaeoceti, cui appartengono solo specie estinte. Tra gli odontoceti si trova il capodoglio (*Physeter macrocephalus*) che ha un aspetto inconfondibile.

1.1.1. Descrizione morfologica e peculiarità anatomiche



Figura 2: Il capodoglio

Il capodoglio (*Physeter macrocephalus*) (**Figura n. 2**) ha un corpo molto grande occupato quasi interamente da un capo così importante da costituire quasi un quarto od un terzo dell'intera lunghezza. Ha una forma squadrata e lo sfiatatoio posizionato all'estremità anteriore sinistra. Questo animale non possiede una vera pinna dorsale, ma sul terzo caudale del dorso, sono presenti una serie di escrescenze che la ricordano, infatti quella più grande veniva chiamata 'gobba' dai balenieri e per la sua forma comunemente scambiata per la pinna dorsale.



Figura 3: Pinna caudale di capodoglio
(www.ricercaitaliana.it)

La pinna caudale (**Figura n. 3**) è triangolare ed è molto sottile. Prima di immergersi l'animale la innalza per una notevole altezza sulla superficie dell'acqua. Comunemente nei Cetacei la pinna caudale è costituita da due

Introduzione

lobi di tessuto connettivo, detti *flukes*. A differenza di quella dei pesci, nei Cetacei questa pinna è disposta orizzontalmente e si muove dal basso verso l'alto. Questa caratteristica permette di riconoscere a prima vista un cetaceo da un pesce e la sua funzione è quella di agire da mezzo di propulsione tramite il suo movimento verticale. Anche in questo caso forma e dimensione variano tra le diverse specie e quindi queste caratteristiche possono essere usate per l'identificazione soprattutto delle specie di grandi dimensioni. I denti sono circa 50 in totale, presenti solo nella mandibola. Questa è molto stretta e lunga e ha l'apice molto arretrato rispetto alla punta del capo. I capodogli sono tra i cetacei che mostrano un maggiore dimorfismo sessuale (cioè una grande differenza tra maschi e femmine). I maschi sono generalmente più lunghi del 30-50% rispetto le femmine (16-18 mt contro 12-14 mt) e pesano il doppio (50 tonnellate contro 25) anche se alla nascita sia i maschi che le femmine misurano circa 4 mt di lunghezza e pesano 1 tonnellata.

L'organo dello spermaceti è una caratteristica che rende unici i capodogli. Esso si sviluppa per 25-33% del corpo dell'animale e comprende diversi organi tra cui il cranio, mandibola e passaggio nasale. Lo spermaceti si trova nell'*organo dello spermaceti*, o *cassa*, davanti e sopra al cranio del mammifero, ed anche nella cosiddetta *giunca*, posto rostralmente rispetto al cranio, proprio sopra la mascella superiore. La cassa è formata da una sostanza cerosa biancastra, mentre la giunca è costituita da una sostanza più solida. Esistono diverse teorie riguardo la funzione di questo organo: una di esse, discussa per inciso in *Moby-Dick* da Melville (1851, 443), è che la cassa si trasformi in una sorta di ariete da usare nei combattimenti tra maschi. Un'altra funzione dell' organo dello spermaceti, secondo Carrier et al. 2002, è occuparsi della galleggiabilità durante le immersioni. Prima di immergersi, l'acqua fredda viene trasportata attraverso quest'organo e la cera si solidifica. L'innalzamento della densità specifica genera una spinta verso il basso (equivalente approssimativamente a 40 kg) e consente al mammifero di inabissarsi senza sforzo. Le moderne conoscenze (Norris and Harvey, 1972) ipotizzano che questo organo

Introduzione

potrebbe essere coinvolto nell'ecolocalizzazione per la formazione di suoni (*click*) che si propagano per centinaia di chilometri. Questi sono prodotti facendo passare l'aria attraverso una struttura presente nella testa, simile alla cavità nasale dell'uomo, chiamata "labbra fonico" - *museau du singe* -. Il suono poi passa attraverso l'organo dello spermaceti e si porta alla giunca dove viene trasmesso all'esterno mediante membrane acustiche presenti in essa (Cranford 1999 and Madsen 2002). I *click* prodotti da questi mammiferi marini sembrano avere minore frequenza (kHz) ma essere più potenti (Móhl *et al.* 2000) rispetto agli altri cetacei. Infine Cranford (1999) pone attenzione alla differenza che esiste tra lo spermaceti nel maschio e nella femmina. Nei primi questo organo appare di dimensioni maggiori con più probabilità quindi di produrre suoni intensi. Secondo questi autori tale organo potrebbe rappresentare una selezione sessuale nella grande scala.

1.1.2. Distribuzione nel Mediterraneo

E' possibile estrapolare la distribuzione e la presenza di capodogli nel Mar Mediterraneo dalle cartine sottostanti (**Figura 4**) che danno un'immagine, sulla base degli avvistamenti e delle localizzazioni acustiche, di quali siano le aree in cui si registra la maggior presenza di questa specie (Gannier A. *et al.*, 2002).

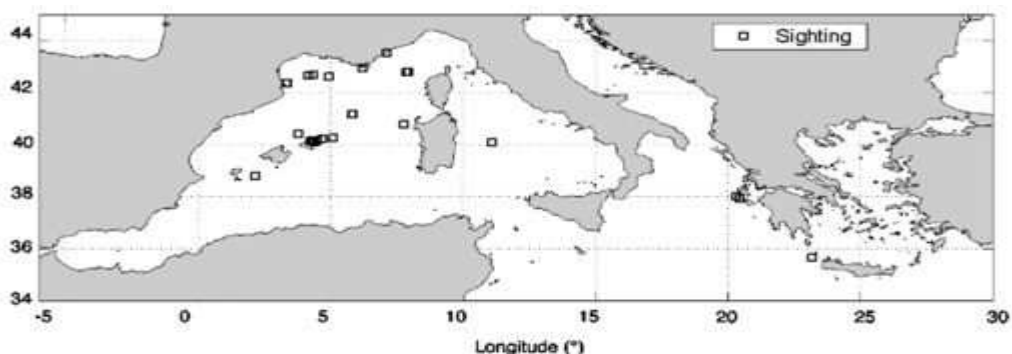


Figura 3: Distribuzione presenza di capodogli Mar Mediterraneo

Introduzione

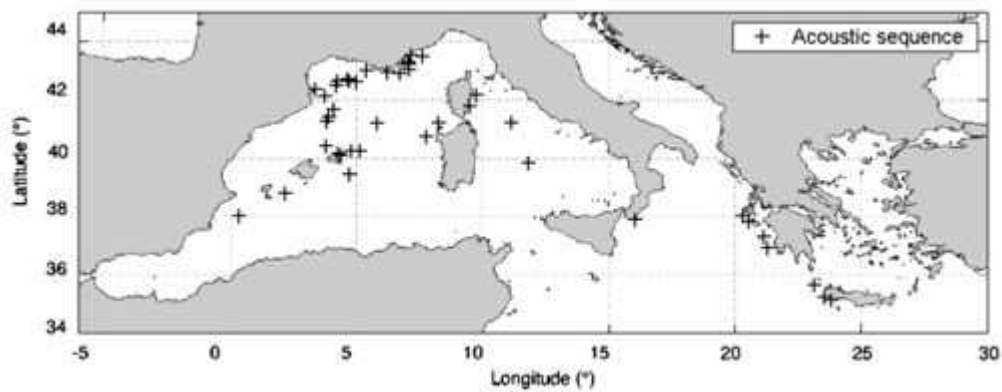


Figura 4: Distribuzione presenza di capodogli nel Mar Mediterraneo

Si riporta di seguito (**Figura n. 5**) la cartina, tratta da un documento della IUCN (International Union for Conservation of Nature), sulla presenza dei cetacei nel Mar Mediterraneo del 2006, che indica la presenza del capodoglio (*Physeter macrocephalus*) in questo bacino e dove si segnala che questa specie in Albania sia presente come specie stanziale, mentre in Croazia come specie visitatrice (Reeves R e Notarbartolo Di Sciara G., 2006).

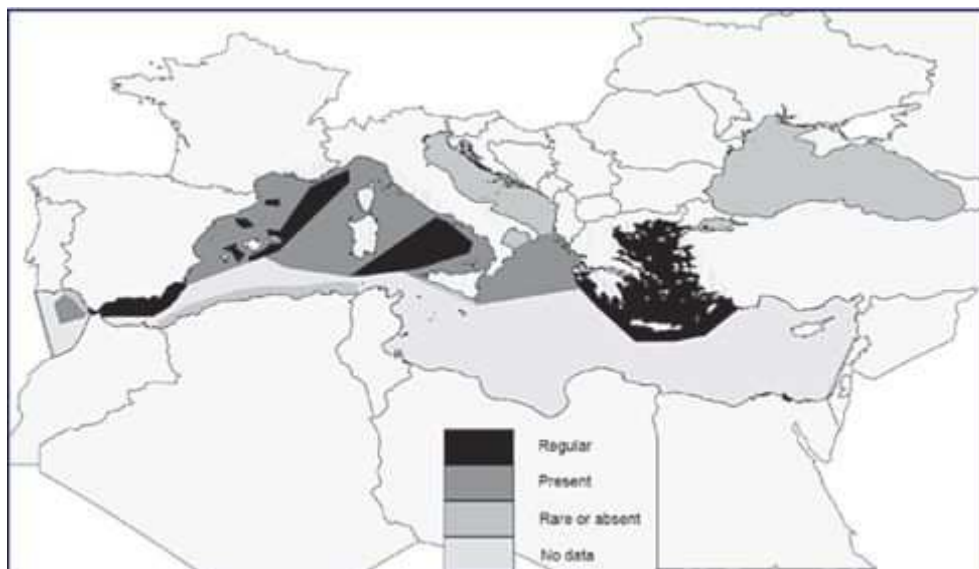


Figura 5: Presenza di Capodogli nel Mar Mediterraneo

1.1.3. Aspetti biologici ed ecologici del capodoglio (*Physeter macrocephalus*)

I maschi lasciano i gruppi familiari costituiti da femmine e sub-adulti ad un'età compresa tra i 3 ed i 15 anni, per formare dei gruppi di aggregazione senza una precisa struttura sociale di individui con un'età omogenea, definiti *bachelors schools* o *groups*. Sono gruppi di maschi immaturi sessualmente e non strutturati con dimensioni comprese tra i 12 e i 14 mt . Il numero dei componenti di questi gruppi tende a decrescere con le dimensioni.

Si possono osservare aggregazioni fino a circa 20 maschi che rimangono concentrati in un raggio di circa 20 km, per periodi variabili da giorni a mesi con la formazione di qualche *cluster* (avvicinamento occasionale di due o più individui).

I *bachelor pods* tendono comunque ad essere meno aggregati spazialmente rispetto alle femmine e inoltre non sembrano esistere tra loro delle relazioni stabili o delle unità sociali. In genere tali forme di aggregazione sembrano avere una funzione di protezione nei confronti dei predatori dato che, il nuotare vicini ed in contatto, pur se distanti, li rende meno vulnerabili. (Whitehead, 2003; pag. 267). Il numero degli appartenenti a questi gruppi tende a ridursi con l'età fino a quando, intorno ai quarant'anni, i capodogli maschi maturi (18 mt di lunghezza e 45 t. di peso) tendono a stare da soli alle latitudini più alte e quindi in acque più fredde vicino ai circoli polari.

La loro maturità sessuale avviene gradualmente durante l'adolescenza, anche se non partecipano attivamente all'accoppiamento, e solo tra i 25 ed i 30 anni migrano verso le acque più calde dove possono trovare le femmine. Non si sa molto di queste migrazioni, in senso longitudinale o latitudinale, se non che possono essere lunghe chilometri (Whitehead, 2003; pag. 12).

1.1.3.1. Dieta

Il capodoglio (*Physeter macrocephalus*) spende circa 8 minuti per cibarsi in superficie e poi immergersi. Durante questi periodi le femmine respirano ogni 12,5 sec mentre i maschi più grandi ogni 17,5 sec. Questi periodi di approvvigionamento in superficie terminano quando l'animale si immerge mostrando la coda. Durante l'immersione l'alimentazione dura da 30 a 45 minuti. In questo momento l'animale emette un serie regolare di Click che probabilmente sono usati per l'ecolocalizzazione delle prede. Questi suoni sono interrotti da scricchiolii e silenzi durante i quali si pensa che l'animale stia mangiando. Visto che questi mammiferi marini ingeriscono diversi tipi di prede essi hanno sviluppato numero tecniche di ricerca del cibo.

Studiando il contenuto stomacale, risulta chiaro che si nutrono di varie specie di cefalopodi che variano a seconda della zona geografica. Si ipotizza che i becchi taglienti dei calamari consumati, contenuti nell'intestino della balena, inducano la produzione di ambra grigia, analogamente alla produzione delle perle. L'irritazione dell'intestino provocata dai becchi stimola la secrezione di questa sostanza simile ad un lubrificante.

I capodogli possono ingerire anche pesci, preferenzialmente condroitti, ma anche teleostei. Generalmente sono pesci di taglia medio-grande che vivono sul fondo o comunque in profondità. Durante le attività di ricerca del cibo, i capodogli, in particolare i maschi, tendono a mangiare incidentalmente una vasta varietà di altri animali, inclusi tunicati, spugne, stelle marine, granchi, aragoste, krill, uccelli di mare, foche, ma possono inghiottire anche oggetti inanimati come legno, noci di cocco, gusci di molluschi, pietre, sabbia, oggetti di alluminio, plastica e reti da pesca .

Il successo nell'attività di alimentazione varia moltissimo a seconda della regione, diversificandosi a distanza di qualche centinaio o migliaio di chilometri. Ci sono scarse evidenze di un trend giornaliero, stagionale o geografico. addirittura, a distanza di qualche centinaio o migliaio di chilometri. In generale i maschi hanno un successo generalmente

inferiore rispetto alle femmine . Pur essendoci una certa variabilità, questi animali trascorrono circa il 75% del loro tempo nel cercare cibo ed il 25% a socializzare, generalmente il pomeriggio (Whitehead, 2003; pag 156). E' stato evidenziato che consumano quotidianamente una quantità di prede pari al 3-3,5% del loro peso da vivi (Lockyer, 1981).

L'unico predatore che attacca i capodogli, oltre all'uomo, è l'orca. I grandi branchi itineranti di orche attaccano frequentemente gruppi di femmine con i piccoli, cercando solitamente di separare il cucciolo di capodoglio ed ucciderlo. Spesso le femmine di capodoglio possono respingere questi attacchi, formando un cerchio con al centro i loro piccoli per poi sbattere violentemente le loro code, impedendo così alle orche di penetrare la formazione. Se il branco di orche è estremamente grande, esse possono a volte uccidere anche femmine adulte. I grossi maschi di capodoglio non hanno invece predatori, perché persino le orche possono essere uccise da queste aggressive e potenti creature.

1.1.3.2. Spostamenti

In relazione agli spostamenti, i capodogli si muovono con velocità differenti a seconda del numero di immersioni effettuate e della quantità dei giorni in cui sono in movimento. Le ricerche effettuate mostrano una velocità media tra i 2 e gli 8 km/h con punte massime di 39 km/h per brevi periodi. Su uno spostamento di breve durata (0,5-2 h) generalmente mantengono una velocità media di 2-5 km/h tenendo conto anche di alcune immersioni. Valutando gli spostamenti effettuati in relazione al tempo di osservazione, si rileva che gruppi di femmine e maschi immaturi percorrono 4 km in un ora, 20 km in 6 ore, 70-90 km in un giorno e 110 km in 2 giorni. Gli animali che hanno un minor successo alimentare possono percorrere distanze pari a 1,5-2 volte rispetto a quelle indicate nello stesso intervallo di tempo. Queste misure fatte con un tracking diretto non permettono di seguire gli animali per periodi più lunghi. Ricerche effettuate nell'Oceano Pacifico usando la fotoidentificazione, per quanto più

imprecisa, suggeriscono che in 5 giorni gli animali possono effettuare trasferimenti di 100 km circa e di 300 km in un mese. I maschi sembrano percorrere distanze maggiori nei loro spostamenti, nell'ordine di qualche migliaio di chilometri, in opportuni spostamenti stagionali legati alla presenza di cibo e di femmine. Lavori effettuati sul Mar Mediterraneo occidentale, utilizzando la foto-identificazione, suggeriscono spostamenti di 500 km in 7 giorni (Drouot-Dulau V. e Gannier G, 2007).

1.1.4.Filogenesi

Il capodoglio (*Physeter macrocephalus*) ha avuto un percorso evolutivo interessante e controverso, ma tutti concordano sul fatto che faccia parte dei cetacei come balene e delfini. I mammiferi marini si sono evoluti da creature simili ad ungulati che hanno fatto ritorno negli oceani forse più di 60 milioni di anni fa. La polemica riguardante l'appartenenza dei capodogli, al sottordine degli odontoceti o misticeti, risale a parecchi anni fa. Alcuni autori (Milinkovitch *et al.* 1993) utilizzando i risultati di studi molecolari e osservando l'albero filogenetico di questi animali suggerirono che i capodogli fossero più strettamente legati ai Misticeti rispetto agli Odontoceti.

La conclusione che ipotizzo Milinkovitch *et al.* (1993) però parve strana visto che la morfologia degli animali suggeriva che essi fossero più simili agli odontoceti per la presenza di denti singoli al posto dei fanoni ed un singolo sfiatatoio. Analisi morfologiche e molecolari più recenti, in particolare quelle condotte da Heyning (1997) e Nikaido *et al.* (2001) giunsero alla conclusione, decisamente più tradizionale, nel considerare i capodogli come odontoceti. Altri dati molecolari più attuali sono risultati ancora più controversi e meno attendibili perchè alcuni concordano con l'evidente caratteristica morfologica comune di questa specie che li vedrebbe appartenenti agli odontoceti, altri supportano la teoria di Milinkovitch che ha ipotizzato per primo la divisione dei capodogli e misticeti da tutti gli altri cetacei.

In ogni caso, i capodogli risultano appartenere ad una unica grande famiglia: *Physeteroidea*. In questa superfamiglia oggi sopravvivono solamente tre specie: i capodogli (*Physeter macrocephalus*), il capodoglio pigmeo (*Kogia breviceps*) e il capodoglio nano (*Kogia simus*). Quest'ultimo più piccolo degli altri che non supera i 2-4 m di lunghezza

1.2. Gli spiaggiamenti

1.3. Gli spiaggiamenti di capodogli nel Mar Mediterraneo: la situazione in Italia

Di tutte le perplessità e le curiosità che maggiormente affascinano l'uomo verso i capodogli e in generale, tutti i mammiferi marini, gli spiaggiamenti rimangono un mistero in parte ancora irrisolto. Questi eventi che possono essere singoli o di massa, coinvolgendo gruppi di soli maschi o solo femmine con i loro cuccioli o misti. Il numero degli animali è più elevato quando a spiaggiare sono le femmine con i loro piccoli. Tali eventi possono interessare tratti lunghi di costa ed essere spalmati nel tempo.

Secondo il National Marine Fisheries Service statunitense (NMFS) per essere considerato spiaggiato l'animale non deve essere per forza malato, ferito o morto, ma viene considerato tale anche quando si trova su una spiaggia affollata e rappresenta un potenziale rischio per la salute umana. Nel caso in cui l'animale spiaggiato sia in buone condizioni di salute, lo shock subito può essere talmente grave da compromettere il suo ritorno in mare aperto (Geraci, 1999).

La prima registrazione sistematica ed organizzata di dati inerenti agli spiaggiamenti è iniziata in Inghilterra circa 70 anni fa (Dierauf, 1990) ma i maggiori progressi in merito alla conoscenza sui cetacei, alla loro fisiologia e a ciò che può colpire la loro salute sono stati fatti negli ultimi 25 anni, in particolare dopo il 1990 e 1992, a seguito di uno spiaggiamento di massa di stenelle dovuto ad una epidemia di morbillivirus e grazie alla stesura

Introduzione

standardizzata di un protocollo per la necropsia dei mammiferi marini di Kuiken and Hartmann (1991) e con la guida dettagliata di Geraci e Lounsbury (1993). Anche le informazioni raccolte da animali in ambiente controllato sono state utili per capire le cause di morte di spiaggiamenti di massa dei mammiferi marini e delle malattie che li possono colpire. Inoltre da carcasse di animali ritrovati lungo le coste si sono potute conoscere nuove specie fino a quel momento ignote, la loro anatomia, i loro aspetti comportamentali e i più diffusi agenti patogeni che li aggrediscono. Gli scheletri ricavati dalle carcasse degli individui arenati hanno fornito importanti preparati per le collezioni museali.

La raccolta sistematica di informazioni sugli spiaggiamenti di mammiferi marini sulle coste italiane è iniziata nel 1986 grazie all'impegno del Centro Studi Cetacei e dei volontari ad esso aderenti. Il Centro costituì una rete nazionale di osservatori per tenere sotto controllo le coste e intervenire nel caso di animali spiaggiati per effettuare il riconoscimento delle specie, prelevare campioni di tessuti, ovvero l'intero corpo, ai fini di indagare sulle cause della morte o, in generale, sulla specie in questione. Per molti anni gli animali spiaggiati hanno rappresentato un'importante fonte di informazioni scientifiche e di reperti per i musei italiani. L'impegno scientifico del CSC si è anche concretizzato nella pubblicazione di rapporti annuali sugli animali rinvenuti e sulle cause di mortalità. I rapporti sono stati pubblicati fin dalle origini dal Museo Civico di Storia Naturale di Milano (MSNM).

Dal 1713 ad oggi si sono spiaggiati lungo le coste italiane 3.907 soggetti. (fonte <http://www-3.unipv.it/cibra/spiaggiamenti.html>).

Gli spiaggiamenti non hanno una distribuzione uniforme durante il corso dell'anno. Infatti, si notano picchi in periodi compresi tra tarda primavera ed estate, quando vi è una più assidua presenza dell'uomo sulle coste, fatto che incrementa il numero delle segnalazioni (Centro studi cetacei, 2006).

Il Centro di Coordinamento per la raccolta dei dati è gestito dal CRIBA dell'Università di Pavia e dal Museo Civico di Storia Naturale di Milano ed

Introduzione

include una Banca Dati con accesso on-line che viene continuamente aggiornata; i dati scientifici completi sono riservati solo agli utenti autorizzati (CRIBA, 2009).

I dati ed i campioni raccolti hanno permesso di costituire la Banca Italiana per i tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo (BIT), ufficialmente istituita nel 2002, con sede presso il Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie (SperiVet) della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova.

La Banca sfrutta il grande potenziale scientifico fornito dagli animali spiaggiati, raccoglie dati importanti e li mette a disposizione della comunità scientifica; inoltre, si occupa dell'organizzazione di attività culturali che sensibilizzino l'opinione pubblica. La BIT è riconosciuta dal CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species*) ed opera secondo l'accordo ACCOBAMS (*Agreement of the Conservation of Cetaceans Of the Black And Mediterranean Seas*).

È da sottolineare che gli animali spiaggiati, morti per cause "naturali", rappresentano un'opportunità per poter compiere studi ecologici, biologici, patologici, genetici, microbiologici, istologici, di immunoistochimica ed ecotossicologici, che possono aiutare l'intera comunità scientifica ad approfondire le conoscenze sui mammiferi marini. E ciò senza impattare direttamente sulle popolazioni residenti negli Oceani, contribuendo così alla salvaguardia di questi soggetti. Una efficiente organizzazione, che si occupi di segnalare gli spiaggiamenti e di coordinare l'attività di recupero, risulta utile ai fini di riuscire ad agire tempestivamente gli organismi, per poter intervenire in tempi utili per il recupero ed il campionamento dei tessuti, che saranno oggetto delle diverse analisi.

Dal 1986 ad oggi 155 sono i capodogli (*Physeter macrocephalus*) che si sono spiaggiati. Per dare un quadro completo si riporta una cartina estratta dalla Banca Spiaggiamenti dell'Università di Pavia (www-3.unipv.it/cibra/spiaggiamenti.html) che raccoglie i dati degli spiaggiamenti lungo le coste italiane (**Figura n. 6**).



Figura 6: Luogo degli Spiaggiamenti di capodogli singoli o di massa lungo le coste italiane

Come si può notare la distribuzione di tali eventi è del tutto casuale anche se la concentrazione maggiore è evidente a livello dello stretto di Messina Bearzi et al., 2010 in uno studio hanno analizzato i casi di spiaggiamento di capodogli tra il 1555 ed il 2009 all'interno di una porzione di Mar Mediterraneo, il Mar Adriatico, dove le acque superficiali e relativamente basse non rappresentano un ambiente ideale per questi mammiferi marini ma che comunque offre una abbondante ricchezza di informazioni storiche Sono stati considerati 36 spiaggiamenti includendo 68 animali. La distribuzione di tali eventi era chiaramente irregolare ma il 44,4% degli spiaggiamenti avveniva lungo un tratto di costa compreso tra Pescara e Rimini (circa 280 km) caratterizzate da coste sabbiose e quindi lontano dall'habitat adatto per il capodoglio. (**Figura n. 7**).

Introduzione

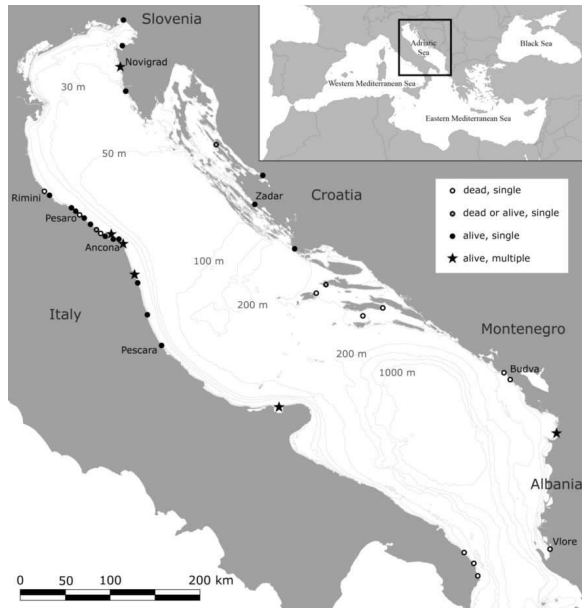
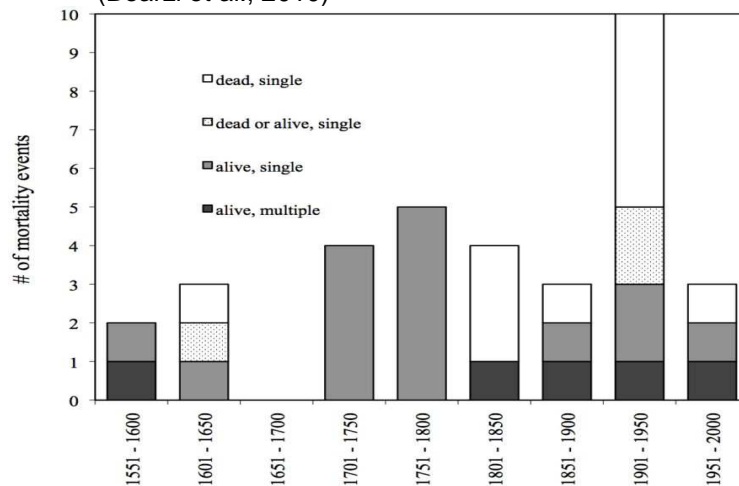


Figura 7: Distribuzione geografica degli spiaggiamenti (Bearzi et al., 2010)

Grafico 1: Distribuzione spiaggiamenti 1901-1950 (Bearzi et al., 2010)



Come si può notare dal grafico (**Grafico n. 1**) la maggiore percentuale degli spiaggiamenti è avvenuta tra il 1901 ed il 1950 caratterizzata da spiaggiamenti singoli, di animali arenati già morti.

1.3.1. Gli spiaggiamenti di massa dei capodogli

A livello mondiale, gli spiaggiamenti di massa che coinvolgono questa specie sembrano concentrarsi in alcune aree geografiche ben precise, come le coste statunitensi, in particolare la costa occidentale e le coste che si affacciano sul Golfo del Messico; le coste del Mare del Nord, in particolare lungo le coste dell'Europa continentale; in Australia ed in particolare in Tasmania (**Fotografia n. 1**) . Queste zone possono essere considerate come “*acoustic dead zone*” perchè sono caratterizzate da acque poco profonde e da una particolare batimetria del suolo che altera la propagazione e la velocità del suono emesso dai cetacei favorendone lo spiaggiamento in questi particolari siti geografici (Bala S. *et al.*, 2005).



Fotografia 1: Spiaggiamenti di massa in Australia

Gli spiaggiamenti di massa di capodogli nel Mar Mediterraneo sono eventi molto rari e distanziati da diverse decadi gli uni dagli altri.

Per quanto riguarda le coste italiane se ne segnalano almeno 11 eventi oltre a quello avvenuto in Puglia. Per dare un quadro completo si riporta una tabella estratta dalla Banca Spiaggiamenti dell'Università di Pavia

(www-3.unipv.it/cibra/spiaggiamenti.html) che raccoglie i dati degli spiaggiamenti lungo le coste italiane (**Tabella n.1**).

Tabella 1: Spiaggiamenti di massa di capodogli (www.unipv.it/cibra)

LUOGO SPIAGGIAMENTO	PROV	DATA	N. ANIMALI COINVOLTI
Ancona	AN	29/07/1584	7
Mazzara del Vallo	TP	1734	16
P.to S. Elpidio	AN	1803	3 (1 M)
Cittanova d'Istria	Croazia	15/08/1853	6 (nd)
Pozzallo	RG	1873	5
Marsala	TP	25/11/1892	7
Castellamare del Golfo	TP	1902	7
Isola di Vis	Croazia	06/1917	7 (nd)
Milazzo	ME	1934	3
Falconara	AN	20/08/1938	7 (nd)
Shengjin	Albania	06/1956	8 (5 F + 3 nd)

La maggior parte dei capodogli in questi casi sembrano essere sani, a parte qualche eccezione (Janeaux et al, 1997).

Attualmente la cause di spiaggiamenti di cetacei vivi restano in gran parte ancora sconosciuti (Simmonds 1997, Geraci et al. 1999, Goold et al. 2002, Bradshaw et al. 2006), anche se molte ipotesi sono state avanzate.

Alcuni autori ipotizzano che le cause più frequenti sono: cause patologiche che possano provocare morte dell'animale (Jauniaux et al. 1997, Lambertsen 1997), disturbi meteorologici e oceanografici, come uragani (Mignucci-Giannoni et al. 1999), cause legate alla variazione del campo geomagnetico (Klinowska 1985a, b, 1988, Kirschvink et al 1986, Kirschvink 1990; Brabyn & Frew 1994), modificazioni all'attività solare che potrebbe, temporaneamente influenzare il campo geomagnetico, oppure

per periodi più lunghi, la temperatura del mare (Vanselow & Ricklefs 2005, Vanselow et al. 2009), tempeste elettriche (Robson & Bree Van 1971), gli effetti dei cicli lunari (Wright 2005), la batimetria del suolo (Brabyn & McLean 1992, Woodings 1995, Chambers & James 2005), eventi climatici su larga scala (Evans et al. 2005), anomalie nella temperatura che influenzano la distribuzione delle prede (Pierce et al. 2007), l'inquinamento acustico (Simmonds & Lopez-Jurado 1991, Frantzis 1998, Balcomb & Claridge 2001) l'inquinamento chimico (Bouquegneau et al. 1997, Joiris et al. 1997, Evans et al. 2004), che può causare o contribuire agli spiaggiamenti (Geraci et al. 1999). Accanto a queste molteplici cause va anche ricordato che gli spiaggiamenti di massa potrebbe dipendere da un forte comportamento sociale, che può indurre gli animali sani a seguire i compagni del gruppo malati o in stato confusionale (Whitehead 2003).

Durante questi spiaggiamenti di massa si devono sottolineare vari comportamenti anomali. In alcuni casi i cetacei sono stati visti nuotare attivamente verso la riva. In altri casi sono stati avvistati altri individui nuotare appena al largo durante lo spiaggiamento, alcuni dei quali si sono spiaggiati più tardi.

