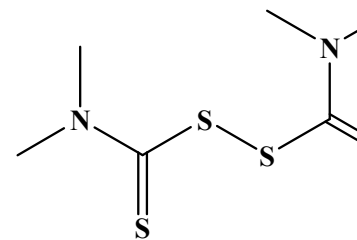
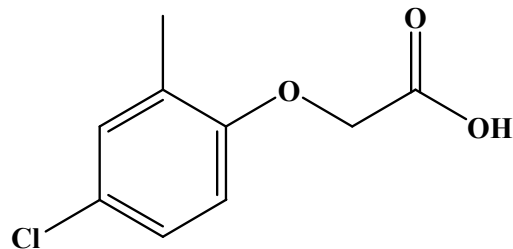


ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ

ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

"Επίδραση των δραστικών ουσιών MCPA και thiram στο βιολογικό υλικό του βιοδείκτη *Mytilus galloprovincialis*"



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Σπύρος Κυπριωτάκης

Εισηγητής: Δρ. Ελευθέριος Αλυσσανδράκης

Ηράκλειο, 2009

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Αντικείμενο της οικοτοξικολογίας

Ο όρος οικοτοξικολογία διατυπώθηκε πρώτη φορά από τον Truhaut το 1969 ως φυσική εξέλιξη της τοξικολογίας, της βασικής επιστήμης που μελετά τη δράση των τοξικών ουσιών στους ζωντανούς οργανισμούς. Ως τοξική ουσία ορίζεται κάθε ουσία που μπορεί να προκαλέσει σοβαρή βλάβη ή θάνατο σαν αποτέλεσμα της φυσικοχημικής αλληλεπίδρασης με τους ιστούς ενός οργανισμού. Οποσδήποτε όλες οι ουσίες, φυσικές ή χημικές, μπορούν να προκαλέσουν οργανικές βλάβες ή θάνατο σε περίπτωση έκθεσης των οργανισμών σε δόσεις ανώτερες των ανεκτών. Επίσης, όλες οι ουσίες μπορούν να θεωρηθούν ασφαλείς για τον άνθρωπο και άλλους οργανισμούς όταν τα επίπεδα έκθεσης των οργανισμών είναι κατώτερα από τα ανώτατα ασφαλή. Σε περιπτώσεις ουσιών που δεν είναι δυνατόν να καθοριστούν ασφαλή επίπεδα έκθεσης τότε οι ουσίες αυτές δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Σύμφωνα με τον πλέον πρόσφατο ορισμό, οικοτοξικολογία είναι η επιστήμη που έχει σαν σκοπό την πρόγνωση των ανεπιθύμητων επιδράσεων δυνητικά τοξικών ουσιών σε είδη που δεν αποτελούν καταπολεμούμενο στόχο και στα οικοσυστήματα (Μαχαίρα 2002).

Η οικοτοξικολογία ασχολείται με την επίδραση του εκάστοτε ρύπου σε επίπεδο πληθυσμού ή οικοσυστήματος. Στην οικοτοξικολογία μπορεί να μην υπάρχει άμεση τοξική δράση σε ένα είδος, αλλά παρόλα αυτά αυτό το είδος να απειλείται λόγω διαταραχής του φυσικού του περιβάλλοντος. Αντίθετα σε περιπτώσεις που ένας ρύπος προκαλεί το θάνατο ακόμη και στο 50% μπορεί να είναι άνευ ή περιορισμένης οικοτοξολογικής σημασίας σε σχέση με έναν άλλο ρύπο που μπορεί να μην προκαλεί το θάνατο σε επίπεδο οργανισμού, αλλά να καθυστερεί σημαντικά την αύξηση του πληθυσμού.

Η επικρατέστερη και ορθότερη άποψη είναι να χαρακτηρίζονται ως περιβαλλοντικοί ρύποι ουσίες που ανιχνεύονται σε συγκεντρώσεις οι οποίες προκαλούν ανεπιθύμητες επιδράσεις σε οργανισμούς ή πληθυσμούς ή στην ισορροπία του οικοσυστήματος. Είναι προφανές λοιπόν ότι όταν μια ουσία βρίσκεται στο περιβάλλον κάτω από μια

συγκέντρωση, η οποία αποδεδειγμένα δεν αναμένεται να προκαλέσει ανεπιθύμητες επιδράσεις ή περιβαλλοντικές βλάβες, τότε δεν χαρακτηρίζεται ως περιβαλλοντικός ρύπος. Ένα πολύ σημαντικό σημείο διαφωνίας αποτελεί ο καθορισμός των επιδράσεων που χαρακτηρίζονται ως περιβαλλοντικές βλάβες. Οι απόψεις που επικρατούν ανήκουν σε αυτούς που θεωρούν ως περιβαλλοντικές βλάβες τις μη αναστρέψιμες αλλαγές σε βιοχημικές λειτουργίες και σε εκείνους που λαμβάνουν υπόψη τους μόνο τις επιδράσεις σε επίπεδο μείωσης πληθυσμών (Μαχαίρα, 2002).

1.2. Σύντομη ιστορική αναδρομή σε σημαντικά προβλήματα περιβαλλοντικής τοξικολογίας

Από την εποχή που ο πρωτόγονος άνθρωπος άρχισε να χρησιμοποιεί γεωργικά εργαλεία για την καλλιέργεια της γης, τη συστηματική ανατροφή ζώων για τις ανάγκες της διατροφής του, να παρεμβαίνει στην ροή ποταμών για αρδευτικούς λόγους και να κόβει δένδρα για την κατασκευή πρόχειρων καλυβών, ξεκινάει η εποχή της ανθρωπογενούς παρέμβασης στη φύση. Αλλά οι αλλαγές αυτές ήταν περιορισμένης κλίμακας, προκαλώντας εξαιρετικά μικρές και τοπικές διαταραχές της φυσικής ισορροπίας. Ο πληθυσμός της Γης ήταν πολύ μικρός, υπολογίζεται ότι ήταν, περίπου, 5 εκατομμύρια πριν από 10.000 χρόνια, αλλά με τη δημιουργία των πρώτων νεολιθικών αγροτικών κοινοτήτων, πριν 8-10.000 χρόνια η διατροφή βελτιώθηκε, η θνησιμότητα μειώθηκε και ο πληθυσμός αυξήθηκε με αλματώδεις ρυθμούς. Με γοργούς ρυθμούς ο πληθυσμός επεκτεινόταν και απλωνόταν σε διάφορες περιοχές με ήπιο κλίμα. Έτσι, πριν 2.000 χρόνια ο πληθυσμός έφτασε τα 250-300 εκατομμύρια. Η κατοικήσιμη έκταση του πλανήτη ήταν αρκετά μεγάλη για να διατηρήσει τις ποικίλες ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Ήδη, από την εποχή των Ρωμαίων έχει καταγραφεί ρύπανση ποταμών και λιμνών, μεγάλες πόλεις με υψηλή ατμοσφαιρική ρύπανση και καταστροφές δασών από κοπή δένδρων και υπερβόσκηση κοπαδιών. Μεγάλες καταστροφές από πλημμύρες και ξηρασίες επικράτησαν στην αρχαία Κίνα και Ινδία λόγω της υπερεκμετάλλευσης φυσικών πλουτοπαραγωγικών πηγών. Ο διπλασιασμός του πληθυσμού ήταν ακόμη αργός με τα σημερινά δεδομένα και κράτησε 1600 χρόνια. Το 1650 μΧ. ο πληθυσμός του πλανήτη μας υπολογίζονταν σε 500 εκατομμύρια. Με τη βιομηχανική επανάσταση

στη Δ. Ευρώπη και τη Β. Αμερική να επεκτείνεται με αλματώδη πρόοδο, ο πληθυσμός διπλασιάστηκε σε ένα δισεκατομμύριο γύρω στα 1850 (διπλασιασμός μέσα σε 250 χρόνια). Από την εποχή εκείνη επέρχονται ταχύτατα αλλαγές στην ποιότητα του πόσιμου νερού, επεκτείνονται οι εγκαταστάσεις αποχέτευσης και υγιεινής στις μεγάλες πόλεις, μεταβάλλονται οι συνθήκες κατοικίας, βελτιώνεται η συντήρηση τροφίμων, καταπολεμούνται με χημικά εντομοκτόνα παράσιτα που προκαλούσαν λοιμώδη νοσήματα, και με αλματώδη ιατρικά επιτεύγματα μειώνεται η παιδική και βρεφική θνησιμότητα. Τον 19^ο αιώνα οι παραπάνω βελτιώσεις της ποιότητας ζωής επέφεραν μείωση της θνησιμότητας σε λιγότερο από 30 ανθρώπους ανά 1.000, με ανάλογη αλματώδη αύξηση του πληθυσμού. Σε λιγότερο από εκατό χρόνια, το 1930, ο πληθυσμός διπλασιάστηκε σε 2 δισεκατομμύρια. Μετά το τέλος του Δεύτερου Παγκόσμιου Πολέμου, με την ανακάλυψη των αντιβιοτικών και τις πολυάριθμες βελτιώσεις στις συνθήκες κατοικίας, υγιεινής και τροφίμων, ο πληθυσμός διπλασιάζεται ξανά σε λιγότερο από 50 χρόνια (1980, περίπου 4.457 δισεκατομμύρια) και το 2.000 ο πληθυσμός του πλανήτη ξεπέρασε τα 6 δισεκατομμύρια (Βαλαβανίδης 2007).

1.3. Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα από την εμφάνισή τους ως σήμερα

Ο άνθρωπος στη συνεχή προσπάθεια ελέγχου του φυσικού περιβάλλοντός του με σκοπό την βελτίωση συνθηκών επιβίωσης, οδηγήθηκε στην ανακάλυψη πολλών φυσικών και συνθετικών ουσιών για την καταπολέμηση των εχθρών των ασθενειών και των ζιζανίων και καλλιεργειών. Η έλλειψη εκλεκτικότητας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε σχέση με τον εκάστοτε καταπολεμούμενο εχθρό σε συνδυασμό με την εμμονή και την συμπεριφορά τους στο περιβάλλον (έκπλυση, βιοσυσσώρευση) μπορεί να οδηγήσουν σε μη προβλέψιμες επιδράσεις, όπως άρχισε να διαφαίνεται ήδη από την δεκαετία του '50.

Η πρώτη ουσία που χρησιμοποιήθηκε στη φυτοπροστασία είναι το θείο, το 1000 π.χ. περίπου, όπως αναφέρει ο Όμηρος. Πολύ αργότερα, το 700 μΧ. χρησιμοποιήθηκε από τους Κινέζους το αρσενικό και πριν το 1800 ακόμη και οι καυκάσιοι γνώριζαν τις εντομοκτόνες δράσεις του πύρεθρου. Τον 17^ο - 18^ο αιώνα αρχίζει η επιστημονική

μελέτη του θέματος της φυτοπροστασίας, όπου η ανάγκη αντιμετώπισης των εντομολογικών κυρίως προσβολών αυξάνεται λόγω ανταλλαγής πληθυσμών εντόμων μεταξύ του παλαιού και του νέου κόσμου. Τη δεκαετία του 1840 γίνεται συστηματική προσπάθεια αντιμετώπισης του ωιδίου με ψεκάσμο θειασβεστίου και αργότερα με επιπάσεις θείου. Το 1877 γίνεται προσπάθεια ελέγχου του δορυφόρου της πατάτας με ψεκάσμο με μη υδατοδιαλυτά χημικά όπως το 'London purple' και το 'Paris green' (μίγμα Cu-As) καθώς και μίγματα Ca, Pb και αρσενικούχων αλάτων. Από το τέλος του 1880 έως και το τέλος του 19^{ου} αιώνα, μπορούμε να πούμε ότι αρχίζει ο ουσιαστικός έλεγχος των εχθρών και ασθενειών των καλλιεργειών. Συγκεκριμένα, το 1882 ανακαλύφθηκαν τυχαία, η αποτελεσματικότητα του βορδιγάλειου πολτού για την καταπολέμηση του περονόσπορου του αμπελιού και στο τέλος του 19^{ου} αιώνα νέα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αναπτύχθηκαν όπως η νικοτίνη, το πύρεθρο, η κάσσια και τα ορυκτέλαια.

Το τέλος του 19^{ου} αιώνα και η αρχή του 20^{ου} χαρακτηρίζονται από την αυξημένη προσοχή των καλλιεργητών και την αποφυγή απωλειών της σοδειάς τους λόγω ασθενειών και εντομολογικών προσβολών, ενώ παράλληλα αναπτύσσεται η βιομηχανία παραγωγής φυτοπροστατευτικών προϊόντων και βελτιώνονται τα μέσα εφαρμογής τους. Από το 1942 έως το 1962 τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα θεωρήθηκαν πανάκεια για την αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών των καλλιεργειών. Την περίοδο αυτή έχουμε την ανακάλυψη του DDT και των άλλων οργανοχλωριωμένων μορίων όπως τα aldrin, dieldrin, chlordane, endrin, heptachlor, methoxychlor και toxaphene. Κατά τη διάρκεια του 2^{ου} παγκοσμίου πολέμου, γίνεται η ανακάλυψη των οργανοφωσφορικών ενώσεων, τα οποία έχουν χαμηλό κόστος παραγωγής, είναι πολύ αποτελεσματικά για την αντιμετώπιση εντόμων και ακάρεων, αλλά είναι πολύ τοξικά για τον άνθρωπο και τα άλλα θηλαστικά. Η χρήση αυτών των νέων χημικών ουσιών στη φυτοπροστασία είχε ως αποτέλεσμα τη θεαματική μείωση των απωλειών στην παραγωγή γεωργικών προϊόντων αλλά και την επιτυχή αντιμετώπιση πολλών φορέων ανθρωπίνων ασθενειών, με αποτέλεσμα να σωθούν εκατομμύρια ανθρώπινες ζωές. Η πρώτη μαζική χρήση του DDT έγινε για την αντιμετώπιση της επιδημίας τύφου στη Νάπολη το 1943-1944. Την επιτυχία αυτή ακολούθησαν συντονισμένα και εκτεταμένα προγράμματα προληπτικής αντιμετώπισης του προβλήματος της ελονοσίας.

