

UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in Biologia Marina

Stato tossicologico di esemplari di foca monaca
(*Monachus monachus*, Hermann 1779) della Grecia,
specie *critically endangered* del Mar Mediterraneo.

Tesi di laurea in
ADATTAMENTI DEGLI ANIMALI ALL'AMBIENTE MARINO

Relatore

Prof.ssa Elena Fabbri

Presentata da

Costanza Formigaro

Correlatori

Prof.ssa Annalisa Zaccaroni

Prof.ssa Letizia Marsili

I sessione

Anno Accademico 2013/2014

Indice

Scopo della tesi	3
Capitolo 1. Biologia della foca monaca (<i>Monachus monachus</i>, Hermann 1779)	4
Introduzione	5
<i>Biologia di Monachus monachus (Hermann, 1779)</i>	5
<i>La popolazione greca di foca monaca</i>	8
<i>MOM/ The Hellenic Society for the Study and Protection of the Monk seal</i>	13
<i>Cause di declino della popolazione greca</i>	14
1. Interazione con le attività di pesca	14
2. Degradazione dell'habitat e Disturbo da presenza dell'uomo	15
3. Variabilità genetica	16
4. Riproduzione e Decessi neonatali	16
5. Eventi stocastici	17
6. Inquinamento	18
Capitolo 2. Accenni di Ecotossicologia	21
Elementi in traccia	22
<i>Elementi in traccia nei Pinnipedi</i>	24
Idrocarburi Policiclici Aromatici	32
<i>Idrocarburi policiclici aromatici nei Pinnipedi</i>	37
Organoclorurati	39
<i>Organoclorurati nei Pinnipedi</i>	42
Capitolo 3. Materiali e Metodi	44
Materiali	45
Metodi	46

<i>Analisi degli elementi in traccia</i>	46
<i>Analisi degli Idrocarburi Policiclici Aromatici</i>	48
<i>Analisi degli Organoclorurati</i>	50
<i>Analisi Statistica</i>	52
Capitolo 4. Risultati e discussione	53
Risultati	54
<i>Elementi in traccia</i>	54
<i>Idrocarburi Policiclici Aromatici</i>	85
<i>Organoclorurati</i>	102
Discussione	129
Capitolo 5. Conclusioni	133
Bibliografia	138
Allegati	154

Scopo della tesi

L'opportunità di effettuare questa tesi è nata grazie alla collaborazione tra l'Università di Bologna e MOm, un'organizzazione no-profit, non governativa ambientale, fondata nel 1988 dalla Società Ellenica per la salvaguardia e la conservazione della foca monaca (*Monachus monachus*). La collaborazione prevedeva un'analisi dei contaminanti inorganici maggiormente rilevanti nella panoramica tossico-ambientale (Hg, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Se, Zn, Mn) in diversi tessuti ed organi di 56 esemplari deceduti. Lo studio comprendeva individui di diverse età (*cuccioli, giovanili, adulti*) e di entrambi i sessi. L'intervallo di tempo analizzato è pari a 20 anni: dal 1994 al 2013. Successivamente, alla collaborazione si è aggiunta l'Università di Siena, integrando lo studio ecotossicologico della specie con la proposta di analisi dei contaminanti organici IPA (idrocarburi policiclici aromatici), in quanto tematica emergente, ed OCs (contaminanti organoclorurati). Lo scopo di questa collaborazione è quello di valutare l'impatto della pressione antropica, attraverso l'inquinamento chimico sulla popolazione di *Monachus monachus*, specie minacciata di estinzione e considerata "criticamente a rischio" nella IUNC-Red List (Aguilar et Lowry, 2013).

Lo scopo di questa tesi invece è quello di analizzare lo stato della foca monaca in Grecia ed elaborare una revisione dei pericoli minaccianti la stessa, focalizzando l'attenzione sull'aspetto eco-tossicologico, dato l'evidente *gap* per quello che concerne le pressioni di natura antropica sulla specie.

Capitolo 1

Biologia della foca monaca (*Monachus monachus*, Hermann 1779)



©ΜΟm/Β. Παράβας

Biologia di *Monachus monachus* (Hermann, 1779)



La foca monaca (*Monachus monachus*, Hermann, 1779) è il focide più antico presente sulla Terra e l'unico presente nel Mar Mediterraneo. È considerata la specie più in pericolo d'estinzione tra tutti i pinnipedi, oltre che una delle 12 specie più in pericolo del mondo, con una popolazione di nemmeno 500 esemplari in tutto il bacino (Androukaki et al., 1999). Storicamente la specie abitava tutto il Mar Mediterraneo e l'area sud-est dell'Oceano Nord Atlantico, dalle Azzorre fino all'equatore (Aguilar, 1999). Ad oggi invece si riscontra una pesante restrizione e frammentazione della distribuzione, tanto che la specie si è ridotta a quattro popolazioni, disgiunte ed isolate:

1. Una piccola popolazione di circa 40 individui nel arcipelago di Madeira , nell'Oceano Atlantico .
2. Una colonia di circa 220 individui , sulla costa atlantica del nord-ovest dell'Africa presso la penisola di Cabo Blanco.
3. Una popolazione di forse meno di 10 individui lungo la costa mediterranea marocchina ed algerina.
4. Il maggior numero di foche si trova nel bacino orientale del Mediterraneo, soprattutto nel Mar Ionio ed Egeo in Grecia e lungo le coste mediterranee della Turchia.

Recentemente, osservazioni di foche monache sono state registrate anche in Israele, Libia, Cipro, Croazia ed Italia . Questo è un segno di speranza che la specie sia in grado di ritornare alle sue aree più antiche di distribuzione, grazie ad una adeguata attenzione da parte dell'uomo con l'ausilio di politiche e programmi di ricerca conservazionistici efficienti (Figura 1.1.)

Studi effettuati recentemente (Pastor et al., 2007) hanno evidenziato differenze genetiche altamente significative tra le due sub-popolazioni, atlantica e mediterraneo-orientale, suggerendo una netta divisione tra le due per lo meno a livello riproduttivo; ma ad oggi, nonostante ulteriori studi effettuati anche sull'anatomia del cranio (Van Bree, 1979), nessuna distinzione tassonomica è stata proposta.

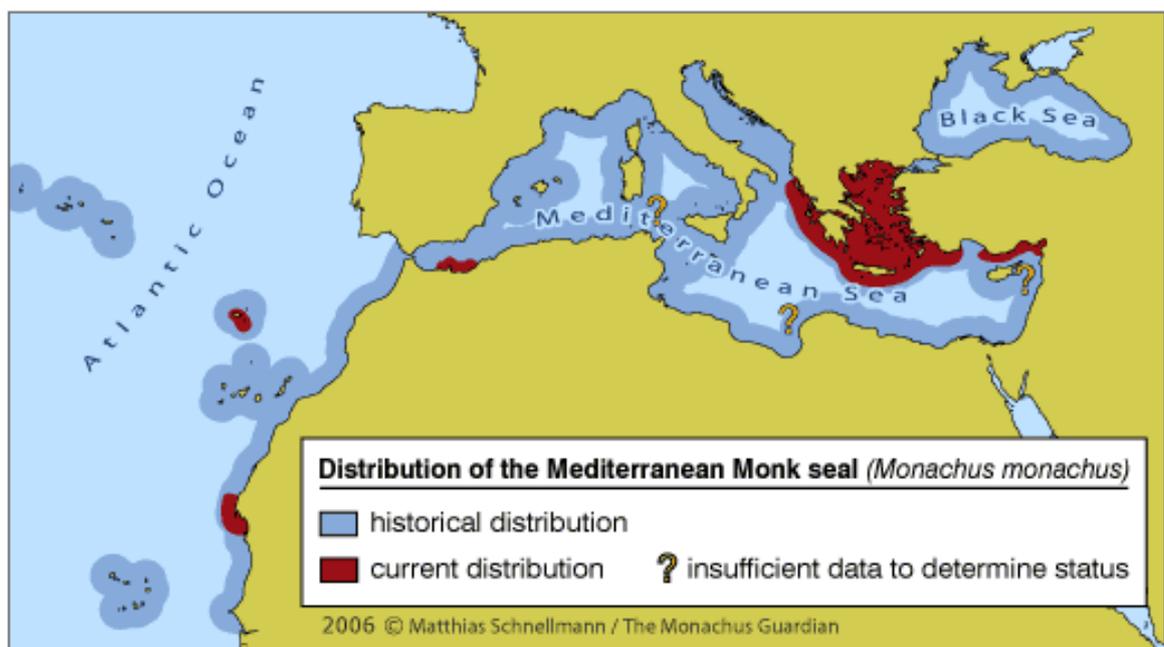


Figura 1.1. Distribuzione storica ed attuale di *Monachus monachus*

Appartenenti alle monachine fanno parte anche altre due specie, quella hawaiana (*Monachus schauinslandi*) e la caraibica (*Monachus tropicalis*), classificate dalla IUNC Red List come *critically endangered* ed *extinct* rispettivamente.

Le foche monache del Mediterraneo sono dei focidi con un evidente dimorfismo sessuale (Figura 2.2.), sia per le dimensioni che possono raggiungere (Gilmartin

and Forcada 2002), che per la colorazione del manto (Samaranch and González, 2000), che per differenze anatomiche del cranio (Mo et al. 2009).



Figura 1.2. Dimorfismo sessuale e variazione del manto con l'avanzare dell'età in *Monachus monachus*

Le femmine diventano attive sessualmente attorno ai 3-4 anni, ma sembra che la disponibilità di cibo, e quindi lo stato nutrizionale, sia un fattore critico altamente correlato con la maturazione. Le foche monache del Mediterraneo sono poligame, il che significa che un maschio adulto si può accoppiare con più di una femmina nel suo piccolo "harem". L'accoppiamento avviene in acqua, durante tutto l'anno, ma i picchi di nascite sono stati riscontrati essere stagionali, precisamente tra la fine dell'estate (Agosto) e l'inizio dell'inverno (Novembre). Nella popolazione greca il picco di nascite è stato registrato per la seconda settimana del mese di Ottobre. I cuccioli vengono partoriti all'interno di grotte riparate sulla spiaggia e presentano un manto tipicamente color nero-marrone cioccolato fondente con una macchia bianca ventrale. La muta avviene entro 15 giorni circa dalla nascita.

La percentuale di cuccioli che raggiunge l'età adulta è al di sotto del 50%, con un picco di mortalità entro i primi due mesi di vita. Come tutti i mammiferi vengono allattati dalla madre e svezzati entro la fine dei 4 mesi di vita.

La foca monaca è una specie con una dieta varia, che include pesci bento-pelagici e demersali, cefalopodi, crostacei, molluschi e perfino tartarughe marine (*C. caretta*). Una recente analisi dei contenuti stomacali di esemplari deceduti appartenenti alla popolazione greca di foca monaca ha evidenziato un comportamento opportunistico della specie, la quale tende a cacciare *in primis* cefalopodi (>50%) come *Octopus vulgaris*, *Eledone spp.* e *Sepia officinalis*, ma anche pesci (48%) di diversi generi, in particolare appartenenti alla famiglia degli Sparidi, largamente allevati nel territorio (Pierce et al. 2009). Le prede vengono cacciate in acque poco profonde durante lunghe apnee (fino a 15 minuti). Sono animali in grado di effettuare immersioni a profondità fino a 200 metri, già in giovane età, e di percorrere grandi distanze in mare nell'arco di brevi periodi di tempo (ad esempio, 150 miglia nautiche in 3 mesi).

La popolazione greca di foca monaca

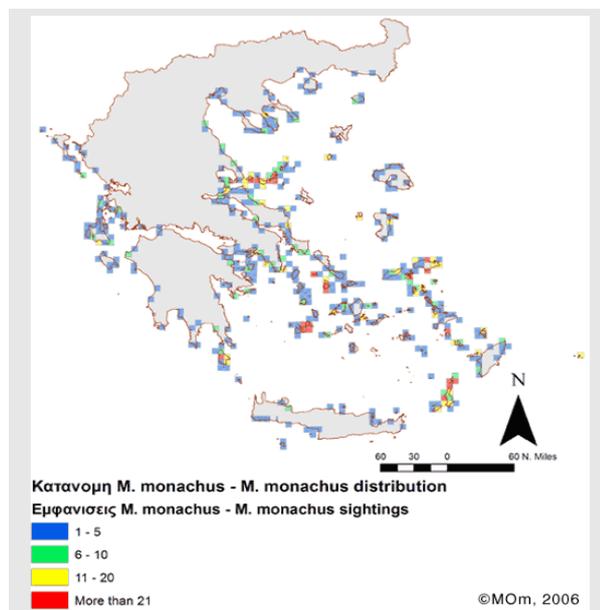


Figura 1.3. Distribuzione di *Monachus monachus* lungo le coste della Grecia

La Grecia è, assieme alla Turchia, il territorio che ospita la maggior parte delle popolazioni di foca monaca nel Mediterraneo orientale. La distribuzione della foca monaca (Figura 1.3.) vede un'areale che comprende praticamente tutta la costa greca, ad eccezione del Golfo di Corinto. È stata osservata frequentare

principalmente gli arcipelaghi del Dodecaneso, le Cicladi, le Sporadi e le isole Ionie.

In occasione del workshop *Population and Habitat Viability Assessment* (PHVA), svoltosi nell'Aprile del 1994 ad Atene, la popolazione totale greca è stata stimata aggirarsi attorno ai 180 esemplari.

Le due popolazioni più stabili sono state individuate nelle isole Ionie (Panou et al., 1993) e nel arcipelago delle isole Sporadi (HSSPMS, 1995), nel quale è stata indentificata una popolazione di circa quaranta foche, di cui una ventina nel Parco Nazionale di Alonissos, un'area protetta che comprende le isole di Youra, Skantzoura, Psathoura, Kyra-Panaghia e Piperi.

I movimenti della specie lungo le coste turco-greche ed all'interno del Mar Egeo non sono ancora stati capiti molto bene. Si sa che le femmine adulte mostrano estrema filopatria, il che a sua volta suggerisce che i maschi (almeno quelli dominanti) sono anch'essi legati a luoghi specifici, ovvero i siti di *pupping*. Ciò nonostante, altre categorie, specialmente legate all'età, sembrano essere molto mobili. Lampanti sono i dati ottenuti dalle femmine giovani, il che potrebbe essere un'indicazione che alcune femmine in giovane età possono percorrere grandi distanze alla ricerca di nuovi siti in cui allevare la propria prole (Karamandilis, dati non pubblicati). Con l'avvento del nuovo millennio, della stesura della Direttiva Habitat (Direttiva n. 92/43/CEE relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche) dalla Commissione Europea e la successiva elaborazione del programma nazionale LIFE-Nature (*The Mediterranean Seal: Conservation actions in two Greek Natura 2000 sites*, LIFE00NAT/GR/7248), il bagaglio conoscitivo sulla popolazione greca di foca monaca si è ampliato.

La scoperta di una popolazione locale nell'isola di Gyros nel 2008 (Karamanlidis et al., 2013) infatti ha portato a delinearne una struttura articolata e l'uso dell'habitat circostante da parte della stessa. Incredibilmente è stato rivelato che questa popolazione non ha nulla a che vedere con quelle studiate a Cabo Blanco, caratterizzate da un comportamento tipicamente solitario. Questo primo ed unico caso di colonia di *M. monachus*, dato dalle sue dimensioni, ha sottolineato la necessità di attuare programmi di conservazione per la specie greca,

concretizzatisi con la creazione di zone con divieto di pesca entro le 3 miglia dalla costa di Gyros (EU LIFE+ NATURE “CYCLADES” project)

Tutte le altre colonie nell'Egeo sono più piccole, ma hanno più o meno la stessa struttura di quella di Gyros, con uno o due maschi dominanti aventi controllo su un piccolo gruppo di femmine. Nel caso di Gyros il numero di femmine è stimato essere dai 10 ai 15 esemplari, nel caso delle altre colonie il *range* si aggira solitamente tra le 5 e 10 femmine (Karamandilis, dati non pubblicati).

Un altro importante passo verso la conservazione di questa specie è stato fatto grazie a Androukaki et al. (1999, 2006), che individuano le più comuni cause di morte attraverso un'analisi temporale a largo spettro, dal 1985 al 2005, su esemplari di diverse età. Lampante è stato il risultato ottenuto, nel quale l'interazione con la pesca ne fa da padrone tra i fattori di morte. Adulti e sub-adulti risultano gli stadi d'età più suscettibili a questa interazione, finendo uccisi deliberatamente i primi ed affogati tra le reti i secondi. I cuccioli invece sembrano risentano più dei così detti *non-human induced factors*, ossia la morte avviene per cause naturali, forza delle onde, malattie etc che sia.

Anche sul fronte degli usi alimentari di *M. monachus* in Grecia si sono fatti passi in avanti. Karamandilis in un recente lavoro (2009) ha analizzato gli isotopi $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, rivelando che questi pinnipedi si trovano all'apice della catena trofica (media $\delta^{15}\text{N}$ $10,40 \pm 1,33\%$), prediligendo cefalopodi e pesci ossei, senza alcuna differenza statistica correlata a sesso, età o dimensione corporea. Inoltre, con l'analisi dell'isotopo $\delta^{13}\text{C}$, l'autore ha potuto affermare che questa specie è tipica alimentarsi in habitat bentonici e/o reefs. Pochi anni dopo, Pierce et al. (2011) con l'analisi del contenuto stomacale individuarono anche che tipologie di prede vengono normalmente cacciate da *M. monachus*, andando così ad aggiungere ulteriori informazioni a quanto già discusso da Salman et al. (2001, in figura 1.4. di seguito).

Tra queste, cefalopodi e pesci ossei risultano essere, come evidenziato da Karamandilis (2009), una componente preponderante nella dieta della foca monaca greca; andando nel dettaglio, le specie *Octopus vulgaris*, *Eledone* spp. e *Sepia officinalis* per il primo e Sparidi, Scorpaenidi, *Dicentrarchus* ed Anguilliformi per il secondo. Un dato fondamentale per la conservazione della foca monaca è emerso da questo studio: la presenza elevata di resti di Sparidi e *Dicentrarchus* nello stomaco di esemplari deceduti risultava essere strettamente correlata alla

causa di morte degli stessi, ossia l'uccisione deliberata da parte dei pescatori. Orata (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) e branzino (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758) sono le due specie maggiormente allevate in Grecia. Questo porta a notare il chiaro comportamento opportunistico dell'animale, oltre ad un necessario mitigamento nell'interazione foca-pesca. Un programma (LIFE05NAT/GR/000083) avente questo obiettivo è stato poi stilato nel 2009, chiamato con l'acronimo MOFI (*Action plan for the mitigation of the negative effects of monk seal-fisheries interactions in Greece*).

Table 1. Preyspecies and number in stomach of *Monachus monachus*.

Prey item	N	TW (g)	W%
Magnoliophyta			
Posidoniaceae			
<i>Posidonia oceanica</i> (L.) Delile, 1813	2 (roots)	56.4	1.11
Porifera			
Irciniidae			
<i>Sarcotragus</i> sp.	1	89.9	1.77
<i>Sarcotragus</i> sp.	1	158.7	3.12
Cephalopoda			
Sepiidae			
<i>Sepia officinalis</i> Linnaeus, 1758	6	1919.5	37.69
Octopodidae			
<i>Eledone moschata</i> (Lamarck, 1798)	8	1889.2	37.10
<i>Bathypolypus sponsalis</i> (Fischer & Fischer, 1892)	5	978.8	19.22
Total	23	5092.5	100

N, number of specimens; TW, total wet weight (estimated wet weight for cephalopods, based on linear equations); W%, percentage of the total weight of all food items.

Figura 1.4. Analisi del contenuto stomacale in *Monachus monachus* (Pierce et al., 2011)

Nonostante la Grecia sia legata alla protezione della foca monaca da normative di carattere internazionale (Convenzione di Brema¹ e di Washington²), comunitario (Direttiva 92/43, *EEC Directive on the Conservation of natural habitats and wild flora and fauna*) ed interno (legge n° 67 del 29 Novembre 1980), lo schema generale di declino delle popolazioni di *Monachus monachus* non ha risparmiato nemmeno la popolazione greca. Dal documento dell'UNEP/MAP (1994) risulta infatti che la colonia presso l'isola di Kos, stimata a 20 esemplari tra il 1971-1972, nel 1977 contava appena tre esemplari. Allo stesso modo, uno studio effettuato

¹ Convenzione sulla Conservazione della Vita Selvatica e degli Habitat naturali in Europa (Convenzione di Berna, 1979);

² Convenzione sul commercio internazionale delle specie di fauna e flora selvatiche minacciate di estinzione (CITES - Convenzione di Washington, 1973);

negli anni '80 ha registrato un calo simile nel Golfo di Corinto (da 20 foche monache nel 1975 a solo 5 nel 1978) e nelle isole Ionie (da 30-40 esemplari riportati nel 1977, a soli 13-20 nel 1987). Tra le cause di regressione della popolazione, il fattore principale ha sicuramente carattere antropico, dall'uccisione intenzionale da parte dei pescatori allo sviluppo del turismo per citarne alcuni.

Nell'ultimo decennio è stata attuata una politica di conservazione della specie da parte dello stato greco. Tra il 1996-2008 è stata infatti incrementata la legislazione nazionale, proteggendo habitat di particolare interesse per le popolazioni chiave sopracitate di foca monaca e cercando di mitigare l'interazione tra pescatori e foche, oltre ad istituire programmi di recupero e riabilitazione degli esemplari in difficoltà ed una rete spiaggiamenti. Infine, ma non meno importante, sono stati attivati programmi di ricerca sulla biologia ed ecologia della specie, in cui il MOM/*The Hellenic Society for the Study and Protection of the Monk seal* ne è uno dei principali promotori.

MOM/ The Hellenic Society for the Study and Protection of the Monk seal

Il MOM è un'organizzazione ambientalista non governativa non-profit greca per lo studio e la protezione della foca monaca, attiva nella promozione e nella tutela dell'ambiente costiero e marino della Grecia, attraverso la protezione della foca monaca del Mediterraneo, unica specie di *Phocidae* nel Mar Mediterraneo e il mammifero marino più in rischio di estinzione in territorio europeo. È inoltre un istituto di ricerca accreditato secondo le disposizioni della Convenzione internazionale sul commercio delle specie minacciate di estinzione (CITES). Dal 1996, il MOM è diventato un membro della IUCN (Unione Internazionale per la Conservazione della Natura), la più grande organizzazione al mondo per la protezione dell'ambiente naturale.

Le attività di ricerca scientifica del MOM, di conservazione e di didattica sono realizzate da un team dedicato e altamente specializzato di professionisti con l'aiuto di numerosi volontari. Tra le innumerevoli attività del MOM, si possono citare:



- Ricerca scientifica
- Soccorso e riabilitazione
- Protezione e gestione
- Sensibilizzazione pubblica
- Educazione ambientale

L'obiettivo principale del MOM è la conservazione dell'ambiente naturale e della biodiversità dei mari greci, attraverso la tutela della foca monaca del Mediterraneo (*Monachus monachus*), ma non solo. Infatti il MOM adopera sì per la sopravvivenza della foca del Mediterraneo, ma anche per un ambiente marino sano per le generazioni presenti e future, nel concetto di sviluppo sostenibile del territorio, lavorando su due diversi, ma altamente correlati, fronti: la riduzione della mortalità di foca monaca connessa all'uomo e la preservazione dell'habitat.

Cause di declino della popolazione greca

Diversi sono i fattori responsabili del declino della foca monaca nel bacino del Mediterraneo. Per tal motivo l'attenzione verrà soffermata esclusivamente alla popolazione greca, essendo oggetto del caso in studio. Tra questi, una distinzione essenziale può essere effettuata sulla base della fonte di induzione del fattore: naturale o indotta dall'uomo. Dai report finali di *Population and habitat viability assessment* (PHVA, Workshop 1994; 2001) appare evidente che le cause indotte dall'uomo sono quelle su cui una buona politica di conservazione può lavorare per ridurre il declino demografico della specie. Tra le innumerevoli minacce, sicuramente l'interazione con le attività di pesca delle foche, la degradazione dell'habitat (sia per inquinamento che per rimodellamento dello stesso a fini turistici) ed il disturbo dato dalla presenza dell'uomo in sé risultano i fattori principali di criticità. Ad ogni modo, anche a livello biologico, la specie è sottoposta a vari fattori di pressione, tra cui un basso tasso di riproduzione, un elevato numero di decessi neonatali ed una scarsa variabilità genetica, il tutto gravato dalle classiche pressioni quali predazione e insorgenza di patologie.

1. Interazione con le attività di pesca

Come è stato riportato precedente, la foca monaca in Grecia tende ad avere un comportamento opportunistico nell'approvvigionamento di prede (Pierce et al., 2011). Questo ha portato negli anni ad uno scontro tra pescatori e foche, in cui sicuramente l'uomo ha avuto la meglio. È evidente questo soprattutto negli studi di Androukaki et al. (1999; 2006), in cui il *deliberate killing* è presente in tutte le fasce d'età (Figura 1.5.), raggiungendo l'apice negli adulti con il 50% dei casi analizzati. Pescatori e operatori nell'acquacoltura considerano le foche una piaga per le loro attività in mare, in quanto danneggiano reti e "rubano" loro il pesce. Non è raro che, oltre all'uccisione diretta, la quale sembra avvenire soprattutto tramite l'uso di armi da fuoco, dinamite e bastonate, si verificano anche casi di impiglio nelle reti da pesca, specialmente con esemplari sub-adulti (Androukaki et al., 2006), provocandone la morte per annegamento. Un altro fattore che va ad incidere sulla sopravvivenza di questa popolazione di pinnipedi è la deplezione di risorse ittiche a causa dello sovrasfruttamento del mare. La simulazione proposta dal PHVA nel 1994 ha sottolineato come la morte di fame possa avere un drammatico effetto sulla probabilità di estinzione della popolazione greca.

È stato fatto molto per limitare la pressione del fattore “fame”, dalla creazione di parchi marini protetti, in cui navigazione e pesca sono vietati o scrupolosamente regolamentati, a misure di compensazione diretta ai pescatori (con reti nuove o un rimborso monetario) per i danni provocati dalle foche (MOFI *action plan*, 2009).

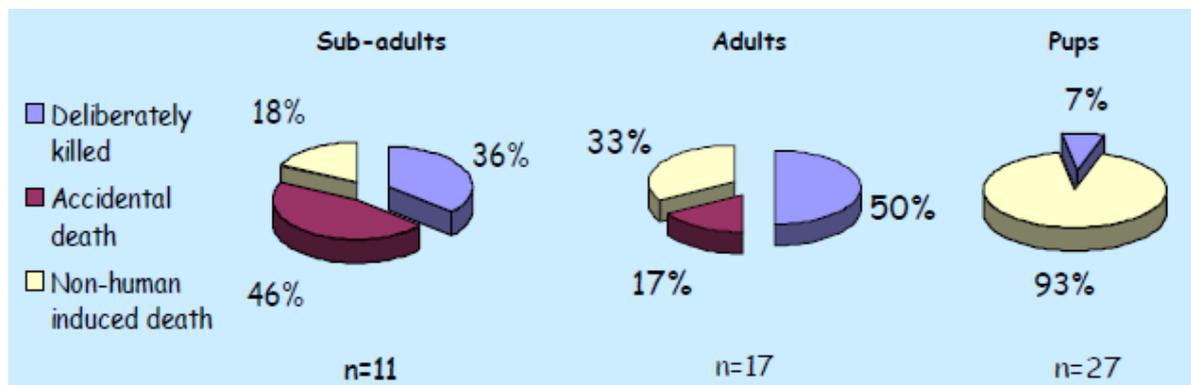


Figura 1.3. Cause di morte in *Monachus monachus* suddivise per classe d'età (Androukaki et al., 2006)

2. Degradazione dell'habitat e Disturbo da presenza dell'uomo

Testi antichi di Aristotele ed Omero narrano di foche sdraiate su spiagge sabbiose e rocciose o nascoste in grandi caverne. Nei primi anni Settanta però, l'industria del turismo ebbe un *boom* colossale ed ad oggi il Mediterraneo ospita ogni estate, specialmente tra Luglio ed Agosto, oltre 110 milioni di turisti. Un vero e proprio assalto è stato pertanto condotto nei confronti dell'habitat monachino, distruggendone spiagge e grotte naturali, al fine creare sfarzosi complessi turistici. L'elevata concentrazione di turisti ha provocato un effetto di disturbo per la specie, portandola ad emarginarsi sempre più. In una *review* del 1999, Johnson e Lavigne analizzano le diverse fasi di deterioramento dell'habitat di *M. monachus* avvenuto nel Mediterraneo durante il XX secolo. Queste grandi ed accoglienti caverne che potevano ospitare colonie di foche monache sono diventate aree vulnerabili, nelle quali è facile finire faccia a faccia con l'uomo. A causa dell'avvento del turismo di massa, dell'attività navale e di *diving*, le grotte sono state infatti occupate dall'uomo, modificando così un habitat tipicamente utilizzato dalla foca come luogo per partorire e svezzare i cuccioli, oltre che tana per dormire e ripararsi da eventi atmosferici. Le spiagge, allo stesso modo, costituendo un'altra tipologia importante di habitat utilizzato dal pinnipede, sono state invase da ondate di turisti ed adibite all'attività di balneazione. La necessità

di creare aree marine protette in cui nessuna attività umana, dalla balneazione alla pesca artigianale alla navigazione non siano consentite, è quindi chiara.

3. Variabilità genetica

Lo stato dell'arte in merito alla genetica per la foca monaca greca non ha molti studi da offrire. Pastor et al. (2007) hanno condotto uno studio su 12 esemplari (cinque cuccioli, due subadulti e cinque adulti) campionati nell'area geografica comprendente Cicladi, Dodecaneso e le isole nord-orientali dell'Egeo, tra il 1995 ed il 1999. I risultati ottenuti sono poi stati confrontati con quelli ottenuti e pubblicati dallo stesso autore nel 2004 sulla popolazione mauritana. La dinamica di popolazione di *M. monachus* mediterraneo-orientale mostra un deficit di alleli rari, tipico in popolazioni che hanno recentemente subito un *bottleneck*, ed una discontinuità nella distribuzione della frequenza degli alleli quando confrontata con la popolazione mauritana, tranne che in alcune eccezioni; un dato che porta a pensare che tempo addietro esistesse una unica grande popolazione nel Mediterraneo di foca monaca. Queste due caratteristiche associate hanno portato Pastor (2007) ad affermare che la popolazione greca è composta da un ridotto numero di esemplari e che vede una importante perdita di variabilità genetica. La scarsa variabilità è molto probabilmente associata ad un basso successo riproduttivo medio degli individui (detto anche *fitness*) ed ad uno scarso adattamento ai cambiamenti ambientali circostanti.

4. Riproduzione e Decessi neonatali

Come indicato dai dati raccolti dal *Rescue and Information Network*, gestito dal MOM dal 1991, la popolazione in Grecia di foca monaca è ampiamente distribuita lungo la costa nazionale. Sono state scoperte varie aree di riproduzione in tutto il paese, ma i due siti più importanti sono il complesso di isole nel Mar Egeo delle Sporadi settentrionali (in particolare, l'area protetta del Parco Nazionale Marino di Alonissos), che vede un tasso di riproduzione stimato a circa 8 neonati ogni anno, ed il complesso di isole Kimolos-Polyegos situato nel sud del Mar Egeo, con un tasso di riproduzione di 7 neonati all'anno. In generale, ad ogni modo, dal report finale del PHVA (Gonzalez et al., 2001), sembra che il tasso di nascite sia molto scarso rispetto a quello potenziale della specie.

Come già precedentemente detto la maturità sessuale viene raggiunta a 3-4 anni nelle femmine ed a 5-6 anni per i maschi. I giovanili però sono uno stadio che subisce un'elevata pressione data dall'interazione con le attività di pesca. Infatti l'82% di essi muore a causa di questa, tra cui il 36% per uccisione diretta da parte dei pescatori e il 46% annegato nelle reti (Androukaki et al., 2006).

La gestazione dura circa 9-11 mesi, dopo di che un solo cucciolo viene partorito sulla terra ferma. La degradazione dell'habitat pone numerose difficoltà per le foche di trovare siti adatti al parto.

La stagione dei cuccioli in Grecia si svolge da agosto a dicembre, con un picco delle nascite durante la seconda settimana di ottobre. L'allattamento può avvenire al massimo per i primi 5 mesi di vita. Durante questo periodo, al contrario delle sorelle hawaiane (*Monachus schauinslandi*), le madri non osservano periodi di lungo digiuno, bensì tendono ad abbandonare incustoditi i loro cuccioli nelle grotte in cui si nascondono per andare a caccia. Ciò porta ad esporre la prole ad elevate fonti di rischio e conseguentemente di morti neonatali. I fattori maggiormente incidenti sulle morti dei cuccioli di foca monaca sono di natura sia ambientale sia biologica. Tra i primi, l'azione delle onde, il livello della sabbia e la presenza di predatori sono i più importanti, mentre per i secondi sono la mancanza di cure parentali e di vigore dei piccoli. Esistono delle indicazioni che presumono la correlazione tra condizioni ambientali e percentuale di mortalità durante i periodi invernali (quando quindi i cuccioli sono nei primi mesi di vita), ma ad oggi non è stata rilevata ancora nessuna significatività statistica del dato (Gonzalez et al., 2001).

5. Eventi stocastici

Nel 1997 la popolazione di Capo Blanco fu colpita da un evento eccezionale di moria di massa. La causa è ancora sconosciuta ma si è ipotizzato sia dovuto ad una intossicazione da biotossine algali e più precisamente da saxitossina (Hernandez et al., 1998; Reyero et al., 1999). Contemporaneamente però in alcuni esemplari è stato isolato un nuovo ceppo di Morbillivirus, chiamato MSMV-WA (monk seal Morbillivirus from West Africa), differente dal CDV (canine distemper virus) e dal PDV (phocid distemper virus). Lo stesso inoltre sembra essere molto simile al DMV (dolphin morbillivirus) (Van de Bildt et al., 1999). Il virus è stato confrontato con quello isolato da un esemplare rinvenuto spiaggiato lungo le

coste greche, identificato con l'acronimo MSMV-G (monk seal Morbillivirus from Greece). Quest'ultimo denota differenze dal ceppo riscontrato nelle foche monache africane e più relazionato al PMV (porpoise morbillivirus). Ciò dimostra interazione tra foche e cetacei e la possibile trasmissione di patogeni.

Ad oggi in Grecia, la popolazione di foche non ha mai visto eventi di mortalità di massa né sono mai stati segnalati casi di intossicazione da biotossine algali.

Al contrario, tre diversi patogeni sono stati isolati da singoli esemplari deceduti lungo le coste greche: Morbillivirus (Van de Bildt et al., 1999), Parapoxvirus e Leishmania spp. (Toplu et al., 2007).

6. Inquinamento

È difficile valutare concretamente l'effetto di inquinanti sulla popolazione di foca monaca nel Mediterraneo. I primi studi effettuati per valutare il carico di organoclorurati in *M. monachus* risalgono ai primi anni Novanta. Cebrian et al. (1993) valutarono le concentrazioni di tDDT e tPCB in un esemplare maschio di 6 anni rivenuto deceduto lungo le coste greche dell'isola di Santorini. Il valore singolo di un animale non può certo dare informazioni sullo stato della popolazione, ma fu il primo studio, dal quale ne derivarono diversi altri. È del 1997 infatti la ricerca condotta da Borrell et al. sui livelli di OCs in due popolazioni, quella di Capo Blanco e dell'isola di Chafarina (Mediterraneo occidentale). I risultati evidenziarono che la popolazione abitante le coste atlantiche mostrava valori più bassi di quella delle coste mediterranee e che quest'ultime avevano livelli di PCBs e DDTs di magnitudo comparabili a quelli riportati da Cebrian et al. (1993). Questo aspetto non lascia certo sorpresi, dato che sono ormai note le elevate quantità di contaminanti riscontrabili nei tessuti dei mammiferi marini presenti nel bacino del Mediterraneo (Aguilar et al., 2002). In un altro studio di Borrell et al. (2007), viene invece presa in considerazione proprio la popolazione greca di foca monaca, anch'essa confrontata con quella di Capo Blanco, evidenziando una mancata significatività nei livelli di OCs intrapopolare, ossia tra classi d'età e sesso, e differenze significative invece tra le due popolazioni in analisi. Ancora una volta quindi, dopo quasi 10 anni, si denota come cetacei e pinnipedi nel Mediterraneo siano maggiormente sottoposti al fattore stressante dell'inquinamento antropico rispetto ai parenti oceanici. L'effetto di questa componente ambientale di stress può essere interpretato, con le dovute

precauzioni, coi dati di Borrell et al. (2007), in cui nessuna differenza significativa ($p > 0.05$) è stata riscontrata tra esemplari adulti di sesso opposto e nemmeno tra le diverse classi d'età. Ciò può essere infatti dovuto al basso tasso riproduttivo della specie, il quale, associato all'elevato tasso di mortalità dei cuccioli nei primi due mesi di vita, possono sinergicamente contribuire a ridurre il trasferimento di organoclorurati dalle femmine durante la gestazione ed allattamento alla prole, oltre a portare ad una comparabilità di concentrazione di contaminanti nei tessuti di maschi e femmine (Borrell et al., 2007). Questo tipo di risultato ad ogni modo non è nuovo in letteratura tra i pinnipedi. Lo stesso andamento è stato riscontrato infatti anche in *Pusa hispida* (Wolkers et al., 1998), un focide che, come *M. monachus*, continua ad alimentarsi anche durante l'allattamento della prole; comportamento che può velare l'escrezione di OCs nelle femmine tramite allattamento e gestazione. Quello che desta maggior timore, ad ogni modo, sono i livelli di DDTs e PCBs riscontrati nelle foche monache del Mediterraneo (Cebrian et al., 1993; Borrell et al., 1997; 2007), i quali, essendo elevati, risultano conseguentemente rischiosi per la specie, specialmente per quegli aspetti relativi alla riproduzione. Sono valori infatti che ricadono in quei *range* per cui già sono stati descritti casi di tumori e stenosi dei corni uterini di *Phusa hispida*, *Phoca vitulina* ed *Halichoerus grypus* (Helle et al., 1976; Reijnders, 1980; Baker, 1989). Oltretutto, elevati livelli di questi contaminanti sono stati correlati ad una diminuzione del testosterone in *Phocoenoides dalli*, dei livelli nel sangue di retinolo in *Phoca vitulina* ed un impoverimento del sistema immunitario (Subramanian et al., 1987, Brouwer et al.; 1989, Swart et al., 1994, 1995).

Oltre agli OCs, anche i metalli pesanti sono stati oggetto di studio in foca monaca. Yediler et al. (1993) analizzarono le concentrazioni di Cu, Zn, Hg, Cd e Pb nel pelo di 35 esemplari in muta, raccolto in grotte lungo le coste greche, nel periodo 1986-1991. Nessun dato inerente a sesso o età è stato raccolto. Le concentrazioni medie per i metalli si mostrarono sorprendentemente omogenee, portando a pensare i ricercatori che ci fosse una distribuzione omogenea di contaminanti nell'habitat della popolazione o che la specie possedesse una qualche forma di regolazione endogena per questi xenobiotici. Nel 2000, Dosi analizzò invece 14 elementi (Al, As, Cd, Co, Cr, Co, Fe, Mn, Mg, Pb, Pt, Se, Si e Zn) su due matrici, blubber e pelle, di esemplari deceduti lungo le coste greche nel periodo 1994-1999. I risultati finali non mostrarono alcuna differenza statistica né sessuale né di provenienza geografica del campione. Al contrario, risultano significative le

differenze sulla base della matrice (concentrazioni maggiori nella pelle) e dello stadio d'età analizzati (livelli di Cu, Fe, Mg, Si e Zn più elevati nei cuccioli). Non è stato possibile definire un *trend* temporale a causa del ristretto numero di esemplari campionati.

Ad oggi, si ha un *gap* di informazioni ecotossicologiche per la specie, specialmente di quei composti “di nuova generazione”, come ritardanti di fiamma bromati ed Idrocarburi Policiclici Aromatici. Questa tesi ha come scopo quello di colmare quest'ultima lacuna, analizzando i livelli IPA nella popolazione greca di foca monaca, oltre che fornire una visione aggiornata sul profilo dei metalli pesanti e contaminanti organoclorurati.

Capitolo 2

Accenni di ecotossicologia



©ΜΟm/Β. Παράβας

Elementi in traccia

I metalli sono elementi chimici solidi a temperatura ambiente, unica eccezione è il mercurio che si trova in forma liquida. Sono naturalmente presenti nell'aria, nell'acqua, nel suolo e di conseguenza anche negli alimenti. Tuttavia le attività umane hanno portato ad una progressiva dispersione nell'ambiente di questi elementi, in particolar modo con l'avvento dell'industria mineraria e metallurgica negli anni Ottanta. I metalli possono essere catalogati in due grandi classi: essenziali e tossici. Si definiscono essenziali quei metalli necessari all'organismo. A loro volta si distinguono in *microminerali essenziali*, come ad esempio il ferro (necessario per l'emoglobina) e lo zinco (in molti enzimi), e *microminerali necessari*, che entrano nella composizione di cofattori enzimatici ma che possono facilmente divenire tossici, come cromo e selenio. I metalli essenziali all'organismo sono numerosi, ma qualora venissero assorbiti in quantità eccessive, possono causare effetti dannosi, come quelli tossici. Quest'ultimi vengono considerati tali se apporto determina effetti dannosi per la salute, tanto maggiori, quanto maggiore è la dose assorbita.

Si definiscono *pesanti* quei metalli che hanno un numero atomico superiore a 20. I metalli pesanti sono caratterizzati da una tendenza nell'accumularsi nel suolo e nella catena alimentare, portando ad effetti nocivi sugli esseri viventi, anche a basse concentrazioni. Possono infatti determinare nell'uomo fenomeni irritativi, intossicazioni acute e croniche, oltre ad avere azione mutagena, cancerogena e interferenti endocrini. Gli organi o gli apparati colpiti possono essere diversi, dal rene al sistema nervoso.

Le vie d'esposizione a questi contaminanti sono molteplici: principalmente possono essere assorbiti per via respiratoria o per ingestione. Nell'organismo si legano prima alle proteine del sangue, per poi distribuirsi nei diversi compartimenti a seconda delle loro proprietà e dell'organo target dell'elemento.

Le vie di eliminazione invece possono essere sintetizzate con l'escrezione renale, biliare (ritrovandoli quindi nelle feci), respiratoria o cutanea. Alcuni metalli possono essere trasferiti dalla madre al feto per via transplacentare o anche attraverso il latte materno .

La preoccupazione ambientale in materia di bioaccumulo dei metalli pesanti è sorta in seguito ad incidenti di varia natura, con uno sviluppo di modelli predittivi in merito all'accumulo di contaminanti in ambiente acquatico che ha avuto il *boom* nel 1980. Negli ambienti marini, le concentrazioni di metalli pesanti nei sedimenti possono superare quelli dell'acqua sovrastante di tre o cinque ordini di magnitudo. La biodisponibilità di questi contaminanti nei sedimenti è legata alla presenza di siti di legame di metallo sul sedimento. L'elevata concentrazione di ossidi di ferro o materiali organici nel sedimento sembra provocare una riduzione nella biodisponibilità di questi elementi. I metalli possono anche formare solfuri insolubili, creando al contrario siti di adsorbimento. Altri fattori che possono influenzare la bioaccumulazione dei metalli dai sedimenti includono la speciazione e trasformazione (ad esempio, la metilazione) dei metalli stessi, oltre che la chimica dei sedimenti (salinità, redox o il pH) e la materia organica disciolta (DOM). Il DOM è una fonte di energia importante per le catene alimentari acquatiche, e la presenza di questa frazione di materia organica può influenzare sia la distribuzione di un metallo tra acqua e sedimenti sia la loro biodisponibilità. Il processo fondamentale nel trasferimento trofico di un contaminante, come precedentemente accennato, è l'assorbimento dietetico. Nei pesci e nei mammiferi marini, l'assorbimento del cibo avviene principalmente a livello intestinale, attraverso processi di diffusione passiva o attiva tramite dei *carrier* (mediati o facilitati). Nei sistemi acquatici, casi di biomagnificazione lungo le catene alimentari sono generalmente limitati a contaminanti persistenti, alogenati e molto idrofobi. Per i metalli, una significativa biomagnificazione nei vertebrati superiori sembra verificarsi solo per gli alchili idrofobi, resistenti alla biotrasformazione e biodegradazione (Hoffman et al., 2002).

Per quanto riguarda gli organismi all'apice della catena trofica marina, nel corso degli ultimi 30 anni c'è stata un'impennata nella ricerca per tracciare la composizione metallica dei mammiferi marini, quali cetacei e pinnipedi. È stato evidenziato che una significativa porzione della variabilità delle concentrazioni di metalli in traccia intra- ed inter-specie è attribuita alla posizione geografica, all'anno di campionamento, la stagione, il sesso, lo spessore del grasso che riveste questi organismi e la loro età.

Elementi in traccia nei Pinnipedi

Di seguito si riportano singolarmente le principali conoscenze dei metalli analizzati in questa tesi e le loro interazioni legate ai Pinnipedi.

Arsenico(As)

Ad oggi, non sono disponibili dati né di laboratorio né in condizioni naturali in merito alla tossicità dell'arsenico nei mammiferi marini. I crostacei sembrano essere una fonte importante di arsenico nelle diete di cetacei. L'arsenobetaina (un importante composto dell'arsenico) è stata testata essere in laboratorio non mutagena (test di Ames), né ha avuto effetto sulla funzione metabolica di cellule ovariche di criceto. Tanto meno ha mostrato alcun sinergismo o antagonismo all'azione di altri contaminanti. L'As viene rapidamente assorbito dal tratto gastrointestinale ed escreto attraverso le vie urinarie, grazie alle sue elevate caratteristiche polari e idrofile. Analisi su fegato e rene di *Pontoporia blainvillei*, hanno mostrato una correlazione significativa tra i due organi, indicando accumulo proporzionale (Eisler, 2000).

Le concentrazioni di As più elevate registrate nei Pinnipedi sono state in un campione fegato di *Phoca vitulina*, con un *range* che spaziava da 0,2 a 1,7 mg/kg p.f. (Koeman et al., 1973).

Cromo(Cr)

Il Cr esavalente è più facilmente assimilabile ed è di circa 100 volte più tossico rispetto allo stato trivalente. Si accumula specialmente negli eritrociti (Foster, 1963). Tuttavia, indagini condotte da Duinker et al. (1979) su organi altamente vascolarizzati di foche trovate decedute non hanno evidenziato livelli elevati come in quelli evidenziati nel cervello. Le concentrazioni (esprese in mg/kg p.f.) variavano da 0,15 - 0,59 nel rene, 0,7-1,2 nel cuore, 0,8-1,4 nella milza, fino ad arrivare a 1,0-2,8 nel cervello.

Il Cr non sembra biomagnificare lungo le catene alimentari marine che coinvolgono i mammiferi o altri vertebrati marini.

Cobalto (Co)

In generale il cobalto viene riscontrato nei tessuti dei mammiferi marini con concentrazioni inferiori a 0,5 mg/kg p.s.. Le concentrazioni trovate in diversi tessuti di *Phoca vitulina* provenienti dal Terranova e Labrador sono risultate sempre inferiori a 0,025 mg/kg p.f. (Veinott e Sjare, 2006). Studi di laboratorio hanno scoperto che la proliferazione dei linfociti in cuccioli di foche rimane inalterata se esposti a 10,0 mg/L per 5 giorni (Kakuschke et al., 2008).

Rame (Cu)

È probabile che il rame non venga accumulato dalla mammiferi marini. Le concentrazioni di circa 800 specie diverse di piante ed animali raccolti in numerose località oceaniche e costiere dimostrano che le concentrazioni di Cu nei mammiferi ed altri vertebrati marini sono tra i più bassi registrati in tutti i gruppi analizzati. Le concentrazioni nei tessuti tendono a diminuire con l'aumentare dell'età dell'organismo, fatta eccezione per il cervello in cui aumentano con l'aumentare dell'età (Eisler, 2000).

Associazioni di rame con altri metalli, come cadmio, zinco, ferro, manganese ed argento in diversi tessuti di vertebrati marini sono documentate, probabilmente mediate dalla presenza di metallotioneine.

Studi effettuati su fegati di esemplari di foche di Weddell (*Leptonychotes weddelli*), hanno rivelato che il rame è positivamente correlato con lo zinco, il manganese ed il ferro (Szefer et al. , 1994).

L'eccesso di rame all'interno della cella ossida il ferro ferroso a ferrico (Fe^{3+}), un composto noto come metaemoglobina, che non è in grado di legare né ossigeno né il biossido di carbonio e non è dissociabile.

Manganese (Mn)

Nei mammiferi marini le concentrazioni di manganese tendono ad essere più elevate nel fegato. Sembrano essere correlate in modo indirettamente proporzionale con l'età degli individui.

Uno studio su esemplari di *Zalophus californianus* hanno evidenziato che cuccioli nati prematuri mostravano livelli di Mn più elevati che in altri cuccioli. Anche le madri hanno mostrato un *trend* simile, infatti quelle con valori elevati di Mn nel

fegato sono state quelle che hanno dato alla luce poi cuccioli prematuri (Martin et al., 1976).

Ferro (Fe)

Le massime concentrazioni di ferro registrate in diversi tessuti di vari Pinnipedi sono state nel sangue, fegato, milza e placenta di *Phoca vitulina* (1.137, 600, 150 e 180 mg/kg rispettivamente) e nel rene di un cucciolo di otaria californiana (*Zalophus californianus*) con 466,0 mg/kg (Eisler, 2000).

I livelli epatici di Fe in *Zalophus californianus* sono risultati costantemente più elevati nelle femmine adulte rispetto ai maschi. La concentrazione più elevata è stata registrata nei cuccioli nati prematuramente (Harper et al. , 2007).

Nichel (Ni)

Il nichel è distribuito omogeneamente in tutta la biosfera ed è essenziale per la normale crescita di molte specie di piante e vertebrati animali (WHO, 1991). L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) classifica i composti del nichel nel gruppo 1 (cancerogeni per l'uomo) e il nichel metallico nel Gruppo 2B (possibile cancerogeno per l'uomo). La US Environmental Protection Agency (EPA) classifica inoltre gli ossidi e gli alogenuri di nichel nel gruppo W, cioè, composti aventi ritenzione moderata nei polmoni e una velocità di *clearance* dai polmoni di diverse settimane. Alcuni composti del nichel sono debolmente mutageni, ma la maggior parte delle prove effettuate hanno dato risposte incerte o negative (Eisler, 2000). Gli effetti tossici e cancerogeni dei composti del nichel sono associati a danni ossidativi del DNA e proteine, oltre ad inibizione delle difese antiossidanti cellulari. La proliferazione dei linfociti in cuccioli di foche (*P. vitulina*) è stimolata quando le cellule vengono incubate a 5,0 mg/L per 5 giorni (Kakuschke et al., 2008) .

Piombo (Pb)

Il piombo ha effetti tossici sulla funzionalità e struttura di diversi organi e tessuti, come reni, ossa, SNC, e sistema ematopoietico, producendo alterazioni biochimiche, istopatologiche, neuropsicologiche, fetotossiche, teratogeniche e degli assi ormonali. I siti target di accumulo del piombo non sono certi, in quanto si riscontra sia in tessuti molli che duri, quali le ossa. I livelli nelle ossa influenzano quelli rintracciabili nel plasma, portando a credere che questo tessuto duro

costituisca una fonte interna di esposizione per quegli individui sottoposti ad una maggiore perdita minerale (Ca²⁺) nelle ossa, come le donne in gravidanza ed in allattamento (Hernandez-Avila et al., 1998). La via principale d'escrezione è attraverso la bile. Il trasferimento placentare, studiato in *P. vitulina*, sembra sia minimo (Roberts et al., 1976).