1.3.2. Ruolo dell'uomo negli spiaggiamenti di massa: inquinamento chimico ed acustico

Gli spiaggiamenti di massa dei capodogli e di altre specie di odontoceti (globicefali, pseudorche, etc.) sembrano essere quindi regolati da eventi o fattori esterni come le condizioni climatiche, marine, la topografia dei fondali, i campi magnetici, i cicli lunari, solari e l'inquinamento ambientale chimico ed acustico. Infatti negli ultimi decenni l'incremento dell'inquinamento, ha condotto a delle indagini sulla presenza di sostanze tossiche e di variazioni acustiche presenti nel mare. La distribuzione di xenobiotici nell'ambiente marino non è omogenea e può variare a seconda

Introduzione

dello spazio e del tempo considerato. L'uso di bioindicatori è spesso utile alternativa per monitorare l'inquinamento. Infatti, i mammiferi marini rappresentano un potenziale indicatore per valutare il livello dei metalli pesanti accumulatosi nell'ambiente marino. Un'elevata posizione nella catena trofica, una vita media lunga e la possibilità di eliminare metà delle sostanze inquinanti rendono questi animali interessanti poiché in essi si accumulano grandi quantità di sostanze chimiche come organoclorurati (Kamin and Riger, 1994; Tanabe *et al.*, 1994) o metalli pesanti. Questi ultimi vengono suddivisi in essenziali (Zn, Cu, Cr, Se, Ni, Al) e non-essenziali (Hg, Cd, Pb). Vi sono ancora dati limitati sull'intossicazione da parte dei metalli pesanti nei mammiferi marini, eccetto che per il mercurio. I fattori che influenzano la concentrazione di questo metallo pesante nei tessuti dei mammiferi marini sono: 1) localizzazione geografica; 2) vie di ingresso; 3) età; 4) sesso; 5) distribuzione all'interno dei tessuti. Il Mar Mediterraneo ha uno scambio limitato di acqua con l'Atlantico ed è circondato da alcuni tra i paesi maggiormente industrializzati e popolati della Terra; per questi motivi i livelli di molte sostanze inquinanti risultano superiori rispetto agli altri oceani (Fossi *et al.*, 2007). Soffermandosi su queste ultime affermazioni, si può facilmente comprendere quanto la minaccia di un progressivo deterioramento di questo ecosistema sia reale e quanto risulti importante proibire o limitare l'input di alcune sostanze nelle acque di questo bacino (Marsili e Focardi, 1996). Esistono diverse e differenti vie d'ingresso dei metalli pesanti nell'organismo dei mammiferi marini: 1) tramite il respiro passando attraverso i polmoni, 2) assorbimento attraverso la cute, 3) prima della nascita con la placenta, 4) con il latte attraverso la lattazione, 5) con l'ingestione di acqua, 6) con la dieta. Tuttavia il maggior ruolo di contaminazione dei metalli pesanti nei mammiferi marini sembra essere principalmente il cibo introdotto (Andrè *et al.*, 1990a, b; Augier, 1993b; Law, 1996). La dieta è responsabile della contaminazione soprattutto da mercurio (Svensson *et al.*, 1992; Nakagawa *et al.*, 1997). Questo metallo pesante può provocare intossicazioni e provocare avvelenamenti nell'organismo. I cefalopodi, che costituiscono la

maggior parte dell'alimentazione dei capodogli, hanno un contenuto maggiore di Hg rispetto a quello contenuto nei pesci (Frodello et al., 2000). La concentrazione di mercurio aumenta con l'età in molti tessuti di mammiferi marini analizzati (e.g. Honda and Tatsukawa, 1981, 1983; Hamanaka *et al.*, 1982; Honda *et al.*, 1983; Augier *et al.*, 199b). Questo incremento si osserva maggiormente a carico del fegato visto che in questo organo avvengono processi di detossificazione. (Honda *et al.* (1986, 1987) Studi eseguiti su diverse specie di Odontoceti, compresi i capodogli, hanno lo scopo di comprendere come questo elemento sia accumulato, biotrasformato ed eliminato nell'organismo. In ogni caso, il fegato appare l'organo deputato all'accumulo del mercurio e alla sua detossificazione (Caurant et al., 1996) mentre i reni fungono da organi escretori. Il Hg si può trovare anche nei polmoni, nei muscoli, nelle ossa e nella cute (Frodello et al., 2000). Le attività riproduttive come la gravidanza, il parto e la lattazione possono modificare i livelli di metalli. Alcuni studi hanno infatti dimostrato che la trasformazione di queste sostanze dalla madre al feto avviene già attraverso la placenta o durante la lattazione. Canella and Kichener (1992) hanno riscontrato dei significativi livelli di mercurio in femmine gravide o in lattazione di capodogli se confrontate con femmine dello stesso gruppo che non stavano allevando i propri piccoli. Gli autori quindi suppongono che questa variazione sia il risultato di un cambiamento ormonale o stress che causa redistribuzione di mercurio in tutto l'organismo. La concentrazione totale di mercurio è un indicatore limitato per gli effetti tossici nei mammiferi marini di tale metallo pesante. Vengono prese quindi in considerazione le componenti del mercurio organico (metilmercurio) che sembrano essere considerevolmente più tossiche rispetto a quelle del mercurio inorganico. Le attività biologiche e tossicologiche del mercurio dipendono dalla forma con la quale tale metallo è liberato in circolo, la via di entrata nell'organismo (cute, respiro o ingestione) rappresenta l'entità del grado di assorbimento (Kaiser and Tolg, 1980). Recentemente alcuni autori,

Introduzione

Wolfe *et al.* (1998), hanno riconsiderato la possibilità che la tossicità del mercurio si possa trovare anche negli animali selvatici.

Nei mammiferi, la tossicità del metilmercurio si manifesta primariamente a livello del sistema nervoso centrale provocando danni che includono: deficit sensitive e motori e problemi nel comportamento. Gli animali cominciano a diventare anoressici e letargici.

Il metilmercurio è altresì assorbito a livello del tratto gastrointestinale, mentre i Sali inorganici di mercurio sono meno facilmente assorbiti. Inoltre, il metilmercurio passa liberamente la placenta (Wagemann *et al.*, 1988) e quindi lo si può ritrovare concentrato a livello dell'encefalo fetale (Wolfe *et al.*, 1998). Questa serie di turbe riproduttive possono provocare alterata crescita fino a morte fetale.

Oltre che per i metalli pesanti i mammiferi marini possono fungere da bioindicatori anche di sostanze inquinanti che vengono rilasciate volontariamente o involontariamente dall'uomo in ambiente e che interagiscono secondariamente con i sistemi biologici degli organismi. Le sostanze organoclorurate (OC) sono nocive per la salute umana e per l'ambiente. Tali sostanze sono definite POPs (*Persistent Organic Pollutants*), e ne fanno parte 9 inquinanti principali e 3 classi di composti (policlorobifenili, diossine e furani).

I composti organoclorurati (*Organochlorine Compounds*) sono derivati alogenati sintetici di idrocarburi alifatici, aromatici ed eterociclici; essi presentano determinate caratteristiche che rendono le loro molecole, caratterizzate da uno o più atomi di cloro, molto pericolose per l'ambiente e per i mammiferi marini. Sono altamente liposolubili, per cui tendono ad accumularsi nei tessuti lipidici di animali lungo la catena trofica, dando luogo a fenomeni di biomagnificazione, per tale motivo gli Odontoceti sono i più esposti a tali inquinanti, in quanto, oltre ad essere all'apice della catena alimentare, presentano una notevole quantità di tessuto lipidico (Marsili, 2000; Fossi *et al.*, 2007). Inoltre queste sostanze sono altamente persistenti nell'ambiente perché hanno un'elevata stabilità chimica e la loro degradazione avviene quindi molto lentamente. Specie oceaniche di

Introduzione

Cetacei come i capodogli (*Physeter macrocephalus*) che vivono in mare aperto lontano da sostanze inquinanti possono essere presi in considerazione come modelli dei cambiamenti a breve termine delle concentrazioni degli inquinanti nelle aree costiere (Aguilar, 1985; Reijnders, 1986). Per la ricerca del cibo un gruppo potrebbe anche percorrere 55 miglia (Jaquet et al., 2000). Le differenze di composizione chimica e le concentrazioni di inquinanti nelle diverse masse d'acqua si dovrebbero trovare quindi nei tessuti ed organi degli animali che vivono in quelle zone (Aguilar, 1987; Aguilar et al., 1993). Pertanto, le concentrazioni di sostanze tossiche come gli organoclorurati nell'alimentazione dei capodogli dovrebbe riflettere su ampia scala i livelli regionali di inquinamento oceanico.

Nel Mare Mediterraneo la vita marina è minacciata dal degrado dell'habitat dovuto alle attività umane come la pesca, il traffico navale, l'inquinamento, e l'antropizzazione delle coste. Per quanto riguarda l'inquinamento, oltre che essere colpiti da quello chimico, che può contaminare l'intera rete trofica marina, i cetacei possono anche essere colpiti dall'inquinamento acustico (G. Pavan, 2002).

I cetacei riescono ad avere uno straordinario adattamento alle particolarità acustiche dell'ambiente subacqueo. In questi mammiferi, la comunicazione acustica ha acquisito un ruolo privilegiato rispetto agli altri canali di comunicazione perchè vivono in un mezzo dove il suono si propaga bene e velocemente, anche a grandi distanze. Per questo i mammiferi marini si affidano al suono per comunicare, investigare l'ambiente, trovare le prede ed evitare gli ostacoli.

Sappiamo che sulla terra il rumore può influenzare il benessere fisico e psichico dell'uomo ma, limitata è la nostra conoscenza dell'impatto del rumore sull'ambiente marino anche se ultimamente il problema è stato sempre più preso in considerazione (Richardson et al., 1995). Il rumore dell'ambiente marino subacqueo e non (il movimento dell'acqua, le onde, il vento, la pioggia, le attività vulcaniche e i terremoti) si unisce alle fonti acustiche e vibratorie prodotte dalle attività umane (il traffico navale, le

Introduzione

indagini geosismiche, gli ecoscandagli, i sonar militari e civili, ecc.): questi rumori possono interferire con la normale vita dei cetacei, anche se essi si sono adattati alle caratteristiche acustiche dell'ambiente naturale elaborando convenienti sistemi di comunicazione

Comunque l'esposizione ai rumori può produrre una ampia gamma di effetti sui mammiferi marini. Un suono a basso livello può non avere nessun effetto visibile, un altro con grado più elevato può disturbare gli animali ed indurre l'allontanamento o altre modifiche del comportamento. Una fonte di rumore molto forte può produrre effetti negativi che possono andare dal disagio e stress fino al danno acustico vero e proprio con perdita di sensibilità uditiva, temporanea o permanente, oltre al possibile danno fisico ad altri organi.

Le perdite di capacità uditive sono accompagnate da innalzamento della soglia di sensibilità che può essere temporaneo (TTS) o permanente (PTS). Poiché l'intensità e la durata dell'esposizione possono agire sinergicamente anche rumori di bassa intensità ma protratti nel tempo possono condurre al danno acustico permanente oltre che ad una varietà di effetti, significativi ma difficilmente valutabili, con ripercussioni sul comportamento e sul benessere psicofisico che possono avere un impatto a lungo termine sulle popolazioni di mammiferi marini. Dal 1995 la Marina Militare italiana ha cominciato a affrontare il problema dell'inquinamento acustico limitando le esercitazioni sonar nel Santuario dei Cetacei del Mare il Ligure.

Nel maggio 1996, nel Golfo di Kyparissiakos, sulla costa occidentale di Grecia Ionica, uno spiaggiamento di numerosi zifi ha focalizzato il problema dell'impatto dei sonar. Lo spiaggiamento avvenne negli stessi giorni e nella stessa area di un test sonar della NATO e benchè studi successivi non abbiano potuto spiegare quanto successo, è comunque aumentata l'attenzione internazionale su questo problema indicando l'esistenza di una seria difficoltà ambientale legato all'uso di sonar visti anche ulteriori episodi verificatisi negli anni successivi (Bahamas, marzo 2000; Canarie 2002).

Introduzione

Non solo i sonar sono fonti di rumore sott'acqua ma anche le vibrazioni che si propagano dalle coste o in mare per decine di miglia di chilometri dando origine ad un inquinamento che può essere acuto e puntuale (per esempio un test sonar o una esplorazione geofisica) o diffuso e continuo (ad esempio quello dovuto al traffico navale) . (Urick, 1983)

L'inquinamento acuto sembra essere più facilmente gestibile. Perché si possono minimizzare gli effetti di rumore irradiato scegliendo attentamente le aree e i periodi più adatti per condurre operazioni potenzialmente dannose, evitando quindi le aree di maggior densità e gli habitat critici.

Al Saclant Undersea Research Center della NATO è sorto il progetto SOLMAR (Sound, Oceanography and Living Marine Resources) mirato allo sviluppo di una Policy che consenta di utilizzare sorgenti sonar di alta potenza in condizioni di sicurezza. E' tuttavia ancora incerta la determinazione di livelli di esposizione sicuri, al momento infatti, non esistono studi che indichino i livelli di sensibilità per le varie specie e continuano ad essere discussi modelli di sensibilità ai traumi acustici che considerano troppe varianti come il tipo di suono, le condizioni di propagazione, la sensibilità degli animali il loro comportamento e altri fattori.

L'Office of Naval Research (ONR-USA) sovvenziona attualmente molti progetti di ricerca su questo soggetto. Lo scopo dell'ONR è aumentare la conoscenza sui mammiferi marini e la loro sensibilità all'esposizione al rumore, per consentire alle Marine Militari di operare entro i limiti di sicurezza in conformità con il Marine Mammals Protection Act (MMPA). Ricerche in questo settore sono anche sovvenzionate dalle compagnie petrolifere che devono mitigare gli effetti delle loro operazioni di trivellazione. Anche se il numero di studi è aumentato negli anni recenti, la scarsa disponibilità di informazioni scientifiche sui rapporti di causa-effetto limita la nostra capacità di capire gli effetti a lungo termine ed adottare strategie di conservazione appropriate. (P. T. Madsena, 2006).

Attualmente l'interesse dei ricercatori è rivolto a temi di più ampio respiro come le strategie d'uso degli ambienti, l'identificazione degli habitat critici

e lo studio dell'impatto delle attività umane anche se le conoscenze sugli habitat critici dei mammiferi marini sono molto scarse. Ciò rende tutte le specie di cetacei vulnerabili al degrado dell'habitat e all'aumento del disturbo antropico particolarmente nel lungo termine.

1.3.3.Lo spiaggiamento di massa di 7 Capodogli del 12 Dicembre 2009



Fotografia 2: Spiaggiamento cadodogli Gargano 2009

Il 12 Dicembre 2009, si è verificato uno dei rari spiaggiamenti di massa di capodogli sul Gargano (**Fotografia n. 2**). In quella occasione, il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM) ha affidato il coordinamento delle indagini sullo spiaggiamento al Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria dell'Università degli Studi di Padova, grazie alla creazione, presso il suddetto Dipartimento, dell'Unità per la Necropsia dei Grandi Cetacei, finanziata dallo stesso MATTM nel 2006.

Il 7 animali erano distribuiti su 3,8 km di costa lungo un di litorale sabbioso, tra Cagnano Varano (2 animali) e Ischitella (5 animali) nella provincia di Foggia. Tutti gli animali erano parzialmente ricoperti di acqua e i vivi, per respirare, dovevano alzare la testa. Intorno al corpo dell'animale si era venuta a formare una fossa che, con le onde, rendeva difficile l'avvicinamento. Tutti i soggetti erano disposti con il corpo parallelamente alla linea di costa. L'evento è accaduto nel settore meridionale del Mar Adriatico dove questa specie è presente in maniera

sporadica vista la bassa profondità di queste acque (Bearzi et al, 2010). I dati relativi alla batimetria sono riportati in **figura n. 10**.

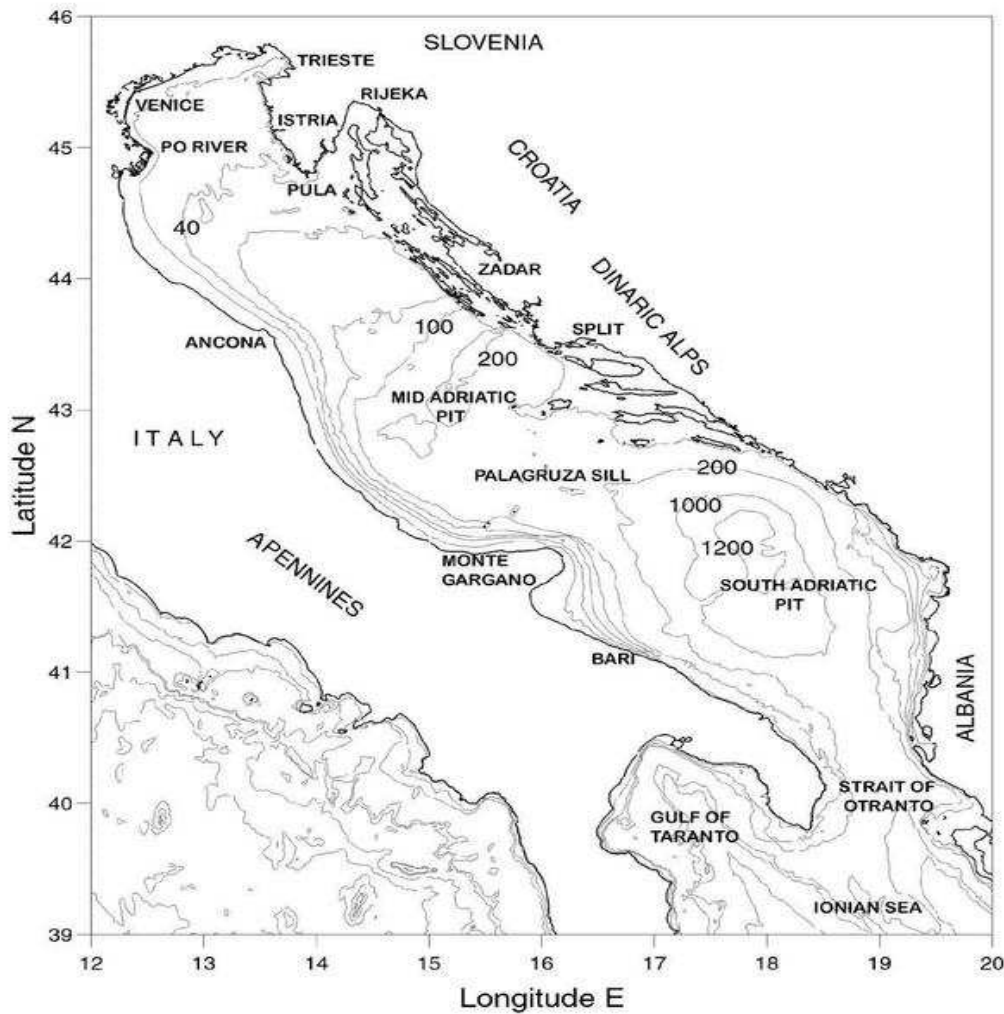


Figura 8: Batimetria Mar Adriatico Meridionale

L'unico punto del Mar Adriatico Meridionale dove si potrebbero trovare le condizioni di profondità necessarie per la sopravvivenza di questa specie è solo una fossa che scende al di sotto dei 1000 metri situata tra le coste pugliesi e l'Albania. Questa depressione però oltre ad avere una superficie limitata è circondata da fondali più bassi, tra i 200 ed i 600 metri, per tali motivi nella parte meridionale del Mar Adriatico non è mai stata confermata la presenza di questa specie in maniera costante, mentre questi cetacei sono stati avvistati regolarmente nel Mar Ionio, nella parte meridionale, in quella zona oceanica definita "Fossa Ellenica", che si

Introduzione

estende dalle isole Ionie a Creta. Quest'area geografica è un habitat ideale per la sopravvivenza dei capodogli perché caratterizzata da una maggiore profondità delle acque ed una migliore batimetria del suolo.

Le cause riportate nel paragrafo 1.3.1., prendono in considerazione oltre ai fattori geografici, anche le condizioni meteorologiche e marine sia a livello locale sia su vasta scala. Le analisi dei dati meteorologici e marini dei 20 giorni antecedenti allo spiaggiamento mostrano in sostanza venti diretti da nord a sud, verso il Gargano con correnti ed onde aumentate di intensità con la medesima direzione, come si può evincere dai dati rilevati dal sistema Poseidon e dai rilievi delle boe meteorologiche vicine (**Figura n. 11**).

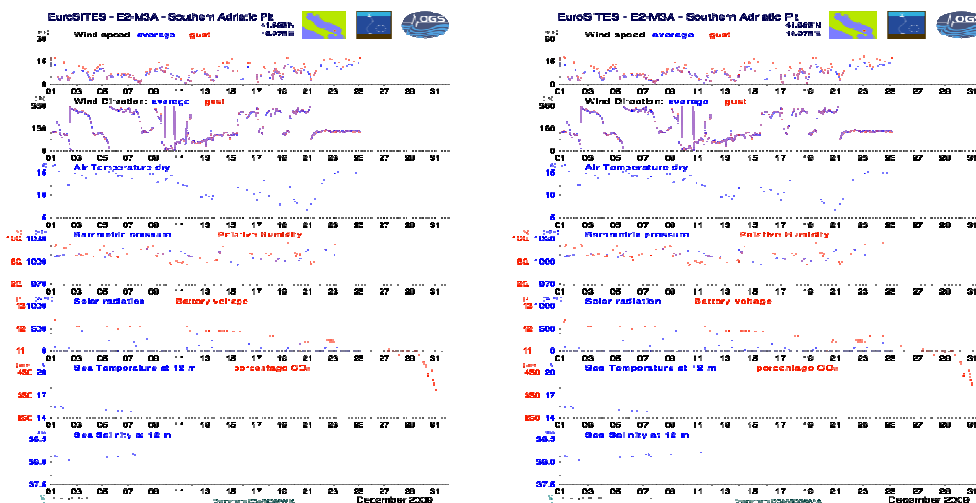


Figura 9: Andamento dei venti nei giorni precedenti allo spiaggiamento

Probabilmente, queste condizioni, oltre agli aspetti geografici della costa che può rappresentare una “acoustic dead zone” come tutto il litorale che va da Chioggia a Pescara, hanno determinato condizioni favorevoli per lo dello spiaggiamento. Di fatto, la posizione e la disposizione degli animali rispetto alla linea di costa sembravano suggerire che gli animali fossero agonizzanti o morti in balia delle condizioni meteo-marine. Per quanto riguarda le condizioni meteo marine su larga scala si è visto che le uniche alterazioni significative sono state: anomali correnti con direzione nord dal Canale d'Otranto con ingresso del Mar Adriatico (**Figura n. 12**), un

Introduzione

incremento della temperatura superficiale del mare di circa 2-4 °C nella zona della “Fossa Ellenica” in novembre e dicembre ed un’anomalo aumento della temperatura in tutto il Mediterraneo centrale e orientale durante l’estate con un nucleo di acqua più fredda lungo le coste ioniche della Grecia (**Figura n. 13**)

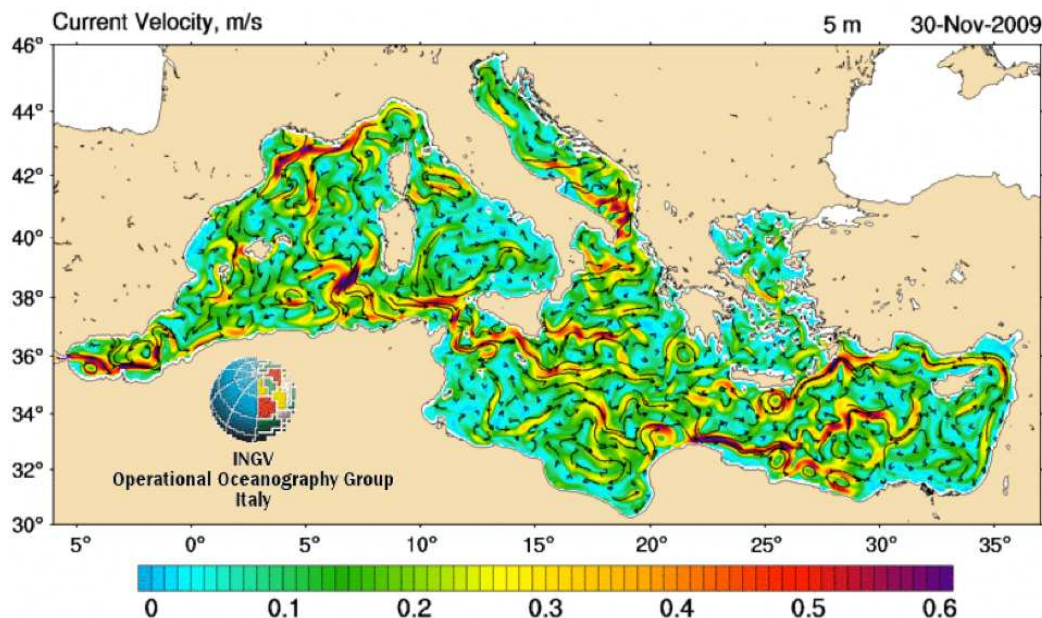


Figura 10: Andamento delle correnti nel Mar Adriatico Meridionale

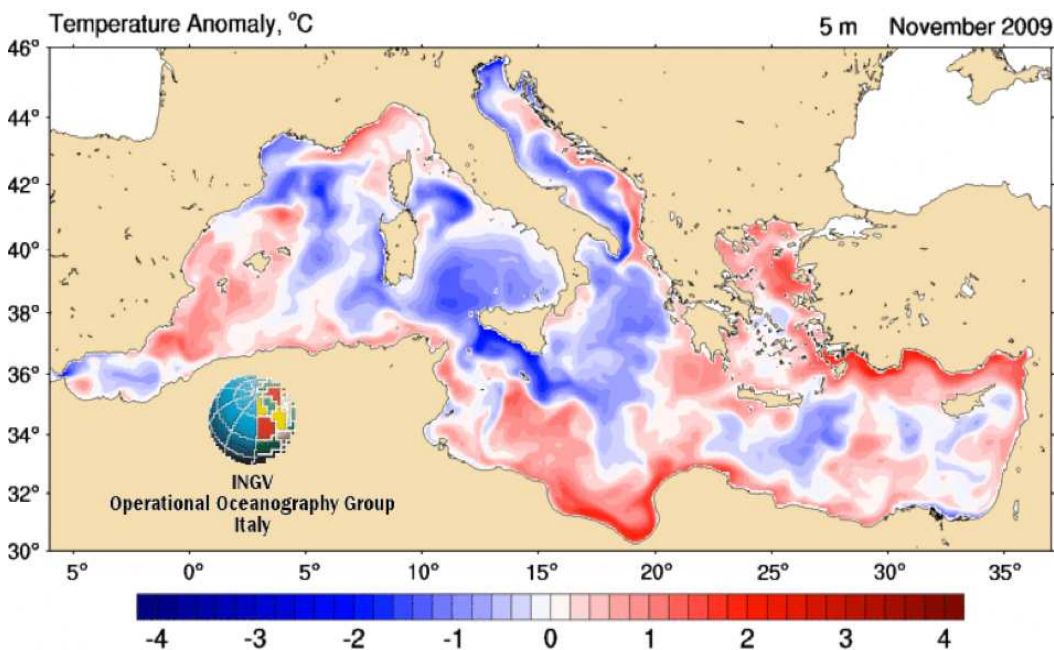


Figura 11: Variazione temperatura Mar Mediterraneo

Introduzione

Come plausibili cause dello spiaggiamento sono stati inoltre valutati la presenza di eventi anomali ed improvvisi che possono aver indotto un disturbo nelle normali attività e nel comportamento di questi animali, quali esercitazioni militari, prospezioni geologiche e terremoti subacquei, accreditati nell'ambiente cetologico, come potenziali *stressors* acustici. Non sono state riportate osservazioni o dati di esercitazioni militari che usassero sonar o attività di prospezione sismica nelle acque italiane del bacino Adriatico meridionale, ma non si hanno notizie di quanto sia accaduto in quel periodo nelle acque degli stati adiacenti (Mazzariol S., 2010).

Un altro fattore preso in considerazione come possibile causa di spiaggiamento è attività sismica ma, in quella occasione non sono stati registrati movimenti tellurici significativi nel bacino Adriatico, mentre nel Mar Ionio sono stati segnalati due eventi: un terremoto il 3 di novembre ed uno il 26 dello stesso mese, entrambi con una potenza superiore al grado 5 della scala Richter e localizzati di fronte alle isole greche del Mar Ionio, proprio in corrispondenza della Fossa Ellenica. Tali eventi non sono comunque stati associati né spazialmente né temporalmente all'evento.

Le foto delle code e dei marchi identificativi sono stati confrontati con le foto scattate in mare e conservate nei database internazionali (Pelagos Research Institute, GR; Tethys Institute, Italia, IFAW,). Grazie a questo confronto è stato possibile riconoscere tre soggetti, due osservati nelle acque del Mar Ligure, un terzo nella Fossa Ellenica nel Mar Ionio. Questo ha permesso di ipotizzare una migrazione tra i due bacini, distanti 1300-1600 km. Tale migrazione è stata quindi confermata dall'indagine degli isotopi stabili, effettuata presso il Dipartimento di Ecologia dell'Università di Palermo sui 7 capodogli: queste indagini confermano la provenienza Mediterranea, dimostrata mediante l'analisi genetica sul DNA mitocondriale e l'appartenenza al medesimo gruppo visto le composizioni isotopiche simili che suggeriscono un'elevata similarità nelle risorse alimentari utilizzate (Ruiz-Cooley et al., 2004; Marcoux et al., 2007).

Le differenze in $\delta^{13}\text{C}$ possono essere ricondotte al diverso contenuto

Introduzione

lipidico dei tessuti analizzati, infatti sebbene essi siano stati sottoposti al trattamento con cloroformio e metanolo. Mentre la presenza di variazioni a carico anche del $\delta^{15}\text{N}$ suggerisce possibili variazioni nella dieta a breve-medio e lungo termine. Infatti alcuni tessuti analizzati (cute, fegato) presentano tempi di *turnover* minori di altri (muscolo), fornendo indicazioni sulla dieta assunta nell'ultimo periodo. Di conseguenza, i dati isotopici permettono di differenziare tra la dieta assimilata negli ultimi 2-3 mesi (più impoverita in $\delta^{13}\text{C}$) e quella relativa a periodi anteriori in cui gli organismi si sono alimentati di altre prede, probabilmente perché presenti in altre aree (**Grafico n. 2**).

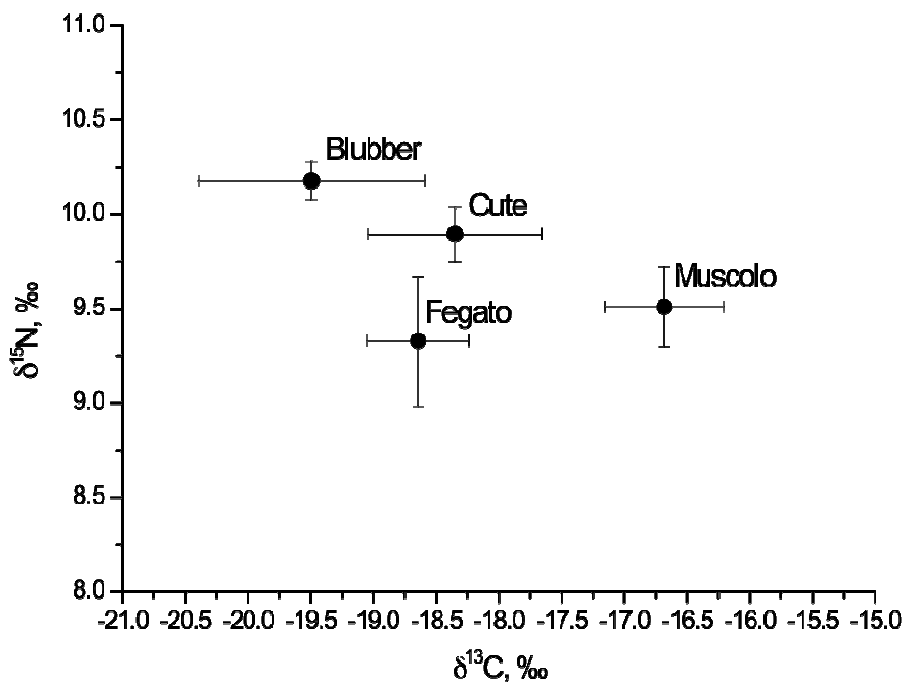


Grafico 2: Composizione isotopica media (\pm d.s.) dei vari tessuti negli esemplari analizzati.

Infine, il DNA estratto da tessuto cutaneo è stato utilizzato per indagini genetiche. Il sesso è stato definito attraverso l'analisi del gene SRY, e conferma la valutazione fatta sul campo: tutti gli individui sono di sesso maschile.

Oltre a scatenare le polemiche sull'eventuale responsabilità umana nell'evento, lo spiaggiamento del Gargano, per le sue peculiarità, ha sollevato numerosi interrogativi e ha messo in luce la complessità di

Introduzione

questi eventi. Infatti uno dei primi problemi da risolvere riguardava la gestione di quegli animali che si erano spiaggiati ancora vivi. Vista la mole dell'animale in questo caso ci si interrogava quale fossero le modalità di soppressione nel rispetto della sicurezza degli operatori e del successo dell'intervento eutanasico. Secondo le linee guida per l'eutanasia dell'AMVA (*American Veterinary Medical Association*) questa pratica dovrebbe essere effettuata da professionisti qualificati onde prostrarre dolore e sofferenza all'animale. Un metodo prevede l'utilizzo di anestetici, preferibilmente quelli utilizzati per l'eutanasia dei comuni mammiferi marini che sono i barbiturici e gli oppioidi potenti (Ex. Etorfina cloridrato uso in deroga). Benchè si riconosca che il loro utilizzo non sia sempre possibile e che può essere pericoloso per il personale. Un'altra tecnica è costituita dal colpo di arma da fuoco accuratamente infierito. Infine un'ultima modalità prevede la morte naturale. Qualora non siano disponibili altre opzioni e non si riesca a salvare l'animale l'eutanasia può essere considerata il metodo più etico per portare a morte l'animale rispetto al consentire la morte per soffocamento di un animale spiaggiato da ore o giorni. Una volta effettuati gli esami post-mortem il problema che si proponeva riguardava lo smaltimento delle carcasse degli animali. Va ricordato che le carcasse di cetacei, in termine igienico-sanitario, fanno riferimento al regolamento CE 1774/2002. La carcassa può essere affondata in mare al largo oppure interrata in spiaggia previo accertamento di assenza di rischio idro-geologico per le falde di acqua potabile usate dall'uomo e dagli animali. Lo scheletro in un secondo momento può essere recuperato per la musealizzazione.

Scopo



2. Scopo

Gli spiaggiati di massa dei mammiferi marini sono eventi di grande impatto sull'opinione pubblica e di difficile comprensione. Le cause di tali eventi, infatti, rimangono ancora misteriose nonostante le numerose ricerche e le varie ipotesi avanzate. Tali situazioni sono eventi piuttosto rari nel Mar Mediterraneo, in particolare quelle che coinvolgono specie di grandi dimensioni. Ecco perché il recente spiaggiamento (dicembre 2009) di 7 capodogli (*Physeter macrocephalus*) lungo le coste settentrionali del Gargano, in Puglia, ha scatenato una vasta eco e risonanza. Il coordinamento dell'intervento sulle carcasse per le indagini post-mortem è

stato affidato dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM) all'Unità per la necropsia dei grandi cetacei, istituita dal 2006 presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova, che ha collaborato con le varie realtà veterinarie nazionali e locali, oltre che con altri gruppi di ricerca e persone coinvolte nella conservazione dei cetacei. La coordinazione tra le varie professionalità ha permesso di ottenere una grande mole di informazioni sui dati relativi agli aspetti ecologici e biologici, e su quelli patologici, microbiologici e tossicologici. Tali risultati hanno permesso di formulare alcune ipotesi plausibili sulle cause del decesso dei capodogli e di incrementare notevolmente le conoscenze da utilizzare per la conservazione di questa specie. L'evento ha evidenziato la necessità di un'azione integrata tra i servizi veterinari pubblici, gli enti di ricerca e le istituzioni competenti al fine di rispondere, in queste situazioni di emergenza, a tutte le esigenze in campo, da quelle sanitarie a quelle di ricerca e di conservazione.