Παρόλα τα οφέλη που προέκυψαν από τη χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, η πέραν των ασφαλών ορίων χρήση τους δημιούργησε διαφορών ειδών προβλήματα τα οποία άρχισαν να φαίνονται από πολύ νωρίς. Τα πρώτα προβλήματα που παρατηρήθηκαν ήταν η ανάπτυξη ανθεκτικότητας που δημιουργήθηκε στους καταπολεμούμενους εχθρούς. Ήδη από την αρχή της δεκαετίας του '50, οι δόσεις DDT και parathion χρειάστηκε να πολλαπλασιαστούν για την αντιμετώπιση εντόμων του καλαμποκιού. Παράλληλα, λόγω καταστροφής των φυσικών αρπακτικών και ωφέλιμων παράσιτων, παρατηρήθηκε έξαρση πληθυσμών νέων ειδών εντόμων, τα οποία μέχρι τότε δεν αποτελούσαν πρόβλημα για τις καλλιέργειες. Τέλος, δεν άργησαν να φανούν οι δυσμενείς επιδράσεις από την παρουσία υψηλών επιπέδων υπολειμμάτων τόσο στα καλλιεργούμενα είδη, αλλά και στον άνθρωπο και στην πανίδα. Τα προβλήματα αυτά φάνηκαν ιδιαίτερα έντονα στα είδη που είναι υψηλά στην τροφική πυραμίδα, όπου παρατηρήθηκαν έντονα τοξικολογικά προβλήματα έως και πλήρης εξαφάνιση ειδών αρπακτικών πτηνών, λόγω του φαινομένου της βιομεγέθυνσης των τοξικών παραγόντων στους οργανισμούς τους. Η κυριότερη αιτία των προβλημάτων αυτών ήταν η εντονότατη και πολύ εκτεταμένη χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, η οποία βασιζόταν τόσο στην απόγνωση για την αντιμετώπιση εχθρών των καλλιεργειών και των προβλημάτων δημόσιας υγείας, αλλά και στην άγνοια του επιστημονικού κόσμου όσον αφορά τις ανεπιθύμητες επιδράσεις της επανειλημμένης έκθεσης σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα και χημικές ουσίες γενικότερα, για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 60' και αρχές του 70' η προσοχή των επιστημόνων όσον αφορά τις ανεπιθύμητες επιδράσεις χημικών ουσιών επικεντρωνόταν κυρίως στις οξείες δράσεις τους τα θηλαστικά, οι οποίες χρησίμευαν σαν γνώμονας εκτίμησης της επικινδυνότητας για τον άνθρωπο. Χρειάστηκε να περάσει πολύς χρόνος για να γίνει σαφές προς όλες τις επιστημονικές ειδικότητες που ασχολούνται άμεσα ή έμμεσα με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ότι η τιμή της οξείας τοξικότητας μιας χημικής ουσίας αποτελεί ένα δείκτη μόνο για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας της όσον αφορά την προστασία από οξείες δηλητηριάσεις. Οι μακροχρόνιες επιπτώσεις στο περιβάλλον πολύ πρόσφατα άρχισαν να αποτελούν αντικείμενο σοβαρού επιστημονικού προβληματισμού και μελέτης. Η δυνατότητα ανάπτυξης πιο φιλικής προς το περιβάλλον φυτοπροστασίας, φαίνεται ότι απαιτεί την πολύ καλή γνώση του

αντικειμένου της οικοτοξικολογίας. Είναι εντυπωσιακό το πόσο λίγα γνωρίζουμε για τις ανεπιθύμητες επιδράσεις των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στους διάφορους οργανισμούς. Θα πρέπει να μάθουμε περισσότερα για τους τρόπους έκθεσης και τους τρόπους πρόσληψης του τοξικού παράγοντα, τους μηχανισμούς τοξικότητας, καθώς και τις αναμενόμενες επιδράσεις τους.

Μια άλλη πολύ σημαντική και καθοριστική παράμετρος για τον προσδιορισμό της επικινδυνότητας μιας ουσίας είναι η δυνατότητα της να βιοσυγκεντρώνεται στα διάφορα είδη και το πώς αυτή διαφοροποιείται ανάλογα του τρόπου έκθεσης των οργανισμών (οδός έκθεσης, υπόστρωμα στο οποίο βρίσκεται η ουσία) (Μαχαίρα, 2002).

1.4. Ρύπανση υδατινών οικοσυστημάτων από φυτοφάρμακα

Η παγκόσμια παραγωγή φυτοφαρμάκων για τη γεωργία είχε αλματώδη ανάπτυξη στην περίοδο των τελευταίων 50 χρόνων. Η κατανάλωση φυτοφαρμάκων αυξήθηκε κατά 15 φορές στην περίοδο αυτή, με περίπου 8-10% αύξηση κάθε χρόνο. Την δεκαετία του 1990 η αύξηση σταμάτησε και άρχισε να υποχωρεί. Οι καλλιέργειες των σιτηρών, ρυζιού, αραβοσίτου, βάμβακος, σόγιας και καπνού καταναλώνουν το 50% των αγροτικών φυτοφαρμάκων. Το 2000 το σύνολο των πωλήσεων των φυτοφαρμάκων ξεπέρασαν τα 35 δισεκατομμύρια δολάρια. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία φυτοφαρμάκων για διάφορες χρήσεις στη γεωργία, όπως ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ακαρεοκτόνα, νηματοκτόνα, τρωκτικοκτόνα, ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών και συντηρητικά ξύλου. Τα φυτοφάρμακα έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της γεωργικής παραγωγής των τελευταίων δεκαετιών. Παρά τις διαφωνίες που έχουν προκύψει για τη ρύπανση του περιβάλλοντος και των τροφίμων από φυτοφάρμακα, δεν έχει γίνει δυνατή η αντικατάστασή τους. Τα τελευταία χρόνια έχουν δημιουργηθεί τρεις τάσεις: η τμηματική αντικατάσταση και απαγόρευση των πιο τοξικών και μη βιοδιασπώμενων φυτοφαρμάκων, η εισαγωγή νέων βιοδιασπώμενων φυτοφαρμάκων και χαμηλότερης τοξικότητας και η διαμόρφωση τεχνικών ολικής διαχείρισης παρασίτων και ζιζανίων με την IPM με ανάμεικτες τεχνικές, αγρανάπαυση, ανθεκτικότερα είδη, δολωματικά εντομοκτόνα, βιολογικές πρακτικές (Integrated Pesticide Management, IPM). Παρόλα αυτά η ρύπανση του περιβάλλοντος, ιδιαίτερα των υδατινών συστημάτων, από φυτοφάρμακα παραμένει ένα σοβαρό πρόβλημα της

περιβαλλοντικής τοξικολογίας. Τα φυτοφάρμακα βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα νερά πολλών ποτάμιων, λιμναίων και παράκτιων περιοχών, ως αποτέλεσμα της έκπλυσης υπολειμμάτων από τις γεωργικές εκμεταλλεύσεις. Οι κυριότερες κατηγορίες που απαντούν ως ρύποι στα νερά είναι τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα, τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά, τα πυρεθροειδή κλπ. Σημαντικές ποσότητες φυτοφαρμάκων απαντούν και σε υπόγεια νερά, που σε ορισμένες περιοχές χρησιμοποιούνται για συστήματα υδροδότησης.

Ο τρόπος έκθεσης ενός οργανισμού σε μία χημική ουσία (μέσω του δέρματος, με εισπνοή, με κατάποση ή μέσω της τροφής) και η συγκέντρωση ή ποσότητα της ουσίας, αποτελούν τις δύο πιο χαρακτηριστικές παραμέτρους που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τη διερεύνηση της τοξικολογικής της δράσης. Οι δυσμενείς επιδράσεις (adverse effects) που προκύπτουν από την τοξική δράση μιας ουσίας μπορεί να χαρακτηρισθούν ανώμαλες, επιβλαβείς, ανεπιθύμητες, παθολογικές και να προκαλέσουν βλάβες σε ζωτικά όργανα ή σε βασικό σύστημα (ανοσολογικό, αναπαραγωγικό, κυκλοφορικό, αναπνευστικό κλπ) ή ακόμη και αλλαγές σε κάποια ενζυμική λειτουργία. Η έκταση των βλαβών ή παθολογικών αλλαγών, το οξειδωτικό stress, οι μη αναστρέψιμες μεταβολές, η υγεία του οργανισμού που δέχθηκε την έκθεση και η ταχύτητα με την οποία παρέχονται αντίδοτα (σε δηλητηριάσεις) ή θεραπευτικές επεμβάσεις κλπ, μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο για το βαθμό και το είδος των τοξικολογικών επιδράσεων των διαφόρων ουσιών. Για να μελετηθεί συστηματικά η έκθεση ζωντανών οργανισμών σε τοξικές χημικές ουσίες απαιτούνται γνώσεις για τους μηχανισμούς της τοξικής δράσης σε βασικά βιομόρια, παραγωγή οξυγονούχων ελευθέρων ριζών, βλάβες σε πρωτεΐνες και ενζυμικούς μηχανισμούς, υπεροξειδωση λιπιδικών κυτταρικών μεμβρανών, παρεμβολή σε ορμονικούς υποδοχείς, βλάβες στην ομοιόσταση του ασβεστίου κλπ.

Στη συνέχεια πρέπει να μελετηθούν οι μεταβολικές διεργασίες που συμβαίνουν στα διάφορα όργανα και το είδος των επιβλαβών δράσεων, οι οποίες μπορεί να είναι εσωτερικές ή να έχουν εξωτερικά παθολογικά γνωρίσματα. Σε ευαίσθητα βιολογικά συστήματα τα τοξικολογικά και παθολογικά γνωρίσματα μπορούν να αναγνωρισθούν με δυσκολία, όπως μείωση της παραλαβής τροφής, πληθυσμιακές μεταβολές, αλλαγή λειτουργίας οργάνου, απώλεια βάρους, μεταβολή ενζυμικής λειτουργίας κ.λπ.

Στην περίπτωση του ανθρώπου και των ανώτερων θηλαστικών, λόγω της πολυπλοκότητας διερευνώνται οι τοξικές βλάβες κατά κατηγορία λειτουργικών συστημάτων και βασικών οργάνων. Οι ζωντανοί οργανισμοί που ζουν στο νερό έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να εκτεθούν σε τοξικές υδατοδιαλυτές και μη υδατοδιαλυτές ουσίες-ρύπους, οι οποίες ανάλογα με την εξωτερική κατάσταση του δέρματος του οργανισμού μπορούν να διεισδύσουν εσωτερικά ή να προκαλέσουν εξωτερικές αλλοιώσεις και παθολογικά συμπτώματα (Βαλαβανίδης, 2007).

1.5. Έκθεση και τρόποι εισόδου τοξικών ουσιών στα βιολογικά συστήματα

Η έκθεση των ζωντανών οργανισμών σε τοξικές και επικίνδυνες χημικές ουσίες μπορεί να πραγματοποιηθεί στα διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα μέσω της επαφής με το δέρμα, με την εισπνοή, την κατάποση ή μέσω της διατροφής. Οι βλάβες που μπορούν να προκληθούν εξαρτώνται από τη συγκέντρωση και τη διάρκεια έκθεσης των τοξικών ουσιών, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τις μεταβολικές διεργασίες και την τοξικολογία των παραγώγων και την κατάσταση υγείας του οργανισμού που εκτίθεται. Αρκετός αριθμός χημικών ουσιών έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν την έναρξη και προαγωγή κακοήθων νεοπλασιών. Ορισμένες χημικές ουσίες είναι ικανές να εισχωρήσουν μετά από έκθεση μέσω των λιπιδικών μεμβρανών των κυττάρων και να αντιδράσουν άμεσα με το κυτταρικό DNA προκαλώντας μεταλλάξεις. Οι ουσίες αυτές καλούνται **μεταλλαξιγόνες** ή **γονοτοξικές**. Η πλειοψηφία των καρκινογόνων ουσιών δεν μπορούν να αντιδράσουν άμεσα με το DNA, αλλά ενεργοποιούνται μόνο μετά από μεταβολική διεργασία ή μέσω ελευθέρων ριζών, και καλούνται **επιγενετικά** καρκινογόνα. Οι καρκινογόνες ουσίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, οι οποίες μετά από συσσώρευση και ενεργοποίηση ογκογονιδίων μπορούν να προκαλέσουν κακοήθη όγκο έπειτα από την πάροδο μεγάλης λανθάνουσας περιόδου. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν τεκμηριωθεί οι κυριότερες χημικές ουσίες που προκαλούν αυξημένο κίνδυνο για διάφορους τύπους καρκίνου. Οι καρκίνοι σε σχέση με έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες στο εργασιακό περιβαλλον αναγνωρίστηκαν εδώ και

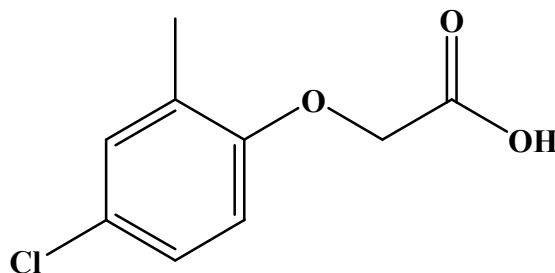
δεκαετίες λόγω των σημαντικών επιπτώσεων που παρατηρήθηκαν από την χρήση και την μακροχρόνια έκθεση σε καρκινογόνες χημικές ουσίες (Βαλαβανίδης, 2007).