Generalmente nei mammiferi marini si è vista una corrispondenza tra età e livelli di piombo nelle ossa. Il processo di biomagnificazione lungo la catena trofica ha un ruolo fondamentale nel meccanismo di accumulo di Pb.

I livelli riscontrati nei Pinnipedi sono paragonabili a quelli per l'uomo, dato che suggerisce un'omogeneità di esposizione tra habitat terrestri e costieri. In *Zalophus californianus*, il piombo è stato riscontrato ad elevate concentrazioni specialmente in denti ed ossa, minori in grasso e muscolo (Braham, 1973). Lo stesso andamento vale per *Phoca vitulina* (Roberts et al., 1976).

Selenio (Se)

Il Selenio (Se) è un metalloide ed elemento essenziale per le funzionalità di numerosi organismi viventi, tra cui anche i mammiferi. Tuttavia, ad oggi il Se è diventato un potenziale contaminante a causa dell'aumento delle sue concentrazioni in molte aree del mondo, risultante da attività svolte in diversi settori, sia industriali che in agricoltura. La sua tossicità varia da specie a specie. Negli ecosistemi acquatici, il Se inorganico viene rapidamente assimilato dai produttori primari (batteri, funghi, alghe e piante) e trasformato in composti organici, i quali vengono poi trasferiti lungo tutta la catena alimentare. Le concentrazioni di selenio nei tessuti di organismi marini sono molto variabili. Concentrazioni superiori a 100 mg/kg sono state descritte in fegati sia di diversi cetacei, come globicefali (*Globicephala macrorhynchus*), beluga (*Delphinapterus leucas*), stenelle striate (*Stenella coeruleoalba*) e tursiopi (*Tursiops truncatus*), sia in pinnipedi, come foche dagli anelli (*Phoca hispida*), foche comuni (*P. vitulina*), foche grigie (*Halichoerus grypus*) ed otarie della California (*Zalophus californianus*) (Eisler, 2010).

Generalmente le concentrazioni epatiche di selenio sono maggiori in individui adulti, sia nei pinnipedi che nei cetacei, e sembrano essere correlate anche ai livelli di mercurio (Storelli et al., 1998). La correlazione con il Hg può riflettere una relazione causale tra i due elementi all'interno dei tessuti dei mammiferi marini,

nei quali viene formato un composto chiamato tiemmanite (HgSe). Il HgSe è un prodotto finale della demetilazione del mercurio nei tessuti contenenti concentrazioni equimolari di mercurio totale e selenio totale (Wagemann et al., 1998). Sembra che il selenio abbia un effetto protettivo contro l'azione tossica del mercurio.

Livelli elevati di Se sono stati trovati in tessuti (49.0 e 88.0 mg/kg p.f. nel fegato, 42.0 e 47.0 mg/kg p.f. nel rene, 5.1 e 5.2 nel sangue) e dieta (2.5 mg/kg p.f.) di due esemplari di otaria californiana tenuti in cattività e deceduti al termine di uno spettacolo (Alexander et al., 1990).

L'urina è un'importante via di escrezione del selenio nei mammiferi marini. Nelle balenottere minori (*Balaenoptera acutorostrata*) è stato calcolato che le urine contengono fino a 1,5 mg/L, ovvero circa 30 volte di più rispetto a quella umana (Hasunuma et al., 1993).

Zinco (Zn)

Le concentrazioni di zinco nei tessuti dei mammiferi marini di solito sono meno di 210.0 mg/kg p.s. (Eisler , 2000). Nei leoni marini di Steller (*Eumetopias jubata*) l'andamento tissutale descritto è fegato >> pancreas >> rene >> muscolo >> cuore >> milza >> polmone, con ordini paragonabili a quelli nei tessuti umani (Hamanaka et al., 1982). I livelli renali sembrano essere direttamente proporzionali all'aumentare dell'età degli individui in *Z. californianus* (Harper et al., 2007).

Lo zinco è considerato elemento essenziale nei processi fisiologici in ambiente marino. Ha un effetto primario sugli enzimi zinco-dipendenti che regolano RNA e DNA, esercita un effetto protettivo sul fegato dei mammiferi inibendo la perossidazione lipidica e la stabilizzazione delle membrane lisosomiali; aiuta neurotrasmissione nel cervello ed è essenziale per la guarigione di ferite. Il sito principale obiettivo di intossicazione da zinco nei mammiferi è pancreas, seguita poi dal tessuto osseo (Eisler, 2000). È solitamente disponibile ed accumulato in quantità di gran lunga superiore ai reali bisogni immediati dell'organismo, è bene concentrarsi in studi futuri più sull'effetto dato da concentrazioni relativamente basse di zinco nei tessuti dei mammiferi marini.

La carenza di zinco si è mostrata essere teratogena nei mammiferi. Sono state riportate in letteratura malformazioni fetali e scheletriche, forse dovute ad una

riduzione della proliferazione cellulare ed dell'attività della fosfatasi alcalina ossea. Non sono disponibili dati specifici sulla carenza di zinco in mammiferi marini, tuttavia, ma una buona conoscenza dell'argomento è stata sviluppata per esseri umani, animali da laboratorio e bestiame, dimostrando in tutti i casi effetti negativi sulla crescita, la riproduzione, la sopravvivenza, il metabolismo ed il benessere generale dell'organismo (Eisler, 2000).

Il *range* omeostatico calcolato nel fegato di focene (*P. phocoena*) è 20,0-100,0 mg/kg FW (Wood e Van Vleet , 1996). Tuttavia, molto spesso le concentrazioni di zinco in diverse specie di mammiferi marini superano i 100,0 mg/kg FW senza danno apparente all'animale.

Cadmio (Cd)

Le concentrazioni di cadmio più elevate solitamente si riscontrano in rene >> fegato >> muscolo. Alti livelli di Cd sono stati più volte associati a diete composte essenzialmente da cefalopodi. Concentrazioni nel *range* di 50-200 mg/kg d.w. nella corteccia renale di *Phoca hispida* della Groenlandia sono stati osservati indurre cambiamenti di natura istopatologica, quali glomerulonefrite (Sonne-Hansen et al., 2002).

Nei mammiferi marini, il cadmio è sempre presente in tutti i campioni di fegato e rene. Le concentrazioni in fegati di beluga (*Delphinapterus leucas*) sono stati positivamente correlate con l'età mentre in foche dagli anelli (*P. hispida*) con la lunghezza. In *Globicephala melas*, ed anche altri mammiferi marini, sono state riscontrate alte concentrazioni di cadmio negli organi fegato e rene, dato attribuito soprattutto all'elevato contenuto del metallo nei calamari, importante elemento della dieta di questa specie di cetacei (Bustamante et al., 1998; Caurant e Amiard-Triquet , 1995). Similmente, livelli elevati di cadmio in trichechi (*Odobenus rosmarus divergens*) sono stati correlati ad elevate concentrazioni dello stesso nelle vongole (*Mya sp .*) di cui si nutrono (Miles e Colline, 1994).

La proliferazione dei linfociti in cuccioli di foche è stata vista inibirsi durante l'esposizione a 6,2 mg Cd /L per 5 giorni (Kakuschke et al.,2008).

Mercurio (Hg)

Generalmente le concentrazioni di mercurio in mammiferi marini si distribuiscono nell'organismo come fegato >> muscolo > grasso. Il mercurio, ed in particolar modo il metilmercurio, aumenta nel fegato con l'aumentare dell'età dell'organismo. Questa correlazione è attribuita ad una diminuzione della velocità di eliminazione del metilmercurio all'aumentare dell'età, dell'efficienza di demetilazione decrescente con l'età o dell'aumento dell'assorbimento di metilmercurio negli anni (Wagemann et al., 1998).

I meccanismi per l'analisi del accumulo di mercurio nei pinnipedi sono simili a quelli riportati da Itano et al. (1984) per la stenella striata (*S. coeruleoalba*), i quali hanno dimostrato che le concentrazioni tissutali di Hg in stenelle aumentano con l'aumentare dell'età dell'animale, raggiungendo un plateau in 20-25 anni, con presente la forma metilata già nelle fasi fetali e in lattazione, indicando un trasferimento placentare e col latte, ma la percentuale di metilmercurio tende a diminuire nel tempo, senza incremento assoluto dopo 10 anni. Tutti gli stadi di sviluppo sono in grado di eliminare il metallo, forma organica metilata inclusa, rallentando le rate nelle forme più adulte (presentando conseguente accumuli più elevati). Sono state correlate fortemente le concentrazioni di mercurio con quelle di selenio in tutte le età. È probabile che mercurio inorganico e selenio vengano complessati in rapporto molare 1:1 in una forma biologicamente disponibile per i mammiferi marini, chiamata tiemmanite, diminuendo il rischio di tossicosi da mercurio (Eisler, 1984, 2006; Nielsen et Dietz, 1990; Das et al., 2002).

Il rapporto Hg:Se è stato riscontrato pari o vicino a valori di 1,0 in adulti di quattro specie di foche, a condizione che le concentrazioni di mercurio tessuti fossero superiori a 15 mg/kg p.f. (Skaare et al., 1994).

Una forte correlazione riscontrata tra livelli di cadmio, mercurio e zinco nel rene di diversi mammiferi marini suggerisce la presenza di un processo di disintossicazione che coinvolge una proteina chiamata metallotioneina.

Diverse variabili modificano l'assorbimento e la ritenzione di mercurio nei mammiferi marini. Queste includono la dieta, l'età, il sesso, lo stato di salute, la vicinanza alle aree urbane, i residui di selenio nell'organismo e le migrazioni effettuate dagli animali in luoghi ad elevata attività tettonica.

La dieta è un importante meccanismo di accumulo nelle foche . Foche grigie (*Halichoerus grypus*), foche dal cappuccio (*Cystophora cristata*) e foche comuni (*Phoca vitulina*), le quali si nutrono di grandi pesci e cefalopodi, contengono fino a 10 volte più mercurio nei loro tessuti rispetto alle foche della Groenlandia (*Pagophilus groenlandicus*), che si nutrono invece di piccoli pesci pelagici e crostacei (Sergent et Armstrong, 1973).

Lo studio di Kakuschke et al. (2008) sulla proliferazione di linfociti in cuccioli di *Phoca vitulina* ha evidenziato una inibizione significativa delle cellule immunitarie durante l'esposizione per 5 giorni a 0,5 mg Hg/L.

Idrocarburi policiclici aromatici

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono contaminanti organici presenti diffusamente nell'ambiente, considerati come una unica classe di POPs (*Persistent Organic Pollutants*). Si formano per combustione incompleta di materiali organici, in particolare legno e combustibili fossili. Derivano sia da fonti naturali, come incendi di foreste ed eventi vulcanici, ma in particolar modo gli IPA derivano da attività antropogeniche, quali la combustione di carbone, prodotti petroliferi, gas, legno, tabacco, rifiuti e altre sostanze organiche. Studi condotti sulla natura di queste sostanze hanno determinato che è possibile evidenziarne la provenienza. Le distribuzioni di IPA dominate dai costituenti alchilici sono rappresentative di fonti di petrolio infatti, mentre quelli non alchilici da sorgenti di natura pirogenica (Sporstol et al. 1983).

Le molecole degli IPA sono costituite da tre o più anelli benzenici, alcune costituite solo da idrogeno e carbonio, altre contengono anche atomi di altra natura come l'azoto e lo zolfo. Alla famiglia degli IPA appartengono alcune centinaia di composti molto eterogenei tra loro. Il benzo(a)pirene (BaP), un particolare composto a cinque anelli, è considerato un buon indicatore dell'inquinamento ambientale dell'intero gruppo degli IPA perché è usuale riscontrarlo nell'ambiente a concentrazioni significative ed è dotato della più elevata tossicità.

Ad oggi, la US Environmental Protection Agency (EPA, 1987) ha individuato tra le tante molecole 16 congeneri di importanza primaria per la salute umana e per gli organismi acquatici, sia mammiferi che non. Le sostanze più tossiche sono le molecole aventi dai quattro a sette anelli benzenici. La figura 2.1. riporta i 16 IPA elencati dall'USEPA, composti caratterizzati da 2-6 anelli fusi, con pesi molecolari (MWS) compresi nel *range* di 128-278 g/mol. La loro solubilità (S) e pressione di vapore (Vp) sono i principali fattori fisici/chimici che ne controllano la distribuzione tra i componenti solubili e le particelle dell'atmosfera, idrosfera e biosfera.

Le fonti che dall'ambiente terrestre traferiscono questi contaminanti direttamente nell'ambiente marino si indentificano in emissioni fluviali ed impianti delle acque reflue urbane ed industriali. Nelle coste del Mar

Mediterraneo orientale, alte concentrazioni di IPA (fino a 625 mg/L) sono state segnalate essere associate al trasporto di petrolio ed operazioni di raffineria per gli effluenti (Yilmaz et al. 1998).

Composto	Sigla	Struttura (# di anelli)	Formula molecolare	Peso molecolare (g/mol)	Solubilità (mg/L)	Punto di fusione (°C)	Punto di ebollizione (°C)	Tensione di vapore (Pa) a 25°C	Coeff. partiz. Ottanolo/H ₂ O (log K _{ow})	Cancerogenicità IARC (2008)	Cancerogenicità NTP (2006)	Cancerogenicità IPCS (1998)	Cancerogenicità NRCC (1983)
Naftalene (S)	Naph	2	C ₁₀ H ₈	128,17	31	81	217,9	10,4	3,40	n.v.		(?)	0
Acenaftene (S)	Ace	3	C ₁₂ H ₆	154,21	3,8	95	279	2,9×10 ⁻¹	3,92	3		(?)	0
Fluorene (S)	Fl	3	C ₁₂ H ₁₀	166,22	1,9	115-116	295	8,0×10 ⁻²	4,18	3		-	0
Fenantrene (S)	Phen	3	C ₁₄ H ₁₀	178,23	1,1	100,5	340	1,6×10 ⁻²	4,60	3		(?)	0
Antracene (S)	Ant	3	C ₁₄ H ₁₀	178,23	0,045	216,4	342	8,0×10 ⁻⁴	4,50	3		-	0
Fluorantene (C)	Flt	4	C ₁₆ H ₁₀	202,26	0,26	108,8	375	1,2×10 ⁻³	5,22	3		+	0
Pinene (C)	Pyr	4	C ₁₆ H ₁₀	202,26	0,132	150,4	393	6,0×10 ⁻⁴	5,18	3		(?)	0
Benzo(a)antracene (C)	B[a]A	4	C ₁₈ H ₁₂	228,29	0,011	160,7	400	2,8×10 ⁻⁵	5,61	2B	Si	+	+
Crizene (C)	Chry	4	C ₁₈ H ₁₂	228,29	0,0015	253,8	448	8,4×10 ⁻⁵ (20°C)	5,91	2B	Si	+	±
Benzo(b)fluorantene (C)	B[b]F	5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	0,0015	168,3	481	6,7×10 ⁻⁵ (20°C)	6,12	2B	Si	+	++
Benzo(k)fluorantene (C)	B[k]F	5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	0,0008	215,7	480	1,3×10 ⁻⁵ (20°C)	6,84	2B	Si	+	0
Benzo(a)pirene (C)	B[a]P	5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	0,0038	178,1	496	7,3×10 ⁻⁷	6,50	1	Si	+	+++
Dibenzo(a,h)antracene (C)	D[ah]A	6	C ₂₂ H ₁₄	278,35	0,0005	266,6	524	5,3×10 ⁻⁵ (20°C)	6,50	2A	Si	+	+++
Benzo(g,h,i)perilene (C)	B[ghi]Per	6	C ₂₂ H ₁₂	276,34	0,00026	278,3	545	1,4×10 ⁻⁵	7,10	3		(?)	0
Indeno(1,2,3-cd)pirene (C)	I[1,2,3-cd]P	6	C ₂₂ H ₁₂	276,34	0,062	163,6	536	1,3×10 ⁻⁵ (20°C)	6,58	2B	Si	+	+

1 cancerogeno dimostrato
2A probabile carcinogenicità
2B possibile carcinogenicità
3 assenza di prove di carcinogenicità.
n.v. non valutato

+ positivo
- negativo
? incerto
() prove insufficienti

0 non cancerogenico
± carcinogenicità incerta
+ cancerogenico

Figure 2.1. Lista dei 16 composti IPA con indicata l'origine (S-petrogenica e C-pirogenica), l'abbreviazione, la struttura, la formula, il peso molecolare e le principali caratteristiche chimico-fisiche, oltre che la cancerogenicità.

Generalmente, le concentrazioni negli impianti di trattamento di acque reflue urbane (rifiuti domestici) sono inferiori (5 mg/L).

Nei mari, le concentrazioni di IPA totali sono molto variabili, con *range* che vanno dal non rilevabile a 11 mg/L. La distribuzione è infatti controllata dalla solubilità e idrofobicità dei diversi IPA. Di norma, la frazione legata a particolato è dominata dalle molecole con 4, 5 e 6 anelli benzenici, mentre le fasi disciolte tendono ad essere dominate da specie con 2 o 3 anelli. In ambiente acquatico quindi avviene una ripartizione degli IPA, tra frazioni disciolte e legate al particolato, a seconda della solubilità delle singole molecole e la disponibilità dei substrati vincolanti, quali le particelle in sospensione. Analisi condotte in campioni di acqua di mare provenienti da USA, Regno Unito e Cina, hanno evidenziato elevati livelli di naftalene negli ultimi due luoghi, mentre i dati americani mostrano livelli molto più bassi del congenere. Questo perché per i campioni americani si è utilizzato solo la frazione di particolato di acqua, nella quale il naftalene non è previsto essere presente in grande quantità, considerando la sua elevata solubilità in acqua. Lo studio (Latimer e Zheng, 2003) ha concluso quindi che i congeneri con elevato peso molecolare sono quelli fortemente associati con il particolato. Anche la natura dei sedimenti stessi risulta un importante fattore di variabilità nelle concentrazioni di IPA nell'ambiente marino.

In generale, in ambiente marino è stato riscontrato un gradiente in cui le concentrazioni *off-shore* sono più basse, seguite da quelle in fascia costiera (*inshore*) ed infine dal microstrato marino superficiale (*sea surface microlayer* o SSM).

Detto ciò, è importante però capire quant'è la frazione che diventa biodisponibile agli organismi acquatici per poterne definire un livello di tossicità dei contaminanti in questione. La biodisponibilità viene estrapolata utilizzando l'approccio dell'equilibrio di ripartizione (EPA 2000). In linea di massima, la sedimentazione rappresenta il processo primario di rimozione di IPA dalla colonna d'acqua, la quale avviene mediante adsorbimento da vari tipi di particelle. Una volta nei sedimenti, le particelle associate alle molecole IPA vengono mescolate in tutto il sedimento superficiale da processi fisici e biologici (ad esempio sospensione delle maree e bioturbazione). Alcuni congeneri (con basso peso molecolare) vengono microbiologicamente

degradati, specialmente nella zona aerobica. Altri (con alto peso molecolare) invece finiscono per sciogliersi nuovamente nella colonna d'acqua sovrastante o in acque interstiziali. Le differenze fondamentali di fonte (piro- o petrogenico) e persistenza degli idrocarburi influiscono in modo significativo con la loro biodisponibilità. Come risultato della biotrasformazione delle molecole IPA, in alcuni vertebrati e invertebrati, il trasferimento lungo catena alimentare e la conseguente biomagnificazione non sembrano esistere né in ambienti acquatici né terrestri, anche se alcuni consumatori primari e predatori detritivori possono incorrere all'accumulo di elevati livelli di IPA. Un confronto quantitativo dei livelli di IPA mostra che le massime concentrazioni si riscontrano in piante acquatiche, oligocheti e isopodi. Il processo che vede un decremento in concentrazioni al crescere del livello trofico viene definito *biominification* (Campbell et al. 1988). È chiaro che i congeneri che si riscontrano negli organismi superiori sono quelli a quattro o più anelli di benzene, più resistenti alla degradazione microbica e quindi con più probabilità di stabilirsi in sedimenti e ingeriti dai macroinvertebrati e vertebrati.

Le informazioni sulle concentrazioni tissutali nei mammiferi marini (Figura 2.2.), di interesse per questa tesi, sono paragonabili a quelle riportate per pesci. Sulla base degli studi pubblicati per tutti vertebrati marini, compresi i pesci, le concentrazioni di IPA totali possono raggiungere concentrazioni pari a 1-4 mg/kg di peso fresco (w.w.) nel fegato, rene, cervello, o tessuto muscolare

La principale preoccupazione in merito all'esposizione agli idrocarburi policiclici aromatici è la potenziale reattività di alcuni metaboliti nel causare danni al DNA, RNA, e proteine cellulari. Anche se alcuni IPA sono stati ben studiati in laboratorio e su animali domestici, gli effetti di un'esposizione acuta o cronica a singole molecole IPA, o a miscele degli stessi, non sono noti per né mammiferi marini *wild* né per rettili, e solo parzialmente lo sono negli uccelli. Inoltre, in natura ci si trova davanti ad uno scenario in cui si ha a che fare con l'insieme di diverse classi di contaminanti, tra cui IPA, idrocarburi alogenati e contaminanti metallici, le quali possono comportare fenomeni di sinergismo o antagonismo, rendendo così difficile identificare per i ricercatori risposte biologiche causate dai singoli IPA.

Species	PAH Occurrence	Location	Species	PAH Occurrence	Location
Chronic exposure			Harbor seal	Liver (15); >3 PAHs; range = nd–<30 ng/g ww Blubber (15); >3 PAHs; nd–<30 ng/g	USA (New York, Massachusetts)
Sperm whale (<i>Physeter catodon</i>)	Blubber (4); 15 PAHs; μ = 99 ng/g (ppb) dw ^a	Belgium	Harbor porpoise	Muscle (26); 9 PAHs; μ range = 0.6–8.6 ng/g ww; μ total PAHs = 32.4 mg/g	UK
Beluga whale	Liver (1); B[a]P ^b ; 0/1 ^c Kidney (1); B[a]P; 0/1 Blubber (1); B[a]P; 0/1 Lung (1); B[a]P; 0/1	Canada (Gulf of St. Lawrence)	Seal (four spp.) Whale (three spp.) Dolphin (two spp.) Porpoise (one spp.)	Muscle (21); total PAH; range = 1100–1210 ng/g dw chrysene equivalents	Canada (Labrador, Newfoundland)
Beluga whale	Liver (5); 16 PAHs; range = 111–303 ng/g ww Brain (5); 16 PAHs; 49–222 ng/g Muscle (5); 16 PAHs; 70–230 ng/g	Canada (Gulf of St. Lawrence)	Acute exposure		
Beluga whale	Liver (10); PAH adducts; 15/16 Kidney (4); PAH adducts; 4/4 Brain (12); PAH adducts; 9/12	Canada (Arctic)	Harbor seal	Muscle (10); 39 PAHs; μ = 2 ng/g ww Liver (10); 39 PAHs; 6 ng/g Kidney (4); 39 PAHs; nd Brain (11); 39 PAHs; 1 ng/g Blubber (17); 39 PAHs; 191 ng/g	USA (Prince William Sound, Alaska)
Beluga whale	Liver (18); aromatic DNA adducts; 4/4 6/6 8/8	Canada (Gulf of St. Lawrence) (Mackenzie Delta) (East Hudson Bay)	Sea otter	Heart (3); 39 PAHs; nd Lung (3); 39 PAHs; nd Blood (4); 39 PAHs; nd Muscle, liver, kidney, brain, intestine (10); 39 PAHs; μ = 1760 ng/g ww across all tissues	USA (Prince William Sound, Alaska)
Beluga whale	Liver (9); B[a]P DNA adducts; 6/9 Brain (11); DNA adducts; 10/11	Canada (St. Lawrence Estuary)	Sea otter	Liver (18); total PAH; μ = 95 ng/g ww (est.) Lung; total PAH; severe congestion (5); μ = 21 ng/g; mild or moderate congestion (8); μ = 4 ng/g	USA (Prince William Sound, Alaska)
Beluga whale	Liver (4); B[a]P DNA adducts; 0/4 Brain (3); DNA adducts; 3/3	Canada (Mackenzie Estuary) (Gulf of St. Lawrence)	Minke whale	Liver (1); 39 PAHs; 202 ng/g ww Blubber (1); 39 PAHs; 105 ng/g	USA (Prince William Sound, Alaska)
Beluga whale	Brain (3); B[a]P DNA adducts; 3/3	Canada (Gulf of St. Lawrence)	Harbor porpoise	Liver (3); 39 PAHs; μ = 118.3 ng/g ww Blubber (2); 39 PAHs; μ = 297.5 ng/g	USA (Prince William Sound, Alaska)
Harp seal (<i>Pagophilus groenlandicus</i>)	Muscle (10); 16 PAHs; median ^d = nd–4.4 ng/g ww Liver (10); 16 PAHs; nd–4.7 ng/g Kidney (10); 16 PAHs; nd–4.3 ng/g Blubber (10); 16 PAHs; nd–23.5 ng/g	Canada (Labrador)			
Harp seal	Muscle (26); total PAH; range ^d = nd–830 ng/g dw chrysene equivalents	Canada (Labrador, Newfoundland)			

^adw, dry weight, ww, wet weight.
^bB[a]P, benzo[a]pyrene.
^cFrequency of detection.
^dMales and females combined.

Figura 2.2. Concentrazioni IPA riscontrati in diversi mammiferi marini. Immagine tratta dal Cap. 13 "Effects of PAH on Marine Birds, Mammals and Reptiles", Douben P.E.T. (2003). PAHs: An Ecotoxicological Perspective.

Ad oggi, gli sforzi di ricerca per indentificare gli effetti degli IPA sulle popolazioni o comunità di mammiferi marini sono pochi (Martineau et al., 1988; 1994; Hellou et al., 1990; Law & Whinnett, 1992; Marsili et al., 1997; 2001) e la maggior parte di questi sono conseguenti a catastrofi, come nel caso Exxon Valdez con la fuoriuscita di petrolio in Alaska e le indagini sugli effetti nella popolazione residente di beluga (*Delphinapterus leucas*).

Idrocarburi policiclici aromatici nei Pinnipedi

Per poter effettuare un confronto con altri studi effettuati sui contaminanti IPA in pinnipedi, la letteratura offre solamente due casi in cui sono state valutate le concentrazioni di questi contaminanti organici. Il primo è uno studio di Marsili

et al. (1997) in biopsie ed altre matrici di *Otaria flavescens* provenienti dall'Argentina. Le concentrazioni variavano da una media di 2785 ng/g p.s. nella popolazione proveniente dal Mar del Plata a 578 ng/g p.s. nella popolazione di Punta Bermeja.

Il secondo invece è su individui di *P. groenlandica* campionati nel Labrador, regione del Canada Atlantico (Zitko et al., 1998). Comparato allo studio di Marsili et al. (1997), Zitko et al. riportano livelli di Σ IPA dieci volte inferiori ad *O. flavescens*, ad eccezione del congenere naftalene, presente in percentuale maggiore in *Phoca groenlandica*.

Organoclorurati

I composti organoclorurati appartengono ad una classe più ampia di sostanze chimiche chiamate inquinanti organici persistenti (POP). I POPs sono sostanze chimiche che persistono nell'ambiente, bioaccumulabili lungo la catena trofica a causa della loro natura lipofila e idrofoba, e presentano un elevato rischio di provocare effetti negativi per la salute sia dell'uomo che degli altri organismi viventi. Gli Organoclorurati, essendo un gruppo eterogeneo di composti, trovano anche numerose applicazioni sia nell'industria che nell'agricoltura. Tra i composti più importanti e maggiormente oggetto di studio sono i bifenili policlorurati (PCBs), i diclorodifeniltricloroetano-derivati (DDTs), i ciclodieni (dieldrin, endrin, clordano ed eptacloro), le policlorodibenzodiossine (PCDD), i policlorodibenzofurani (PCDF) e gli esaclorocicloesani (HCH). Come con la maggior parte dei composti di origine antropica, gli organoclorurati finiscono negli oceani di tutto il mondo attraverso processi di deposizione atmosferica, il modo principale con cui gli organoclorurati vengono trasportati negli ambienti marini, o di dilavamento dei sedimenti utilizzati per l'agricoltura. Una volta raggiunto l'ambiente acquatico, questi composti vengono facilmente assorbiti attraverso la catena alimentare. Molti sono resistenti alla degradazione metabolica, altamente lipofili e con bassa solubilità in acqua, caratteristiche che consentono una rapida diffusione e concentrazione lungo le catene trofiche marine (Jones e de Voogt, 1999). Negli organismi marini quindi si osservano due processi: la *bioaccumulazione*, cioè l'aumento nel tempo dei livelli di organoclorurati negli organismi rispetto alla concentrazione presente nell'ambiente, e la *bioamplificazione*, ossia le concentrazioni tendono ad aumentare da un livello più basso della catena alimentare ad uno superiore. Fondamentalmente, sono queste caratteristiche che rendono gli organoclorurati potenzialmente problematici per i mammiferi marini, i quali non solo li ingeriscono mentre si nutrono di prede che hanno alti livelli di organoclorurati, ma anche accumulano questi contaminanti nel loro grasso (o *blubber*).

Policlorobifenili (PCB)

I policlorobifenili sono composti in cui si ha la sostituzione, totale o parziale, degli atomi di idrogeno della molecola del bifenile con atomi di cloro (Figura 2.3.). La variazione del numero e della posizione degli atomi di cloro nella molecola forma fino a 209 differenti congeneri dei PCB.

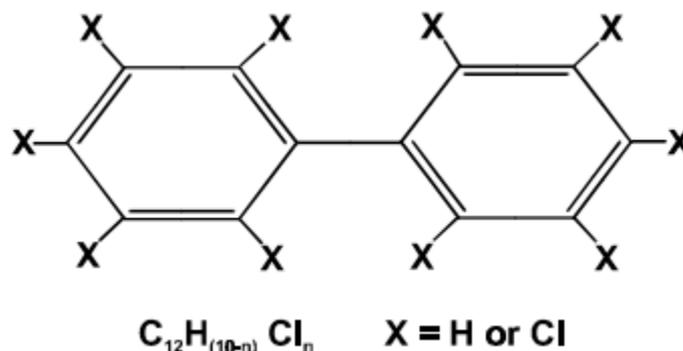


Figura2.3. Struttura molecolare generale di un clorobifenile.

Ad oggi la produzione di queste sostanze, iniziata nei primi anni '90, è stata vietata ed abbandonata, ma considerate le milioni di tonnellate di PCBs prodotte nel passato ed utilizzate largamente su scala mondiale in diversi settori, ancora oggi si possono riscontrare negli organismi viventi, sia marini che terrestri, ad elevate concentrazioni.

Dato che la loro persistenza nell'ambiente aumenta con il grado di clorurazione e a seconda della posizione occupata dagli atomi di cloro all'interno della molecola, i PCBs ad alto grado di sostituzione sono quelli che rappresentano la frazione più abbondante nell'ambiente. I PCBs in cui sono presenti poi atomi di cloro nelle posizioni meta e para, ma non nella posizione orto rispetto al legame C-C, sono caratterizzati dal massimo effetto tossico, dato che gli anelli aromatici componenti queste molecole si trovano sullo stesso piano, da qui il termine PCBs "coplanari", rendendo struttura e proprietà tossicologiche paragonabili a quelle delle diossine (PCBs "diossina simili").

Pesticidi organoclorurati

Il termine generico “pesticidi” indica tutta la categoria di prodotti antiparassitari per uso essenzialmente agricolo, ma anche domestico, mentre con il termine “pesticidi organoclorurati” si intendono correttamente quelle sostanze il cui meccanismo d’azione (prevalentemente a danno del sistema nervoso) sia riferibile a strutture molecolari organiche fortemente clorate. Come per i policlorobifenili, a causa dell’uso spropositato in agricoltura, della stabilità chimica e della scarsa biodegradazione questi composti sono diventati ubiquitari, specialmente in ambiente marino (Aguilar e Borrell, 2005).

Tra i cloroderivati, il più noto degli insetticidi è il DDT (diclorodifeniltricloroetano) con i suoi metaboliti (pp’DDD, op’DDD, pp’DDE, op’DDE). In figura 2.4. sono riportate le strutture molecolari di DDT e metaboliti. Ancora ad oggi il DDT è impiegato in quegli stati in cui la malaria ed il tifo sono ancora largamente presenti mediante irrorazioni mirate per ridurre la diffusione.

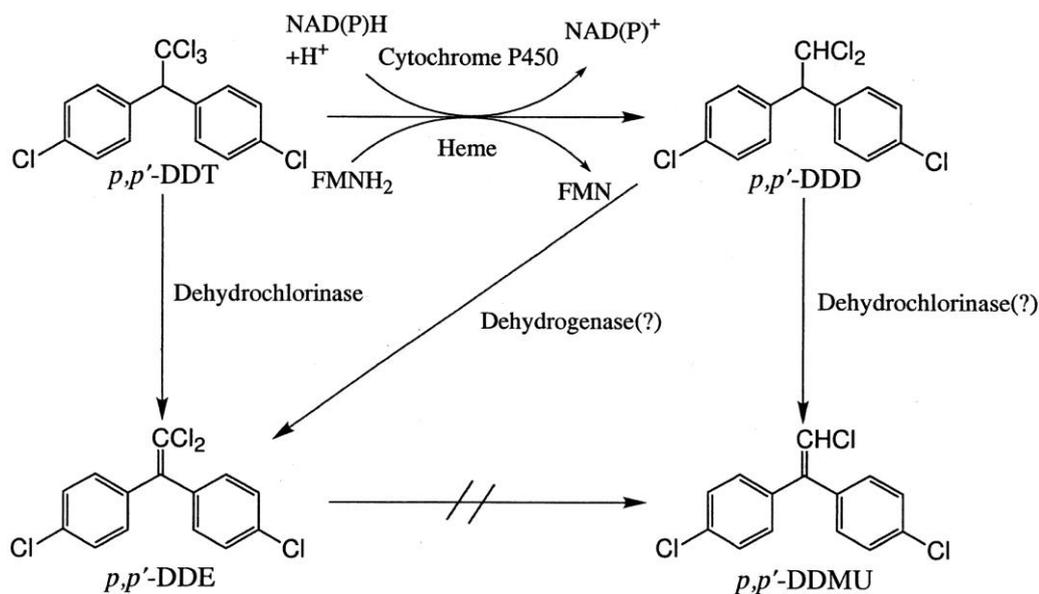


Figura 2.4. Struttura molecolare del *p,p'*-DDT e metaboliti con relativi processi metabolici.

Per quanto riguarda i mammiferi marini, la letteratura offre alcuni studi in merito alla pressione che alcuni organoclorurati provocano su questi organismi. O'Shea et al. (1999) riassunse alcuni dei più importanti effetti negativi investigati in cetacei e pinnipedi, sia di tipo letale sia sub-letale, quali problemi

riproduttivi, difetti di nascita, cancro, cambiamenti comportamentali, complicazioni a livello del sistema immunitario e nervoso ed alterazione ormonale. Ad oggi, gli organoclorurati sono stati trovati e studiati in diverse specie di mammiferi marini, tra le quali almeno 23 specie di pinnipedi, 44 odontoceti, 11 mysticeti, lontre marine, sirenidi e orsi polari (O'Shea , 1999).

Età, sesso e stato riproduttivo giocano un ruolo importante nel determinare la concentrazione di residui organoclorurati nel blubber dei mammiferi marini (O'Shea, 1999). Subadulti maschi e femmine non presentano solitamente livelli di organoclorurati diversi in modo significativo nel loro grasso, ma nel corso del tempo si riscontra un aumento di tali concentrazioni nei maschi e una diminuzione nelle femmine. Questo fatto è attribuito ad un trasferimento di contaminanti lipofilici dalle madri ai loro cuccioli durante la gestazione e l'allattamento (O'Shea, 1999). Oltre a questi tre fondamentali fattori, giocano un ruolo nel diverso accumulo nell'organismo delle varie specie di mammiferi marini anche la variazione spaziale, ecologica (specialmente le diverse diete) e temporale. Le specie che abitano le zone costiere e le acque costiere in prossimità di aree industriali o agricole tendono a presentare livelli maggiori di organoclorurati rispetto alle specie pelagiche. In merito alla dieta invece, le specie che si trovano ai livelli più bassi della catena trofica, come i mysticeti, tendono ad avere residui di organoclorurati inferiori agli odontoceti (O'Shea, 1999).

Organoclorurati nei pinnipedi

In letteratura esistono numerosi studi di tipo descrittivo riportanti i livelli di organoclorurati in varie specie di pinnipedi. Pochi invece sono quelli che analizzano gli effetti negativi in questi mammiferi marini associandoli a diverse esposizioni di contaminanti (Reijnders, 1986; Helle et al., 1976,1980; Bergman e Olsson, 1985; DeLong et al., 1973; Brouwer et al., 1989; Stede e Stede, 1990; Bergman et al., 1992; Mortensen et al., 1992; Kakuschke et al., 2010).

Tra questi, sono stati riportati casi di: disordini nel ciclo riproduttivo, come sterilità in foca grigia e comune dovuta all'esposizione di PCBs, DDTs e loro metaboliti (Bergman e Olsson, 1985) e il fallimento d'impianto dell'ovocita in

foca comune (Reijnders, 1986); disordini ormonali, quali bassi livelli di retinolo (Brouwer et al., 1989), precursore della vitamina A, e di estradiolo (Reijnders, 1986) nel plasma di foca comune esposta a PCBs e relativi metaboliti; ed infine disordini di tipo morfologico, come osteoporosi, esostosi e paradontiti in foca grigia e comune del Mar Baltico esposte a PCBs, DDTs e metaboliti (Stede e Stede, 1900; Mortensen et al., 1992). Inoltre test condotti in cattività su *Phoca vitulina* (Ross et al., 1995, 1996a, 1996b; De Swart et al., 1994; Kakuschke et al., 2010) hanno evidenziato effetti negativi provocati dall'esposizione ad organoclorurati anche a carico del sistema immunitario, con calo dell'attività delle cellule natural killer (NK) e della proliferazione linfocitaria.

La serie di effetti negativi sopradescritta mostra l'evidente pressione data dall'esposizione di questi contaminanti di sintesi alla quale le popolazioni di focidi e otaridi sono soggette.

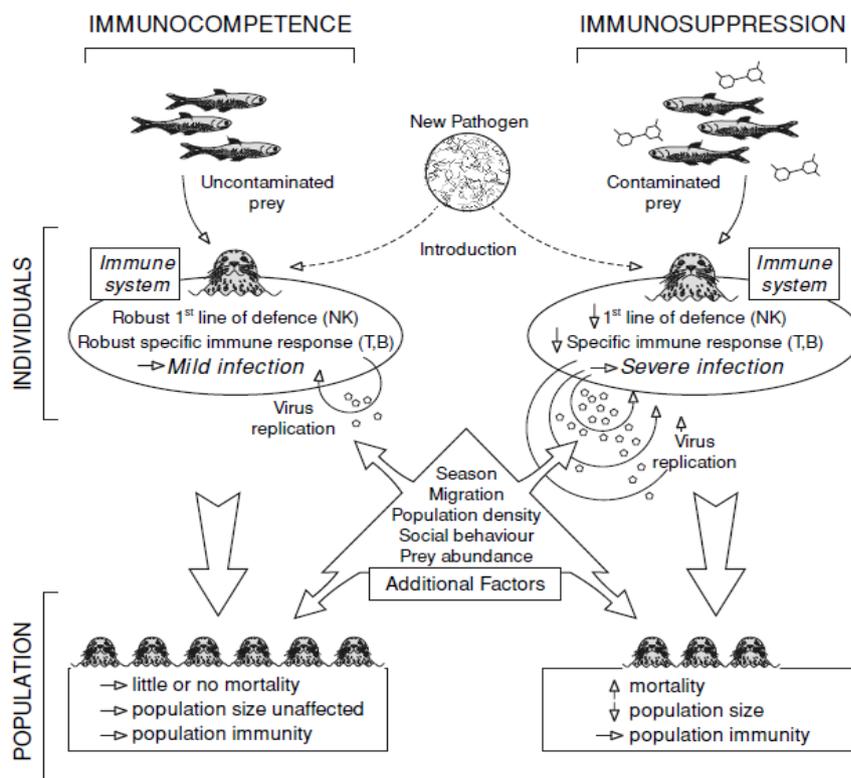


Figura 2.5. Schema adattato da Ross (2002) sull'effetto immunotossico di organoclorurati in *Phoca vitulina*.

Capitolo 3

Materiali e Metodi



©ΜΟm/Β. Παράβας

Dal MOm/ The Hellenic Society for the Study and Protection of the Monk seal sono stati messi a disposizione i campioni di 59 esemplari di foca monaca trovati morti o deceduti dopo il loro ingresso nei centri di recupero predisposti durante l'arco di tempo 1994-2013. Gli esemplari provengono da località differenti. I campioni sono relativi ad ambedue i sessi ed a diverse classi di età: cuccioli in allattamento, cuccioli svezzati, sub-adulti ed adulti. La difficoltà di distinzione tra cuccioli svezzati (*weaner*) e sub-adulti, si è deciso di unire le due classi in una unica definita "giovanili".

Da ciascun animale sono stati raccolti in fase autoptica diversi tessuti ed organi, e registrati sesso, età ed area di spiaggiamento. La completezza nella raccolta dei dati e del tessuto è dipesa dallo stato di conservazione degli animali (gli animali non sempre erano in buone condizioni).

La popolazione campionata comprendeva:

- 29 femmine, 28 maschi e 2 non identificati;
- 17 adulti, 16 cuccioli, 24 giovanili e 2 non identificati.

Da questi sono stati ricavati i seguenti campioni:

- 59 di tessuto adiposo;
- 15 di fegato;
- 13 di rene;
- 12 di muscolo;
- 3 di cuore;
- 4 di polmone;
- 6 di milza;
- 14 di pelo;

per un totale di 126 campioni, suddivisi tra le analisi di contaminanti inorganici ed organici.

Per l'analisi dei contaminanti lipoaffini (OCs ed IPA) sono stati utilizzati solamente campioni di grasso, tessuto target di queste sostanze in quanto lipofiliche, mentre per gli elementi in traccia sono state analizzate tutte le matrici a disposizione.

Analisi degli elementi in traccia

Per l'analisi dei metalli si è impiegato il Metodo EPA 3052 modificato. I campioni di tessuto od organo in analisi sono stati pesati, utilizzando una quantità pari a 0.5 g circa di ogni matrice a disposizione, e successivamente mineralizzati utilizzando un Milestone ETHOS 1 - Closed Vessel Microwave Digestion System. Questo strumento viene utilizzato per la digestione acida, che permette di ottenere un campione liquido ed omogeneo. Per l'acidificazione vengono aggiunti 3 ml di acido nitrico ad ogni campione. Il programma utilizzato prevede una durata di 50 minuti in cui, grazie all'elevata pressione, i campioni raggiungono simultaneamente ma in maniera graduale la temperatura finale di 230°C. Una volta ottenuto un liquido trasparente ed omogeneo, questo viene diluito in acqua distillata deionizzata ad elevato grado di purezza (18mΩ). Lo step successivo prevede la lettura degli analiti soggetto di studio, quali As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Se e Hg, con ICP-OES , ossia spettrometria ottica di emissione con plasma accoppiato induttivamente (PerkinElmer-Optima 2100 DV ICP System). Si tratta di una spettrometria ad emissione in cui, nebulizzando il campione (nebulizzatore ultrasonico U-5000 AT+, CETAC) e trasferendolo in una torcia al plasma d'Argon a 10.000 °C, si ottiene l'emissione di luce da parte degli atomi metallici contenuti nel campione. Ogni metallo ha una o più bande di emissione specifiche la cui intensità dipende dalla concentrazione della specie metallica cercata. Lo spettrometro è quindi utilizzato per riconoscere le sostanze. Lo strumento è collegato direttamente ad un computer che valuta le informazioni riguardanti l'emissione dal campione. Da queste informazioni si ottengono dati relativi sia alla presenza di un metallo che alla quantità di esso all'interno del campione. Il computer fornisce successivamente un grafico, chiamato spettro di emissione, che indica l'abbondanza di ogni ione in funzione dello spettro di emissione, specifico di ogni composto. Sono state scelte le seguenti lunghezze d'onda per una migliore lettura di ogni singolo elemento in studio:

Analita	Lunghezza d'onda (λ)
Hg	194.696
As	193.696
Pb	220.353
Cd	214.440
Cr	267.716
Cu	324.752
Co	238.892
Ni	221.648
Se	196.026
Mn	257.610
Zn	206.200

Per la lettura di Hg_{TOT} è stata incrementata la sensibilità dello strumento ICP-OES utilizzando la metodica degli *idruri* (FIAS-100 system; PerkinElmer, Inc). Questa metodica risulta utile quando si ha a che fare con elementi difficili da analizzare in fiamma, come Hg, As e Se, perché la riduzione allo stato gassoso dei loro composti (ad altro stato di ossidazione) fa risultare la lettura complessa. I composti vengono quindi convertiti per riduzione con sodio boridruro nei corrispondenti idruri volatili, i quali verranno poi regolarmente atomizzati dalla fiamma di Argon in ICP-OES. La miscela utilizzata nello specifico caso era composta da 0,5% di NaBH₄ e 0,05% di NaOH, portata a volume con acqua deionizzata ultrapura.

Analisi degli Idrocarburi Policiclici Aromatici

Ogni campione di blubber è stato suddiviso in due sub-campioni, uno utilizzato per calcolare la percentuale d'acqua all'interno del tessuto e l'altro per l'analisi vera e propria dei contaminanti. Per misurare la percentuale d'acqua, i campioni sono stati pesati e poi posti in stufa per 24h a 105°C. Al termine del trattamento è stato pesato il rimanente secco e sottratto al peso iniziale fresco. La rimanente parte dei campioni è stata confermata a -80°C fino al momento della liofilizzazione. Dopo il passaggio in liofilizzatore, il campione è stato triturato finemente in modo da aumentare la superficie di contatto tra il liquido estraente e il composto da estrarre per migliorare la rapidità e l'efficienza dell'estrazione.

Il processo di estrazione è stato effettuato facendo riferimento alla metodica di Griest e Caton (1983) e Holoubek *et al.* (1990) con alcune modifiche (Marsili *et al.*, 1997). Tale metodica presuppone un processo preliminare di digestione alcalina del campione. Circa 0,75 g di tessuto liofilizzato sono stati estratti per 4 ore in Soxhlet con 100 mL di miscela KOH/metanolo (1:4) ad una temperatura leggermente superiore a quella del punto di ebollizione della miscela. Dopo il raffreddamento, il contenuto dei palloni è stato trasferito in imbuti separatori e saponificati per due volte con 100 mL di cicloesano specifico per i residui. Ogni estrazione liquido/liquido è stata effettuata agitando a mano gli imbuti per 5 minuti, in modo tale da permettere al cicloesano di trattenere al meglio gli IPA. Gli imbuti sono stati lasciati a riposo per circa 30 minuti, fino a quando le due fasi non si sono separate; il sovranatante (composto da cicloesano ed idrocarburi) è stato quindi prelevato con una pipetta e trasferito in un nuovo pallone. Successivamente si è attuata una purificazione tramite cromatografia liquida su colonna, la quale prevedeva che l'estratto, dopo essere stato evaporato e concentrato in Rotavapor a 40°C e risospeso in 10 mL di una miscela acetone-esano (1:1), venisse fatto passare all'interno di una colonna impaccata con Florisil (circa 3 cm) attivato in stufa a 120°C per circa un'ora, al fine di togliere qualunque residuo di acqua e rendere migliore l'impaccamento e la purificazione successiva. L'eluizione della colonna di Florisil è stata effettuata con 100 mL della miscela acetone-esano ed infine il campione è stato portato a secco per mezzo del Rotavapor (40°C), per essere risospeso poi in 0,5 mL di acetonitrile.

Durante il processo di estrazione degli IPA sono state adottate tutte le precauzioni necessarie ai fini di una buona resa dell'esperimento. Per evitare la fotodegradazione degli IPA, le varie operazioni sono state eseguite coprendo completamente la strumentazione (palloni e imbuti separatori) con carta di alluminio.

L'estratto ottenuto è stato analizzato tramite HPLC con detector a fluorescenza. È stata usata una colonna a fase invertita (Supelcosil LC-18, 25 cm x 4,6 mm d.i., 0,5 µm di diametro delle particelle) con un gradiente acetonitrile/acqua. La concentrazione iniziale del gradiente era 60% di acetonitrile e 40% di acqua, e tale è rimasto fino al ventesimo minuto della corsa cromatografica, per poi arrivare al 100% di acetonitrile per 10 minuti, per poi tornare alle condizioni iniziali. Il flusso era di 1,5 mL/min. La quantificazione è stata effettuata usando uno standard esterno a 16 IPA della Supelco (EPA 610).

Analisi degli organoclorurati (OCs)

Nei campioni di adipe sono state effettuate analisi al fine di valutare la presenza e la concentrazione dei composti organoclorurati. Per la valutazione dei livelli di HCB, DDTs e PCBs i campioni sono stati innanzitutto liofilizzati mediante un apparecchio liofilizzatore Edwards. La liofilizzazione per sublimazione richiede un tempo che varia da due a tre giorni in base al tessuto od organo da liofilizzare ed alla sua percentuale di acqua. Alla fase di liofilizzazione segue l'omogeneizzazione: i campioni sono stati tritati finemente mediante forbici e bisturi. Successivamente avviene l'estrazione vera e propria: dei ditali in cellulosa Whatman (d.i. 25 mm; d.e. 27 mm; lunghezza 100 mm) sono stati caricati con il campione (1,0 g di liofilizzato) ed estratti in Soxhlet per 9 ore con 200 mL di n-esano. In seguito è avvenuto un primo clean-up forte con 10 mL di acido solforico "Baker" concentrato al 98% per 24 ore, è stato recuperato il sovrantante, concentrato a 10 mL mediante un evaporatore rotante in depressione (Rotavapor 110) ad una temperatura di 45 °C e, per eliminare ulteriori tracce residue di lipidi, quali colesterolo e steroidi, è stata effettuata una cromatografia liquida su colonna impiccata con Florisil "Merk" (pH di 8,5; granulometria di 0,150-0,250 mm), precedentemente essiccato in stufa ad una temperatura di 120°C per circa un'ora. All'adsorbimento su Florisil sono seguite eluizioni successive di n-esano fino al raggiungimento di un volume finale di 100 mL. In ultimo avviene una seconda concentrazione con evaporatore rotante per portare a secco il campione che verrà poi risospeso con n-esano. Il metodo analitico utilizzato è quello gascromatografico ad alta risoluzione con un GC AGILENT 6890/N, con un rivelatore a cattura di elettroni ^{63}Ni ed una colonna capillare di silice fusa, a fase legata, del tipo SBPTM5 (Supelco) lunga 30 m, con uno spessore del film di 25 μm ed un diametro interno di 0,25 mm. Il carrier era N_2 con una pressione in testa alla colonna di 15,5 psi (rapporto di splittaggio 50/1) e lo scavenger l'argon/metano (95/5) con un flusso di 40 mL/min. L'iniettore PTV viene tenuto chiuso a 50°C fino al momento dell'iniezione, quindi la temperatura viene portata a 250°C aprendo la valvola di splittaggio dopo un minuto. La temperatura del rivelatore è di 380°C; quella del forno parte da 100°C per 10 min, e quindi sale a 250°C con una progressione di 5°C/min. Una miscela di isomeri specifici viene iniettata per calibrare il sistema, valutare il recupero e

confermare i risultati, i quali vengono espressi in ng/g o µg/g peso secco (p.s.). I recuperi sono stati calcolati mediante addizioni di quantità note di standard su replicati omogenei dello stesso campione e variano da un minimo dell'85% ad un massimo del 95%. Il "blank" è stato valutato facendo un'estrazione a vuoto (con il ditale di cellulosa sottoposto alle usuali fasi di estrazioni). Il tracciato gascromatografico ottenuto per ogni campione analizzato viene confrontato con quello ottenuto dallo standard. Lo standard iniettato è preparato con: 50 ng/ml di HCB, 100 ng/ml di DDT (p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDD, o,p'-DDE), 200 ng/ml di o,p'-DDT e 2 µg/ml di Arochlor 1260. Per la valutazione della linearità della risposta strumentale e della sensibilità strumentale lo standard viene iniettato in quantità di 1, 2 e 4 µL. La gascromatografia capillare permette di individuare e di quantificare nei diversi campioni di HCB, o,p'-DDT e p,p'-DDT con i rispettivi metaboliti (p,p'-DDD; o,p'-DDD e p,p'-DDE; o,p'-DDE), e circa 30 congeneri dei PCBs. Il limite di rilevabilità dello strumento è risultato essere 0,1 ng/kg (ppt) per tutti gli OC analizzati.