Lo scopo di questo elaborato è quello di analizzare, riportare le analisi e di valutarne i risultati delineando, con un approccio coordinato e multidisciplinare, quanto successo ai 7 capodogli (*Physeter macrocephalus*) spiaggiatisi sul litorale compreso tra Cagnano, Varano ed Ischitella (FG) nel Dicembre 2009. Nel lavoro verranno prese in considerazione le principali ipotesi di causa di spiaggiamento riportate in letteratura, focalizzando l'attenzione sul ruolo del mercurio nel capodoglio in particolare, e più in generale su altre specie affini di mammiferi marini attraverso un confronto in termini filogenetici, dietetici ed ecologici. L'evento avvenuto nel Gargano rappresenta un fatto eccezionale visto il numero degli animali coinvolti. A fronte di una limitata letteratura, la grossa quantità di dati messa a disposizione da questo avvenimento è utile non solo per capire meglio la biologia di questi animali, ma anche per avere utili informazioni sulle cause che hanno provocato lo spiaggiamento.



3. Materiali e metodi

I campioni di materiale utilizzati in questo studio provengono sia da prelievi eseguiti durante l'esame autoptico in Gargano sui 7 capodogli che si sono spiaggiati nel dicembre del 2009 lungo il litorale tra Cagnano Varano ed Ischitella (FG) sia da quelli provenienti dalla Banca Italiana Tessuti (BIT o MMBT), che ha sede presso il Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova.

(<http://www.mammiferimarini.sperivet.unipd.it/lanostrafilosofia/index.htm>).

La Banca è stata ufficialmente riconosciuta e finanziata dal Ministero dell'Ambiente Italiano e inserito nell'accordo ACCOBAMS. I tessuti preparati e conservati nella BIT sono accessibili a tutti coloro che ne necessitano su motivata richiesta scientifica. Nella BIT la ricerca dei campioni è gestita attraverso l'inserimento, in un software, di diversi codici che identificano il singolo campione, esemplare, organo, specie, provenienza e che specificano la modalità di conservazione, in congelato o già inclusi in paraffina solida. I patologi veterinari del Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria dell'Università di Padova, che collaborano con la BIT, hanno eseguito l'esame autoptico sugli esemplari giunti alla Banca come animali interi.

I dati relativi all'esame necroscopico inseriti in questo elaborato ad altri esami collaterali, sono stati raccolti dagli archivi del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova. Dal 2006 fino ad oggi ho potuto partecipare personalmente all'esecuzione di numerosi esami autoptici (dati necroscopici, iconografici ed esami collaterali) di soggetti spiaggiati compresi quelli del Gargano.

3.1. Campioni inseriti nell'elaborato

I campioni inseriti in questo elaborato provengono sia da tessuti che sono stati prelevati durante la necropsia dei 7 capodogli che si sono spiaggiati in Puglia sia da altri campioni che provengono dalla BIT. I 7 animali si sono arenati sul litorale compreso tra Cagnano, Varano ed Ischitella (FG), in circa 3,8 km di litorale il 10 dicembre del 2009. Alcuni animali si sono spiaggiati vivi e si presentavano disposti con il corpo parallelamente alla linea di costa.

Una volta accertato il decesso le carcasse sono state trascinate a riva dove sono stati eseguite le indagini post-mortem e le relative analisi collaterali sui tessuti. Queste indagini sono state eseguite solo agli animali

Materiali e metodi

numero 5, 6 e 7 in quanto gli altri soggetti si presentavano in avanzato stato di decomposizione ed era quindi impossibile effettuare il campionamento. Gli animali sono stati misurati servendosi di una cordella metrica dall'estremità craniale al centro della coda e quindi sono stati stimati i pesi ed individuate le età (vedere tabella . nel capitolo dei Risultati)

Per approfondire il ruolo del mercurio, ancora poco chiaro in questa specie, la sua partecipazione come causa nello spiaggiamento nonché la sua distribuzione negli organi di questi animali sono state eseguite delle indagini per la ricerca dei metalli pesanti e colorazioni speciali secondo i protocolli standard (riportati in appendice). Come mezzo di confronto le stesse analisi sono state eseguite anche in altri campioni di tessuti di mammiferi marini provenienti dalla BIT. In particolare sono stati analizzati campioni di Tursiope (*Tursiope truncatus*) essendo questa la specie più studiata ed avendo quindi a disposizione numerosi dati in letteratura, di grampo (*Grampus grisous*) visto che questa specie ha un'alimentazione simile a quella del capodoglio ed infine sono stati esaminati campioni di Balenottera comune del mediterraneo (*Balaenoptera physalus*) essendo questi animali probabilmente vicini filogeneticamente al capodoglio. Tale campioni vengono inseriti e riassunti in **tabella n. 2**.

Tabella 2: Campioni di mammiferi marini utilizzati come mezzo di confronto

ID ANIMALE	SPECIE	LUOGO/ANNO RITROVAMENTO	SESSO	LUNGHEZZA
116	Grampo (<i>Grampus grisou</i>)	2007 Cattolica, RI	M Adulto	2,91 m
95	Tursiope (<i>Tursiope truncatus</i>)	2006 Jesolo, VE	F Adulta	2,85 m
165	Tursiope (<i>Tursiope truncatus</i>)	2009 Lido Adriano	M	-
109	Balenottera comune del Mediterraneo (<i>Balaenoptera physalus</i>)	2006 Finale ligure	M Neonato	5,57 m
134	Balenottera comune del Mediterraneo (<i>Balaenoptera physalus</i>)	2008 Giannella, Porto S. Stefano GR	M Sub-adulto	10,4 m
141	Capodoglio (<i>Physeter macrocephalus</i>)	2008 Piombino LI	F Adulta	9,77 m

3.2. Protocollo necroscopico


L'esame autoptico veniva svolto da vari professionisti qualificati nel settore della veterinaria che vista l'unicità dell'evento si sono recati presso il luogo dello spiaggiamento per effettuare la necroscopia. Gli animali sono stati analizzati seguendo un protocollo standardizzato dai patologi veterinari ed in linea con le principali direttive internazionali della WHOI (*Woods Hole Oceanographic Institution*) (Pugliares et al., 2007).

Dopo aver misurato la lunghezza totale dell'animale con cordella metrica si procedeva alla rilevazione dei restanti rilievi biometrici. Tale dati così


Materiali e metodi

ottenuti venivano inseriti nella scheda di segnalazione fornita dal Centro Studi Cetacei (**Scheda n. 1**). Inoltre veniva valutato lo stato di conservazione della carcassa secondo i parametri elencati da Geraci e Lonsbury (2005) (**Tabella n. 3**). Quindi venivano effettuate delle foto della pinna caudale utili per la fotoidentificazione dell'animale. Durante queste operazioni si valutavano le eventuali lesioni esterne, si rilevava la presenza di ectoparassiti e si esaminavano gli orifizi esterni (cavità orale, sfiatatoio, fessura genitale, orifizio anale, fessure mammarie); ci si accertava, inoltre, dello stato di nutrizione osservando il profilo del corpo caudalmente allo sfiatatoio e nella regione del torace.

Scheda 1: Scheda di segnalazione del Centro Studi Cetacei




CENTRO STUDI CETACEI
Associazione italiana per lo studio e la tutela delle specie marine
www.centrostudicetacei.org




MUSEO DI STORIA NATURALE DI MILANO
Via Sallustiana, 2 - 20121 Milano - Tel. 02 80463281
www.museo.storiadimilano.it

Pag. 1/3



CENTRO STUDI CETACEI
Associazione italiana per lo studio e la tutela delle specie marine
www.centrostudicetacei.org



MUSEO DI STORIA NATURALE DI MILANO

Pag. 2/3

Specie _____ Codice _____

DATA PRIMO RIVULIMENTO _____

LOCALITÀ _____ COMUNE _____ PROVINCIA _____

COORD. GEOG. _____

Nome, cognome, indirizzo, Foto di appartenenza di chi per primo ha segnalato l'evento: _____

Sex: M F Lunghezza totale in cm _____ neonato adulto poco _____ (vedi nota 1)

Esemplare vivo:
Vivo e ospalizzato Vivo e poi deceduto dato _____

Esemplare deceduto:
fresco in decomposizione iniziale in decomposizione avanzata mummificato

Esemplare rinvenuto:
sulla costa in mare

Data e luogo della ricognizione (specifica il sito): _____

Partecipanti alla ricognizione _____
(vedi nomenclatura)

Carcassa recuperata per studio e ricerca Simulato Segnalato a _____

Neopsicopio effettuata da _____
(luogo, data)

Dissezione e/o campionamento effettuato da _____

Parti conservate _____

ciò Museo-Istituto _____

Fotografie e/o video _____

Ripetere il riempimento di informazioni nelle caselle seguenti (su 2) tutte o in parte ricompiendo alla pag. 2

Indirizzo: Museo di Storia Naturale di Milano, viale Dr. Michela Pizzetti
Corso Venezia 50 - 20121 Milano - Tel. 02 80463281
www.museo.storiadimilano.it

S.O.S. Malattie e Conservazione 02-80463281 - E-mail: Assolam@stn.it



- 1- Lunghezza corporea (anteriore ed epa - parte anteriore del tronco) e (posteriore ed epa - parte posteriore del tronco) misurata fino all'ultimo vertebra del lussurem
- 2- Estensione anteriore del corpo - (estensione anteriore della pinna pettorale) _____
- 3- Estensione anteriore del tronco - (estensione anteriore della bocca) _____
- 4- Estensione anteriore del tronco - (mandibola anteriore) della bocca _____
- 5- Estensione anteriore del tronco - (mandibola anteriore) della bocca _____
- 6- Lunghezza dell'occhio _____
- 7- Estensione anteriore del tronco - (estensione anteriore della mandibola) _____
- 8- Estensione anteriore del tronco - (estensione anteriore della mandibola) _____
- 9- Estensione anteriore del tronco - (estensione anteriore della pinna dorsale) _____
- 10- Lunghezza massima della pinna dorsale _____
- 11- Lunghezza massima della pinna dorsale _____
- 12- Diametro cranio e occhio della bocca _____
- 13- Lunghezza della pinna dorsale alla base _____
- 14- Altezza della pinna dorsale _____
- 15- Estensione posteriore della pinna caudale - (senza lobe) della coda _____
- 16- Altezza del corpo al margine superiore dell'occhio _____
- 17- Altezza del corpo al margine superiore della pinna pettorale _____
- 18- Altezza del corpo all'estremità anteriore della pinna dorsale _____
- 19- Lunghezza della pinna caudale _____
- 20- Lunghezza massima della pinna pettorale _____
- 21- Lunghezza della pinna pettorale (ca. 1/3 estensione anteriore) _____
- 22- Lunghezza della pinna pettorale (ca. 1/3 estensione anteriore) _____
- 23- Lunghezza della pinna caudale _____
- 24- Obliquità - (senza lobe) della coda _____
- 25- Rapporto medio della pinna caudale - (senza lobe) della coda _____
- 26- Obliquità - (senza lobe) della pinna caudale (ca. 1/3 estensione anteriore) _____
- 27- Obliquità - (senza lobe) della pinna caudale (ca. 1/3 estensione anteriore) _____
- 28- Obliquità - (senza lobe) della pinna caudale (ca. 1/3 estensione anteriore) _____

Tabella 3: Classificazione dello stato di conservazione degli individui spiaggiati (Geraci & Lonsbury, 2005).

GRADO DI CONSERVAZIONE	DEFINIZIONE	CARATTERISTICHE
Categoria 1	Animale vivo	Animale spiaggiatosi vivo, morto in un secondo momento, del quale è stata effettuata la necropsopia subito dopo la morte.
Categoria 2	Carcassa in buone condizioni	odore fresco, morfologia normale, minima disidratazione della pelle, degli occhi e delle mucose; lingua e pene non protrudenti; <i>blubber</i> integro, bianco e semi-traslucido; muscoli integri, rosso scuro, ben definiti; visceri intatti e ben definiti; encefalo integro, caratteristiche superficiali distinguibili.
Categoria 3	Decomposto, ma con organi essenzialmente intatti	carcassa intatta; pene e lingua protrudenti; possibili lesioni <i>post mortem</i> ; leggero odore sgradevole; mucose secche; occhi scavati o mancanti; <i>blubber</i> contenente sangue ed oleoso; muscoli e visceri rilasciati e poco definiti; intestino contenente gas; sangue rosso scuro; encefalo molle e fragile.
Categoria 4	Decomposizione avanzata	carcassa quasi intatta, ma collassata; l'epidermide può essere completamente mancante, severi danni <i>post mortem</i> ; forte odore sgradevole; <i>blubber</i> molle, oleoso e spesso con tasche contenenti gas; muscoli molli, strappati e cadenti; sangue scuro; visceri spesso identificabili, ma difficili da sezionare; intestino con molto gas; encefalo color rosso scuro con tasche di gas e di consistenza molle.
Categoria 5	Mummificato o resti scheletrici	pelle stesa sui resti scheletrici, resti di tessuto seccati.

Le carcasse degli esemplari sono state portate a riva dove è stata effettuata l'autopsia. Per dare una valutazione oggettiva e comparabile dello stato di nutrizione veniva effettuata la misurazione dello spessore del *blubber* misurato in mm, a livello dorsale, medio e ventrale, a livello dell'inserzione caudale della pinna dorsale.

Materiali e metodi

Con l'ausilio di coltelli a lama panciuta di medie e grandi dimensioni si praticavano tagli orizzontali ed alcuni verticali. Quelli orizzontali iniziavano dall'estremità craniale e si portavano al centro della coda dorsalmente oppure a livello della regione genitale ventralmente. Gli altri tagli verticali, praticati in serie, venivano realizzati partendo dal condotto uditivo esterno fino agli organi genitali. Venivano praticati una serie numerosa di tagli verticali vista la mole degli animali e la quantità di *blubber* da asportare. Il cinto toracico veniva quindi asportato utilizzando uncini e coltelli a sciabola per mettere in evidenza i linfonodi pre-scapolari che venivano quindi recuperati ed immersi in formalina. Forando i muscoli ed i legamenti presenti tra le 2 coste, si creava una finestra sul lato visibile per accedere alla cavità toracica, valutando l'eventuale presenza di liquidi ed i rapporti tra gli organi, i quali venivano fatti a pezzi o asportati per intero a seconda del peso quindi, lavati in bacinelle di dimensioni adeguate, pesati, fotografati e campionati. Venivano quindi opportunamente esaminati per rilevare la presenza di alterazioni di forma, colore e consistenza. Gli organi cavi (cuore, trachea, esofago) venivano incisi con una forbice per permetterne l'osservazione del lume e della parete interna ed il prelievo di eventuale materiale patologico o parassito in essi presente. In particolare, il cuore dopo una prima ispezione esterna veniva esteriorizzato per analizzare più a fondo le camere cardiache ed i lembi valvolari. Veniva inoltre misurato lo spessore del ventricolo destro e sinistro. Gli organi parenchimosi (linfonodi e polmoni) ed il tessuto muscolare venivano tagliati sia dove si riscontravano alterazioni, sia sul tessuto sano eseguendo una serie di tagli trasversali e paralleli: questa operazione aveva la finalità di rilevare la presenza di lesioni profonde non valutabili esternamente, parassiti ed essudato. I linfonodi mediastinici una volta ispezionati esternamente ed internamente venivano tagliati "a panino"; questa tecnica prevede che con una mano si tenga fermo l'organo avvolto nella carta per farlo scivolare meno mentre con l'altra servendosi di un coltello a lama panciuta di piccole dimensioni si pratica un taglio longitudinale dal margine convesso. Era così possibile osservare il

Materiali e metodi

rapporto tra corticale e midollare ed eventuali alterazioni.

Si procedeva quindi all'incisione della cavità addominale, rilevando l'eventuale presenza di liquido ascitico, la corretta topografia degli organi e eventuali forme parassitarie. Uno dei primi organi che venivano esaminati se possibile era la milza. Servendosi di un coltello con lama panciuta l'organo veniva inciso per mettere in evidenza il rapporto tra corticale e midollare ed eventuali alterazioni nella forma, volume, colore e consistenza. Viste le dimensioni degli organi presenti sono state recuperate porzioni di fegato e di rene che venivano riposte in un contenitore, lavate e quindi ispezionate esteriormente per ricercare eventuali alterazioni di colore e consistenza del parenchima. In esse successivamente si eseguivano dei tagli ispettivi per andare ad analizzare la presenza di eventuali lesioni patologiche o forme parassitarie. Il contenuto intestinale di 6 soggetti su 7 (tranne il 2) è stato recuperato per essere analizzato in altre sedi.

Dopo aver asportato la cute ed parte dell'organo dello spermaceti ed aver pulito le superfici ossee del neurocranio, si procedeva all'apertura della scatola cranica mediante sega oscillante per permettere l'estrazione dell'encefalo intero. Operazione che è risultata essere davvero ricca di problemi vista la mole dell'animale. In seguito, dall'arcata mandibolare venivano prelevati alcuni denti destinati alla determinazione dell'età.

Per prelevare il midollo spinale si scollavano tutti i muscoli assiali dorsali, esponendo così i processi vertebrali trasversi e gli archi vertebrali, dall'articolazione atlanto-occipitale alla prime vertebre lombari comprese. Mediante un bisturi ed una pinza atraumatica si scollavano le meningi e si prelevava il midollo.

Durante tutte queste operazioni venivano prelevati dei campioni, sia in corrispondenza delle lesioni riscontrate sia dei tessuti sani per effettuare gli esami istopatologici, virologici e batteriologici. Tutte le alterazioni rilevate durante la necropsia venivano descritte per ogni soggetto in un'apposita scheda, per poter essere utilizzate in seguito per una diagnosi morfologica macroscopica.

Il protocollo necroscopico prevede anche un approccio dorsale ed uno ventrale che in questo caso non sono stati realizzati visto che l'esame autoptico si è svolto in spiaggia e le dimensioni dell'animale non hanno previsto altri spostamenti una volta posizionato.

Il decubito dorsale viene utilizzato quando la freschezza del campione permetteva alla BIT di raccogliere più campioni possibili da numerosi tessuti, compreso l'intero sistema nervoso centrale, garantendo le corrispondenze anatomiche.

Infine l'approccio ventrale viene utilizzato solo quando, per scopi museali, è richiesta l'integrità delle strutture ossee e non è quindi necessaria l'apertura del canale vertebrale.

3.3. Prelievo e conservazione dei campioni

3.3.1. Istopatologia

Durante l'esame autoptico, mediante l'utilizzo di pinza e bisturi o forbice, venivano prelevati campioni di tessuto da ogni organo in maniera casuale delle dimensioni di circa 1-2 cm³. Se invece si riscontravano lesioni il prelievo era mirato a prendere le parti dell'alterazione che sembravano essere più significative o addirittura l'intera lesione. Il campione veniva prelevato con l'utilizzo di pinze, bisturi o forbici per non danneggiare l'area patologica presente.

I campioni prelevati venivano conservati in barattoli con coperchio a pressione, destinati alla BIT, su cui veniva riportato il codice banca, l'ID e l'organo, data e luogo dell'esecuzione della necropsia. Ogni barattolo veniva quindi riempito con formalina al 10%, un fissativo non coagulante costituito da formaldeide in soluzione acquosa. Il rapporto tra fissativo usato ed il campione era di 10:1. I tessuti rimanevano in formalina per almeno due giorni per ottenere una fissazione completa. Per l'encefalo ed i campioni di altre parti di tessuto nervoso era richiesto un rapporto fissativo:campione maggiore (20:1) e tempi di fissazione più lunghi (minimo 15 giorni). Per favorire la penetrazione del fissativo venivano

effettuati con una lama opportuna dei tagli trasversali sulle porzioni di campione più spesse.

3.3.2.Citologia

Quando nelle cavità sierose si rilevava la presenza di liquido (essudato o trasudato), questo veniva raccolto in un contenitore per valutarne il volume. Il liquido raccolto in è stato successivamente analizzati in altre sedi.

3.3.3.Batteriologia

Durante l'esame necroscopico sono stati prelevato campioni di una lesione con sospetta eziologia batterica. Si effettuavano quindi prelievi utilizzando un tampone sterile monouso. Venivano effettuate delle incisioni sul tessuto o sull'organo sospetto con lama da bisturi sterile. Il tampone veniva così inserito in profondità, raschiato e quindi rimosso prestando attenzione a non inquinarlo ed infine inserito nell'apposito terreno di trasporto amies (Venturini Transystem).

3.3.4.Parassitologia

Esemplari di tutte le specie di parassiti rilevate macroscopicamente durante l'esame autoptico venivano conservate in etanolo 70% per l'identificazione. Quando associati alla lesione si procedeva alla loro fissazione in formalina 10% per l'esame istopatologico

3.3.5.Tossicologia

Il prelievo per gli esami tossicologici era mirato ad alcuni organi target, ovvero *cute-blubber* (adipe sottocutaneo), muscolo, fegato e gonadi. Porzioni di questi tessuti (minimo 10 g) venivano prelevati per mezzo di

pinza e bisturi, avvolti in fogli di carta stagnola opportunamente contrassegnati con codice ID ed organo, e conservati congelati a -80°C fino alla loro utilizzazione per le analisi. Le indagini ecotossicologiche effettuate hanno riguardato sia la quantificazione che la qualificazione di alcuni xenobiotici clorurati: HCB, dei PCB e dei PAHs, tutti considerati prioritari dall'US EPA ed alcuni di questi conosciuti come potenti cancerogeni.

3.4. Valutazione dell'età e del peso

Come già descritto nel paragrafo precedente "Protocollo necroscopico", durante l'autopsia venivano rimossi alcuni denti dalle arcate mandibolari che venivano congelati a -20°C. Per la valutazione della stima dell'età di questi mammiferi marini è stata letta in triplo la deposizione degli strati di dentina dai denti estratti e facendo corrispondere ad ogni strato di dentina a 2 anni secondo Berzin o a 1 anno secondo Lockyer.

La stima del peso è stata fatta utilizzando una formula universalmente riconosciuta che sfrutta la lunghezza totale dell'animale. Il peso reale delle carcasse è stato valutato durante le fasi di spostamento per lo smaltimento e la sua correzione, che tiene conto dei fluidi e tessuti persi durante lo spostamento e la necroscopia, è stata fatta moltiplicando il peso reale per 1,14. La stima e la correzione sono stati fatti basandosi sulle formule ricavate in letteratura (Lockyer, 1991).

3.5. Emboli gassosi e lipidici

Le analisi effettuate in tessuti di capodogli raccolti durante la necroscopia per lo studio degli emboli gassosi hanno previsto il prelievo, mediante siringhe, di bolle gassose che in seguito sono state analizzate. Il prelievo deve essere eseguito il prima possibile (meglio se entro le 12 ore dalla morte) per non avere un risultato errato dovuto al processo autolitico che

avviene nei tessuti biologici. La tecnica migliore invece per dimostrare la presenza di emboli grassi è quella di utilizzare l'osmio dopo la fissazione in paraffina dei campioni. Per la realizzazione di questo studio sono stati effettuati prelievi di polmone, sangue e mesentero dei soggetti 5,6 e 7.

3.6. Biotossine algali

Lo studio per la valutazione delle biotossine algali è stato effettuato tramite uno studio *in vivo* utilizzando topi albini del peso di 20g a cui sono stati somministrati per via intraperitoneale estratti di fegato di capodoglio (6 e 7).

3.7. Prove biologiche

Per valutare il ruolo delle sostanze chimiche reperite nei tessuti sono state effettuate alcune prove biologiche *in vivo*.

Tali esperimenti sono stati realizzati tramite studi *in vivo* su topi di laboratorio ed esemplari di *Gambusia Affinis* e *in vitro* utilizzando colture cellulari primarie di fibroblasti.

Il primo studio *in vivo* prevedeva l'utilizzo di estratti di fegato o fegato somministrati per via intraperitoneale e orale. Infatti, ad alcuni animali venivano inoculati per via intraperitoneale estratti di fegato di capodogli 6 e 7. Ad altri soggetti sono state somministrate per via orale quote crescenti (2g e 4g pro capite) di fegato dei capodogli 6 e 7.

Le colture cellulari primarie di fibroblasti di 2 esemplari di capodoglio (esemplare 6 e 7), sono state trattate ciascuna con l'estratto di fegato del rispettivo esemplare per valutare la presenza e la tossicità di biotossine algali liposolubili presenti nel fegato dei capodogli al fine di stabilire l'eventuale ruolo di queste tossine sulla morte degli animali. Tale trattamento *in vitro* ha permesso di avere un dato di tossicità direttamente sulla stessa specie e non su altre tassonomicamente molto distanti, anche

Materiali e metodi

se con limitazioni classiche di qualunque test *in vitro*. L'estrazione delle biotossine liposolubili è stata effettuata su materiale epatico congelato a -20°C, seguendo la metodica indicata in Gazzetta Ufficiale N. 165 del 16 Luglio 2002 (MINISTERO DELLA SALUTE, DECRETO 16 maggio 2002 - Tenori massimi e metodiche di analisi delle biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini).

Il piano sperimentale ha previsto il trattamento di 4 flask da 200 ml a confluenza, 2 con colture cellulari dell'esemplare n. 6 e 2 con colture cellulari dell'esemplare n. 7, tutte alla terza generazione. 1 flask per animale è stata trattata con estratto del rispettivo fegato e 1 flask per animale è stata trattata con il veicolante (bianco chimico) utilizzato per le tossine liposolubili, cioè il Tween 60. Successivamente le colture cellulari sono state trattate con un omogenato in soluzione fisiologica di fegato di 2 esemplari di capodoglio (n. 6 - PM6 - e n. 7 - PM7) e, come bianco sperimentale, di un esemplare di maiale, 2 colture cellulari di fibroblasti degli esemplari 6 e 7. Quattro provette da 15 ml a confluenza (terza generazione), 2 dell'esemplare 6 e 2 dell'esemplare 7, sono state così trattate: una n. 6 con omogenato di maiale (1g/L), una PM6 con omogenato di fegato del soggetto 6, una PM7 con omogenato di maiale (1g/L), una PM7 con omogenato di fegato del soggetto 7.

E' stato infine realizzato un secondo studio *in vivo* utilizzando 80 esemplari di *Gambusia affinis* suddivisi in quattro gruppi sperimentali. Questi animali sono stati esposti ad omogenato in soluzione fisiologica di fegato dei 2 capodogli (numero 6 e 7) e come bianco sperimentale un esemplare di maiale. Il primo gruppo (20 pesci) mantenuto in acqua pura come Gruppo Controllo, un secondo gruppo (20 pesci) mantenuto in acqua con omogenato di fegato di maiale (1g/L) come Controllo Sperimentale, un terzo gruppo (20 pesci) mantenuto in acqua con omogenato di fegato di PM6 (1g/L) ed un quarto gruppo (20 pesci) mantenuto in acqua con omogenato di PM7 (1g/L). Tutte le vasche sono state adeguatamente ossigenate durante tutto il tempo sperimentale

3.8. Preparati istologici: preparazione dei campioni

3.8.1. Riduzione dei preparati

I campioni di tessuto fissati in formalina che erano stati prelevati durante l'autopsia dopo essere stati nel fissativo per un tempo adeguato venivano così ridotti utilizzando delle lame da bisturi modificate. Le dimensioni del pezzo dovevano essere adatte per l'inserimento in apposite cassette monouso di resina acetlica per istologia, dette "biocassette" (BIOPTICA s.p.a.). La riduzione, o *trimming* (dall'inglese *to trim*, tagliare), veniva eseguita in modo tale che la superficie di taglio della parte di lesione o di tessuto che si voleva esaminare poggiasse sul fondo della biocassetta, secondo l'orientamento ed il piano di sezione desiderati.

Sui lati esterni della biocassetta venivano riportati in matita i due codici di registrazione del soggetto (codice banca e codice ID) e l'organo, in modo da permettere l'individuazione del campione. Tali dati venivano successivamente riportati sulla parte smerigliata del vetrino.

Nel caso in cui i campioni contenessero delle calcificazioni o delle strutture ossee che rendessero difficili le operazioni di taglio, questi venivano immersi per almeno 48 ore in una soluzione decalcificante (50 ml acido formico 100%, 40 ml acido cloridrico 37%, 1000 ml acqua distillata).

3.8.2. Inclusione in paraffina (processazione)

I campioni, sistemati nelle biocassette, venivano disidratati ed inclusi in paraffina tramite un processatore per tessuti biologici automatico (Citadel; SHANDON), che eseguiva un ciclo di passaggi della durata complessiva di 18 ore. Tale ciclo prevede un lavaggio in acqua corrente per 15 minuti e l'immersioni in alcol a concentrazioni scalari: un passaggio in alcol 70% per 90 minuti, due passaggi consecutivi in alcool 90% per 60 minuti, due passaggi consecutivi in alcool puro per 60 minuti ciascuno. Tutti i passaggi

venivano eseguiti a temperatura ambiente. Successivamente si effettuavano due passaggi in xilolo in stufa termostata a 35°C di 75 minuti ciascuno e tre passaggi consecutivi in bagni di paraffina a 60°C: i primi due della durata di 60 minuti, il terzo della durata di 30 minuti. Terminata la processazione, i campioni ottenuti in ogni singola biocassetta venivano prelevati e montati in blocchetti di paraffina solida adattabili su microtomo per taglio utilizzando un'apposita centralina di inclusione (Embed 503; KALTEK s.r.l.) che consente fusione e successivo raffreddamento della paraffina stessa.

3.8.3.Taglio

Per il taglio delle sezioni è stato utilizzato un microtomo rotativo retrattile (AS 325, SHANDON), mediante il quale venivano preparate sezioni di 4 µm (per i campioni di tessuto renale il taglio veniva eseguito a 3 µm). Usando un pennellino bagnato, le sezioni dei campioni venivano immerse in acqua fredda, raccolte con il vetrino porta-oggetti per istologia, reimmerse in acqua distillata a temperatura di 45-48 °C e quindi fatte aderire nuovamente al vetrino (tali passaggi servivano ad eliminare le eventuali pieghe della sezione formatesi durante il taglio al microtomo). Dopo aver lasciato asciugare il vetrino a temperatura ambiente, questo veniva mantenuto in stufa a 60°C per almeno 30 minuti.

3.8.4.Colorazione di base con ematossilina-eosina (EE)

Dopo essere stati collocati in stufa per almeno 30 min, prima di procedere con la colorazione, i vetrini subivano un processo di reidratazione per togliere la paraffina, per mezzo di una macchina (Autostainer, LEICA) appositamente programmata che sottopone le sezioni a due bagni consecutivi di xilolo 100% di 5 minuti ciascuno, quindi a bagni di 3 minuti ciascuno in una scala di alcol a concentrazione decrescente (100%, 90%, 75%, 50%) ed infine ad un lavaggio in acqua distillata. Tutte le sezioni preparate sono state sottoposte ad una colorazione di base con ematossilina-eosina (EE), utilizzando un coloratore automatico (Autostainer, LEICA) che esegue i seguenti passaggi: immersione in

ematossilina per 7 minuti; due lavaggi consecutivi in acqua corrente per 5 minuti; immersione in eosina in soluzione alcolica per 60 secondi; disidratazione nella scala crescente degli alcoli (70%, 75%, 90%, 100%); passaggio finale in xilolo puro.

Appena terminato tale processo, sul vetrino porta-oggetto, all'altezza della sezione colorata, veniva fatto aderire un vetrino copri-oggetto usando una colla montante sintetica per preparati istologici, solubile in xilolo (Eukitt, BIOPTICA s.p.a.).

I vetrini così preparati venivano quindi osservati al microscopio ottico (MO) a vari ingrandimenti e tutte le alterazioni istopatologiche riscontrate a carico dei singoli organi o tessuti erano riportate per ogni soggetto nella scheda in cui erano già stati inseriti i rilievi macroscopici e la diagnosi morfologica macroscopica (se effettuata). Quindi veniva scritta la diagnosi morfologica istopatologica.

3.9. Colorazioni specifiche

Le colorazioni che sono state effettuate in tutti i campioni istologici di capodoglio e degli altri mammiferi marini provenienti dalla BIT usati come confronto sono state: 1) colorazione di Danscher, 2) colorazione di Schmorl, 3) colorazione di Sali di Piombo (Secondo Lillie), 4) PAS (Periodic Acid Schiff), 5) Gram e 6) Giemsa (vedere protocollo appendice 2).

La prima nota anche come autometallografia, viene utilizzata per mettere in rilievo la presenza alcuni metalli nei tessuti inclusi in paraffina (oro, argento, zinco e mercurio). Il particolare protocollo usato colora i depositi di solfuro e seleniuro di mercurio (Danscher and Moller-Madsen, 1985) e deve sempre essere correlata con tecniche di rilevamento a raggi X (proton o electron induced X-ray emission analysis). La colorazione di Schmorl evidenzia depositi di pigmenti bruno scuri segnalati come lipofuscina. Alle due colorazioni è stato dato un codice che descrive la quantità di mercurio e lipofuscina rinvenuti (da 1 – assente a 4 – presente in elevata quantità per la tecnica auto metallografica; assente/presente per

Materiali e metodi

la tecnica di rilievo della lipofuscina). La distribuzione del mercurio nei preparati istologici trattati con colorazione di Danscher è stata valutata mediante l'utilizzo di un microscopio (Microscopio Leica DME con fotocamera digitale Leica EC3 con monitor raffigurante il software LAS EZ). Utilizzando un obiettivo 40x si evidenziavano depositi cellulari di mercurio nei diversi tessuti analizzati. Il primo campo visivo utilizzato per il conteggio dei tale depositi è stato scelto basandosi su quello che la letteratura suggerisce essere il maggiore sito di ritrovamento del mercurio. Successivamente gli stessi depositi venivano contati in 10 campi visivi diversi. È stata creata una tabella (**Tabella n. 4**) per valutare il grado di distribuzione del mercurio nei campioni analizzati. La media della distribuzione osservata nei 10 campi visivi diversi è stata comparata con la tabella creata. La PAS (Periodic Acid Schiff) è una reazione che evidenzia i polisaccaridi neutri (glicogeno, mucina). La colorazione di Giemsa si basa sulla differenziazione dei costituenti cellulari che hanno reazione basica, i quali fissano l'eosina (acida)colorandosi in rosso-arancio questa colorazione migliora la struttura cellulare mettendo in evidenza protozoi e microrganismi. Ed infine la colorazione Gram che serve per mettere in evidenza microrganismi gram +/-.