1.6. Στοιχεία για τις δραστικές ουσίες MCPA και thiram

1.6.1. MCPA

Το MCPA (4-χλωρο-2-μεθυλοφαινοξυοξικό οξύ, Εικόνα 1) είναι ένα διασυστηματικό φαινοξυαλκανοϊκό ζιζανιοκτόνο που εισήχθηκε στη γεωργική πράξη με το εμπορικό όνομα Agroxone. Η σύνθεσή του έγινε αρχικά από τους Synerholme και Zimmerman το 1945 και από τους Templeman και Foster το 1946, στην προσπάθεια εύρεσης ουσιών με υψηλή εκλεκτική δράση στην παρεμπόδιση της αύξησης των ζιζανίων οι οποίες δεν θα είχαν επιπτώσεις στην αύξηση των δημητριακών (Wikipedia, 2009). Χρησιμοποιείται για να ελέγξει ένα ευρύ φάσμα ετήσιων και πολυετών πλατύφυλλων ζιζανίων σε καλλιέργειες δημητριακών, σε λειμώνες, δενδρώδεις καλλιέργειες, καθώς επίσης σε τύρφη και εγκαταστάσεις χλοοταπήτων. Είναι φυτοτοξικό στο αμπέλι, τα κηπευτικά, το βαμβάκι και τα καλλωπιστικά. Τα εμπορικά ονόματα για μερικά από τα προϊόντα που περιέχουν MCPA είναι Agritox, Agroxone, Chiptox, Rhonox, και Weed-Rhap. Στη χώρα μας κυκλοφορεί με τα εξής εμπορικά ονόματα: είναι Renox, Agroxone, Limrca, Χελλαξόν, Σεραχλώρ και MCPA Γεωφάρμ (Πηγή: Υπ.Α.Α.Τ.).

Το MCPA επηρεάζει την κυτταρική διαίρεση, αυξάνει το μεταβολισμό του φωσφόρου και επηρεάζει το μεταβολισμό των νουκλεϊνικών οξέων και των πρωτεϊνών. Τα συμπτώματα της δράσης του είναι η πρόκληση επιναστίας, η κύρτωση και συστροφή του ελάσματος, η έντονη παραμόρφωση της νέας βλάστησης και η αναστολή της επιμήκυνσης των ριζών (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).



Εικόνα 1. Χημική δομή του MCPA.

Τύχη και συμπεριφορά στο περιβάλλον.

Το MCPA είναι σχεδόν αδιάλυτο στο νερό, αμετάβλητο, λιπόφιλο και υπάρχει ως στερεό στη φύση. Το MCPA δεν υδρολύεται και φωτολύεται ιδιαίτερα αργά όταν εφαρμόζεται σε εδαφικές επιφάνειες και ενώ δέχεται ακτινοβολία μόνο από το φυσικό φως του ήλιου. Από εργαστηριακές μελέτες, το MCPA αποδείχθηκε εξαιρετικά κινητικό. Η ποσότητα της οργανικής ουσίας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εμμόνη του MCPA στο έδαφος μετά την εφαρμογή του. Με το ποσοστό της οργανικής ουσίας λιγότερο από 10% στο χώμα, η χημική ένωση του ζιζανιοκτόνου αλλοιώνεται σε μια ημέρα, ενώ σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% αυτή η διαδικασία διαρκεί τρεις έως εννέα ημέρες.

Χώμα: Το MCPA δεν είναι ιδιαίτερα επίμονο στο χώμα, με τον χρόνο ημιζωής να ποικίλλει μεταξύ 15 και 50 ημερών. Η διάσπαση του MCPA στο έδαφος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως ο τύπος του εδάφους, το pH, η υγρασία, η συγκέντρωση του MCPA, οι κλιματολογικοί παράγοντες και το περιεχόμενο οργανικής ουσίας. Η διασπαση του MCPA εμφανίστηκε μέσα σε 5-9 εβδομάδες στο όξινο χώμα, ενώ στο ουδέτερο (pH 6.3 και ανώτερο) παρατηρήθηκε σε 1 εβδομάδα.

Μια ιδιαίτερος σημαντική επίδραση του MCPA κατά τον μετασχηματισμό του στο έδαφος είναι η μείωση της μικροβιακής δραστηριότητας στο χώμα. Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά στη βιοδιάσπαση αυτής της ουσίας, το οξυγόνο και η υγρασία παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Απουσία οξυγόνου, η βιοδιάσπαση του MCPA στο χώμα είναι αμελητέα, ενώ η φωτοδιάσπαση και η υδρόλυση δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικές διαδικασίες υποβάθμισης (U.S. EPA, 2004a). Όσο για την κινητικότητα του είναι αποδεδειγμένο ότι εξαρτάται από το ποσοστό της οργανικής ουσίας και όσο μικρότερο είναι αυτό τόσο περισσότερο κινείται το MCPA μέσα στο έδαφος. Ωστόσο, υπάρχει σοβαρή πιθανότητα να καταλήξει σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα λόγω έκπλυσης και επιφανειακής απορροής.

Νερό: Το MCPA όπως και άλλα γεωργικά ζιζανιοκτόνα έχουν ανιχνευθεί σε λίμνες, ποταμούς και δεξαμενές, που μπορούν να χρησιμεύσουν ως πηγές για πόσιμο νερό. Η μεταφορά τους από το χώμα στο νερό μπορεί να είναι αποτέλεσμα άμεσων ή έμμεσων μηχανισμών μεταφοράς, συμπεριλαμβανομένων αέριων και εδαφικών ψεκασμών που οδηγούν σε εξάτμισή του στον αέρα, την εναπόθεση από τη βροχή, τη διάβρωση των

εδαφολογικών μορίων από τον αέρα ή το νερό, την απορροή επιφάνειας και την έκπλυση. Σε ειδικές περιπτώσεις, το MCPA μπορεί να βρεθεί στο νερό ως αποτέλεσμα των διαρροών κάποιων υπολειμμάτων του που μπορεί να βρίσκονται σε δεξαμενές ή άλλον εξοπλισμό σε διαδικασία καθαρισμού. Η βιοδιάσπασή του στο νερό (υπό συνθήκες αερισμού) είναι μια σημαντική διαδικασία που έχει επιπτώσεις στην περιβαλλοντική συμπεριφορά του MCPA.

Σε μελέτες που έγιναν για το MCPA σε νερό ορυζώνα σε συνθήκες σκότους βρέθηκε ότι αυτή η ουσία υποβαθμίζεται από τους υδρόβιους μικροοργανισμούς σε 13 ημέρες. Εντούτοις, στα αναερόβια υδρόβια συστήματα (ίζημα/νερό), η βιοδιάσπασή της ήταν τόσο μικρή που θεωρείται αμελητέα. Επίσης, όπως προαναφέρθηκε η υδρόλυση και η φωτόλυση δεν συνιστούν καθόλου αποτελεσματικές διαδικασίες για τη διάσπαση του MCPA. Για παράδειγμα σε υδατικό διάλυμα (pH 8.3), ο χρόνος ημιζωής υπολογίστηκε σε διάστημα 20-24 ημέρες με παράλληλη έκθεση στον ήλιο. Η φωτόλυση των αραιών υδάτινων διαλυμάτων του MCPA έδωσε ως σημαντικότερο υποπροϊόν τη 4-χλωρο-2-μεθυλοφαινόλη, ενώ βρέθηκε επίσης η *o*-κρεσόλη και η 4-χλωρο-2-φορμυλοφαινόλη προσδιορίστηκε επίσης. Κατά τη διάρκεια των περιόδων κρύου καιρού και χαμηλού φωτισμού, η διάσπαση του MCPA μέσω της βιολογικής υποβάθμισης ή της φωτόλυσης είναι μάλλον περιορισμένη. Το MCPA δεν υδρολύεται εύκολα στο αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα με pH 5-9 και δεν έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτη δέσμευσή του από ιζήματα (U.S. EPA, 2004a).

Τοξικολογικό προφίλ.

Τοξικότητα στον άνθρωπο: Τα σκευάσματα που περιέχουν MCPA έχουν τη σήμανση 'Επικίνδυνο' ή/και 'Ερεθιστικό' στην ετικέτα παρόλο που η οξεία τοξικότητα του προϊόντος δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή (LD₅₀ σε αρουραίους: 700-1300 mg/Kg Z.B.). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι προκαλεί ερεθισμό των ματιών. Γενικότερα, τα συμπτώματα στον άνθρωπο μετά από οξεία τοξική έκθεση περιλαμβάνουν ψεύδισμα, συσπάσεις, σπασμούς, χαμηλή αρτηριακή πίεση, καθώς και απώλεια των αισθήσεων. Όσο αφορά την επίδραση λόγω χρόνιας έκθεσης αγροτών στο συγκεκριμένο φυτοπροστατευτικό δεν έχουν αναφερθεί καρκινογενέσεις ή ιδιαίτερες μεταλλάξεις, υπάρχουν όμως αναφορές για τοξίκωση οργάνων και στομαχικά προβλήματα, μυϊκές αδυναμίες και μερική ζημία στο σκώτι (EXTOXNET, 1996a).

Τοξικότητα στα πουλιά: Οι δοκιμές οξείας τοξικότητας έδειξαν ότι το MCPA είναι «μέτρια τοξικό» έως και «σχεδόν μη τοξικό» στα πουλιά που εκτέθηκαν σε αυτό για σύντομες περιόδους. Επίσης, κανένα δυσμενές αποτέλεσμα δεν αναφέρθηκε στις μελέτες τοξικότητας που αφορούν την αναπαραγωγή. Τα αποτελέσματα των ερευνών αναφέρονται σε δοκιμές που έγιναν σε ορτύκια.

Τοξικότητα στα θηλαστικά: Οι δοκιμές τοξικότητας του MCPA έδειξαν ότι είναι «ελαφρώς τοξικό» για τα θηλαστικά και τα αποτελέσματα εξήχθησαν από εργαστηριακά πειράματα που έγιναν σε αρουραίους. Ωστόσο σε πειράματα χρόνιας τοξικότητας παρατηρήθηκαν προβλήματα στην αναπαραγωγική λειτουργία σκύλων και αρουραίων, καθώς επίσης και τερατογενέσεις. Μάλιστα, ορισμένα από τα πειραματόζωα που έδειξαν χρόνια προβλήματα είχαν εκτεθεί ακόμη και στην μικρότερη δόση που ήταν περίπου 5 mg/kg/ημέρα.

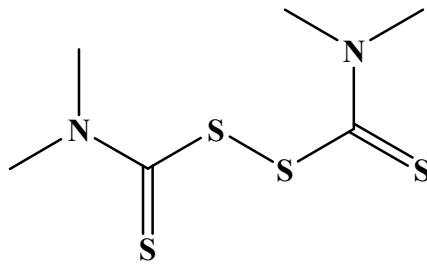
Τοξικότητα σε έντομα μη στόχους: Οι δοκιμές που έγιναν σε μέλισσες έδειξαν ότι το MCPA είναι «σχεδόν μη τοξικό».

Τοξικότητα σε υδρόβιους οργανισμούς: Οι ερευνητικές αναφορές που είναι διαθέσιμες για τους υδρόβιους οργανισμούς είναι σχετικά περιορισμένες και αφορούν κυρίως το MCPA στις μορφές εστέρα και άλατος και λιγότερο το οξύ για το οποίο γίνεται η έρευνα αυτής της εργασίας. Τα στοιχεία που προκύπτουν για το άλας είναι σχετικά καθησυχαστικά αφού βρέθηκε «ελαφρώς τοξικό» σε ψάρια γλυκού νερού και «σχεδόν μη τοξικό» σε ασπόνδυλα γλυκού νερού και σε ψάρια που ζούν σε θάλασσες και εκβολές. Αντίθετα το MCPA σε μορφή εστέρα παρουσιάστηκε ως «ιδιαίτερα τοξικό» στα ψάρια και στα ασπόνδυλα του γλυκού νερού, ενώ μόνο για τα θαλάσσια ψάρια ήταν «μέτρια τοξικό». Όσο αφορά το οξύ MCPA, μια μελέτη τοξικότητας που έγινε για ψάρια που ζούν σε θάλασσες και εκβολές το υπέδειξε ως «σχεδόν μη τοξικό». Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν αναφορές για μελέτες με θέμα το MCPA και τη χρόνια τοξικότητα που πιθανόν να παρουσιάσει σε υδρόβιους οργανισμούς (U.S. EPA, 2004a).