Capitolo 4

Risultati e discussione



© ΜΟμ/Β. Παράβας

Elementi in traccia

I risultati delle analisi eseguite relativamente ai contaminanti inorganici sono riportati in tabella I come media \pm deviazione standard. I dati ottenuti per singolo esemplare nelle matrici blubber e fegato sono riportati nella sezione Allegati, tabella 2 e 3.

Considerando il ruolo fisiologico nell'organismo dei diversi elementi analizzati, si è ritenuto più opportuno trattare separatamente gli essenziali dai tossici.

1.1. Elementi essenziali

Secondo la distinzione indicata da Casarett *et Doull's* (2008), sono stati analizzati i seguenti elementi: cobalto (Co), rame (Cu), ferro (Fe), manganese (Mn), selenio (Se) e zinco (Zn).

1.1.1. Ferro

Come ci si aspettava, date le sue funzioni biologiche, il ferro risulta essere l'elemento preponderante in tutti i tessuti, con concentrazioni più elevate in fegato (390.40 ± 333.23 mg/kg p.f.), milza (237.19 ± 300.78 mg/kg p.f.) e pelo (195.77 ± 272.36 mg/kg p.f.). nei primi due organi infatti si svolge la sintesi di numerose proteine, quali l'emoglobina e l'emocateresi, mentre nel pelo sono presenti pigmenti che possono contenere ferro (Chyla e Zyrnicki, 2000). Valori più bassi invece sono stati riscontrati nel grasso (19.49 ± 26.82 mg/kg p.f.). Il ferro infatti è un metallo essenziale per l'eritropoiesi ed un componente chiave dell'emoglobina, della neoglobina e degli enzimi dell'eme, delle metalloflavoproteine e mitocondriali.

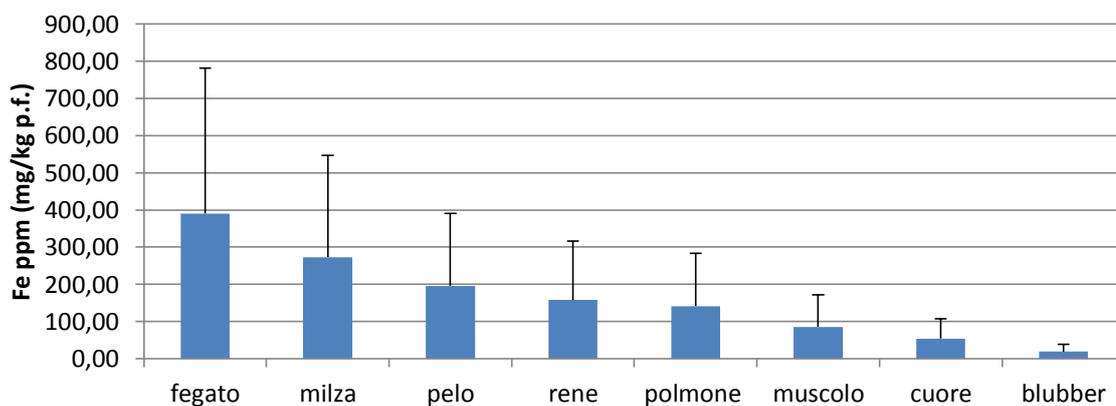


Grafico 4.1. Distribuzione del ferro (Fe) in *M. monachus*

Da un'analisi comparata con le concentrazioni riportate in letteratura, possiamo evidenziare che gli individui campionati di *Monachus monachus* nel presente studio mostrano nel blubber livelli mediamente inferiori rispetto all'unico lavoro sulla stessa specie (Dosi et al., 2000). Analogamente, rispetto ad altre specie di pinnipedi, fegato e muscolo risultano inferiori, mentre il rene rientra nei range riportati per *P. vitulina*, *P. hispida*, *P. caspica*, *P. sibirica*, *H. grypus*, *P. groenlandicus* e *C. cristata* (Frank et al., 1992; Watanabe et al., 2002, 1998; Anan et al., 2002; Julshamn e Grahl-Nielsen, 2000).

Statisticamente, non sono state individuate differenze significative tra le tre macroaree campionate (Nord Egeo, Sud Egeo ed Isole Ioniche) e conseguentemente l'analisi statistica successiva in funzione di sesso, età ed anno di spiaggiamento è stata effettuata sulla totalità dei dati. Nessuna differenza significativa ($p > 0.05$) è risultata né dal confronto maschi/femmine né cuccioli/giovani/adulti. Allo stesso modo, nessuna significatività nel periodo 1994-2013.

matrice	Co	Cr	Cu	Mn	Fe	Ni	Se	Zn	As	Pb	Cd	Hg
blubber	0,02±0,01	0,26±0,51	2,84±3,32	0,44±0,91	19,49±26,82	1,22±2,74	0,34±0,44	4,44±3,13	0,69±0,55	0,23±0,90	0,02±0,01	0,21±0,22
fegato	0,10±0,06	0,77±2,47	27,71±18,15	2,83±0,76	390,40±333,23	3,37±11,03	17,33±32,28	48,27±25,71	0,79±0,60	0,17±0,15	0,87±1,85	4,09±7,36
rene	0,07±0,12	1,15±2,47	13,64±5,99	3,32±9,88	158,10±303,21	3,49±7,03	2,84±2,46	27,09±13,81	0,79±0,59	0,12±0,10	2,46±4,03	1,45±2,28
muscolo	0,03±0,02	0,11±0,10	6,37±5,53	0,45±1,00	86,04±72,64	0,50±0,63	0,80±0,53	28,40±11,24	0,62±0,37	0,06±0,07	0,03±0,02	0,29±0,24
cuore	0,03±0,00	0,05±0,01	8,27±1,47	0,30±0,04	54,08±6,75	0,29±0,13	1,57±1,16	13,95±9,85	0,91±1,02	0,11±0,04	0,03±0,01	1,19±0,87
polmone	0,04±0,03	1,67±2,06	4,15±3,26	0,11±0,02	141,90±58,79	8,69±9,87	0,62±0,30	8,79±2,63	0,29±0,44	0,04±0,02	0,03±0,00	0,11±0,06
milza	0,05±0,05	0,07±0,04	3,79±3,13	0,21±0,13	273,19±300,78	0,25±0,06	5,80±11,24	13,00±2,85	0,50±0,22	0,07±0,07	0,07±0,06	0,51±0,65
pelo	0,42±0,83	47,19±93,55	12,36±26,03	5,55±8,50	195,77±272,36	244,93±503,83	2,35±3,65	79,12±86,16	5,67±14,91	26,89±77,08	0,28±0,53	2,24±3,96

Tabella I. Elementi in traccia in diverse matrici di *Monachus monachus* espressi come valore medio ± deviazione standard.

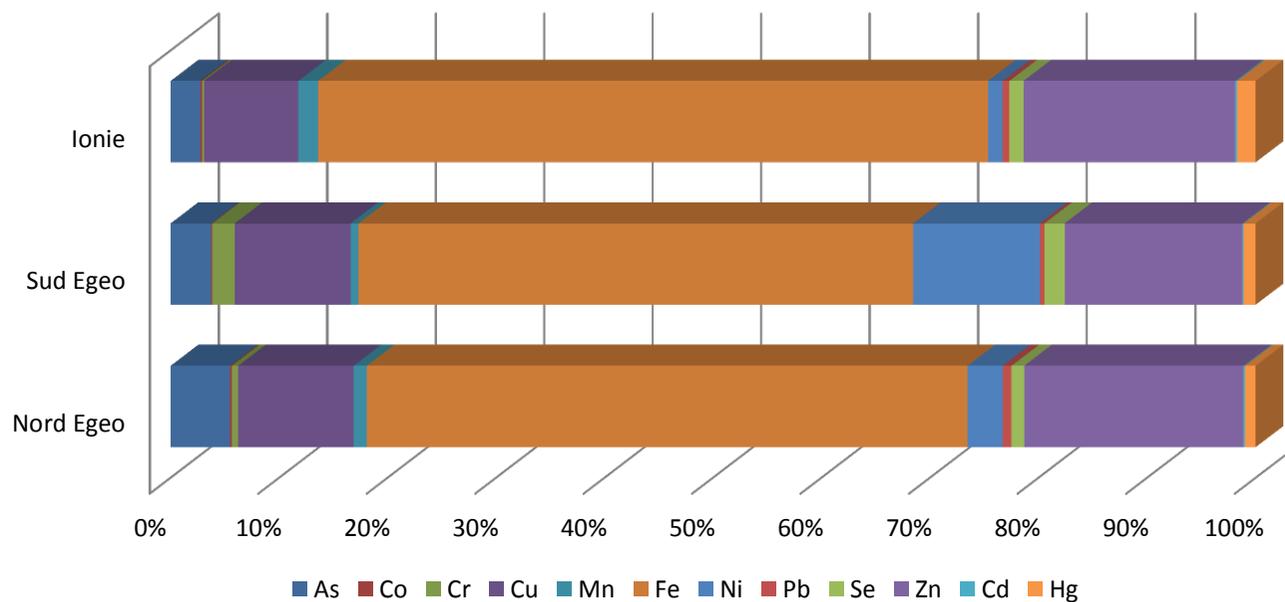


Figura 3.1. Profilo tossicologico di elementi in traccia presenti in blubber di *M. monachus* nelle diverse macroaree della Greci

1.1.2. Zinco

I livelli di zinco risultano preponderanti nel pelo (79.12 ± 86.16 mg/kg p.f.), seguiti dai due organi metabolicamente più attivi nell'organismo, quali fegato (48.27 ± 25.71 mg/kg p.f.) e rene (27.09 ± 13.81 mg/kg p.f.). Lo zinco infatti è un elemento essenziale indispensabile negli organismi viventi in quanto cofattore di numerosi enzimi coinvolti sia nella sintesi che nella degradazione di metaboliti. È inoltre coinvolto nella catalisi e nell'espressione genica di molte proteine ed acidi nucleici, partecipa nei processi di trasporto di molecole nell'organismo ed è fondamentale nelle risposte immunologiche (Beyersmann *et Haase*, 2001).

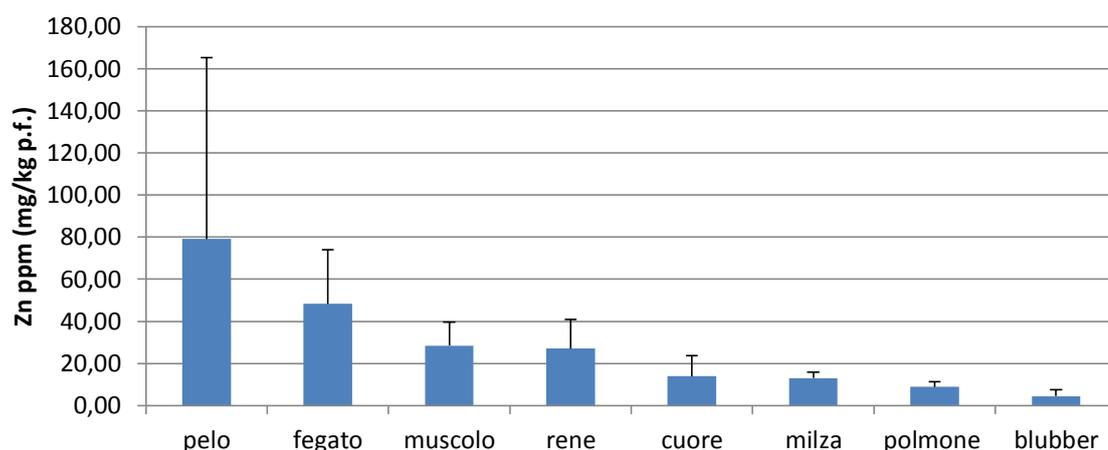


Grafico 4.1. Distribuzione dello zinco (Zn) in *M. monachus*

Paragonati ai dati in Letteratura, i valori riscontrati nei presenti campioni di foca monaca risultano nel *range* riportato per la stessa specie da Dosi *et al.* (2000) per quanto riguarda il blubber e per altri focidi in fegato, rene e muscolo (Frank *et al.*, 1992; Medvedev *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1998, 2002; Anan *et al.*, 2002; Julshamn *et Grahl-Nielsen*, 2000). I livelli di questo elemento in traccia nel pelo invece risultano nettamente inferiori se confrontati con quelli dello studio di Yediler *et al.* (1993) in *Monachus monachus*, ed allo steso tempo anche se paragonati a lavori su foca del Ladoga, foca dagli anelli e foca barbata (Medvedev *et al.*, 1997). Questo dato potrebbe essere giustificato dal colore del pelo, considerando che diversi autori hanno evidenziato livelli maggiori di Mg e Zn in peli di animali color nero rispetto a quelli di color marrone, rosso o biondo (Chyla e Zyrnicki, 2000).

Statisticamente, nessuna differenza è emersa tra sesso, età, area geografica od anno nel blubber. Il risultato però potrebbe essere falsato dal fatto che nessuna particolare funzione è attribuita a questo elemento nel tessuto adiposo. L'analisi sull'organo fegato al contrario ha evidenziato una lieve differenza ($p < 0.10$) tra classi d'età, nello specifico tra individui adulti e giovanili.

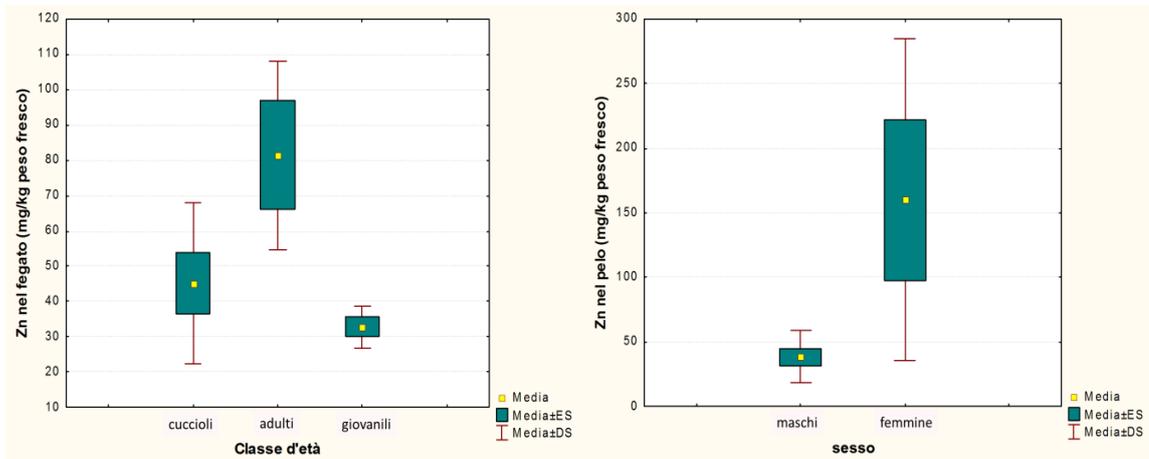


Figura4.2. Differenze tra classi d'età e sesso nei livelli di zinco (Zn) in *M. monachus*

Nel pelo, il confronto tra gruppi ha invece evidenziato una differenza, anche se non statisticamente significativa ($p < 0.10$), tra maschi (38.48 ± 19.89 mg/kg p.f.) e femmine ($159.92 \pm 124,82$ mg/kg p.f.).

1.1.3. Rame

Come per lo zinco, anche il rame si concentra maggiormente nei due organi metabolicamente più attivi, fegato (27.71 ± 18.15 mg/kg p.f.) e rene (13.64 ± 5.99 mg/kg p.f.). Il risultato è facilmente giustificabile data la natura di questo micro-nutriente. Il rame infatti è anch'esso cofattore di numerosi enzimi, come tirosinasi, superossido dismutasi e citocromo C ossidasi, oltre che stimolatore del sistema immunitario e coinvolto nella formazione dei globuli rossi.

I livelli del presente studio risultano più elevati in fegato, rene e muscolo rispetto a valori riportati in altri studi su focidi (Frank et al., 1992; Medvedev et al., 1997; Watanabe et al., 1998,2002; Anan et al., 2002; Malcom et al., 1994; Julshamn et Grahl-Nielsen, 2000).

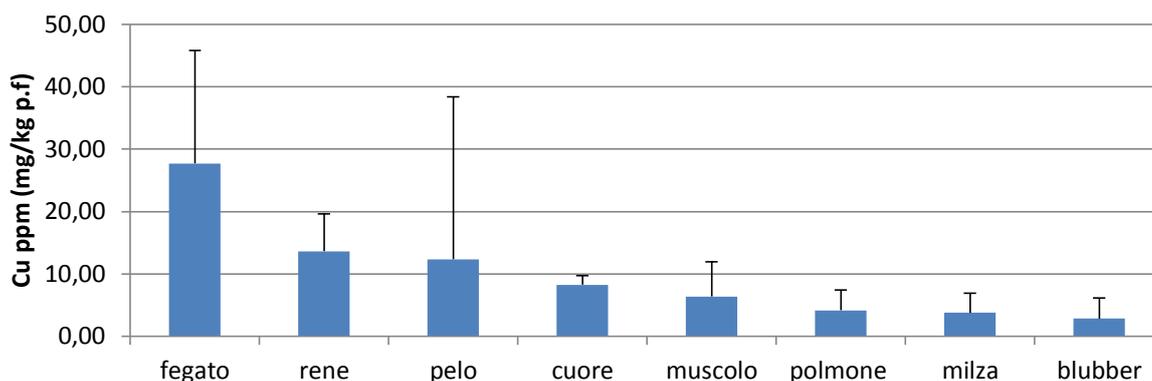


Grafico 4.3. Distribuzione del rame (Cu) in *M. monachus*

Statisticamente, lievi differenze ($p < 0.10$) sono state evidenziate solamente nel rene con il confronto tra classi di età, tra individui giovani e cuccioli. Al contrario di quanto riportato in letteratura per molti vertebrati (Law et al., 1992; Watanabe et al., 1998), sia nel rene che nel fegato, si riscontrano valori inferiori nella classe più giovane, tendendo poi ad uniformarsi nelle due classi d'età più avanzata. Questo andamento è stato descritto anche in *Ursus maritimus*, ma non ne è stato chiarito il motivo (Norheim et al., 1992).

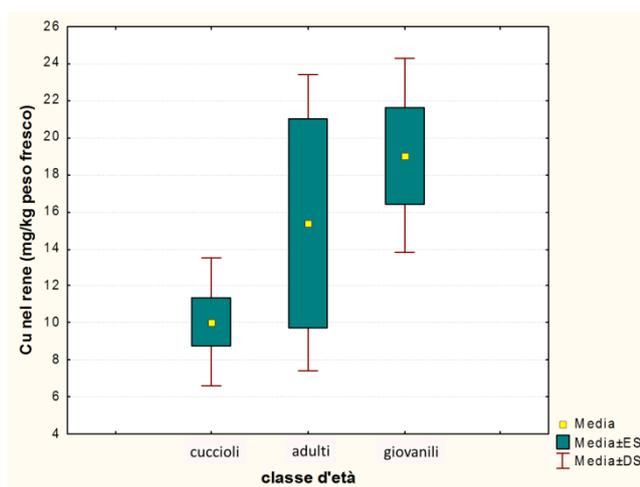


Figura 4.3. Differenze tra classi d'età nei livelli di rame (Cu) in *M. monachus*

1.1.4. Manganese

Il manganese è un metallo il cui ruolo nell'organismo non è ancora ben chiaro, nonostante partecipi alla catalisi di numerosi enzimi ed alla sintesi di DNA e RNA. Rene e fegato risultano anche in questo caso gli organi con le

concentrazioni più elevate, con valori rispettivamente pari a 3.26 ± 9.88 mg/kg p.f. e 2.83 ± 0.76 mg/kg p.f., assieme al pelo (5.55 ± 8.50 mg/kg p.f.). Ad ogni modo, i dati se paragonati ad altri focidi, presentano livelli coerenti ai *range* riportati in altri casi studio. Eccezione è il rene, organo che invece presenta livelli mediamente 3 volte più alti di quelli riportati per *P. vitulina*, *P. caspica*, *P. sibirica* ed *H. grypus* (Frank et al., 1992; Watanabe et al., 1998, 2002; Anan et al., 2002).

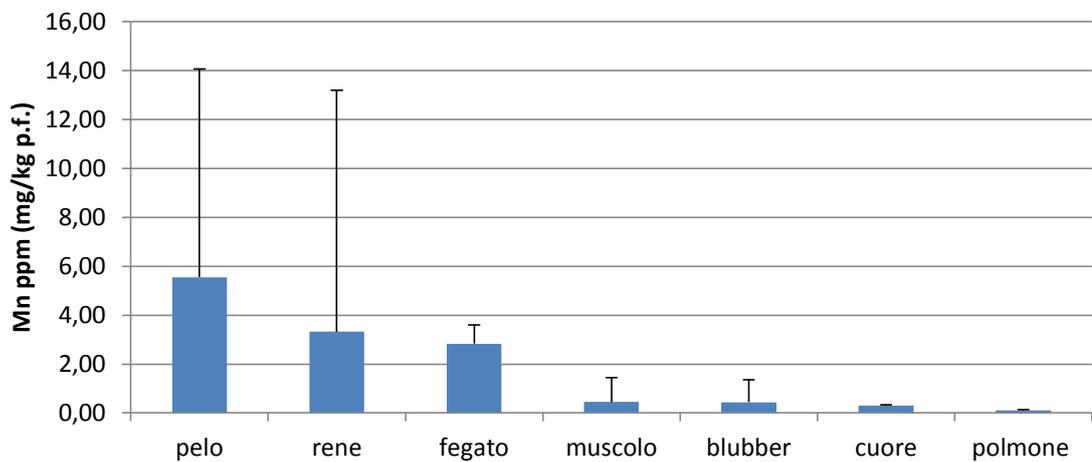


Grafico 4.5. Distribuzione del manganese (Mn) in *M. monachus*

Differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) sono state evidenziate nel rene e nel pelo per classi di età. Generalmente gli adulti mostrano valori nettamente inferiori rispetto ad individui giovani e cuccioli. Nel rene della classe intermedia dei giovanili si riscontra una grande variabilità tra gli individui oltre che mediamente valori più elevati che nelle altre due classi. Nel pelo invece la stessa situazione si presenta però con la classe dei cuccioli, fatto probabilmente legato al caratteristico colore nero della pelliccia di *Monachus monachus*. Novak infatti descrisse in uno studio del 1998 una correlazione tra elevati livelli di Ni, Cd, Co e Mn ed il colore scuro di capelli umani.

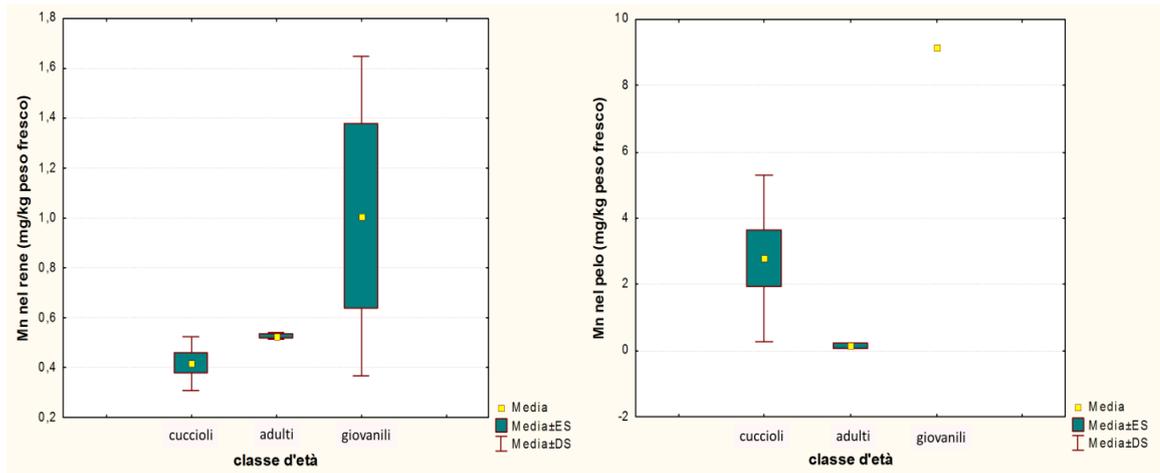


Figura 4.5. Differenze tra classi d'età nei livelli di Mn in *M. monachus*

1.1.5. Cobalto

Dalle analisi effettuate su diversi tessuti ed organi di *Monachus monachus* appare evidente che il cobalto sia distribuito abbastanza uniformemente all'interno dell'organismo. I livelli maggiori risultano essere nel pelo (0.42 ± 0.83 mg/kg p.f.). Non sono molti i dati disponibili in letteratura inerenti alle concentrazioni di cobalto in mammiferi marini e tanto meno nello specifico sui pinnipedi. Le tre matrici principalmente utilizzate negli studi sugli elementi in traccia, quali fegato, rene e muscolo, evidenziano che *M. monachus* presenta livelli mediamente maggiori, ed a livello epatico fino a 10 volte più elevati che in altri focidi (Frank et al., 1992; Watanabe et al., 2002; Anan et al., 2002). Ad ogni modo, test di laboratorio effettuati su cellule linfocitarie *in vitro* di *P. vitulina* non hanno mostrato una proliferazione ad esposizioni di 10.0 mg Co/L per 5 giorni, concentrazione nettamente più alta di qualsiasi altra riscontrata in organi e tessuti di foca monaca.

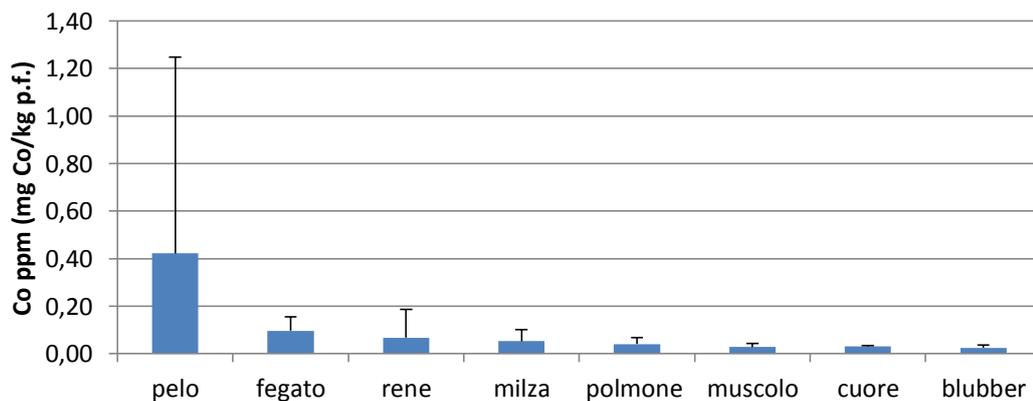


Grafico 4.6. Distribuzione del cobalto (Co) in *M. monachus*

Le analisi statistiche hanno evidenziato differenze significative ($p < 0.05$) nel fegato e nel rene tra classi d'età, con livelli marcatamente superiori negli esemplari più adulti nel primo caso e livelli simili tra adulti e giovanili ma mediamente inferiori nei cuccioli nel secondo caso.

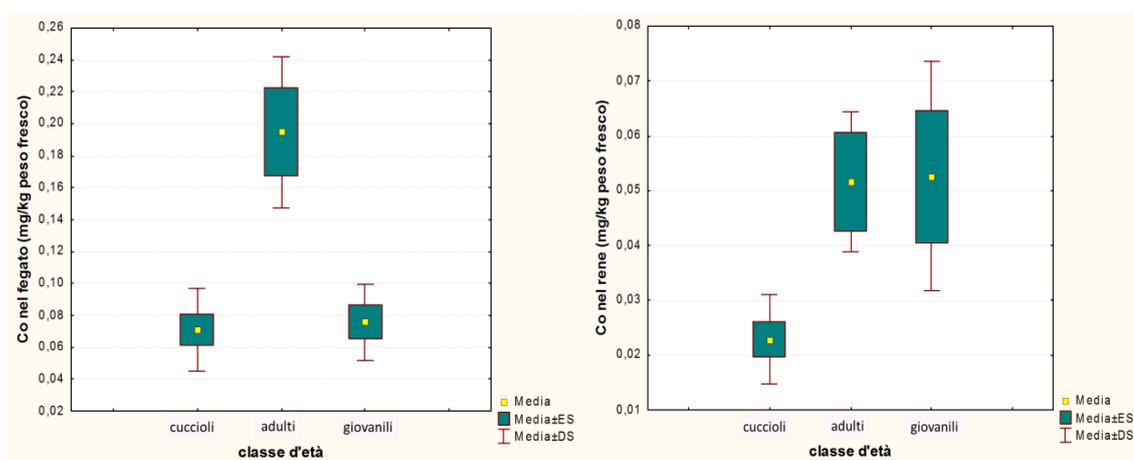


Figura 4.6. Differenze tra classi d'età nei livelli di Co in *M. monachus*

Lievi differenze, anche se non significative ($p < 0.10$) sono emerse anche dall'analisi comparata tra macroaree sulla matrice pelo. Dato il numero inferiore di campioni per il pelo, è stato possibile confrontare solamente Nord e Sud Egeo. È proprio quest'ultimo che mostra i livelli maggiori.

1.1.6. Selenio

Il selenio è un oligonutriente essenziale all'organismo e svolge varie funzioni all'interno dello stesso. Tra le più interessanti c'è l'azione antagonista,

quindi detossificante, al mercurio. Per svolgere questa attività però il Hg deve prima raggiungere certe concentrazioni, le quali variano da specie a specie. Coerentemente alla Letteratura, *Monachus monachus* mostra elevati livelli di selenio nel fegato, organo target di accumulo del metallo, seguito da milza e rene. Nessun dato esiste su questa specie per il selenio, ma i dati riportati in altri focidi sono paragonabili ai presenti per fegato, rene e muscolo (Skaare et al, 1990; Frank et al., 1992; Anan et al., 2002; Nyma et al., 2002; Brunborg et al., 2006; Julshamn et Grahl-Nielsen, 2000).

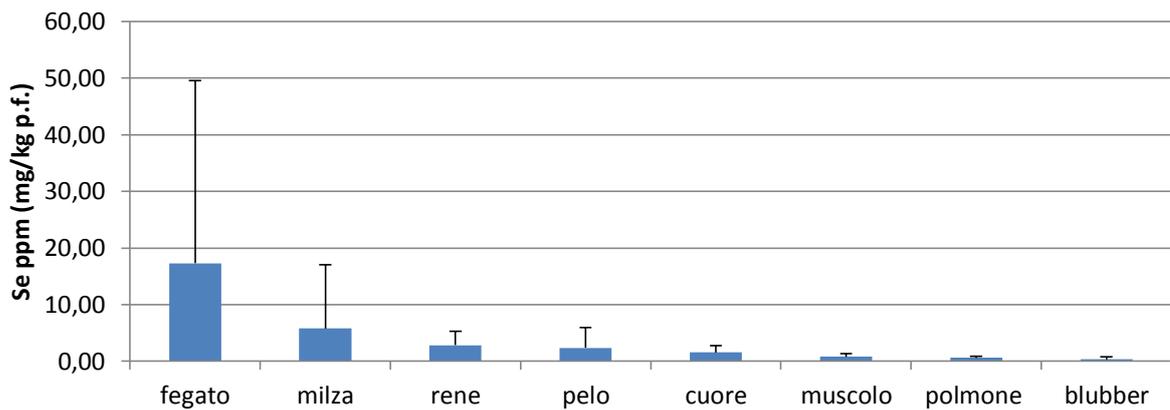


Grafico 4.7. Distribuzione del selenio (Se) in *M. monachus*

Come riportato da diversi autori in altri mammiferi (Lavery et al., 2008; Seixas et al., 2007), le analisi statistiche hanno evidenziato differenze significative nel fegato tra adulti e le altre due classi d'età. Gli adulti infatti mostrano livelli di selenio epatico 20-40 volte più elevati rispettivamente di sub-adulti e cuccioli, delineando una correlazione positiva con l'aumentare dell'età e conseguentemente un fenomeno di accumulo nell'organismo. Anche nel rene si riscontrano le medesime differenze significative ($p < 0.05$) tra le tre classi d'età.

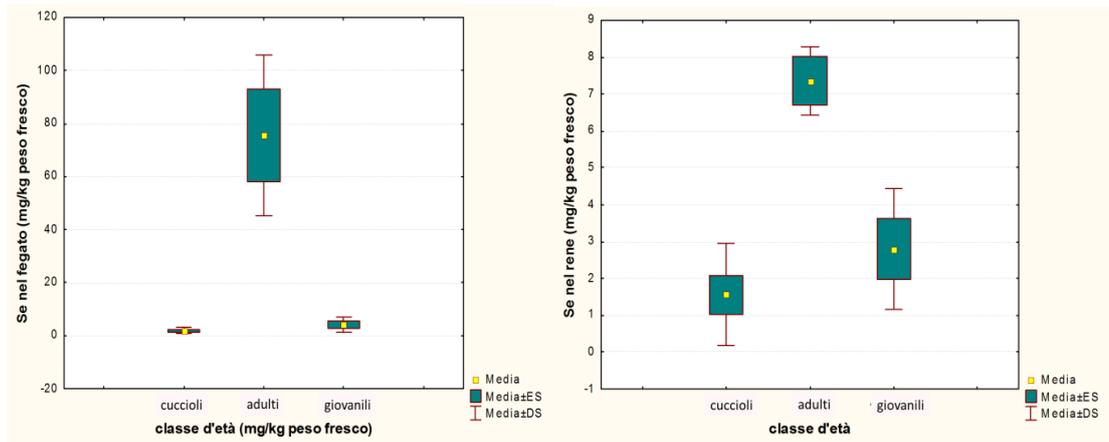


Figura 4.7. Differenze tra classi d'età nei livelli di Se in *M. monachus*

Differenze, seppur non significative ($p < 0.10$), emergono anche dal confronto per macroaree nel rene. Come per il cobalto, è stato possibile confrontare solamente Nord e Sud Egeo. Quest'ultimo, come nel caso precedente, mostra le concentrazioni più alte.

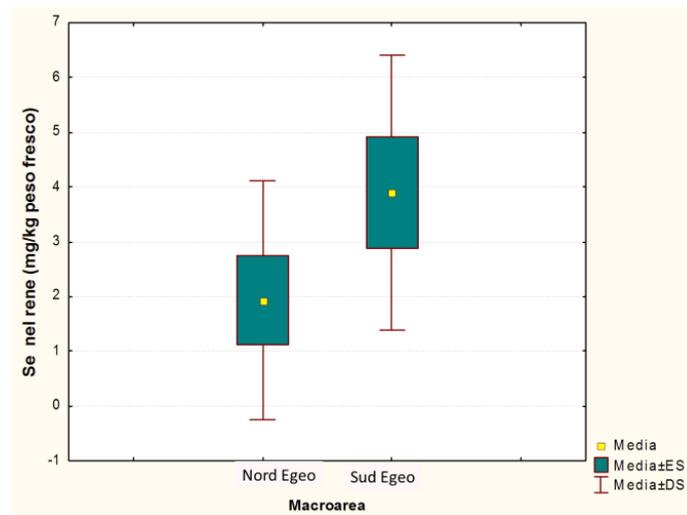


Figura 4.8. Differenze tra sessi nei livelli di Se in *M. monachus*

1.2. Elementi tossici

Seguendo la distinzione indicata da Casarett *et Doull's* (2008), sono stati analizzati i seguenti elementi: cadmio (Cd), arsenico (As), cromo (Cr), piombo (Pb), mercurio (Hg) e nichel (Ni).

1.2.1. Cromo

Non tutte le specie di cromo sono equamente tossiche. Il cromo esavalente è la forma più tossica e può essere assimilata molto più rapidamente del cromo trivalente (Cr III), andandosi ad accumulare soprattutto negli eritrociti e conseguentemente in organi altamente vascolarizzati.

Nella popolazione di foca monaca greca esaminata in questo studio, i livelli di Cr si distribuiscono più o meno omogeneamente in polmone, rene e fegato. Le concentrazioni maggiori sono nel pelo, spaziando in un *range* molto ampio (0,38-335,69 mg/kg p.f.). In generale, i livelli riscontrati in *Monachus monachus* appaiono più elevati di quelli riportati in letteratura per altri focidi, ma non sono tali da eguagliare le concentrazioni descritte da Khuel *et al.* (1994) in cetacei spiaggiati lungo le coste americane nel 1987-1988.

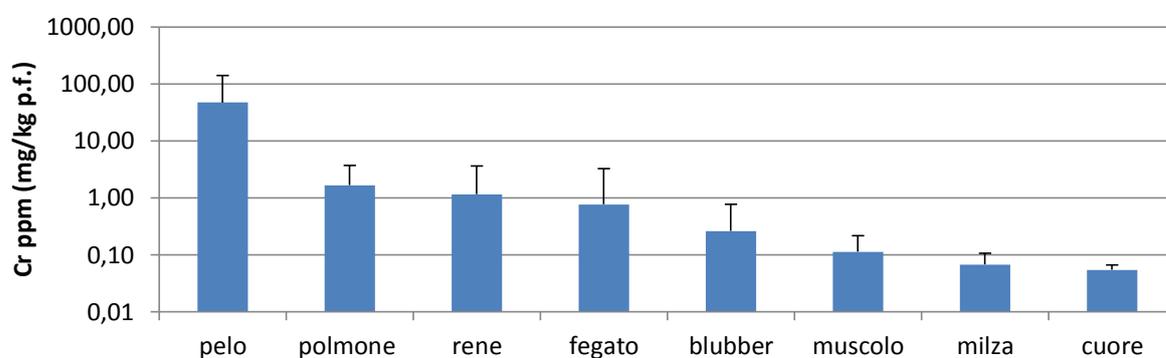


Grafico 4.8. Distribuzione del cromo (Cr) in *M. monachus*

Lievi differenze ($p < 0.10$) sono emerse nel confronto tra macro aree effettuate sul tessuto adiposo della popolazione greca di foca monaca.

Ancora una volta è la macro area del Sud Egeo a presentare i mediamente valori maggiori. I test statistici applicati sugli altri tessuti ed organi non hanno presentato alcuna differenza significativa.

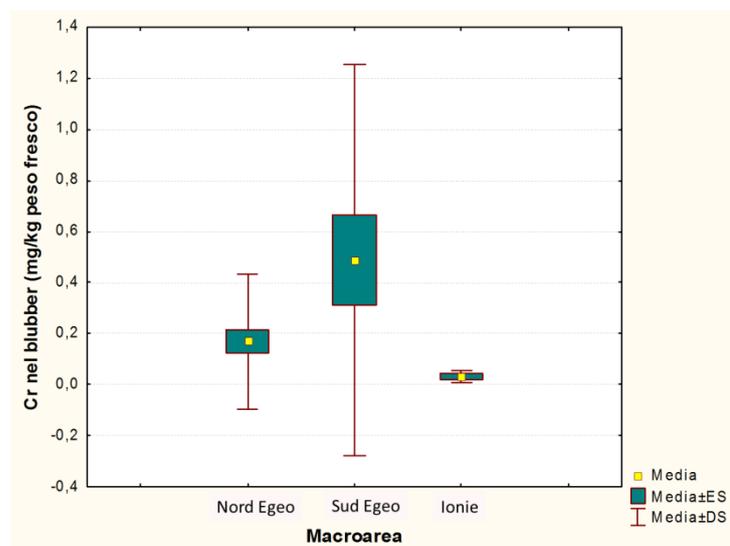


Figura 4. Differenze tra macroaree nei livelli di Cr in *M.monachus*

1.2.2. Nichel

La distribuzione del nichel in *M. monachus* presenta un'interessante similarità con quella del cromo. Le concentrazioni maggiori si riscontrano nel pelo, con un *range* pari a 1,37-622,93 mg/kg p.f., e gli organi maggiormente vascolarizzati, quali polmone, fegato e rene, presentano mediamente gli stessi livelli del metallo.

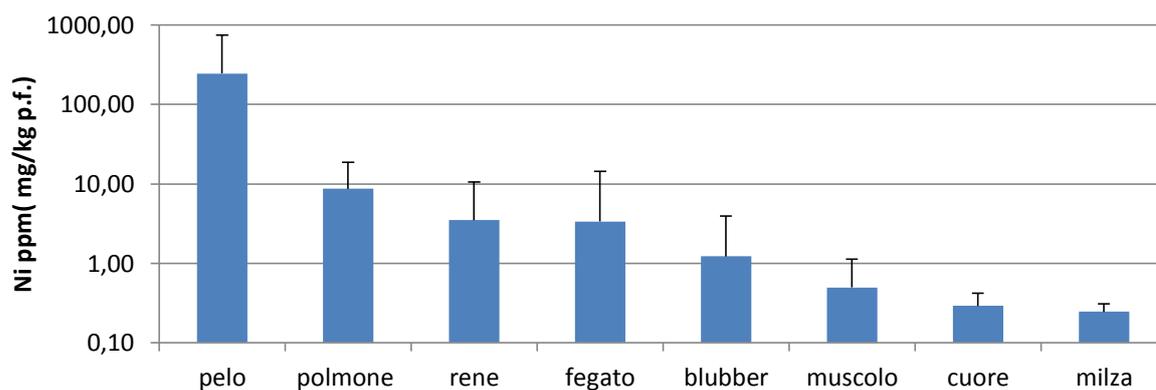


Grafico 4.9. Distribuzione del cromo (Cr) in *M. monachus*

Analogamente a cromo e cobalto, le concentrazioni di nichel riscontrate nelle diverse matrici di foca monaca risultano maggiori se paragonate sia a quelle di altre specie di focidi (Frank et al., 1992; Medvedev et al., 1997; Watanabe et al., 2002) che di cetacei rinvenuti spiaggiati in diverse aree del mondo (Villa et al., 1993; Law et al., 1996). Particolarmente elevata risulta la concentrazione di nichel nel pelo di questi individui, la quale mediamente risulta 60 volte più elevata di *P. hispida ladogensis*, 80 volte di *E. barbatus* e più di 100 volte maggiore che in *P. hispida hispida*.

Elevati livelli di Ni dovrebbero essere presi in considerazione nel quadro generale di salute di questa popolazione. Test in laboratorio su *Phoca vitulina* infatti hanno evidenziato che la proliferazione linfocitaria viene stimolata quando le cellule vengono sottoposte a trattamenti pari a 5.0 mg Ni/L per 5 giorni (Kakuschke et al., 2008), concentrazione paragonabile a quella riscontrata in fegato e rene.

Dall'analisi statistica, differenze significative ($p < 0.05$) sono state riscontrate tra le diverse macro-aree analizzate in blubber, con ancora una volta la macro-area 2 (Sud Egeo) mediamente maggiore.

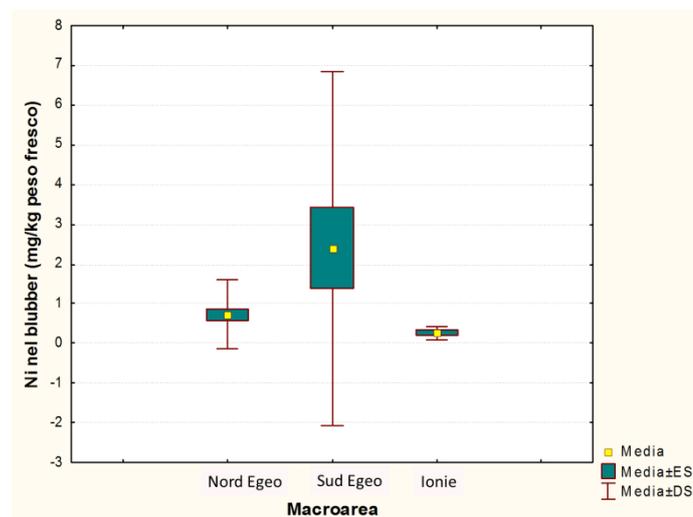


Figura 4.10. Differenze tra macroaree nei livelli di Ni in *M. monachus*

Differenze, sebbene non statisticamente significative ($p < 0.10$), sono poi risultate dal confronto tra sessi nel rene, in cui le femmine mostrano mediamente livelli più elevati dei maschi.

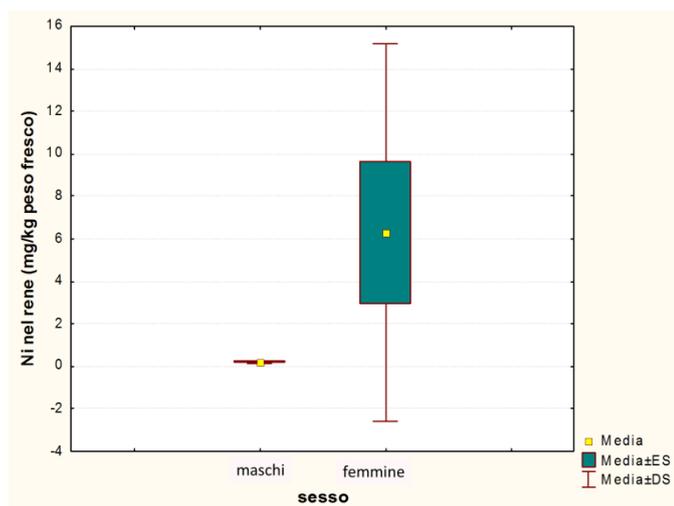


Figura 4.11. Differenze tra sessi nei livelli di Ni in *M. monachus*

1.2.3. Piombo

Il piombo è un metallo pesante che può modificare funzioni e struttura renale, epatica ed ossea. I tessuti target di accumulo del piombo sono quelli così detti in inglese *hard tissues*, ossia ossa e denti, ma la sua tossicità si esplica nei tessuti molli, in particolare nel cervello. In vari pinnipedi, tra cui *Z. californianus* e *P. vitulina*, è stato descritto questo pattern di accumulo (Braham, 1973; Roberts et al., 1976). Non sono riportati in letteratura casi di intossicazione da Pb né in focidi né in otaridi. L'unico caso descritto è quello di un tursiope (*T. truncatus*) tenuto in cattività, deceduto in seguito all'ingestione di alcuni pallini presenti nella vasca.

L'esposizione ambientale può infine alterare lo sviluppo e/o la funzione del sistema immunitario, portare ad ipersensibilità, autoimmunità, o immunosoppressione (Klaassen, 2008).

In questo studio, non erano a disposizione campioni di ossa o denti, quindi le distribuzioni riscontrate si riferiscono esclusivamente ad organi e tessuti molli, ad eccezione del pelo. Quest'ultimo infatti, costituito da cheratina può rientrare nella categoria degli *hard tissues*, ed in conferma di ciò esso è la matrice con livelli più alti di Pb (26.89 ± 77.08 mg/kg p.f.) in *Monachus monachus*. I livelli riscontrati nel pelo di questa popolazione

monachina sono mediamente più alti se paragonati a quelli riportati da Yediler et al. (1993). L'autore infatti, il quale analizzò pelo ritrovato in 7 grotte abitate da *M. monachus* in Grecia, descrive livelli pari a 784.67 ± 310.6 ng/g, ossia mediamente 30 volte inferiori al presente studio. Il pelo è un tipo di matrice che è stata utilizzata per l'analisi di metalli pesanti anche in altre specie, tra le quali *P. hispida ladogensis*, *P. h. hispida* ed *E. barbatus* (Medvedev et al., 1997; Watanabe et al., 1998). Tutte queste presentano livelli inferiori alla popolazione greca *M. monachus* analizzata in questo studio.

Il blubber, il tessuto molle avente le concentrazioni maggiori da noi analizzate per il Pb (0.23 ± 0.90 mg/kg p.f.), risulta circa 3 volte inferiore ai livelli riportati da Dosi (2000) nella medesima popolazione. Va sottolineato però che la stessa autrice riporta che circa il 75% dei campioni analizzati presentava concentrazioni inferiori a 0.216 µg/g, paragonabili ai livelli qui da noi riportati, mentre 6 campioni erano al di sotto del LOD. Il valore medio veniva sfalsato da due animali, nei quali erano stati trovati livelli molto elevati.

Per gli altri tessuti invece, i livelli osservati sono comparabili con quanto riportato in *P. caspica* (Anan et al., 2002; Watanane et al., 2002), *P. vitulina* (Drescher et al., 1977; Frank et al., 1992), *P. hispida* (Frank et al., 1992; Medvedev et al., 1997), *H. grypus* (Frank et al., 1992; Nyman et al., 2002), *C. cristata* e *P. groenlandicus* (Brunborg et al., 2006)

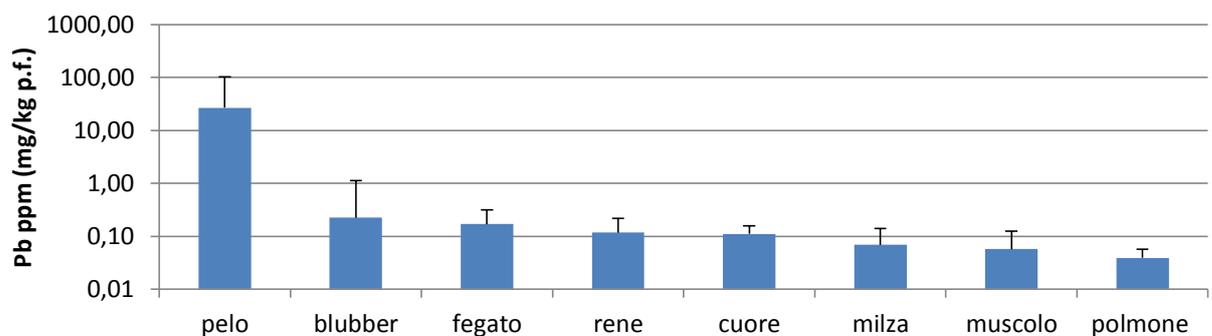


Grafico 2. Distribuzione del piombo (Pb) in *M. monachus*

In accordo con la letteratura, differenze, anche se non statisticamente significative ($p < 0.10$), sono state riscontrate in rene e fegato tra classi

d'età, in cui gli individui adulti mostrano mediamente livelli maggiori di giovanili e cuccioli. È chiara la presenza di un meccanismo di accumulo del Pb in questa specie.

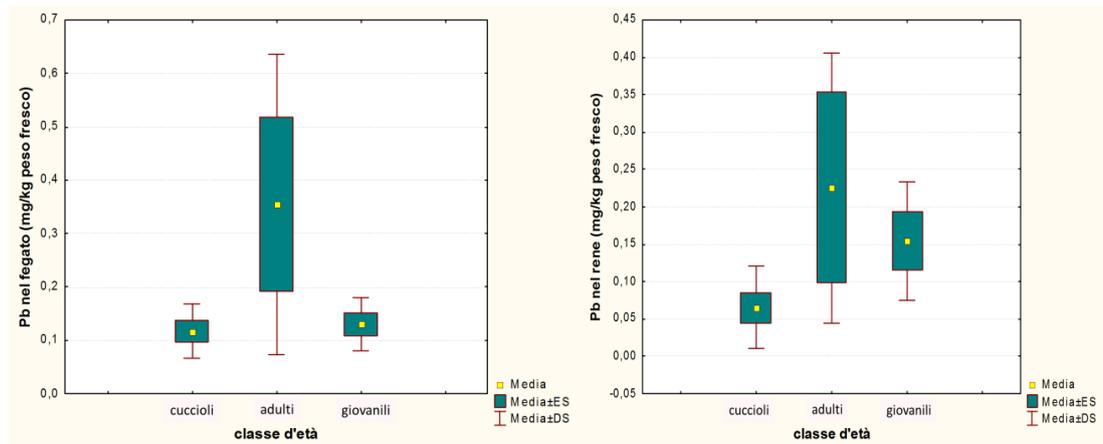


Figura 4.12. Differenze tra classi d'età nei livelli di Pb in *M. monachus*

Nessuna differenza è stata colta per sesso, aree geografiche o anno.