Tabella 4: Codice distribuzione del mercurio

NUMERO DEPOSITI CELLULARI DI MERCURIO	CODICE DI DISTRIBUZIONE
0 – 5	0 – Assente
5 – 10	1 - Presente in esigua quantità
10 – 15	2 – Presente in piccola quantità
15 – 20	3 – Presente in media quantità
> 20	4 – Presente in elevata quantità

3.10. Microscopio elettrico a scansione (ESEM)

Si tratta di un sistema integrato in cui per la prima volta si realizza l'assemblaggio di un microscopio elettronico a scansione (ESEM) con uno spettrometro a dispersione di energia che utilizza un rivelatore a superconduttore.

Il microscopio è di tipo SEM con sorgente a emissione di campo (FEG) e consente di ottenere risoluzioni spaziali dell'ordine di alcuni nanometri.

L' ESEM permette di lavorare in modalità "ambientale" ossia può analizzare campioni in uno stato del tutto incompatibile con l'applicazione della microscopia elettronica a scansione convenzionale: campioni umidi/bagnati, campioni ricoperti da olii, emulsioni, spore, pollini, etc..L'EDS con rivelatore a superconduttore - di nuovissima concezione rispetto ai tradizionali rivelatori a semiconduttore - permette di effettuare analisi elementale a fluorescenza X ad altissima risoluzione (circa 10 volte superiore) riducendo sostanzialmente la quantità di analisi da effettuare, la quantità di materiale da utilizzare, il tempo di esposizione ed il danneggiamento.

Il sistema integrato ESEM-EDS ad elevata risoluzione permette di acquisire informazioni morfologiche e strutturali sulle più svariate tipologie di materiali e nei più vari stati di conservazione ed identificare le specie atomiche presenti, fino agli elementi più leggeri, quantificandone la presenza. La migliore sensibilità consentirà di lavorare su piccole quantità di materiale e di minimizzare, fino in alcuni casi a ridurre a zero, l'invasività.

I campioni analizzati da questa apparecchiatura provenivano da linfonodi e fegato del soggetto n.6. Il tessuto fresco tagliato, con uno spessore di 3 millimetri, è stato appoggiato su un film di plastica trasparente per essere poi analizzato dal microscopio.

Materiali e metodi

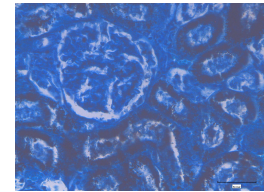
Di seguito viene riportata una tabella riassuntiva che indica il tipo di esame che è stato eseguito, su quale campione e l'ente coinvolto (**Tabella n. 5**).

Tabella 5: Enti che hanno fornito il loro contributo per le analisi sui campioni di capodoglio

PROVE	CAMPIONE	ENTE
Virologia/sierologia	Polmone, Coagulo cardiaco, Fegato, Rene, Intestino (soggetti 5,6 e 7)	Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete - Università di Teramo; Dipartimento di Sanità Pubblica e Benessere degli Animali - Università di Bari.
Microbiologia	Blubber, Linfonodi prescapolari, Polmoni, Linfonodi polmonari, Coagulo cardiaco, Fegato, Rene, Intestino, Altri organi (soggetti 5,6 e 7)	Unità Operativa Diagnostica IZS della Puglia e della Basilicata; Dipartimento di Sanità Pubblica e Benessere degli Animali - Università di Bari; Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete - Università di Teramo.
Tossicologia e biotossine	Cute, Blubber, Muscolo, Fegato, Rene, Contenuti stomacali, (soggetti 5,6 e 7) Cute, Blubber, Muscolo (soggetti 1,2,3,e 4)	Dipartimento di Scienze Ambientali Università di Siena; Unità Operativa Diagnostica IZS della Puglia e della Basilicata ; Centro di Ricerche Marine – Cesenatico; Università di Catania. Pelagos Research Institute; Università di Genova
Parassitologia	Cute, Blubber, muscolo, Polmone, Fegato, Contenuti stomacali, S.N.C (soggetto 6) , Parassiti, Gonadi, Mesentere (soggetti 5,6 e 7) Blubber, Contenti stomacali (soggetti 1,2,3,e 4)	Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie - Università di Padova; Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica - Università la Sapienza di Roma; Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile, Università della Tuscia - Viterbo.
Istopatologia	Cute, Blubber, Muscolo, Linfonodi prescapolari, Polmone, Linfonodi polmonari, Cuore, Fegato, Milza (soggetto 5) , Pancreas (soggetto 6) , Rene, Stomaco, Intestino, S.N.C (soggetto 6) , Parassiti, Gonadi, Mesentere, Altri organi	Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria - Università di Padova; Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete - Università di Teramo; Unità Operativa Diagnostica IZS della Puglia e della Basilicata

Materiali e metodi

	(soggetti 5,6 e 7)	
Genetica	Cute (soggetti 5,6, e 7)	Università di Firenze; Università di Palermo
Età	Denti, Gonadi (soggetti 5,6 e 7) Denti (soggetti 1,2,3 e 4)	Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie - Università di Padova.
Alimentazione	Blubber, Contenuti stomacali (soggetti 1,2,3,4,5,6 e 7)	Museo di Storia Naturale di Milano; Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie - Università di Padova
Analisi emboli	Polmone, Sangue, Mesentero (soggetto 5,6 e 7)	Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC); Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria - Università di Padova



4. Risultati

In questo capitolo vengono riportati i risultati effettuati sia su tessuti di animali che si sono piaggiati in Puglia sia di altri campioni di mammiferi marini provenienti dalla BIT. I 7 capodogli si sono spiaggiati lungo un tratto di litorale sabbioso di circa 3,8 (vedere cartina) tra Cagnano, Varano (2 animali) ed Ischitella (5 animali). Gli animali si sono spiaggiati tutti vivi ed erano parzialmente ricoperti d'acqua per cui per respirare dovevano alzare la testa. Intorno al corpo dell'animale si era venuta a formare una fossa che rendeva difficile l'avvicinamento. Tutti i soggetti erano disposti con il corpo parallelamente alla linea di costa.

Gli animali sono stati numerati da 1 a 7 partendo dal più meridionale e vicino al porto canale di Foce Varano in agro di Ischitella verso la foce di

Risultati

Capoiale in agro di Cagnano Varano, con gli esemplari da 1 a 5 nel territorio del primo comune e i soggetti 6 e 7 in quello del secondo. Tale numerazione sembrava rispettare l'ordine di spiaggiamento e/o decesso. Infatti i numeri da 1 a 4 sono stati ritrovati morti o in fase agonica (possibilmente il soggetto 2, in considerazione del ritardo degli eventi putrefattivi successivamente constatati), mentre i soggetti 5, 6 e 7 sono stati trovati ancora vitali ma nell'impossibilità di riprendere il largo.

Una volta accertato il decesso le carcasse sono state trasportate a riva dove è stata effettuata la necropsia.

Le necropsie complete sono state effettuate sugli individui 5, 6 e 7 in quanto gli altri soggetti si presentavano in avanzato stato di decomposizione e quindi era impossibile effettuare un campionamento. Per ogni animale è stato determinato un codice di conservazione della carcassa (da 1 - vivo o appena morto - a 5 - resti o carcassa mummificata) e di nutrizione (da 1 - cachettico - a 5 - obeso).

La lunghezza è stata misurata sulla spiaggia con una cordella metrica e corrisponde alla lunghezza lineare dall'estremità craniale al centro della coda. La stima del peso è stata determinata utilizzando una formula universalmente riconosciuta che sfrutta la lunghezza totale dell'animale. Il peso reale delle carcasse è stato valutato durante le fasi di spostamento per lo smaltimento e la sua correzione, che tiene conto dei fluidi e tessuti persi durante lo spostamento e la necropsia, è stata fatta moltiplicando il peso reale per 1,14. La maturità gonadica sugli individui 5, 6 e 7 è stata valutata al microscopio ottico osservando la presenza di spermatozoi maturi nel lume dei tubuli seminiferi. L'età è stata stimata leggendo la deposizione degli strati di dentina dai denti estratti da ciascun capodoglio (**Tabella n. 6**).

.

Risultati

Tabella 6: Dati biometrici e biologici capodogli

ANIMALE N.	LUNGHEZZA STANDARD	PESO STIMATO	PESO REALE	PESO CORRETTO	ETÀ
1	11,2 m	18,9 t	13 t	14,8 t	25-25,5°
2	12,2 m	20,7 t	14 t	16 t	19-19,5°
3	11,3 m	16,7 t	12,5 t	14,8 t	20-20,5°
4	11,4 m	17,1 t	12 t	13,7 t	19-19,5°
5	10,5 m	13,7 t	14 t	16 t	15°
6	12,1 m	20,4 t	15,5 t	17,7 t	21°
7	11,2 m	16,3 t	13,8 t	15,7 t	20°

Nella figura che segue sono riportati i dati biometrici per ogni singolo animale, l'esatta distribuzione delle carcasse lungo la costa e le relative coordinate piane (**Figura n. 14**).

4.1. Report necroscopici capodogli

Nelle schede che seguono vengono riportate le osservazioni rilevate durante l'esame *post-mortem* dei capodogli 5,6 e 7 spiaggiati in Puglia, segnalando le principali lesioni riscontrate all'esame macroscopico e microscopico. In ogni scheda inoltre sono stati inseriti i risultati delle analisi virologiche, batteriologiche, parassitologiche, sierologiche ed altre indagini effettuate nel materiale biologico prelevato.

ID 174	CAPODOGLIO N.5
Specie	<i>Physeter macrocephalus</i>
Famiglia	Physeteridae
Sottordine	Odontoceti
Data necropsia	14/12/2009
Sesso	MASCHIO
Età	15°
Lunghezza totale	10,5 M
Peso reale/corretto	14t/16t
Condizioni individuo	stato di conservazione 2/3; stato nutrizione 3
Note	Spessore del <i>blubber</i> dorsale 9 cm; medio 9 cm; ventrale 11 cm.
ESAME <i>post mortem</i>	
Esame macroscopico	
<u>CUTE, BLUBBER E TESSUTI SOTTOCUTANEI</u> : presenza di crostacei Pennellidae, associate a lesioni granulomatose.	
<u>LINFONODI PRE-SCAPOLARI</u> : Linfadenopatia reattiva diffusa grave cronica con presenza di alcune cavitazioni cistiche nella corticale di piccole dimensioni; Positività del citoplasma di macrofagi nei seni linfonodali alla colorazione di Danscher, anche	

Risultati

perifericamente ai follicoli linfatici.
<u>CAVITA' TORACICA</u> : ;etecchie e soffusioni pleuriche con aree di edema emorragico. Modesta effusioni siero-ematica pleurica; grave e diffuso pneumomediastino con petecchie emorragiche.
<u>POLMONI E PLEURE</u> : emorragie polmonari sub-pleuriche occasionalmente associate a cavitazioni; edema diffuso grave ed aree di enfisema sul polmone destro associato a petecchie emorragiche.
<u>LINFONODI POLMONARI</u> : Linfadenopatia reattiva sub-acuto/cronica diffusa grave con presenza abbondante di cavitazioni contenenti gas nella corticale.
<u>CUORE E PERICARDIO</u> : Presenza abbondante di bolle sia nei vasi coronarici sia nel sangue intra-cardiaco; presenza di coagulo bianco nell'atrio destro e di coagulo contenente bolle nel ventricolo destro; spessore della parete ventricolare libera dx: 4,5 cm, sx; 12 cm.
<u>CAVITA' ADDOMINALE E MESENTERE</u> : Peritonite siero-fibrinosa viscerale e parietale sub-acuta diffusa grave; marcata iperemia e congestione vascolare, occasionali petecchie e soffusioni emorragiche; erosioni/ulcerazioni disseminate nel tessuto mesenterico, generalmente con decorso para-vascolare, con minime aderenze tra le pliche mesenteriche; presenza di cisti parassitarie presenti nella radice intestinale del mesetere.
<u>FEGATO E PANCREAS</u> : congestione/emorragia epatica diffusa grave
<u>MILZA</u> : n.d.r.
<u>CONCAMERAZIONI GASTRICHE</u> : Presenza di nematodi, scarsi becchi di calamari e una sola scatola di plastica.; gastrite catarrale acuta diffusa moderata con erosioni sulla sommità delle pliche mucosali nella II concamerazione gastrica; occasionali ulcere a carico della mucosa della III concamerazione gastrica che appare colma di liquido gialloverdastro (bile).
<u>INTESTINO</u> : enterite catarrale moderata diffusa nel tratto prossimale.
<u>LINFONODI MESERAICI</u> : n.d.r.
<u>RENE</u> : congestione grave, in particolare alla giunzione corticomidollare, con edema; emorragie multifocali puntiformi.
<u>TESTICOLI</u> : n.d.r.
<u>ALTRO</u> : congestione ed edema multi viscerale.

Risultati

Esame microscopico
<u>LINFONODI PRE-SCAPOLARI</u> : grave deplezione linfocitaria centro-follicolari, associata minima carioressi linfocitaria a livello dei centri germinativi.
<u>POLMONI E PLEURE</u> : ampie aree emorragiche associate a presenza di elementi batterici riferibili a clostridi; esame IHC per Morbillivirus negativo
<u>LINFONODI POLMONARI</u> : grave deplezione linfocitaria centro-follicolari, associata minima carioressi linfocitaria a livello dei centri germinativi.; presenza di ampie cavitazioni otticamente vuote nella corticale; istiocitosi dei seni; esame IHC per Morbillivirus negativo.
<u>CUORE E PERICARDIO</u> : microemorragie miocardiche
<u>FEGATO E PANCREAS</u> : grave quadro congestizio-emorragico; alla colorazione di Danscher diffusa positività delle cellule del Kupffer.
<u>MILZA</u> : n.d.r.
<u>INTESTINO</u> : enterite cronica lieve con disepitelizzazione e denudazione dei villi intestinali, associati a pigmento giallo-verde, riferibile a pigmento biliare.
<u>RENE</u> : ampie aree congeste con emorragie, frequentemente intratubulari; alla colorazione di Danscher, diffusa positività citoplasmatica delle cellule dei tubuli contorti e, occasionalmente, nell'epitelio e nel lume tubulare nella midollare
<u>TESTICOLI</u> : presenza di attività di spermiogenesi/spermatogenesi in corso; presenza di pigmento bruno-giallastro nelle cellule di Leydig
Esame virologico
<u>MORBILLIVIRUS</u> : negativo (PCR)
<u>HERPESVIRUS</u> : negativo (PCR)
<u>ADENOVIRUS</u> : negativo (PCR)
<u>CORONAVIRUS</u> : negativo (PCR)
<u>ALTRI</u> : negativo (microscopia elettronica)
Esame batteriologico
<u>POLMONE</u> : polimicrobismo aspecifico
<u>LINFONODI PRE-SCAPOLARI</u> : polimicrobismo aspecifico
<u>LINFONODI POLMONARI</u> : polimicrobismo aspecifico
<u>FEGATO E PANCREAS</u> : polimicrobismo aspecifico

Risultati

<u>RENE</u> : polimicrobismo aspecifico
<u>INTESTINO</u> : polimicrobismo aspecifico
<u>ALTRO</u> : ricerca <i>Brucella</i> spp. Negativa
Esame parassitologico
<i>Toxoplasma gondii</i> : negativo (PCR - polmone, fegato)
<u>PARASSITI ESTERNI</u> : Presenti di rare lesioni cutanee, localizzate prevalentemente lateralmente sul corpo dell'animale, dalle quali sono state isolate solo porzioni di cefalotorace degenerate di crostacei Pennellidae; per lo stato di conservazione dei parassiti, non è stato possibile arrivare ad una identificazione morfologica di specie.
<u>POLMONE</u> : n.d.r.
<u>RENE</u> : n.d.r.
<u>FEGATO</u> : n.d.r.
<u>MESENTERE</u> : isolate in prossimità delle anse intestinali, 12 larve merocercoidi di cestodi Tetraphyllidea appartenenti alla specie <i>Monorygma grimaldii</i> .
<u>STOMACO</u> : 45 <i>Anisakis</i> spp. (adulti e L4)
<u>INTESTINO</u> : assenza di parassiti macroscopicamente evidenti all'apertura delle diverse porzioni intestinali esaminate (tratto iniziale, intermedio e terminale). Il contenuto intestinale, analizzato per filtrazione mediante l'utilizzo di setacci, ha dato esito negativo.
<u>COPROLOGICO</u> : presenza di rare uova di nematodi Anisakidae.
<u>MICOLOGICO</u> : negativo (fegato e polmone)
Esame sierologico
<u>BRUCELLA</u> : negativa
Altre indagini
<u>RADIOATTIVITA'</u> : negativa
<u>EMBOLI LIPIDICI POLMONARI</u> : assenti (fissazione <i>en bloc</i> con OsO4 di tessuto polmonare)
<u>EMBOLI GASSOSI VASCOLARI</u> (media di 6 campioni): 16,30 +/- 1,36 % O2; 78,35 +/- 0,73 % N2; 2,38 +/- 1,33 % CO2; 2,94 +/- 0,77 % H2; 0,03 +/- 0,08% CH4.
<u>BIOTOSSINE IDRO E LIPOSOLUBILI</u> : negativa (fegato)

ID 173	CAPODOGLIO N.6
Specie	<i>Physeter macrocephalus</i>
Famiglia	Physeteridae
Sottordine	Odontoceti
Data necropsia	13/12/2009
Sesso	MASCHIO
Età	21°
Lunghezza totale	12,1m
Peso reale/corretto	15,5t/17,7t
Condizioni individuo	stato di conservazione 2; stato nutrizione 3
Note	Spessore del <i>blubber</i> dorsale 8,5 cm; medio 9 cm; ventrale 12 cm.
ESAME <i>post mortem</i>	
Esame macroscopico	
<p><u>CUTE, BLUBBER E TESSUTI SOTTOCUTANEI</u>: parassitosi esterna lieve associata a occasionale dermatite granulomatosa associata a frammenti di elementi parassitari; ferite lacero-contuse ed erosioni a carico della mandibola dovute allo spiaggiamento con stasi ematica a carico della rima mandibolare; assenza di emorragie ed edema nelle regioni retromandibolari, mandibolari, peri-oculari e peri-auricolari; assenza di emorragie nel grasso acustico intra-mandibolare</p> <p><u>LINFONODI PRE-SCAPOLARI</u>: Linfadenopatia reattiva sub-acuta/cronica con abbondante pigmentazione nerastra multifocale in sede corticale.</p> <p><u>CAVITA' TORACICA</u>: minima effusione toracica sieroso limpido lievemente rosato (trasudato); pneumomediastino moderato con emorragie ed edema.</p> <p><u>POLMONI E PLEURE</u>: edema polmonare moderato diffuso con soffiusioni e petecchie pleuriche; aree di edema gelatinoso ed emorragia a carico della pleura parietale.</p> <p><u>LINFONODI POLMONARI</u>: linfo-adenopatia cronica diffusa grave con presenza di bolle associate ad emorragie</p>	

Risultati

<u>CUORE E PERICARDIO</u> : emboli gassosi nei vasi coronarici; coaguli multipli aderenti all'endocardio atriale destro; spessore della parete ventricolare libera dx: 4 cm, sx; 5,2 cm.
<u>CAVITA' ADDOMINALE E MESENTERE</u> : peritonite sierofibrinosa viscerale e parietale sub-acuta diffusa lieve; marcata iperemia e congestione vascolare, occasionali petecchie e soffiusioni emorragiche; erosioni/ulcerazioni disseminate nel tessuto mesenterico con minime aderenze tra le pliche mesenteriche; presenza di cisti parassitarie presenti nella radice intestinale del mesentere
<u>FEGATO E PANCREAS</u> : congestione epatica diffusa grave; periepatite fibrinosa diffusa moderata; pancreas autolitico
<u>MILZA</u> : n.d.r.
<u>CONCAMERAZIONI GASTRICHE</u> : presenza di nematodi, becchi di calamari e corpi estranei; gastrite catarrale acuta diffusa lieve della II concamerazione gastrica con erosioni minime sulla sommità delle pliche della mucosa; presenza di abbondante fluido sieroso marrone nella I e II concamerazione; gastrite ulcerativa da lieve a moderata del compartimento pilorico con contenuto catarrale giallo-verdastro abbondante (bile).
<u>INTESTINO</u> : enterite catarrale moderata diffusa nel tratto prossimale
<u>LINFONODI MESERAICI</u> : linfadenopatia reattiva cronica diffusa lieve
<u>RENE</u> : congestione grave, in particolare alla giunzione corticomidollare, con edema; emorragie multifocali puntiformi
<u>TESTICOLI</u> : n.d.r.
<u>ALTRO</u> : congestione ed edema multi viscerale.
Esame microscopico
<u>CUTE, BLUBBER E TESSUTI SOTTOCUTANEI</u> : dermatite purulenta multifocale grave nelle sezioni ottenute dalle lesioni cutanee.
<u>LINFONODI PRE-SCAPOLARI</u> : deplezione linfocitaria centro-follicolare; linfadenite eosinofilica da lieve a moderata; microemorragie con eritrofagocitosi; istiocitosi marcata dei seni; presenza di abbondanti depositi di un pigmento similantracotico, di colorito bruno-nerastro, osservabile generalmente in vicinanza della parete di vasi sanguigni.; positività del citoplasma di macrofagi nei seni linfonodali alla colorazione di Danscher
<u>POLMONI E PLEURE</u> : bronchite cronica multifocale da lieve a moderata; aree emorragiche multifocali associate alla presenza di corpi batterici (possibilmente clostridi) nel lume dei vasi sanguigni: IHC per Morbillivirus negativa.
<u>LINFONODI POLMONARI</u> : deplezione linfocitaria centro-follicolare con occasionale

Risultati

<p>carioressi linfocitaria, associata a microemorragie e istiocitosi dei seni, IHC per Morbillivirus negativa.</p>
<p><u>CUORE E PERICARDIO</u>: presenza di materiale simil-fibrinoso prevalentemente adeso al rivestimento endocardico nelle sezioni di atrio; microemorragie miocardiche; presenza di cavitazioni otticamente vuoti, sia singole sia disposte a treno, nei vasi dell'epicardio</p>
<p><u>CAVITA' ADDOMINALE E MESENTERE</u>: mesentere: emorragie perivasali di modica estensione; peritonite mesenterica perivascolare cronica lieve. Microtrombosi evidente in alcuni vasi venosi di piccolo calibro e diverse strutture capillari</p>
<p><u>FEGATO E PANCREAS</u>: presenza di estesi fenomeni autolitici, con contestuale riscontro di multipli e densi aggregati di corpi batterici sia nel lume dei vasi sanguigni, sia nel parenchima; all'interno di più strutture vasali, inoltre, sono apprezzabili accumuli di un pigmento di colorito giallo-verdastro; stasi biliare e fenomeni congestizio emorragici a carico del tessuto epatico; alla colorazione di Danscher diffusa positività citoplasmatica delle cellule del Kupffer.</p>
<p><u>CONAMERAZIONI GASTRICHE</u>: elementi batterici riferibili a clostridi sia nel tessuto in esame, sia all'interno dei vasi sanguigni</p>
<p><u>INTESTINO</u>: Enterite cronica lieve con disepitelizzazione e denudazione dei villi intestinali, associati a pigmento giallo-verde, riferibile a pigmento biliare</p>
<p><u>RENE</u>: ampie aree congeste con emorragie, frequentemente intratubulari; alla colorazione di Danscher, diffusa positività citoplasmatica delle cellule dei tubuli contorti e, occasionalmente, nell'epitelio e nel lume tubulare nella midollare</p>
<p><u>TESTICOLI</u>: presenza di attività di spermiogenesi/spermatogenesi in corso.; presenza di pigmento bruno-giallastro nelle cellule di Leydig</p>
<p><u>SNC</u>: lipofuscinosi neuronale occasionale; rari sferoidi ed edema con presenza di elementi riferibili a clostridi (post-mortem); occasionali aggregati di granuli citoplasmatici positivi alla colorazione di Danscher.</p>
<p style="text-align: center;">Esame virologico</p>
<p><u>MORBILLIVIRUS</u>: negativo (PCR)</p>
<p><u>HERPESVIRUS</u>: negativo (PCR)</p>
<p><u>ADENOVIRUS</u>: negativo (PCR)</p>
<p><u>CORONAVIRUS</u>: negativo (PCR)</p>
<p><u>ALTRI</u> : negativo (microscopia elettronica)</p>
<p style="text-align: center;">Esame batteriologico</p>

Risultati

<u>POLMONE</u> : <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<u>LINFONODI PRE-SCAPOLARI</u> : <i>Aeromonas hydrophila</i>
<u>LINFONODI POLMONARI</u> : <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Corynebacterium aquaticum</i>
<u>FEGATO E PANCREAS</u> : assenza di crescita
<u>RENE</u> : assenza di crescita
<u>INTESTINO</u> : <i>Vibrio vulnificus</i> e <i>Vibrio holisae</i>
<u>ALTRO</u> : ricerca <i>Brucella</i> spp. Negativa
Esame parassitologico
<i>Toxoplasma gondii</i> : negativo (PCR - polmone, fegato)
<u>PARASSITI ESTERNI</u> : evidenti rare lesioni cutanee, dalle quali sono stati isolati 21 esemplari di crostacei del genere <i>Pennella</i> ; alcuni parassiti integri, mentre nella maggior parte dei casi erano presenti lesioni, contenenti solo la porzione cefalica del parassita; i crostacei integri erano localizzati per lo più nella porzione anteriore del corpo, mentre la maggior parte delle lesioni da Pennellidae erano distribuite nelle zone ventrali e centrali del corpo e sulla testa; occasionali cisti parassitarie nello spessore del <i>blubber</i> (<i>Phyllobothrium delphini</i>)
<u>POLMONE</u> : n.d.r.
<u>RENE</u> : n.d.r.
<u>FEGATO</u> : n.d.r.
<u>MESENTERE</u> : isolate in prossimità delle anse intestinali, 12 larve merocercoidi di cestodi Tetracystidae appartenenti alla specie <i>Monorygma grimaldii</i> .
<u>STOMACO</u> : 241 <i>Anisakis</i> spp. (adulti e L4)
<u>INTESTINO</u> : assenza di parassiti macroscopicamente evidenti all'apertura delle diverse porzioni intestinali esaminate (tratto iniziale, intermedio e terminale). Il contenuto intestinale, analizzato per filtrazione mediante l'utilizzo di setacci, ha dato esito negativo.
<u>COPROLOGICO</u> : presenza di rare uova di nematodi Anisakidae.
MICOLOGICO: negativo (fegato e polmone)
Esame sierologico
<u>BRUCELLA</u> : negativa
Altre indagini
<u>RADIOATTIVITA'</u> : negativa

Risultati

<u>EMBOLI LIPIDICI POLMONARI</u> : assenti (fissazione <i>en bloc</i> con OsO4 di tessuto polmonare)
<u>EMBOLI GASSOSI VASCOLARI</u> (media di 6 campioni): 13,63 +/- 7,62 O2; 84,96 +/- 6,56 % N2; 1,41 +/- 1,07 % CO2
<u>BIOTOSSINE IDRO E LIPOSOLUBILI</u> : negativa (fegato)

ID 172	CAPODOGLIO N.7
Specie	<i>Physeter macrocephalus</i>
Famiglia	Physeteridae
Sottordine	Odontoceti
Data necropsia	12-13/12/2009
Sesso	MASCHIO
Età	20°
Lunghezza totale	11,8m
Peso reale/corretto	13,8t/15,7t
Condizioni individuo	stato di conservazione 2; stato nutrizione 3
Note	Spessore del <i>blubber</i> dorsale 7,3 cm; medio 8,8 cm; ventrale 9,8 cm.
ESAME <i>post mortem</i>	
Esame macroscopico	
<u>CUTE, BLUBBER E TESSUTI SOTTOCUTANEI</u> : parassitosi esterna lieve associata a occasionale dermatite granulomatosa associata a frammenti di elementi parassitari; ferite lacero-contuse ed erosioni a carico della mandibola dovute allo spiaggiamento con stasi ematica a carico della rima mandibolare; assenza di emorragie ed edema nelle regioni retromandibolari, mandibolari, peri-oculari e peri-auricolari; assenza di emorragie nel grasso acustico intra-mandibolare.	
<u>LINFONODI PRE-SCAPOLARI</u> : linfadenopatia reattiva sub-acuta/cronica con	

Risultati

abbondante pigmentazione arancio/marrone multifocale in sede corticale
<u>CAVITA' TORACICA</u> : moderata effusione toracica sieroso limpido lievemente rosato (trasudato); pneumomediastino minimo con emorragie ed edema.
<u>POLMONI E PLEURE</u> : edema polmonare grave diffuso con iperemia pleurica ed enfisema.
<u>LINFONODI POLMONARI</u> : edema polmonare grave diffuso con iperemia pleurica ed enfisema..
<u>CUORE E PERICARDIO</u> : presenza di moderata quantità di bolle nei vasi coronarici; spessore della parete ventricolare libera dx: 3,2 cm, sx; 3,7 cm
<u>CAVITA' ADDOMINALE E MESENTERE</u> : peritonite siero-fibrinosa viscerale e parietale sub-acuta diffusa lieve; marcata iperemia e congestione vascolare, occasionali petecchie e soffiusioni emorragiche; presenza di cisti parassitarie presenti nella radice intestinale del mesentere
<u>FEGATO E PANCREAS</u> : congestione epatica diffusa gravi; aspetti di epatosi evidente nelle aree non congeste; periepatite fibrinosa diffusa moderata
<u>MILZA</u> : n.d.r.
<u>CONCAMERAZIONI GASTRICHE</u> : presenza di nematodi, becchi di calamari e corpi estranei; gastrite catarrale acuta diffusa lieve della II concamerazione gastrica con erosioni minime sulla sommità delle pliche della mucosa; presenza di abbondante fluido sieroso marrone nella I e II concamerazione; gastrite ulcerativa da lieve a moderata del compartimento pilorico con contenuto catarrale giallo-verdastro abbondante (bile).
<u>INTESTINO</u> : enterite catarrale moderata diffusa nel tratto prossimale.
<u>LINFONODI MESERAICI</u> : n.d.r.
<u>RENE</u> : congestione grave, in particolare alla giunzione corticomidollare, con edema.
<u>TESTICOLI</u> : n.d.r.
<u>ALTRO</u> : congestione ed edema multi viscerale.
Esame microscopico
<u>CUTE, BLUBBER E TESSUTI SOTTOCUTANERI</u> : dermatite pio granulomatosa multifocale grave.
<u>LINFONODI PRE-SCAPOLARI</u> : deplezione linfocitaria nei centri germinativi, con focali reperti di carioressi linfocitaria; istiocitosi moderata dei seni con presenza di plasmacellule, con scarsi granulociti neutrofili ed eosinofili; in sede corticale, generalmente perivascolare, presenti elementi macrofagici, singoli o in gruppo, con

Risultati

citoplasma aumentato e repleto di pigmento marrone-nerastro; positività del citoplasma di macrofagi nei seni linfonodali alla colorazione di Danscher
<u>POLMONI E PLEURE</u> : broncopolmonite fibrinosa acuta diffusa grave con minima componente interstiziale; IHC per Morbillivirus negativa
<u>LINFONODI POLMONARI</u> : deplezione linfocitaria nei centri germinativi, con focali reperti di carioressi linfocitaria; istiocitosi moderata dei seni con presenza di plasmacellule, con scarsi granulociti neutrofili ed eosinofili; IHC per Morbillivirus negativa.
<u>CUORE E PERICARDIO</u> : microemorragie miocardiche; fibrosi interstiziale minima lieve con segni di degenerazione delle fibre miocardiche
<u>FEGATO E PANCREAS</u> : aspetti congestizio-emorragici, generalmente in zona 3, associati a quadri atrofici (compressione) delle filiere epatocitarie.; fibrosi interstiziale portale lieve; aspetti degenerativi a carico degli epatociti in zona 1 e 2 (rigonfiamento torbido e degenerazione vacuolare) con quadri di lipidosi macro-vacuolare evidente soprattutto in zona 1; presenza di globuli ialini eosinofili da ipossia intracitoplasmatici; stasi biliare intra-epatocitaria; alla colorazione di Danscher, granuli citoplasmatici positivi di epatici (prevalentemente centro-lobulare e midzonale), e diffusa positività citoplasmatica delle cellule del Kupffer..
<u>MILZA</u> : n.d.r.
<u>INTESTINO</u> : enterite cronica diffusa lieve con componente eosinofila, con minime atrofia e fusione dei villi intestinali; sfaldamento della mucosa enterica con completa denudazione dei villi intestinali; evidenza di aggregati di pigmento biliare nel lume frammisto alle cellule epiteliali sfaldate.
<u>RENE</u> : congestione diffusa grave; emorragie intra-tubulari in prossimità della giunzione corticomidollare; alla colorazione di Danscher, diffusa positività citoplasmatica delle cellule dei tubuli contorti e, occasionalmente, nell'epitelio e nel lume tubulare nella midollare
<u>TESTICOLI</u> : presenza di attività di spermiogenesi/spermatogenesi; occasionale microemorragie nel lume di alcuni tubuli
Esame virologico
<u>MORBILLIVIRUS</u> : negativo (PCR)
<u>HERPESVIRUS</u> : negativo (PCR)
<u>ADENOVIRUS</u> : negativo (PCR)
<u>CORONAVIRUS</u> : negativo (PCR)

Risultati

<u>ALTRI</u> : negativo (microscopia elettronica)
Esame batteriologico
<u>POLMONE</u> : <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Vibrio holisae</i>
<u>LINFONODI PRE-SCAPOLARI</u> : assenza di crescita
<u>LINFONODI POLMONARI</u> : assenza di crescita
<u>FEGATO E PANCREAS</u> : assenza di crescita
<u>RENE</u> : <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Enterobacter</i> spp.
<u>INTESTINO</u> : <i>Citrobacter</i> spp.
<u>ALTRO</u> : Ricerca <i>Brucella</i> spp. Negativa Nessuna crescita dal coagulo intra-cardiaco
Esame parassitologico
<i>Toxoplasma gondii</i> : negativo (PCR - polmone, fegato)
<u>PARASSITI ESTERNI</u> : Evidenti rare lesioni cutanee, dalle quali sono state isolate solo porzioni di cefalotorace degenerati di crostacei Pennellidae.
<u>POLMONE</u> : n.d.r.
<u>RENE</u> : n.d.r.
<u>FEGATO</u> : n.d.r.
<u>MESENTERE</u> : isolate in prossimità delle anse intestinali, 13 larve merocercoidi di cestodi Tetrphyllidea appartenenti alla specie <i>Monorygma grimaldii</i> .
<u>STOMACO</u> : 145 <i>Anisakis</i> spp. (adulti e L4)
<u>INTESTINO</u> : assenza di parassiti macroscopicamente evidenti all'apertura delle diverse porzioni intestinali esaminate (tratto iniziale intermedio e terminale). Il contenuto intestinale, analizzato per filtrazione mediante l'utilizzo di setacci, ha dato esito negativo.
<u>COPROLOGICO</u> : presenza di numerose uova di nematodi Anisakidae.
<u>MICOLOGICO</u> : negativo (fegato e polmone)
Esame sierologico
<u>BRUCELLA</u> : negativa
Altre indagini
<u>RADIOATTIVITA'</u> : negativa
<u>EMBOLI LIPIDICI POLMONARI</u> : assenti (fissazione <i>en bloc</i> con OsO4 di tessuto)

Risultati

polmonare)
<u>EMBOLI GASSOSI VASCOLARI</u> (media di 6 campioni): 17,52 +/- 1,22 % O ₂ ; 81,86 +/- 0,93 % N ₂ ; 0,62 +/- 0,23% CO ₂
<u>BIOTOSSINE IDRO E LIPOSOLUBILI</u> : negativa (fegato)

4.2. Rilievi patologici *post-mortem*

Dalle analisi del campionamento effettuato durante le indagini necroscopiche sui tre soggetti che si sono spiaggiati vivi (5,6 e 7) non si rileva alcuna indicativa lesione patologica che possa essere responsabile dello spiaggiamento.