1.6.2. Thiram

Το thiram (τετραμεθυλοθειουράμ-δισουλφίδιο, Εικόνα 2) είναι μια διθειοκαρβαμδική ένωση που χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο για να αποτρέψει

ζημιές στη φάση της συγκομιδής και για να προστατεύσει τα ήδη συγκομισμένα προϊόντα κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά τους (φρούτα, λαχανικά, χλοοτάπητες, καλλωπιστικά φυτά κ.τ.λ.) από ποικίλες μυκητολογικές ασθένειες. Χρησιμοποιείται επίσης ως προστατευτικό σπόρων. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ως απωθητικό ζώων για να προστατεύσει τα οπωροφόρα και τα καλλωπιστικά δέντρα από τα κουνέλια, τα τρωκτικά και τα ελάφια. Έχει υποκίτρινο χρώμα και χαρακτηριστική μυρωδιά. Το thiram είναι διαθέσιμο σε μορφή σκόνης επίπασης, βρέξιμης σκόνης, κόκκων, σε υγρή υδατοδιαλυμένη μορφή, ενώ βρίσκεται και σε μίγματα με άλλα μυκητοκτόνα. Αυτή η δραστική ουσία έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε μίγματα που προορίζονται για την αντιμετώπιση της ψώρας στον άνθρωπο, ως αντηλιακό, και ως βακτηριδιοκτόνο που εφαρμόζεται άμεσα στο δέρμα ή που ενσωματώνεται στο σαπούνι. Το Thiram είναι γνωστό με εμπορικά ονόματα όπως Atack, Arasan, Aules, Fermide 850, Fernasan, FMC 2070, Hexathir, MercuramNomersan, Pomarsol, Puralin, Rezifilm, Rhodiasan Express, Spotrete, Tersan, Thiosan, Thiotex, Thiramad, Thirame, Thiuramin, Thirasan, Tirampa, Tiuramyl, TMTC, TMTD 50 Borches, Trametan, Tuads, and Tulusan. Στη χώρα μας κυκλοφορεί με τα εξής εμπορικά ονόματα: Granuflo, Vitavax και Thiraphox (Πηγή: Υπ.Α.Α.Τ.).



Εικόνα 2. Χημική δομή του thiram.

Τύχη και συμπεριφορά στο περιβάλλον

Το thiram είναι μια δραστική ουσία που χαρακτηρίζεται από χαμηλή ως μέτρια εμμόνη στο περιβάλλον. Η κινητικότητά του είναι ιδιαίτερα χαμηλή ως και μηδενική σε αργιλώδη εδάφη καθώς και σε εδάφη πλούσια σε οργανική ουσία. Το ενδεχόμενο ρύπανσης των υπογείων υδάτων είναι σχεδόν απίθανο και αυτό οφείλεται στην μικρή διαλυτότητα που έχει στο νερό, αλλά και στην πολύ ισχυρή του τάση να προσροφάται

από τα κολλοειδή του εδάφους. Ο χρόνος ημιζωής αυτής της δραστικής ουσίας για το έδαφος είναι 15 ημέρες και εξαρτάται κυρίως από το pH αυτού, αλλά και από την συγκέντρωση της οργανικής ουσίας. Αποδομείται πιο γρήγορα σε όξινα εδάφη και σε εδάφη πλούσια σε οργανική ουσία. Για παράδειγμα, η αποδόμησή του σε αμμώδες φυτόχωμα με pH 3,5 έγινε μετά από 4 έως 5 εβδομάδες, ενώ στην τιμή του pH 7 χρειάστηκαν 14 έως 15 εβδομάδες. Γενικότερα, έχει βρεθεί ότι παραμένει σε αμμώδες έδαφος επί δύο μήνες, ενώ σε εδάφη με μεγάλη συγκέντρωση οργανικής ουσίας η παρουσία του περιορίστηκε στο διάστημα της μιας εβδομάδας. Επίσης, η αποδόμηση του thiram μπορεί να προκληθεί από μικροβιακή δράση ή από υδρόλυση σε όξινες συνθήκες, αλλά δε διασπάται όταν βρίσκεται σε υγρές ή απολύτως ξηρές εδαφικές επιφάνειες.

Όσον αφορά στην συμπεριφορά του στο νερό έχει βρεθεί ότι το thiram διαλύεται και αποδομείται γρήγορα μέσω της υδρόλυσης και της φωτόλυσης, ειδικά όταν βρίσκεται σε όξινες συνθήκες. Το thiram μπορεί επίσης να βρεθεί στα ιζήματα των επιφανειακών υδάτων.

Τοξικολογικό προφίλ

Τοξικότητα στον άνθρωπο: Το thiram είναι «ελαφρώς τοξικό» από την κατάποση και την εισπνοή του και «μέτρια τοξικό» από δερμική απορρόφηση. Ειδικά για το δέρμα η ουσία αυτή θεωρείται ερεθιστική. Η οξεία έκθεση στους ανθρώπους μπορεί να προκαλέσει πονοκέφαλους, ίλιγγο, κούραση, ναυτία, διάρροια και άλλα γαστρεντερικά συμπτώματα. Επίσης, όταν η έκθεση (εισπνοή) σε αυτήν την ουσία είναι οξεία παρατηρούνται συμπτώματα όπως φαγούρα, ξηρότητα στο λαιμό, βράχνιασμα, βήχας, ζαλάδα, φτέρνισμα, ερεθισμοί της μύτης ή του λαιμού και βρογχίτιδα. Κατά συνέπεια, άτομα με χρόνιες παθήσεις του δέρματος και του αναπνευστικού συστήματος διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο από την έκθεσή τους στο thiram. Η χρόνια έκθεση του ανθρώπου περιλαμβάνει συμπτώματα όπως υπνηλία, σύγχυση, απώλεια σεξουαλικής επιθυμίας, ψεύδισμα και αδυναμία. Η επαναλαμβανόμενη ή παρατεταμένη έκθεση στο thiram μπορεί επίσης να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις όπως δερματίτιδα, βούρκωμα, ευαισθησία στο φως και επιπεφκίτιδα (EXTOXNET, 1996b).

Τοξικότητα στα πουλιά: Το thiram είναι μη τοξικό στα πουλιά σύμφωνα με αποτελέσματα ερευνών που έγιναν σε ορτύκια, πάπιες, φασιανούς και κόττυφες.

Τοξικότητα στα θηλαστικά: Οι απόψεις αναφορικά με την τοξικότητα του thiram στα θηλαστικά είναι αντικρουόμενες, αφού από τη μια πλευρά η χρήση του ενδείκνυται για την προστασία των καλλιεργειών από κάποια ζώα ενώ από ορισμένα ερευνητικά πειράματα σε ποντίκια και κουνέλια αποδεικνύεται ότι είναι ιδιαίτερος τοξικό. Συγκεκριμένα στα ποντίκια που χορηγήθηκε το thiram διαπιστώθηκαν συμπτώματα όπως προβλήματα στο αναπνευστικό και τους μύες, σπασμοί και μεταπτώσεις στην κινητική τους ικανότητα. Πολύ σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι όλα τα πειραματόζωα πέθαναν μέσα 2 έως 7 ημέρες μετά την έκθεσή τους. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι οι δόσεις που χορηγήθηκαν για αυτά τα πειράματα ήταν υψηλές.

Τοξικότητα σε έντομα μη στόχους: Το thiram χαρακτηρίζεται ως «μη τοξικό» για τις μέλισσες.

Τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς: Από έρευνες που έγιναν σε υδρόβιους οργανισμούς, όπως πέστροφες και κυπρίνους, το thiram χαρακτηρίστηκε ως «ιδιαίτερος τοξικό». Γενικότερα, οι υποθέσεις για την τοξική επίδραση και τις χρόνιες συνέπειες του thiram στο ευρύτερο φάσμα των υδρόβιων οργανισμών (ψάρια λιμνών, εκβολών και θαλασσών, ασπόνδυλα, άλγη κ.τ.λ.) είναι δυσμενείς όσον αφορά στον κύκλο ζωής και την επιβίωση των υδρόβιων ειδών (U.S. EPA, 2004b).

1.7. Τα δίθυρα ως βιοδείκτες

Η έννοια του βιολογικού δείκτη ή βιοδείκτη είναι ένας νέος όρος που εμφανίζεται στην οικοτοξικολογία και αφορά την βιολογική ανταπόκριση στην ύπαρξη κάποιων συγκεκριμένων βιολογικών παραγόντων - περιβαλλοντικών ρύπων. Η βιολογική αυτή ανταπόκριση αφορά την οποιαδήποτε απόκλιση από την φυσιολογική κατάσταση και μετρείται σε μοριακό, κυτταρικό ή επίπεδο οργανισμού. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι επιδράσεις που ανιχνεύονται με τους βιολογικούς δείκτες μπορούν να συσχετιστούν με την ύπαρξη συγκεκριμένων συγκεντρώσεων περιβαλλοντικών ρύπων και αποτελούν ένα εργαλείο ανίχνευσης των ρύπων με βιολογικές μεθόδους. Ο κύριος στόχος της μελέτης των βιολογικών δεικτών είναι να γίνει δυνατή η πρόβλεψη των επιδράσεων σε ανώτερα επίπεδα οργάνωσης όπως πληθυσμών και οικοσυστήματος, με κριτήριο τις επιδράσεις που παρατηρούνται σε μοριακό η κυτταρικό επίπεδο (Μαχαίρα, 2002).

1.7.1. Η χρήση των δίθυρων σε προγράμματα παρακολούθησης της ρύπανσης

Οι δίθυροι οργανισμοί, όπως τα στρείδια και τα μύδια, είναι πολύ σημαντικοί για την παρακολούθηση της περιβαλλοντικής ρύπανσης και ως τέτοιοι έχουν χρησιμοποιηθεί εδώ και πολλά χρόνια. Γενικότερα τα μαλάκια είναι ευρέως καταναμημένα σε θαλάσσια ύδατα του βόρειου ημισφαιρίου, η συλλογή τους είναι αρκετά εύκολη και λόγω της διατροφής τους μέσω φιλτραρίσματος του νερού μπορούν να βιοσυσσωρεύουν ποικίλες προσμείξεις (μέταλλα και οργανικές ενώσεις). Επιπλέον, έχουν το κατάλληλο μέγεθος για βιοχημική ανάλυση και είναι οργανισμοί ανεκτικοί σε συνθήκες μειωμένης αλατότητας, όπως και σε ένα ευρύ φάσμα ρύπων, εν μέρει λόγω του εξαιρετικά δραστικού ανοσοποιητικού συστήματος.

Για πολλά χρόνια οι εν λόγω οργανισμοί (είδη της οικογένειας Mytilidae) έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες της χημικής ρύπανσης των παράκτιων υδάτων στα προγράμματα «Mussel Watch». Τα προγράμματα αυτά, τα οποία είχαν αρχικά σχεδιαστεί από τον Goldberg το 1975, συνίστανται στην χρήση των θαλάσσιων δίθυρων προκειμένου να εξεταστεί η ποιοτική και ποσοτική ύπαρξη πολυάριθμων υδατικών ρύπων. Η ανάλυση των οργανισμών αυτών, αντί για το νερό που τα περιβάλλει, είναι σε πολλές περιπτώσεις πιο ακριβής, καθώς όπως προαναφέρθηκε οι οργανισμοί αυτοί μπορούν να συγκεντρώνουν τους ρύπους στους ιστούς τους.

Στα προγράμματα Mussel Watch, πληθυσμοί ιθαγενών, ή εισαχθέντων στις συγκεκριμένες περιοχές μυδιών, συλλέγονται και στη συνέχεια εξετάζονται τα επίπεδα συγκέντρωσης ρύπων στους μαλακούς ιστούς ή και στο κέλυφος. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα επίπεδα που αναμένεται να επικρατήσουν στην περιοχή που επιλέχθηκε για εξέταση ή σε σχέση με τα αποδεκτά επίπεδα συγκεντρώσεων ρύπων που έχουν τεθεί για μύδια κατανάλωσης από τους διάφορους φορείς. Τα συγκεκριμένα προγράμματα υπήρξαν και θεωρούνται ακόμη σημαντικά εργαλεία για την παρακολούθηση της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Στοιχεία για την ύπαρξή τους σε παγκόσμια κλίμακα, καθώς και για την χρήση τους, απεικονίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Προγράμματα Mussel Watch (από Emmanouil, 2007).