1.2.4. Cadmio

Il cadmio non riveste alcun ruolo biologico nei mammiferi. Cd ed i vari composti derivanti sono tossici perfino a basse concentrazioni e tendono ad accumularsi negli organismi e negli ecosistemi. Solitamente gli organi target sono *in primis* il rene, seguito poi dal fegato (Dehn et al., 2006) mentre i livelli più bassi si riscontrano in muscolo e grasso. Come per il piombo, in molti focidi è stata osservata una correlazione positiva tra l'aumentare dei livelli renali ed epatici del metallo e l'età degli individui. Uno studio effettuato da Sonne-Hansen et al. (2002) ha mostrato che concentrazioni tra 50-200 mg Cd/kg p.s. nella corteccia renale possono indurre cambiamenti istopatologici in *Pusa hispida*, come glomerulonefrite. Generalmente, elevati livelli di Cd vengono associati a diete ricche di cefalopodi, un gruppo di molluschi di cui fanno parte anche alcune specie di cui *M. monachus* si ciba.

La distribuzione tra i vari tessuti in foca monaca è in accordo con quella riportata in diversi studi (Dehn et al., 2006; Jiawen Li, 2013), con rene e

fegato>>pelo>milza, cuore, polmone, muscolo e blubber. I livelli renali ed epatici, pari rispettivamente a 2.46 ± 4.03 e 0.87 ± 1.85 mg/kg p.f., sono mediamente in accordo con quelli riportati da vari studiosi (Frank et al., 1992; Watanabe et al., 1998, 2002) e nettamente inferiori a quelli di *P. groenlandicus* e *C. cristata* (Brunborg et al., 2006). Mediamente ad ogni modo, le concentrazioni da noi ottenute per la popolazione greca di foca monaca sono da considerarsi basse.

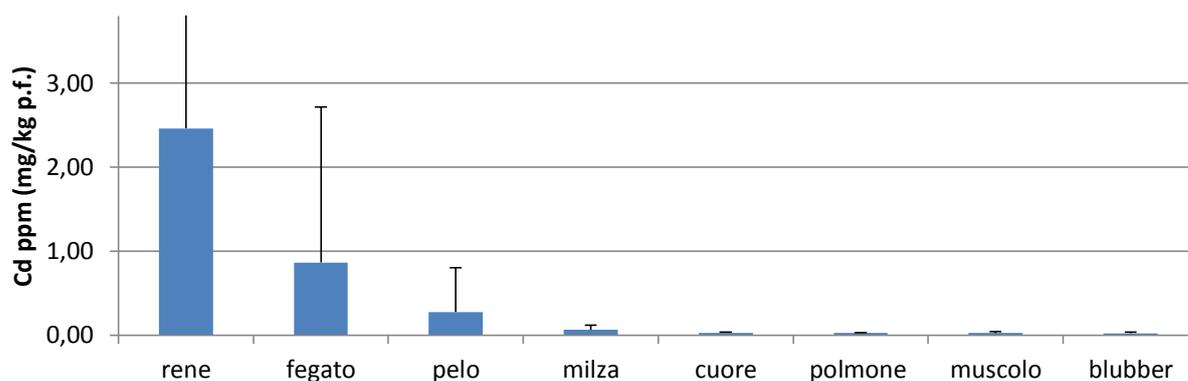


Grafico 4.11. Distribuzione del cadmio (Cd) in *M. monachus*

Le analisi statistiche (Kruskal-Wallis test) hanno evidenziato differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) legate alla classe d'età in rene, fegato e blubber. Gli individui adulti presentano livelli maggiori che giovani e cuccioli. Legate invece al sesso solo in blubber, in cui le femmine mostrano mediamente livelli più alti dei maschi. Nessun'altra particolare differenza è stata evidenziata dalla statistica tra macroaree o anno.

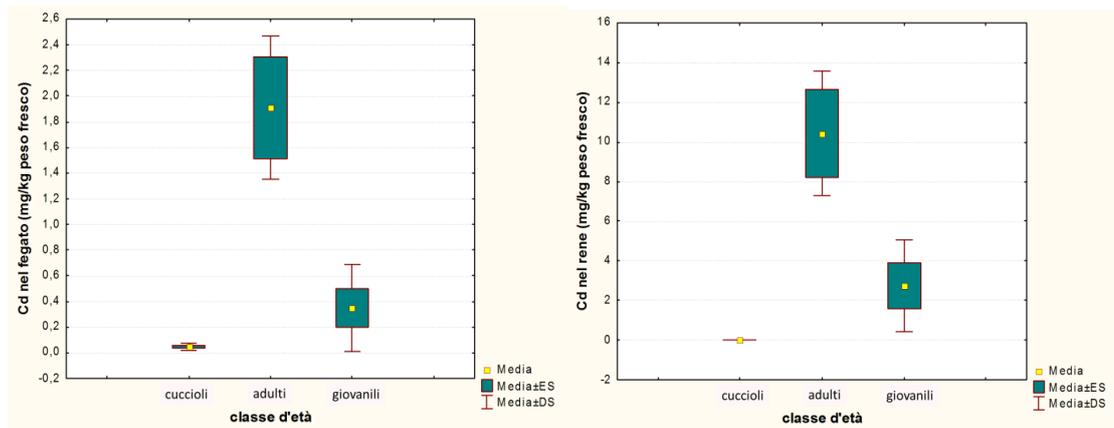


Figure 4.13. Differenze tra classi d'età nei livelli di Cd in fegato e rene di *M. monachus*

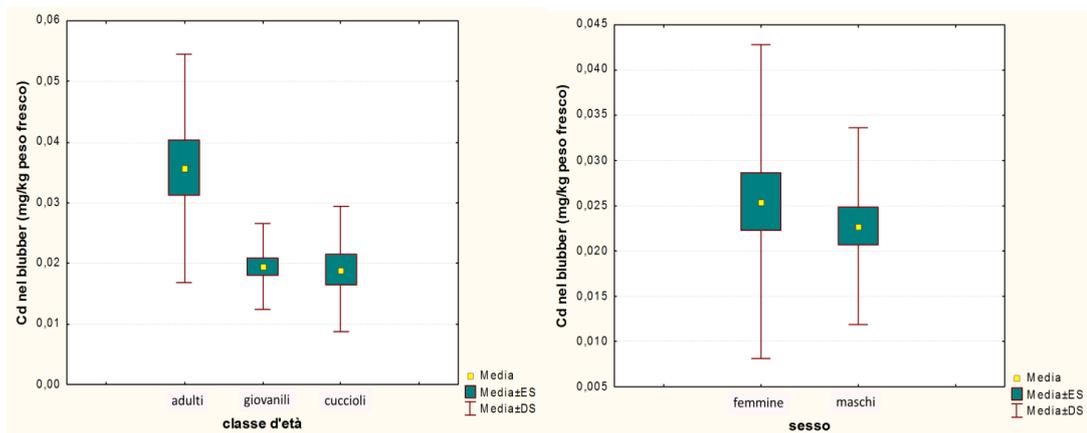


Figura 4.14. Differenze tra classi d'età e sesso nei livelli di Cd nel blubber di *M. monachus*

1.2.5. Arsenico

L'arsenico (As) è un semimetallo che risulta molto meno tossico negli stati combinati, quali arsenobetaina, arseno-colina, monometil-arsano (MMA), dimetil-arsano (DMA), trimetil-arsano (TMA), tetrametilarsano (TETRA), acido metil- e dimetil-arsenioso e metil- e dimetil-arsenico, rispetto che allo stato elementare. Nei mammiferi marini, la via principale d'esposizione è l'ingestione di crostacei. Ad oggi, nessun caso di intossicazione da arsenico è stato descritto in alcun cetaceo o pinnipede.

I livelli più alti mai descritti sono in delfini comuni (*Delphinus delphis*) del Portogallo, i quali spaziavano in un *range* di 9.1–15.1 mg As/kg p.s. in muscolo, fegato, e pelle (Carvalho et al., 2002).

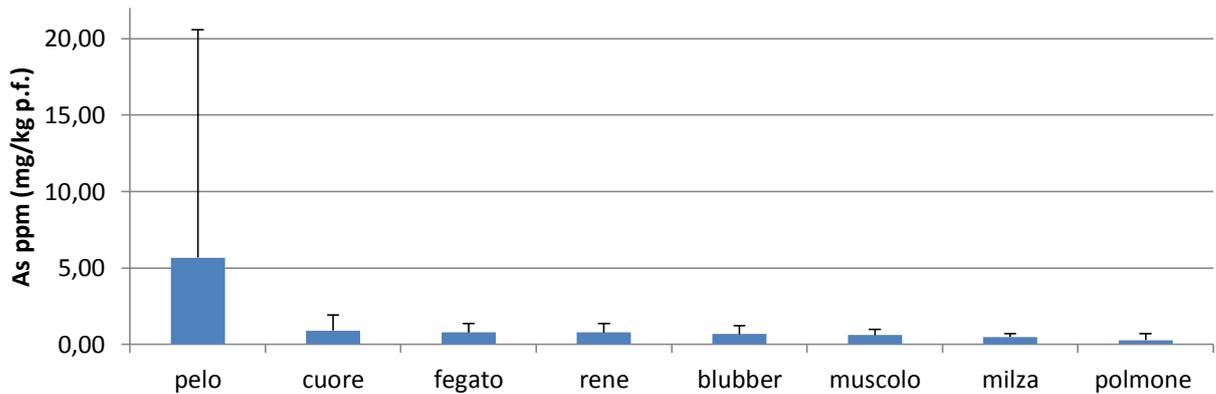


Grafico 4.12. Distribuzione dell'arsenico (As) in *M. monachus*

Il presente studio riporta elevati livelli di arsenico nel pelo (5.67 ± 14.93 mg/kg), seguiti da cuore > fegato, rene, muscolo, milza > polmone. Il confronto con la letteratura, per il pelo, è scarno. Solamente Gray et al. (2008), analizza l'As su questa matrice. Mediamente i livelli di *Monachus monachus* risultano inferiori alla foca di Weddell. Tra gli organi interni ed i vari tessuti molli campionati ed analizzati in questo studio, il cuore appare concentrare i maggiori livelli del metallo. Questo è stato descritto anche in *Stenella coeruleoalba* da Bellante et al. (2012), il quale ha ipotizzato che il cuore potesse essere un organo target di accumulo dell'arsenico nella specie. In fegato, rene e blubber, l'As si distribuisce in modo omogeneo.

I risultati qui ottenuti, messi a confronto con la letteratura presente su diverse specie di focidi, risultano essere più elevati in tutte le matrici analizzate. Gli unici studi che riportano livelli maggiori di *M. monachus* nel blubber, dove quindi il metalloide non è attivo metabolicamente, non riportano alcun commento in merito alla possibile tossicità dell'elemento negli individui (Frank et al., 1992).

Considerando i diversi parametri che potrebbero influire sulla eterogeneità dei risultati ottenuti, quali sesso, classe d'età, area geografica e anno di decesso degli individui, risultano statisticamente significative ($p < 0.05$) le differenze tra classi d'età nel tessuto adiposo e nel rene.

Nel blubber gli esemplari adulti mostrano livelli di accumulo nettamente maggiori che nelle altre due classi, mentre nel rene i cuccioli mostrano livelli nettamente inferiori di adulti e giovanili. Entrambi i dati ottenuti nelle diverse matrici sono giustificabili con un accumulo proporzionale all'età. Il fatto che nel rene anche i giovani mostrino elevati livelli di As mentre nel blubber no, può essere dovuto ad una diversa cinetica nei due compartimenti. L'adipe infatti è un tessuto di stoccaggio in cui sostanze nutritive e lipofile vengono depositate mentre il rene è un organo con funzioni completamente differenti e metabolicamente attivo, ricevente grandi apporti di sostanze di ogni genere attraverso il circolo sanguigno.

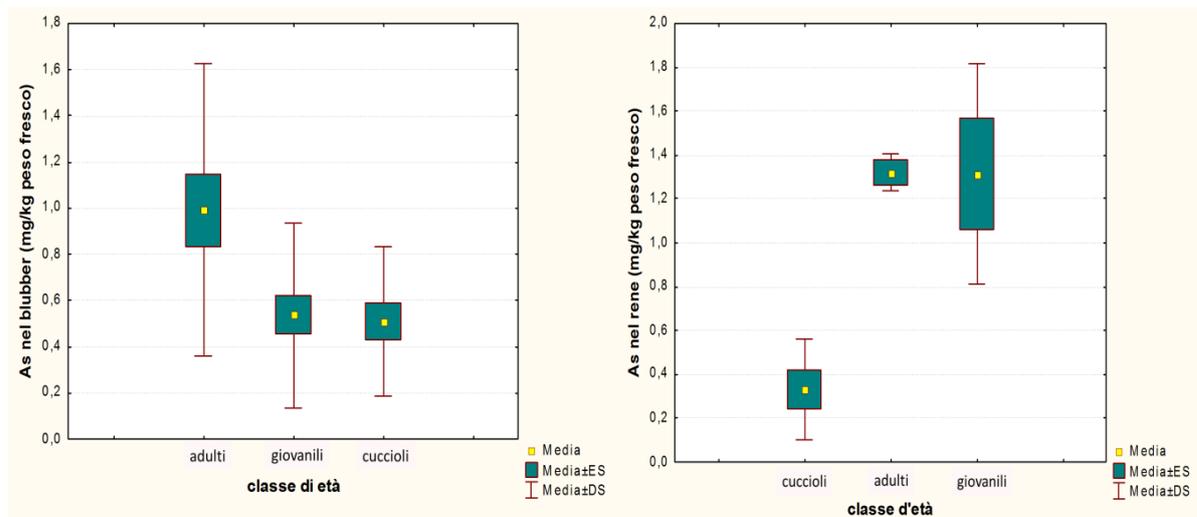


Figura 4.15. Differenze tra classi d'età nei livelli di As in *M. monachus*

1.2.6. Mercurio

Data la sua persistenza ed elevata mobilità nell'ecosistema marino, caratteristiche che lo portano a presentarsi con elevati livelli di biomagnificazione ai livelli superiori della catena trofica, il mercurio (Hg) è stato fortemente studiato come metallo pesante. In particolar modo, gli odontoceti del Mediterraneo hanno mostrato livelli nettamente più elevati di Hg rispetto a quelli presenti nell'Oceano Pacifico ed Atlantico (Andrè et al, 1991; Augier et al., 1993). Questo può essere spiegato dalla naturale presenza di depositi di cinabro nel Mediterraneo oltre che dall'uso del metallo in ambito industriale (Bacci, 1989; Andrè et al.,

1991). Questo studio mostra per la prima volta i livelli di questo elemento tossico negli organi e tessuti dell'unico pinnipede del Mediterraneo. L'unico dato in merito è lo studio di Yediler et al. (1993) nel pelo di foca monaca rinvenuto in grotte di due isole greche. I risultati qui ottenuti nel pelo di individui di diverse età, sesso e rappresentativi di un periodo abbastanza ampio (1994-2013) si presentano 20 volte inferiori che nei campioni analizzati da Yediler et al. (1993), dato che presuppone esserci una minor esposizione ambientale per questa popolazione negli ultimi 20 anni.

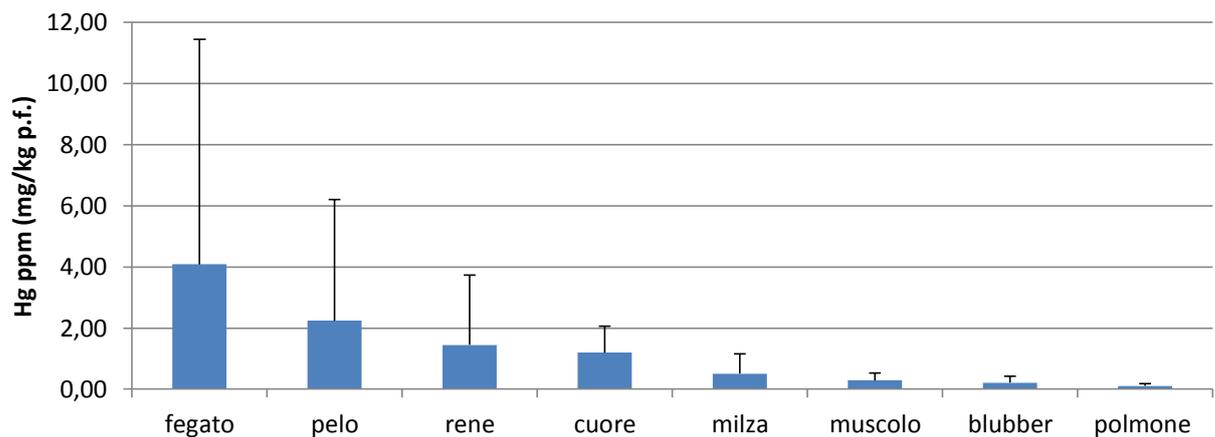


Grafico 4.12. Distribuzione del mercurio (Hg) in *M. monachus*

L'organo che mostra i livelli maggiori di Hg è il fegato, con valori pari a $4,09 \pm 7,36$ mg/kg p.f.. Le concentrazioni riscontrate sono paragonabili a quelle riportate in *P. caspica*, *P. hispida hispida*, *P. hispida ladogensis* e *P. sibirica* (Anan et al., 2002; Medvedev et al., 1997; Watanabe et al., 1998), ed inferiori di 6-30 volte a *P. vitulina*, *P. hispida*, *H. grypus*, *C. cristata* ed *A. gazella* (Lake et al., 1995; Frank et al., 2002; Nyman et al., 2002; Brunborg et al., 2006; Malcom et al., 1994).

Nella popolazione greca di foca monaca analizzata sono state riscontrate differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra le diverse classi di età nel fegato, con gli adulti aventi valore medio pari a $16,83 \pm 6,85$ mg/kg mentre giovani e cuccioli $1,48 \pm 0,97$ mg/kg p.f. e $0,49 \pm 0,20$ mg/kg p.f.

rispettivamente. Anche se non significativo per i test statistici ($p < 0.10$), è visibile questa differenza anche nel rene.

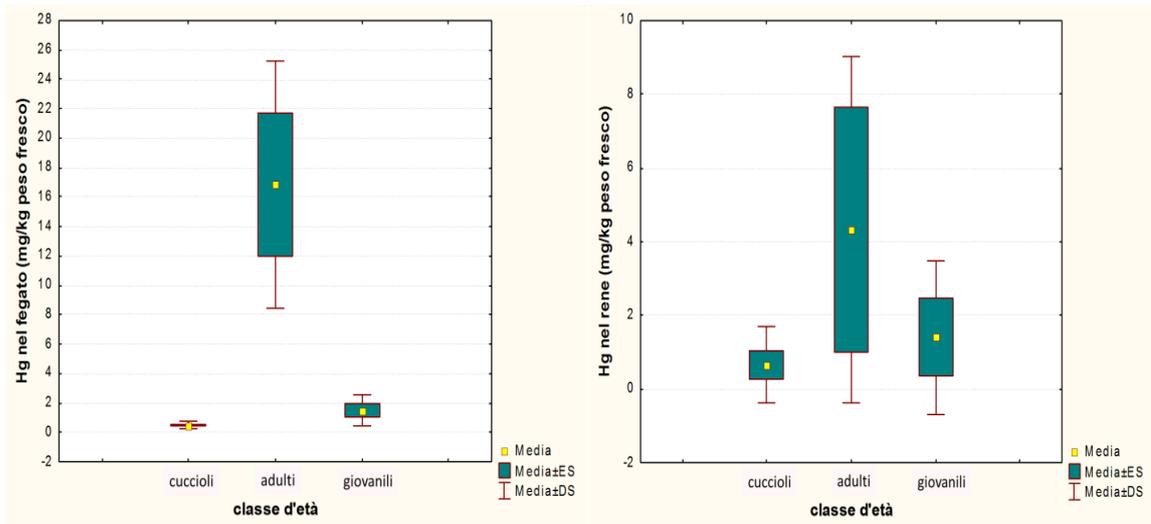


Figura 4.15. Differenze tra classi d'età nei livelli di Hg in *M. monachus*

Discussione

Il presente studio si propone di analizzare per la prima volta lo status tossicologico della popolazione greca di foca monaca (*Monachus monachus*) degli ultimi vent'anni. In questo paragrafo sono stati riportati i dati ottenuti dalle analisi di 12 elementi in tracce, essenziali e tossici.

Nella classe dei metalli essenziali spicca per maggior concentrazione il ferro, presente nell'eme, una proteina in grado di legare in maniera reversibile l'ossigeno, utilizzandolo per trasportare elettroni nella catena respiratoria, nel ridurre specie reattive dell'ossigeno (catalasi e perossidasi) o semplicemente trasportandolo nel sangue (emoglobina) o immagazzinandolo nei muscoli (mioglobina). Il sangue dei mammiferi marini è noto per avere un'alta concentrazione di emoglobina al fine di assicurare un efficiente trasporto dell'ossigeno durante le immersioni.

In merito agli altri metalli inclusi nel gruppo degli elementi essenziali, quali Zn, Mn, Se, Cu e Co, tutti appaiono nei *range* descritti in Letteratura per altre specie di focidi, ad eccezione del cobalto e del rame.

Questo porta, nonostante gli individui campionati fossero deceduti, a credere che i livelli riportati in questo studio possano fungere da dato indicativo fisiologico degli elementi essenziali in *Monachus monachus*.

Per quanto riguarda i livelli di Co e Cu rinvenuti in questa specie, è legittimo pensare che vi sia una qualche tipologia, anche se lieve, di inquinamento ambientale, e che questo pinnipede, abitando sostanzialmente la fascia costiera, ne risenta e agisca da sentinella dello stato ambientale delle coste greche. Il cobalto si trova come minerale in natura, e non viene estratto da solo ma come sottoprodotto dell'estrazione di rame o nichel. Ad oggi in Grecia sono presenti miniere attive di cobalto. Gli usi industriali sono molteplici ed in alcune applicazioni non è ancora sostituibile. Importante è il suo uso come agente essiccante in vernici, smalti, lacche e inchiostri da stampa. Estremamente utilizzato è anche il rame, specialmente in agricoltura, nelle attrezzature per la nautica, nell'elettronica, nei trasporti, in edilizia e in molti altri settori.

La mera valutazione dei livelli di metalli pesanti, o comunque potenzialmente tossici, nei tessuti può a volte dare informazioni errate sulla reale pericolosità

dei contaminanti e sul loro impatto sulla salute delle specie considerate. Detto ciò, è ad ogni modo fondamentale conoscerne i livelli, in quanto forniscono delle soglie che definiscono i valori di “normalità” e “anormalità” negli animali (Wagemann e Muir, 1984). Nel cercare di valutare o ipotizzare un potenziale effetto avverso dei contaminanti su specie in pericolo di estinzione, il problema più grande è la mancanza di prove sperimentali *in vivo*, non effettuabili in queste specie. Ci si deve quindi affidare a prove *in vitro* o a studi retroattivi, che correlino determinati effetti ai livelli di contaminanti reperiti nei tessuti e/o nel sangue, e quindi in genere a studi *ex vivo*. Gli effetti avversi di natura subacuta più importanti per la conservazione di specie in via di estinzione sono quelli a carico del sistema endocrino, immunitario e gli effetti genotossici. Purtroppo ad oggi, gli studi esistenti a riguardo sono molto pochi nei pinnipedi.

Per *M. monachus*, a seconda del tessuto od organo che si prende in considerazione, risultano preponderanti in termini percentuali il mercurio o l'arsenico, nel fegato nel primo caso o nel blubber nel secondo caso, fatto giustificato dalla natura lipofilica del As. Dato l'esiguo in numero di campioni delle altre matrici, si preferisce tener conto come risultati più rappresentativi solamente questi due tessuti. Freeman e Sangalang (1977) hanno dimostrato come l'arsenico in test *in vitro* su cellule di foca comune, a concentrazioni pari a 0.45 µg/g, sia in grado di alterare in maniera significativa la produzione di ormoni steroidei. In particolare, viene ridotta la produzione di testosterone e di corticosterone ed aumentata quella di 11-ketotestosterone e di diidroisoandrosterone, alterando quindi la corretta funzionalità gonadica. Concentrazioni pari o superiori a 0.45 µg/g sono reperite in tutti i tessuti considerati, ed è quindi bene tener conto di un possibile effetto sulla capacità di riproduzione della specie dato dai livelli di As agenti su assi riproduttivo ed adrenergico. Inoltre, Frouin et al. (2010) hanno studiato che in colture di cellule di linfoma B 11B7501 di foca comune si osserva un decremento dell'attività fagocitaria a seguito di esposizione a AsCl₃ alla concentrazione di 20 e 50 µM, oltre che una riduzione significativa della proliferazione cellulare ed un aumento del numero di micronuclei, risultando quindi fortemente citotossici e immunotossici. Tali concentrazioni sono comparabili con quelle osservate nei tessuti di foca monaca (*M. monachus*) residente in Grecia.

Un confronto coi livelli riportati in letteratura in altre specie di focidi (Tabella II) è stata fatta precedentemente, ma è bene fare un confronto anche con altre

specie considerate sentinelle nel Mar Mediterraneo, quali cetacei e tartarughe marine. La popolazione greca di foca monaca non arriva mai a livelli di Hg nel fegato del calibro di *Stenella striata*, *Tursiops truncatus*, *Globicephala melas* e *Delphinus delphi* (Shoham-Frider et al., 2002), ma mostra un *range* che varia da 0,21-24,89 mg/kg p.f.. Lo stesso vale per l'As, con valori compresi tra 0,00- 2,17 mg/kg p.f. e per il Pb, con un minimo di 0,06 mg/kg p.f. ed un massimo di 0,68 mg/kg p.f. nel fegato di *M. monachus* (Capelli et al., 2008; Bellante et al., 2012). I livelli di cadmio invece sono paragonabili alle specie di odontoceti riportati nello studio di Shoham-Frider et al. (2002), con un *range* di 0,02-7,10 mg/kg p.f.

Una tendenza all'accumulo negli individui adulti è presente in tutti gli elementi tossici analizzati, nichel e cromo compresi, ma non si osservano differenze significative tra maschi e femmine.

Spesso gli elementi in traccia hanno comportamenti affini, sia in ambiente che una volta all'interno degli organismi. Questo è stato riscontrato anche in *Monachus monachus*. Specie chimiche affini sembrano essere nichel-cromo, selenio-mercurio e selenio-cadmio.

La prima coppia, nichel-cromo, trova una correlazione positiva ($R^2=0.9941$) nell'accumulo nel blubber, fegato e rene del focide in studio. Questi due metalli solitamente sono utilizzati insieme nella creazione di leghe estremamente resistenti, che presentano fino all'80 di Ni ed il 20% di Cr. Sono utilizzati per la costruzione di componenti soggetti a forte sollecitazione, come ingranaggi, pistoni, giunti, parti di motori a combustione interna e fucili.

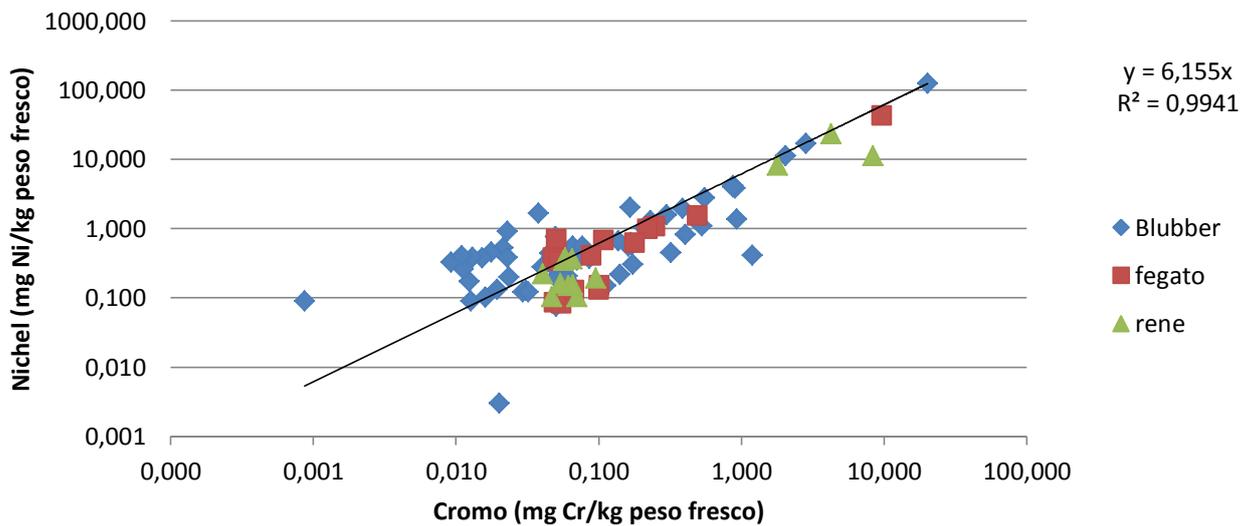


Grafico 4.14. Correlazione Ni-Cr in diverse matrici di *M. monachus*

Le analisi statistiche hanno evidenziato differenze più (Ni) o meno (Cr) significative tra i livelli dei due metalli nelle diverse macroaree: Nord Egeo, Sud Egeo ed Ionio. Concentrazioni nettamente maggiori per il Sud Egeo, e più in dettaglio per gli individui rinvenuti nelle Isole Cicladi, fanno presupporre una fonte di contaminazione di tipo antropogenico.

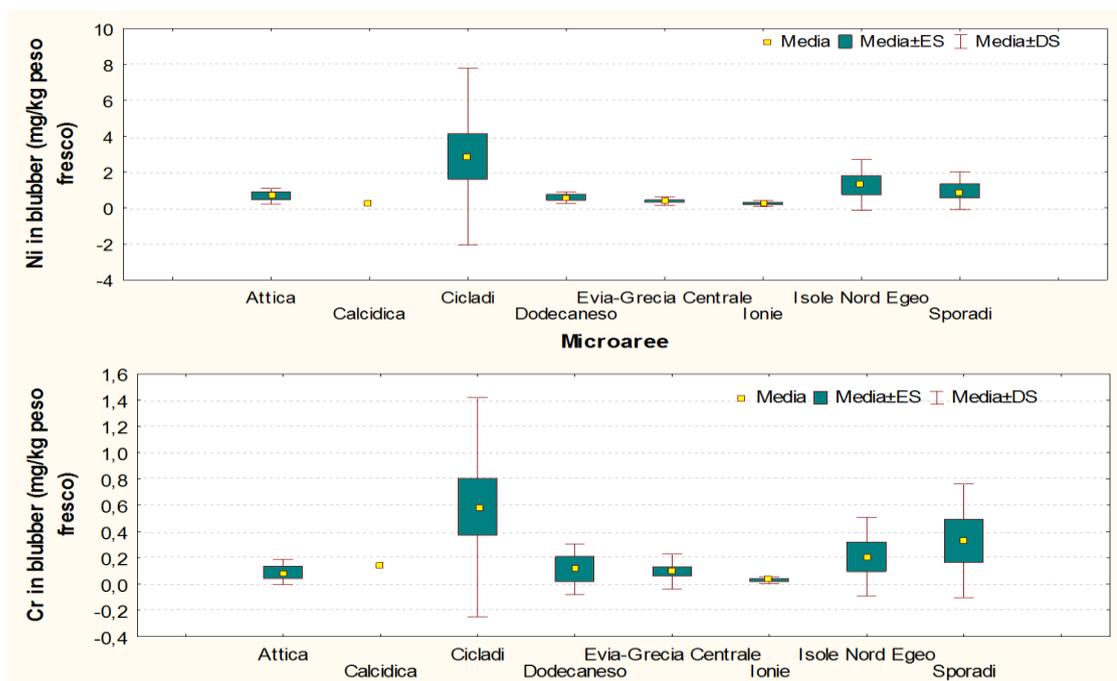


Figure 4.16. Livelli di Ni in blubber di *M. moachus* in base all'area geografica

La tossicità del cromo nei mammiferi marini non è ancora chiara (Law, 1996), ma recentemente Kakuschke et al. (2005) hanno evidenziato ad esempio come Cr sia in grado di indurre ipersensibilità in foca comune (*P. vitulina*) a concentrazioni ematiche di circa 20 µg/l. Per il nickel invece è stata già descritta sia una trasmissione verticale madre-cucciolo che una correlazione tra elevati livelli di Ni nel pelo delle femmine e i casi di cuccioli nati morti in *Pusa hispida saimensis* (Hyvärinen e Sipilä, 1984). Lo studio di Kakuschke et al. (2005) ha sottolineato come anche questo metallo possa dare gli effetti sopracitati del cromo a concentrazioni pari a 41 µg/L. Tali concentrazioni sono 7 e 3 volte rispettivamente inferiori a quelle osservate nei tessuti di *M. monachus*, ma va per altro tenuto presente che i livelli ematici sono generalmente inferiori a quelli tissutali, quindi i risultati ottenuti non sono da sottovalutare per possibili effetti sulla specie. L'ipersensibilizzazione può determinare una grave reazione negli individui interessati, e può avere gli stessi effetti nocivi dell'immunosoppressione.

Per quanto riguarda invece selenio-mercurio, la loro correlazione è nota già dai primi anni 70', quando Koeman et al. (1973) descrissero per primi questo comportamento mutualistico tra i due elementi nel fegato di diversi mammiferi marini. Più precisamente si è notata un'azione antagonista del selenio al mercurio, e quindi un meccanismo di detossificazione, quando i due metalli raggiungono nell'organismo un rapporto molare tendente a 1. Questo rapporto molare Hg:Se però può anche assumere valori diversi da uno, maggiori o inferiori, e Palmisano et al. (1995) ha giustificato questa variazione assumendo che il valore tendente a uno si raggiunge solo dopo aver raggiunto determinate concentrazioni di Hg nell'organismo. Tale soglia sembra variare da specie a specie. Nel presente studio, *Monachus monachus* spazia in un range Hg:Se molare di valori pari a 0.04–0.5, con gli un chiaro incremento del rapporto negli individui più adulti.

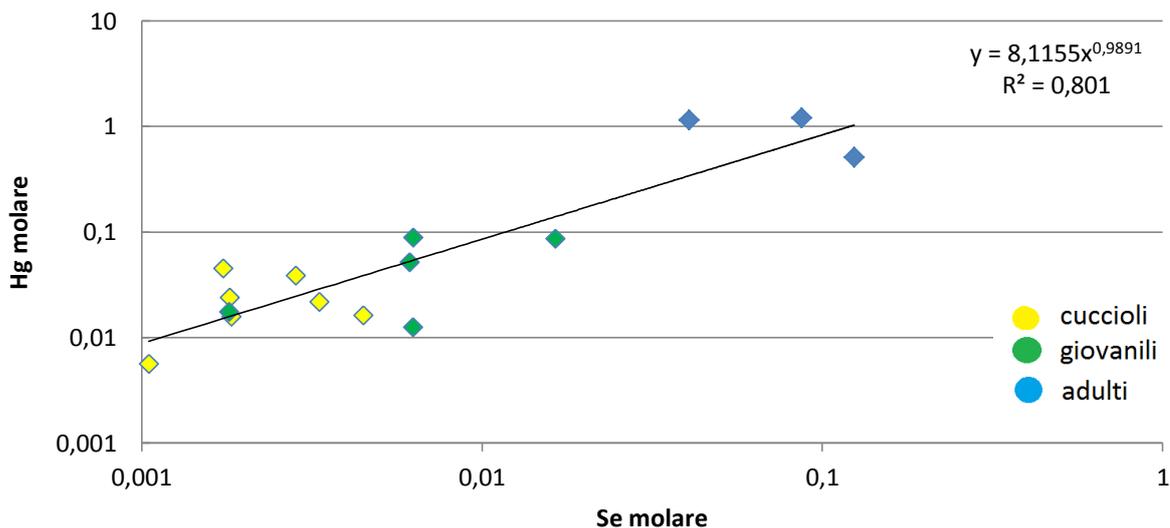


Grafico 4.15. Rapporto molare Hg:Se nel fegato di *M. monachus* in relazione con la classe d'età

Il selenio poi sembra avere un ruolo simile anche con il cadmio (Ikemoto et al., 2004; Kedziorski et al., 1996). Ed infatti l'andamento descritto per il mercurio precedentemente, rispecchia quello del Cd sia nel fegato che rene di *M. monachus*, con quest'ultimo organo target d'accumulo del metallo tossico. Il rapporto molare Cd:Se in questo caso varia tra 0.01-1.65 nel rene, mentre nel fegato tra 0.002-1.79.

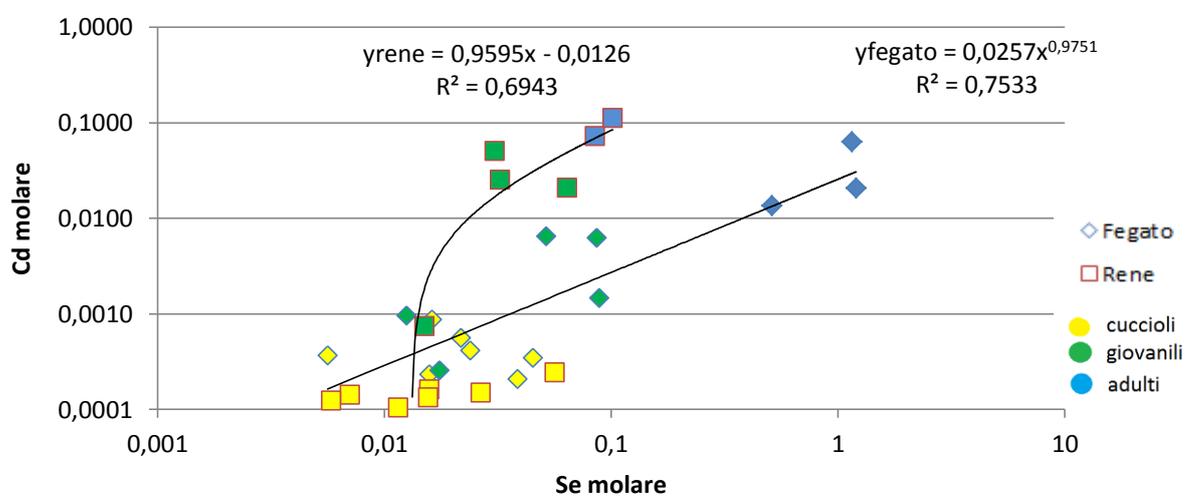


Grafico 4.16. Rapporto molare Cd:Se nel fegato e rene di *M. monachus* in relazione con la classe d'età

Tessuto	Specie	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn	Ni	Hg	Se	Ref	
Blubber	<i>Monachus monachus</i>	0,69±0,55	0,02±0,01	0,02±0,01	0,26±0,51	2,84±3,32	19,49±26,82	0,44±0,91	0,23±0,90	4,44±3,13	1,22±2,74	0,21±0,22	0,34±0,44	Questo studio	
		0,15972	0,0561	0,03828	1,51404	1,1418	44,286	0,75108	1,6764	19,4634				Dosi 2000 (convertito a peso fresco)	
	<i>Phoca vitulina</i>	0,14	<0,1			7,1				52		4,1	3,4	Skaare et al., 1990	
		0,16	<0,1			6,1				47		16	10		
			0,1	0,2			11			59		7,9	5,5		
												0,107±0,016		Brookens et al. 2008	
			1,6											Frank et al. 1992	
		<i>Pusa hispida</i>	4,3											Frank et al. 1992	
		<i>Halichoerus grypus</i>	3,6											Frank et al. 1992	
	Fegato	<i>Monachus monachus</i>	0,79±0,60	0,87±1,85	0,10±0,06	0,77±2,47	27,71±18,15	390,40±333,23	2,83±0,76	0,17±0,15	48,27±25,71	3,37±11,03	4,09±7,36	17,33±32,28	Questo studio
<i>Phoca vitulina</i>												1,814±0,286		Brookens et al. 2008	
												38,5±7,86		Lake et al. 1995	
												69,9±62,1			
				0,09	0,019	0,049	8,6	808	3,7	0,16	54	0,026	26	11	Frank et al. 1992
		<i>Pusa hispida</i>		0,65	0,018	0,044	4,4	1050	2,2	0,16	32	0,019	44	19	Frank et al. 1992
		<i>Pusa hispida ladogensis</i>		0,31±0,17			5,07±2,65			0,7±0,59	36,47±7,52	0,45±0,41	3,40±49,15		Medvedev et al. 1997
		<i>Pusa hispida hispida</i>		0,18±0,07			6,35±2,97			0,45±0,1	35,28±3,81	0,3±0,14	4,20±11,90		Medvedev et al. 1997
		<i>Pusa caspica</i>		1,1±1,7	0,042±0,016		11±5	470±580	5,5±1,30	0,068±0,046	49±15	<0,07	15±26		Watanabe et al. 2002
			0,17	0,929	0,02	0,105	5,63	1100	6,15	0,019	90,7		5,8	5,2	Anan et al. 2002
				0,732	0,009	0,081	13,4		6,37	0,002	70,9		27	19	
		<i>Pusa sibirica</i>		0,28±0,45			3,8±1,5	940±400	2,1±0,8		42±15		2,3±2,6		Watanabe et al. 1998
		<i>Halichoerus grypus</i>		0,018	0,015	0,106	14	448	2,4	0,18	46	0,009	26	14	Frank et al. 1992
				0,4±0,2						nd-1,8			78±840	20±21	Nyma et al. 2002
				1,8±1,1						nd-0,1			109±72	28±20	
		<i>Phagophilus groenlandicus</i>	0,19±0,04	23±16						0,05±0,03			0,86±0,90	1,8±0,7	Brunborg et al. 2006
		<i>Cystophora cristata</i>	0,27±0,10	28±16						0,07±0,03			29±30	11±10	Brunborg et al. 2006
		<i>Arctocephalus gazella</i>		114±19,9		0,34±0,04	85±30			0,19±0,05	126±13,2		62±7,7		Malcom et al. 1994
Rene	<i>Monachus monachus</i>	0,79±0,59	2,46±4,03	0,07±0,12	1,15±2,47	13,64±5,99	158,10±303,21	3,32±9,88	0,12±0,10	27,09±13,81	3,49±7,03	1,45±2,28	2,84±2,46	Questo studio	
	<i>Phoca vitulina</i>											1,611±0,267		Brookens et al. 2008	
				0,46	0,012	0,154	4,5	201	0,7	0,05	29	<0,006			Frank et al. 1992
		<i>Pusa hispida</i>		2,12	0,011	0,107	2,8	166	0,6	0,11	26	0,014			Frank et al. 1992
		<i>Pusa hispida ladogensis</i>		0,5±0,48			3,14±1,07			0,56±0,38	20,68±6,99	0,31±0,18	6,15±4,20		Medvedev et al. 1997
		<i>Pusa hispida hispida</i>		0,10±0,04			3,66±1,33			0,42±0,24	23,31±7,2	0,19±0,06	0,42±0,15		Medvedev et al. 1997
		<i>Pusa caspica</i>		9,5±11	0,038±0,02		3,3±0,6	150±42	1±0,2	0,078±0,097	27±7	0,07±0,039	1,6±1,3		Watanabe et al. 2002
			0,16	6,99	0,022	0,072	4,66	200	1,01	0,005	58,4		1,8	2,8	Anan et al. 2002
				12	0,022	0,076	4,12		1,21	0,031	47,9		1,9	3,6	
		<i>Pusa sibirica</i>		2±1,1			5,5±2,3	160±66	0,84±0,16		34±12		1,8±0,8		Watanabe et al. 1998
		<i>Halichoerus grypus</i>		3,4±1,7						nd-0,1			4,7±2,1	2,3±0,3	Nyma et al. 2002
				10±5,1						nd			4,0±2,3	3,2±0,7	
				1,26	0,017	0,114	2,6	147	0,8	0,11	23	<0,006			Frank et al. 1992
		<i>Phagophilus groenlandicus</i>	0,23±0,04	43±15						0,09±0,05			0,36±0,15	1,7±0,4	Brunborg et al. 2006
	<i>Cystophora cristata</i>	0,36±0,14	93±40						0,04±0,05			2,1±1	2,2±0,7	Brunborg et al. 2006	

Tessuto	Specie	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn	Ni	Hg	Se	Ref
Muscolo	<i>Monachus monachus</i>	0,62±0,37	0,03±0,02	0,03±0,02	0,11±0,1	6,37±5,53	86,04±72,64	0,45±1	0,06±0,07	28,40±11,24	0,50±0,63	0,29±0,24	0,80±0,53	Questo studio
	<i>Phoca vitulina</i>											0,7552±0,098		Brookens et al. 2008
	<i>Pusa hispida ladogensis</i>		0,05±0,04			2,86±1,14			0,52±0,29	35,21±13,9	0,30±0,17	3,22±9,95		Medvedev et al. 1997
	<i>Pusa hispida hispida</i>		0,09±0,04			2,39±0,94			0,38±0,03	30,32±4,94	0,13±0,06	0,07±0,03		Medvedev et al. 1997
	<i>Pusa caspica</i>		0,011±0,017	0,010±0,003		1,1±0,2	200±64	0,18±0,06	0,027±0,028	30±9	<0,04	0,55±0,030		Watanabe et al. 2002
		0,11	0,0024	0,012	0,073	1,6	410	1,04	0,018	44,8		0,48	0,62	Anan et al. 2002
			0,016	0,006	0,015	1,08		0,2	0,005	41,8		0,44	0,66	
	<i>Pusa sibirica</i>		0,003±0,002			1,1±0,2	250±58	0,12±0,05		20±6		0,25±0,15		Watanabe et al. 1998
	<i>Halichoerus grypus</i>								nd			0,7±0,3		Nyma et al. 2002
									nd			0,6±0,4		
	<i>Phagophilus groenlandicus</i>	0,02±0,02	0,04±0,03			2,7±0,6	170±20		0,20±0,10	31±6		0,05±0,04	0,31±0,05	Julshamn e Grahl-Nielsen 2000
		0,10±0,20	0,30±0,20			2,2±0,7	240±60		0,20±0,10	29±6		0,18±0,09	0,30±0,06	
		0,20±0,20	0,20±0,08			1,6±0,3	260±50		0,30±0,20	22±4		0,20±0,10	0,28±0,03	
		0,230±0,21	0,09±0,05						0,13±0,26			0,14±0,08	0,27±0,04	Brunborg et al. 2006
<i>Cystophora cristata</i>	0,16	0,22			2,4	138		0,63	38		0,08	0,3	Julshamn e Grahl-Nielsen 2000	
	0,17±0,05	0,10±0,10			0,80±0,50	200±100		0,60±0,60	20±9		0,22±0,04	0,29±0,07		
	0,20±0,20	0,30±0,20			1,0±0,2	260±50		0,30±0,30	23±5		0,10±0,10	0,25±0,04		
	0,10±0,04	0,11±0,09						0,06±0,09			0,16±0,06	0,26±0,05	Brunborg et al. 2006	
Cuore	<i>Monachus monachus</i>	0,91±1,02	0,03±0,01	0,03±0,00	0,05±0,01	8,27±1,47	54,08±6,79	0,30±0,04	0,11±0,04	13,95±9,85	0,29±0,13	1,19±0,87	1,57±1,16	Questo studio
												0,399±0,052		Brookens et al. 2008
Pelo	<i>Monachus monachus</i>	5,67±14,93	0,28±0,53	0,42±0,83	47,19±93,55	12,36±26,03	195,77±272,36	5,55±8,50	26,89±77,08	79,12±86,16	244,93±503,83	2,24±3,96	235±365	Questo studio
			0,20256±0,0839			12,6±4,3			0,78467±0,3106	228,9±17,2		22,43±15,4		Yediler et al. 1993
	<i>Phoca vitulina</i>											15,958±2,011		Brookens et al. 2008
	<i>Pusa hispida ladogensis</i>		0,96±0,53			22,50±28,9			6,34±9,09	323,84±283	4,11±3,92	17,49±16,97		Medvedev et al. 1997
	<i>Pusa hispida hispida</i>		1,45±0,79			14,10±9,99			1,58±1,33	177,5±44,32	2,32±1,26	4,26±1,37		Medvedev et al. 1997
	<i>Pusa sibirica</i>											3,5±1,6		Watanabe et al. 1998
<i>Erignathus barbatus</i>		1,30±0,43				5,77±4,22			1,42±0,80	146,4±65,91	3,11±1,83	0,78±0,21	Medvedev et al. 1997	

Tabella II. Elementi in traccia in *M. monachus* ed altre specie di focidi

Idrocarburi policiclici aromatici

Questo studio si propone di riportare i primi risultati relativi alla valutazione quali-quantitativa dei contaminanti lipoaffini idrocarburi policiclici aromatici (IPA) in campioni di grasso sottocutaneo (n=55) di esemplari di foca monaca (*Monachus monachus*) deceduti in Grecia. La popolazione presenta valori pari a $636,94 \pm 1044,20$ ng/g p.s., con un *range* che spazia da un minimo di 69,06 ng/g ad un massimo di 7894,07 ng/g p.s. I dati ottenuti per singolo esemplare, espressi in peso secco, sono riportati nella sezione Allegati, tabella 1, con indicata la percentuale d'acqua (H₂O%) che permette di calcolare le concentrazioni in peso fresco.

I risultati mostrano già a prima vista una chiara eterogeneità, e per questo motivo sono stati elaborati e presentati considerando come possibili fonti di variabilità diversi parametri, quali anno di decesso, luogo di ritrovamento dell'individuo, sesso e classe di età. Gli idrocarburi policiclici aromatici sono stati analizzati come **ΣIPA Totali** (somma di Naftalene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, B(g,h,i)perilene, B(k)fluorantene, B(a)pirene, B(a)antracene, Crisene, B(b)fluorantene, DiB(a,h)anthracene) e **ΣIPA Cancerogeni** (somma di B(k)fluorantene, B(a)pirene, B(a)antracene, Crisene, B(b)fluorantene, DiB(a,h)anthracene).

L'elaborazione statistica è stata realizzata togliendo dal *dataset* l'esemplare ID230 (femmina, giovanile, ritrovato nel 2011 nell'isola di Aloniso, Sporadi), il quale presentava dei livelli di ΣIPA anomali, pari a 7894 ng/g p.s, ed in quanto tale considerato come *outlier*.

Il test delle varianze (Test di Kursal-Wallis), applicato ai parametri località, sesso e classe d'età, non ha mostrato differenze significative ($p > 0.05$) in alcun caso, risultando così inutile applicare un'investigazione più approfondita per vagliare potenziali differenze tra 2 ranghi attraverso l'uso di altri tipi di test non parametrici, come il test di Kolmogorov-Smirnov. Le differenze verranno quindi descritte esclusivamente in base al dato grafico.

1. Località

Le aree di provenienza dei campioni sono state analizzate in diverse modalità, al fine di estrarre al meglio informazioni utili sullo stato ecotossicologico della specie. Il ridotto numero di campioni a disposizione per questo studio non ha dato la possibilità entro ogni gruppo di provenienza di suddividere gli individui per sesso, classe d'età o anno di decesso.

Inizialmente si è cercato di testare le due macroaree greche distinte geograficamente in Mar Ionio e Mar Egeo. Successivamente si è suddiviso la macro area del Mar Egeo in due sub-macroaree (Nord e Sud Egeo) al fine di saggiare un eventuale effetto diluente del mare nelle isole pelagiche meridionali, quali Cicladi e Dodecaneso. Infine è stata esaminata una suddivisione basata sulla provenienza geopolitica dei campioni. Sono state individuate così otto microaree: Cicladi, Isole del Nord Egeo, Sporadi, Attica, Dodecaneso, Evia, Calcidica e Isole Ionie.