Quelle più evidenti, sia a livello macro che microscopico, presenti nei 3 animali sono:

- Dermatite parassitaria da *Pennella* con complicazioni piogranulomatose o purulente, da patogeni opportunisti.
- Linfadenopatia reattiva pre-scapolare con deplezione centro-follicolare, edema, occasionali emorragie e istiocitosi dei seni
- Congestione multiviscerale
- Peritonite sierofibrinosa cronica con minime aderenze, emorragie ed erosioni nei soggetti 5 e 6 (**Fotografia n. 3**)



Fotografia 3: Peritonite sierofibrinosa cronica

- Bronco-polmonite fibrinosa acuta diffusa nel soggetto 7, e occasionale nel soggetto numero 5; bronchite cronica diffusa lieve nel soggetto numero 6.
- Linfadenopatia reattiva polmonare diffusa da moderata a grave con deplezione centrollicolare e occasionali emorragie.
 - Pneumomediastino, emorragie polmonari e pleuriche, pneumomatosi cistica dei linfonodi mediastinici.
- Gastrite catarrale parassitaria con erosioni/ulcere (II concamerazione), e ulcere gastriche nella III concamerazione.
- Enterite cronica diffusa lieve con abbondante pigmento biliare.
- Congestione epatica grave con minima atrofia centro-lobulare e lipidosi peri-portale (evidente soprattutto nel soggetto 7). Stasi biliare e abbondante positività.
- Emorragie intra-tubulari renali.
- Lipofuscinosi dei neuroni osservati nel midollo allungato del soggetto 6.
- Depositi citoplasmatici positivi alla colorazione istochimica di Danscher per il mercurio negli epatociti e nelle cellule del Kupffer, nelle cellule

Risultati

epiteliali dei tubuli renali prossimali e distali, nei macrofagi dei seni linfonodali, sia corticali sia midollari, nei neuroni del midollo allungato del soggetto 6 (associati a lipofuscinosi).

Di particolare rilievo sono i quadri linfonodali con una deplezione dei centri germinativi follicolari che suggeriscono una condizione di immunodepressione. Anche i quadri infiammatori polmonari in alcuni casi e la dermatite parassitaria associata ad infezioni secondarie di tipo purulento o piogranulomatoso sembrano andare in questa direzione. Queste ultime sembrano essere state determinate da batteri alofili opportunisti, come *Aeromonas hydrophila*, presenti nell'acqua respirata durante lo spiaggiamento. Si segnala che tale reperto appare associato alla positività citoplasmatica dei macrofagi nei seni linfonodali, soprattutto degli organi pre-scapolari, in particolare in sede peri-follicolare e sinusale.

4.2.1. Esami microbiologici, virologici e sierologici

I risultati degli esami microbiologici e virologici sono negativi per numerosi agenti patogeni ad azione neurotrofa come Morbillivirus, Herpesvirus, *Brucella* sp e *Toxoplasma gondii*. Questo dato è stato confermato anche all'esame istologico, immunoistochimico e alla microscopia elettronica. I batteri esaminati all'esame microbiologico sono tutti agenti opportunisti e nessuno può essere considerato come agente causale dello spiaggiamento.

4.2.2. Contenuti stomacali

Durante la necropsia dei capodogli è stato possibile effettuare la raccolta del contenuto gastrico di 6 animali su 7 (tranne il 2) considerando che nei soggetti 1 e 3 la raccolta è stata incompleta. Di seguito si riporta una tabella che riassume e quantifica quanto si è potuto trovare nelle concamerazione gastriche specificando la quantità di origine organica (becchi di calamari), parassitaria ed inorganica (**Tabella n. 7**).

Risultati

Tabella 7: Contenuto rinvenuto nelle concamerazioni gastriche

NUMERO ANIMALE	CONTENUTO ORGANICO	CONTENUTO INORGANICO	n. ANISAKIS (ADULTI + L4)	PESO TOTALE
1	208,9g	1475,4g (Sacchetti, scatole e contenitori in plastica; reti; ami e fili da pesca)	-	1684,3g
3	237,6g	4934,6g (Sacchetti, scatole e contenitori in plastica; reti; ami e fili da pesca; matassa di corda di materiale sintetico intrecciata diametro 0,5 cm e peso 4 kg)	-	5172,2g
4	10,6g	20,7g (Sacchetti, scatole e contenitori in plastica)	0	31,3g
5	29g	9,5g (Sacchetti, scatole e contenitori in plastica)	41	38,5g
6	496,2g	1199g (Sacchetti, scatole e contenitori in plastica; reti; ami e fili da pesca)	244	1695,2g
7	265,4g	731,6g (Sacchetti, scatole e contenitori in plastica)	145	997g

Risultati

La frazione organica dei contenuti stomacali si compone prevalentemente di cefalododi nello specifico del genere *Histioteuthis* spp. Nei soggetti esaminati sono stati trovati solo becchi dei cefalopodi manca completamente la parte molle della preda (**Fotografia n. 4**) È possibile inoltre rilevare una differenza nel grado di digestione delle mandibole, che in alcuni dei capodogli risultano molto digerite, in particolare nell'esemplare n. 3.



Fotografia 4: Contenuto stomacale soggetto n. 6

Nella I e II concamerazione gastrica sono stati ritrovati oggetti di origine antropica come sacchetti, scatole e contenitori quasi tutti composti da plastica in quantità variabile da alcuni grammi a circa 1 kg . Erano presenti inoltre ami e fili da pesca e reti ed una matassa di corda di materiale sintetico del diametro di 0,5 cm e dal peso di 4 kg.

Oltre ai reperti di origine organica ed inorganica, si sono reperiti anche elementi parassitari, sia adulti sia pre-adulti (stadio L4), del genere *Anisakis* spp., associati a quadri di gastrite catarrale acuta lieve con minime erosioni/ulcerazioni. Su tali esemplari è in corso l'indagine

genetica. In generale, il carico parassitario sembra essere correlato con la quantità di cibo.

4.2.3. Emboli gassosi e lipidici

I risultati ottenuti dalle indagini sugli emboli gassosi possono essere definiti, come un “embolismo gassoso” associato a pneumoediastino, pneumotorace e pneumopericardio, causati da un lungo periodo di decubito sulla spiaggia in vita. Nel soggetto n. 5 in particolare, si rileva infatti la presenza di abbondante quantità di gas nel ventricolo sinistro, inoltre, da segnalare che questo animale presentava anche gas di putrefazione (idrogeno e metano), indicando una sovrapposizione dei processi con una maggior evidenza di tale condizione (**Grafico n. 3**).

In relazione agli emboli lipidici, nonostante gli animali siano stati per un lungo periodo sulla battigia, non si riscontrava alcuna positività polmonare.

Grafico 3: Composizione emboli gassosi

ANIMALE	EMBOLI GASSOSI VASCOLARI (media di 6 campioni)
SOGGETTO 5	16,30 +/- 1,36 % O ₂ ; 78,35 +/- 0,73 % N ₂ ; 2,38 +/- 1,33 % CO ₂ ; 2,94 +/- 0,77 % H ₂ ; 0,03 +/- 0,08% CH ₄
SOGGETTO 6	13,63 +/- 7,62 O ₂ ; 84,96 +/- 6,56 % N ₂ ; 1,41 +/- 1,07 % CO ₂
SOGGETTO 7	17,52 +/- 1,22 % O ₂ ; 81,86 +/- 0,93 % N ₂ ; 0,62 +/- 0,23% CO ₂

4.3. Biotossine algali

I risultati di esami effettuati su porzioni di fegato di capodogli (soggetti 6 e 7) esclude la presenza, in valori significativi, delle seguenti biotossine: azaspiracidi totali, pectenotossine totali, yessotossine totali, acido okadaico e derivati totali, paralytic shellfish poison. Anche il campione di tessuto nervoso del capodoglio 6 inviato successivamente al centro ha dato esito negativo.

4.4. Esami tossicologici

Vengono di seguito riportati i risultati delle analisi effettuate per la ricerca dei metalli pesanti e degli esami tossicologici sia in alcuni tessuti di capodogli che in tessuti di mammiferi marini provenienti dalla BIT presi in esame come confronto.

4.4.1. Metalli pesanti

Le indagini chimiche per la ricerca di metalli pesanti hanno messo in evidenza dei valori elevati di mercurio riportati in **Tabella n. 7**. Considerate le scarse conoscenze relativamente agli effetti di questa sostanza in questa specie, le indagini che sono state realizzate mirano ad approfondire il ruolo del mercurio nei capodogli che si sono spiaggiati in Puglia comparando i dati ottenuti anche con altri mammiferi marini presenti in BIT.

Infatti, nella **Tabella n. 8** vengono riportati i risultati per la ricerca di questo elemento effettuata su campioni di tessuto congelato di capodogli che si sono spiaggiati lungo le coste pugliesi, in particolare il mercurio viene valutato come mercurio totale e nelle sue due forme: inorganica ed organica. Come si può notare nel fegato la percentuale di metilmercurio, considerata la forma più tossica di questo elemento, si aggira attorno al 5-5,10% mentre è interessante osservare come nel rene tale percentuale sia compresa tra 26,60 e 44,10%.

Risultati

Tabella 8: Valori di mercurio su campioni in congelato di capodogli
(Peso espresso in ppm - mg/kg w.w.)

ORGANI	Hg TOTALE	Hg INORGANICO	Hg ORGANICO	% MeHg
Fegato capodoglio 5	88,3	83,84	4,46	5,10
Fegato capodoglio 6	119	113,48	5,52	4,70
Fegato capodoglio 7	93,8	89,13	4,67	5
Rene capodoglio 5	5,01	3,5	1,51	30,14
Rene capodoglio 6	7,15	5,25	1,9	26,60
Rene capodoglio 7	4,88	2,73	2,15	44,10
Muscolo capodoglio 5	3,9	0	4,29	100
Muscolo capodoglio 6	6,56	0,52	6,04	92,10
Muscolo capodoglio 7	4,38	0	5,31	100

Di seguito sono riportati i dati della ricerca dei metalli pesanti, evidenziando il risultato ottenuto per il mercurio in altri mammiferi marini presi come specie di confronto.

Vengono riportati i valori dei metalli pesanti nei tessuti di rene, fegato e muscolo presenti nelle 2 balenottere comuni del Mar Mediterraneo (*Balaenoptera physalus*). Come si può notare i valori di mercurio misurati sono relativamente bassi rispetto ai dati ottenuti per il capodoglio. (**Tabella n. 9**).

Risultati

Tabella 9: Valori mercurio balenottere comuni del Mar Mediterraneo (*Balaenoptera physalus*) dati espressi in ppm – mg/kg w.w.

METALLI E VALORI DI RIFERIMENTO	ID 134 RENE	ID 109 RENE	ID 134 FEGATO	ID 109 FEGATO	ID 134 MUSCOLO	ID 109 MUSCOLO
As 193.696	< LOD	2,941	3,163	0,499	1,272	< LOD
Co 238.892	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Cd 228.802	0,257	< LOD	0,025	< LOD	< LOD	< LOD
Cr 267.716	0,573	0,102	0,147	0,485	0,187	0,093
Cu 324.752	3,202	3,008	5,919	54,65	0,854	2,297
Mn 257.610	2,843	0,578	4,356	2,351	1,202	0,371
Fe 259.939	0,857	< LOD	1,075	< LOD	2,638	0,743
Ni 221.648	0,184	0,038	0,063	0,21	0,182	0,052
Pb 220.353	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Hg 194.168	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0
Se 196.026	0,884	0,164	< LOD	< LOD	0,038	< LOD
Zn 206.200	91,35	62,13	160,8	148,1	59,45	118,5
Cd 214.440	0,22	< LOD	0,052	0,029	< LOD	< LOD

I dati che seguono riportano i risultati realizzati per la ricerca dei metalli pesanti nei tessuti di rene, muscolo e fegato del grampo (*Grampo griseou*) ID 116. Come si può notare i livelli di mercurio sono più elevati nel fegato rispetto agli altri organi (**Tabella n. 10**)

Tabella 10: Valori mercurio del Grampo (*Grampo griseou*) dati espressi in ppm – mg/kg w.w

METALLI E VALORI DI RIFERIMENTO	ID 116 RENE	ID 116 MUSCOLO	ID 116 FEGATO
As 193.696	0,178	0,463	0,241
Co 238.892	< LOD	< LOD	< LOD
Cd 228.802	9,308	0,074	7,956
Cr 267.716	0,093	0,105	0,24
Cu 324.752	4,186	0,223	3,543
Mn 257.610	0,653	0,105	3,431
Fe 259.939	2,246	3,053	2,871
Ni 221.648	0,023	0,017	0,043
Pb 220.353	< LOD	< LOD	0,269
Hg 194.168	0,585	0,606	4,754
Se 196.026	3,286	2,341	107,4
Zn 206.200	76,74	32,67	157,8
Cd 214.440	7,653	0,062	7,043

La ricerca per i metalli pesanti è stata realizzata anche su campioni di

Risultati

fegato, muscolo e rene di 2 tursipi (*Tursiopo truncatus*). Come si può notare anche in questa specie i livelli di mercurio sono più elevati nel fegato ma inferiori se paragonati a quelli del grampo ID 116 (**Tabella n. 11**).

Tabella 11: Valori mercurio in tursipi (*Tursiope truncatus*) dati espressi in ppm – mg/kg w.w

METALLI E VALORI DI RIFERIMENTO	ID 95 FEGATO	ID 165 FEGATO	ID 95 RENE	ID 165 RENE	ID 95 MUSCOLO	ID 165 MUSCOLO
As 193.696	0,154	0,051	0,303	< LOD	1,574	< LOD
Co 238.892	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Cd 228.802	0,165	< LOD	0,765	0,111	0,005	< LOD
Cr 267.716	0,179	0,131	0,114	1,037	0,365	0,252
Cu 324.752	16,43	1,253	5,686	3,181	1,501	1,211
Mn 257.610	2,578	1,432	0,412	0,512	0,199	0,22
Fe 259.939	5,142	2,589	1,899	4,589	< LOD	2,779
Ni 221.648	0,052	< LOD	0,018	0,033	0,157	0
Pb 220.353	0,015	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Hg 194.168	2,699	< LOD	1,295	< LOD	1,444	0,202
Se 196.026	35,82	1,778	6,405	4,962	2,554	1,193
Zn 206.200	204,2	29,84	61,65	56,71	38,28	68,63
Cd 214.440	0,215	0,091	0,629	0,16	0,016	0,009

I risultati che seguono riassumono le tabelle precedenti indicando solo le quantità di mercurio contenute in muscolo, rene e fegato dei 7 capodogli e degli altri mammiferi marini (**Tabella n. 12**).

Tabella 12: Tabella riassuntiva relativa alle quantità di mercurio espressi in ppm - mg/kg w.w.

ID	MUSCOLO	RENE	FEGATO
95	1,44	1,30	2,70
109	0	<LOD	<LOD
116	25,53	7,31	79,25
134	< LOD	<LOD	<LOD
165	0,20	1,30	<LOD
172(7)	3,9	4,88	93,8
173(6)	6,56	7,15	100
174(5)	4,38	5,01	88,3
175(4)	1,192	n.p.	n.p.
176(3)	0,467	n.p.	n.p.
177(2)	1,230	n.p.	n.p.

Risultati

178(1)	0,860	n.p.	n.p.
--------	-------	------	------

Come si può notare le maggiori concentrazioni sono a carico del fegato con una presenza di 100 ppm - mg/kg w.w. nel soggetto n.6 (ID 173).

Infine vengono di seguito riportate delle tabelle in cui si riassumono i risultati riguardanti la ricerca del mercurio riportando gli ID identificativi di ciascun animale e la distribuzione di questo elemento nei diversi organi. Essa è stata valutata secondo un protocollo riportato nel paragrafo Materiali e Metodi. La distribuzione è stata analizzata utilizzando due colorazioni, la colorazioni di Danscher e quella di Schmorl che evidenziano metalli pesanti inclusi in paraffina e pigmenti referibili a lipofuscina rispettivamente **(Tabelle dal n. 13 a n. 19)**.

Tabella 13: Distribuzione mercurio nel tursiope (*Tursiope truncatus*)

ID	ORGANO	COLOR. DANSCHER,	COLOR. SCHMORL
95	FEGATO		
	Regione periportale	3	Presente
	Regione pericentrale	2	
	Regione midzonale	1	
	RENE		
	Tubuli prossimali	2	Presente
	Tubuli distali	1	
	LINFONODI		
	Corticale	1	Assente
	Midollare	1	

Tabella 14: Distribuzione mercurio nel Grampo (*Grampus griseus*)

ID	ORGANO	COLOR. DANSCHER,	COLOR. SCHMORL
116	FEGATO		
	Regione periportale	4	Presente
	Regione pericentrale	3	
	Regione midzonale	2	
	RENE		
	Tubuli prossimali	3	Presente
	Tubuli distali	2	
	LINFONODI		
	Corticale	2	Presente
	Midollare	1	

Risultati

Tabella 15: Distribuzione mercurio Balenottera comune del Mar Mediterraneo ()

ID	ORGANO	COLOR. DANSCHER,	COLOR. SCHMORL
134	FEGATO		
	Regione periportale	2	Presente
	Regione pericentrale	1	
	Regione midzonale	0	
	RENE		
	Tubuli prossimali	1	Presente
	Tubuli distali	1	
	LINFONODI		
	Corticale	1	Assente
	Midollare	1	

Tabella 16: Distribuzione mercurio nel tursiope (*Tursiope truncatus*)

ID	ORGANO	COLOR. DANSCHER,	COLOR. SCHMORL
165	FEGATO		
	Regione periportale	2	Presente
	Regione pericentrale	2	
	Regione midzonale	1	
	RENE		
	Tubuli prossimali	2	Presente
	Tubuli distali	1	
	LINFONODI		
	Corticale	2	Presente
	Midollare	1	

Tabella 17: Distribuzione mercurio nei capodogli (*Physeter macrocephalus*)

ID	ORGANO	COLOR. DANSCHER,	COLOR. SCHMORL
172(7)	FEGATO		
	Regione periportale	3	Presente
	Regione pericentrale	2	
	Regione midzonale	1	
	RENE		
	Tubuli prossimali	1	Presente
	Tubuli distali	1	
	LINFONODI		
	Corticale	2	Presente
	Midollare	1	

Tabella 18: Distribuzione mercurio nei capodogli
(Physeter macrocephalus)

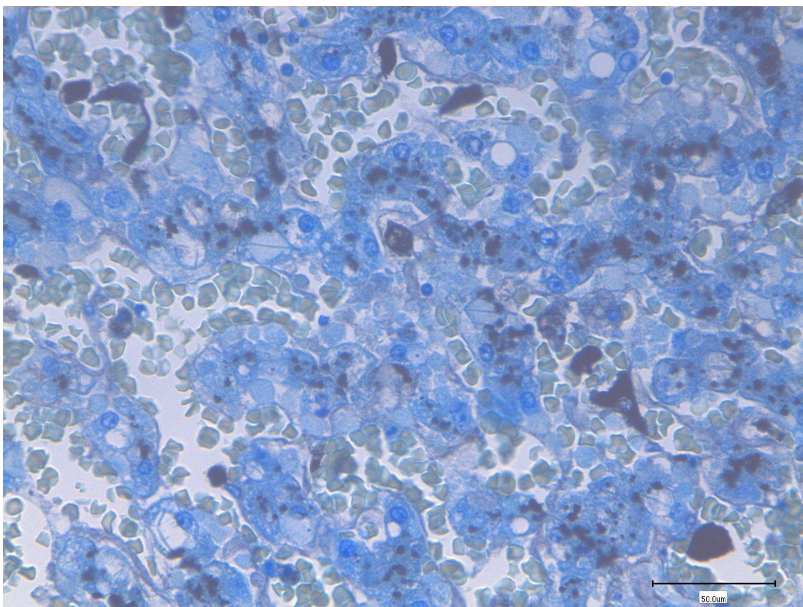
ID	ORGANO	COLOR. DANSCHER,	COLOR. SCHMORL
173(6)	FEGATO		
	Regione periportale	2	Presente
	Regione pericentrale	2	
	Regione midzonale	1	
	RENE		
	Tubuli prossimali	2	Presente
	Tubuli distali	2	
	LINFONODI		
	Corticale	1	Presente
	Midollare	1	

Tabella 19: Distribuzione mercurio nei capodogli
(Physeter macrocephalus)

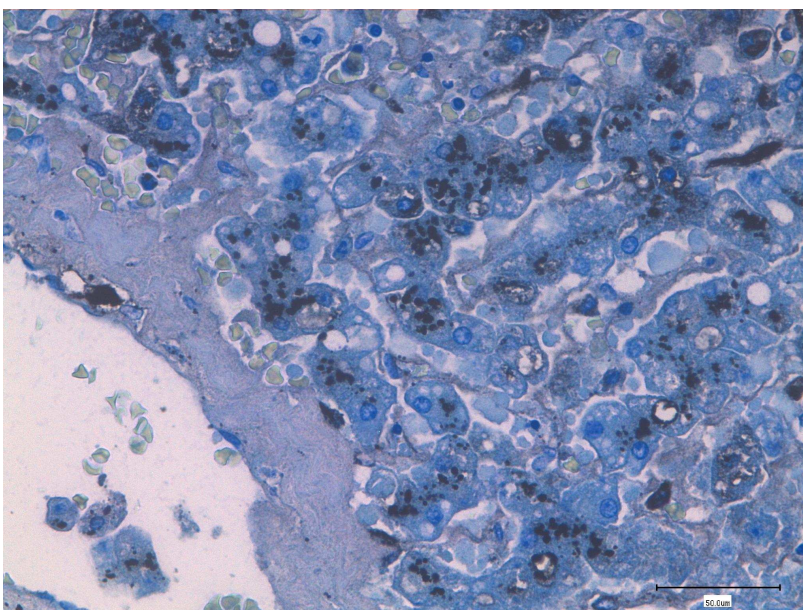
ID	ORGANO	COLOR. DANSCHER,	COLOR. SCHMORL
174(5)	FEGATO		
	Regione periportale	3	Presente
	Regione pericentrale	2	
	Regione midzonale	1	
	RENE		
	Tubuli prossimali	2	Presente
	Tubuli distali	1	
	LINFONODI		
	Corticale	1	Assente
	Midollare	1	

La positività riscontrata per questa colorazione è evidente a livello epatico e renale soprattutto nei soggetti numero 5 e 7, i quali presentavano oltre alle lesioni epatiche da stasi e compressione anche un modesto grado di lipidosi in sede peri-portal (**Fotografia n. 5 e 6**). La colorazione di Danscher è risultata positiva anche nel soggetto 6 dove erano presenti depositi citoplasmatici di mercurio negli epatociti, nelle cellule del Kupffer, nelle cellule epiteliali dei tubuli renali prossimali e distali, nei macrofagi dei seni linfonodali sia corticali sia midollari, nei neuroni del midollo allungato. (**Fotografia n. 7**)

Risultati

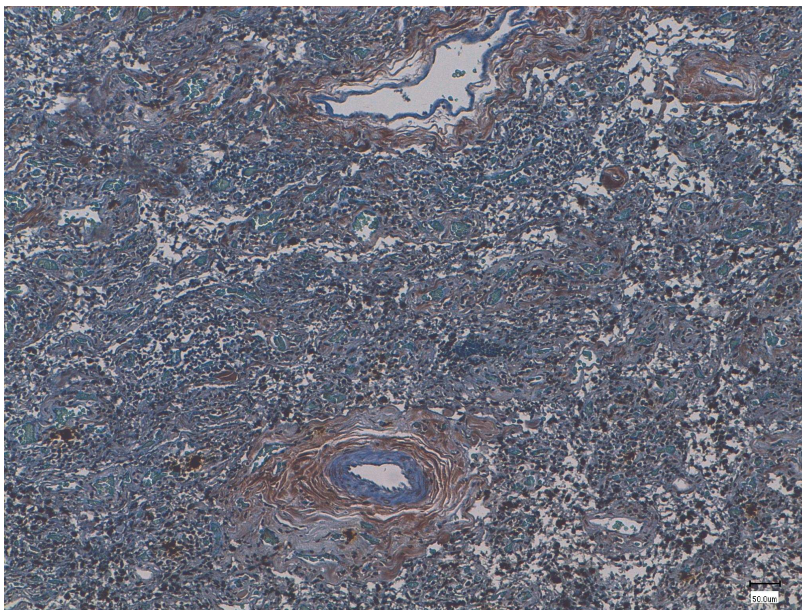


Fotografia 5: Campione di fegato del soggetto n. 5



Fotografia 6: Campione di fegato del soggetto n. 7

Risultati

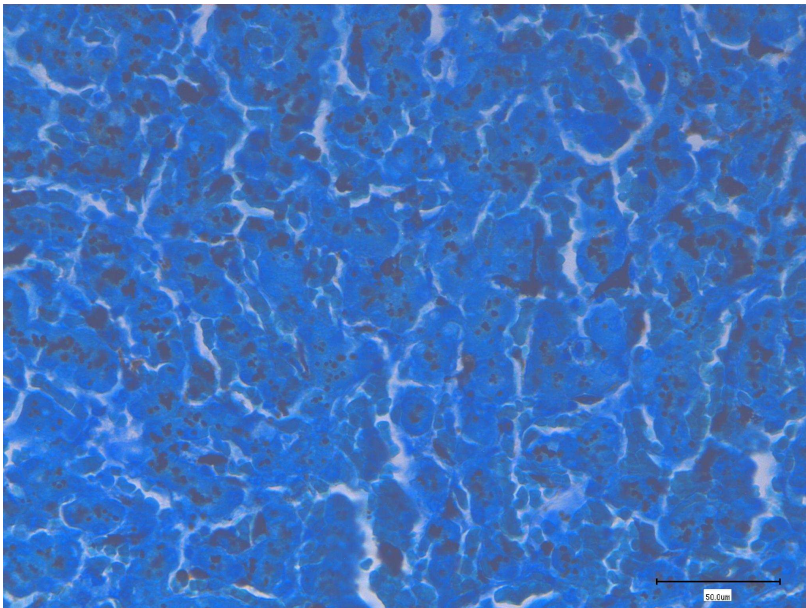


Fotografia 7: Campione di linfonodo soggetto n. 6

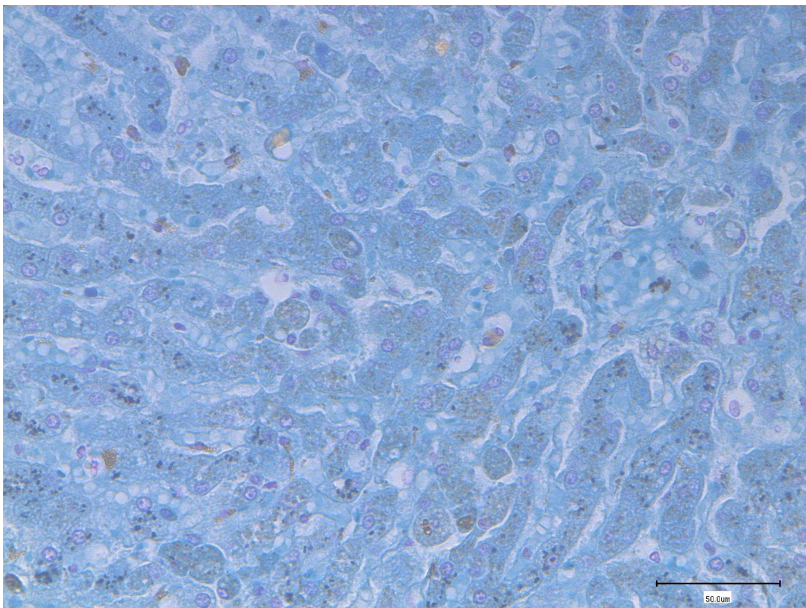
La colorazione per la presenza della lipofuscina eseguita nei tessuti di capodoglio e di altri mammiferi marini è risultata positiva in sede linfonodale, renale ed epatico.

La tecnica autometallografica evidenzia delle differenze anche nei tessuti (rene, fegato, polmone, linfonodi) di altri mammiferi marini usati come mezzo di confronto. Anche in questi campioni la colorazione istochimica è risultata positiva anche se con delle differenze legate alla specie. Nei tursiopi è stata rilevata una maggiore positività a carico del fegato, principalmente a livello peri-portale si notano depositi citoplasmatici di mercurio negli epatociti e nelle cellule del Kupffer (**Fotografia n. 8**) e pigmenti riferibili a lipofuscina a carico degli epatociti (**Fotografia n. 9**) Minore positività è stata rilevata nel linfonodi e rene.

Risultati



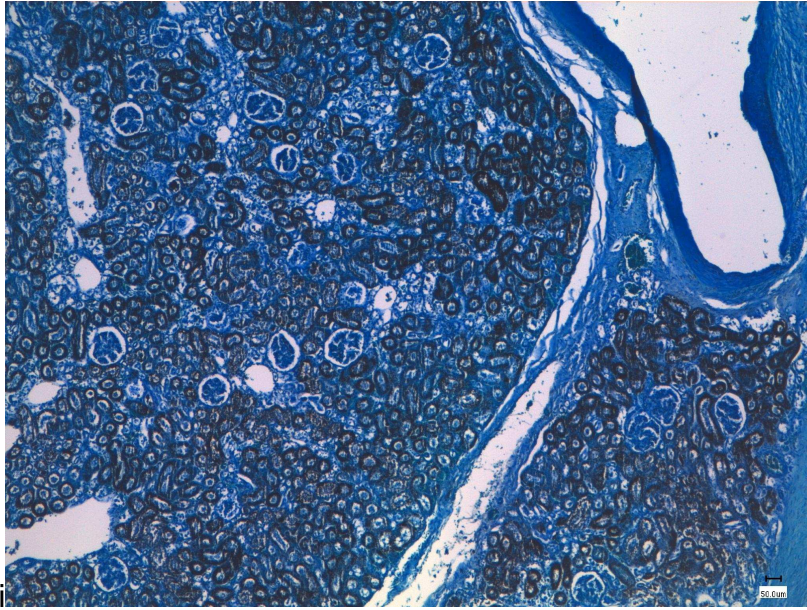
Fotografia 8: Campione di fegato tursiope



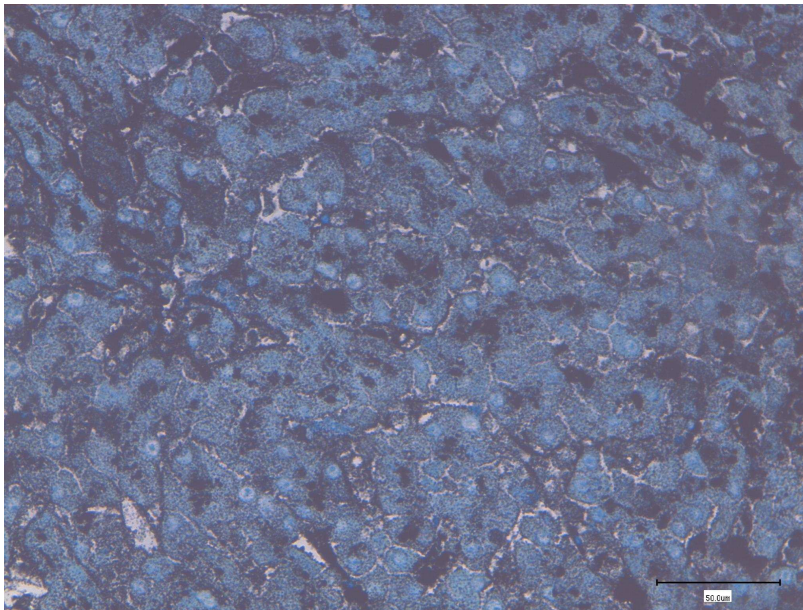
Fotografia 9: Campione di fegato di tursiope colorato con colorazione di Schorml

Nel grampo (ID 116) si è riscontrata una positività molto marcata a carico di tutti i tessuti analizzati. Nel rene in particolare si notano depositi citoplasmatici di mercurio a carico dei tubuli prossimali del rene (**Fotografia n. 10**). Nel fegato si evidenzia una marcata presenza di mercurio con una distribuzione equamente diffusa (**Fotografia n. 11**).