Είδος	Περιοχή	Ρύπος	Μέθοδος ανάλυσης	Αναφορά
<i>M. edulis</i>	Shetland Islands	PAH	GC-MS	Webster et al, 1997
<i>M. edulis</i> <i>M. galloprovincialis</i>	Baltic Sea, Atlantic Coast, Mediterranean Sea	PAH	GC-MS	Baumard et al, 1999
<i>M. edulis</i>	Mersey Estuary, UK	PCB	CG-MS	Connor et al, 2001
30 molluscan species	West Taiwan Coasts	Cu, Zn, Cd, Pb, Ni, Cr, As, Sn	AAS DPASV	Hung et al, 2001
<i>M. edulis</i> <i>M. galloprovincialis</i>	Basque Coast, Spain	Cd, Cu, Zn, Pb, Cr, Ni, Hg, As, Ag	AAS	Franco et al, 2002
<i>M. edulis</i>	South Korea Coasts	BT	GC-MS	Hong et al, 2002
<i>M. trossulus</i> <i>C. grayanus</i>	Okhotsk Sea	Cd, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, Zn	AAS	Kavun et al, 2002
<i>P. perna</i>	Rio de Janeiro Bay	Hg, MeHg	AAS GC-ECD	Kehring et al, 2002
<i>M. edulis</i> <i>M. coruscus</i>	South Korea Coasts	CP, PCB	GC-MS	Kim et al, 2002
<i>M. edulis</i>	Bay of Fundy, Canada	PAH, PCB	CG-MS	Chou et al, 2003

1.7.2. Περιγραφή του βιοδείκτη *Mytilus galloprovincialis*

Το *Mytilus galloprovincialis* είναι δίθυρο μαλάκιο ιθαγενές των ακτών της Μεσογείου, της Μαύρης Θάλασσας και της Αδριατικής και ανήκει στην υποοικογένεια Mytilinae της οικογένειας Mytilidae. Είναι επίσης γνωστό με κοινά ονόματα όπως μύδι κόλπων, μπλε μύδι, μεσογειακό μύδι κ.τ.λ.

Γενικότερα η συσσώρευση των πληθυσμών του γίνεται σε σημεία ευκράτων περιοχών του πλανήτη μέσω των πλοίων που χρησιμοποιούν τα ύδατα, ερχόμενα από τις διάφορες περιοχές του πλανήτη. Τα μύδια δημιουργούν αποικίες στα κύττη των σκαφών και έτσι μεταφέρονται σε όλο τον κόσμο. Με τον τρόπο αυτό η ναυτιλία έχει επηρεάσει την εξάπλωση και την ανάμειξη του *Mytilus galloprovincialis* με τα αυτόχθονα ήδη της κάθε περιοχής. Συνήθως βρίσκεται στον αμμώδη πυθμένα βραχωδών ακτών, στις οποίες υπάρχει δυνατή ροή των υδάτων.

Εκτός από την εύκολη εξάπλωσή του, ο συγκεκριμένος οργανισμός έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί επίσης εύκολα να επικρατήσει σε επίπεδα πληθυσμών ή ακόμη

και να προκαλέσει την πτώση άλλων πληθυσμών που ανήκουν σε γηγενή δίθυρα μαλάκια. Το γεγονός αυτό οφείλεται στον συγκριτικά μεγαλύτερο ρυθμό αναπαραγωγής του *M. galloprovincialis* σε σχέση με τα αυτόχθονα ήδη που συναντά σε κάθε περιοχή. Συγκεκριμένα ο ρυθμός αναπαραγωγής του είναι 20-200% μεγαλύτερος από άλλα είδη. Παράλληλα, είναι οργανισμός ανθεκτικότερος στην έκθεση στους ανέμους από τα ανταγωνιστικά προς αυτό δίθυρα. Επίσης, μετά από ερευνητικά πειράματα που έγιναν στην νότια Αφρική παρατηρήθηκε ότι η βιωσιμότητα του *M. galloprovincialis* στην συνεχή έκθεση σε αέρα βρέθηκε πολύ μεγαλύτερη (92%) σε σχέση με αυτή των αυτοχθόνων *Perna perna* (78%), *Choromytilus meridionalis* (37-46%) και *Aulacomya ater* (0-10%).

Το *Mytilus galloprovincialis* έχει σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα. Σπανιότερα παρατηρούνται και άτομα με σκούρο μπλε χρώμα. Τα δύο κελύφη έχουν ίδιο μέγεθος και είναι κολλημένα μεταξύ τους. Το ένα άκρο του κελύφους είναι αιχμηρό και ελαφρώς λυγισμένο, ενώ το άλλο άκρο είναι στρογγυλεμένο, παρόλα αυτά όμως το σχήμα του μπορεί να ποικίλλει ανά περιοχή. Το μήκος του μπορεί να φτάνει τα 15 εκατοστά αλλά συνήθως είναι περίπου 5-8 εκατοστά. Συγγενή του ήδη είναι τα *Mytilus edulis* και *Mytilus trossulus* (FAO. *Mytilus galloprovincialis*).

Στις Εικόνες 3-5 που ακολουθούν φαίνονται ορισμένα τυπικά δείγματα του *Mytilus galloprovincialis*.



Εικόνα 3: *M. galloprovincialis*.



Εικόνα 4: *M. galloprovincialis*.



Εικόνα 5: Αποικία του *M. galloprovincialis*.

1.7.3. Βλάβες στο DNA ως βιοδείκτης επίδρασης (biomarkers of effect) στα μύδια

Το γεγονός ότι στους ιστούς των διθύρων μπορούν να βιοσυσσωρεύονται ρύποι μπορεί να έχει επιπτώσεις τόσο στην υγεία του οργανισμού όσο και στην δομή και το μέγεθος του πληθυσμού σε μακροπρόθεσμη βάση. Μια αξιόπιστη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αυτών είναι δυνατή μέσω της ολοκληρωμένης χρήσης σχετικών βιοδεικτών. Ως βιοδείκτες μπορούν να οριστούν οι «μετρήσεις σωματικών υγρών κυττάρων ή ιστών, που καταδεικνύουν με βιοχημικούς ή κυτταρικούς όρους την ύπαρξη ξενοβιοτικών στοιχείων ή το μέγεθος της αντίδρασης του οργανισμού που εκτίθεται σε αυτά» (McCarthy και Shugart, 1990). Πιο συγκεκριμένα, οι βιοδείκτες επίδρασης υπολογίζουν μια τοξική αντίδραση ή την εξέλιξη μιας νόσου, ως συνέπεια της έκθεσης του οργανισμού στους ρύπους. Οι βλάβες στο DNA είναι ένας βιοδείκτης επίδρασης, και μάλιστα ιδιαίτερος ανησυχητικός, που χρησιμοποιείται ευρέως, διότι μπορεί να προκαλέσει κληρονομικές επιπτώσεις, ενώ έχει και τη δυνατότητα πρόκλησης μελλοντικών ασθενειών. Οι βλάβες στο γενετικό υλικό (DNA) ποικίλλουν και μπορεί να είναι μονές αλυσίδες DNA (SSB), τροποποιήσεις αζωτούχων βάσεων,

ογκώδη συμπλέγματα DNA- ξενοβιοτικού (DNA adducts) καθώς και εκτενείς αλλοιώσεις (χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή μικροπυρήνες).

Η πρόκληση τέτοιων βλαβών έχει τεκμηριωθεί επαρκώς σε υδρόβια ζώα μετά από έκθεση τους σε γονοτοξικές χημικές ουσίες. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μια σαφή σύνδεση μεταξύ της ρύπανσης των υδάτων και των γενετικά οφειλόμενων διαταραχών (Marsh et al., 1992). Συγκεκριμένα όταν τα μύδια (*Mytilus* spp.) αποτελούν πειραματικό μοντέλο, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική, αλλά παροδική αύξηση σε ογκώδη συμπλέγματα κινολίνης με το DNA (DG-C8-4NQO) μετά από έκθεση στο οξείδιο της 4-νιτροκινολίνης (4-NQO), όπως μετρήθηκε με σήμανση με ³²P. Παρόμοιες και περισσότερο επίμονες τροποποιήσεις DNA βρέθηκαν στον *Mytilus galloprovincialis* και τον *Mytilus edulis* μετά από έκθεση σε βενζο[α]πυρένιο (BaP).

Γενικά, το γεγονός ότι ο μεταβολισμός γνωστών καρκινογόνων ουσιών είναι σχετικά αργός σε δίθυρα μαλάκια σε σχέση με τα ψάρια και τα θηλαστικά, δίνει τη δυνατότητα σε αυτά να συσσωρεύουν ξενοβιοτικά με περιορισμένες συνέπειες και κάνει ακόμη πιο δύσκολη την άμεση σύνδεση μεταξύ έκθεσης και γονοτοξικού αποτελέσματος. Σε γενικές γραμμές, ωστόσο, η αξιολόγηση των βλαβών του DNA στα μύδια αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη και είναι ενδεικτική της έκθεσης σε ρύπους που ενδέχεται να επηρεάσουν την ακεραιότητα του DNA (Emmanouil, 2007).

1.8. Μονές αλυσίδες DNA και οξειδωμένες αζωτούχες βάσεις ως δείκτες βλάβης DNA

1.8.1. Μονές αλυσίδες DNA

Οι μονές αλυσίδες DNA (single strand breaks) μπορούν να προκληθούν από διάφορους παράγοντες όπως άμεση επίδραση ξενοβιοτικών στο DNA, επίδραση τους μετά από βιομετατροπή, προσβολή από ελεύθερες ρίζες (reactive oxygen species), κοπή οξειδωμένων ή αλκυλιωμένων αζωτούχων βάσεων, κοπή ή άλλων βλαβών DNA ή και μετά από σχηματισμό εστιών διαλυτών σε αλκαλικό περιβάλλον (alkali labile sites) (Tice et al., 2000). Επομένως η δημιουργία SSB είναι ένα πολύ συνηθισμένο φαινόμενο σε καταστάσεις προσβολής του και για αυτό χρησιμοποιείται ως ευαίσθητος αλλά μη ειδικός βιοδείκτης γονοτοξικότητας. Επιπλέον, οι SSB δίνουν μια πρόωμη

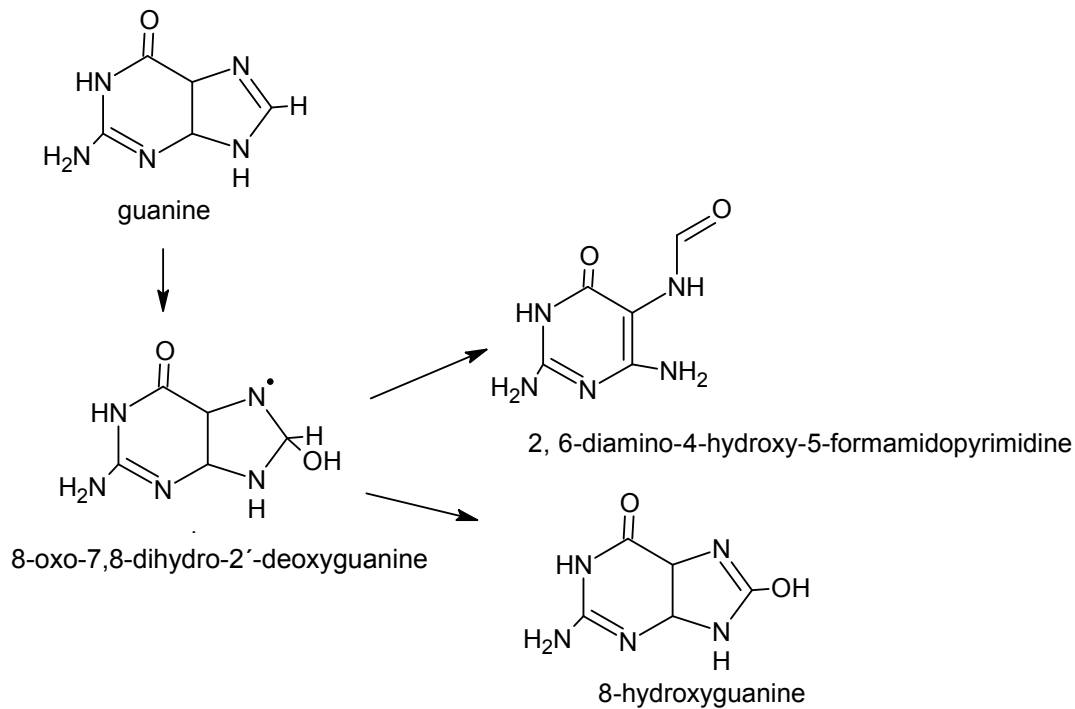
εικόνα γενοτοξικότητας, η οποία ενδέχεται αργότερα να εδραιωθεί με περισσότερο μόνιμες βλάβες (π.χ. δημιουργία μικροπυρήνων).

Οι SSB μετρώνται αρκετά συχνά σε ιστούς μυδιών σε προγράμματα παρακολούθησης υδατικής ρύπανσης. Επίσης, μια σειρά από *in vivo* και *in vitro* πειράματα χρησιμοποιούν μύδια και κύτταρα μυδιών αντίστοιχα τα οποία εκτίθενται σε γονοτοξικές ουσίες διαφορετικής δυναμικότητας. Εν συνεχεία, οι SSB μετρώνται κυρίως μέσω των μεθόδων ηλεκτροφόρησης μεμονωμένων κυττάρων και αλκαλικής έκλυσης alkaline single cell gel electrophoresis (Comet assay) και alkaline elution assay.