Statisticamente, nessuna differenza significativa è stata evidenziata nei livelli di IPA totali e cancerogeni né per Mar Ionio-Mar Egeo ($p=0,5101$) né per Mar Ionio-Nord Egeo-Sud Egeo ($p=0,3595$).

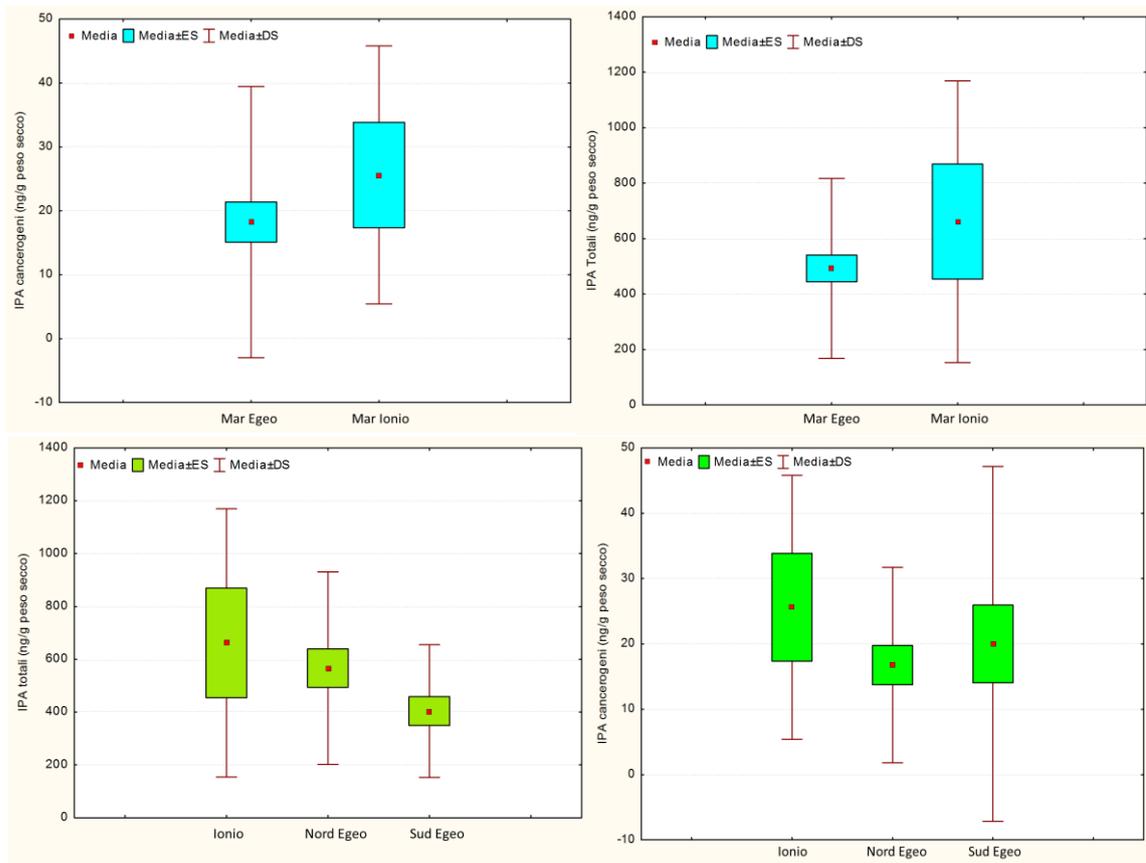


Figura 4.17. IPA totali e cancerogeni in esemplari di *M. monachus* nelle due forme di macroaree testate: Mar Egeo-Mar Ionio e Mar Ionio-Nord Egeo-Sud Egeo

Gli esemplari delle colonie abitanti le isole del Mar Ionio sembrano ad ogni modo mostrare livelli maggiori di quelle del Mar Egeo, e lo stesso andamento si riscontra se si scompone il Mar Egeo nelle due sub-macroaree Nord e Sud Egeo. L'andamento degli IPA totali rispecchia quello degli IPA cancerogeni, ad eccezione del Sud Egeo, il quale mostra in media le più basse concentrazioni di IPA totali, ma quelle di IPA cancerogeni sono leggermente inferiori ai livelli riscontrati per il Mar Ionio.

L'analisi statistica più approfondita tra le diverse microaree non ha sottolineato anche in questo caso differenze significative (IPA Totali $p=0,5206$; IPA Cancerogeni $p=0,5118$) e l'elaborazione grafica si è dimostrata congrua col risultato del Test di Kursal-Wallis, mettendo in evidenza un'uniformità delle località, nonostante Sporadi e Calcidica presentino livelli mediamente inferiori di IPA cancerogeni (rispettivamente $6,31\pm 3,07$ ng/g p.s. e $7,93\pm 4,06$ ng/g p.s.).

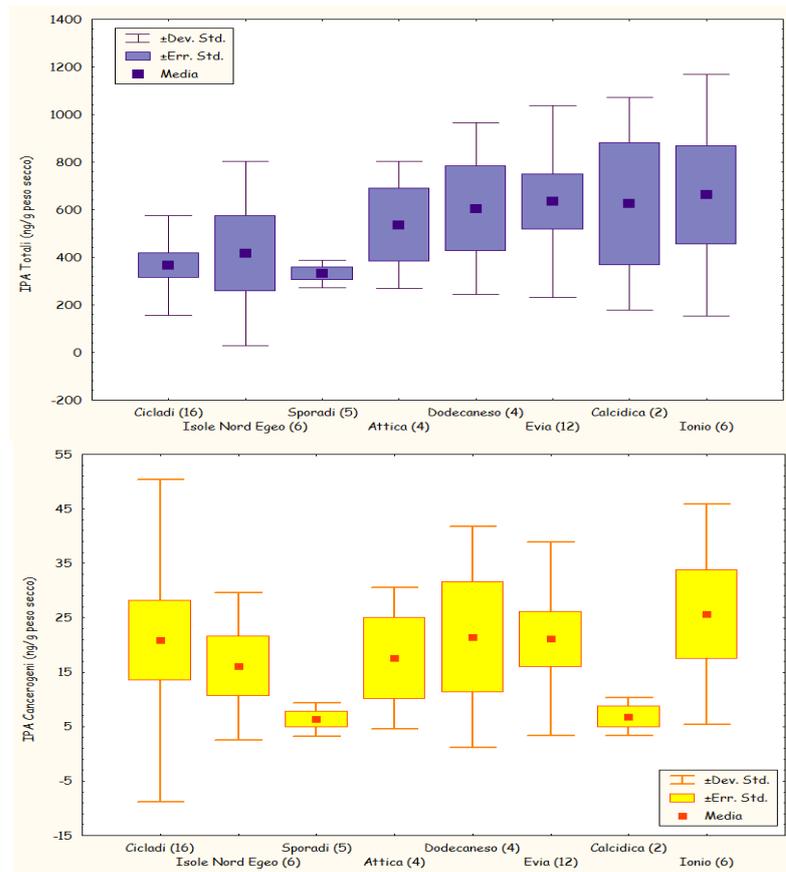
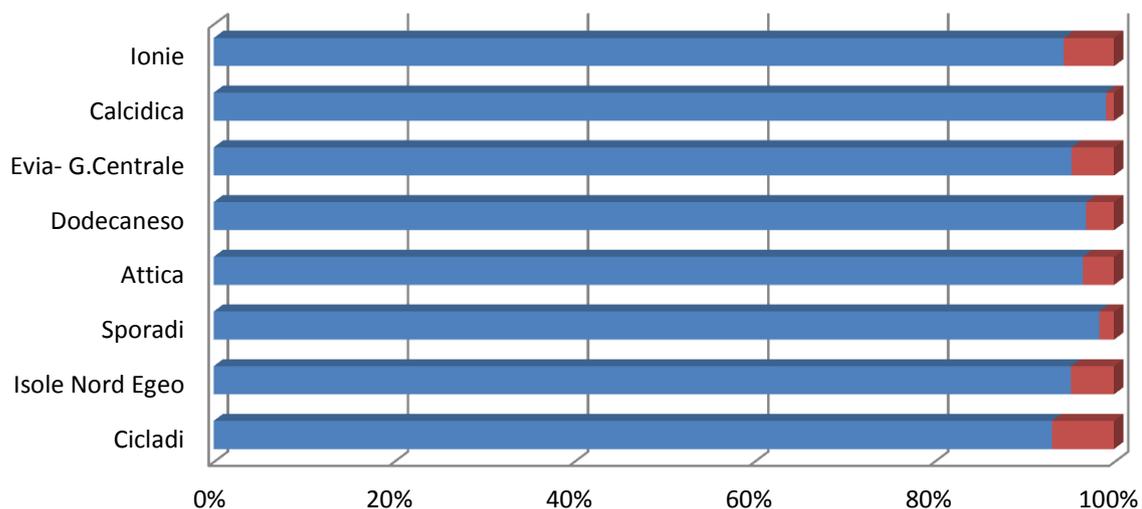


Figura 4.18. IPA totali e cancerogeni in esemplari di *M. monachus* suddivisi per microaree geografiche

Le differenze che graficamente risaltano maggiormente nel confronto dei livelli di IPA Totali ed IPA Cancerogeni sono Cicladi e Calcidica. Gli esemplari provenienti dalle Cicladi infatti mostrano bassi livelli di IPA Totali ed elevati livelli di IPA Cancerogeni. Per quelli della Calcidica invece appare un *trend* inverso. È chiaro quindi che le diverse colonie di foca monaca in Grecia mostrano un diverso *fingerprint* tossicologico per i contaminanti IPA e conseguentemente possono subire pressioni di carattere diverso a seconda dell'area geografica in cui risiedono. Dal grafico 4.17 si evince infatti come l'esposizione a IPA cancerogeni sia maggiore nelle colonie di foca monaca residenti nelle Isole Ionie (5,58%) e Cicladi (6,89%).



	Cicladi	Isole Nord Egeo	Sporadi	Attica	Dodecaneso	Evia-G.Centrale	Calcidica	Ionie
■ altri IPA	93,11	95,20	98,34	96,54	96,91	95,29	99,11	94,42
■ ΣIPAcanc	6,89	4,80	1,66	3,46	3,09	4,71	0,89	5,58

Grafico 4.17. Profilo tossicologico di contaminanti IPA cancerogeni in *M. monachus* analizzato in base alla microarea geografica di provenienza ed espresso come percentuale rispetto agli altri idrocarburi analizzati.

2. Sesso

Un'analisi in funzione del sesso degli esemplari di foca monaca disponibili è stata applicata per evidenziare eventuali differenze, in quanto è considerato uno tra i fattori più importanti da prendere in considerazione quando si effettuano confronti intra- ed inter-specie in merito ai livelli di contaminanti lipoaffini nei mammiferi marini (Aguilar et al., 1999). Aguilar et al. (1999) hanno descritto per primi una correlazione positiva tra età e concentrazioni di OCs nel maschio, mentre nelle femmine questa relazione non era riscontrabile in quanto il trasferimento di contaminanti dalla madre alla prole influenza le concentrazioni dei contaminanti nei tessuti delle femmine riproduttive. Studi condotti su coppie di madre-cucciolo hanno dimostrato che quantità significative di contaminanti liposolubili possono essere trasferite alla prole sia via placenta che attraverso l'allattamento (Aguilar e Borrell, 1994; Ridgway e Reddy, 1995; Ylitalo et al., 2001), essendo il latte estremamente ricco di grassi. Il latte di alcuni pinnipedi è stato stimato contenere una percentuale di lipidi variabile tra il 20-65% in funzione del periodo di allattamento (Atkinson, 1997). Per le femmine riproduttive quindi questo trasferimento rappresenta una

importante perdita di contaminanti e quindi un vero e proprio processo di detossificazione dell'organismo.

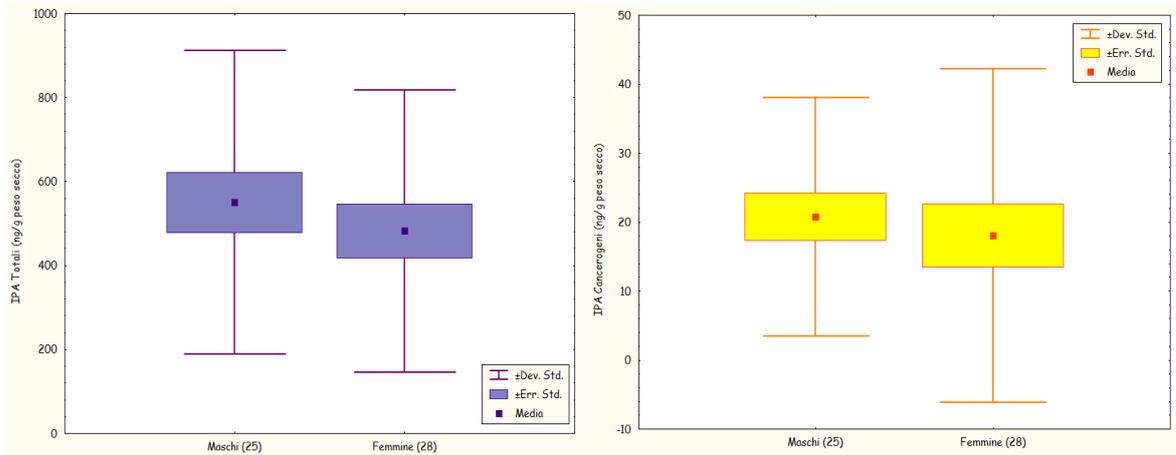


Figura 4.19. Differenze tra maschi e femmine nei livelli di IPA totali e cancerogeni in *M. monachus*

Nel caso studio qui indagato, i maschi di foca monaca mostrano coerentemente alla letteratura livelli, seppur non statisticamente significativi, maggiori rispetto alle femmine sia di IPA Totali ($549,31 \pm 361,69$ ng/g p.s. e $481,82 \pm 336,04$ ng/g p.s. rispettivamente) che di IPA Cancerogeni ($20,73 \pm 17,27$ ng/g p.s. nei maschi e $18,03 \pm 24,21$ ng/g p.s. nelle femmine). Nel profilo tossicologico (grafico 4.18) i due sessi si mostrano comparabili.

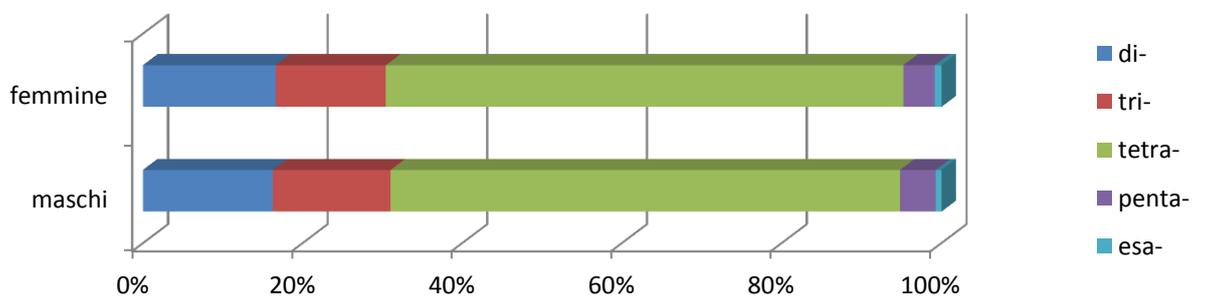


Grafico 4.18. Profilo tossicologico di IPA in maschi e femmine di *M. monachus*

3. Classe d'età

Come il sesso, la classe d'età è un importante fattore di cui tener conto nelle analisi intraspecifiche di contaminanti lipoaffini soggette a bioaccumulo

(Aguilar et al., 1999). In questo caso, è stato possibile considerare differenze entro classe d'età tra maschi e femmine.

Tra le tre classi d'età indagate (cuccioli, giovanili ed adulti) si evidenziano due *trend* differenti a seconda che si osservino i livelli di IPA totali o di IPA cancerogeni. I primi mostrano elevate concentrazioni nei cuccioli, seguiti poi da adulti e giovanili (questi due paragonabili). Il fatto che i cuccioli presentino i livelli maggiori di IPA Totali è presumibilmente legato al trasferimento di questo tipo di contaminanti attraverso l'allattamento da parte delle madri. Entro ogni singola classe si evidenziano andamenti differenti tra i due sessi. Generalmente i maschi presentano livelli maggiori delle femmine, conformemente alla letteratura, ad eccezione della classe adulta, nella quale le femmine presentano valori più elevati (549,38±386,53 ng/g p.s.; *range* 125,64-1131,64 ng/g p.s.) degli individui maschi (394,19±391,45 ng/g p.s.; *range* 172,88-1090,32 ng/g p.s.).

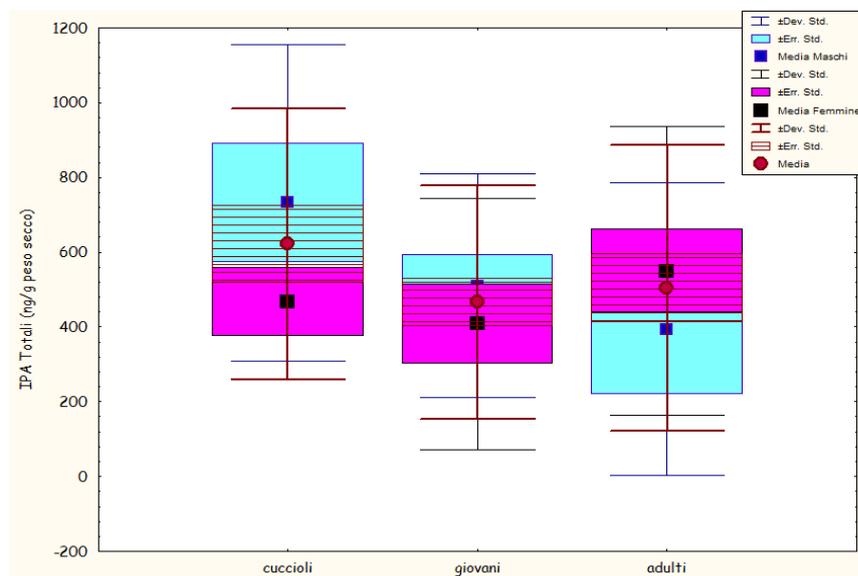


Figura 4.20. Differenze nei livelli di IPA totali tra classi di età di *M. monachus*. Per ogni classe si sono analizzate differenze tra sessi.

Il dato risulta sorprendente in quanto le femmine raggiunta la maturità sessuale e, quindi, in grado di riprodursi, dovrebbero presentare livelli più bassi degli esemplari maschili. È riconosciuto che uno dei fattori minante lo stato della foca monaca del Mediterraneo è il basso tasso riproduttivo della specie, fatto che potrebbe giustificare i livelli delle femmine adulte del presente studio,

ma mancano degli approfonditi referti necroscopici degli individui per decretare effettive problematiche di tipo riproduttivo, quali sterilità o raggiungimento di un'età avanzata per la riproduzione, e/o di tipo biologico-ambientale, come l'uso a scopo turistico delle grotte in cui la specie è solita partorire ed allevare la prole.

Per quanto riguarda invece il *trend* degli IPA cancerogeni, cuccioli e giovani mostrano livelli inferiori degli adulti per entrambi i sessi. La maggiore persistenza di questi contaminanti nel tessuto adiposo degli adulti, li rende probabilmente poi meno biodisponibili nel trasferimento madre-cucciolo.

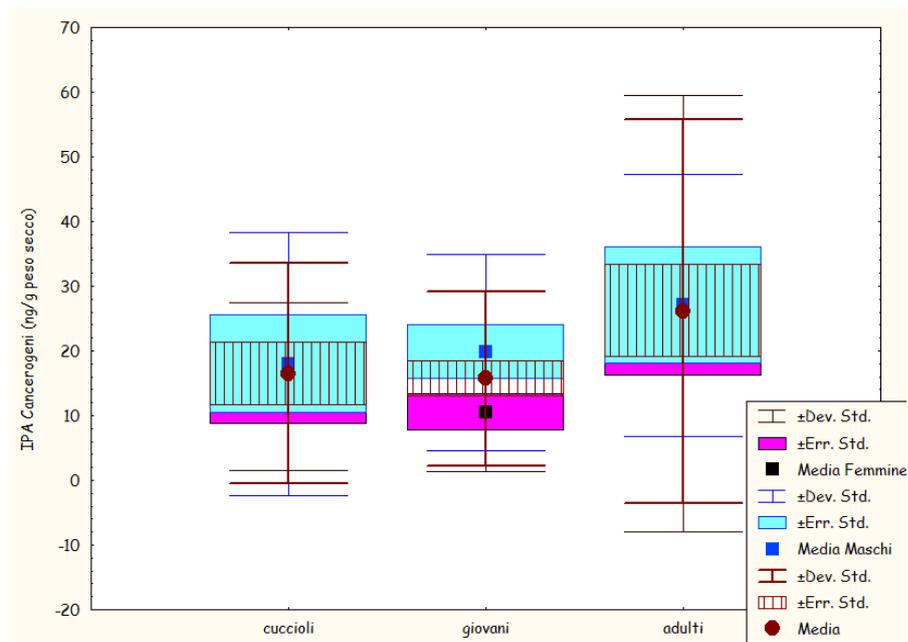


Figura 4.21. Differenze nei livelli di IPA cancerogeni tra classi di età di *M. monachus*.

Per ogni classe si sono analizzate differenze tra sessi.

Anche l'analisi del *fingerprint* tra classi mostra differenze solo nella percentuale di IPA cancerogeni presenti, inferiori nei cuccioli (2,46%) e via via crescenti nei giovani (4,22%) e negli adulti (7,49%), denotando una diversa pressione tra classi di età data dai contaminanti idrocarburi policiclici aromatici.

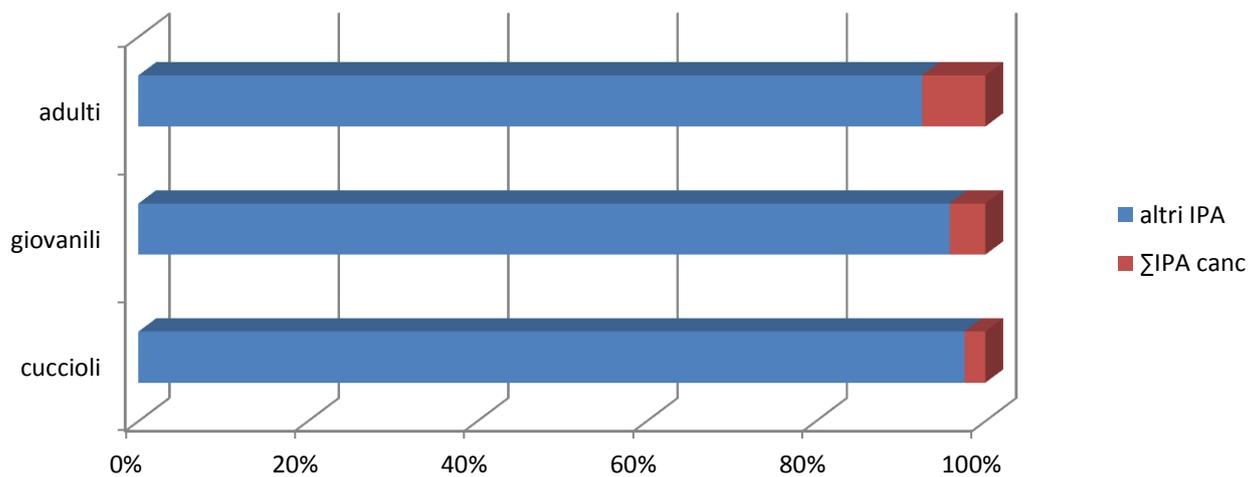


Grafico 4.19. Profilo tossicologico di contaminanti IPA cancerogeni nelle tre classi d'età (cuccioli, giovanili, adulti) in *M. monachus* espresso come percentuale rispetto agli altri idrocarburi analizzati.

4. Trend temporale

Dato l'ampio *range* temporale (1995 al 2013) dei campioni a disposizione si è costruito un *trend* temporale di contaminazione da IPA Totali in foca monaca della Grecia. Questa elaborazione non tiene conto di ulteriori analisi entro gruppi, quali sesso, età o località, dato l'esiguo numero di campioni presenti per ogni anno. Gli anni più rappresentativi del *trend* qui ricostruito infatti sono il 1999, 2009 e 2011, composti ognuno da campioni di 5 esemplari. L'andamento ricostruito con gli altri anni invece è da prendere con cautela, essendo questi rappresentati da un numero inferiore di campioni, specialmente gli anni 2005 e 2007 rappresentati esclusivamente da un singolo animale. L'analisi statistica non ha colto differenze statistiche tra i vari anni ma in media si può notare una tendente diminuzione dei livelli di IPA totali nel tessuto adiposo di *Monachus monachus*, specialmente dal 2007 in poi. Infatti, si sono rilevati alti livelli nell'intervallo temporale 1995-2006, rappresentato da un valore medio di IPA Totali pari a $598,36 \pm 379,75$ ng/g p.s. (n=35), seguito da una diminuzione nel secondo intervallo 2007-2013, caratterizzato da un valore medio pari a $325,15 \pm 167,11$ ng/g p.s.; n=19). I livelli maggiori si riscontrano nel 1998, anche se il risultato è dato solamente dall'analisi di 2 esemplari.

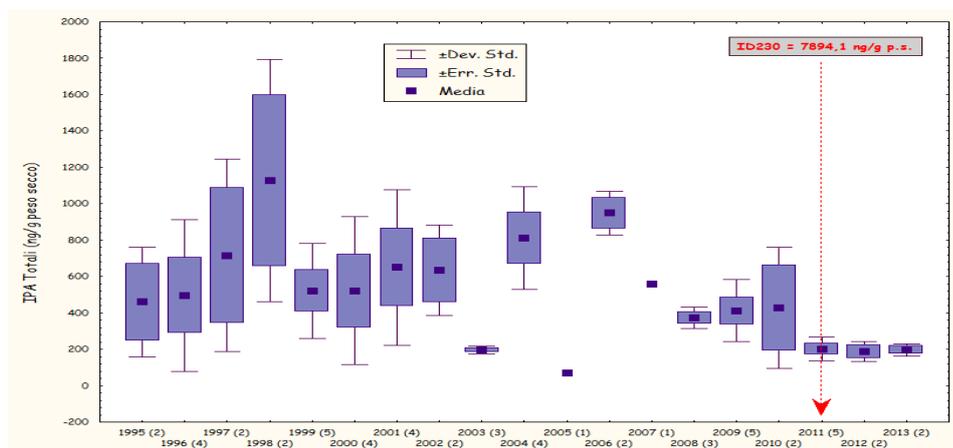


Figura 4.22. Trend temporale dei livelli di IPA totali in *M. monachus*

Il *trend* temporale elaborato per gli IPA Cancerogeni invece non mostra questa tendenza nel corso del tempo. L'analisi delle medie dei due intervalli 1995-2006 e 2007-2013 elaborati per gli IPA cancerogeni mostra un aumento delle concentrazioni nel secondo periodo, con valore medio di $22,87 \pm 27,83$ ng/g p.s.

e $16,71 \pm 15,69$ ng/g p.s. del secondo e primo intervallo temporale rispettivamente.

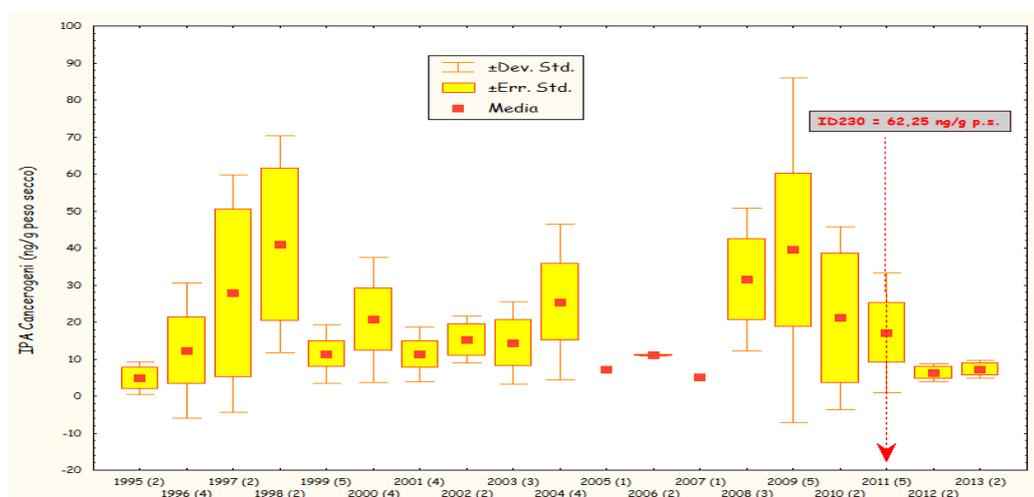


Figura 4.23. Trend temporale dei livelli di IPA cancerogeni in *M. monachus*

L'andamento opposto di IPA totali e cancerogeni fa presumere un cambiamento nella fonte di contaminazione da questi contaminanti organici, legata maggiormente ad un impatto dato da fonti pirogeniche o industriali, le quali producono soprattutto IPA alto molecolari. Gli IPA basso molecolari invece sono soprattutto legati ad un'origine petrogenica.

Anche raggruppando i diversi IPA a seconda del numero di anelli benzenici si riscontra un andamento simile, con penta- ed esaciclici che tendono ad aumentare nel secondo intervallo temporale, ossia dal 2007 in poi, specialmente negli anni 2009 e 2010, mentre i basso peso molecolare con andamento opposto, in particolare i tetraciclici (Acenaftene, Fluorene, Fenantrene ed Antracene).

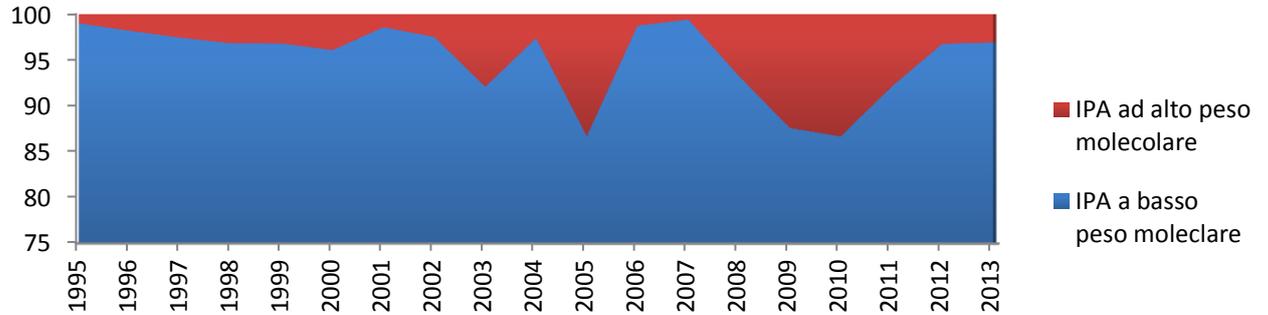


Grafico 4.20. Profilo tossicologico del trend temporale dei livelli di IPA ad alto e basso peso molecolare in *M. monachus*

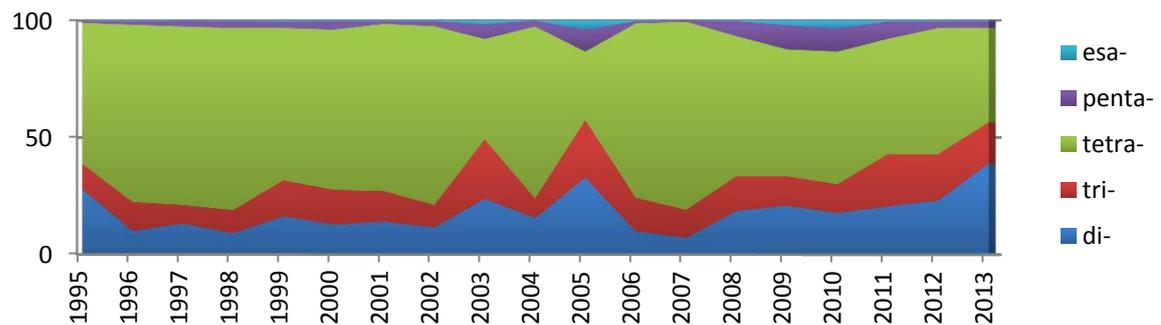


Grafico 4.21. Profilo tossicologico del trend temporale dei livelli di IPA di-, tri-, tetra-, penta- ed esa-ciclici in *M. monachus*

5. Stato di decomposizione

Per essere certi che la variabilità dei dati ottenuti non dipendesse anche dallo stato di decomposizione al momento del campionamento dell'animale, si è testata attraverso un'analisi della varianza (test di Kursal-Wallis) l'ipotesi nulla (H_0) che il valore medio di IPA totali negli esemplari campionati subito dopo la morte nel centro di riabilitazione del MOM/ the Hellenic Society for the Study and Protection of the Monk Seal fosse uguale al valore medio degli individui ritrovati deceduti lungo le coste greche. Il primo gruppo è stato catalogato come "fresco-CODICE 1" mentre il secondo come "deteriorato-CODICE 2".

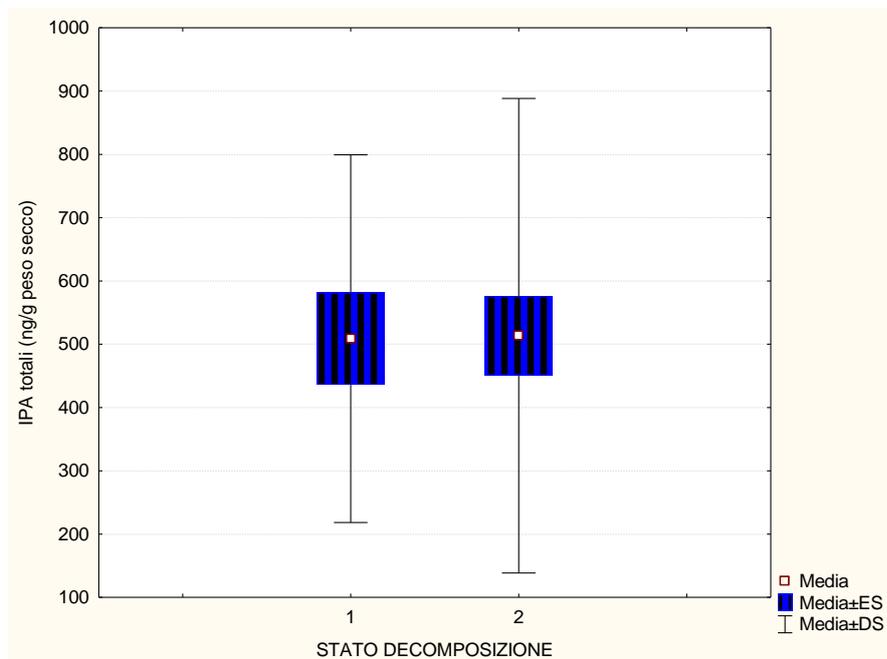


Figura 4.24. Livelli di IPA totali in campioni *freschi* e *deteriorati* di *M. monachus*.

Appare evidente sia dalla figura 4.24 sia dal valore di significatività ($p = 0,7813$) che non si ha alcuna differenza tra i due gruppi e che quindi lo stato di decomposizione del campione non va a modificare la rilevabilità dei contaminanti IPA nel blubber di foca monaca.

Il caso studio

L'esemplare escluso dai risultati ed elaborazioni statistiche finora riportati è una giovane femmina rinvenuta deceduta nell'isola di Aloniso nel 2011.

La decisione di escluderlo dalle elaborazioni è dovuto ad un anomalo valore di IPA totali del valore medio ottenuto per la popolazione greca di *Monachus monachus*, come mostrato nel grafico 4.22.

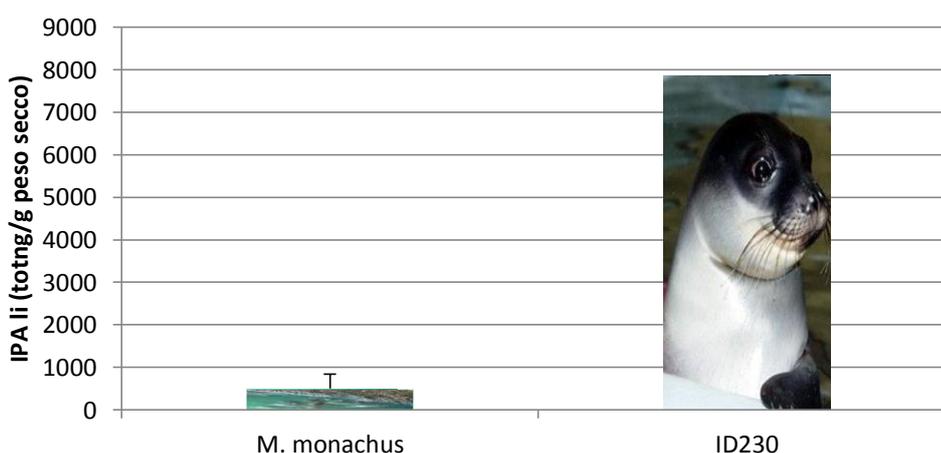


Grafico 4.22. Livelli di IPA totali nella popolazione greca di *M. monachus*, espressi come valore medio e deviazione standard, e del caso studio ID 230

Anche il *fingerprint* mostra delle differenze: il gruppo di congeneri preponderanti, calcolati come % su \sum IPA tot, in ID 230 sono i tetraciclici, con uno schiacciante contributo dato dal pirene, molecola in % più presente anche in generale per la popolazione di foca monaca, ma in proporzioni nettamente differenti (73,70% in ID 230 e 49,14% in media nelle altre foche). Il pirene (C₁₆H₁₀) è una molecola derivante alla combustione incompleta di composti organici, facilmente riscontrabile in natura, ma viene utilizzato anche nelle tinture, in erbicidi e plastiche. Test di laboratorio hanno evidenziato danni epatici in animali esposti ad una dieta ricca di pirene ma gli stessi effetti non sono mai stati riportati nell'uomo (www.epa.gov).

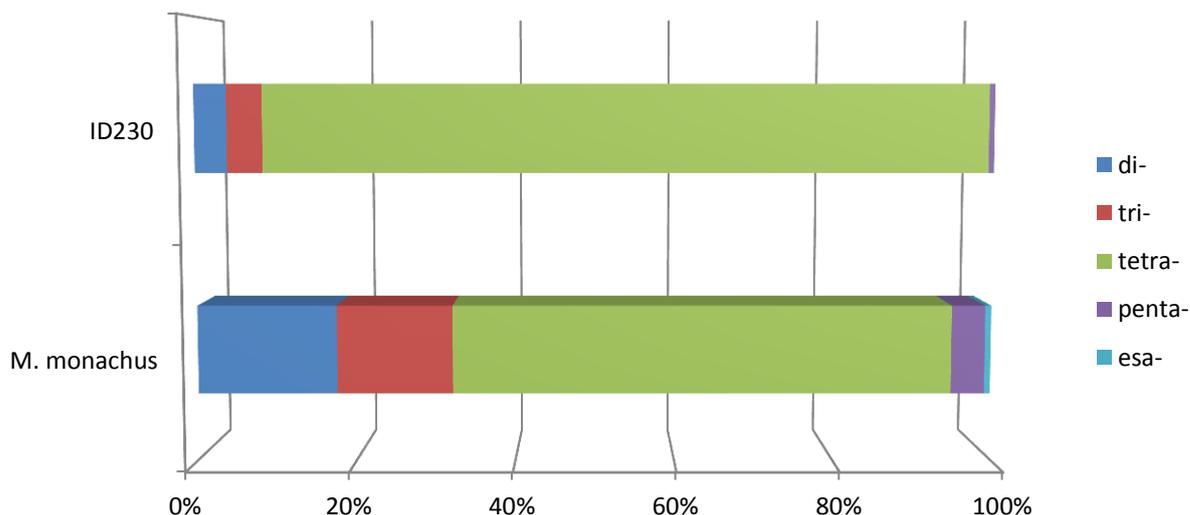


Grafico 4.23. Profilo tossicologico di IPA totali nella popolazione greca di *M. monachus* del caso studio ID 230, espresso come presenza in percentuale di idrocarburi di-, tri-, tetra-, penta- ed esa-ciclici.

Una notevole discrepanza si evidenzia anche per i di- e tri-ciclici e per gli IPA cancerogeni, questi ultimi quasi impercettibili nel *fingerprint* del caso studio (0,79%).

Discussione

Questo studio si propone di riportare i primi dati in merito alla pressione data dai contaminanti IPA (o PAHs nell'acronimo inglese) sulla popolazione greca di foca monaca (*Monachus monachus*). I livelli riscontrati, considerando tutti gli esemplari a disposizione (ID 230 compreso), sono riportati in Tabella III.

	Σ IPA totali	Σ IPA cancerogeni
media	636,94	19,67
mediana	390,39	10,99
SD	1060,31	21,44
min	69,06	1,97
max	7894,07	120,72

Tabella III. Concentrazioni IPA nella popolazione greca di *M.monachus* espresse in ng/g peso secco.

Il *fingerprint* evidenzia il pirene come congenere maggiormente presente nei campioni analizzati, con un valore medio pari al 49,58% su Σ IPA totali, seguito da naftalene e fluorantene (17,29% e 13,18% rispettivamente). Questi tre congeneri sono definiti a basso peso molecolare e la loro elevata presenza nel totale dei 14 IPA analizzati è data dalle loro caratteristiche fisico-chimiche, quali idrosolubilità e biodisponibilità. Un'analogo profilo è stato descritto da Cagnazzi et al. (2013) in esemplari australiani di *Orcaella heinsohni* e *Sousa chinensis*. La somma dei cinque IPA più cancerogeni invece è pari a un valore medio di 4,83% (*range* 0,53-39,37%).

I confronti con la letteratura esistente in merito a livelli di IPA in pinnipedi sono essenzialmente due: uno su otaridi (Marsili et al., 1997) e uno su focidi (Zitko et al., 1998). La popolazione oggetto di questo studio vede valori medi paragonabili a quelli riportati da Marsili et al. (1997) in *Otaria flavescens* di Punta Bermeja e inferiori a quelli della colonia di Mar de la Plata. Un raffronto invece con i dati riportati da Zitko et al. (1998) in *Phoca groenlandica* del Labrador risulta difficile in quanto il numero totale congeneri IPA analizzati è inferiore rispetto al presente studio.

Rispetto ad altri mammiferi marini residenti nel Mar Mediterraneo invece, Marsili et al. (2001) hanno riportato livelli in *Stenella coeruleoalba* maggiori che in *Balenoptera physalus* (36205±41107 ng/g p.f. e 9052,50±21304 ng/g p.f. rispettivamente), coerentemente col livello trofico occupato dai due cetacei, il primo predatore e il secondo filtratore. I risultati qui ottenuti per *Monachus monachus* sono mediamente inferiori (1107,11±2119,44 ng/g b.l.) a *B. physalus*, ma il *range* sembra sovrapporsi a quello del mysticete (*B. physalus*=228,60-83662 ng/g p.f. versus *M. monachus*= 72,47-13471,11 ng/g b.l.).

Infine, rispetto ad altri lavori effettuati sui livelli IPA in mammiferi marini nel resto del mondo, il lavoro di Kannan e Perrotta (2008) in fegati di lontra marina della California (*Enhydra lutris nereis*) sembrano i più affini ai livelli riscontrati per *M. monachus*, avendo *range* pari a 66-5700 ng/g p.s. e valore medio 584 ng/g p.s.

Il metabolismo e gli effetti di alcuni IPA sono stati ben documentati in diverse specie di mammiferi terrestri attraverso test di laboratorio, ma ad oggi si ha ancora una scarsa documentazione sugli effetti in mammiferi selvatici e ancor

più per quel che concerne gli organismi in ambiente marino (Eisler 2000). Differenze specie-specifiche nella sensibilità alla cancerogenesi e mutagenesi sembrano essere legate in gran parte a differenze nei livelli di attività delle MFO (Eisler 2000). È difficile quindi individuare quanto i livelli di IPA Totali rilevati nella popolazione greca di foca monaca affliggano la popolazione stessa. Certo è che tutti e 14 i congeneri analizzati sono stati riscontrati in tutti e 55 i campioni a disposizione e perciò gli idrocarburi policiclici aromatici vanno considerati come contaminanti presenti in ambiente e fonte di stress per la specie, specialmente in certe aree della Grecia nelle quali sono risultati in % su Σ IPA totali livelli particolarmente elevati di IPA cancerogeni (Isole Ionie e Cicladi). Allo stesso modo, è bene sottolineare che, oltre a variabili di tipo geografico, la popolazione di foca monaca risente in modo differente della contaminazione da IPA a causa di variabili di tipo biologico, quali classe d'età e sesso. Nello specifico, i maschi adulti mostrano livelli maggiori di IPA cancerogeni rispetto a cuccioli e giovani, rendendoli più soggetti a fenomeni cancerogeni. Inoltre i cuccioli di ambedue i sessi mostrano concentrazioni di IPA totali più elevati di giovani ed adulti, indice del fatto che durante l'allattamento avviene un trasferimento di questi tossici da parte delle madri.

Organoclorurati

Gli ultimi studi pubblicati in merito all'esposizione di *Monachus monachus* a contaminanti organoclorurati risalgono a meno di dieci anni fa ma i campioni utilizzati al periodo 1996-1999 (Borrell et al., 2007). Con questa tesi si propone di aggiornare le conoscenze in merito all'esposizione di questa tipologia di contaminanti nella popolazione di foca monaca residente nel territorio greco.

Le pubblicazioni antecedenti al qui presente lavoro (Cebrian et al., 1993; Borrell et al., 1993, 2007) hanno lavorato confrontando pochi esemplari di diverse popolazioni presenti nel Mar Mediterraneo. In generale le colonie residenti lungo le coste atlantiche (Capo Blanco e Madeira) mostrano livelli inferiori a quelle residenti all'interno del bacino mediterraneo. Nel 2007, Borrell et al. riportano livelli pari a 1.07 ± 0.78 e 24.71 ± 32.19 $\mu\text{g/g}$ b.l. rispettivamente per le colonie di Cabo Blanco e della Grecia.

Come per l'analisi degli idrocarburi policiclici aromatici, per questo studio si è utilizzata solamente la matrice adiposa (o *blubber*) di 49 esemplari di foca monaca (*Monachus monachus*) deceduti in Grecia. La popolazione mostrava valori altamente eterogenei e si è deciso di escludere due esemplari dalla elaborazione statistica in quanto considerati outlier. Questi due sono ID 97 e 107, due femmine adulte campionate nel 1997 e 1999 rispettivamente (Grafico 4.24). ID 97 presentava un valore di OCs pari a 1.695.715,95 ng/g peso secco mentre ID 107 pari a 1.183.501,36 ng/g peso secco. In media invece la popolazione di foca monaca (escludendo i due esemplari) mostrava un valore pari a $69.994,05 \pm 81.458,21$ ng/g peso secco. I risultati per singolo esemplare, in peso secco, sono riportati nella sezione Allegati, tabella 1, con indicata la percentuale di materia organica estratta (MOE%), che permette di passare ai livelli su base lipidica.

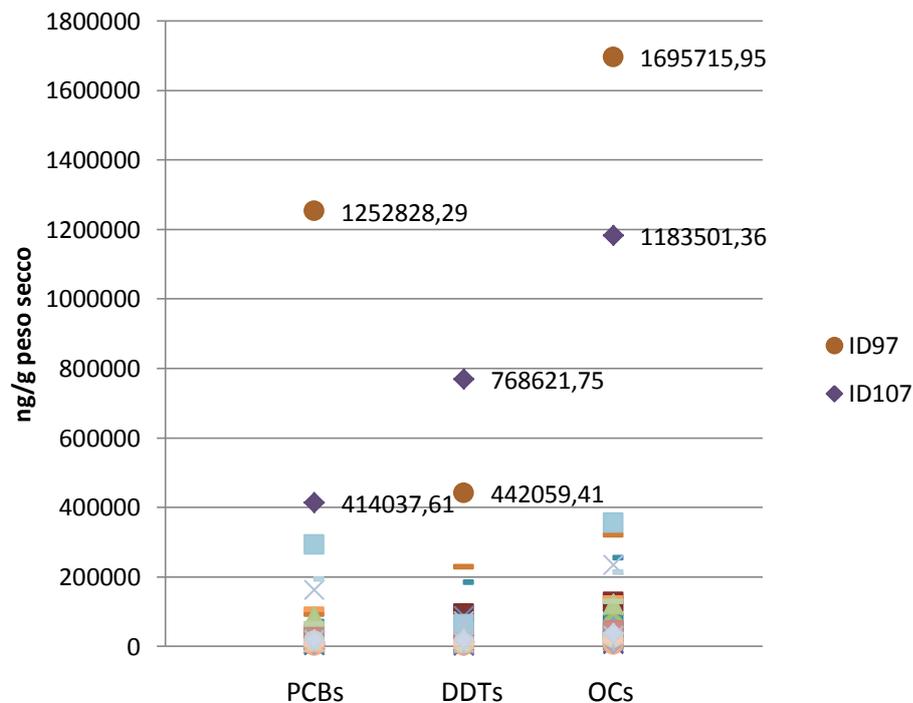


Grafico 3.24. Concentrazioni di OCs, PCBs e DDTs nei 49 esemplari analizzati di *Monachus monachus*

Il test delle varianze (Test di Kursal-Wallis), applicato ai parametri località, sesso e classe d'età, non ha mostrato differenze significative ($p > 0.05$), risultando così anche in questo caso inutile investigare più dettagliatamente. Le differenze verranno quindi descritte esclusivamente in base al dato grafico.

I risultati sono stati elaborati ed analizzati come Σ PCBs (somma di 26 congeneri: PCB 95, 101, 99, 151, 144_1, 149_1, 146, 153, 141, 138, 178, 187, 183, 128, 174, 177, 156_1, 172, 180, 199, 170, 196, 201, 195, 194, 206), Σ DDTs (somma di *o.p'*DDE, *p.p'*DDE, *o.p'*DDD, *p.p'*DDD, *o.p'*DDT, *p.p'*DDT), HCB e Σ OCs (somma di Σ PCBs, Σ DDTs e HCB).

1. Località

Come per l'elaborazione dei risultati ottenuti dei contaminanti IPA, le aree di provenienza dei campioni sono state analizzate in tre diversi modi:

- Macroaree Mar Ionio e Mar Egeo;
- Macroaree Mar Ionio, Nord Egeo e Sud Egeo;

- Microaree Cicladi, Isole del Nord Egeo, Sporadi, Attica, Dodecaneso, Evia, Calcidica e Isole Ionie.

Statisticamente, nessuna differenza significativa è stata evidenziata dal test di Kursal-Wallis (Tabella IV) nei livelli di contaminanti OCs per le due macro aree Mar Ionio-Mar Egeo e Mar Ionio-Nord Egeo-Sud Egeo, anche se graficamente si vede che mediamente le aree dell'Egeo mostrano individui con livelli maggiori che in quelli del Mar Ionio, come mostra la figura 4.25.