Risultati

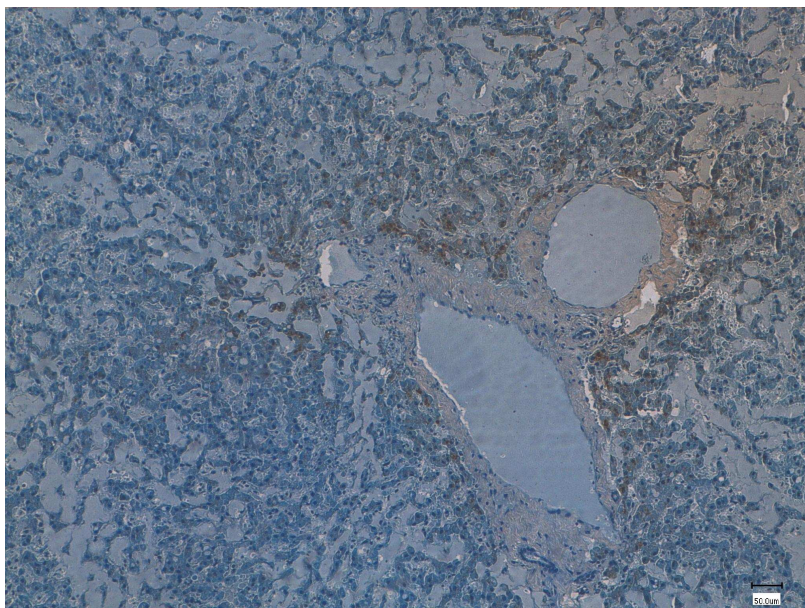


Fotografia 10: Campione di rene di Grampo



Fotografia 11: Campione di fegato di grampo

Invece nella Balenottera comune del Mediterraneo (ID 134) la positività non è stata riscontrata così evidente anche se permangono tracce di mercurio a carico delle cellule di Kupffer nel fegato. **(Fotografia n. 12).**



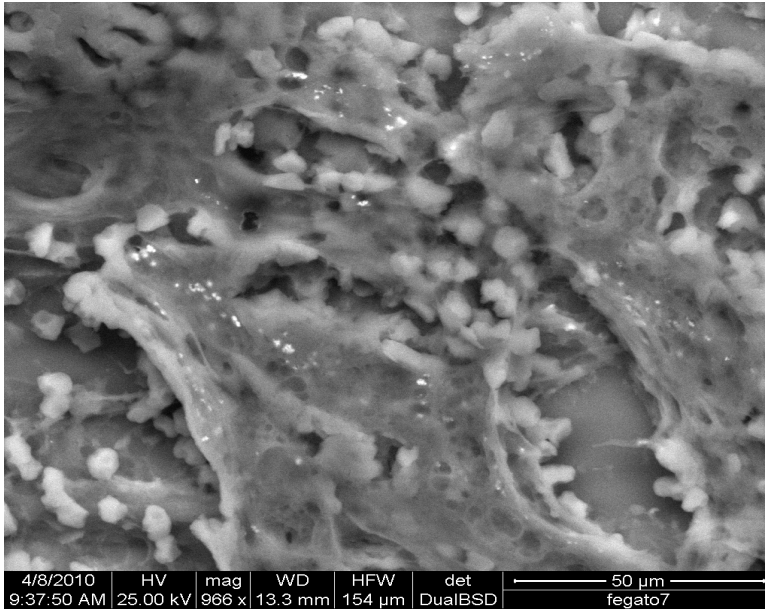
Fotografia 12: Campione di fegato di Balenottera comune

Infine un'ultima indagine per la ricerca dei metalli pesanti ha previsto l'utilizzo del microscopio ottico a scansione (ESEM) evidenziano dei cristalli a carico dei tessuti analizzati, fegato e linfonodo nel soggetto n. 7 (**foto grafie n. 13 e 14**). In entrambi i campioni la composizione di tali cristalli è costituita principalmente da mercurio e selenio non specificando di quale forma di mercurio si tratti. I risultati elaborati dal microscopio rivelano che questi cristalli si compongono di una percentuale di numeri di atomi di zolfo, mercurio e selenio così distribuiti: nel fegato il 17,87% è costituito da zolfo, il 43,87% da mercurio e 38,26% di selenio, mentre nel linfonodo il 24,11% è rappresentato da zolfo, il 44,65% da mercurio ed il 31,24% da selenio (**Tabella n. 20**)

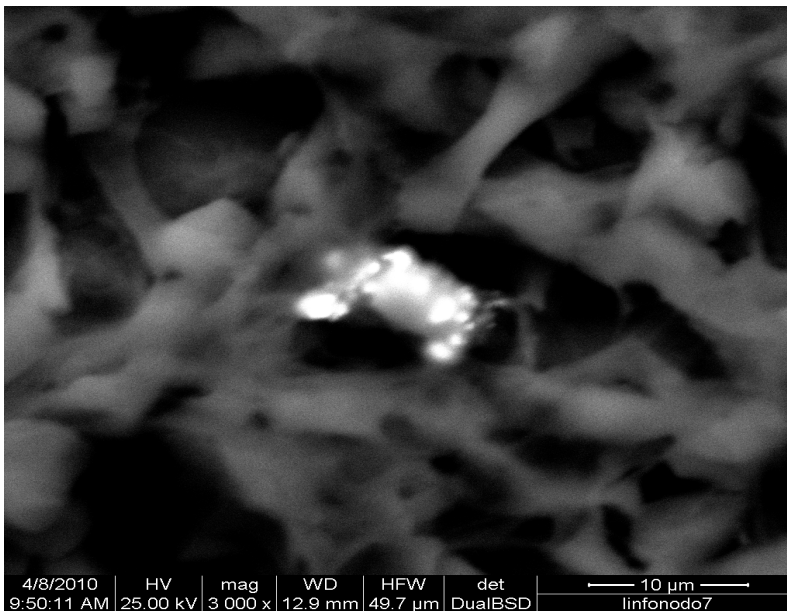
Tabella 20: Percentuale di elementi contenuti in campioni di fegato e linfonodo di capodoglio (soggetto n. 7) analizzati tramite microscopio ottico a scansione (ESEM).

% NUMERI DI ATOMI	FEGATO	LINFONODO
Zolfo	17,87	24,11
Mercurio	43,87	44,65
Selenio	38,26	31,24

Risultati



Fotografia 13: Immagine ottenuta al microscopio ottico a scansione (ESEM) su un campione di fegato di capodoglio (soggetto n. 7)
Le frecce indicano i cristalli di mercurio e selenio rinvenuti



Fotografia 14: Immagine ottenuta al microscopio ottico a scansione (ESEM) su un campione di linfonodo di capodoglio (soggetto n. 7)
Le frecce indicano i cristalli di mercurio e selenio rinvenuti

4.4.2. Esami eco-tossicologici

Il materiale biologico analizzato per valutare la presenza di xenobiotici clorurati ed idrocarburi policiclici aromatici appartiene ad esemplari di capodoglio spiaggiatisi lungo il litorale pugliese, nel Gargano, nell'inverno del 2009.

Nell'elaborazione dei dati, il primo test statistico che è stato applicato è stato quello di Shapiro-Wilks per valutare il tipo di distribuzione dei dati. I risultati del test evidenziano che la maggior parte delle variabili considerate hanno una distribuzione non normale, cioè non seguono la classica curva a campana di Gauss. Per tale motivo i test che sono stati utilizzati per valutare eventuali correlazioni e differenze tra i vari gruppi (diverse aree, maschi e femmine) sono test non parametrici. I valori di media, mediana, minimo e massimo, deviazione standard (D.S.) e errore standard (E.S.) vengono riportati al solo scopo descrittivo,

Nelle **tabelle n. 22, 23 e 24** vengono riportati i valori di statistica descrittiva degli OCs riferiti al materiale biologico: adipe sottocutaneo, fegato e muscolo, prelevato agli esemplari di capodoglio spiaggiatisi in Puglia, tutti di sesso maschile.

Risultati

Tabella 21: Statistica descrittiva dei livelli di OC (ng/g p.s.) e della Materia Organica Estratta (MOE%) rilevati nell'adipe sottocutaneo degli esemplari di capodoglio spiaggiatisi nel Gargano (Puglia).

	N	MEDIA	MEDIAN A	MINIM O	MASSIM O	DEVIAZIO NE STANDAR D	ERRORE STANDA RD
MOE%	7	71,29	72,00	58,10	79,10	7,10	2,69
HCB	7	521,75	131,97	74,13	2887,27	1043,79	394,52
Op'DDE	7	2598,30	339,09	217,86	15537,4 1	5714,01	2159,69
Pp'DDE	7	133144, 44	25617,2 5	15977, 99	636319, 63	227504,43	85988,59
Op'DDD	7	3227,17	637,39	271,65	18201,9 3	6621,23	2502,59
Pp'DDD	7	2562,16	412,24	305,67	11991,54	4323,50	1634,13
Op'DDT	7	5724,00	953,30	662,50	27173,4 8	9796,86	3702,86
Pp'DDT	7	9938,75	1942,93	1163,10	40683,4 9	14874,79	5622,14
DDT TOT.	7	157194, 82	29742,1 1	18886, 85	749907, 48	268360,49	101430,73
95	7	1197,67	288,06	146,46	6192,33	2220,81	839,39
101	7	3620,79	822,21	335,77	19436,7 6	7017,28	2652,28
99	7	754,78	110,10	38,35	4658,91	1722,00	650,85
151	7	2206,50	525,19	224,25	11010,56	3951,17	1493,40
144+135	7	1554,83	295,84	193,76	8039,93	2893,21	1093,53
149+118	7	14124,8 4	3029,95	1635,8 7	69910,1 2	25075,56	9477,67
146	7	5963,61	1429,72	688,89	29294,8 4	10484,97	3962,95
153	7	32191,8 9	7311,85	3450,4 3	157312, 38	56378,43	21309,04
141	7	3913,23	361,82	135,65	24644,8 1	9152,17	3459,19
138	7	18513,4 6	4117,37	2107,6 2	89147,3 5	31937,53	12071,25
178	7	2269,93	553,65	231,07	11735,57	4223,63	1596,38

Risultati

187	7	9811,03	2401,63	1125,82	47547,3 7	17002,97	6426,52
183	7	3031,07	721,80	305,55	14506,6 5	5187,72	1960,77
128	7	1155,95	193,98	117,29	6583,49	2400,13	907,16
174	7	2671,49	644,70	402,41	12226,8 6	4345,70	1642,52
177	7	2582,68	558,13	249,60	13006,3 8	4678,15	1768,18
156+171+202	7	2862,18	573,95	274,36	15044,7 1	5433,31	2053,60
172	7	1132,20	283,94	140,76	5579,24	1991,96	752,89
180	7	16383,5 3	3841,68	1787,8 6	79097,5 4	28308,26	10699,52
199	6	53,39	48,97	31,64	73,41	16,81	6,86
170	7	10046,8 9	2119,76	948,84	50945,3 9	18331,04	6928,48
196	7	2166,70	477,91	310,34	10235,6 7	3644,23	1377,39
201	7	2085,00	417,39	234,23	10821,3 0	3894,13	1471,84
195	5	280,09	188,07	78,13	773,35	284,56	127,26
194	7	8201,01	248,77	124,62	55145,7 4	20703,42	7825,16
206	5	38,11	34,40	20,11	67,22	17,76	7,94
PCB TOT.	7	148714, 34	31601,8 6	15420, 32	752123, 91	270389,05	102197,46

Risultati

Tabella 22: Statistica descrittiva dei livelli di OC (ng/g p.s.) e della Materia Organica Estratta (MOE%) rilevati nel muscolo degli esemplari di capodoglio spiaggiatisi nel Gargano (Puglia).

	N	MEDIA	MEDIAN A	MINIM O	MASSIM O	DEVIAZION E STANDARD	ERRORE STANDAR D
MOE%	7	18,72	17,71	9,40	28,40	7,10	2,69
HCB	7	14,53	17,18	3,17	26,60	8,78	3,32
op'DDE	7	39,61	39,73	10,15	74,09	26,93	10,18
pp'DDE	7	4206,2 3	3071,88	797,51	11507,07	3802,31	1437,14
op'DDD	7	112,25	133,47	24,86	214,46	78,76	29,77
pp'DDD	7	112,55	110,51	18,99	245,43	89,82	33,95
op'DDT	7	117,60	60,60	17,42	461,45	154,88	58,54
pp'DDT	7	258,48	123,76	32,86	1064,09	361,14	136,50
DDT TOT.	7	4846,7 1	3539,95	910,35	13429,49	4426,67	1673,12
95	7	47,76	36,56	13,74	111,60	35,20	13,31
101	7	118,49	132,98	21,83	221,59	84,51	31,94
99	7	15,05	16,94	3,01	27,95	9,72	3,67
151	7	74,16	72,99	15,34	177,55	60,68	22,93
144+135	7	46,59	40,54	10,32	115,09	38,14	14,41
149+118	7	485,97	448,29	109,98	1199,62	401,75	151,85
146	7	187,50	198,09	45,00	434,24	146,96	55,55
153	7	1042,7 8	1058,82	233,14	2610,17	886,37	335,01
141	7	47,55	46,50	9,52	119,32	39,78	15,04
138	7	635,85	551,98	130,48	1666,30	558,44	211,07
178	7	74,52	73,85	15,79	170,09	59,25	22,39
187	7	341,08	319,49	72,81	837,58	283,50	107,15
183	7	114,75	108,80	22,69	283,36	96,79	36,58
128	7	23,17	21,24	5,37	42,39	14,48	5,47
174	7	114,16	104,62	25,50	275,04	91,93	34,74
177	7	82,76	76,68	18,07	210,28	70,56	26,67
156+171+20 2	7	83,92	78,61	18,18	200,73	67,71	25,59
172	7	37,84	37,53	8,51	86,79	29,69	11,22
180	7	558,06	511,75	106,92	1411,01	480,59	181,65
199	7	5,34	5,22	2,56	7,56	1,84	0,70

Risultati

170	7	283,58	265,59	57,38	700,14	237,76	89,87
196	7	85,97	81,65	12,66	194,23	68,86	26,03
201	7	70,43	67,12	14,16	163,96	57,54	21,75
195	6	41,94	41,59	14,22	68,70	22,00	8,98
194	7	59,69	42,96	12,45	115,06	42,00	15,88
206	7	12,40	9,81	3,94	28,10	9,22	3,48
PCB TOT.	7	4685,35	4456,34	1006,58	11451,72	3869,91	1462,69

Tabella 23: Statistica descrittiva dei livelli di OC (ng/g p.s.) e della Materia Organica Estratta (MOE%) rilevati nel fegato degli esemplari di capodoglio spiaggiatisi nel Gargano (Puglia).

	N	MEDIA	MEDIANA	MINIMO	MASSIMO	DEVIAZIONE STANDARD	ERRORE STANDARD
MOE%	3	18,63	15,60	12,70	27,60	7,90	4,56
HCB	3	35,83	31,29	8,10	68,10	30,26	17,47
op'DDE	3	125,72	77,18	18,59	281,38	137,96	79,65
pp'DDE	3	13074,30	5334,49	1261,81	32626,61	17054,80	9846,59
op'DDD	3	316,97	174,22	49,73	726,97	360,48	208,12
pp'DDD	3	476,20	68,81	59,94	1299,83	713,30	411,83
op'DDT	3	420,28	224,70	4,45	1031,70	540,83	312,25
pp'DDT	3	948,84	347,76	21,23	2477,54	1333,92	770,14
DDT TOT.	3	15362,31	6227,15	1415,75	38444,03	20133,59	11624,14
95	3	104,58	79,84	12,47	221,42	106,65	61,57
101	3	317,28	215,44	30,04	706,34	349,46	201,76
99	3	32,67	24,59	8,11	65,31	29,45	17,00
151	3	238,94	114,87	17,07	584,87	303,55	175,26
144+135	3	147,97	65,23	13,91	364,78	189,51	109,41
149+118	3	1586,47	677,41	129,55	3952,46	2067,23	1193,52
146	3	612,94	275,78	52,22	1510,82	785,58	453,55
153	3	3519,55	1479,12	248,90	8830,62	4640,47	2679,18
141	3	139,67	66,02	10,78	342,22	177,57	102,52
138	3	2113,55	828,83	152,15	5359,67	2831,51	1634,77
178	3	225,45	110,20	19,63	546,53	281,72	162,65
187	3	1080,12	456,82	82,55	2700,99	1416,14	817,61
183	3	361,85	152,86	24,54	908,16	477,45	275,65

Risultati

128	3	53,20	35,88	7,20	116,51	56,68	32,72
174	3	380,18	174,27	29,46	936,79	487,45	281,43
177	3	264,11	110,50	18,54	663,31	348,76	201,36
156+171+202	3	269,63	118,05	19,21	671,64	351,64	203,02
172	3	108,10	52,91	9,09	262,31	135,33	78,13
180	3	1799,56	717,73	119,69	4561,27	2410,33	1391,60
199	3	13,30	4,38	2,25	33,29	17,34	10,01
170	3	915,64	378,62	61,94	2306,35	1214,75	701,34
196	3	242,78	113,80	15,43	599,12	312,49	180,42
201	3	204,12	95,02	15,57	501,77	260,82	150,58
195	3	103,16	51,53	3,39	254,57	133,31	76,97
194	3	110,30	52,56	9,34	269,00	139,13	80,33
206	2	31,59	31,59	11,56	51,62	28,33	20,03
PCB TOT.	3	14966,19	6463,82	1113,03	37321,73	19544,45	11283,99

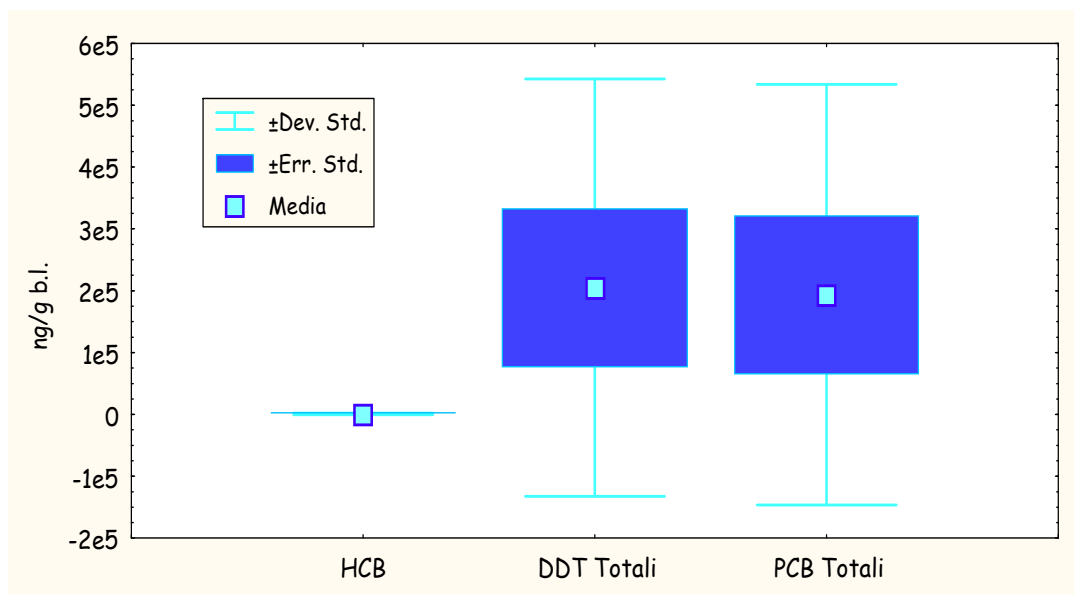


Figura 13: Media aritmetica, D.S. ed E.S. dei livelli di HCB, DDT Totali e PCB Totali (ng/g base lipidica) rilevati nell'adipe sottocutaneo degli esemplari di capodoglio spiaggiatisi nel Gargano (Puglia)

Come possiamo (**Figura n. 15**) vedere l'HCB è lo xenobiotico clorurato presente con i livelli più bassi in tutto il materiale biologico, mentre è sorprendente il fatto che i DDT Totali siano quelli maggiormente elevati sia

Risultati

nell'adipe che nel muscolo che nel fegato nonostante il divieti di uso di questo pesticida da oltre 30 anni. I PCB Totali hanno concentrazioni in assoluto sempre molto elevate, ma leggermente inferiori di quelle del DDT.

Come potevamo aspettarci sia in base ai dati ottenuti su altre specie di Cetacei che alle caratteristiche del tessuto stesso, l'accumulo più marcato si ha a livello dell'adipe sottocutaneo, seguito dal fegato e quindi dal muscolo. Anche l'HCB ha i livelli maggiori nell'adipe anche se le differenze non si apprezzano. HCB e DDT Totali sono maggiori nell'adipe rispetto al muscolo.

Per quel che riguarda i PAHs, le tabelle di statistica descrittiva sono riportate di seguito (**Tabella n. 25, 26 e 27**).

Tabella 24: Statistica descrittiva dei livelli di PAH (ng/g p.s.) e della Materia Organica Estratta (MOE%) rilevati nell'adipe sottocutaneo degli esemplari di capodoglio spiaggiatisi nel Gargano (Puglia).

	N	MEDIA	MEDIA	MINIMO	MASSIMO	DEVIAZIONE	ERRORE
	.	A	NA	O	MO	STANDARD	STANDARD
MOE%	7	71,29	72,00	58,10	79,10	7,10	2,69
Naftalene	7	94,56	93,79	33,13	130,94	33,02	12,48
Acenaftene	7	64,60	34,08	16,93	252,24	83,97	31,74
Fluorene	7	32,89	21,29	18,68	88,80	25,40	9,60
Fenantrene	7	14,14	12,63	8,79	22,12	4,36	1,65
Antracene	7	0,99	0,94	0,55	1,69	0,45	0,17
Fluorantene	7	4,99	3,31	1,82	9,28	3,14	1,19
Pirene	7	2,80	1,91	0,62	5,75	2,26	0,86
Benzo(a)antracene	7	0,69	0,73	0,30	1,04	0,30	0,11
Crisene	7	7,23	5,90	4,82	10,76	2,28	0,86
Benzo(b)fluorantene	7	4,43	5,37	1,96	6,19	1,80	0,68
Benzo(k)fluorantene	7	0,63	0,59	0,17	1,41	0,38	0,15
Benzo(a)pirene	7	0,51	0,48	0,19	1,04	0,31	0,12
Dibenzo(a,h)antracene	7	1,03	0,89	0,43	1,80	0,48	0,18

Risultati

Benzo(g,h,i)perilene	7	1,52	1,37	0,94	2,30	0,49	0,18
IPA Totali	7	231,03	233,25	100,44	397,05	90,04	34,03
IPA Cancerogeni	7	14,52	15,08	9,71	19,89	4,02	1,52

Tabella 25: Statistica descrittiva dei livelli di PAH (ng/g p.s.) e della Materia Organica Estratta (MOE%) rilevati nel muscolo degli esemplari di capodoglio spiaggiatisi nel Gargano (Puglia).

	N	MEDIA	MEDIA NA	MINIMO	MASSIMO	DEVIAZIONE STANDARD	ERRORE STANDARD
MOE%	7	18,72	17,71	9,40	28,40	7,10	2,69
Naftalene	7	87,05	98,11	29,80	173,91	54,08	20,44
Acenaftene	7	66,70	34,34	5,70	202,06	74,71	28,24
Fluorene	7	94,77	83,89	18,26	267,03	89,81	33,94
Fenantrene	7	14,63	15,85	3,25	30,13	9,54	3,61
Antracene	7	0,80	0,63	0,22	2,03	0,59	0,22
Fluorantene	7	4,80	3,85	2,08	8,62	2,81	1,06
Pirene	7	8,94	6,41	4,64	16,52	4,46	1,69
Benzo(a)antracene	7	1,48	0,52	0,25	4,85	1,76	0,66
Crisene	7	3,92	3,76	0,88	6,91	1,95	0,74
Benzo(b)fluorantene	7	2,78	2,74	1,22	3,98	0,89	0,34
Benzo(k)fluorantene	7	0,68	0,66	0,43	1,10	0,26	0,10
Benzo(a)pirene	7	0,59	0,50	0,40	1,09	0,24	0,09
Dibenzo(a,h)antracene	7	0,91	1,02	0,50	1,25	0,31	0,12
Benzo(g,h,i)perilene	7	1,08	1,02	0,39	2,14	0,59	0,22
IPA Totali	7	289,12	344,77	90,93	380,41	108,92	41,17
IPA Cancerogeni	7	10,36	11,89	5,32	14,14	3,42	1,29

Risultati

Tabella 26: Statistica descrittiva dei livelli di PAH (ng/g p.s.) e della Materia Organica Estratta (MOE%) rilevati nel fegato degli esemplari di capodoglio spiaggiatisi nel Gargano (Puglia).

	N	MEDIA	MEDIA	MINIMO	MASSIMO	DEVIAZIONE	ERRORE
	.	A	NA	O	MO	NE	STANDARD
						STANDARD	RD
MOE%	3	18,63	15,60	12,70	27,60	7,90	4,56
Naftalene	3	53,94	44,76	24,92	92,14	34,54	19,94
Acenaftene	3	32,74	37,63	21,76	38,85	9,54	5,51
Fluorene	3	15,89	18,03	4,66	24,99	10,33	5,96
Fenantrene	3	12,36	12,53	11,82	12,73	0,48	0,28
Antracene	3	1,31	1,59	0,68	1,65	0,55	0,32
Fluorantene	3	3,93	2,78	1,81	7,21	2,88	1,66
Pirene	3	8,38	7,65	4,48	13,02	4,32	2,49
Benzo(a)antracene	3	0,60	0,53	0,47	0,79	0,17	0,10
Crisene	3	7,94	7,59	3,49	12,73	4,63	2,67
Benzo(b)fluorantene	3	4,45	5,71	1,22	6,44	2,82	1,63
Benzo(k)fluorantene	3	0,70	0,56	0,47	1,05	0,31	0,18
Benzo(a)pirene	3	8,69	2,62	2,10	21,36	10,98	6,34
Dibenzo(a,h)antracene	3	6,81	7,28	2,50	10,65	4,09	2,36
Benzo(g,h,i)perilene	3	2,54	2,79	1,35	3,49	1,09	0,63
IPA Totali	3	160,29	139,13	122,01	219,74	52,19	30,13
IPA Cancerogeni	3	29,19	30,41	10,26	46,89	18,35	10,59

Risultati

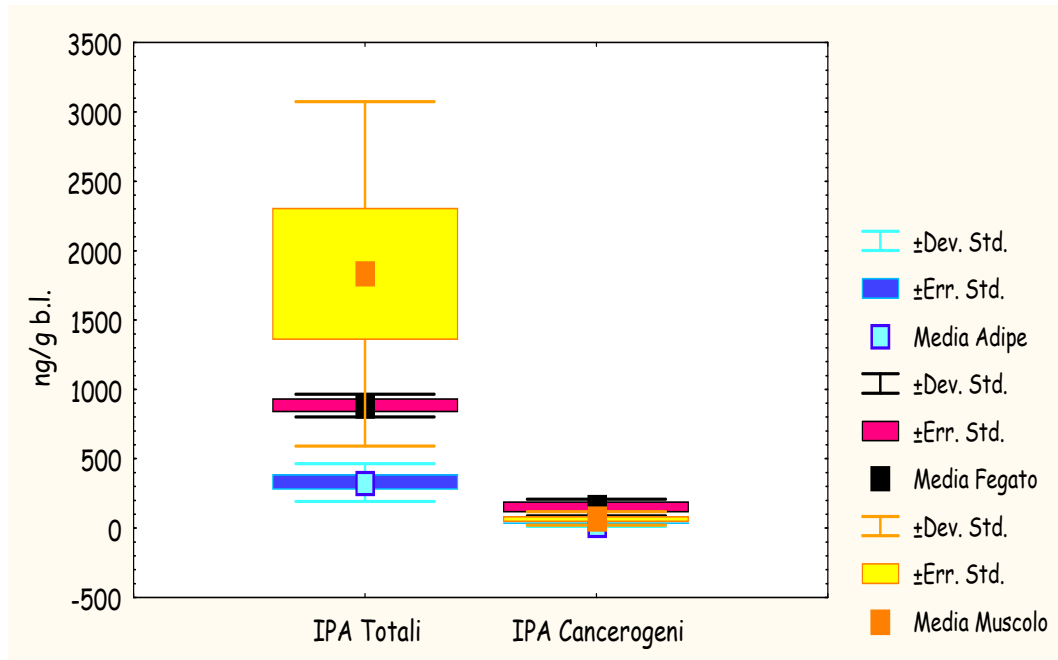


Figura 14: Media aritmetica, D.S. ed E.S. dei livelli di IPA Totali ed IPA Cancerogeni (ng/g base lipidica) rilevati nel materiale biologico degli esemplari di capodoglio spiaggiatisi nel Gargano (Puglia).

Il risultato più sorprendente è dato dai livelli più elevati di IPA totali nel tessuto muscolare, seguito dall'organo epatico e quindi dal tessuto adiposo. Anche nel fegato si sono riscontrati livelli sia di IPA Totali che Cancerogeni significativamente maggiori ($p < 0,05$). Infine tra muscolo e fegato risultano significativamente differenti solo i livelli di IPA Totali ($p < 0,10$) (**Figura n. 16**).

4.4.3. Prove biologiche

Per valutare il ruolo delle sostanze chimiche reperite nei tessuti sono state effettuate alcune prove biologiche *in vivo*.

Tali esperimenti sono stati realizzati tramite studi *in vivo* su topi di laboratorio ed esemplari di *Gambusia Affinis*. Ai primi sono state somministrate quote di estratti di fegato e fegato dei soggetti di capodoglio 6 e 7 per via intraperitoneale e orale. I soggetti trattati con estratti di fegato per via intraperitoneale sono giunti a morte dopo 14-16 ore. Nei soggetti alimentati con quote diverse di fegato dei capodogli dopo 24 ore dalla somministrazione si riscontravano segni quali: letargia, pelo arruffato, riluttanza al movimento ed ottundimento del sensorio. Quindi gli animali

Risultati

sono stati sacrificati ed i rispettivi organi (fegato, reni ed encefalo) sono stati utilizzati per la ricerca del mercurio. Il quantitativo di mercurio dei soggetti inoculati per via intraperitoneale e deceduti dopo 14-16 ore è sovrapponibile a quello dei gruppi controllo (**Tabella n. 21**)

Tabella 27: Risultati delle prove biologiche su topi di laboratorio

PROVA	TESSUTO e CONCENTRAZIONE (ppm - µg/g)
Topi <u>inoculati IP</u> con estratti di fegato di capodoglio <u>n. 6 e 7</u>	Encefalo < 0,010 , Organi < 0,010
Topi <u>alimentati con 2 g</u> di fegato di capodoglio <u>n 7</u>	Encefalo 0,126 , Reni 1,046 , Fegato 0,328
Topi <u>alimentati con 4 g</u> di fegato di capodoglio <u>n 7</u>	Encefalo 0,171 , Reni 1,53 , Fegato 0,442
Topi <u>alimentati con 2 g</u> di fegato di capodoglio <u>n 6</u>	Encefalo 0,200 , Reni 1,57 Fegato 0,510
Topi <u>alimentati con 4g</u> di fegato di capodoglio <u>n 6</u>	Encefalo 0,153 Reni 1,47 Fegato 0,664

Nel secondo studio sono stati utilizzati esemplari di *Gambusia affinis*. L'esperimento è stato mantenuto fino a 48 h e quindi si è proceduto al sacrificio degli animali per le indagini dei *biomarkers*. Le prove hanno dimostrato una inibizione parziale della AChE sottolineando la presenza di un potenziale agente neurotossico.



5. Discussione e conclusione

Lungo il litorale tra Cagnano, Varano ed Ischitella in provincia di Foggia in data 10 Dicembre del 2009 si sono spiaggiati 7 capodogli (*Physeter macrocephalus*). In questo litorale sabbioso di oltre 4 chilometri gli animali arenati si presentavano parzialmente ricoperti d'acqua e con il corpo parallelo alla linea di costa. Tutti e 7 erano maschi con una lunghezza standard compresa tra 10,5 e 12,5 metri, un peso che oscillava tra i 12,5 e 15,5 tonnellate ed un'età valutata attorno ai 20 anni (in particolare 15 anni per il soggetto n. 5, il più giovane, e di circa 25 anni per il soggetto n.1, quello più adulto. Una volta accertato il decesso le carcasse sono state trasportate a riva dove è stato possibile effettuare la necropsia. Lo spiaggiamento di questi animali è avvenuto nel Mar Adriatico Meridionale

luogo dove raramente si riscontra la presenza di capodogli (Reeves R. e Notabartolo di Sciara G., 2006), probabilmente anche a causa della acque poco profonde e la particolare batimetria del fondale che rendono inospitale questo bacino del Mediterraneo, ad esclusione del “Canyon di Bari”, fossa di oltre 1.000 mt di profondità tra le coste pugliesi e l’Albania. Nonostante questo sono stati registrati numerosi spiaggiamenti di questa specie, tra cui 6 di massa, compreso quello descritto in questo lavoro (Bearzi et al., 2010). I rapporti li collocano lungo una costa sabbiosa, con acque basse e profilo lineare, condizione simile alle “acoustic dead zones” descritte in letteratura in altre parti del mondo (Bala S. *et al.*, 2005). La presenza dei capodogli comunque risulta ben documentata nel Mar Ionio, da dove pare siano partiti i capodogli di questo gruppo prima di giungere a spiaggiarsi sul Gargano (R. Frantzis A., comunicazione personale). Di fatto, i dati genetici supportati da rilievi fotografici e dalle analisi degli isotopi stabili, confermano l'appartenenza di questo gruppo di capodogli alla popolazione del Mediterraneo. Inoltre il confronto tra le foto identificative prese in vita e conservate in vari database mediterranei, confermano che almeno due dei soggetti provenivano dal Mar Ligure, mentre 1 è stato avvistato più volte nella “Fossa Ellenica” (Mar Ionio). Questi dati, hanno stimolato il confronto e lo scambio di informazioni tra gruppi di studio, che sono giunti a ipotizzare una migrazione stagionale tra i due bacini attraverso lo stretto di Messina o (meno probabile), il Canale di Sicilia. Tale osservazione viene supportata dai dati sugli isotopi stabili che indicano un cambio di dieta avvenuto 2-3 mesi prima dello spiaggiamento. Il sito di spiaggiamento si trova ad almeno 350 km da S. Maria di Leuca (LE), imboccatura del bacino Adriatico, mentre dista oltre 650 km dalle prime isole ioniche della Grecia, dove appunto inizia l’area di presenza dei capodogli. Quanto detto in considerazione della massima velocità orizzontale degli animali riportata in letteratura (70-90 km/giorno), senza interruzioni e con una rotta pressoché lineare, senza soste, in assenza di deviazioni dovute alle correnti né di rallentamenti dovuti a stanchezza o altre cause.