1.8.2. Οξειδωμένες αζωτούχες βάσεις

Οι βλάβες στις αζωτούχες βάσεις του DNA είναι η πιο συνήθης επίδραση των ROS σε αυτό, καθώς οι υδροξυλικές ρίζες (OH[·]) προσβάλλουν τους διπλούς δεσμούς αυτών των μορίων. Τόσο οι πουρίνες όσο και οι πυριμιδίνες μπορούν να προσβληθούν από ROS, εντούτοις η γουανίνη έχει την χαμηλότερη ενέργεια ιονισμού με αποτέλεσμα να είναι η πιο ευπαθής. Η γουανίνη μπορεί να οξειδωθεί από OH[·] ή περοξυνιτρικά μέσω απομάκρυνσης H από τον C8'. Έτσι, σε υδατικά διαλύματα η οξείδωση δίνει 8-οξο-7,8-διυδρο-2'-δεοξυγουανοσίνη. Η 8-οξο-dG βρίσκεται σε ισορροπία με τη ανοικτή μορφή της φορμαμιδοπυριμιδίνης (Fpy) και σε ταυτομερισμό με την ενολική μορφή της 8-υδροξυγουανοσίνη (8-OH-dG). Στο Σχήμα 1 φαίνεται η ίδια ακολουθία αντιδράσεων στην οποία όμως συμμετέχει η γουανίνη αντί της γουανοσίνης.

Οι οξειδωτικές βλάβες του DNA παίζουν σημαντικό ρόλο στην γήρανση και στην δημιουργία νεοπλασιών στα θηλαστικά. Αυτό συμβαίνει κυρίως γιατί η 8-οξο-dG είναι μεταλλαξιογόνο, καθώς μπορεί να συνδεθεί συμπληρωματικά με αδενίνη (A) αντί για κυτοσίνη (C), οδηγώντας μετά τον αναδιπλασιασμό του σε αλλαγή G-T (G-T transversion).



Σχήμα 1. Δημιουργία και εξέλιξη της ελεύθερης ρίζας γουανίνης που δημιουργείται μετά την προσβολή της γουανίνης στον C8'. Η οξειδωση δημιουργεί την 8-OH-dG (σε ισορροπία με την 8-oxo-dG) ενώ σε αναγωγικό περιβάλλον δημιουργείται και η ανοικτή μορφή της Fry.

Όσον αφορά στα μύδια, η 8-oxo-dG έχει καταγραφεί είτε μετά από *in vivo* έκθεση σε ξενοβιοτικά είτε σε πειράματα πεδίου. Για παράδειγμα, μια σειρά από πειράματα έκθεσης του *M. galloprovincialis* στο BaP κατέδειξε αύξηση των επιπέδων 8-oxo-dG στον πεπτικό αδένα και στα βράγχια του οργανισμού, είτε μέσω διάλυσης σε νερό είτε μέσω ρυπασμένης με BaP τροφής. Επίσης, πληθυσμοί του *Unio tumidus* έδειξαν αυξημένα επίπεδα 8-oxo-dG μετά από έκθεση σε ρυπασμένο περιβάλλον για 21 ημέρες. Εντούτοις, οι μελέτες με τη 8-oxo-dG σε μύδια είναι συγκριτικά λίγες τόσο σε σχέση με την έρευνα για την 8-oxo-dG σε θηλαστικά όσο και με την έρευνα για SSB σε μύδια (Emmanouil, 2007).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικό μέρος

2.1.1. Διαλύματα

Διάλυμα HEPES: HEPES (0,12 M), KCl (0,15 M), Na₂EDTA (6 mM), pH 7,2.

Διάλυμα λύσης: NaCl (2,5M), Na₂EDTA (0,1M), Tris base (10 mM), pH 10, 0 μέχρι 1 L με απιονισμένο νερό στους 4 °C. Αμέσως πριν την χρήση σε 89 mL προστέθηκε Triton-X (1mL) και DMSO (10 mL) .

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: NaOH (0,1 M), Na₂EDTA (1 mM), pH 13, μέχρι 2 L στους 4 °C.

Διάλυμα ουδετεροποίησης: Tris base (0,4M), pH 7.5.

Διάλυμα Frg: NaCl (0,1M), HEPES (40 mM) Na₂EDTA (0,5mM) pH 8,0. Μετά από αποστείρωση, προστέθηκε βόεια αλβουμίνη (bovine serum albumin) (0,2 mg/mL). Το διάλυμα διατηρήθηκε στους -20 °C.

Διάλυμα χρώσης: Ιωδιούχο προπίδιο, 2,5 µg/mL (Research Organics, Cleveland, USA). κανονικού σημείου τήξης (Normal melting point) αγαρόζη (NMPA) και χαμηλού σημείου τήξης (low melting point) αγαρόζη (LMPA): NMPA ή LMPA (0,5 w/v σε PBS) αποστειρώθηκε σε αυτόκλειστο. Πριν την χρήση τήχθηκε σε υδατόλουτρο.

2.1.2. Πειραματική έκθεση στα αγροχημικά Thiram και MCPA

Εμπορικά διαθέσιμα μύδια *Mytilus galloprovincialis* μέσου μήκους 8-9 cm αγοράστηκαν από την εταιρία Πικούνης, Διονύσου 70, Κηφισιά. Τα μύδια μεταφέρθηκαν αμέσως σε ενυδρείο χωρητικότητας 15 L με θαλάσσιο νερό αλατότητας 34‰ μέσης θερμοκρασίας 25 °C, σε συνθήκες σταθερού 24ωρου φωτισμού. Τα μύδια τρέφονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα με εμπορικά διαθέσιμη σκόνη *Spirulina* (M. Rohrer, Ολλανδία). Τα επίπεδα νιτρικών και νιτροδών ελέγχονταν κάθε 2 ημέρες και δεν υπερέβησαν τα 0,5 και 0,25 ppm αντίστοιχα. Πριν τη έναρξη των πειραμάτων τα μύδια αφέθηκαν να εγκλιματιστούν στις προαναφερθείσες συνθήκες τουλάχιστον για 5

ημέρες. Οι οργανισμοί αυτοί βιοσυσσωρεύουν γρήγορα ρύπους από το περιβάλλον, αλλά εξίσου γρήγορα τους αποβάλλουν σε συνθήκες καθαρού νερού.

Συνθήκες πειράματος Α.

Κατά την διάρκεια του πειράματος Α, 8 μύδια ανά πειραματική κατηγορία (4 μύδια/ποτήρι ζέσεως) τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως 2 L (Simax, Czech Republic) με θαλασσινό νερό. Εν συνεχεία, προστέθηκε θαλασσινό νερό ρυπασμένο με αγροχημικά με ονομαστικές συγκεντρώσεις thiram αυτές που καταγράφονται στον Πίνακα 3. Το νερό αντικαθίστατο κάθε 12 h. Κατά την διάρκεια της έκθεσης τα πειραματόζωα δεν λάμβαναν τροφή. Η γενική υγεία των μυδιών (έκκριση βλέννας, αντίδραση σε ερεθίσματα, προσκόλληση στα υάλινα τοιχώματα κ.λπ.) και ο αριθμός νεκρών ζώων καταγράφονταν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος.

Πίνακας 3. Ονομαστικές συγκεντρώσεις του thiram ανά πειραματική κατηγορία.

	Πειραματική κατηγορία			
	Μάρτυρας	Χαμηλή Δόση	Μεσαία Δόση	Υψηλή Δόση
Ονομαστική συγκέντρωση thiram (mg/L)	0	0,1	1,00	10,00

Συνθήκες πειράματος Β.

Οι συνθήκες ήταν ίδιες με αυτές του πειράματος Α, με ονομαστικές συγκεντρώσεις MCPA αυτές που καταγράφονται στον Πίνακα 4. Τα ποτήρια ζέσεως παρέμεναν καλυμμένα με αλουμινόχαρτο για να αποφευχθεί φωτοκαταβολισμός της ένωσης (European Commission- Health & Consumer Protection Directorate, 2005).

Πίνακας 4. Ονομαστικές συγκεντρώσεις του MCPA ανά πειραματική κατηγορία.

	Πειραματική κατηγορία			
	Μάρτυρας	Χαμηλή Δόση	Μεσαία Δόση	Υψηλή Δόση
Ονομαστική συγκέντρωση MCPA (mg/L)	0	50	150	200

Συνθήκες πειράματος Γ.

Οι συνθήκες ήταν ίδιες με αυτές του πειράματος Α, με ονομαστικές συγκεντρώσεις thiram και MCPA αυτές που καταγράφονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Ονομαστικές συγκεντρώσεις του thiram και του MCPA ανά πειραματική κατηγορία.

	Πειραματική κατηγορία		
	Μάρτυρας	thiram	MCPA
Ονομαστική συγκέντρωση (mg/L)	0	1,00	150

Μετά το πέρας των πειραμάτων τα ζώα θυσιάστηκαν και τα βράγχια αποσπάστηκαν προκειμένου να υποβληθούν σε περαιτέρω διεργασία.

2.2. Απομόνωση κυττάρων από βράγχια

Το κέλυφος των μυδιών ανοίχθηκε με χειρουργικό νυστέρι (17 cm) και τα βράγχια αποσπάστηκαν με μικρού μεγέθους χειρουργικές λαβίδες. Ο ιστός μεταφέρθηκε σε ποτήρι pyrex 20 mL, το οποίο περιείχε 3 mL διαλύματος HEPES και κατατεμαχίστηκε με την βοήθεια πλαστικής πιπέτας Pasteur. Εν συνεχεία, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε δυο πλαστικά erpendorf[®], χωρητικότητας 1,5 mL το καθένα, και υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση 2000 x g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 mL διαλύματος HEPES και ένα ποσό από αυτό (εμπειρικά καθορισμένο) απορρίφθηκε. Το διάλυμα που παρέμεινε υποβλήθηκε ξανά σε φυγοκέντρηση 2000 x g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το τελικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα HEPES (150 µL) και διατηρήθηκε σε πάγο μέχρι περαιτέρω χρήση.

2.3 Ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων

Το διάλυμα που παράχθηκε κατά την προαναφερθείσα διαδικασία (15,0 µL) ανακατεύτηκε με τηγμένη LMPA (150 µL) και απλώθηκε κατά μήκος μιας καλυμμένης με NMPA αντικειμενοφόρου. Δύο αντικειμενοφόροι παρήχθησαν κατά αυτόν τον τρόπο ανά μύδι. Συνολικά αναλύθηκαν 3 μύδια /κατηγορία για το Thiram και 4

μύδια/κατηγορία για το MCPA. Προστέθηκαν γυάλινες καλυπτρίδες και οι αντικειμενοφόροι αφέθηκαν να στερεοποιηθούν για 15 min μέσα σε παγωμένο μεταλλικό δίσκο. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες αφαιρέθηκαν και οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίστηκαν σε παγωμένο διάλυμα λύσης (100 mL) μέσα σε γυάλινο δοχείο Corlin και αφέθηκαν εκεί σε θερμοκρασία 4 °C για 1 h, καλυμμένες με αλουμινόχαρτο. Μετά το πέρας της μιας ώρας, οι αντικειμενοφόροι μεταφέρθηκαν σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιείχε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (pH 13), όπου αφέθηκαν για 30 min στο σκοτάδι. Εν συνεχεία, υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση με το ίδιο διάλυμα για 20 min, στα 20 V/200 mA. Τέλος, οι αντικειμενοφόροι πλύθηκαν με διάλυμα ουδετεροποίησης (3 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών η καθεμιά, με 1 mL ανά αντικειμενοφόρο) και βάφτηκαν με ιωδιούχο προπίδιο (20 µg/mL, 50 µL). Μια καλυπτρίδα προστέθηκε σε κάθε αντικειμενοφόρο και το σύνολο των παρασκευασμάτων αποθηκεύτηκε σε πλαστικό αδιαφανές κουτί, το οποίο περιείχε δύο στρώσεις υγρών χαρτιών. Το κουτί καλύφθηκε εξ ολοκλήρου με αλουμινόχαρτο και παρέμεινε στους 4 °C μέχρι την ανάλυση των παρασκευασμάτων για 48 ώρες (< 48h).