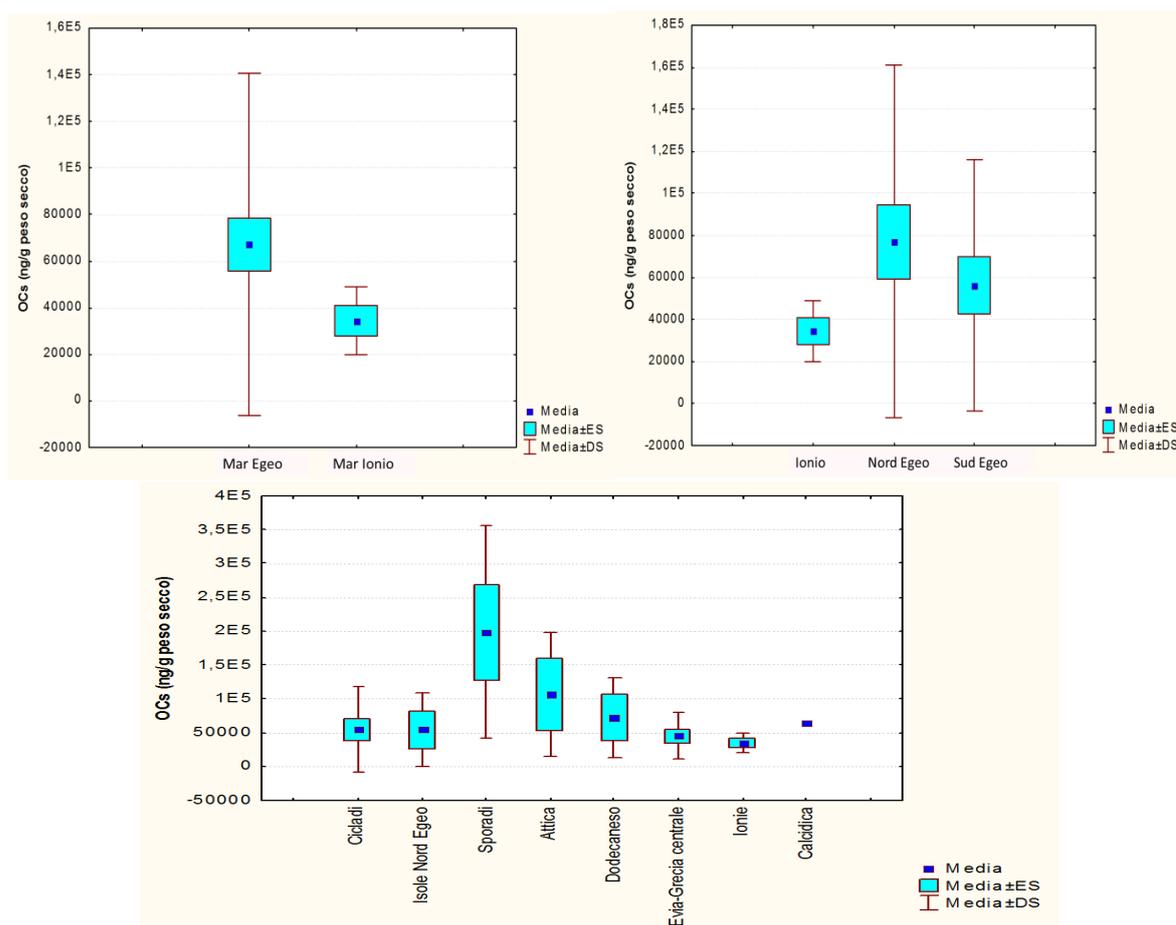


Figura 4.25. Differenze tra i livelli di OCs in *M. monachus* in base all'area geografica testata.

Allo stesso modo, anche per le otto microaree, nelle quali gli esemplari di foca monaca sono stati rinvenuti deceduti, non si nota alcuna differenza statisticamente significativa ($p=0,4397$), anche se Sporadi ed Attica sono le due località che mostrano livelli medi più elevati di tutte le altre zone testate, avendo rispettivamente $198.649,27 \pm 157.321,44$ ng OCs/g peso secco e $106.712,53 \pm 92.146,41$ ng OCs/g peso secco.

Area	Locazione	HCB	DDTs	PCBs	Ocs
Macroaree	<i>Mar Ionio/Mar Egeo</i>	p=0,6273	p=0,7374	p=0,7642	p=5604
Macroaree	<i>Mar Ionio/Nord Egeo/Sud Egeo</i>	p=0,4421	p=0,6525	p=0,7051	p=0,4491
Microaree	<i>Cicladi/Dodecaneso/Evia/Ionie/Isole Nord Egeo/ Sporadi/Attica/Calcidica</i>	p=0,8002	P=0,3634	P=0,6126	p=0,4397

Tabella IV. *p-values* ottenuti dal test non parametrico delle varianza (Test di Kursall-Wallis) per i parametri di località considerati.

Di seguito, le singole classi di contaminanti organoclorurati verranno trattate singolarmente.

Policlorobifenili (PCBs)

I policlorobifenili (PCBs) risultano essere il gruppo di contaminanti più influente nell'inquinamento da organoclorurati nella foca monaca della Grecia. L'esposizione ai PCBs si dimostra essere dall'analisi statistica uniforme nella popolazione ($p > 0.05$), anche se una visione grafica fa intuire una maggior pressione per le colonie dell'Egeo, più specificatamente per Attica e Sporadi.

Mediamente *Monachus monachus* in Grecia appare esposta a $37.324,35 \pm 54.597,88$ ng PCBs/g peso secco, un livello inferiore a quello associato alla possibilità di carcinoma ($\sum \text{PCBs} = 77\,000$ ng/g l.w.) in leone marino californiano (*Zalophus californianus*) (Ylitalo et al., 2005). Nonostante ciò, alcune zone e conseguentemente alcune colonie sembrano maggiormente a rischio di effetti cancerogeni dati dall'esposizione a PCBs (Sporadi = $95.774,58 \pm 115.929,67$ ng PCBs/g p.s; Attica = $85.980,70 \pm 93.587,51$ ng PCBs/g p.s.).

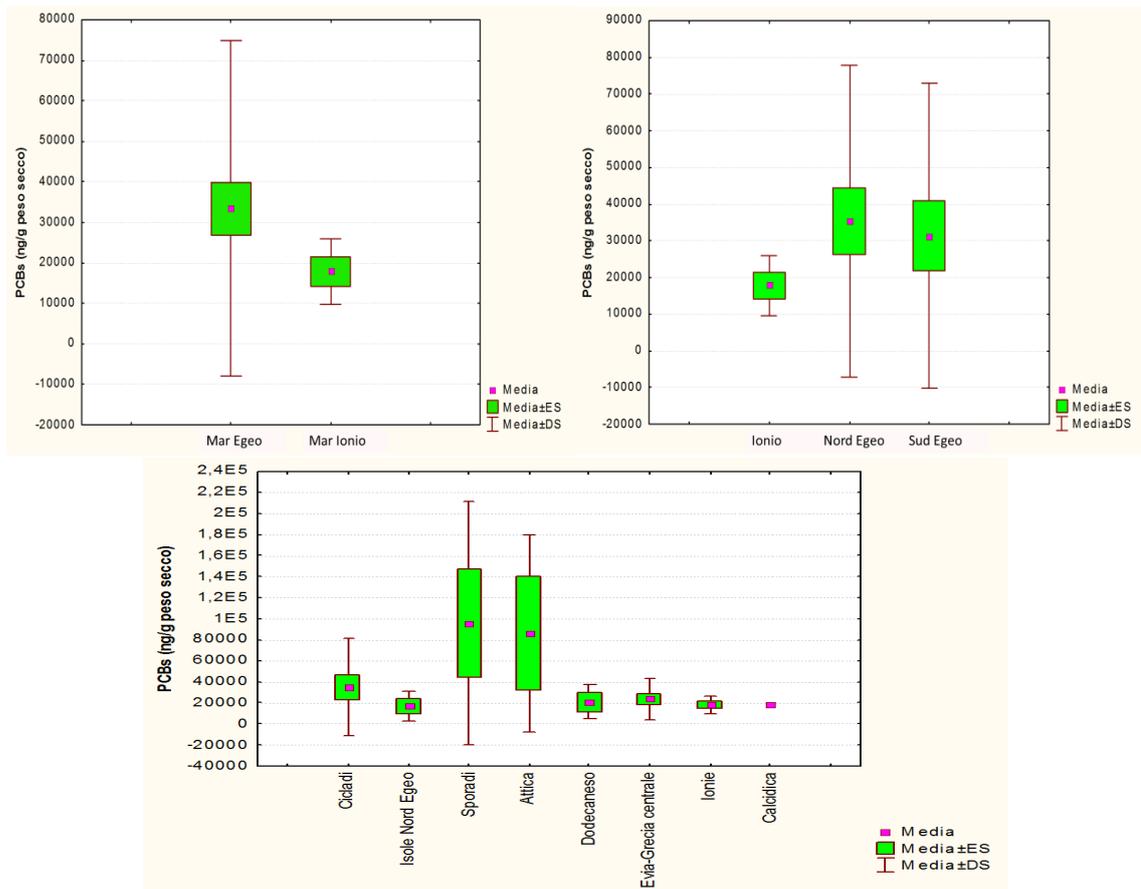


Figura 4.26. Differenze tra i livelli di PCBs in *M. monachus* in base all'area geografica testata.

Oltre alla diversa quantità in sé di PCBs a cui le colonie di foca monaca sono soggette, anche la composizione in percentuale sulla somma totale (\sum PBCs) potrebbe influire diversamente sullo stress da contaminanti in questa specie. Ma l'analisi grafica del *fingerprint* dei PCBs mostra una tipologia di esposizione abbastanza omogenea tra le diverse aree geografiche.

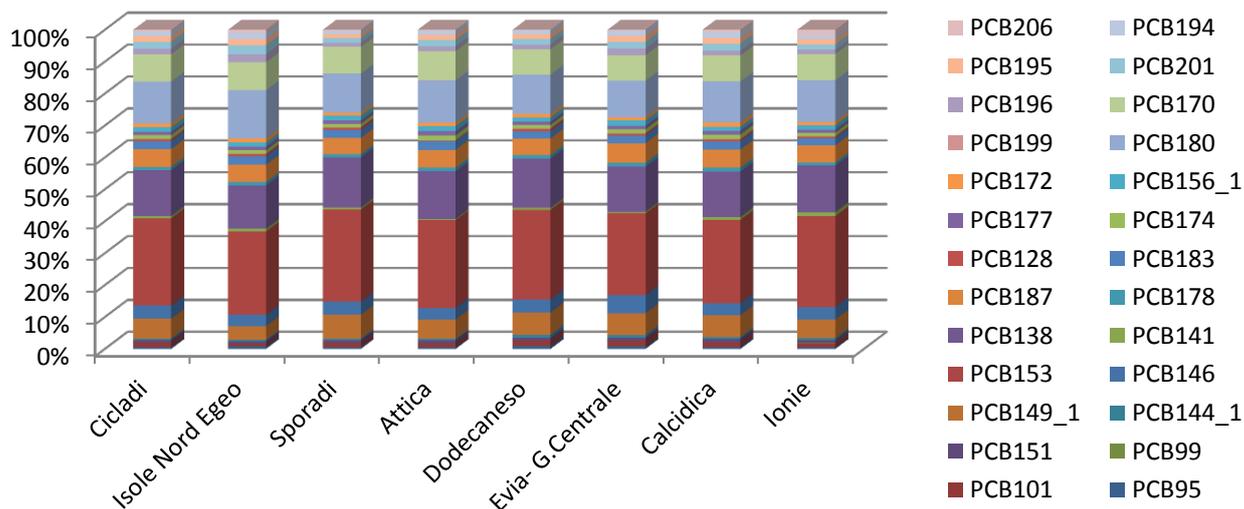


Grafico 4.25. Profilo tossicologico di PCBs in *M. monachus* a seconda della microarea testata.

Il congenere preponderante è il PCB 153, presente in media al 27,12% sulla Σ PCBs, in accordo con numerosi altri studi condotti su diverse specie di pinnipedi (Peterson et al., 2014), seguito da PCB 138 (14,51%) e PCB 180 (12,85%).

Pesticidi organoclorurati

Il DDT, nelle sue forme *orto* e *para*, insieme ai suoi metaboliti, sono il secondo gruppo di contaminanti organoclorurati più influente per la popolazione greca di foca monaca.

Dall'analisi statistica si evince che, come per i PCBs, anche l'esposizione ai pesticidi organoclorurati è sostanzialmente omogenea ($p > 0.05$). Il dato grafico ad ogni modo ripropone lo stesso *trend* osservato per i PCBs e OCs, con gli individui ritrovati nell'Egeo aventi livelli maggiori di quelli ritrovati nello Ionio e più nel dettaglio con la località delle Sporadi maggiormente esposta rispetto a tutte le altre sette microaree.

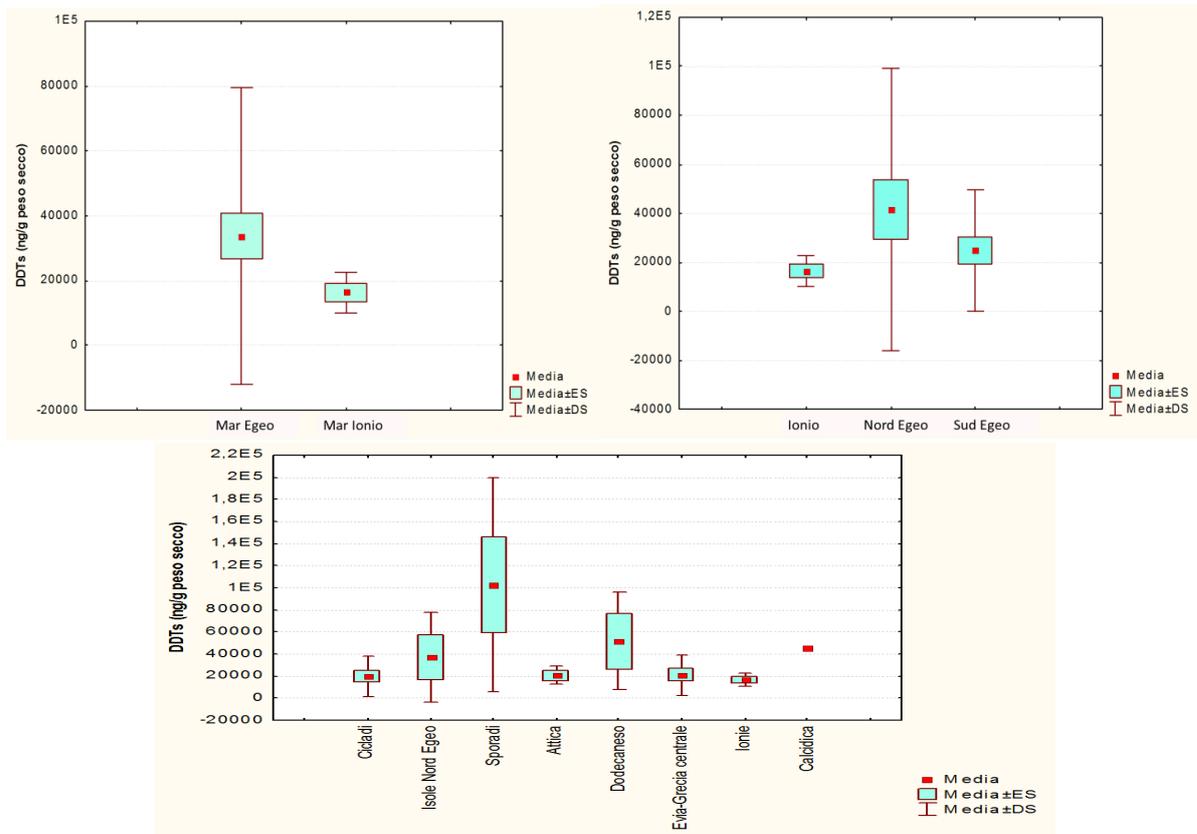


Figura 4.27. Differenze tra i livelli di pesticidi organoclorurati in *M. monachus* in base all'area geografica testata.

Il *fingerprint* dei pesticidi organoclorurati si mostra anche qui abbastanza uniforme, con il *p.p'* DDE quale congenere primario (in media 91,76%), seguito dal *p.p'* DDT al 3,66%. L'Attica risulta la zona in cui le foche sono maggiormente esposte al DDT (6,20%).

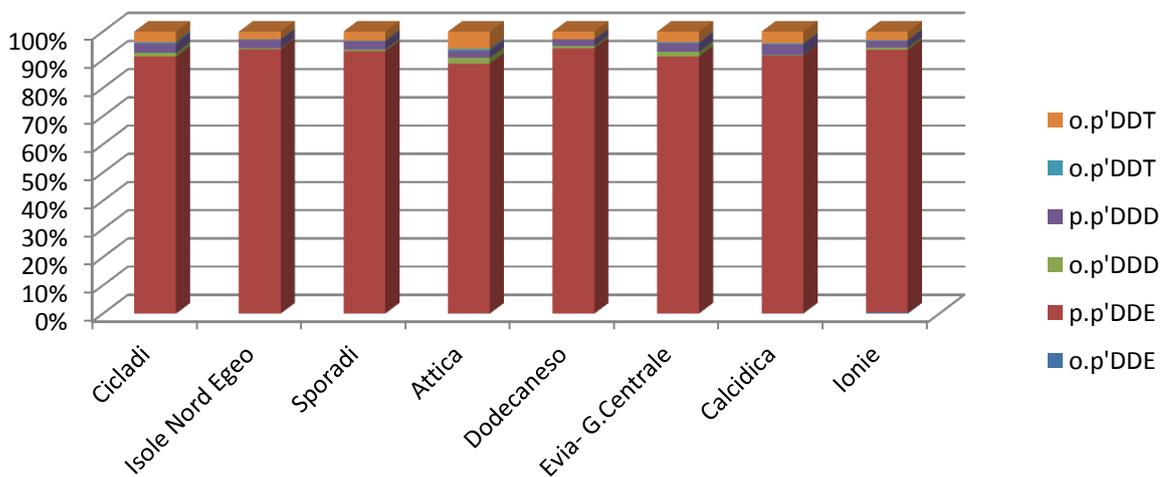


Grafico 4.26. Profilo tossicologico di pesticidi organoclorurati in *M. monachus* a seconda della microarea testata.

Esaclorobenzene (HCB)

L'esaclorobenzene, come tutti gli altri contaminanti organoclorurati, si distribuisce sul piano spaziale in maniera tale che all'analisi statistica della varianza non vengano evidenziate differenze significative ($p > 0.05$), né per macroaree né per microaree.

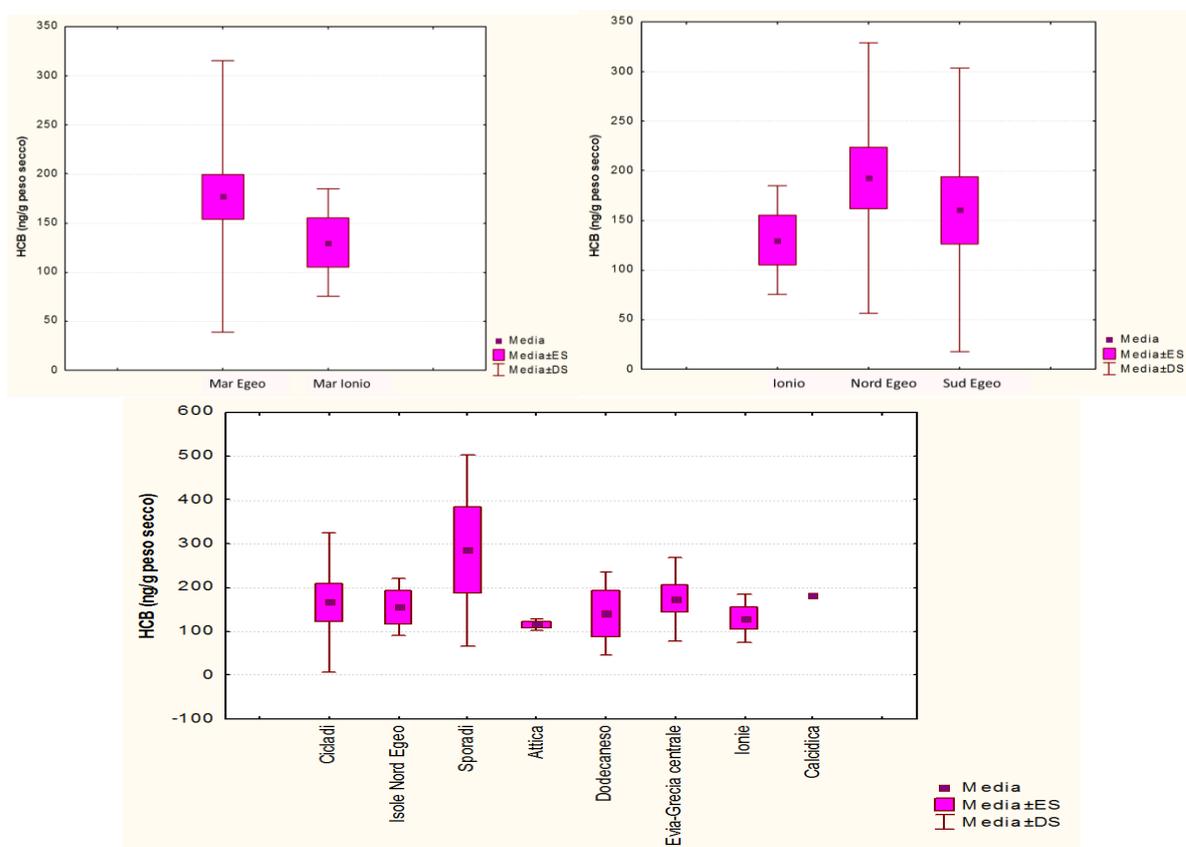


Figura 4.28. Differenze tra i livelli di HCB in *M. monachus* in base all'area geografica testata.

L'HCB mostra un profilo a livello di microaree paragonabile a quello dei DDT e relativi metaboliti. Questo è dovuto probabilmente al fatto che anch'esso veniva usato come fungicida (www.epa.gov). L'area in cui si riscontrano i livelli maggiori di HCB sono ancora una volta le Sporadi ($285,02 \pm 195,01$ ng/g peso secco).

2. Sesso

Come descritto nel paragrafo degli Idrocarburi policiclici aromatici (IPA), il sesso è un fattore fondamentale da tener conto quando si esaminano differenze intra- ed inter-specifiche nell'accumulo di contaminanti lipoaffini come gli organoclorurati.

L'analisi statistica per gli OCs totali in foca monaca della Grecia non ha rilevato differenze significative tra i due sessi ($p=0,3999$). Nonostante ciò, graficamente si può notare che le femmine ($66.683,63 \pm 86.896,79$ ng/g p.s.) mostrano livelli mediamente inferiori dei maschi ($77.928,45 \pm 79.351,19$ ng/g p.s.), in accordo con la letteratura (Aguilar et al., 1999).

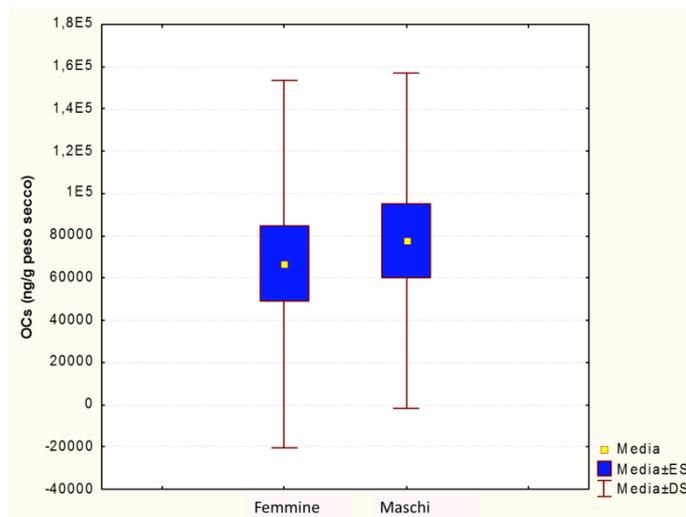


Figura 4.29. Differenze nei livelli di OCs tra maschi e femmine di *M. monachus*

Policlorobifenili (PCBs)

Dalla letteratura (Aguilar et al., 1999) si conosce che le femmine, specialmente le adulte, tendono a mostrare livelli di PCBs inferiori ai maschi, in quanto esse sono in grado di espellere grandi quantità di contaminanti attraverso l'allattamento e la gestazione. Nel caso specifico, gli esemplari di foca monaca non mostrano questa differenza tra i due sessi, anzi mediamente esprimono valori verosimilmente uguali ($39.078,53 \pm 66.535,93$ ng/g p.s. nelle femmine e $37.654,77 \pm 40.212,98$ ng/g p.s. nei maschi).

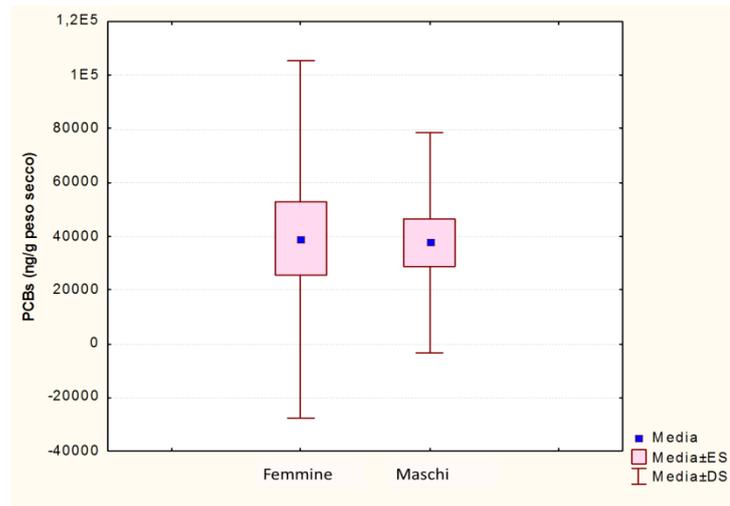


Figura 4.30. Differenze nei livelli di PCBs tra maschi e femmine di *M. monachus*

Questo fatto potrebbe essere imputato alla bassa quota di nascite annuali registrate per *Monachus monachus*, che porterebbe le femmine adulte ad un accumulo di contaminanti PCBs pari a quello dei maschi adulti, o al fatto che in questa specie le femmine non smettono di cibarsi durante l'allattamento del cucciolo portandole ad un equilibrio tra le quote di contaminanti eliminate attraverso l'allattamento e la gestazione e le quote di *intake*, le quali sostanzialmente derivano appunto dalla dieta dell'individuo. Un'analisi più nel dettaglio, nella quale si tengono in considerazione le tre classi d'età (cuccioli, giovani, adulti), evidenzia come la seconda teoria possa essere più eleggibile. Dal grafico 4.27 si evince infatti come femmine e maschi delle tre classi d'età mostrino una distribuzione abbastanza omogenea anziché crescente in relazione all'età.

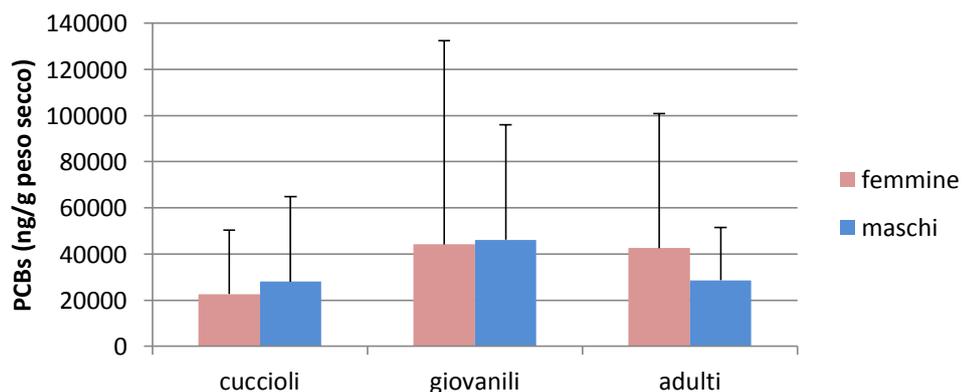


Grafico 4.27. Differenze nei livelli di PCBs tra maschi e femmine entro diverse classi d'età.

Il profilo tossicologico, calcolato come percentuale di ogni singolo congenere sulla somma totale dei 26 PCBs analizzati, non mostra differenze tra maschi e femmine. Come nelle località, il congenere principale è il PCB 153, presente al 27,83% nei maschi ed al 26,44% nelle femmine, seguito da PCB 138 (15,01% nei maschi e 14,07% nelle femmine) e PCB 180 (maschi=12,55%; femmine=13,09%).

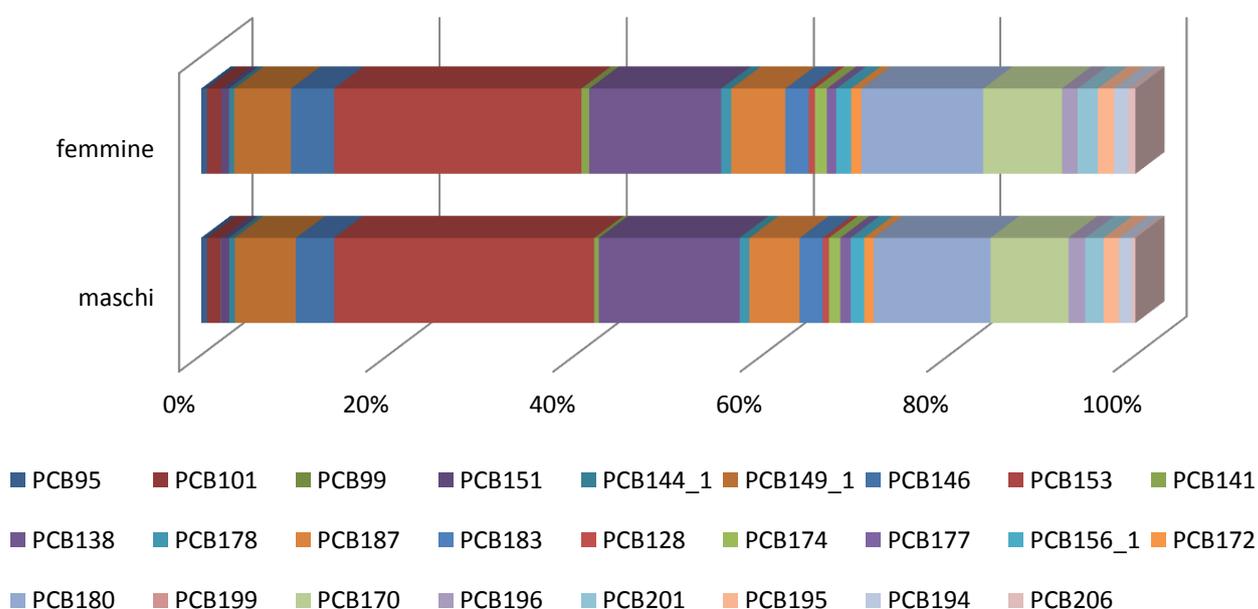


Grafico 5.28. Profilo tossicologico di PCBs in maschi e femmine di *M. monachus*.

Pesticidi organoclorurati

Come per i PCBs, anche i pesticidi tendono ad essere eliminati dalle femmine attraverso allattamento e gestazione. Solitamente quindi si osserva in tutti i mammiferi marini una distinzione tra livelli di accumulo tra i due sessi nelle classi adulte (Aguilar et al., 1999).

In questo caso, diversamente dai pesticidi, si può evincere una minima differenza nel valore medio tra maschi e femmine, con i primi (40.078,75±49.390,51 ng/g p.s.) aventi concentrazioni maggiori delle seconde (44.063,82±91.327,63 ng/g p.s.).

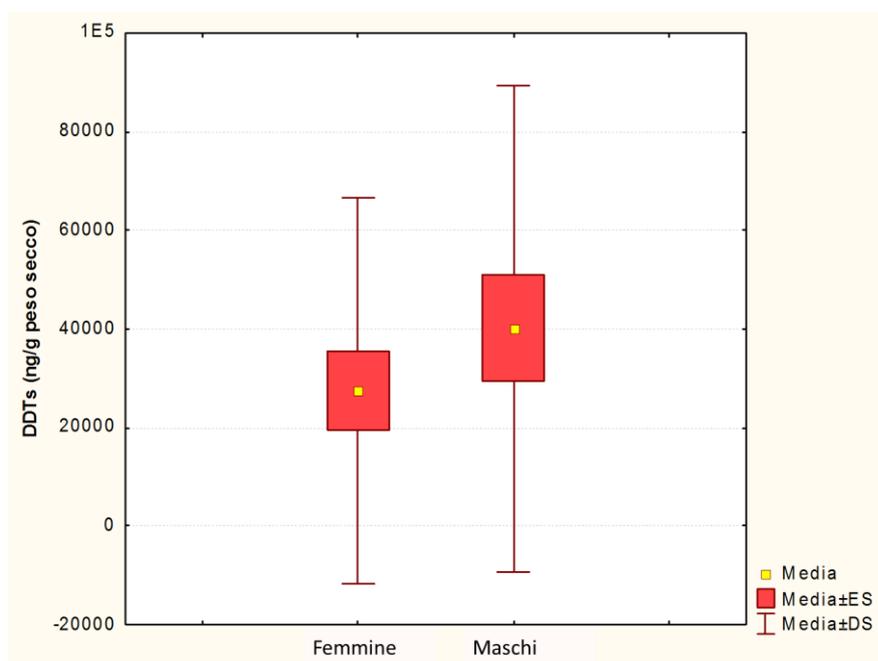


Figura 6.31. Differenze nei livelli di pesticidi clorurati in maschi e femmine di *M. monachus*.

Come per i PCBs, un'analisi più nel dettaglio, sottoclassificando i due sessi nelle tre classi d'età cuccioli, giovani ed adulti, non sembra seguire il classico *trend* di accumulo dei mammiferi marini (Aguilar et al., 1999). Infatti i valori medi più alti si riscontrano nelle femmine adulte ($66.439,26 \pm 134.731,63$ ng/g p.s.) e nei cuccioli (maschi= $66.562,08 \pm 97.157,55$ ng/g p.s.; femmine= $46.020,45 \pm 77.144,07$ ng/g p.s.). I maschi adulti invece risultano aver livelli di pesticidi simili alla classe giovanile dello stesso sesso ($29.550,14 \pm 17.998,62$ ng/g p.s. e $36.758,38 \pm 27.428,37$ ng/g p.s. rispettivamente).

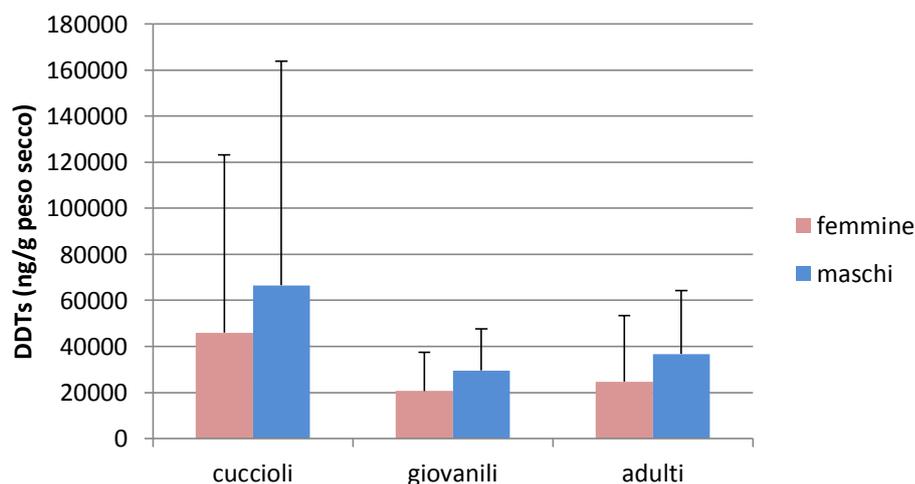


Grafico 7.29. Differenze nei livelli di PCBs tra maschi e femmine entro diverse classi d'età.

Il *fingerprint* dei pesticidi organoclorurati nei due sessi si presenta sostanzialmente simile. La forma preponderante è il *p.p'* DDE, presente al 91,17% nelle femmine e al 93,05% nei maschi, seguito dal *p.p'* DDT (3,79% nelle femmine e 3,25% nei maschi). Unica differenza tra i due sessi è la concentrazione in percentuale del metabolita *o.p'* DDD, presente nelle femmine due volte tanto che nei maschi (1,42% e 0,80% rispettivamente). L'*o.p'*DDD deriva dalla dechlorurazione dell'*o.p'*DDT; si è osservato che nei cani è in grado di provocare atrofia citotossica delle ghiandole surrenali (Nichols e Hennigar, 1957), compromettendo conseguentemente la sintesi di ormoni steroidei. Effetti tossici simili sono stati descritti anche nell'essere umano, negli uccelli, nel visone e nella lontra (Bergenstal et al., 1960; Jönsson et al., 1993, 1994).

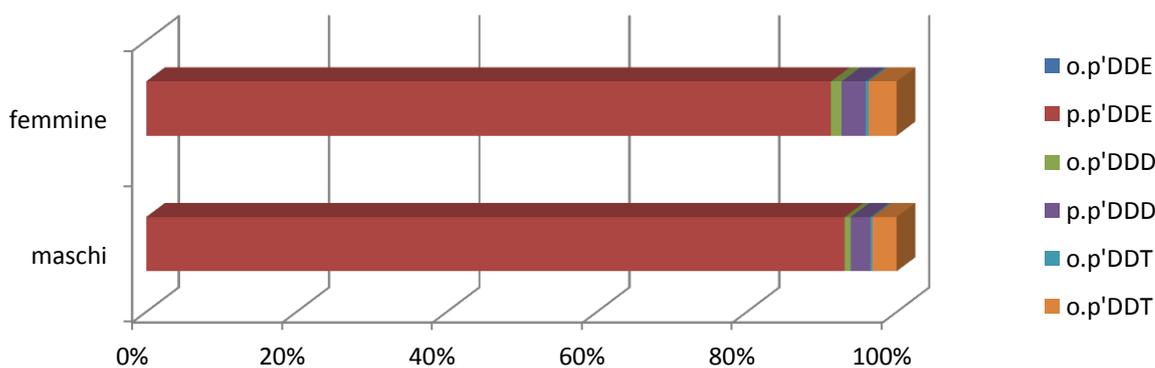


Grafico 8.30. Profilo tossicologico di pesticidi clorurati in maschi e femmine di *M. monachus*.

Esaclorobenzene (HCB)

Il test non parametrico della varianza (Test di Kursall-Wallis) ha evidenziato una differenza significativa ($p = 0,0018$) nei livelli accumulati nell'adipe dai due sessi. Le femmine presentano valori di HCB inferiori, pari a $188,57 \pm 226,47$ ng/g p.s. dei maschi a $227,42 \pm 130,92$ ng/g p.s.

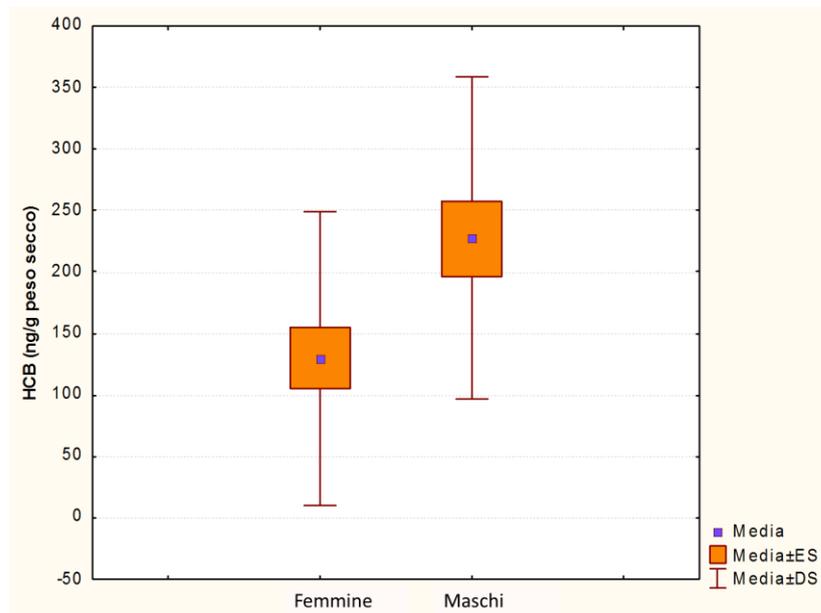


Figura 9.32. Differenze nei livelli di HCB tra maschi e femmine di *M. monachus*.

Considerando le classi d'età, si nota mediamente una tendenza all'accumulo dell'esaclorobenzene nelle classi d'età di ambedue i sessi.

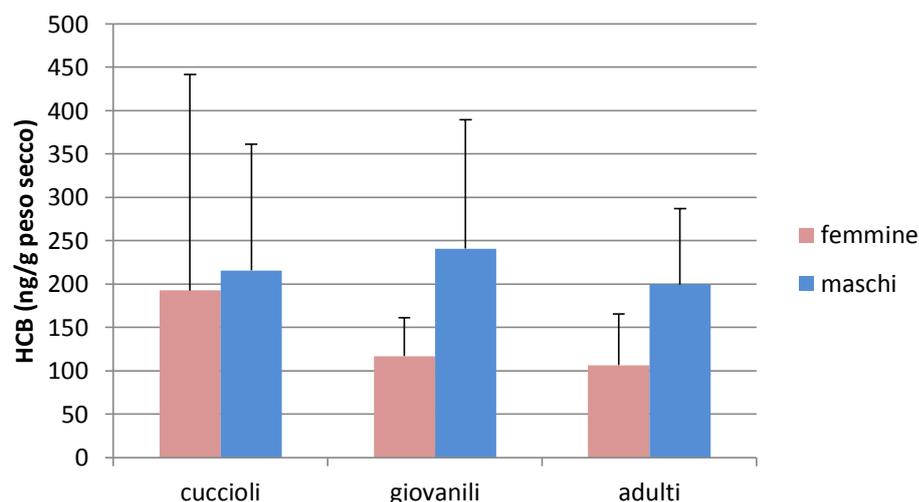


Grafico 10.31. Differenze nei livelli di HCB tra maschi e femmine entro diverse classi d'età.

3. Classe d'età

Come il sesso, anche l'età degli esemplari è un importante fattore da tener conto nelle elaborazioni intraspecifiche per contaminanti lipoaffini, soggette a bioaccumulo (Aguilar et al., 1999). Analogamente all'elaborazione per IPA e metalli pesanti, si è proceduto a una classificazione degli individui di foca monaca in tre classi: cuccioli, giovanili ed adulti. L'analisi statistica degli OCs *in toto* non evidenzia alcuna differenza statistica tra le tre classi ($p = 0,5503$).

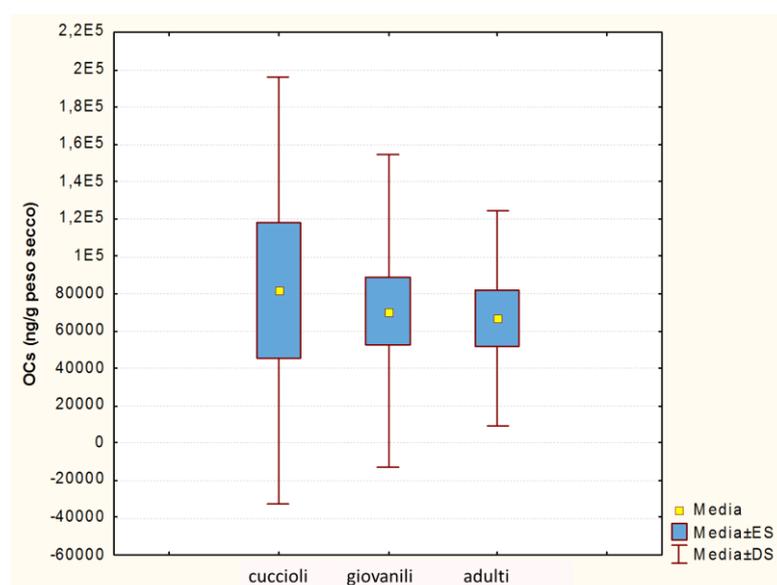


Figura 11.33. Differenze nei livelli di OCs tra diverse classi d'età in *M. monachus*.

Il dato grafico mostra però che mediamente i cuccioli presentano livelli di organoclorurati maggiori ($238.319,47 \pm 481.155,53$ ng/g p.s.) delle altre due classi, le quali in media risultano paragonabili (giovanili= $81.780,00 \pm 114.192,80$ ng/g p.s.; adulti= $70.724,3 \pm 83.458,57$ ng/g p.s.). Suddividendo le tre classi d'età per il sesso, si denota che maschi e femmine di esemplari adulti non mostrano differenze nei livelli accumulati nel blubber. Questo risultato potrebbe essere dovuto al fatto che in questa specie le femmine non smettono di procacciarsi il cibo durante l'allattamento dei piccoli, portando ad avere quote di *intake* di contaminanti organici pari a quelle di *output*, e trasferendo conseguentemente elevate concentrazioni di OCs alla prole attraverso il latte.

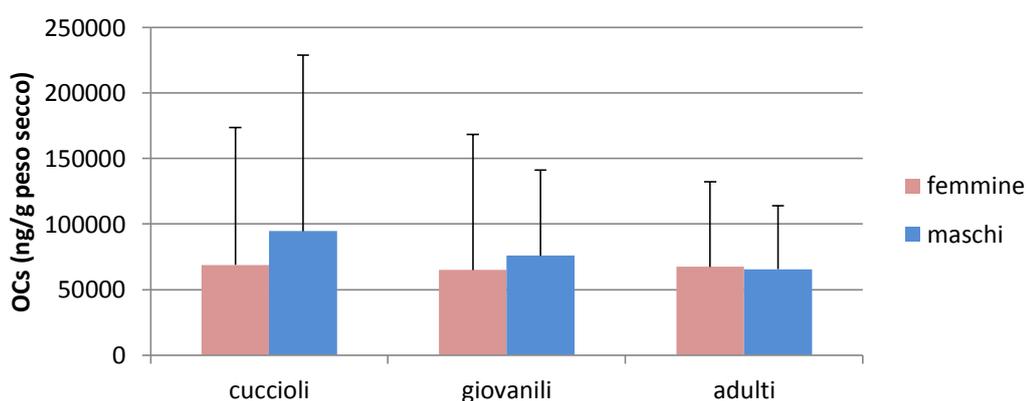


Grafico 12.32. Differenze nei livelli di OCs tra maschi e femmine entro diverse classi d'età.

Policlorobifenili (PCB)

La foca monaca presenta i livelli maggiori in esemplari adulti e giovanili, evidenziando un tendenziale accumulo di questi contaminanti con l'avanzare dell'età e uno scarso trasferimento dalla madre alla prole se paragonato con il *trend* generale degli organoclorurati. Dato che trova conferma anche nel fatto che le femmine adulte mostrano concentrazioni mediamente maggiori degli individui maschi.

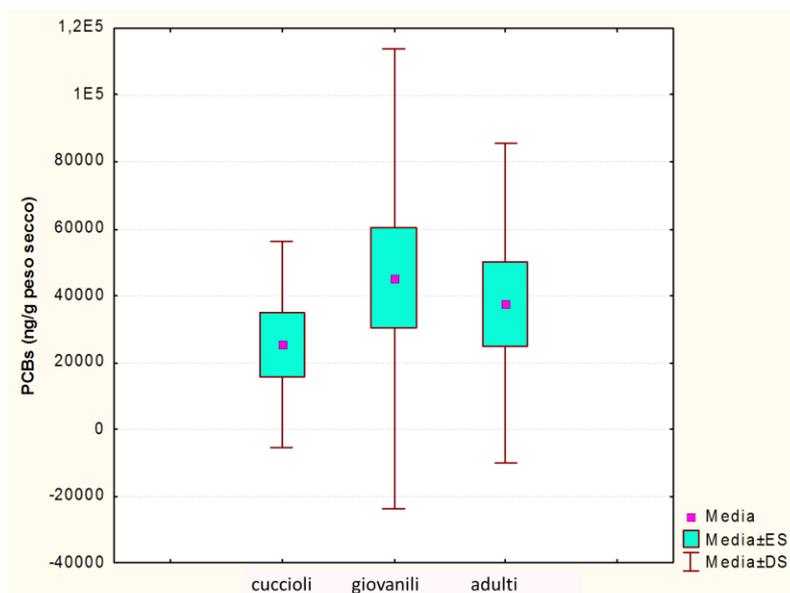


Figura 13.34. Differenze nei livelli di PCBs tra diverse classi d'età in *M. monachus*.

Lo studio del *fingerprint* tra le tre classi d'età denota che ci sono delle differenze tra classi, specialmente tra adulti e le altre due classi. Cuccioli e giovanili mostrano infatti in % livelli maggiori di penta-, esa- ed epta-clorobifenili, mentre gli adulti di opta e nona-clorobifenili. Più nel dettaglio, i cuccioli mostrano livelli in % di PCB 149 (7,31%) e 146 (6,02%) maggiori rispetto agli adulti (PCB 149=4,67%; PCB 146=3,61%) e viceversa gli adulti mostrano livelli maggiori specialmente di PCB 180 (14,48%) e 201 (2,7%) rispetto ai cuccioli (PCB 180=10,97%; PCB 201=1,86%). Non si ha alcuna differenza particolare invece nei principali congeneri, ossia PCB 153 e 138. Questo diverso profilo tossicologico è dato sicuramente da aspetti sia di natura chimica propri dei singoli congeneri sia di natura biologica, come la dieta, dati proprio dal fatto di appartenere a diverse classi di età.

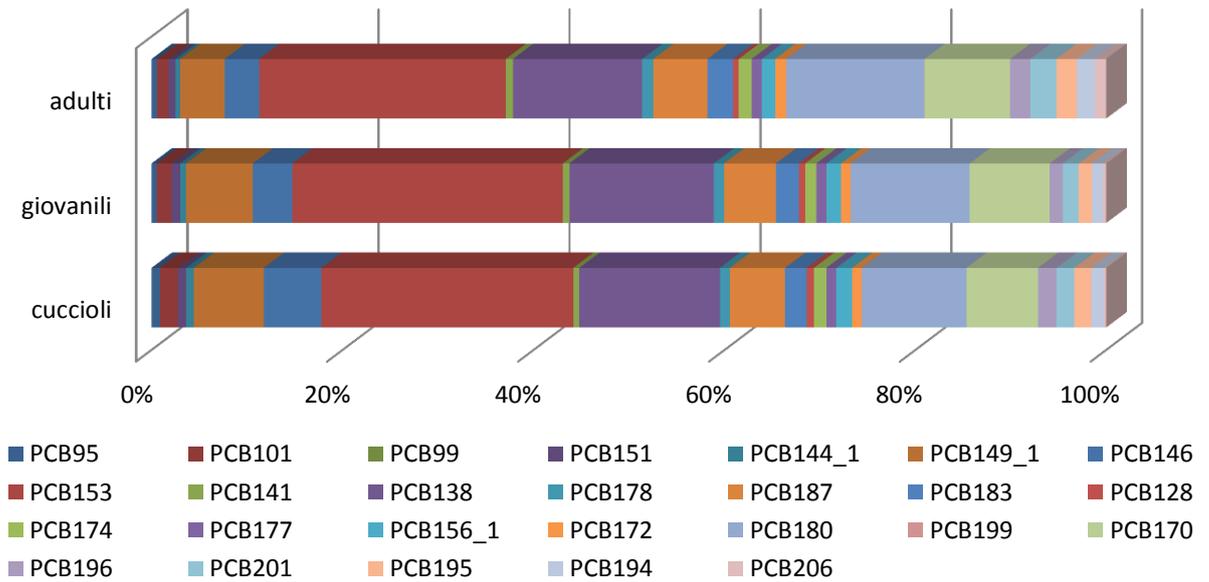


Grafico 14.33. Profilo tossicologico di PCBs nelle diverse classi d'età in *M. monachus*.

Pesticidi clorurati

Il *trend* di DDT, DDE e DDD ricalca quello descritto precedentemente per gli organoclorurati *in toto* evidenziando che è questa la categoria di contaminanti clorurati che maggiormente viene trasferita durante gestazione ed allattamento dalla madre al cucciolo. È possibile inoltre che i maschi adulti siano in grado di eliminare in maniera più efficiente questi composti dato che presentano livelli verossimilmente paragonabili alla classe giovanile, a differenza invece delle femmine adulte che mostrano valori più simili alla classe più giovane, ossia i cuccioli.