Attualmente le cause di spiaggiamento di cetacei vivi sono in gran parte ancora sconosciute (Simmonds 1997, Geraci et al. 1999, Goold et al. 2002, Bradshaw et al. 2006) ma si possono attribuire ad una condizione multifattoriale (Evans et al., 2005; Whitehead, 2000; Jauniaux et al, 1998). Tra le cause di spiaggiamenti, così come espresso in letteratura e citate nell'Introduzione (par. 1.3.1), risultano i cambiamenti climatici meteorologici. Solamente alcuni dati relativi al periodo dell'evento, riportano delle variazioni sostanziali. Anche per quanto riguarda i dati ufficiali attinenti ad esercitazioni militari e attività di prospezione geologica, in atto in quell'area in quel periodo o in quello precedente, non sono stati riscontrati eventi significativi. Di fatto, anche le indagini sugli emboli gassosi escludono che la causa del decesso sia da attribuirsi alla "*gas and fat embolic syndrome*", condizione patologica riportata in letteratura come associata spazialmente e temporalmente all'esposizione ai sonar militari (Fernandez et al., 2005). Di contro, i reperti embolici rilevati nei casi cardiaci, mesenterici e sottocutanei hanno messo in evidenza una composizione simile all'aria espirata, risultando quindi essere aria che dai polmoni, probabilmente per effetto della compressione del torace, è entrata in circolo. Queste lesioni sono quindi assimilabili al pneumoediastino, pneumotorace e pneumopericardio osservati durante le necroscopie e che, insieme ai quadri congestizi, emorragici, degenerativi e necrotici a carico di polmone, rene e fegato, rappresentano le lesioni da decubito che rendono impossibile un recupero di tali soggetti ai fini di riabilitazione e rilascio oltre le 6 ore dallo spiaggiamento.

Anche cause patologiche, probabilmente, possono provocare la morte dell'animale portandolo a spiaggiarsi (Jauniaux et al. 1997, Lambertsen 1997). I reperti necroscopici trovati durante questo spiaggiamento sono numerosi ma non si rileva alcuna indicativa lesione patologica che possa esserne responsabile. Per questioni organizzative le necroscopie complete sono state effettuate solo sugli individui 5, 6 e 7 che sono stati numerati. Tale numerazione sembrava rispettare l'ordine di spiaggiamento e/o decesso. È da sottolineare che dall'analisi dei contenuti stomacali (di

tutti e 7 i soggetti) è emerso che la frazione organica si componeva prevalentemente da becchi di cefalopodi, questi molluschi sembrano essere la parte principale della dieta di questi animali (Evans et al., 2004, Sean C. et al., 2000). Il ritrovamento solo della parte chitinoso della preda a vari gradi di digestione potrebbe essere il risultato di uno stato di digiuno prolungato dei 7 soggetti. In particolare, i dati descritti da Karen Evans (2004) su spiaggiamenti di massa di capodogli, suggeriscono che il tempo di transito delle parti molli delle prede sia superiore ai 3-5 giorni, indicando in questo caso un digiuno compatibile con i tempi di spostamento dal Mar Ionio al bacino Adriatico.

Tale condizioni di inanizione potrebbe aver provocato la movimentazione delle riserve lipidiche ed eventuale aumento nella concentrazione circolante di sostanze inquinanti lipofiliche presenti nel tessuto adiposo. Tale condizione ha sicuramente favorito ed indotto uno stato di immunocompromissione, evidente anche all'osservazione microscopica degli organi linfoidi secondari, che ha potenzialmente esposto gli animali a quadri infiammatori secondari acuti, come broncopolmoniti e dermatiti sostenute da batteri opportunisti.

Dai rilievi tossicologici e da prove biologiche effettuate si rileva la presenza di un'alterazione delle funzioni nervose ad eziologia esogena che, per quanto minima può aver alterato il senso di orientamento e della percezione. Infatti è ben documentato in letteratura come i mammiferi marini possano rappresentare un potenziale indicatore di sostanze tossiche, come organo clorurati e metalli pesanti, presenti nell'ambiente marino. (Karen E., 2004; Kamin and Riger, 1994; Tanabe *et al.*, 1994) Le indagini realizzate per la ricerca di metalli pesanti hanno messo in evidenza dei valori elevati di mercurio. Considerate le scarse conoscenze relativamente agli effetti di questa sostanza in questa specie, le indagini che sono state realizzate miravano ad approfondire il ruolo di questo elemento nei capodogli e in altri mammiferi marini utilizzati come mezzo di confronto.

La concentrazione di mercurio è risultata essere 88,3, 119 e 93,8 mg/kg

Discussione e conclusione

w.w. nei campioni di fegato e 5,01, 7,15 e 4,88 mg/kg w.w. nei campioni di rene per i soggetti n. 5,6 e 7 rispettivamente, con una percentuale di metilmercurio nel fegato tra 4,70-5,10%. Le concentrazioni di mercurio risultano superiori rispetto ai soggetti spiaggiati in altri eventi di massa (Holsbeek L. et al., 1999), ma sono in linea con i livelli evidenziati in altre specie nel Mar Mediterraneo (Capelli R. et al., 2008; Frodello J.P. et al. 2000). Interessante è stata la scoperta di una percentuale di metilmercurio tra il 26,60 ed il 44,10% nei reni che potrebbe suggerire la movimentazione di questo elemento in circolo (Thomas w., 2007). In letteratura (Frodello et al., 2000, Caurant *et al.*, 1996) si mette in evidenza come nei mammiferi marini il fegato risulti essere il principale sito di demetilazione ed accumulo di mercurio e selenio, mentre a livello renale avviene il processo di escrezione. Durante il processo di demetilazione il mercurio organico (MeHg), che è la forma più tossica, viene convertito in mercurio inorganico e coniugato con il selenio ne annulla la tossicità. Infatti, il selenio ed il mercurio, in rapporto molare 1:1 circa, si legano tra di loro andando a formare un complesso noto come seleniuro di mercurio che è implicato nel processo di detossificazione. Questi depositi si rilevano tramite la tecnica auto-metallografia correlata con tecniche di rilevamento a raggi X che evidenzia la presenza di cristalli di solfuro e seleniuro di mercurio quindi, mercurio inorganico. Infatti tale colorazione, eseguita nei tessuti dei soggetti n.5,6 e 7 è risultata positiva anche se con dei gradi diversi di distribuzione. Si evidenziano dei depositi citoplasmatici nei macrofagi soprattutto, in sede periportale nel fegato (soggetti 5 e 7) e nei macrofagi nei seni linfonodali sia corticali che midollari.. La colorazione di Danscher effettuata su vari tessuti sembra comunque suggerire la circolazione del mercurio ed una localizzazione certa in sede neuronale, comune ad entrambe le forme di mercurio (inorganica e organica). Tale osservazione pare trovare supporto anche nelle prove di somministrazione *per os* di fegato di capodoglio su topo. Per meglio comprendere la cinetica di questo elemento la colorazione è stata eseguita anche su altri mammiferi che sono stati utilizzati come mezzi di confronto. Dai risultati

emerge che la minor quantità della distribuzione di mercurio si riscontra nei tessuti delle balenottere comuni. Questo potrebbe far ipotizzare che la diversa alimentazione rifletta i livelli più bassi di mercurio trovati. Infatti è ben documentata come la dieta sia responsabile della contaminazione di questo elemento (Svensson et al., 1992 Nakagawa et al., 1997). Alcuni studi hanno dimostrato che ad ogni passaggio della catena alimentare la concentrazione del metilmercurio nell'organismo cresce, e la sua concentrazione nei predatori acquatici, come alcuni mammiferi marini in cima alla catena alimentare, può essere un milione di volte maggiore rispetto alla concentrazione nell'acqua. (Bouquegneau and Joiris, 1988). Elevati livelli di concentrazione di mercurio sono stati trovati in alcune balenottere minori (*Balaenoptera acutorostrata*) della Groenlandia (Hansen et al., 1990), mentre quelle provenienti dall'Antartico presentavano una quantità di mercurio decisamente inferiore (Honda et al., 1986, 1987). Hansen et al. (1990) hanno attribuito questo basso livello di mercurio trovato nei tessuti degli animali (*Balaenoptera bonaerensis*) provenienti dall'Antartico al differente livello trofico ed in seguito al contenuto di mercurio presente nella dieta dei due diversi mammiferi marini. Quelle del nord si cibano principalmente di pesce mentre quelle del sud mangiano prevalentemente krill.

La colorazione di Dancher è risultata essere marcatamente positiva anche nei tessuti di grampo. Tuttavia a dispetto di molti studi ben documentati, riguardanti l'inquinamento dei metalli pesanti presenti nelle stenelle e nei tursiopi (Augier et al., 1993; Van Vleet E., 1996), le indagini che si occupano dei grampi sono poco numerose. Nel Mar Mediterraneo il limitato numero degli spiaggiamenti di questa specie non consente di avere dati completi. La loro dieta, come quella dei capodogli, sembra essere costituita prevalentemente da calamari ed occasionalmente da pesci (Robineau A.; 1982). Questi molluschi sembrano avere un contenuto di mercurio più elevato rispetto agli altri (Frodello et al., 2000) . Anche le colorazioni dei tessuti dei tursiopi, che si nutrono di pesci, sono risultate essere positive ma in misura minore se rapportate a quelle di

grampo e capodogli.

La tecnica auto-metallografica è stata eseguita anche su campioni di tessuto polmonare dei capodogli e di altri mammiferi marini. Dai risultati si rileva una esigua quantità di mercurio. Questo potrebbe far ipotizzare che la via d'ingresso tramite il respiro sia poco coinvolta nel ciclo biologico di questo elemento anche se Rawson *et al.*(1996) scoprirono che i cristalli di seleniuro di mercurio erano presenti anche nei polmoni e nei noduli linfatici ilari associati a particelle. Questi ritrovamenti hanno portato a pensare che il mercurio fosse entrato sia tramite la dieta sia con polveri durante il respiro. Questo elemento probabilmente è assorbito nel tratto intestinale e tramite la vena porta giunge al fegato dove si deposita. Nei polmoni e a livello dei noduli ilari il seleniuro di mercurio appare associato con particelle di carbonio e questo potrebbe suggerire un'associazione tra i due elementi. Infatti l'intossicazione da mercurio spesso si verifica in quei soggetti che si trovano nelle vicinanze di aree dove avviene la combustione di carburanti o inceneritori di rifiuti e dove questi due elementi tendono ad aggregarsi assieme in particelle (Rawson *et al.*, 1995).

La colorazione per la presenza della lipofuscina eseguita nei tessuti di capodoglio e di altri mammiferi marini è risultata positiva in sede linfonodale, renale ed epatico e nel SNC. La lipofuscina è un pigmento che deriva da un danno alla membrana subcellulare. Essa si accumula maggiormente in relazione alla concentrazione di mercurio. Infatti tale metallo inattiva alcuni enzimi lisosomi digestivi, questo riduce la degradazione di proteine, con eccessivo accumulo di lipofuscina all'interno delle cellule e morte delle stesse. (Rawson *et al.*, 1993). I risultati eseguiti con il microscopio ottico a scansione (ESEM) associato all'emissione di raggi x confermano la presenza di depositi costituiti principalmente di selenio e mercurio nel tessuto linfatico ed epatico.

Oltre alle indagini per la ricerca dei metalli pesanti si sono eseguite indagini per la ricerca di inquinanti organici, valutando la presenza di xenobiotici clorurati ed idrocarburi policiclici aromatici. Queste sostanze

sono altamente liposolubili, per cui tendono ad accumularsi nei tessuti lipidici di animali lungo la catena trofica, dando luogo a fenomeni di biomagnificazione, per tale motivo i mammiferi marini sono i più esposti a tali inquinanti, in quanto, oltre ad essere all'apice della catena alimentare, presentano una notevole quantità di tessuto lipidico (Marsili, 2000; Fossi et al., 2007). Inoltre queste sostanze sono altamente persistenti nell'ambiente perché hanno un'elevata stabilità chimica e la loro degradazione avviene quindi molto lentamente. Specie oceaniche di Cetacei come i capodogli (*Physeter macrocephalus*) che vivono in mare aperto lontano da sostanze inquinanti possono essere presi in considerazione come modelli dei cambiamenti a breve termine delle concentrazioni degli inquinanti nelle aree costiere (Aguilar, 1985; Reijnders, 1986). Per la ricerca del cibo un gruppo potrebbe anche percorrere 55 miglia (Jaquet et al., 2000) pertanto le differenze di composizione chimica e le concentrazioni di inquinanti nelle diverse masse d'acqua si dovrebbero trovare nei tessuti ed organi degli animali che vivono in quelle zone (Aguilar, 1987; Aguilar et al., 1993). Quindi le concentrazioni di sostanze tossiche come gli organoclorurati nell'alimentazione dei capodogli dovrebbe riflettere oltre ai livelli locali di inquinamento anche quelli oceanici.

Dai risultati emerge che l'HCB è lo xenobiotico clorurato presente con i livelli più bassi in tutto il materiale biologico. Sorprendente è il fatto che i DDT Totali siano quelli maggiormente elevati sia nell'adipe che nel muscolo che nel fegato nonostante il divieto di uso di questo pesticida da oltre 30 anni. I PCB Totali hanno concentrazioni in assoluto sempre molto elevate, ma leggermente inferiori di quelle del DDT.

Come potevamo aspettarci sia in base ai dati ottenuti su altre specie di Cetacei che alle caratteristiche del tessuto stesso, l'accumulo più marcato si ha a livello dell'adipe sottocutaneo, seguito dal fegato e quindi dal muscolo. Essendo questi composti liposolubili, è probabile che nei mammiferi marini sottoposti ad elevato stress come si verifica durante lo spiaggiamento, ci possa essere una mobilitazione delle riserve lipidiche

ed insieme a queste dei contaminanti in esse accumulate. Fra i primi a essere stati rimossi potrebbero esserci stati gli IPA. Questo spiegherebbe i bassi valori a livello dell'adipe, e le importanti concentrazioni a livello muscolare. Il Mediterraneo risulta uno dei mari in cui i Cetacei sono esposti alle quantità più elevate di tali sostanze xenobiotiche (Honda et al., 1983; Andrè et al., 1991; Leonzio et al., 1992).

La misura dell'inibizione dell'attività dell'acetilcolinesterasi, un enzima presente nel tessuto nervoso eseguita su *Gambusia affinis*, ha dimostrato una sua inibizione parziale sottolineando la presenza di un potenziale agente neurotossico. E' noto che alcuni pesticidi come gli organofosforati ed i carbammati, utilizzati su larga scala, hanno un'azione inibitoria nei confronti dell'acetilcolinesterasi. E' probabile che anche lo stesso mercurio sia il responsabile di una azione inibente dell'acetilcolinesterasi. (Møller-Madesan I. 1991, Bellus S., 2007, Nielsen JB., 1992, Suda I., 1989)

Sono infine ben conosciuti gli effetti depletivi del mercurio a carico degli organi del sistema reticolo-endoteliale e i conseguenti deficit immunologici, oltre agli effetti neurotossici che possono provocare alterazioni dell'orientamento e del comportamento, svolti dalla forma organica del mercurio. Le sostanze organiche clorurate hanno dimostrato, per lo meno in *vitro* e su animali da laboratorio, un'azione sinergica con il mercurio organico, accentuandone gli effetti anche quando presente in basse concentrazioni (Cheng J. *et al.*, 2009; Goldoni M. *et al.*, 2008). Tali effetti sono stati quindi accentuati, come accennato sopra, dal lungo periodo di digiuno che ha quindi portato questi soggetti a morte lungo le coste pugliesi, trascinati dalle correnti e spinti dai venti.

Queste sostanze inquinanti contribuiscono alla scomparsa dei cetacei dai nostri mari, non solo arrecando danni al singolo individuo che entra in contatto con essi, ma anche alle generazioni future, in quanto la loro attività di distruttori endocrini diminuisce la capacità di riprodursi degli esemplari esposti.

In conclusione, lo spiaggiamento di questi 7 capodogli si può attribuire ad una condizione multifattoriale (Evans et al., 2005; Whitehead, 2000;

Jauniaux et al, 1998). Gli animali sono entrati nel Mar Adriatico e qui la complicità di fattori ecologici (profondità), biologici (inesperienza del gruppo), sociali (aggregazione), insieme ai rilievi patologici e tossicologici (alterazione del sensorio e immunocompromissione di origine chimica), hanno determinato l'impossibilità ad orientarsi e a trovare una via d'uscita da questo vicolo cieco. Durante il viaggio, durato almeno una settimana, gli animali non si sono alimentati, con una potenziale movimentazione delle riserve lipidiche e delle eventuali sostanze inquinanti lipofiliche presenti nei tessuti adiposi. La positività infatti alla colorazione specifica per il mercurio associato alla presenza della lipofuscina in sede linfonodale, renale ed epatico, suggerisce una circolazione della sostanza nell'organismo dei capodogli. Tale ipotesi è supportata infine dalle indagini tossicologiche che hanno evidenziato elevati livelli di PCB e di DDT nei tessuti ed una distribuzione e composizione anomala per quanto riguarda IPA e Hg, avvalorando l'ipotesi della circolazione.

Si ricorda che lo stesso mercurio ha un'azione di depressione sul sistema immunitario e nervoso, incrementata in alcune condizioni dalla presenza di sostanze organoclorurate..

Comunque si trova un consenso generale agli spiaggiamenti di massa sul fatto che esistano una serie di co-fattori che influiscono sul sistema di navigazione interno di questi animali che non fornirebbe più un'immagine precisa allo spostamento; "un sistema nervoso alterato che potrebbe determinare panico e risposta incontrollata di fronte ad un'alterata informazione, probabilmente intensificata da fattori esterni come cattive condizioni meteorologiche, il non adattamento a fondali bassi e la poca coesione sociale" (Whitehead, 2003; pag. 200). Lo spiaggiamento avvenuto nel Gargano per le sue peculiarità, ha sollevato numerosi interrogativi e ha evidenziato la complessità dell'organizzazione logistica necessaria per questo tipo di fenomeno.

Comprendere lo stato di salute dei cetacei è fondamentale non solo per stimare il loro reale stato di conservazione ma anche perchè questi animali ci dicono moltissimo sulla salute del nostro mare. In ogni caso è indubbio

Discussione e conclusione

che l'essere umano, con le sue attività, rappresenti una minaccia costante. Sarebbe auspicabile che nel futuro l'uomo avesse più attenzione verso i mammiferi marini garantendone così la loro sopravvivenza negli oceani.

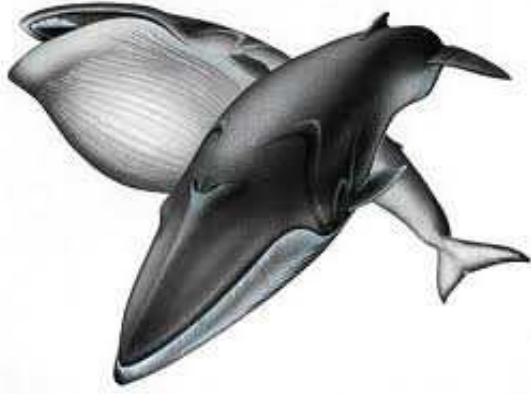
6. Appendice 1

Schede delle specie di Odontoceti e Mysticeti trattati

Regno	Animalia
Phylum	Chordata
Sub phylum	Vertebrata
Superclasse	Gnathostomata
Classe	Mammalia
sottoclasse	Theria
infraclasse	Eutheria
Ordine	Cetacea (Brisson, 1792)
sottordine	Odontoceti (Flower, 1864)

Regno	Animalia
Phylum	Chordata
Sub phylum	Vertebrata
superclasse	Gnathostomata
Classe	Mammalia
sottoclasse	Theria
Infraclasse	Eutheria
Ordine	Cetacea (Brisson, 1792)
Sottordine	Misticeti (Cope, 1891)

6.1. Balenottera comune del Mediterraneo (*Balaenoptera physalus*)



FAMIGLIA BALAENOPTERIDAE

GENERE BALAENOPTERA

SPECIE: *Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758)

La sua lunghezza media è stata stimata intorno ai 24 metri per un peso che varia da 60 a 80 tonnellate. Il suo corpo è affusolato. Emana lunghi soffi verticali a cono rovesciato a volte alti 6-7 metri dovuti alla presenza di uno sfiatatoio provvisto di due orifizi. La colorazione è grigio ardesia sul dorso e bianco sul ventre. Presenta una cospicua asimmetria nella pigmentazione del capo: la regione mandibolare destra è bianca, mentre quella di sinistra è grigio ardesia. Inoltre la livrea grigia del dorso, presenta spesso sfumature di diversa tonalità la cui forma è caratteristica dell'individuo. Le balenottere effettuano lunghe apnee variabili dai 5 a 15 minuti (max 26 minuti) e, quando si immergono, non mostrano la pinna caudale fuori dall'acqua.

E' una specie prettamente pelagica, frequenta acque profonde della scarpata inferiore e di largo anche se, talvolta, alcuni individui sono stati osservati su deboli profondità. Si nutre sia di piccoli crostacei del plancton sia di pesci. In Mediterraneo è stato osservato che gli stessi individui vanno ad alimentarsi ogni anno d'estate nel bacino Liguro-Provenzale e nella parte sud del Mar Tirreno. L'attuale status della popolazione è poco noto nella maggior parte delle aree del Nord Atlantico (incluso il mar Mediterraneo). Studi recenti suggeriscono l'esistenza di una serie di gruppi di questa specie separati geneticamente tra loro a seconda della regione geografica. A livello mondiale, le popolazioni di balenottera comune sono gravemente compromesse a causa dello

sfruttamento da parte della moderna baleneria industriale. Pertanto la specie è stata classificata come endangered. In Mediterraneo le collisioni sono la causa principale della mortalità della specie.

6.2. Grampo (*Grampus gryseus*)



GRAMPO

Grampus griseus

(G. Cuvier, 1812)

Delfino di media taglia, lunghezza media attorno a 3,5 m (max 4,3 m), peso di 300-400 kg (max 600 kg); alla nascita misura 1,5 m.

Corporatura leggermente tozza nella zona anteriore del corpo con capo rotondeggiante e rostro completamente coperto dal melone (che possiede un'infossatura longitudinale dallo sfiatatoio all'apice della mascella). Da 3 a 7 paia di robusti denti nella mascella superiore. Pinna dorsale mediana, alta e falcata; pinne pettorali allungate (15 % della lunghezza tot) e appuntite. Alla nascita, il cucciolo è di colore grigio chiaro uniforme, ma con l'età, mentre il colore si scurisce fino al grigio, il corpo si ricopre di graffi bianchi che, in alcune porzioni del corpo come il capo, sono talmente fitti da conferire un colorito bianco; il ventre presenta una chiazza chiara a forma di ancora simile a quella del globicefalo. I grampi si procurano i caratteristici graffi durante le interazioni sociali piuttosto violente; il permanere di tali lesioni nel tempo è ancora oggetto di studio.

Malgrado l'aspetto tozzo è capace di movimenti agili e veloci (non di rado salta interamente fuori dall'acqua durante i momenti dedicati al gioco e alle interazioni sociali), ma in genere nuota lentamente; non si conoscono le sue prestazioni in immersione anche se probabilmente si immerge a profondità elevate per predare i calamari. Predilige acque profonde, in zone dove la scarpata continentale è più ripida. Non compie

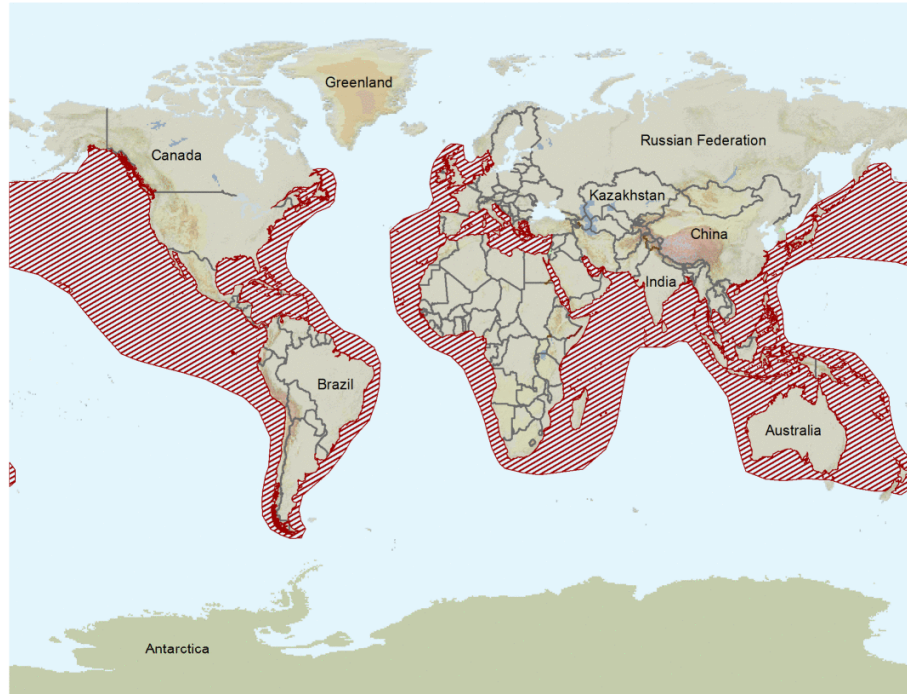
migrazioni. La dieta è marcatamente teutofaga e, vista la scarsa dentatura, si nutre raramente di pesci. Forma in genere gruppi di 1-2 dozzine di individui (in Mediterraneo la media è 16), ma l'organizzazione sociale è sconosciuta. Anche la riproduzione è poco studiata; si sa che la gestazione dura 13-14 mesi e la maggior parte delle nascite avviene in estate; la maturità sessuale viene raggiunta alla lunghezza di 2,7 m (7 anni per le femmine, sconosciuta l'età dei maschi). Non si hanno dati sulla longevità.

Cetaceo cosmopolita che si ritrova in tutti i mari (tranne ai poli); è diffuso in tutto il Mediterraneo. Non ci sono dati sulle abbondanze globali (IUCN, 2008).

Nome comune in Inglese: *Risso's dolphin*.

Fig. 9.8: distribuzione mondiale di *G. griseus*.

<http://www.iucnredlist.org>



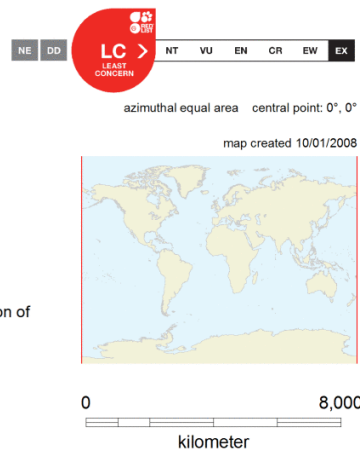
Grampus griseus

range type

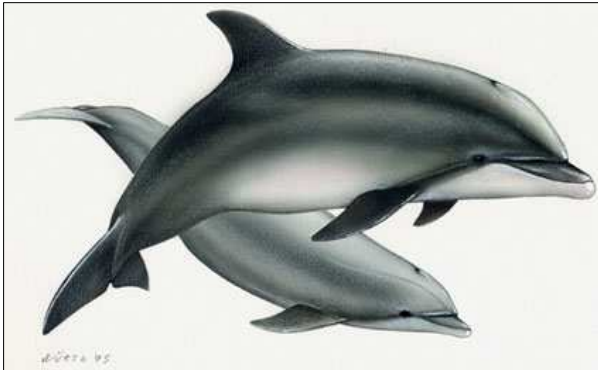
- native (resident)
- native (breeding)
- native (non breeding)
- reintroduced
- introduced
- origin uncertain
- possibly extinct
- extinct

- national boundaries
- subnational boundaries
- lakes, rivers, canals
- salt pans, intermittent rivers

data source:
IUCN (International Union for Conservation of Nature)



6.3. Tursiope (*Tursiops truncatus*)



TURSOIOPE

Tursiops truncatus

(Montagu, 1821)

Delfino di taglia medio-grande, in cui l'adulto raggiunge i 2,5-3,5 m di lunghezza per un peso di 270-350 kg (le popolazioni mediterranee, ed in particolare quella adriatica, raggiungono le dimensioni maggiori al mondo). Alla nascita il piccolo misura 1 m.

La corporatura è slanciata, ma molto più robusta e muscolosa rispetto a delfino comune e stenella; il melone è ben pronunciato, con un solco che lo separa nettamente dal tozzo rostro. Da 20 a 26 robusti denti per emimascella. Pinna dorsale mediana, moderatamente falcata; pinne pettorali corte e sottili. La livrea non presenta striature marcate, ma sfumature di colore, molto variabile tra gli individui. In genere il dorso e la zona posteriore sono molto scuri, quasi neri, mentre il ventre e la zona anteriore sono più chiari, quasi bianchi, e a volte con sfumature rosacee. L'unica linea che si nota è quella scura che congiunge l'occhio con l'inizio delle pinne pettorali, anch'esse scure (le popolazioni dell'emisfero australe presentano colorazione nettamente differente).

Data la possenza del corpo, il tursiope raggiunge facilmente notevoli velocità (oltre 30 km/h) e possiede di grandi doti acrobatiche. È in grado di immergersi per circa 8 minuti, fino a 600 m di profondità. Esistono due ecotipi di tursiopi, quelli costieri (più abbondanti e studiati), residenti, e quelli pelagici che possono compiere migrazioni notevoli. Il tursiope è prevalentemente ittiofago, ma si ciba anche di cefalopodi e macroinvertebrati bentonici. Mentre i maschi adulti si muovono in coppia, le femmine costituiscono unità familiari di 5-10 individui. La stagione riproduttiva non è ben definita, ma accoppiamenti e nascite avvengono nello stesso periodo (12 mesi di gestazione); la maturità sessuale viene raggiunta a 9-10 anni per le femmine, 11-13 nei maschi. La longevità è stata

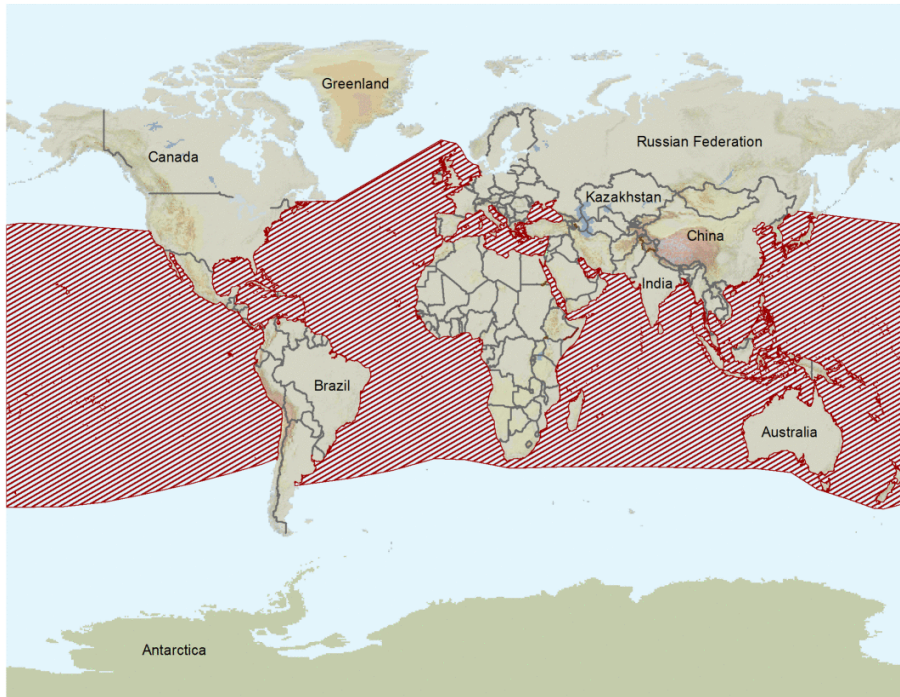
stimata intorno ai 40 anni.

È diffuso nei mari tropicali e temperati, ma non nelle zone fredde; la popolazione mondiale si aggira intorno ai 600.000 esemplari ed è il delfino più comune nelle acque italiane (IUCN, 2008).

Nome comune in Inglese: *Bottlenose dolphin*.

Fig. 9.12: distribuzione mondiale di *T. truncatus*.





<http://www.iucnredlist.org>



Tursiops truncatus

range type

-  native (resident)
-  native (breeding)
-  native (non breeding)
-  reintroduced
-  introduced
-  origin uncertain
-  possibly extinct
-  extinct

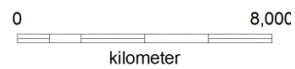
-  national boundaries
-  subnational boundaries
-  lakes, rivers, canals
-  salt pans, intermittent rivers

data source:
IUCN (International Union for Conservation of Nature)


NE
DD
LC
NT
VU
EN
CR
EW
EX

azimuthal equal area central point: 0°, 0°

map created 10/03/2008



7. Appendice 2

7.1. Protocolli per le colorazioni istochimiche

7.1.1. Colorazione di Gram

Reagenti:

<ul style="list-style-type: none">• Crystal violetto
<ul style="list-style-type: none">• Soluzione di Lugol
<ul style="list-style-type: none">• Soluzione di alcool:acetone, 4:1
<ul style="list-style-type: none">• Safranina

Preparazione:

1. Sparaffinare e idratare le soluzioni con acqua distillata
2. Coprirle completamente con la soluzione crystal violetto per un minuto
3. Risciacquare velocemente con la soluzione di Lugol
4. Coprirle con la soluzione di Lugol per un minuto
5. Risciacquarle in acqua distillata per circa 5 secondi
6. Decolorare facendo gocciolare; a soluzione alcool-acetone 4:1 sul vetrino fino ad eliminare l'eccesso di colorante
7. Risciacquare in acqua distillata per 5 secondi
8. Velocemente coprire le sezioni con la soluzione di safranina prima che possano seccarsi, per un minuto
9. Risciacquare in acqua distillata per 5 secondi
10. Asciugare i vetrini in stufa
11. Chiarificare in cilene
12. Montare il coprioggetto con un montante sintetico per preparati istologici (Eukitt; BIOPTICA s.p.a.)