2.4 Ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων με το ένζυμο formamidopyrimidine glycosylase (Fpg)

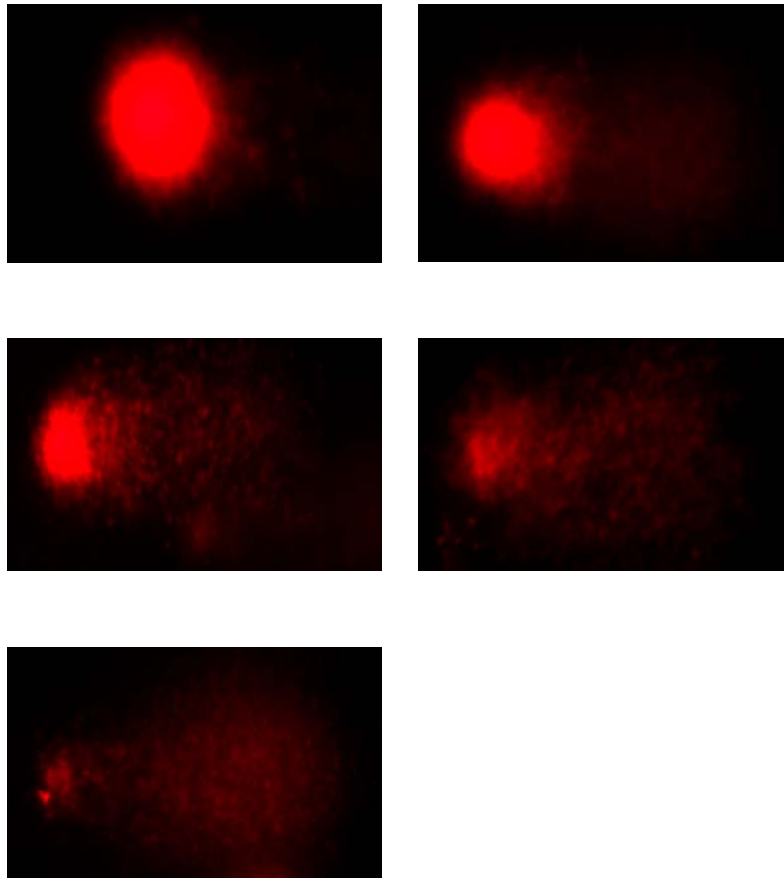
Συνολικά αναλύθηκαν 4 μύδια ανά κατηγορία, τα οποία εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις που καταγράφονται στον Πίνακα 5 και με παραγωγή 4 αντικειμενοφόρων ανά μύδι αντί για 2. Η διαδικασία ήταν αυτή που περιγράφεται στο πείραμα Γ, με την διαφορά ότι μετά την λύση και πριν την μεταφορά στην συσκευή ηλεκτροφόρησης παρεμβλήθηκε επώαση με το ένζυμο Fpg (formamidopyrimidine glycosylase). Το Fpg είναι ένα ένζυμο από το βακτήριο *Escherichia coli*, το οποίο έχει χαρακτηριστικά N-γλυκοζυλάσης. Συγκεκριμένα, κόβει την οξειδωμένη βάση 8-oxo-dG από την φωσφοδιεστερική αλυσίδα του DNA δημιουργώντας επιπλέον μονές αλυσίδες DNA. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε ήταν για να υπολογιστεί έμμεσα το 8-oxo-dG. Αναλυτικά, οι αντικειμενοφόροι αφαιρέθηκαν από το δοχείο Corlin και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αντικειμενοφόροι πλύθηκαν με διάλυμα Fpg (3 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών η καθεμιά, με 1 mL ανά αντικειμενοφόρο) και σε 2 από

τις 4 αντικειμενοφόρους ανά μύδι προστέθηκε 1 μονάδα ενζύμου Fpg (AMS Biotechnology, UK) σε διάλυμα Fpg (50 μ L) κατά τους Collins και συνεργάτες (1993). Στις υπόλοιπες 2 αντικειμενοφόρους προστέθηκε διάλυμα Fpg μόνο (50 μ L). Μια καλυπτρίδα προστέθηκε σε κάθε αντικειμενοφόρο και το σύνολο των παρασκευασμάτων αποθηκεύτηκε σε πλαστικό αδιαφανές κουτί, το οποίο περιείχε δύο στρώσεις υγρών χαρτιών. Το κουτί καλύφθηκε εξ ολοκλήρου με αλουμινόχαρτο και επωάστηκε στους 37 °C για 1 h. Στην συνέχεια, τα παρασκευάσματα τοποθετήθηκαν σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν παρόμοια με αυτήν που περιγράφεται στο 2.3.

Οι αντικειμενοφόροι εξετάστηκαν κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss AxioCam MRC, Carl Zeiss Inc., Γερμανία) σε μεγέθυνση X 200. Για τα πειράματα A και B έγινε φωτογραφική αποτύπωση 40 κυττάρων ανά αντικειμενοφόρο (80 ανά μύδι) και για το πείραμα Γ αποτύπωση 40 κυττάρων ανά αντικειμενοφόρο (160 ανά μύδι).

Εν συνεχεία οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με το πακέτο (TriTekCometScore™), το οποίο υπολογίζει την παράμετρο «% DNA στην ουρά» in tail. Για τα πειράματα A και B χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος % DNA in tail, η οποία είναι ανάλογη του % ποσοστού των SSB, ενώ για το πείραμα Γ χρησιμοποιήθηκε η διαφορά [% DNA in tail (παρασκευάσματα με Fpg) - % DNA in tail (παρασκευάσματα χωρίς Fpg)], η οποία είναι ανάλογη του ποσοστού 8-oxo-dG.

Στην Εικόνα 6 παρατίθενται ορισμένες ενδεικτικές φωτογραφίες, επιλεγμένες από το πλήθος αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Είναι τοποθετημένες κατά σειρά ένδειξης ζημιάς από την μικρότερη στη μεγαλύτερη. Οι πυρήνες μοιάζουν με κομήτες λόγω χρώματος, σχήματος και συγκεκριμένης τροχιάς που φαίνονται ότι ακολουθούν. Αυτά τα οπτικά χαρακτηριστικά είναι συνέπεια της διαδικασίας που ακολουθείται στην μέθοδο comet assay. Στις φωτογραφίες διακρίνονται κάποιοι σχηματισμοί πίσω από κάθε πυρήνα που διεθνώς ονομάζονται ουρές. Αυτές οι ουρές είναι κομμάτια γενετικού υλικού που έχουν αποκοπεί από την αλυσίδα και ως εκ τούτου οι φωτογραφίες που απεικονίζουν μεγαλύτερες ουρές αναφέρονται σε πυρήνες που έχουν υποστεί την μεγαλύτερη ζημιά στο DNA (DNA damage).



Εικόνα 6: Στην πρώτη φωτογραφία παρατηρείται μια σχεδόν ανύπαρκτη ουρά που σημαίνει ένα πιθανόν ασήμαντο DNA damage, κάτι που ισχύει και για τον πυρήνα της δεύτερης φωτογραφίας στον οποία η ζημιά είναι ελαφρώς πιο αυξημένη. Στην τρίτη φωτογραφία παρατηρείται προφανής ζημια στο γενετικό υλικό ενώ στην τέταρτη και την πέμπτη η ζημια για τον πυρήνα είναι σχεδόν καθολική.

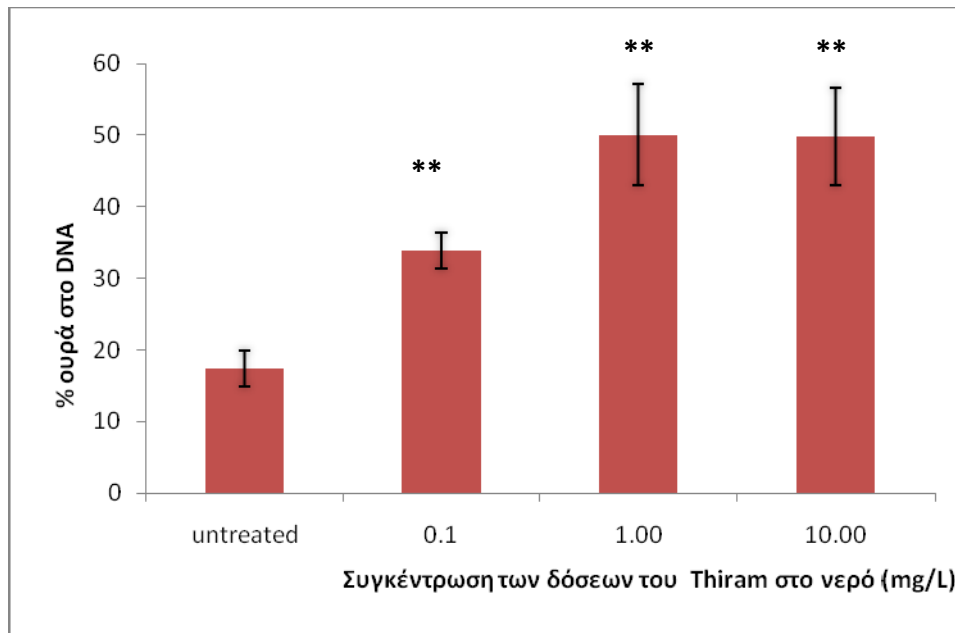
Καθώς τα αποτελέσματα του Comet assay δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, μια ικανοποιητική προσέγγιση κανονικής κατανομής μπορεί να γίνει με υπολογισμό της διαμέσου του συνόλου των κυττάρων (Duez et al., 2003). Η διάμεσος των 80 κυττάρων ανά μύδι (για τα πειράματα A και B) και η διαφορά των διαμέσων ανά μύδι (για το πείραμα Γ) υπολογίσθηκε και πραγματοποιήθηκε one-way ANOVA προκειμένου να εντοπιστεί στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών κατηγοριών. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε post-hoc t-test με διόρθωση Bonferonni μεταξύ κάθε δύο κατηγοριών. Στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε σε επίπεδο $P < 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε αυτό το κεφάλαιο παρατίθενται τα αποτελέσματα των τριών πειραμάτων με στατιστική απεικόνιση καθώς και ένα επεξηγηματικό σχόλιο για το καθένα ξεχωριστά. Τα σύμβολα του αστερίσκου (*) και του δολαρίου (\$) που βρίσκονται σε ορισμένες από τις κορυφές των ράβδων συμβολίζουν το επίπεδο της στατιστικά σημαντικής διαφοράς σε σχέση με τον μάρτυρα και σε σχέση με την υψηλή δόση.

3.1. Πείραμα 1^ο: Αποτελέσματα έκθεσης του *M. galloprovincialis* στο thiram (comet assay)

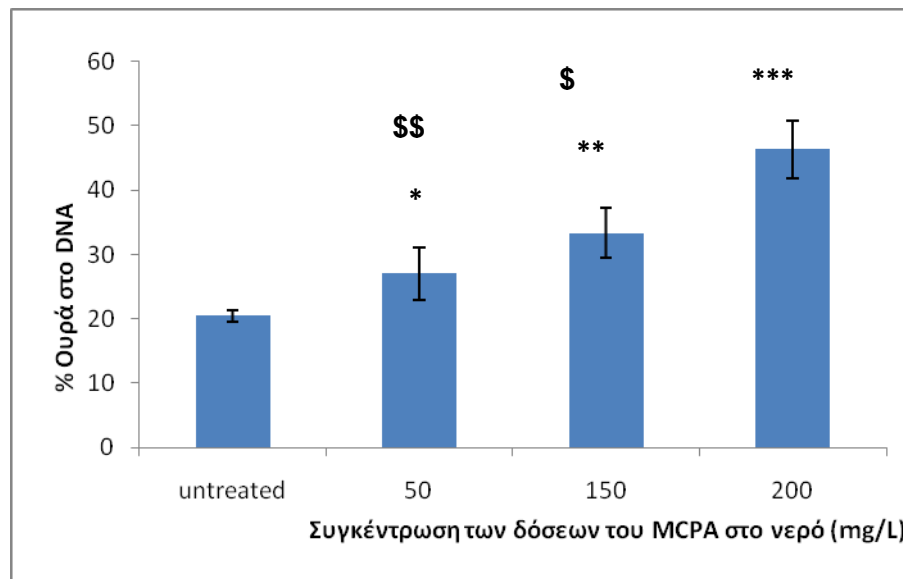
Με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για το thiram παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και όλων των επιπέδων των δόσεων που χορηγήθηκαν (Σχήμα 2). Αυτό σημαίνει ότι όλα τα επίπεδα των δόσεων είχαν σημαντική επίδραση στο γενετικό υλικό των μυδιών, δηλαδή προκάλεσαν αρκετά σπασίματα στην αλυσίδα του DNA. Στην σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των επιμέρους δόσεων παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά και αυτό είναι ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον στοιχείο όσον αφορά στην έρευνα για την επίδραση της συγκεκριμένης δραστικής ουσίας. Αυτό το στοιχείο επί της ουσίας σημαίνει ότι η επίδραση του thiram στο γενετικό υλικό του *M. galloprovincialis* ήταν ίδια και μάλιστα στατιστικά σημαντική ανεξαρτήτως της δόσης. Για το γεγονός αυτό θα γίνει προσπάθεια ερμηνείας στο κεφάλαιο των συμπερασμάτων. Μια λεπτομέρεια που μπορεί να ενισχύσει τον προβληματισμό για το συγκεκριμένο αποτέλεσμα, είναι ότι η επίδραση που είχε η μεσαία δόση ήταν αριθμητικά ίση ή ελαφρώς μεγαλύτερη από αυτήν της μεγάλης δόσης. Και αυτό το γεγονός μπορεί επίσης να ερμηνευτεί με διάφορους τρόπους.



Σχήμα 2: Οι τρεις επιμέρους δόσεις έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τον μάρτυρα αλλά όχι μεταξύ τους.