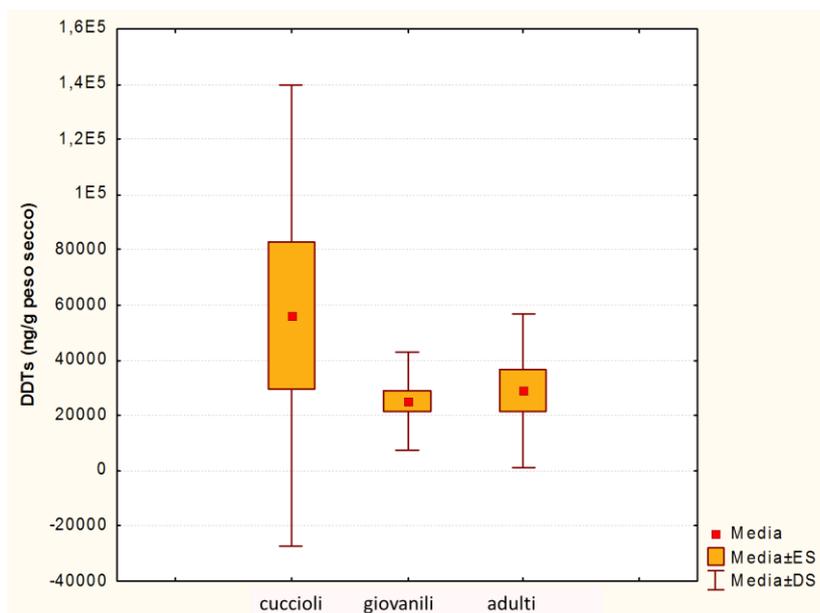


Figura 15.35. Differenze nei livelli di pesticidi clorurati tra diverse classi d'età in *M. monachus*.

Il profilo tossicologico invece non mostra spiccate differenze tra le tre classi d'età, se non un leggero incremento in % delle due forme *orto* e *para* DDT proporzionale all'età (*o.p'* DDT: cuccioli=0,25%, giovanili=0,36%, adulti=0,37%; *o.p'*DDT: cuccioli=3,10%, giovanili=3,71%, adulti=4,06%).

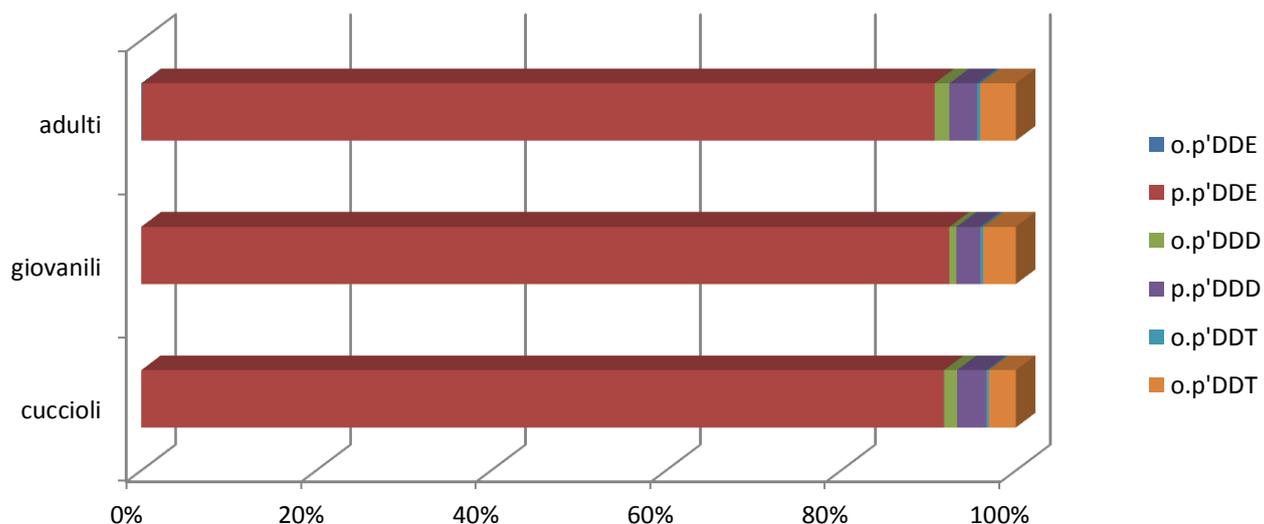


Grafico 16.34. Profilo tossicologico di pesticidi clorurati in diverse classi d'età in *M. monachus*.

Esaclorobenzene (HCB)

L'esaclorobenzene presenta, assieme a DDT e metaboliti, la stessa tendenza degli organoclorurati in generale, nella quale i cuccioli ($201,30 \pm 203,91$ ng/g peso secco) mostrano livelli maggiori rispetto a giovanili ($181,89 \pm 126,15$ ng/g peso secco) ed adulti ($117,85 \pm 88,99$ ng/g peso secco).

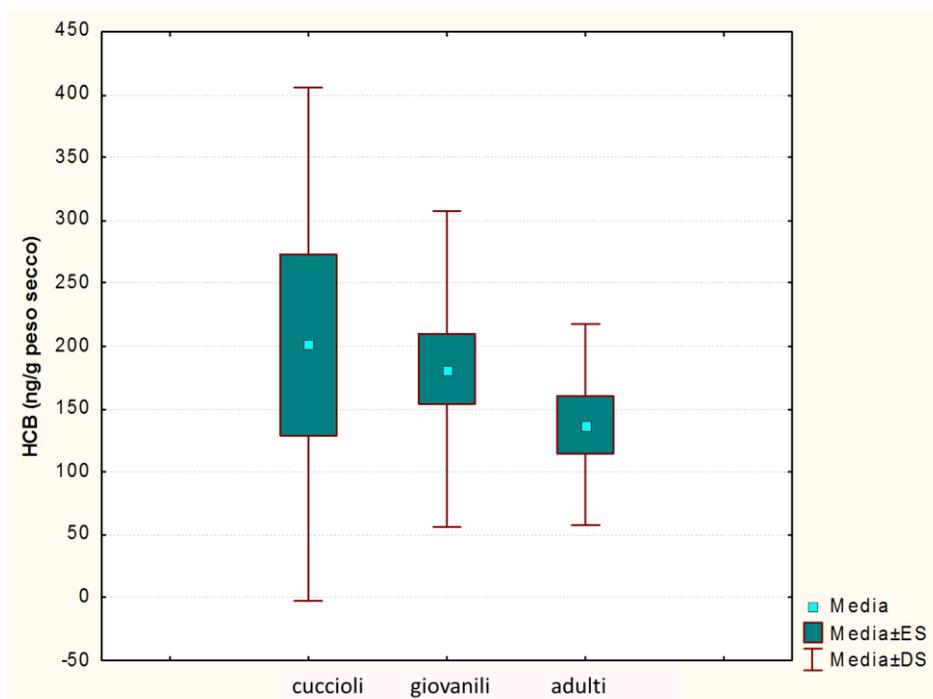


Figura 17.35. Differenze nei livelli di HCB tra diverse classi d'età in *M. monachus*.

4. Trend temporale

Dato il *range* temporale disponibile per i campioni utilizzati nelle analisi dei contaminanti OCs, che spazia dal 1995 al 2013, si è costruito un trend temporale di contaminazione da PCB, pesticidi e HCB in foca monaca della Grecia. Questa elaborazione, come per gli IPA, non tiene conto di ulteriori analisi entro gruppi, quali sesso, età o località, dato l'esiguo numero di campioni presenti per ogni anno. Gli anni più rappresentativi del *trend* qui ricostruito sono il 1996, 2000, 2009 e 2011, composti da campioni di 5/4 esemplari. L'andamento ricostruito con gli altri anni invece è da prendere con cautela, essendo questi rappresentati da un numero inferiore di campioni, specialmente gli anni 1996, 1997, 2005, 2006 e 2007 rappresentati

esclusivamente da un singolo animale. Nell'elaborazione del *trend* di HCB, negli anni 1998 e 2006, gli esemplari risultavano < LOD.

L'analisi statistica non ha colto differenze significative tra i vari anni ma in media si possono dividere questi quasi 20 anni in due fasi: dal 1995 al 2006 si riscontrano mediamente livelli inferiori di OCs ($63.546,22 \pm 72.229,94$ ng/g peso secco) nel tessuto adiposo di foca monaca (*Monachus monachus*) rispetto alla seconda fase, che va da 2007 al 2013 ($78.698,61 \pm 93.737,06$ ng/g peso secco).

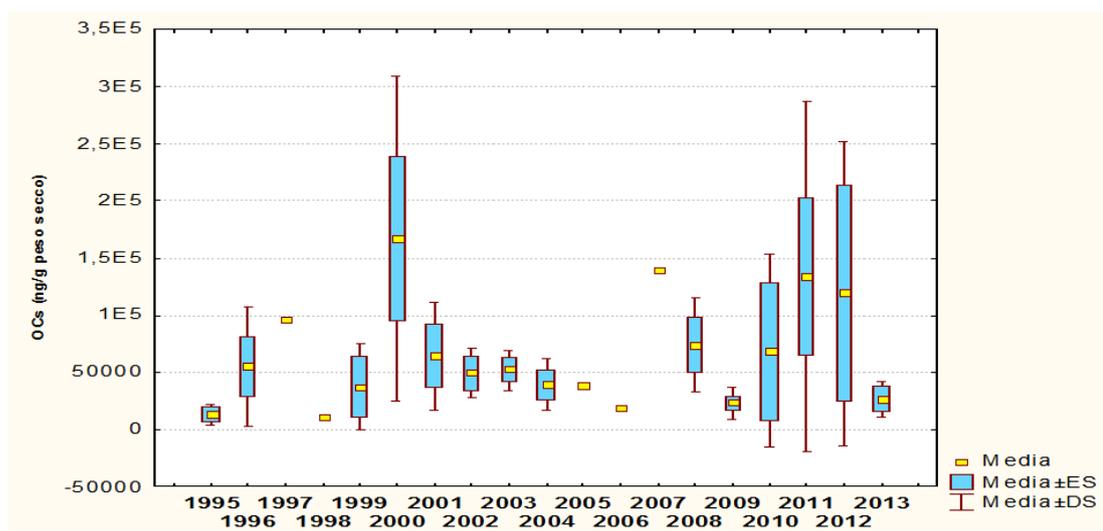


Figura 18.36. Trend temporale dei livelli di OCs in *M. monachus*.

Questo trend risulta opposto a quello individuato per gli IPA Totali e paragonabile invece a quello descritto per gli IPA cancerogeni.

Esaminando ogni singola classe di contaminanti organoclorurati, il *trend* non appare più come quello precedentemente descritto, ad eccezione dei PCB. Dettaglio non trascurabile è che, per tutte e tre le classi, l'anno 2000 risulta in media sempre il più elevato ($166.995,19 \pm 141.960,15$ ng OCs/g peso secco), o rispetto al periodo temporale in cui si trova o nell'intero arco temporale, a seconda del *trend* del contaminante indagato.

Policlorobifenili (PCB)

Come già accennato, i PCB mostrano un *trend* temporale suddivisibile nelle stesse due fasi descritte per gli OCs. Il primo arco temporale (1995-2006) mostra mediamente livelli inferiori del secondo (2007-2013), ad eccezione dell'anno 2000 (53.143,33±33.768,58 ng/g p.s.) che rientra nel *range* del secondo periodo (2.208,81 – 293.118,41 ng/g p.s.).

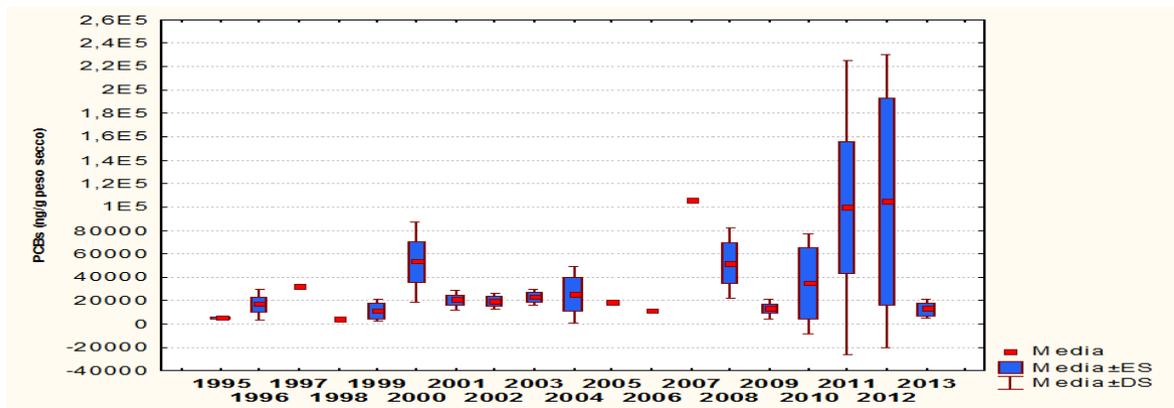


Figura 19.37. Trend temporale dei livelli di PCBs in *M. monachus*.

Pesticidi clorurati

Per i pesticidi clorurati, quali DDT e relativi metaboliti, si rileva un'omogeneità nei livelli nel blubber di foca monaca, ad eccezione dell'anno 2000 (113.525,47±108.230,70 ng/g p.s.) in cui si registra in media una concentrazione superiore rispetto a tutti gli altri anni (32.512,75±43.378,13 ng/g p.s.).

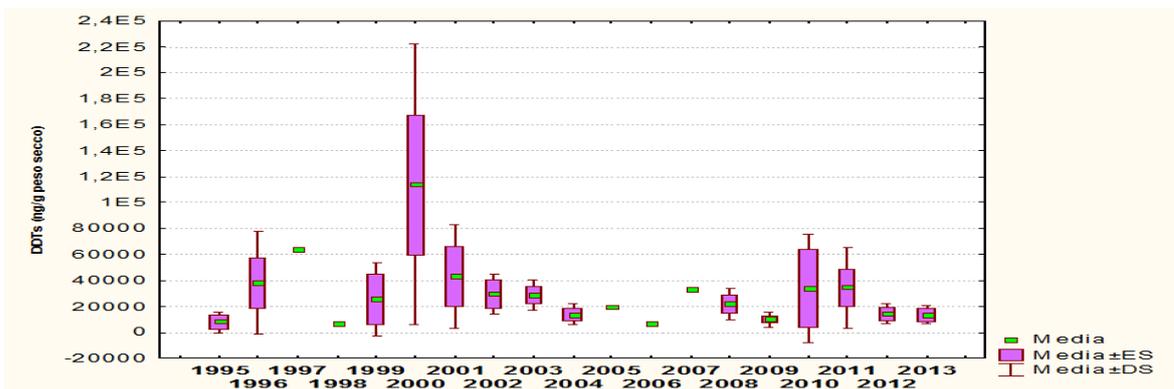


Figura 20.38. Trend temporale dei livelli di pesticidi clorurati in *M. monachus*.

Esaclorobenzene (HCB)

L'HCB mostra lo stesso andamento del DDT, probabilmente perché utilizzati entrambi come pesticidi. Anche in questo caso, i livelli medi per l'anno 2000 (326,39±229,27 ng/g p.s.) risultano maggiori rispetto a tutti gli anni testati (171,55±130,37 ng/g p.s.).

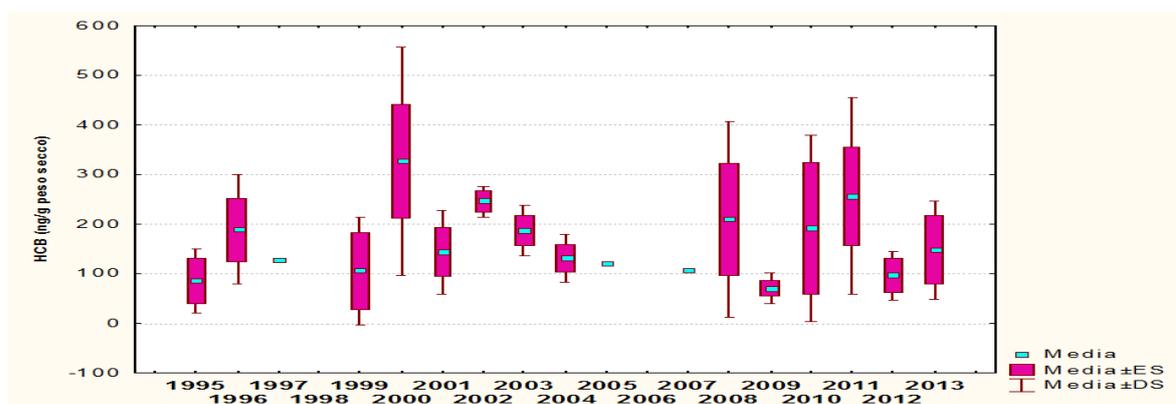


Figura 21.39. Trend temporale dei livelli di HCB in *M. monachus*.

5. Stato di decomposizione

Come con i contaminanti IPA, per essere certi che i risultati ottenuti non dipendessero anche dal parametro “stato di decomposizione”, si è testato attraverso un’analisi della varianza (test di Kursal-Wallis) che i livelli medi di OCs negli esemplari campionati successivamente al decesso nel centro di riabilitazione del MOM/ the Hellenic Society for the Study and Protection of the Monk Seal fossero uguali ai livelli medi degli individui ritrovati deceduti lungo le coste greche. Anche in questo caso, il primo gruppo è stato catalogato come “fresco-CODICE 1” mentre il secondo come “deteriorato-CODICE 2”.

La statistica non ha evidenziato differenze significative ($p=0,9239$) tra i due codici, anche se dal dato grafico si può evincere che mediamente il codice 2, ossia gli esemplari ritrovati già deceduti lungo le coste greche, mostrano livelli inferiori di OCs. Dei tre gruppi di composti organoclorurati analizzati, sembra che HCB e pesticidi organoclorurati siano le molecole che definiscono il *trend* finale degli OCs in questa analisi.

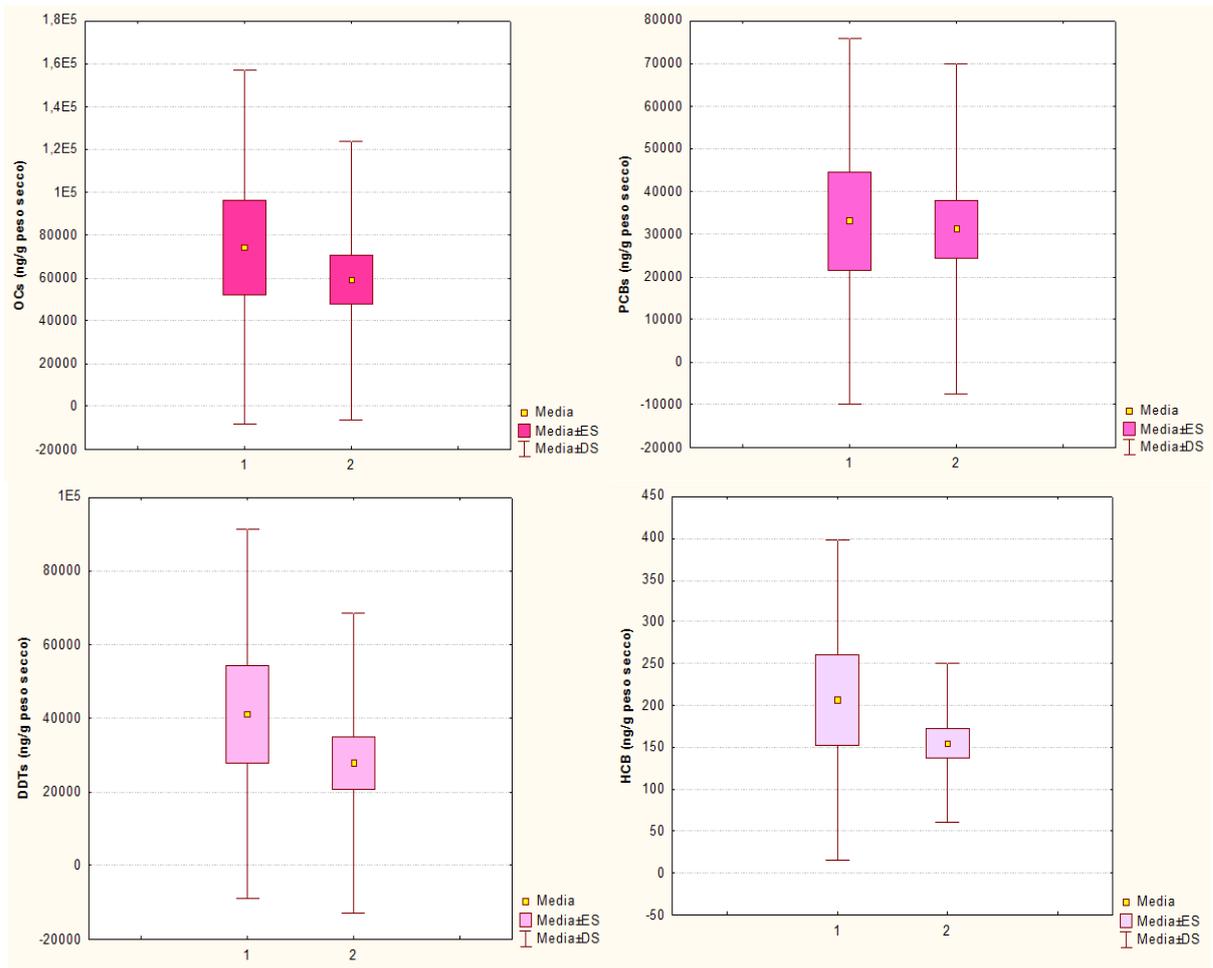


Figura 22.40. Differenze nei livelli di OCs, PCBs, DDTs e HCB in esemplari *freschi* e *deteriorati* di *M. monachus*.

Il risultato può essere interpretato in due modi diversi: il valore medio di OCs maggiore negli esemplari “codice 1” può essere dovuto o effettivamente ad una migliore qualità del campione o al fatto che gli individui che vengono portati nel centro di riabilitazione spesso sono animali in fin di vita, non in grado di provvedere al proprio sostentamento. Questo stato può essere dovuto proprio alle elevate concentrazioni di OCs accumulate nell’organismo, che possono portare una serie di effetti negativi, tra i quali l’immunosoppressione. È da precisare inoltre che i cuccioli sono la classe che maggiormente usufruisce del centro riabilitativo (www.mom.gr) e che sono la classe che mostra mediamente i livelli maggiori di OCs nella popolazione di foca monaca in Grecia.



Figure 4.41. Riabilitazione di un cucciolo di *M. moachus* nel centro di recupero del MOM

I casi studio

I due esemplari esclusi dal *dataset* nelle elaborazioni statistiche finora riportate sono ID 97 e 107, due femmine adulte registrate decedute nelle isole di Megara (Attica) la prima e di Chios (Isole del Nord Egeo) la seconda. Ambedue sono degli ultimi anni '90, più precisamente ID 97 del 1997 e ID 107 del 1999.

La decisione di escludere questi due esemplari dalle elaborazioni è, come nel caso di ID 230 con risultati dei contaminanti IPA, determinato dall'anomalo valore di contaminanti organoclorurati ottenuto rispetto al valore medio ottenuto per la popolazione greca di *Monachus monachus*, sia per i pesticidi che per i PCBs, come appare nel grafico 4.35.

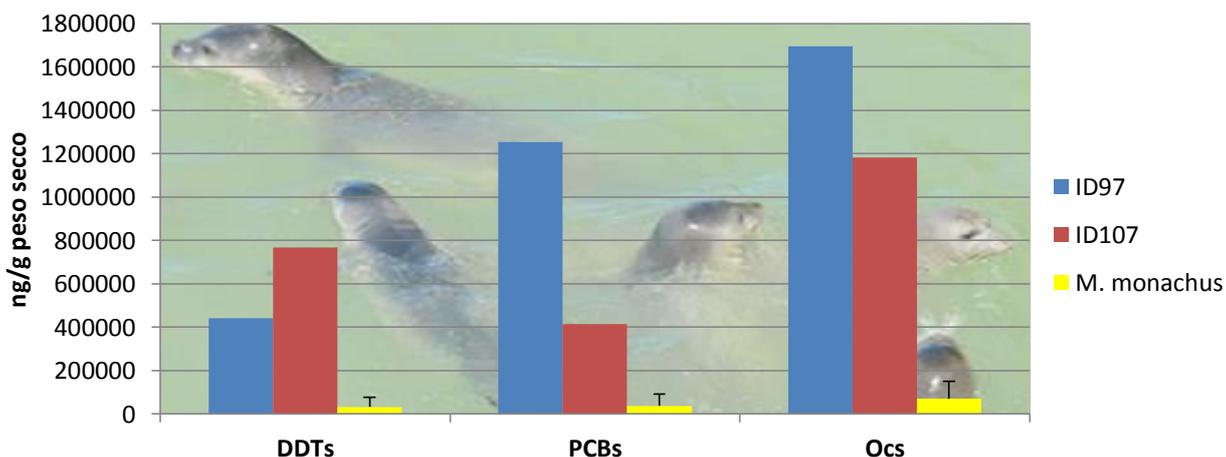


Grafico 4.35. Livelli di OCs, PCBs e pesticidi clorurati nella popolazione greca di *M. monachus*, espressi come valore medio e deviazione standard, e dei casi studio ID 97 e 107

Anche il *fingerprint* mostra delle differenze. Per il profilo tossicologico dei PCBs, il congenere preponderante rimane il 153 in % paragonabile tra la popolazione in generale di foca monaca e i due casi studio. Ciò che muta è il secondo congenere maggiormente presente in %. Nella popolazione in generale è il 138, mentre in ID 97 e 107 è il 180, presente al 16,5% e 19,7% rispettivamente. La percentuale di PCB 138 è comparabile. Osservando meno dettagliatamente si può affermare che i due casi studi presentano basse percentuali di pentaclorobifenili e di alcuni esaclorobifenili (congeneri 95, 101, 99, 151, 144_1, 149_1 e 146) ed elevate percentuali di epta- ed optaclorobifenili rispetto alla popolazione greca di foca monaca.

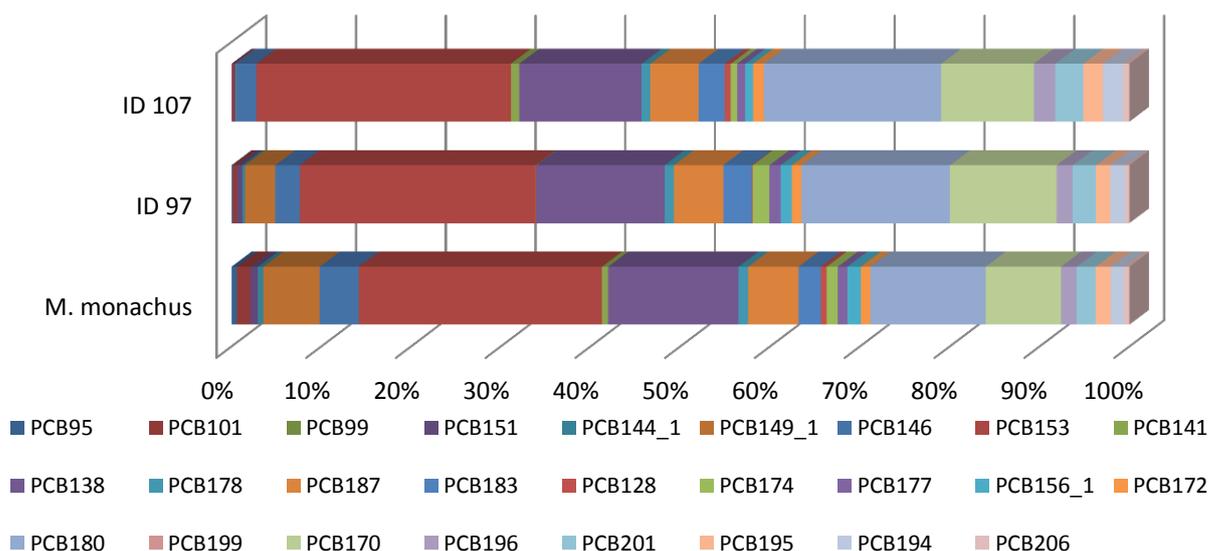


Grafico 4.36. Profilo tossicologico di PCBs nella popolazione greca di *M. monachus* dei casi studio ID 97 e 107

Per il profilo tossicologico dei pesticidi, la forma chimica principale rimane in tutti i casi il *p.p'* DDE, ma in percentuali diverse, specialmente in ID 107, dato dal fatto che nei due casi studio risultano praticamente assenti le due forme metaboliche declorate *o.p'*DDD e *p.p'*DDD.

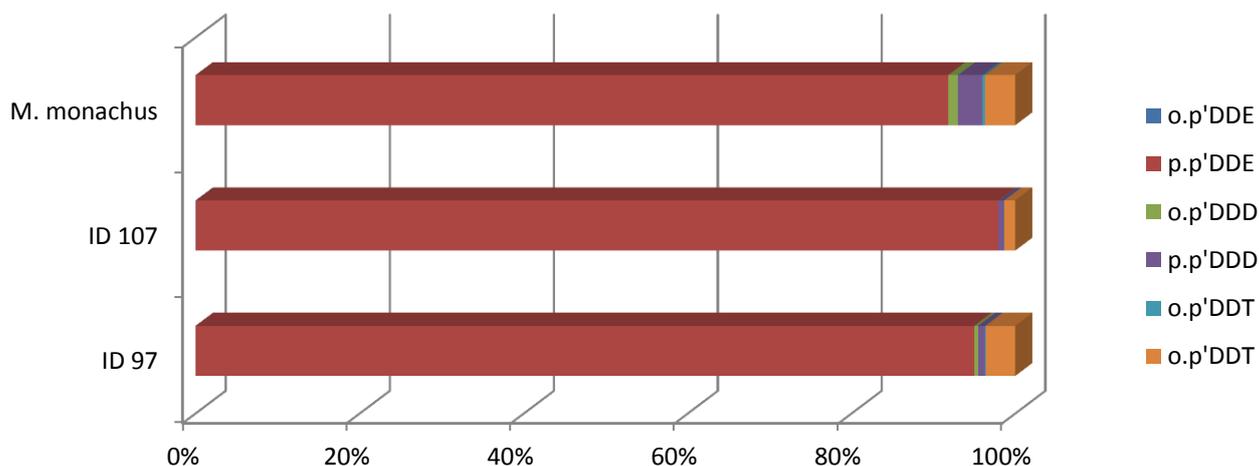


Grafico 4.37. Profilo tossicologico di pesticidi DDTs nella popolazione greca di *M. monachus* dei casi studio ID 97 e 107

Discussione

Questo studio si propone di aggiornare i dati in merito all'esposizione da contaminanti organoclorurati (OCs) nella popolazione greca di foca monaca (*Monachus monachus*). I livelli riscontrati, considerando tutti gli esemplari a disposizione (ID 97 e 107 inclusi), sono riportati in tabella V.

	HCB	DDTs	PCBs	OCs
media	184,63	55893,48	69818,58	125896,69
mediana	127,57	18679,26	20404,41	38440,72
SD	188,41	126602,65	188455,76	289934,27
min	< LOD	2014,01	2208,81	4381,18
max	842	768621,75	1252828,29	1695715,95

Tabella V. Concentrazioni di OCs, PCBs, DDTs e HCB nella popolazione greca di *M.monachus* espresse in ng/g peso secco.

Il valore medio del rapporto DDTs/PCBs nell'intera popolazione è pari a 0.69, dato che offre informazioni sul tipo di esposizione a cui *Monachus monachus* è soggetta. Infatti, se un'area è particolarmente interessata da una contaminazione di tipo agricolo, il rapporto tra i due xenobiotici risulta a favore dei DDTs (>1), viceversa se è a favore dei PCBs (<1). Generalmente, il Mar Mediterraneo è interessato ad un impatto industriale (Aguilar et al., 1999), come risulta anche in questo caso.

Un'analisi più nel dettaglio, considerando i diversi parametri valutati in questo studio (età, sesso e località), mostra che l'area geografica in cui le colonie di foca monaca risiedono è la variabile maggiormente influente sulla tipologia di esposizione. Infatti gli esemplari del Dodecaneso e Calcidica mostrano un valore medio pendente più verso una contaminazione da DDTs (2,02 e 2,47 rispettivamente) mentre quelli delle Cicladi da PCBs (0,89).

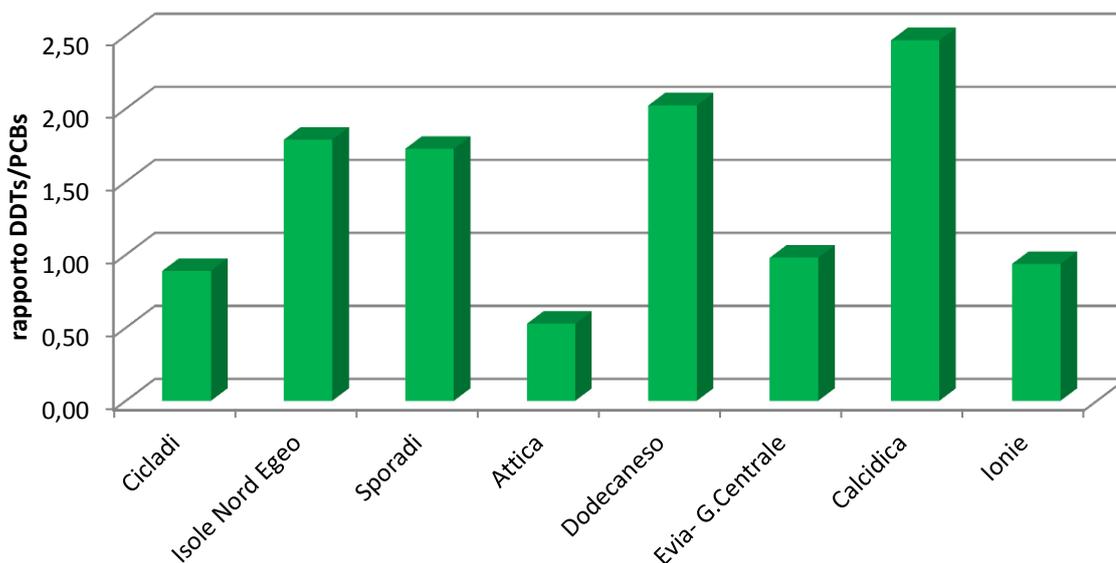


Grafico 4.38. Rapporto DDTs/PCBs in *M. monachus* a seconda delle diverse microaree geografiche.

Classi d'età e sesso invece non mostrano particolari differenze, ma i due parametri risultano sempre tendenti ad un valore pari a 1. Ciò significa che in generale maschi e femmine, cuccioli, giovani e adulti sono esposti ad una pressione di contaminazione di PCBs e DDTs paritaria.

L'analisi del *fingerprint* dei PCBs ha evidenziato che il congenere primario risulta essere il #153 (27,12%), seguito da #138 (14,51%) e #180 (12,85%), in accordo coi dati riportati da Borrell et al. (2007).

Borrell et al. (2007) riportano per la popolazione greca livelli di PCBs pari a $24,71 \pm 32,19 \mu\text{g/g b.l.}$, i quali risultano 3 volte inferiori a quelli riscontrati in questo studio. Il dato è concorde col *trend* temporale per i PCBs precedentemente riportato, nel quale è stata riscontrata una tendenza all'aumento delle concentrazioni di questi contaminanti in relazione al tempo. L'esposizione del primo arco temporale (1995-2006) analizzato in questo studio ($23.217,61 \pm 20.381,65 \text{ ng/g p.s.}$) è paragonabile a quello riportato da Borrell et al. (2007).

Come dichiarato anche in altri studi effettuati su *Monachus* spp. (Borrell et al., 1997, 2007; Willcox et al., 2004; Ylitalo et al., 2008; Lopez et al., 2012), la popolazione greca di foca monaca non ha evidenziato differenze statisticamente significative nei livelli di PCBs tra classi d'età o sesso (ad

eccezione di HCB). Questa differenza mancante, evidenziata anche in altri focidi (Wolkers et al., 1998), potrebbe essere dovuta a due diversi fattori:

- Le femmine adulte di *Monachus monachus* continuano a procacciarsi il cibo durante l'allattamento (Gazo e Aguilar, 2005);
- *Monachus monachus* è stata osservata avere un basso tasso riproduttivo, sia nelle popolazioni del Mediterraneo Orientale (Gucu et al., 2004) sia in quelle dell'Atlantico (Gazo et al., 1999).

L'esposizione a contaminanti policlorobifenili per la popolazione di foca monaca era già stata considerata un importante fattore di rischio per la conservazione di questa specie da Borrell et al. (1997), dato che i livelli da loro riportati (64,30 µg/g b.l.) ricadevano nel *range* di contaminazione in grado di provocare lo sviluppo di tumori e stenosi patologiche nei corni uterini di foca degli anelli, comune e grigia (Helle et al., 1976; Reijnders et al., 1890). Le concentrazioni pubblicate per gli individui del Mediterraneo Occidentale sono paragonabili al valore medio qui calcolato. Valori simili sono stati collegati anche a riduzione di testosterone in circolo nella focena di Dall (Subramanian et al., 1987), dei livelli di retinolo nel sangue (Brouwer et al., 1989) e dell'attività di cellule NK (Swart et al., 1994) in foca comune.

Per quanto riguarda l'esposizione da DDTs, l'analisi del *fingerprint* mostra che la forma preponderante nella popolazione greca di foca monaca è il *p.p'* DDE (91,76%), in accordo con altri studi effettuati su questa specie (Menchero et al., 1994; Borrell et al., 1997, 2007). I livelli qui riportati sono paragonabili a quelli di Borrell et al., (2007) per la popolazione greca e 2 volte maggiori di quelli riportati per la popolazione dell'Isola di Chafarina (Borrell et al., 1997), nel Mediterraneo Occidentale, e per l'individuo maschio ritrovato deceduto nell'Isola di Santorini, Grecia (Menchero et al., 1994).

Calcolando il rapporto *p.p'*DDE/*p.p'*DDT, possiamo notare che la maggior parte dei DDTs è rappresentata dal metabolita *p.p'*DDE (28,17). Questo composto è la principale forma derivante dalla degradazione metabolica del composto primario *p.p'*DDT. Infatti, un tipico DDT tecnico è composto di *p.p'*DDT (77,1%), *o.p'*DDT (14,9%), *p.p'*DDD (0,3%), *o.p'*DDD (0,1%), *p.p'*DDE (4,0%), *o.p'*DDE (0,1%) e composti non identificati (3,5%) (WHO, 1979), con un rapporto

$p.p'DDE/p.p'DDT$ di 0,05. Chiaramente, se il rapporto $p.p'DDE/p.p'DDT$ è più alto, si può dedurre che la maggior parte del principio attivo ($p.p'DDT$) sia stato degradato a $p.p'DDE$ e che quindi non ci siano immissioni recenti dell'insetticida nell'ecosistema (Aguilar, 1984). Tutti i parametri analizzati, quali sesso, età e località, mostrano valori maggiori di 0,05.

Il rapporto $p.p'DDE/DDTs$ invece, oltre ad avere un significato analogo al rapporto $p.p'DDE/p.p'DDT$, può anche essere indicativo dell'efficienza dei processi metabolici della popolazione (Borrell & Aguilar, 1987), indicando l'abbondanza relativa di forme metabolizzate del pesticida. In questo caso, la foca monaca in Grecia mostra un valore pari a 0,91. Il calcolo del valore medio del rapporto $p.p. DDE/DDTs$ non mostra differenze tra classi d'età, sesso o località.

Questo studio mette in luce come i contaminanti organoclorurati, e specialmente i PCBs, siano una fonte di rischio per la conservazione della foca monaca. Dalla letteratura appare chiaro che le colonie residenti nel bacino mediterraneo, se paragonate a quelle dell'Oceano Atlantico e Pacifico, risentono maggiormente di questo tipo di pressione antropica. Dai risultati ottenuti da questo studio, la popolazione greca risulta in una situazione di serio pericolo, considerando anche il fatto che negli ultimi 7 anni il valore medio di OCs accumulato nel tessuto adiposo è aumentato.

Appare necessario quindi uno studio approfondito sulla sensibilità specie-specifica a questi contaminanti ed sui possibili effetti sinergici o antagonisti tra miscele di diversi inquinanti organoclorurati.

Capitolo 5

Conclusione



© ΜΟμ/Β. Παράβας

Ad oggi non esistono praticamente dati sull'esposizione a contaminanti di *M. monachus* (Borrell et al., 1997, 2007; Menchero et al., 1994; Dosi, 2000). È quindi difficile giungere a conclusioni esaustive relativamente al reale significato tossicologico dei livelli osservati nel presente studio e al potenziale impatto che possono avere sulla salute degli individui.

Da quanto ottenuto comunque si può concludere che:

- In merito agli **elementi in traccia essenziali**, il Fe risulta essere l'elemento preponderante e tutti appaiono nei *range* descritti in letteratura per altre specie di focidi, ad eccezione del cobalto e del rame, fatto che porta, nonostante gli individui campionati fossero deceduti, a credere che i livelli riportati in questo studio possano fungere da dato indicativo fisiologico degli elementi essenziali in *Monachus monachus*. Dai risultati ottenuti per Co e Cu è legittimo pensare che vi sia una qualche tipologia, anche se lieve, di inquinamento ambientale, e che questo pinnipede, abitando sostanzialmente la fascia costiera, ne risenta e agisca da sentinella dello stato ambientale delle coste greche;
- in merito agli **elementi in traccia tossici**, a seconda del tessuto od organo che si prende in considerazione, risultano preponderanti in termini percentuali il mercurio o l'arsenico. Le concentrazioni di As riscontrate nella foca monaca della Grecia rientrano nei livelli in grado di provocare interferenze endocrine (Freeman e Sangalang, 1977) ed immunosoppressione (Frouin et al., 2010). Sono state infine evidenziate differenze tra i livelli di Ni e Cr tra le diverse macroaree: Nord Egeo, Sud Egeo ed Ionio, con concentrazioni nettamente maggiori per il Sud Egeo, e più in dettaglio per gli individui rinvenuti nelle Isole Cicladi, dato che fa presupporre una fonte di contaminazione di tipo antropogenico. Kakuschke et al. (2005) hanno recentemente evidenziato come il Cr sia in

grado di indurre ipersensibilità in foca comune (*P. vitulina*) a concentrazioni ematiche di circa 20 µg/l. Le concentrazioni di nickel osservate nei tessuti di *M. monachus* sono inferiori a quelle in grado di provocare nascite premature e ipesensibilità (Hyvärinen e Sipilä, 1984; Kakuschke et al. 2005), ma va tenuto presente che i livelli ematici sono generalmente inferiori a quelli tissutali, quindi i risultati ottenuti non sono da sottovalutare per possibili effetti nocivi sulla specie.

- in merito agli **idrocarburi policiclici aromatici** (IPA), questo studio si propone di riportare i primi dati nella popolazione greca di foca monaca (*Monachus monachus*). Il pirene risulta essere il congenere primario (49,58%), seguito da naftalene (17,29%) e fluorantene (13,18%). Gli IPA considerati cancerogeni invece sono presenti al 4,83% (range 0,53-39,37%). La popolazione greca di foca monaca presenta valori medi paragonabili a quelli riportati da Marsili et al. (1997) in *Otaria flavescens* di Punta Bermeja e inferiori a quelli della colonia di Mar de la Plata. Rispetto ad altri mammiferi marini residenti nel Mar Mediterraneo invece, i risultati ottenuti per *Monachus monachus* sono mediamente inferiori a *Balenoptera physalus*. È difficile definire quanto i livelli di IPA rilevati nella popolazione greca di foca monaca affliggano la popolazione stessa, ma questo tipo di contaminanti è stato riscontrato in tutti gli esemplari a disposizione e perciò vanno considerati come possibile fonte di stress per la specie, specialmente in certe aree della Grecia nelle quali sono risultati in % su Σ IPA totali dei livelli particolarmente elevati di IPA cancerogeni (Isole Ionie e Cicladi). Infine, la popolazione appare risentire in modo differente la contaminazione da IPA a causa di variabili di tipo biologico, quali classe d'età e sesso. Nello specifico, i maschi adulti mostrano livelli maggiori di IPA cancerogeni rispetto a cuccioli e giovani, rendendoli più soggetti a fenomeni cancerogeni e i cuccioli di ambedue i

sessi mostrano concentrazioni di IPA totali più elevati di giovani ed adulti, indice del fatto che durante l'allattamento avviene un trasferimento di questi tossici da parte delle madri;

- in merito ai **contaminanti organoclorurati**, questa ricerca si propone di aggiornare i dati riguardanti l'esposizione da policlorobifenili, pesticidi ed esaclorobenzene. Dal rapporto DDTs/PCBs la popolazione greca di foca monaca risulta in generale essere interessata maggiormente ad un impatto industriale, ma un'analisi più nel dettaglio evidenzia che l'area geografica nella quale le colonie di foca monaca risiedono è la variabile maggiormente influente sulla tipologia di esposizione. Gli esemplari del Dodecaneso e Calcidica mostrano un valore medio pendente più verso una contaminazione da DDTs (2,02 e 2,47 rispettivamente) mentre quelli delle Cicladi da PCBs (0,89).
 - L'analisi del *fingerprint* dei **PCBs** ha evidenziato che il congenere primario risulta essere il #153 (27,12%), seguito da #138 (14,51%) e #180 (12,85%). Il *trend* temporale mostra una tendenza negli ultimi sette anni all'aumento delle concentrazioni di questi contaminanti, dato da tenere presente in quanto l'esposizione a contaminanti policlorobifenili per la popolazione di foca monaca era già stata considerata un importante fattore di rischio per la conservazione di questa specie da Borrell et al. (1997). Differenze statisticamente significative tra classi d'età o sesso sono assenti.
 - Per quanto riguarda l'esposizione da **DDTs**, l'analisi del *fingerprint* mostra che la forma preponderante nella popolazione greca di foca monaca è la p.p' DDE (91,76%), la principale forma derivante dalla degradazione metabolica del composto primario pp'DDT, e quindi si può dedurre che non ci sono immissioni recenti dell'insetticida nell'ecosistema. I livelli qui riportati sono

paragonabili a quelli di Borrell et al., (2007) per la popolazione greca e 2 volte maggiori di quelli riportati per la popolazione dell'Isola di Chafarina (Borrell et al., 1997), nel Mediterraneo Occidentale, e per l'individuo maschio ritrovato deceduto nell'Isola di Santorini, Grecia (Menchero et al., 1994).

Dai risultati ottenuti da questo studio, la popolazione greca risulta in una situazione di serio pericolo, considerando anche il fatto che negli ultimi 7 anni il valore medio di OCs accumulato nel tessuto adiposo è aumentato.

I fattori di rischio principali sono l'esposizione a policlorobifenili, arsenico e mercurio. In certe aree della Grecia, alcune colonie potrebbero essere soggette ad ulteriori pressioni date da pesticidi DDTs, nichel e cromo.

Appare necessario quindi uno studio approfondito sulla sensibilità specie-specifica a questi contaminanti ed ai possibili effetti sinergici o antagonisti tra miscele di diversi inquinanti organoclorurati.

I risultati ottenuti da questo studio mettono in luce aspetti biologici importanti, da tenere in considerazione in un piano di conservazione della specie. I livelli di esposizione riscontrati nella popolazione greca di foca monaca a determinati xenobiotici sono tali da poter provocare stati di immunosoppressione negli individui, esponendoli a infezioni e fenomeni stocastici di mortalità di massa, già avvenute per la popolazione atlantica di Capo Blanco (Osterhaus et al., 1997), a forme tumorali dell'apparato riproduttore ed interferenze dell'asse endocrino.

Bibliografia



©ΜΟm/Β. Παράβας

- Action Plan for the mitigation of the negative effects of monk seal - fisheries interactions in Greece, Summary Report. MOM, WWF Greece, Fisheries Research Institute, 2009. pp.11.
- Action Plan for the mitigation of the negative effects of monk seal-fisheries interactions in Greece, Summary Report. Mom, WWF Greece, Fisheries Research Institute (2009) , pp. 11.
- Aguilar A., Borrell A., Pastor T. (1999). Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans. J. Cetacean Res Manag. Pp. 83-116, special issue 1.
- Aguilar A., Borrell A., Reijnders PJH. (2002). Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals. Mar. Environ. Res. , 53:425-452.
- Aguilar, A. & Lowry, L. (IUCN SSC Pinniped Specialist Group) 2013. *Monachus monachus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2.
- Aguilar, A. and Borrell, A. 1994. Reproductive transfer and variation of body load of organochlorine pollutants with age in fin whales (*Balaenoptera physalus*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27(4):546-54.
- Aguilar, A., Borrell, A. and Pastor, T. 1999. Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans. J. Cetacean Res. Manage. (special issue) 1:83-116.
- Alexander, J.W., Solangi, M.A., Edwards, W.C., Whitenack, D., (1990). Selenium toxicosis in two California sea lions (*Zalophus californianus*). Int. Assoc. Aquat. Anim. Med. (IAAAM) Proc. 21, 25–28.
- Anan,Y., Kunito,T., Ikemoto,T., Kubota,R., Watanabe,I., Tanabe,S., Miyazaki, N., Petrov, E.A., 2002. Elevated concentrations of trace elements in Caspian seals (*Phoca caspica*) found stranded during the mass mortality events in 2000. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 42, 354–362.
- Andre´, J., Boudou, A., Ribeyre, F., Bernhard, M., 1991. Comparative study of mercury accumulation in dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from French Atlantic and Mediterranean coasts. Sci. Tot. Environ. 104, 191–209

- Androukaki E., Chatzisprou, A., Adamantopolou, S., Dendrinou, P., Kommenou, A., Kuiken, T., Tounta, E. and Kotomatas, S. (2006). Investigating the causes of the death in monk seals, stranded in coastal Greece. Poster presentation: 20th Annual Conference of the European Cetacean Society, 2-7 April 2006, Gdynia, Poland.
- Androukaki, E., S. Adamantopoulou, P. Dendrinou, E. Tounta and S. Kotomatas. (1999). Causes of mortality in the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) in Greece. *Contributions to the Zoology & Ecology of the Eastern Mediterranean Region 1* (1999): 405-411.
- Androukaki, E., S. Adamantopoulou, P. Dendrinou, E. Tounta and S. Kotomatas. 1999. Causes of mortality in the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) in Greece. *Contributions to the Zoology & Ecology of the Eastern Mediterranean Region 1* (1999): 405-411.
- Atkinson S (1997). Reproductive biology of seals. *Reviews of Reproduction* 2:175–194.
- Augier, H., Park, W.K., Ronneau, C., 1993. Mercury contamination of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba* Meyen) from French Mediterranean coasts. *Mar. Poll. Bull.* 26 (6), 306–311
- Bacci, E., 1989. Mercury in the Mediterranean. *Mar. Poll. Bull.* 20 (2), 59–63.
- Baker, J. R. (1989) Pollution associated uterine lesions in grey seals from Liverpool Bay area and the Irish Sea. *Veterinary Record* 125,303.
- Bellante A., Sprovieri M. Buscaino G., Buffa G., Di Stefano V., Salvagio Manta D., Barra M., Filiciotto F., Bonanno A. e Mazzola S., 2012. Distribution of Cd and As in organs and tissues of four marine mammal species stranded along the Italian coasts, *J. Environ. Monit.*, 14, 2382-2391
- Bergenstal DM, Hertz R, Lipsett MB, Moy RH (1960): Chemotherapy of adrenocortical cancer with o,p'-DDD (Rothane). *Annals of Internal Medicine* 53, 672-682
- Bergman, A. and Olsson, M. 1985. Pathology of Baltic ringed seal and grey seal females with special reference to adrenocortical hyperplasia: is environmental pollution the cause of a widely distributed disease syndrome? *Finn. Game Res.* 44: 47–62.
- Bergman, A., Olsson, M. and Reiland, S. 1992. Skull-bone lesions in the Baltic gray seal (*Halichoerus grypus*). *Ambio* 21: 517–519.