7.1.2. Colorazione di Giemsa

Reagenti:

• Ac. Citrico	2.4 ml
• Ac. Fosfato disodico	1.6 ml
• Soluzione di Giemsa (Merck)	10 ml
• Acqua distillata	50 ml

Procedura:

1. Preparare una soluzione mescolando insieme i prodotti sopraindicati ed immergervi i vetrini per 60 minuti
2. Decolorare in acetone per pochi secondi
3. Immergere nuovamente in una soluzione di acetone e cilene al 50%
4. Fare 2 passaggi in xilene
5. Montare con un montante sintetico per preparati istologici (Eukitt; BIOPTICA)

7.1.3. Colorazione Pas

Reagenti:

• Acido periodico 0,5%, acquoso	500 ml
• Reattivo di Schiff	500 ml

Preparazione:

- Soluzione Blu alcian 1%

Sciogliere, miscelando, 5 g di blu alcian in 500 ml di acido acetico al 3%. Il valore pH è pari a circa 2,5.

- Soluzione di acido acetico al 3%

Miscelare con cautela 485 ml di acqua distillata con 15 ml di acido acetico 100%.

1. Sparaffinare e portare le sezioni all'acqua come di consueto.
2. Sciacquare con acqua distillata.

3. Immergere in acido periodico per 5 min.
4. Lasciare sotto l'acqua di rubinetto corrente per 3 min.
5. Sciacquare con acqua distillata.
6. Immergere in reattivo di Schiff per 15 min.
7. Lasciare sotto l'acqua di rubinetto corrente per 3 min.
8. Sciacquare con acqua distillata
9. Immergere in soluzione di ematossilina modificata secondo Gill III per 2 min.
10. Lasciare sotto l'acqua di rubinetto corrente 3 min.
11. Serie ascendente di alcoli, 2 volte con xilene
12. Montare con montante sintetico per preparati istologici (Eukitt; BIOPTICA).

7.1.4.Colorazione Schmorl (Lipofuscina)

Reagenti:

Soluzione A – Ferrocianuro di potassio	0,1 g
Soluzione B – Cloruro ferrico	0.750g
Soluzione C – Nuclear fast red	0.1%

Procedura:

1. Sparaffinare e portare le sezioni all'acqua come di consueto.
2. Sciacquare con acqua distillata per 1 min.
3. Pesare 0,1g di ferrocianuro di potassio e portarlo a 10ml con acqua distillata in un cilindro.
4. Pesare 0,750g di cloruro ferrico e portarlo a 75ml con acqua distillata in un cilindro.
5. In un contenitore miscelare 2ml della soluzione A e 15ml della soluzione B.
6. Coprire completamente i vetrini istologici con la soluzione ottenuta per 8 minuti.
7. Risciacquare in acqua corrente per 5 minuti.
8. Coprire completamente i vetrini per contrastare con la soluzione C per 5 minuti.
9. Risciacquare in acqua corrente per 5 minuti.
10. Chiarificare in xilene.
11. Montare il coprioggetto con un montante sintetico per preparati istologici (Eukitt; BIOPTICA s.p.a.) .

Risultato:

Cellule cromaffini	scure
Cellule argentaffini	
Melanociti	
Colloide tiroide	
Lipofuscina	
Nuclei cellulari	Rosso

7.1.5. Colorazione Mercurio

Reagenti

Soluzione A - Gomma arabica 50%	25g
Soluzione B - Acido citrico monoidrato	5,1g
Soluzione C – Sodio citrato diidrato	4,7g
Soluzione D – Idrochinone	2,83g
Soluzione E – Nitrato d'Argento	1,7g
Blu di Toluidina	0,5g

Procedura

1. Sparaffinare e portare le sezioni all'acqua come di consueto.
2. Risciaquare in acqua distillata.
3. Preparare le soluzioni come segue:
 - a) pesare 50g di soluzione A in 100ml di acqua deionizzata.
 - a) pesare 5,1g di soluzione B e 4,7g di soluzione C in 20ml di acqua distillata assieme
 - b) pesare 2,83g di soluzione D in 50ml di acqua
 - c) pesare 1,7g di soluzione E in 10ml di acqua distillata
4. In un contenitore preparare una miscela contenente:
 - a) 100ml di soluzione A

- b) 15ml di soluzione B e C assieme
 - c) 45ml di soluzione C
 - d) 1,5ml di Soluzione E
5. Trattare i campioni con miscela in stufa a 28° per circa 90 minuti
 6. Porre i vetrini in acqua corrente per circa 10 minuti
 7. Effettuare colorazione di contrasto con il Blu di Toluidina per 2/3 secondi
 8. Risciacquare in acqua di fonte per 2/3 secondi
 9. Porre i vetrini in alcool a 75° per 2/3 secondi
 10. Disidratare attraverso scala ascendenti di alcool e xilene
 11. Montare il copri oggetto con un montante sintetico per preparati istologici (Eukitt; BIOPTICA s.p.a.) .

7.1.6.Colorazione Sali di Piombo (secondo Lielle)

Reagenti

Soluzione A – Sodio Rhodanato	0,20g
Soluzione B – Acido acetico glaciale	1ml e 0,20ml
Soluzione C – Light green	0,1g

Procedura

1. Sparaffinare e portare le sezioni all'acqua come di consueto
2. Risciacquare in acqua distillata
3. Pesare 0,20g di soluzione A aggiungere 1ml di Soluzione B e portare tutto a 100ml con acqua deionizzata
4. Trattare i campioni con la miscela composta al punto 3 per circa 1 ora.
5. Risciacquare i vetrini in acqua deionizzate, 3 passaggi per circa 2/3 secondi
6. Pesare 1g si soluzione C ed aggiunger 0,20ml di soluzione B in 100ml
7. Trattare i vetrini con la miscela composta al punto 6 per circa 2 minuti
8. Montare con vetrino copri oggetti e glicerina

Risultati

Sali di piombo	Rosso
Sfondo	Verde

8. Bibliografia

ADLER-FENCHEL H. (1980)

Acoustically derived estimates of the size distribution of a sample of sperm whale (Physeter catodon) in the western North Atlantic. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 37:2358-61.

AGUILAR A. (1987)

Using organochlorine pollutants to discriminate marine mammal populations: a review and critique of the methods. Marine Mammal Science, 3:242–262.

AGUILAR A., JOVER L., BORRELL A. (1993)

Heterogeneities in organochlorine profiles of Faroese long-finned pilot whales: indication of segregation between pods. Report of the international whaling commission, 20:359–367.

ANDRÉ J.M., AMIARD J.C., AMIARD-TRIQUET C., BOUDON A., RIBEYRE F. (1990A)

Cadmium contamination of tissues and organs of delphinid species (Stenella attenuata). Influence of biological and ecological factors. Ecotoxicological and Environmental Safety, 20:290-306.

AQUILAR A. (1985)

Compartmentation and reliability of sampling procedures in Organochlorine pollution surveys of cetaceans. Residue reviews, 95:91–114.

AUGIER H., BENKOËL L., CHAMLIAN A., PARK W.K., RONNEAU C. (1993b)

Mercury, zinc and selenium bioaccumulation in tissue and organs of Mediterranean striped dolphins Stenella coerulealba Meyen. Toxicological result of their interaction. Cellular and Molecular Biology, 39:621-634.

BALA S., POJE A.C., VEIT E.E., NGUANGUIA H. (2005)

Acoustical dead zones and the spatial aggregation of whale strandings. Journal of Theoretical Biology, 238: 764–770.

BALCOMB K.C., CLARIDGE D.E. (2001)

A mass stranding of cetaceans caused by naval sonar in the Bahamas. Bahamas Journal of Science 5: 2-12.

BEARZI G., PIERANTONIO ., AFFRONTI M., , HOLCER D., MAIO M.,
NOTARBARTOLO DI SCIARA G. (2010)

Bibliografia

*Overview of sperm whale *Physeter macrocephalus* mortality events in the Adriatic Sea.*
Mammal Rev., In press

BOUQUEGNEAU J.M., DEBACKER V., GOBERTS S., NELLISSEN J.P. (1997)
Toxicological investigations on four sperm whales stranded on the Belgian coast: inorganic contaminants. *Biologie* 67:75-78.

BRABYN M., FREW R.V.C. (1994)
New Zealand herd stranding sites do not relate to geomagnetic topography. *Marine Mammal Science*, 10:195-207.

BRABYN M.W., MCLEAN I.G. (1992).
Oceanography and coastal topography of herd-stranding sites for whales in New Zealand. *Journal of Mammalogy*, 73: 469-476.

BRADSHAW C.J.A., EVANS K., HINDELL M.A. (2006)
Mass cetacean strandings: a plea for empiricism. *Conservation Biology*, 20:584-586.

CANELLA E.J., D.J. KITCHENER. (1992)
*Differences in mercury levels in female sperm whale *Physeter macrocephalus* (Cetacea: Odontoceti).* *Australian Mammal Society*, 30:207-210.

CARANT F., M. NAVARRO, J.C. AMIARD (1996)
Mercury in pilot whale: possible limits to the detoxification process. *The science of the total environment*, 186:95-104.

CARRIER D.R., DEBAN S.M., OTTERSTROM J. (2002)
The face that sunk the Essex: Potential function of the spermaceti organ in aggression, *The journal of experimental biology*, 205:1755-63.

CENTRO STUDI CETACEI (2006). CETACEI SPIAGGIATI LUNGO LE COSTE ITALIANE.
XIX° Rendiconto 2005. (Mammalia). *Atti Società Italiana Scienze Naturali Museo Civico Storia Naturale Milano*, 147:325-335.

CHAMBERS S.L., JAMES R.N. (2005)
Sonar termination as a cause of mass cetacean strandings in Geographe Bay, southwestern Australia. proceedings of acoustics 2005, 9-11 November 2005, Busselton, Western Australia, 1-8.

Bibliografia

COX T.M., RAGEN T.J., READ A.J., VOS E., BAIRD R.W., BALCOMB K., CRANFORD T., CRUM L., D'AMICO A, D'SPAIN G., FERNANDEZ A., FINNERAN J., GENTRY R., GERTH W., GULLARD F., HILDEBRAND J., HOUSER D., HULLAR T., JEPSON P.D., HETTEN D., MACLEOD C.D., MILLER P., MOORE S., MOUNTAIN D.C., PALKA D., PONGANIS P., ROMMEL S., ROWLES T., TAYLOR B., TRACK P., WARTZOK D., GISINER R., MEAD J., BENNER L. (2006)

Understanding the impacts of anthropogenic sounds on beaked whales. Journal of cetacean research and management, 7:177-187.

CRANFORD TW. (1999)

The sperm whale's nose: Sexual selection on a grand scale?. Marine mammal science, 15:1133-57.

DANSCHER G., MØLLER-MADSEN B. (1985)

Silver Amplification of Mercury Sulfide and Selenide: A histochemical Method for Light and Electron Microscopic Localization of Mercury in Tissue. The Journal of histochemical and cytochemistry, 33:219-228.

DAS K., LEPOINT G., DEBACKER V., DAUBY P., BOUQUEGNEAU J.M. (2000)

Tuna and dolphin associations in the north-east Atlantic: evidence of different ecological niches from stable isotope and heavy metal measurements. Marine Pollution Bulletin, 40:102-109.

DAS K., LEPOINT G., LERORY Y., BOUQUEGNEAU J.M. (2003)

Marine mammals from the southern North Sea: feeding ecology data from $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ measurements. Marine Ecology Progress Series, 263:287-298.

DENIRO M.J., EPSTEIN S. (1978)

Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochimica and cosmochimica acta, 42:495-506.

DIERAFUL L.A. (1990)

Mass stranding of cetacean. In: "Crc hand of marine mammal medicine: health, disease and rehabilitation", Crc press, Inc. Boca Raron, Florida, pp 83-95.

DROUOT-DULAU V., GANNIER A. (2007)

Movements of sperm whale in the western Mediterranean Sea: preliminary photo-identification results. Journal of the Marine Biological Association of the UK, 87:195-200.

EVANS K., HINDELL M., HINCE G. (2004)

*Concentrations of organochlorines in sperm whales (*Physeter macrocephalus*) from*

Bibliografia

Southern Australian waters. Marine Pollution Bulletin, 48: 486-503.

EVANS K., HINDELL M., THIELE D. (2002)

Three mass stranding of sperm whales (Physeter macrocephalus) in southern Australian waters. Marine mammal science, 18:622-43.

EVANS K., THRESHER R., WARNEKE R.M., BRADSHAW C.J.A., POOK M., THIELE D., HINDELL M.A. (2005)

Periodic variability in cetacean strandings: links to large-scale climate events. Biology Letters 1: 147-150.

EVANS P.G.H., RAGA J.A. (2002)

Marine mammals: biology and conservation, Kluwer academic/pleum publishers, 9:361-363
Fulmination infection and toxic shock syndrome caused by Streptococcus pyogenes, The journal of emergency medicine, 22:357-366.

FERNANDEZ A., EDWARDS J.F., RODRIQUEZ F., ESPINOSA DE LOS MONTEROS A., HARRAEZ P., CASTRO P., JABER J.R., MARTIN V., ARBELO M. (2005)

Gas and fat embolic syndrome involving a mass stranding of beaked whales (Family ziphiidae) exposed to anthropogenic sonar signals. Veterinary Pathology, 42:446-57.

FOSSI M.C., CASINI S., MARSILI L. (2007)

Potential toxicological hazard due to endocrine-disrupting chemicals on Mediterranean top predators: State of art, gender differences and methodological tools. Environmental research, 104:174-182.

FRANTZIS A (1998)

Does acoustic testing strand whales? Nature 392:29.

FRODELLO J.P., ROMEO M., VIALE D. (2000)

Distribution of mercury in the organs and tissues of five toothed-whale species of the Mediterranean. Environmental pollution, 108:447-452.

GANNIER A., DROUOT-DULAU V., GOULD J.C. (2002)

Distribution and relative abundance of sperm whales in the Mediterranean. Marine Ecology Progress Series, 243: 281–293.

GAYE-SIESSEGGER J., FOCKEN U., ABEL H., BECKER K. (2004)

Individual protein balance strongly influences $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values in Nile tilapia, oreochromis niloticus. NATURWISSENSCHAFTEN, 9:90-93.

Bibliografia

GERACI J.R. (1999)

Marine mammals deaths: causes, investigations and issues. In: "Conservation and management of marine mammals", Smithsonian Institution Press, Washington, 34: 367-395.

GERACI J.R., LOUNSBURY J.V. (2005)

Marine Mammal Ashore: A field for Strandings, second edition, National Aquarium in Baltimore, Baltimore, 60:1-371.

GERACI J.R., LOUNSBURY V.J. (1993).

Marine Mammals Ashore. Texas A&M grant publication, par 1.2, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3.

GOOLD J.C. (1996)

Signal processing techniques for acoustic measurement of sperm whale body lengths. The Journal of the Acoustical Society of America, 100:3431-41.

GOOLD J.C., WHITEHEAD H., REID R.J. (2002)

*North Atlantic sperm whale, *Physeter macrocephalus*, strandings on the coastlines of the British Isles and Eastern Canada*. Canadian Field Naturalist, 116: 371–388.

GORDON J.C.D. (1991a)

*Evaluation of a method for determining the length of sperm whale (*Physeter macrocephalus*) from their vocalization*. Journal of Zoology, 224:301-14.

HEYNING J.E. (1997)

Sperm whale phylogeny revisited. Analysis of the morphological evidence. Marine mammal science, 13:596-613.

HOBSON K.A. (1999)

Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: A review. Oecologia, 120:314-326.

HONDA K., TATSUKANA R. (1981)

*Ecology and bioaccumulation of *Stenella coeruleoalba* – heavy metal concentration in the muscle and liver tissue of *Stenella coeruleoalba**. In: "Studies of the level of organochlorine compounds and heavy metals in the marine organisms", Fujiyama (Editor), University of Ryukyus, pp. 13-23.

HONDA K., TATSUKANA R. (1983)

*Distribution of cadmium and zinc in tissues and organs, and their related change in striped dolphins, *Stenella coeruleoalba**. Archives of environmental contamination and toxicology, 12:543-550.

Bibliografia

HONDA K., TATSUKANA R., ITANO K., MIYAZAKI N., FUJIYAMA T. (1983)
Heavy metal concentrations in muscle, liver and kidney tissue of striped dolphin, Stenella coeruleoalba and their variations with body length, weight, age and sex. Agricultural and biological chemistry, 47:1219-1228.

JAQUET N., DAWSON S., SLOOTEN E. (2000)
Seasonal distribution and diving behaviour of male sperm whales off Kaikoura: foraging implications. Canadian journal of zoology, 78:407–419.

JAUNIAUX T., BROSENS L., JACQUINET E., LAMBRIGTS D., COIGNOUL F (1997)
Pathological investigations on sperm whales stranded on the Belgian and Dutch coasts. Biologie, 67:63-67.

JOIRIS C.R., HOLSBEEK L., BOSSICART M., TAPIA G. (1997)
Mercury and organochlorines in four sperm whales stranded on the Belgian coast, November 1994. Biologie, 67:69-73.

KAISER G., TOLG G. (1980)
Mercury: In: "the Hand book of Environmental Chemistry", 3:1-58.

KAMRIN M.A., RINGER R.K. (1994)
PCB residues in mammals: a review. Toxicology and environmental chemistry, 41:63-84.

KLINOWSKA M. (1985A)
Cetacean live stranding dates relate to geomagnetic disturbances. Aquatic Mammals, 11:109-119.

KLINOWSKA M. (1985B).
Cetacean live stranding sites relate to geomagnetic topography. Aquatic Mammals, 11: 27-32.

KLINOWSKA M. (1988)
Cetacean 'navigation' and the geomagnetic field. Journal of Navigation, 41: 52-71.

KUIKEN T., HATMANN M.G. (1991)
Dissection technique and tissue sampling. Proceeding of the first ECS workshop on Cetacean Pathology. Leiden, The Netherlands, 5:1-39.

L. MARSILI, FOCARDI S. (1996b)
Organochlorine levels in subcutaneous blubber biopsies of fin whales (Balaenoptera physalus) and striped dolphins (Stenella coeruleoalba) from the Mediterranean Sea.

Bibliografia

Environmental Pollution, 91: 1-9.

LAMBERTSEN R.H. (1997)

Natural disease problems of the sperm whales. Biologie, 67:105-112.

LAW R.J. (1996)

Metals in marine mammals. In: "Environmental contaminants in wildlife. Interpreting tissues concentration". beyer w.n., heinz g.h., Crc press inc. lewis publisher inc. boca raton florida pp 357-376.

LOCKYER C. (1981)

*Estimates of growth and energy for the sperm whale, *Physeter catodon**. Fisheries and Aquaculture Department, 5:489-504.

MADSEN P.T. (2002)

Sperm whale sound production-in the acoustic realm of the biggest nose on record. In: "Sperm whale sound production", University of Aarhus, Denmark.

MADSEN P.T., MØHL B. (2000)

*Sperm whale (*Physeter catodon* L. 1758) do not react sound from detonators*. The journal of the acoustical society of America, 107:668-71.

MADSEN P.T., PAYNE R., KRISTIANSEN N.U., WAHLBERG M., KERR I., MØHL B. (2002)

Sperm whale sound production studied with ultrasonic time/depth-recording tags. The journal of the acoustical society of America, 11: 200-205.

MARCOUX M., RENDELL L., WHITEHEAD H. (2007)

Indications of fitness differences among vocal clans of sperm whale. Behavioral ecology and sociobiology 61:1093-1098.

MARSILI L. (2000)

Lipophilic contaminants in marine mammals: review of the results of ten years' work at the Department of Environmental Biology, Siena University (Italy). International journal of environment and pollution, 13: 416-452.

MARSILI L., FOCARDI S. (1996a)

Chlorinated hydrocarbon (HCB, DDTs and PCBs) levels in cetaceans stranded along the Italian coasts: an overview. Environmental monitoring and assessment, 45:129-180.

Bibliografia

MAZZARIOL S. (2010)

Relazione tecnica finale per il Ministero dell'Ambiente: spiaggiamento di 7 esemplari di capodoglio (*Physeter macrocephalus*) sul litorale compreso tra Cagnano Varano ed Ischitella (FG) tra il 10 ed il 15 dicembre 2009. www.minambiente.it

MELVILLE, H. (1851)

Moby-Dick; or, The whale. London: Penguin (1972).

MENDES S., NEWTON J., REID J.R., ZUUR A.F., PIERCE G.J. (2007)

Stable carbon and nitrogen isotope ration profiling of sperm whale teeth reveals ontogenetic movements and trophic ecology. *Oecologia*, 151:605-615.

MIGNUCCI-GIANNONI A.A., TOYOS-GONZÁLEZ G.M., PÉREZ-PADILLA J., RODRÍGUEZ-LÓPEZ M.A., OVERING J. (1999)

*Mass stranding of pygmy killer whales (*Feresa attenuata*) in the British Virgin Islands*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80:759-760.

MILINKOVITCH M.C., GUILLERMO O., MEYER A. (1993)

Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequence. *Nature*, 361:346-48.

MØHL B., WAHLBERG M., MADSEN P.T., MILLER L.A., SURLYKKE A. (2000).

Sperm whale click: Directionality and source level revisited. *The journal of the acoustical society of America*, 107:638-48.

NAKAGAWA R., YUMITA Y., HIROMOTO M. (1997).

Total mercury intake from fish and shellfish by Japanese people. *Chemosphere*, 35:2909-2913.

NIKAIDO M., MATSUNO F., MAMILTON H., BROWNELL R.L., CAO Y., DIND W., ZUOYAN Z., SHEDLOCK A.M, FORDYCE R.E., HASEGAWA M, OKADA N. (2001)

Retroposon analysis of major cetacean lineages: The monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins. *Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America*, 98:7384-89.

NORRIS K.S., HARVEY G.W. (1972)

*A theory for the function of the spermaceti organ of the sperm whale (*Physeter catodon* L.)*. In: "Animal orientation and navigation", S. R. Galler, K. Schmidt-Koenig, G. J. Jacob and R. E. Belleville (Editors), D.C: NASA, Washington, 397-417.

Bibliografia

NORRIS K.S., T. P. DOHL (1980)

The structure and function of cetacean schools. In: " Cetacean behaviour: Mechanisms and functions", I. M. Herman, New York, 61-211.

NOTARBARTOLO DI SCIARA G., VENTURINO M.C., ZANARDELLI M., BEARZI G., BORSANI F.J., CAVALLONI B. (1993)

Cetacean in the central Mediterranean Sea: distribution and sighting frequencies. Marine Ecology Progress Series, 60:131-138.

P. T. MADSENA., M. JOHNSON., P.J.O. MILLER., J. LYNCH., P. TYACK (2006)

Quantitative measures of air-gun pulses recorded on sperm whales (Physeter macrocephalus) using acoustic tags during controlled exposure experiments. Acoustical Society of America, pp 2366–2379.

PAVAN G. (2002)

Gli effetti del rumore subacqueo sui mammiferi marini. Bollettino di ACCOMBAMS

PIERCE G.J., SANTOS M.B., SMEENK C., SAVELIEV A., ZUUR A.F. (2007) *Historical trends in the incidence of strandings of sperm whales (Physeter macrocephalus) on North Sea coasts: an association with positive temperature anomalies.* Fisheries Research 87: 219-228

POST D.M. (2002).

Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions, Ecology, 83:703-718.

PUGLIARES K.R., BOGOMOLNI A., TOUHEY K.M., HERZING S.M., HARRY C.T., MOORE M.J. (2007).

Marine Mammal Necropsy: an introductory guide for stranding responders and field biologists. Woods Hole Oceanographic Institution. Technical report.

REEVES R.E., NOTARBARTOLO DI SCIARA G. (2006)

The status and distribution of cetaceans in the Black Sea and Mediterranean Sea. IUCN Workshop Report, Monaco, 5-7 marzo 2006.

REIJNDERS P.J.H. (1986)

Perspectives for studies of pollution in cetaceans. Marine pollution bulletin, 17:58–59.

RICHARDSON E. (1995)

Marine Mammals and Noise. Academic Press.

ROBSON F.D., VAN BREE P.J.H. (1971)

Bibliografía

*Some remarks on a mass stranding of sperm whales, *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758, near Gisborne, New Zealand, on March 18, 1970.* Zeitschrift für Säugetierkunde, 36:55-60.

ROMMEL S.A., COSTIDIS A. M., FERNANDEZ A., JEPSON P.D., PABST D.A., MCLELIAND W.A., ALIEN D.M, BARROS N.B. (2006)
Elements of beaked whale anatomy and diving physiology and some hypothetical causes of sonar-related stranding. Journal of cetacean research and management, 7:189-209.

RUI-COOLEY R., GENDRON D., AGUINIGAL S., MESNICK S., CARRIQUIRY J.D. (2004)
Trophic relationships between sperm whales and jumbo squid using stable isotopes of C and N. Marine ecology progress series, 277: 275–283.

RUIZ-COOLEY R.I., GENDRON D., AGUÍÑIGA S., MESNICK S., CARRIQUIRY J.D. (2004)
Trophic relationships between sperm whales and jumbo squid using stable isotopes of C and N. Marine Ecology Progress Series, 277:275-283.

SIMMOND MP. (1997)
The meaning of cetacean strandings. Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Biologie 67: 29-34.

SIMMONDS M.P., LOPEZ-JURADO L.F. (1991)
Whales and the military. Nature, 351: 448.

SOTIROPOULOS M.A., TONN W.M., WASSENAAR L.I. (2004)
Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. Ecology of Freshwater fish, 13:155-160.

SVENSSON B.G., SCHÜTZ A., NILSSON A., AKESSON I., AKESSON B., SKERFVING S. (1992)
Fish as a source of exposure to mercury and selenium. Science of the Total Environment, 126:61-74.

TANABE S., IWATA H., TATSUKAWA R. (1994)
Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. Science of the total environment, 154:163-177.

URICK S. (1983)
Principles of underwater sound. McGraw Hill.

Bibliografia

VANDER ZANDEN M.J., RASMUSSEN J.B. (2001)

Variation in $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies. Limnology and oceanography, 42:2061-2066.

VANSELOW K.H., RICKLEFS K. (2005)

*Are solar activity and sperm whale *Physeter macrocephalus* strandings around the North Sea related?* Journal of Sea Research, 53:319-327.

VANSELOW K.H., RICKLEFS K., COLIJN F. (2009)

*Solar driven geomagnetic anomalies and sperm whale (*Physeter macrocephalus*) strandings around the North Sea: an analysis of long term datasets.* The Open Marine Biology Journal, 3:89-94.

WAGEMANN R., STEWART R.E.A., LOCKHART W.L., STEWART B.E., POVELDO M. (1988)

*Trace metals and methylmercury: association and transfer in harp seals (*Phoca groenlandica*) mother and their pups.* Marine Mammal Science, 4:339-355.

WHITEHEAD H. (2003)

Sperm whales: Social evolution in the Ocean. The University of Chicago Press.

WHITEHEAD H. (2003)

The peculiar anatomy of sperm whale: The spermaceti organ. In: "Sperm whales social evolution in the ocean", The University of Chicago press, Chicago, 8-11

WHITEHEAD H. (2003)

Sperm whale behaviour and vocalizations: foraging. In: "Sperm whales social evolution in the ocean", The University of Chicago press, Chicago, 156-158

WHITEHEAD H. (2003)

The lives and populations of sperm whale. In: "Sperm whales social evolution in the ocean", The University of Chicago press, Chicago, 11-13.

WHITEHEAD H. (2003)

Sperm whale societies. In: "Sperm whales social evolution in the ocean", The University of Chicago press, Chicago, 264-270.

WHITEHEAD H. (2003)

Sperm whale behavior and vocalizations: stranding. In: "Sperm whales social evolution in the ocean", The University of Chicago press, Chicago, 264-270.

Bibliografia

WOLFE M.F., SCHWARZBACH S., SULAIMAN R.A. (1998)

Effects of mercury on wildlife: a comprehensive review. Ecotoxicological and Environmental Safety, 17:146-160.

WOODINGS S. (1995)

A plausible physical cause of mass cetacean strandings. Honours Thesis, Department of Physics,
University of Western Australia

WRIGHT A. (2005)

*Lunar cycles and sperm whales (*Physeter macrocephalus*) strandings on the North Atlantic coastlines of the British isles and eastern Canada*. Marine Mammal Science, 21:145-149.

9. Siti web

<http://www-1.unipv.it/criba/spiaggiamenti.html>

CRIBA (2009)- Banca Dati Spiaggiamenti

<http://www.accobams.org/>

Manifesto ICRAM Cetacea

<http://www.mammiferimarini.sperivet.unipd.it/lanostrafilosofia/index.htm>

Banca per i Tessuti dei Mammiferi marini del Mediterraneo

www.minambiente.it

Relazione tecnica finale per il Ministero dell'Ambiente: *spiaggiamento di 7 esemplari di capodoglio (*Physeter macrocephalus*) sul litorale compreso tra Cagnano Varano ed Ischitella (FG) tra il 10 ed il 15 dicembre 2009*

10. Ringraziamenti

Al Dr. S. Mazzariol che oltre ad essere stato il mio relatore è stato un amico con cui ho condiviso piacevoli viaggi assieme verso necroscopie interminabili e per aver creduto in me fino alla fine di questo percorso.

Al Prof. B. Cozzi per avermi dato l'opportunità di utilizzare tutti i campioni presenti in Banca e per la disponibilità generosa con cui mi ha sempre accolto nel suo ufficio.

Al Prof. M. Pietrobelli perché mi ha fatto capire davvero che cosa significa, nella vita, essere un grande uomo.

Alle Dott.sse M. Giurato e A. Peruffo per loro infinita gentilezza e per aver condiviso assieme mille sorrisi e qualche sconforto.

Ai tecnici E.Gallo, D.Trez e Dott.ssa R. Zanetti per avermi fatto compagnia durante la produzione dei miei mille vetrini.

Alla Dott.ssa F. Marcer per aver condiviso tante emozioni in compagnia della squadra cetacei.

Ai tecnici dell'aula necroscopia, E. Zanetti e Dr. G. Palmisano che mi hanno aiutato sempre con grande disponibilità.

Alla Dott.ssa S. Normando per avermi fatto iniziare il cammino verso i mammiferi marini.

Beh, visto che sono tanti gli anni passati all'università tante sono state le persone che mi hanno fatto compagnia in questo mio lungo percorso, alcune hanno condiviso con me solo pochi momenti altri mi hanno accompagnato per più tempo rendendo questo mio lungo viaggio decisamente meno pesante.

Alla mia mamma perché da quando sono nata non ha mai smesso di credere in me facendomi sentire una persona più forte e migliore, per tutte le volte che ha aperto le braccia aiutandomi a risolvere i miei insormontabili problemi ma soprattutto per avermi fatto capire che la vita va vissuta giorno per giorno con coraggio senza la preoccupazione del domani.

Al mio grande ed unico papà che vive le mie sofferenze come fossero sue per ascoltarmi con pazienza, per consigliarmi infinitamente senza mai

Ringraziamenti

stancarsi e per raggiungermi ovunque nel mondo facendomi sempre sentire importante.

Ai mio mitico fratellone Stefano (Metallo) perché le sue parole riescono sempre a risollevarmi il morale, per esserci in ogni situazione ma soprattutto per aspettarmi quando mi attardo per continuare assieme il cammino della vita.

Ai miei zii Antonella, Cristina, Andrea e Stefano per le numerose chiacchierate condivise e per essere un punto di riferimento nella mia vita.

Ai miei cugini Sofia, Davide, Riccardo e Leonardo per i numerosi sorrisi che mi hanno sempre regalato.

Ai miei nonni, Valeria, Cleme, Adolfo e Beppi per avermi sempre ascoltata e consigliata con la maturità saggia di chi ha vissuto esperienze ben diverse da quelle dell'Università.

Al mio bellissimo nipotino Giacomo e alla sua meravigliosa mamma Stefania perché ogni volta che ci si vede scopro sempre giochi diversi

A Samuele mio "collega" all'università e fuori, per avermi fatta sentire me stessa in ogni momento, per aver avuto fiducia in me anche quando partivo con un "non vado a fare l'esame" e per avermi insegnato che nella vita qualunque cosa accada ci si deve buttare senza perdere l'attimo.

Alla Laretta che fa parte della mia famiglia come una sorella che mi ha prestato innumerevoli fazzoletti per ridere e piangere assieme.

A Carmen, per i momenti unici che abbiamo vissuto... grazie per la nostra amicizia che mi rende serena .

Ai miei sposi Silvietta e Matteo perché sono un punto fermo della mia vita sul quale faccio sempre affidamento.

A Rigoz costante presenza come amico nella mia vita e senza il quale non ne sarei uscita dai piè di pagina in questa tesi.

Alla Frensis for Coppola che anche se non sarà alla mia laurea per Lorenzo il motivo ugualmente mi sarà vicina come ha fatto in questi ultimi anni.

Al Piccoeo perché i suoi meravigliosi quadri mi fanno compagnia.

Al mitico Matteo alias Camerata per i bellissimi concerti di Vasco passati assieme e a quelli che verranno.

A Paolo Trive perché anche tramite google talk e skype mi ha raggiunto

Ringraziamenti

con parole di conforto.

Alla Fede Zulliani per non avermi mandato a quel paese visto che:
“Samu va con Cris, Cris va con la Valeria io vado con Samu e tu?? Tu sei fuori! “

A Skelli un vero amico sul quale si può contare.

A Cris che ha reso di sicuro più interessante i miei tirocini con i suoi racconti settimanali.

Al socio Matbet per le tante e belle serate che abbiamo passato assieme.

A Sirietto per tutte le volte che mi ha consolato quando ero un po' giù di corda.

Alla bella Fla e al mittico Ciakki che mi hanno fatto compagnia in numerose passeggiate.

Un particolare ringraziamento va ai miei amici delfini e a tutti quegli animali che nella vita ho incontrato e che nel bene o nel male mi hanno spinto a continuare e a perseverare verso questa strada. A loro tutti un grazie particolare perché hanno fatto in modo si realizzasse un sogno nella mia vita, quello di diventare Medico Veterinario.