- Borrell A., Aguilar A., Corsolini S., Forcadi S. (1996) Evaluation of toxicity and sex-related variation of PCB levels in Mediterranean striped dolphins affected by an epizootic. *Chemosphere* 32:2359-69
- Bouquegneau J.M., Debacker V., Gobert S., Nellissen J.P. (1997b). Toxicological investigations on four sperm whales stranded on the Belgian coast: inorganic contaminants. In: Jacques T.G. and Lambertsen R.H., eds. Sperm whale deaths in the North Sea: Science and Management. *Bull. Inst. Roy. Sci. Nat. Belg.* 67 (suppl): 75–78.
- Braham, H.W., (1973). Lead in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Environ. Pollut.* 5, 253–258.
- Braham, H.W., 1973. Lead in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Environ. Pollut.* 5, 253–258.
- Brookens T.J., O'Hara T.M., Taylor R.J., Bratton G.R., Harvey J.T., 2008. Total mercury body burden in Pacific harbor seal, *Phoca vitulina richardii*, pups from central California. *Mar Pollut Bull.*;56(1):27-41.
- Brouwer, A., Reijnders, P.J.H. and Koeman, J.H. 1989. Polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated fish induces vitamin A and thyroid hormone deficiency in the common seal *Phoca vitulina*. *Aq. Toxicol.* 15: 99–106.
- Brunborg L.A., Graff I.E., Frøyland L., Julshamn K., 2006. Levels of non-essential elements in muscle from harp seal (*Phagophilus groenlandicus*) and hooded seal (*Cystophora cristata*) caught in the Greenland Sea area. *Sci Total Environ.* 1;366(2-3):784-98.
- Cagnazzi D, Fossi MC, Parra GJ, Harrison PL, Maltese S, Coppola D, Soccodato A, Bent M, Marsili L., 2013. Anthropogenic contaminants in Indo-Pacific humpback and Australian snubfin dolphins from the central and southern Great Barrier Reef. *Environ Pollut.* 182:490-4.
- Campbell PGC, Lesis AG, Chapman PM, Fletcher WK, Imber BE, Luoma SN, Stokes PM and Winfrey M. (1988) Biologically Available Metals in Sediments. Publication No. 27694. National Research Council of Canada, Ottawa
- Capelli R., Das K., De Pellegrini R., Drava G., Lepoint G., Miglio C., Mingantia V., Poggi R., 2008. Distribution of trace elements in organs of six species of cetaceans from the Ligurian Sea (Mediterranean), and the

- relationship with stable carbon and nitrogen ratios. *Science of The Total Environment*, Vol 390, pp. 569 – 578.
- Carvalho, M.L., Pereira, R.A., Brito, J., 2002. Heavy metals in soft tissues of *Tursiops truncatus* and *Delphinus delphis* from west Atlantic Ocean by X-ray spectrometry. *Sci. Total Environ.* 292, 247–254.
 - De Swart RL, Ross PS, Timmerman HH, Vos HW, Reijnders PJ, Vos JG, Osterhaus AD. 1995 Impaired cellular immune response in harbour seals (*Phoca vitulina*) feeding on environmentally contaminated herring. *Clin Exp Immunol.*;101(3):480-6.
 - Dehn, L.A., Follmann, E.H., Rosa, C., Duffy, L.K., Thomas, D.L., Bratton, G.R., et al., 2006. Stable isotope and trace element status of subsistence-hunted bowhead and beluga whales in Alaska and gray whales in Chukotka. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 301–319.
 - Dehn, L.A., Follmann, E.H., Thomas, D.L., Sheffield, G.G., Rosa, C., Duffy, L.K., et al., 2006. Trophic relationships in an Arctic food web and implications for trace metal transfer. *Sci. Total Environ.* 362, 103–123.
 - DeLong, R.L., Gilmartin, W.G. and Simpson, J.G. 1973. Premature births in Californian sealions: association with high organochlorine pollutant residue levels. *Science* 181: 1168–1170
 - Dosi A., 2000. Heavy Metals in Blubber and Skin of Mediterranean Monk Seals, *Monachus monachus* from the Greek Waters. Master of Science (MSc) Thesis. School of Ocean Sciences, University of North Wales, Bangor.
 - Douben P.E.T. (2003). PAHs: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-56024-3 (alk. paper)
 - Duinker, J.C., Hillebrand, M.T.J., Nolting, R.F., (1979). Organochlorines and metals in harbour seals (Dutch Wadden Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 10, 360–364.
 - Eisler R (2000) *Handbook of Chemical Risk Assessment*, vol. 2. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 1343–1411
 - Eisler R. (2010). *Compendium of Trace Metals and Marine Biota. Volume 2*
 - Eisler, R., (2000). Zinc. In: *Handbook of Chemical Risk Assessment. Volume 1.* Lewis Publishers, Boca Raton, FL

- Foster, R.F., (1963). Environmental behavior of chromium and neptunium. In: Schultz, V., Klement, A.W. (Eds.), Radioecology. Reinhold, New York, pp. 569–576.
- Frank, A., Galgan, V., Roos, A., Olsson, M., Petersson, L.R. & Bignert, A., 1992. Metal Concentrations in Seals from Swedish Waters. *Ambio*, 21: 529-538.
- Freeman H.C., Sangalang G.B., 1997. A study of the effects of methyl mercury, cadmium, arsenic, selenium, and a PCB (Arochlor 1254) on adrenal and testicular steroidogeneses in vitro, by the grey seal *Halichoerus grypus* *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 5 (1977), pp. 369–383
- Frouin H., Fortier M., Fournier M., 2010. Toxic effects of various pollutants in 11B7501 lymphoma B cell line from harbour seal (*Phoca vitulina*) *Toxicology*, 270 (2010), pp. 66–76
- Gonzalez, L.M., B. Heredia, A. Araujo, I. Robinson, J. Worms, P.S. Miller, and U. Seal (eds.). (2002). Population and Habitat Viability Assessment for the Mediterranean Monk Seal (*Monachus monachus*) in the Eastern Atlantic. Workshop Report. Apple Valley, MN: IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group
- Gray R., Canfield P., Rogers T., 2008. Trace element analysis in the serum and hair of Antarctic leopard seal, *Hydrurga leptonyx*, and Weddell seal, *Leptonychotes weddellii*; *Sci Total Environ*; 399(1-3) :202-15.
- Griest W.H., Caton J.E. (1983). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons for quantitative analysis. *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Ed. A. Bi4resth. 95-148.
- Hamanaka, T., Ito, T., Mishima, S., (1982). Age-related change and distribution of cadmium and zinc concentrations in the stellar sea lion (*Eumetopias jubata*) from the coast of Hokkaido, Japan. *Mar. Pollut. Bull.* 13, 57–61.
- Harper, E., Leger St., J.A., Westberg, J.A., Mazzaro, L., Schmitt, T., Reidarson, T.H. (2007). Tissue heavy metal concentrations of stranded California sea lions (*Zalophus californianus*) in southern California. *Environ. Pollut.* 147, 677–682.
- Harper, E., Leger St., J.A., Westberg, J.A., Mazzaro, L., Schmitt, T., Reidarson, T.H., et al., 2007. Tissue heavy metal concentrations of

- stranded California sea lions (*Zalophus californianus*) in southern California. *Environ. Pollut.* 147, 677–682.
- Hasunuma, R., Ogawa, T., Fujise, Y., Kawanashi, Y., (1993). Analysis of selenium metabolites in urine samples of minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) using ion exchange chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.* 104C, 87–89.
 - Helle, E. 1980. Lowered reproductive capacity in female ringed seals (*Pusa hispida*) in the Bothnian Bay, northern Baltic Sea, with special reference to uterine occlusions. *Ann. Zool. Fenn.* 17: 147–158.
 - Helle, E., Olsson, M. and Jensen, S. (1976) PCB levels correlated with pathological changes in seal uteri. *Ambio* 5, 261-263.
 - Helle, E., Olsson, M. and Jensen, S. 1976. PCB levels correlated with pathological changes in seal uteri. *Ambio* 5: 261–263
 - Hellenic Society for the Study and protection of the Monk Seal, (1995). Continuation of the Monitoring of the Monk Seals in the National Marine Park of Northern Sporades. Final Report for the European Commission Project 4-3010(92)7829.
 - Hernández, M., I. Robinson, A. Aguilar, L.M. González, L.F. López-Jurado, M.I. Reyero, E. Cacho, J. Franco, V. López-Rodas and E. Costas. (1998). Did algal toxins cause monk seal mortality? *Nature*, 393: 28-29.
 - Hernandez-Avila, M., Smith, D., Meneses, F., Sanin, L.H., Hu, H., (1998). The influence of bone and blood lead on plasma lead levels in environmentally exposed adults. *Environ. Health Perspect.* 106, 473–477.
 - Hoffman D. J., Rattner B. A., Burton, Jr. G. A., Cairns, Jr. J. (2002). *Handbook of ecotoxicology*, 2nd ed. ISBN 1-56670-546-0 (alk. paper)
 - Holmes A.L., Wise S.S., Goertz C.E., Dunn J.L., Gulland F.M., Gelatt T., Beckmen K.B., Burek K., Atkinson S., Bozza M., Taylor R., Zheng T., Zhang Y., Aboueissa A.M., Wise J.P. 2008. Metal tissue levels in Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) pups. *Mar Pollut Bull.*, 56(8):1416-21.
 - Holoubek I., Paasivirta J., Maatela P., Lahtipera M., Holoubkova I., Korinek P., Bohacek Z., Caslavsky J. (1990). Comparison of extraction methods for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in sediments. *Toxicol. Environ. Chem.* 25: 137-154.
 - Holsbeek L., Joiris C., Debacker V., Ali I., Roose P., Nellissen J.P., Gobert S., Bouquegneau J.M., Bossicart M. (1999). Heavy metals, organochlorines and polycyclic aromatic hydrocarbons in sperm whales

- stranded in the Southern North Sea during the 1994/1995 winter. *Mar. Pollut. Bull.* 38: 304–313.
- Hyvarinen H., Sipila T. (1984). Heavy metals and high pup mortality in the Saimaa ringed seal population in Eastern Finland. *Mar. Pollut. Bull.* 15(9): 335–337.
 - Ikemoto T., Kunito T., Tanaka H., Baba N., Miyazaki N., Tanabe S., 2004. Detoxification Mechanism of Heavy Metals in Marine Mammals and Seabirds: Interaction of Selenium with Mercury, Silver, Copper, Zinc, and Cadmium in Liver. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* , Vol. 47, Issue 3, pp 402-413
 - Jiawen Li, 2013. Distribution and maternal transfer of arsenic, cadmium, mercury, lead and selenium in Baikal seals (*Phoca sibirica*) . Norwegian University of Science and Technology
 - Johnson, W.M. and D.M. Lavigne. 1999. Mass Tourism and the Mediterranean monk seal. The role of mass tourism in the decline and possible future extinction of Europe's most endangered marine mammal, *Monachus monachus*. *Monachus Science. The Monachus Guardian* 2 (2) 1999. IMMA Inc. Guelph, Canada: 1-30.
 - Jones K.C., de Voogt P. (1999). Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environ Pollut.*, 100(1-3):209-21.
 - Jönsson CJ, Lund B-O, Brandt I (1993): Adrenocorticolytic DDT-metabolites: studies in mink, *Mustela vison* and otter, *Lutra lutra*. *Ecotoxicology* 2, 41-53
 - Jönsson CJ, Lund B-O, Brunström B, Brandt I (1994): Toxicity and irreversible binding of two DDT-metabolites- 3-methylsulphonyl-DDE and o,p'-DDD in adrenal interrenal cells in birds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1303-1310
 - Kakuschke A, Valentine-Thon E, Griesel S, Fonfara S, Siebert U, Prange A., 2005. Immunological impact of metals in harbor seals (*Phoca vitulina*) of the North Sea. *Env Sci Techno*, 39 (19): 7568-7575.
 - Kakuschke, A., Valentine-Thon, E., Fonfara, S., Griesel, S., Rosenberger, T., Siebert, U., et al., (2008). Metal-induced impairment of the cellular immunity to newborn harbor seals (*Phoca vitulina*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 129–136.
 - Kakuschke, A., Valentine-Thon, E., Fonfara, S., Griesel, S., Rosenberger, T., Siebert, U., et al., 2008. Metalinduced impairment of the cellular

- immunity to newborn harbor seals (*Phoca vitulina*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 129–136.
- Kannan K., Perrotta E., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in livers of California sea otters. *Chemosphere.* 71(4):649-55.
 - Karamanlidis, A.A., J. Curtis, E. Androukaki, E. Joseph, M. Psaradelli, E. Tounta and P. Dendrinis (2009). Isotopic tracking of foraging of Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*) in the eastern Mediterranean Sea. Poster presentation, in: Workshop "Research, Management, Conservation, and Policy in Monk Seal Recovery: A Global Perspective", 18th Biennial Conference of the Society for Marine Mammalogy. 10th October 2009, Quebec, Canada.
 - Karamanlidis, A.A., S. Adamantopoulou, V. Paravas, M. Psaradellis, P. Dendrinis. (2013). Demographic structure and social behaviour of the unique Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) colony of the island of Gyros. Poster presentation, in: 20th Biennial Conference of the Society for Marine Mammalogy. 10th December 2013, Dunedin, New Zealand
 - Kedzierski A., Nakonieczny M., Swierczek E., Szulińska E., 1996. Cadmium-selenium antagonism and detoxifying enzymes in insects., *Anal Bioanal Chem.* ;354(5-6):571-5.
 - Koeman J.H., Peeters W.H.M., Koudstaal-Hol C.H.M., Tjioe P.S., De Goeij J.J.M. (1973). Mercury–selenium correlations in marine mammals. *Nature* 245: 385–386.
 - Koeman, J.H., Peters, W.H.M., Koudstaal-Jol, C.H.M., Tjioe, P.S., de Goeij, J.J.M., (1973). Mercury-selenium correlations in marine mammals. *Nature* 245, 385–386.
 - Kuehl, D.W., Haebler, R., Potter, C., 1994. Coplanar PCB and metal residues in dolphins from the U.S. Atlantic coast including Atlantic bottlenose obtained during the 1987/88 mass mortality. *Chemosphere* 28, 1245–1253.
 - Kwohn Y.T., Yamazaki S., Okubo A., Yoshimura E., Tatsukawa R., Toda S. (1986). Isolation and characterization of metallothionein from kidney of striped dolphin,
 - Law R.J. (1996). Metals in marine mammals. In: Beyer W.N., Heinz G.H., Redmond-Norwood A.W. eds. *Environmental contaminants in wildlife.*

Interpreting Tissues Concentrations. SETAC Special Publication Series. CRC Press Inc., Lewis Publishers INC., Boca Raton, FL, pp. 357–376.

- Law, R.J., Jones, B.R., Baker, J.R., Kennedy, S., Milne, R., Morris, R.J., 1992. Trace metals in the livers of marine mammals from the Welsh coast and the Irish Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 24, 296–304.
- Law, R.J., Stringer, R.L., Allchin, C.R., Jones, B.R., 1996. Metals and organochlorines in sperm whales (*Physeter macrocephalus*) stranded around the North Sea during the 1994/1995 winter. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 72–77.
- Malcom H.M., Boyd J.L, Osborn D., French M.C., Freestone P., 1994. Trace metals in Antarctic fur seal (*Arctocephalus gazelle*) livers from Bird Island, South Georgia. *Mar Pollut Bull.*;28(6):375-380.
- Marsili L, Caruso A, Fossi MC, Zanardelli M, Politi E, Focardi S., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in subcutaneous biopsies of Mediterranean cetaceans. *Chemosphere.* 44(2):147-54.
- Marsili L, Fossi MC, Casini S, Savelli C, Jimenez B, Junin M, Castello H., 1997 .Fingerprint of polycyclic aromatic hydrocarbons in two populations of southern sea lions (*Otaria flavescens*). *Chemosphere.* 34(4):759-70.
- Marsili L., Fossi M.C., Casini S., Savelli C. Jimenez B., Junin M., Castello H. (1997). Fingerprint of polycyclic aromatic hydrocarbons in two populations of southern sea lions (*Otaria flavescens*). *Chem.* 34(4): 759-770.
- Martin, J.H., Elliot, P.D., Anderlini, V.C., Girvin, D., Jacobs, S.A., Risebrough, R.W., et al., (1976). Mercury selenium-bromine imbalance in premature parturient California sea lions. *Mar. Biol.* 35, 91–104.
- Medvedev N., Panichev N., Hyvärinen H. 1997, Levels of heavy metals in seals of Lake Ladoga and the White Sea. *Sci Total Environ.* Nov 5;206(2-3):95-105.
- Mo G., Zotti A., Agnesi S., Finoia M.G., Bernardini D., Cozzi B. (2009) Age Classes and Sex Differences in the Skull of the Mediterranean Monk Seal, *Monachus monachus* (Hermann, 1779). A Study Based on Bone Shape and Density. *The anatomical record* 292:544–556
- Mochizuki Y., Suzuki K.T., Sunaga H., Kobayashi T., Doi R. (1985). Separation and characterization of metallothionein in two species of seals by high performance liquid chromatography–atomic absorption spectrophotometry. *Comp. Biochem. Physiol.* 82C(2): 249–254.

- Mortensen, P., Bergman, A., Bignert, A., Hansen, H.-J., Härkönen, T. and Olsson, M. 1992. Prevalence of skull lesions in harbour seals (*Phoca vitulina*) in Swedish and Danish museum collections: 1835–1988. *Ambio* 21: 520–524.
- Nichols J., Hennigar G. (1957): Studies on DDD, 2,2-bis (parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane. *Exp Med Surg* 15, 310-316
- Norheim, G., Skaare, J.U., Wiig, O., 1992. Some heavy metals, essential elements, and chlorinated hydrocarbons in polar bear (*Ursus maritimus*) at Svalbard. *Environ. Pollut.* 77, 51–57.
- Nyman M, Koistinen J, Fant ML, Vartiainen T, Helle E., 2002. Current levels of DDT, PCB and trace elements in Baltic ringed (*Phoca hispida baltica*) and grey seals (*Halichoerus grypus*). *Environ Pollut* 119: 399–412.
- Nyman M., Koistinen J., Fant M.L., Vartiainen T., Helle E., 2002; Current levels of DDT, PCB and trace elements in the Baltic ringed seals (*Phoca hispida baltica*) and grey seals (*Halichoerus grypus*). *Environ Pollut.* 119(3):399-412.
- Olafson R.W. and Thompson J.A.J. (1974). Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Mar. Biol.* 28: 83–86.
- Osterhaus A., J. Groen, H. Niesters, M. van de Bildt, B. Martina, L. Vedder, J. Vos, H. van Egmond, B. A. Sidi et M. E. O.Barham (1997). Morbillivirus in monk seal mass mortality. *Nature* 388, pp. 838-839.
- Palmisano F., Cardellicchio N., Zambonin P.G. (1995). Speciation of mercury in dolphin liver: a two-stage mechanism for the demethylation accumulation process and role of selenium. *Mar. Environ. Res.* 40(2): 109–121.
- Panou, A., J. Jacobs, D. Panos. (1993). The Endangered Mediterranean Monk Seal *Monachus monachus* in the Ionian Sea, Greece. *Biological Conservation* 64:129-140.
- Pastor T, Garza JC, Allen P, Amos W, Aguilar A. (2004). Low genetic variability in the highly endangered mediterranean monk seal., *J Hered.* (4):291-300.
- Pastor T., J. C. Garza, A. Aguilar, E. Tounta, E. Androukaki (2007). Genetic diversity and differentiation between the two remaining populations of the critically endangered Mediterranean monk seal, *Animal Conservation*, Vol. 10, Issue 4, pp. 461–469

- Peterson S.H., Hassrick J.L., Lafontaine A., Thomé J.P., Crocker D.E., Debier C., Costa D.P. (2014) Effects of age, adipose percent, and reproduction on PCB concentrations and profiles in an extreme fasting North Pacific marine mammal. *PLoS One*. 22;9(4):e96191.
- Pierce G.J., Hernández G., Santos M.B., Edridge A., Dendrinis P., Psaradelli M., Tounta E., Androukaki E. (2009), Diet of Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*), Conference proceeding European Cetacean Society
- Pierce, G.J., Hernandez-Milian, G., Santos, M.B., Psaradellis, M., Tounta, E., Androukaki, E. & Edridge, A. (2011). Diet of the Monk Seal (*Monachus monachus*) in Greek Waters. *Aquatic Mammals* 27(3), 284-297
- Reijnders, P. J. H. (1980) Organochlorine and heavy metal residues in harbour seals from the Wadden Sea and their possible effects on reproduction. *Netherlands Journal of Sea Research* 14, 30-65.
- Reijnders, P.J.H. 1986. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature* 324: 456–457.
- Reyero M, Cacho E, Martínez A, Vázquez J, Marina A, Fraga S, Franco JM (1999). Evidence of saxitoxin derivatives as causative agents in the 1997 mass mortality of monk seals in the Cape Blanc Peninsula. *Nat Toxins*. . Vol7(6):311-5.
- Ridgway, S. and Reddy, M. 1995. Residue levels of several organochlorines in *Tursiops truncatus* milk collected at varied stages of lactation. *Mar. Poll. Bull.* 30(9):609-14.
- Roberts, T.M., Heppleston, P.B., Roberts, R.D., (1976). Distribution of heavy metals in tissues of the common seal. *Mar. Pollut. Bull.* 7, 194–196.
- Roberts, T.M., Heppleston, P.B., Roberts, R.D., 1976. Distribution of heavy metals in tissues of the common seal. *Mar. Pollut. Bull.* 7, 194–196.
- Ross P, De Swart R, Addison R, Van Loveren H, Vos J, Osterhaus A. 1996a. Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: wildlife at risk? *Toxicology*.112(2):157-69. Review.
- Ross PS, De Swart RL, Reijnders PJ, Van Loveren H, Vos JG, Osterhaus AD. 1995. Contaminant-related suppression of delayed-type hypersensitivity and antibody responses in harbor seals fed herring from the Baltic Sea. *Environ Health Perspect.*;103(2):162-7.

- Ross, P. S., De Swart, R. L., Timmerman, H. H., Reijnders, P. J. H., Vos, J. G., Van Loveren, H., & Osterhaus, A. D. M. E. (1996). Suppression of natural killer cell activity in harbour seals (*Phoca vitulina*) fed Baltic Sea herring. *Aquatic Toxicology*, 34(1), 71-84.
- Salman, A., M. Bilecenoglu and H. Güçlüsoy. (2001). Stomach contents of two Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*) from the Aegean Sea, Turkey. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81 (4): 719 - 720.
- Samaranch , R. , and Gonzalez , L. M. (2000). Changes in morphology with age in Mediterranean monk seals *Monachus monachus* . *Mar.Mamm. Sci.* 16 , 141 – 157
- Shoham-Frider E., Amiel S., Roditi-Elasar M., Kress N., 2002. Risso's dolphin (*Grampus griseus*) stranding on the coast of Israel (eastern Mediterranean). Autopsy results and trace metal concentrations. *Science of The Total Environment*, Vol. 295, Issues 1–3, pp 157–166.
- Skaare J.U., Markussen N.H., Norheim G., Haugen S., Holt G. 1990. Levels of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, mercury, cadmium, copper, selenium, arsenic, and zinc in the harbour seal, *Phoca vitulina*, in Norwegian waters. *Environ Pollut.* 66(4):309-24
- Sonne-Hansen, C., Dietz, R., Leifsson, P.S., Hyldstrup, I., Riget, E.F., 2002. Cadmium toxicity to ringed seals (*Phoca hispida*): an epidemiological study of possible cadmium-induced neuropathy and osteodystrophy in ringed seals (*Phoca hispida*) from Qaanaaq in northwest Greenland. *Sci. Total Environ.* 295, 167–181.
- Sporstol S, Gjos N, Lichtenthaler RG, Gustavsen KO, Urdal K, Oreld F and Skei J (1983). Source identification of aromatic hydrocarbons in sediments using gc/ms. *Environmental Science and Technology*, 17, 282–286.
- Stede, G. and Stede, M. 1990. Orientierende Untersuchungen von Seehundschädeln auf pathologische Knochenveränderungen. In: *Zoologische und Ethologische Untersuchungen zum Robbensterben*. Inst. f. Haustierkunde, Kiel, Germany, 31–53.
- *Stenella coeruleoalba*. *Agric. Biol. Chem.* 50(11): 2881–2885.
- Storelli, M.M., Ceci, E., Marcotrigiano, G.O., (1998). Comparison of total mercury, methylmercury, and selenium in muscle tissues and in the liver

- of *Stenella coeruleoalba* (Meyen) and *Caretta caretta* (Linnaeus). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 61, 541–547.
- Subramanian, A. N., Tanabe, S., Tatsukawa, R., Saito, S. and Miyazaki, N. (1987) Reduction in the testosterone levels by PCBs and DDE in Dali's porpoises of Northwestern North Pacific. Marine Pollution Bulletin 18(12), 643-646.
 - Swart, R. L. de, Ross, P. S., Timmerman, H. H., Vos; H. W., Reijnders, P. J. H., Vos, J. G. and Osterhaus, D. M. E (1995) Impaired cellular immune response in harbour seals (*Phoca vitulina*) fed environmentally contaminated herring. Clinical and Experimental Immunology 101, 480-486.
 - Swart, R. L. de, Ross, P. S., Vedder, L. J., Timmerman, H. H., Heisterkamp, S. H., Van Loversen, H., Vos, J. G., Reijnders, P. J.H. and Osterhaus, D. M. E. (1994) Impairment of immune function in harbour seals (*Phoca vitulina*) feeding on fish from polluted waters. Ambio 23, 155-159.
 - Szefer, P., Szefer, K., Pempkowiak, J., Skwarzec, B., Bojanowski, R., (1994). Distribution and co-associations of selected metals in seals of the Antarctic. Environ. Pollut. 83, 341–349
 - T.J. O'Shea, R.R. Reeves & A. Kirk Long (eds.),1999. Marine mammals and persistent ocean contaminants: proceedings of the Marine Mammal Commission workshop, Keystone, Colorado, 12-15 October 1998. Bethesda MD (USA), Marine Mammal Commission.
 - Tohyama C., Himeno S.I., Watanabe C., Suzuki T., Morita M. (1986). The relationship of the increased level of metallothionein with heavy metal levels in the tissue of the harbor seal (*Phoca vitulina*). Ecotoxicol. Environ. Safety 12(1): 85–94.
 - Toplu N, Aydoğan A, Oguzoglu TC. (2007), Visceral leishmaniosis and parapoxvirus infection in a Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*). J Comp Pathol. Vol 136(4):283-7.
 - UNEP/MAP. 1994. Present Status and Trend of the Mediterranean Monk Seal (*Monachus monachus*) Populations. pp. 44, 15 figs., refs. UNEP/MAP Meeting of Experts on the Evaluation of the Implementation of the Action Plan for the Management of the Mediterranean Monk Seal, Rabat, Morocco, 7-9 October 1994. RAC/SPA (UNEP), Tunis, UNEP(OCA)/MED WG. 87/3.

- Van de Bildt M.W.G., E.J. Vedder, B.E.E. Martina, Ba Abou Sidi, Azza Bent Jiddou, Mohamed Ely Ould Barham, E. Androukaki, A. Komnenou, H.G.M. Niesters, A.D.M.E. Osterhaus (1999). Morbilliviruses in Mediterranean monk seals, *Veterinary Microbiology*, Volume 69, Issues 1–2, Pp. 19-21
- Veinott, G., Sjare, B., 2006. Mercury, cadmium, selenium, and seven other elements in the muscle, renal, and hepatic tissue of harbor seals (*Phoca vitulina*) from Newfoundland and Labrador, Canada. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 77, 597–607.
- Villa, R.B., Osuna, F.P., Cortes, M.H.P., 1993. Concentraciones de metales pesados en el tejido cardiaco, hepatico y renal de la vaquita *Phocoena sinus* (mammalia: phocoenidae). *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Auto, Mexico, Ser. Zool.* 64, 61–72.
- Wagemann R., Trebacz E., Boila G., Lockhart W.L. (1998), Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals, *Science of The Total Environment*, Vol.218, Issue 1, pp 19–31.
- Watanabe, I., Tanabe, S., Amano, M., Miyazaki, N., Petrov, E.A. & Tatsukawa, R., 1998. Age-Dependent Accumulation of Heavy Metals in Baikal Seal (*Phoca sibirica*) from the Lake Baikal. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 35: 518-526.
- Watanabe, I., Tanabe, S., Amano, M., Miyazaki, N., Petrov, E.A., Tatsukawa, R., 1998. Age-dependent accumulation of heavy metals in Baikal seal (*Phoca sibirica*) from the Lake Baikal. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*35, 518–526.
- Watanabe, T. Kunito, S. Tanabe, M. Amano, Y. Koyama, N. Miyazaki, E.A. Petrov, R. Tatsukawa, 2002. Accumulation of heavy metals in Caspian seals (*Phoca caspica*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 43: 109–120.
- Wolkers J, Burkow IC, Lydersen C, Dahle S, Monshouwer M, Witkamp RF. (1998) Congener specific PCB and polychlorinated camphene (toxaphene) levels in Svalbard ringed seals (*Phoca hispida*) in relation to sex, age, condition and cytochrome P450 enzyme activity. *Sci Total Environ*;216:1–11.
- Wood, C.M., Van Vleet, E.S., (1996). Copper, cadmium and zinc in liver, kidney and muscle tissues of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) stranded in Florida. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 886–889
- World Health Organization (WHO), 1991. Nickel. *Environ. Health Crit.* 108, 1–383.

- Yediler, A., Panou, A. & Schramel, P., 1993. Heavy Metals in Hair Samples of the Mediterranean Monk Seal (*Monachus monachus*). *Mar. Pollut. Bull.*, 26: 156-159.
- Ylitalo, G.M., Matkin, C.O., Buzitis, J., Krahn, M.M., Jones, L.L., Rowles, T. and Stein, J.E. 2001. Influence of life-history parameters on organochlorine concentrations in free-ranging killer whales (*Orcinus orca*) from Prince William Sound, AK. *Sci. Total Environ.* 281:183-203.
- Ylitalo, G.M., Stein, J.E., Hom, T., Johnson, L.L., Tilbury, K.L., Hall, A.J., et al., 2005. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Mar. Pollut. Bull.* 50, 30-39.

Sitografia

- www.epa.gov
- www.mom.gr
- www.monachus-guardian.org

Allegati

SIGLA	ANNO	SESSO	CLASSE D'Età	LOCALITA'NOME	H2O%	MOE%	HCb	DDTs	PCBs	OCs	IPA Tot	IPA Canc
ID85	05/01/1995	Femmina	2	Cicladi	23,9	92,3000	131,8000	13652,4000	6214,7400	19998,9400	245,3100	1,7700
ID89	28/01/1996	Femmina	5	Isole Nord Egeo	47,8	48,4000	189,9600	93818,5100	33573,8300	127582,3000	1116,8900	39,6500
ID91	14/03/1996	Maschio	2	Cicladi	14,3	83,4000	297,8800	37967,8800	20761,3700	59027,1300	348,7300	3,3800
ID92	15/10/1996	Femmina	1	Sporadi	42,7	63,1000	79,0300	15436,6300	8970,8100	24486,4700	288,7000	2,9200
ID94	12/12/1996	Maschio	5	Isole Nord Egeo	46,8	17,8000	0,0000	6118,8800	3846,1900	9965,0700	230,5400	3,1600
ID97	16/06/1997	Femmina	5	Attica	31,5	77,8000	828,2400	442059,4100	1252828,2900	1695715,9500	341,8600	5,0900
ID98	24/09/1997	Maschio	5	Dodecaneso	33,6	84,7000	127,5700	63999,6300	32201,2500	96328,4600	1090,3200	50,4700
ID104	28/11/1998	Maschio	1	Dodecaneso	36,1						656,2000	20,3300
ID105	09/12/1998	Maschio	1	Evia-Grecia centrale	57,1	30,4000	0,0000	6117,2600	4256,5700	10373,8400	1600,0800	61,7100
ID107	15/04/1999	Femmina	5	Isole Nord Egeo	22,6	86,1000	842,0000	768621,7500	414037,6100	1183501,3600	168,4900	21,5800
ID109	02/06/1999	Femmina	5	Calcidica	22,8	74,6000	183,4400	45235,2500	18331,2300	63749,9200	688,8100	5,0600
ID110	20/06/1999	Maschio	2	Evia-Grecia centrale	36,1						787,4800	9,0100
ID111	22/08/1999	Femmina	5	Cicladi	47,9	40,1000	28,2800	5553,5700	4736,6100	10318,4600	331,7000	3,4600
ID113	11/11/1999	Maschio	1	Isole Nord Egeo	36,1						634,1900	17,7200
ID114	21/01/2000	Maschio	2	Ionie	32,8	91,3000	223,4100	24388,3400	29718,2700	54330,0200	335,5000	41,0200
ID117	10/08/2000	Femmina	5	Ionie	43,8	29,1000	99,7700	17936,5500	20404,4100	38440,7200	1131,6400	27,9400
ID119	05/12/2000	Femmina	1	Sporadi	26,4	85,1000	635,0800	183559,9500	70661,6000	254856,6300	305,1100	8,9100
ID120	11/12/2000	Maschio	1	Sporadi	34,2	42,2000	347,2900	228217,0400	91789,0500	320353,3700	314,1600	4,4800
ID124	09/04/2001	Femmina	2	Ionie	26,7	83,5000	80,3700	11828,7500	12224,0700	24133,1800	211,2600	3,3500
ID127	15/06/2001	Femmina	2	Ionie	36,1						1154,9200	18,4700
ID128	24/06/2001	Femmina	2	Attica	31,9	66,3000	111,8600	29192,6700	21644,0700	50948,6000	841,5400	16,5500
ID129	02/10/1995	Femmina	1	Evia-Grecia centrale	22,3	82,0000	40,4900	2014,0100	4275,4700	6329,9700	674,0877	7,9000
ID138	24/01/2002	Maschio	2	Evia-Grecia centrale	18,4	87,4000	268,0600	40497,9000	23782,9600	64548,9200	809,8600	10,7300
ID145	28/11/2002	Maschio	2	Evia-Grecia centrale	29,7	89,9000	223,8400	18491,9300	15311,1800	34026,9500	457,0500	19,6500
ID146	15/04/2003	Maschio	2	Evia-Grecia centrale	13,4	94,9000	232,4600	31089,2400	29264,6500	60586,3500	202,4800	7,1300
ID148	18/05/2003	Maschio	5	Isole Nord Egeo	32,5	92,0000	194,9000	38680,0500	25017,6400	63892,5900	172,8800	8,8500
ID151	14/12/2003	Maschio	2	Cicladi	28,1	91,8000	132,0600	15736,7800	15773,2900	31642,1300	212,8300	27,1100
ID152	01/05/2004	Maschio	2	Cicladi	36,1						953,5900	22,0900
ID154	03/03/2004	Maschio	2	Ionie	23,4	95,0000	125,0500	8393,8900	8650,9500	17169,8900	1066,7900	55,7400
ID155	16/02/2004	Femmina	2	Sporadi	13,6	94,2000	183,2800	23058,6200	14333,0400	37574,9400	416,5900	8,9100
ID162	05/12/2001	Maschio	1	Dodecaneso	31,5	87,9000	240,3800	87928,4000	28195,4700	116364,2500	395,3300	6,8500
ID164	23/11/2005	Femmina	2	Ionie	44,2	95,3000	121,6600	19391,1100	18477,4800	37990,2500	69,0600	7,1600
ID167	12/10/2004	Femmina	5	Evia-Grecia centrale	22,1	84,2000	88,7200	9595,2800	53089,9200	62773,9300	807,6800	14,8500
ID181	19/05/2006	Femmina	5	Calcidica	36,1						1034,8900	10,8000
ID184	02/11/2006	Maschio	1	Evia-Grecia centrale	51,3	58,8000	0,0000	6585,3200	11369,4300	17954,7400	863,4700	11,1900
ID186	19/05/2007	Maschio	2	Cicladi	31,3	71,3000	106,0500	33144,7800	105264,4200	138515,2500	557,1300	5,0300
ID192	15/01/2008	Femmina	2	Attica	60,9	86,4000	103,7900	13058,5400	42954,4700	56116,8000	423,4200	30,9300
ID193	27/02/2008	Femmina	5	Cicladi	41,6	75,8000	89,2400	17365,9400	27015,3100	44470,4900	390,3900	51,0700
ID205	17/10/2008	Maschio	2	Cicladi	28,2	86,2000	436,8600	35382,7700	85384,3900	121204,0200	308,8700	12,5200
ID210	11/02/2009	Maschio	2	Cicladi	33,9	84,1000	50,4000	8398,6700	11316,3000	19765,3700	410,0200	16,0900
ID212	20/04/2009	Femmina	5	Cicladi	25	39,8000	42,0300	10664,1400	21141,2600	31847,4200	306,5800	120,7200
ID214	15/05/2009	Femmina	2	Dodecaneso	30,8	93,0000	54,0100	2118,3700	2208,8100	4381,1800	277,1900	8,0100
ID216	29/08/2009	Femmina	1	Cicladi	21,7	93,3000	116,5500	10394,0600	7442,2000	17952,8000	362,6800	16,6500
ID219	23/10/2009	Femmina	1	Evia-Grecia centrale	68,7	12,5000	92,4300	18697,6100	21930,9900	40721,0300	705,5400	36,0400
ID223	08/06/2010	Maschio	5	Evia-Grecia centrale	72,7	86,7000	324,3000	63222,2800	64963,7600	128510,3400	193,0500	38,6000
ID229	28/10/2010	Maschio	1	Cicladi	56,5	60,4000	59,1200	3962,3600	4385,4200	8406,9100	662,0900	3,5200
ID230	10/01/2011	Femmina	2	Sporadi	46,8	58,6000	180,4400	62676,0800	293118,4100	355974,9200	7894,0700	62,2500
ID231	16/02/2011	Femmina	2	Evia-Grecia centrale	68	94,9000	141,0200	23244,0200	14381,3600	37766,4000	214,4700	1,9700
ID237	10/06/2011	Maschio	2	Cicladi	68,5	92,2000	553,1000	71559,3300	162365,5400	234477,9700	185,8300	27,6500
ID239	25/10/2011	Maschio	5	Evia-Grecia centrale	17,3	93,2000	150,7400	11771,0400	17132,0800	29053,8600	284,1900	34,2800
ID249	03/04/2012	Femmina	2	Cicladi	80,7	90,7000	62,2800	8880,1400	16088,6700	25031,0900	226,8500	7,9500
ID251	25/05/2011	Femmina	5	Cicladi	37,6	64,0000	0,0000	2566,2100	11322,3200	13888,5300	125,6400	4,5700
ID255	12/07/2012	Femmina	5	Attica	28,3	93,9000	130,9000	19597,7300	193343,5600	213072,1900	147,9500	4,5700
ID257	22/02/2013	N.D.	N.D.	Isole Nord Egeo	19,1	95,3000	78,6900	8230,2300	7161,6500	15470,5700	173,9200	5,4800
ID258	01/03/2013	N.D.	N.D.	Cicladi	21,7	93,2000	217,9500	18679,2600	18447,9100	37345,1200	222,0200	8,9700

Tabella 1. Contaminanti organici negli esemplari di *Monachus monachus* della Grecia utilizzati per il presente studio. I valori di IPA ed OCs sono espressi in ng/g peso secco.

ID	Sesso	classe d'età	località	anno	As	Co	Cr	Cu	Mn	Fe	Ni	Pb	Se	Zn	Cd	Hg
83	Maschio	cucciolo	Sporadi	1994	0,50	0,06	1,19	0,71	1,77	82,29	0,41	6,79	0,19	8,02	0,02	0,03
85	Femmina	giovanile	Cicladi	1995	1,20	0,01	0,16	0,56	0,11	16,89	0,56	0,19	0,16	1,99	0,01	0,29
89	Femmina	adulto	Isole Nord Egeo	1996	0,65	0,02	0,02	0,34	0,05	5,58	0,10	0,02	0,12	1,06	0,02	0,11
91	Maschio	giovanile	Cicladi	1996	0,10	0,02	0,32	1,02	1,00	49,96	0,45	0,21	0,18	2,29	0,01	0,20
92	Femmina	cucciolo	Sporadi	1996	0,20	0,02	0,08	1,08	0,15	9,72	0,57	0,01	0,20	3,10	0,01	0,05
94	Maschio	adulto	Isole Nord Egeo	1996	0,65	0,03	0,17	0,82	0,14	34,19	0,31	0,19	0,20	4,00	0,05	0,02
97	Femmina	adulto	Attica	1997	1,55	0,02	0,23	4,66	0,06	3,08	1,30	0,01	0,24	3,96	0,02	0,08
98	Maschio	adulto	Dodecaneso	1997	2,15	0,02	0,02	7,98	0,10	2,22	0,38	0,03	0,29	4,75	0,02	0,15
101	Femmina	cucciolo	Isole Nord Egeo	1997	1,39	0,03	0,17	0,62	0,13	10,33	2,05	0,95	0,27	5,05	0,02	0,11
104	Maschio	cucciolo	Dodecaneso	1998	0,74	0,05	0,41	2,26	0,44	52,85	0,82	0,51	0,48	12,04	0,02	0,02
105	Maschio	cucciolo	Evia-Grecia Centrale	1998	0,35	0,03	0,09	0,90	0,59	3,36	0,37	0,01	0,14	3,63	0,01	0,02
107	Femmina	adulto	Isole Nord Egeo	1999	0,15	0,03	0,14	0,40	0,56	37,38	0,67	0,09	0,33	2,75	0,05	0,15
109	Femmina	adulto	Attica	1999	1,01	0,02	0,02	9,26	0,08	2,44	0,54	0,06	0,48	7,23	0,04	0,54
110	Maschio	giovanile	Evia-Grecia Centrale	1999	0,14	0,02	0,01	6,64	0,09	2,81	0,39	0,05	0,25	5,31	0,01	0,20
111	Femmina	adulto	Cicladi	1999	0,97	0,02	0,03	0,57	0,05	27,96	0,13	0,03	0,42	4,95	0,08	0,26
112	Maschio	cucciolo	Sporadi	1999	0,34	0,03	0,05	0,39	0,07	17,17	0,78	0,04	0,21	3,42	0,05	0,13
113	Maschio	cucciolo	Isole Nord Egeo	2009	0,66	0,02	0,06	0,75	0,09	18,40	0,19	0,09	0,20	8,20	0,02	0,01
114	Maschio	giovanile	Ionie	2000	0,26	0,02	0,07	0,77	0,15	10,47	0,36	0,12	0,17	1,46	0,02	0,36
117	Femmina	adulto	Ionie	2000	0,39	0,02	0,00	0,23	0,02	3,71	0,09	0,06	0,25	2,08	0,04	0,41
119	Femmina	cucciolo	Sporadi	2000	0,91	0,01	0,02	0,06	0,01	0,11	0,00	0,00	0,02	0,33	0,01	0,05
120	Maschio	cucciolo	Sporadi	2000	0,60	0,02	0,03	0,50	0,05	8,55	0,12	0,47	0,25	5,25	0,02	0,03
124	Femmina	giovanile	Ionie	2001	0,22	0,02	0,02	7,52	0,11	8,00	0,38	0,10	0,49	9,56	0,01	0,19
127	Femmina	giovanile	Ionie	2001	0,80	0,02	0,05	7,75	0,30	41,33	0,50	0,05	0,50	8,29	0,04	0,14
128	Femmina	giovanile	Attica	2001	0,19	0,02	0,07	7,14	0,39	26,34	0,56	0,13	0,28	6,94	0,02	0,36
129	Femmina	cucciolo	Evia-Grecia Centrale	1995	0,08	0,01	0,02	0,47	0,03	2,28	0,20	0,05	0,16	1,56	0,01	0,18
138	Maschio	giovanile	Evia-Grecia Centrale	2002	1,53	0,05	0,53	7,18	4,00	60,81	1,09	0,09	0,57	6,95	0,02	0,74
145	Maschio	giovanile	Evia-Grecia Centrale	2002	0,33	0,02	0,01	0,19	0,02	4,62	0,33	0,05	0,06	1,61	0,02	0,08
146	Maschio	giovanile	Evia-Grecia Centrale	2003	0,47	0,02	0,01	7,65	0,08	3,47	0,41	0,11	0,27	7,15	0,02	0,42
148	Maschio	adulto	Isole Nord Egeo	2003	2,48	0,07	0,87	7,57	2,11	111,59	3,97	0,04	0,40	7,50	0,02	0,22
151	Maschio	giovanile	Cicladi	2003	0,98	0,02	0,01	0,29	0,07	4,88	0,17	0,04	0,05	4,32	0,02	0,03
152	Maschio	giovanile	Cicladi	2004	0,70	0,03	0,21	0,20	0,03	6,27	1,03	0,04	0,13	1,69	0,03	0,01
154	Maschio	giovanile	Ionie	2004	0,53	0,02	0,03	0,13	0,36	9,17	0,12	0,09	0,03	1,19	0,02	0,04
155	Femmina	giovanile	Sporadi	2004	0,35	0,02	0,55	3,93	0,08	4,24	2,82	0,05	0,24	3,76	0,02	0,39
161	Femmina	adulto	Evia-Grecia Centrale	2004	0,84	0,02	0,05	0,44	0,43	16,76	0,20	0,06	0,29	3,79	0,02	0,28
162	Maschio	cucciolo	Dodecaneso	2001	0,33	0,02	0,02	0,45	0,04	5,01	0,93	0,15	0,23	2,45	0,02	0,35
164	Femmina	giovanile	Ionie	2005	0,22	0,02	0,01	0,12	0,47	5,86	0,09	0,07	0,02	1,56	0,01	0,07
181	Femmina	adulto	Calcidica	2008	0,43	0,02	0,14	0,92	0,07	15,01	0,22	0,03	0,37	3,80	0,06	0,26
184	Maschio	cucciolo	Evia-Grecia Centrale	2006	0,30	0,02	0,11	0,25	0,03	3,58	0,15	0,14	0,04	1,80	0,02	0,06
186	Maschio	giovanile	Cicladi	2007	0,64	0,02	0,05	8,70	0,26	8,87	0,45	0,05	0,51	7,82	0,02	0,16
192	Femmina	giovanile	Attica	2008	1,29	0,02	0,04	0,36	0,02	2,73	0,28	0,11	0,04	0,96	0,02	0,03
193	Femmina	adulto	Cicladi	2008	2,02	0,02	0,88	0,54	0,06	3,59	4,23	0,12	0,19	1,84	0,02	0,30
205	Maschio	giovanile	Cicladi	2008	0,38	0,02	0,90	0,52	0,31	23,28	3,88	0,12	0,16	1,45	0,04	0,14
210	Maschio	giovanile	Cicladi	2009	0,19	0,02	2,04	1,76	0,12	8,87	11,32	0,03	0,07	1,18	0,02	0,01
212	Femmina	adulto	Cicladi	2009	0,29	0,06	0,93	9,70	5,15	145,62	1,38	0,17	1,37	12,26	0,06	0,45
214	Femmina	giovanile	Dodecaneso	2009	0,72	0,02	0,01	6,19	0,06	2,64	0,26	0,09	0,95	5,53	0,02	0,59
216	Femmina	cucciolo	Cicladi	2009	0,18	0,02	0,02	7,29	0,12	6,36	0,46	0,04	1,20	6,36	0,02	0,93
219	Femmina	cucciolo	Evia-Grecia Centrale	2009	0,55	0,02	0,05	7,69	0,12	9,03	0,30	0,03	0,67	10,03	0,01	0,19
223	Maschio	adulto	Evia-Grecia Centrale	2010	1,90	0,03	0,17	0,34	0,78	24,16	0,58	0,14	0,09	3,10	0,04	0,05
228	Maschio	cucciolo	Evia-Grecia Centrale	2010	0,59	0,02	0,05	8,41	0,16	17,94	0,40	0,05	0,92	12,71	0,02	0,31
229	Maschio	cucciolo	Cicladi	2010	0,41	0,02	0,05	0,42	0,03	4,58	0,08	0,01	0,10	1,75	0,02	0,02
230	Femmina	giovanile	Sporadi	2011	0,61	0,03	0,39	1,49	1,07	26,83	1,96	0,07	0,20	3,40	0,02	0,02
231	Femmina	giovanile	Evia-Grecia Centrale	2011	0,20	0,02	0,05	0,09	0,03	9,28	0,31	0,04	0,25	1,38	0,01	0,52
237	Maschio	giovanile	Cicladi	2011	0,07	0,02	0,06	0,72	0,05	20,43	0,21	0,12	0,23	1,55	0,01	0,11
239	Maschio	adulto	Evia-Grecia Centrale	2011	0,49	0,03	0,17	7,23	1,27	22,26	0,64	0,09	0,32	6,58	0,02	0,14
249	Femmina	giovanile	Cicladi	2012	0,77	0,02	0,30	6,94	0,13	7,88	1,60	0,16	2,89	6,74	0,02	0,89
251	Femmina	adulto	Cicladi	2012	1,11	0,03	2,84	0,32	0,82	30,40	17,23	0,10	0,21	2,13	0,03	0,05
255	Femmina	adulto	Evia-Grecia Centrale	2012	1,27	0,02	0,02	0,36	0,27	7,18	0,13	0,06	0,05	1,43	0,02	0,01

Tabella 2. Elementi in traccia nel blubber degli esemplari di *Monachus monachus* della Grecia utilizzati per il presente studio. I valori sono espressi in mg/kg peso fresco.

ID	Sesso	classe d'età	località	anno	As	Co	Cr	Cu	Mn	Fe	Ni	Pb	Se	Zn	Cd	Hg
119	Female	cucciolo	Sporadi	2000	0,55	0,07	0,05	17,84	2,78	219,35	0,38	0,06	3,05	60,90	0,02	0,57
212	Female	adulto	Cicladi	2009	0,00	0,17	0,05	56,88	2,79	451,89	0,09	0,68	94,95	97,37	2,31	17,46
255	Female	adulto	Evia-Grecia Centrale	2012	0,77	0,16	0,11	21,48	2,22	314,85	0,69	0,17	40,48	50,62	1,51	24,89
223	Male	adulto	Evia-Grecia Centrale	2010	2,17	0,25	0,05	59,85	3,79	168,85	0,08	0,21	91,04	96,25	7,10	8,13
216	Female	cucciolo	Cicladi	2009	0,58	0,06	0,25	10,72	2,58	716,74	1,07	0,09	1,72	22,49	0,06	0,67
219	Female	cucciolo	Evia-Grecia Centrale	2009	1,07	0,12	0,22	26,03	3,31	588,11	1,00	0,12	1,89	60,53	0,05	0,36
113	Male	cucciolo	Isole Nord Egeo	2009	1,02	0,08	0,10	24,43	3,33	1374,74	0,15	0,17	1,28	36,22	0,10	0,90
184	Male	cucciolo	Evia-Grecia Centrale	2006	0,74	0,06	0,18	9,53	2,35	165,20	0,63	0,09	0,44	25,20	0,04	0,21
228	Male	cucciolo	Evia-Grecia Centrale	2010	0,19	0,06	9,69	66,38	4,33	419,94	43,19	0,09	3,57	82,07	0,04	0,35
229	Male	cucciolo	Cicladi	2010	0,66	0,04	0,09	14,97	2,78	210,90	0,40	0,20	1,25	28,32	0,03	0,37
230	Female	giovanile	Sporadi	2011	0,36	0,07	0,10	22,12	3,71	600,07	0,13	0,12	0,99	31,33	0,11	1,26
231	Female	giovanile	Evia-Grecia Centrale	2011	0,44	0,04	0,05	20,24	1,68	214,85	0,70	0,09	1,38	31,65	0,03	0,36
249	Female	giovanile	Cicladi	2012	2,01	0,11	0,50	30,15	2,38	131,14	1,53	0,14	6,82	42,30	0,70	3,30
205	Male	giovanile	Cicladi	2008	0,54	0,09	0,07	16,75	2,84	159,16	0,13	0,21	4,08	33,07	0,73	1,23
237	Male	giovanile	Cicladi	2011	0,72	0,07	0,05	18,34	1,64	120,30	0,34	0,10	7,00	25,67	0,17	1,26

Tabella 3. Elementi in traccia nel fegato degli esemplari di *Monachus monachus* della Grecia utilizzati per il presente studio. I valori sono espressi in mg/kg peso fresco.