3.2. Πείραμα 2^ο: Αποτελέσματα έκθεσης του *M. galloprovincialis* στο MCPA (comet assay)

Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της χορήγησης δόσεων MCPA στα μύδια προκύπτει καταρχάς το συμπέρασμα ότι υπάρχει μια ομαλή σχέση μεταξύ δόσης και αποτελέσματος. Πιο αναλυτικά, τα γεγονότα που παρατηρούνται και μπορούν να σχολιαστούν σε πρώτη φάση είναι τα εξής: 1^ο) Ο μάρτυρας παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά με κάθε ένα από τα τρία διαφορετικά επίπεδα δόσεων που χορηγήθηκαν, 2^ο) από την σύγκριση μεταξύ των τριών επιπέδων δόσεων είναι προφανές ότι η επίδραση του MCPA στο γενετικό υλικό του *M.galloprovincialis* εξαρτάται αναλογικά από το ύψος της δόσης, 3^ο) η σχέση μεταξύ της μικρής και της μεσαίας δόσης συγκριτικά με την πιο υψηλή είναι επίσης ομαλή και δείχνει οπωσδήποτε μια αναλογία. Γενικότερα, η αναλογία δόσης αποτελέσματος είναι ένα συνηθισμένο στοιχείο όταν παρατηρείται γενοτοξική συμπεριφορά.

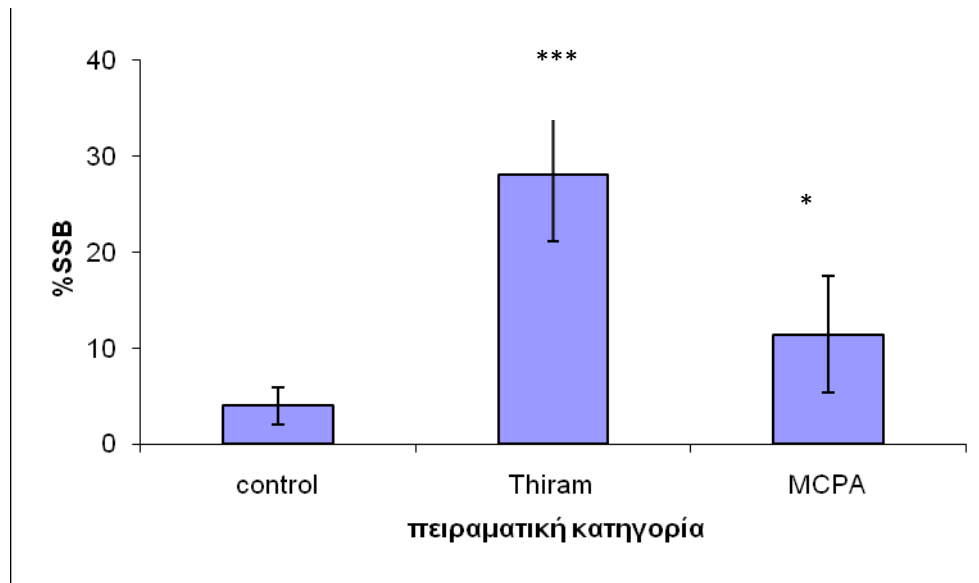


Σχήμα 3: Στο δεύτερο πείραμα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις επιδράσεις που είχε η κάθε δόση σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά και σχετικά με την υψηλή δόση.

3.3. Πείραμα 3^ο: Αποτελέσματα χορήγησης της πρωτεΐνης Fpg σε ήδη εκτεθειμένα σε thiram και MCPA μύδια (comet assay+Fpg)

Όπως προαναφέρθηκε το συγκεκριμένο πείραμα έγινε σε μύδια που εκτέθηκαν στη μεσαία δόση που επιλέχθηκε για κάθε δραστική ουσία. Με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι και στις δύο περιπτώσεις υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα όσον αφορά στο ποσοστό των SSB. Το γεγονός αυτό είναι ήδη γνωστό από τα αποτελέσματα που έδωσαν τα προηγούμενα πειράματα. Το στοιχείο όμως που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι ότι στην περίπτωση του thiram έχουμε ιδιαίτερα αυξημένη διαφορά με τον μάρτυρα πράγμα που κάνει σαφές ότι αυτή η δραστική ουσία προκάλεσε και οξειδωτικό στρες, δηλαδή πλήθος οξειδωμένων βάσεων 8-oxo-dG στην αλυσίδα του γενετικού υλικού. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στο ύψος της δόσης που χρησιμοποιήθηκε για το thiram.

Αντίθετα, στην περίπτωση του MCPA, παρατηρήθηκε ότι το Fpg «ανακάλυψε» ορισμένες οξειδωμένες βάσεις έτσι, ώστε να δημιουργήσει νέες μονές αλυσίδες DNA. Το οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε είναι μικρότερο από αυτό που προκάλεσε το thiram.



Σχήμα 4: Οι επιδράσεις των δύο αγροχημικών είναι στατιστικά σημαντικές με αυτήν του thiram να εμφανίζεται αυξημένη σε σχέση με την επίδραση του MCPA.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας την διαδικασία αυτής της έρευνας αρχικά θα ήταν απαραίτητη μια αναφορά στην επιλογή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή της μελέτης γύρω από τη επίδραση που μπορεί να προκαλέσουν οι δραστικές ουσίες thiram και MCPA στο DNA του *M. galloprovincialis*. Η μέθοδος comet assay είναι μια ιδιαιτέρως ενδιαφέρουσα όσο και διαδεδομένη μέθοδος η οποία καλύπτει ένα ευρύ φάσμα ερευνών που αφορούν την συμπεριφορά των κυτταρικών πυρήνων κάτω από τα διάφορα ερεθίσματα που μπορούν να δεχτούν. Στην περίπτωση της συγκεκριμένης έρευνας, η single cell gel electrophoresis (SCGE) επιλέχθηκε προκειμένου να αποκομιστεί μια αρχική εικόνα για την ικανότητα των δύο δραστικών ουσιών να προκαλέσουν βλάβες στο DNA του *M. galloprovincialis* (SSB και 8-oxo-dG). Σε αυτό το σημείο πρέπει να αποσαφηνιστεί ότι ο σχηματισμός SSB είναι αφενός ένα γεγονός που μπορεί να προκληθεί πολύ συχνά και μπορεί να οφείλεται σε διάφορες αιτίες και αφετέρου οι οργανισμοί είναι σε θέση να τα επισκευάσουν ή γενικότερα να τα διαχειριστούν με ποικίλους τρόπους (ενζυμική δραστηριότητα, δημιουργία νέων αλυσίδων κ.λπ.). Επίσης τα σπασίματα δεν θεωρούνται ιδιαίτερα μεταλλαξιογόνα (Collins et al., 1997). Ωστόσο, με δεδομένο το ότι πολλές παρεκτροπές από την κανονική λειτουργία των οργανισμών μπορούν να συνδέονται με μεταλλαξιόγόνες δυνατότητες χημικών ουσιών, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα SSB υποδεικνύουν ή έστω δίνουν το ερέθισμα για μια περαιτέρω έρευνα σε αυτήν την κατεύθυνση (Lee et al., 1996).

Προκειμένου να αναζητηθούν περισσότερο στοχοποιημένα αποτελέσματα, η συγκεκριμένη πειραματική μέθοδος επιδέχεται κάποιες τροποποιήσεις. Στην συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Fpg για να κόψει την οξειδωμένη βάση 8-oxo-dG, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο του πειραματικού μέρους. Η χρήση του Fpg σε έρευνες με SCGE έχει πραγματοποιηθεί ευρέως για μελέτες πάνω σε θηλαστικά, καθώς και σε μαλάκια σε μικρότερη όμως έκταση (Labieniec και λοιποί., 2003).

Η επιλογή των δόσεων που χορηγήθηκαν για αυτά τα πειράματα έγινε βάση προηγούμενων πειραμάτων τα οποία αναφέρει η σχετική βιβλιογραφία (Doyotte et al.,

1997) αντίστοιχα για το thiram και για το MCPA. Ως δεδομένο, και ιδιαίτερα για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, πρέπει να ληφθεί ότι οι δόσεις ήταν υψηλές.

Στην προσπάθεια ανάλυσης των αποτελεσμάτων καταρχήν πρέπει να σταθούμε στο γεγονός ότι όλες οι δόσεις που χορηγήθηκαν είτε από το thiram είτε από το MCPA είχαν επίδραση στο DNA. Αυτό το αποτέλεσμα αποδεικνύει ότι αυτές οι δραστικές ουσίες έχουν μηχανισμούς που επιδρούν στο DNA με αρκετή δυναμική ούτως, ώστε να προκαλέσουν βλάβη.

Στην περίπτωση του thiram παρατηρήθηκε μια γενική νοσηρότητα στα εκτεθειμένα ζώα και τα αποτελέσματα έδειξαν έντονη επίδραση (SSB). Το πλέον ενδιαφέρον στοιχείο όμως είναι ότι οι δόσεις δεν έπαιξαν τόσο σημαντικό ρόλο αφού σύμφωνα με τα στατιστικά αποτελέσματα δεν υπήρξε αναλογία μεταξύ δόσης και αποτελέσματος. Δηλαδή οι επιδράσεις που είχαν οι τρεις δόσεις στις αντίστοιχες ομάδες, έφτασαν σε ένα κοινό επίπεδο, και μάλιστα τα ποσοστά της μεσαίας και της μεγάλης συγκέντρωσης είναι επι της ουσίας ίδια. Κατά συνέπεια, αν δεχτούμε ότι αυτά τα σπασίματα προήλθαν από την έκθεση σε αυτή τη δραστική ουσία, η πρώτη υπόθεση που μπορεί να γίνει είναι ότι το thiram είναι αρκετά ζημιογόνο σε αυτές τις δόσεις για το DNA του *M. galloprovincialis*. Για να αξιολογηθεί και να διερευνηθεί ο τρόπος δράσης του μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα στοιχεία που λήφθηκαν από το πείραμα στο οποίο έγινε επώαση των κυττάρων με το ένζυμο Fpg. Αυτή η μελέτη κατέδειξε με σαφήνεια ότι το thiram δημιούργησε ελεύθερες ρίζες και αυτός είναι πιθανότατα ένας από τους κύριους τρόπους δράσης του. Πράγματι, σε έρευνες που έχουν γίνει από τους Doyotte και συνεργάτες (1997) φάνηκε η ίδια δόση thiram προκάλεσε οξειδωτικό στρες (μείωση δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων) στο μύδι *Unio tumidus*.

Στην περίπτωση του MCPA παρατηρήθηκε σημαντικό ποσοστό SSB το οποίο ήταν ανάλογο των δόσεων που χορηγήθηκαν. Όσο αφορά το οξειδωτικό στρες, το MCPA προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση του 8-oxo-dG, αν και σημαντικά μικρότερη από το thiram. Σε σχετική βιβλιογραφία αυτή η δραστική ουσία προκάλεσε οξειδωτικό στρες σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, αλλά όχι μέσω της μείωσης της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (Bukowska et al., 2008).

Συμπερασματικά σε ότι αφορά το σύνολο των διεργασιών αυτής της ερευνητικής διαδικασίας μπορεί να λεχθεί ότι πρόκειται για μια πολύ ενδιαφέρουσα προσπάθεια

παρακολούθησης και κατανόησης της δράσης των MCPA και thiram σχετικά με την γενετοξική επίδραση τους στον *Mytilus galloprovincialis*.

Προκειμένου να συλλεχθούν ασφαλή αποτελέσματα επιδιώχθηκε να γίνει η όσο το δυνατόν καλύτερη προσομοίωση των φυσικών συνθηκών, στις οποίες αφορά αυτή η μελέτη. Παρόλη την προσπάθεια όμως είναι κατανοητό ότι σε ένα εργαστηριακό περιβάλλον οι συνθήκες είναι επί της ουσίας αφενός υποθετικές και αφετέρου μη ευέλικτες αναφορικά με τη μεταβολή των εξωτερικών παραγόντων. Για παράδειγμα, οι δόσεις που χορηγήθηκαν είναι βασισμένες σε προηγούμενες μελέτες, αλλά πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη ότι ήταν υψηλές και συγκεκριμένες. Επίσης, οι συνθήκες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας σε ένα φυσικό περιβάλλον είναι μεταβλητές (π.χ πίεση και θερμοκρασία υδάτων, συγκέντρωση των δραστικών ουσιών, επάρκεια τροφής των βιοδεικτών κ.τ.λ).

Κατά συνέπεια, το πιο ασφαλές ίσως συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί, με βάση το ότι αυτές οι δραστικές ουσίες έχουν όντως επίδραση στο γενετικό υλικό του βιοδείκτη, είναι ότι μια έρευνα σε πραγματικές περιβαλλοντικές συνθήκες και μάλιστα με δεδομένο ότι οι μελέτες με μαλάκια είναι περιορισμένες θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την οικοξικολογία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. Βιβλία και Περιοδικά

1. Βαλαβανίδης Α., 2007 Οικοτοξικολογία και περιβαλλοντική τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήμα Χημείας.
2. Ζιώγας Β. και Μάρκογλου Α. (2007). Γεωργική Φαρμακολογία. Εκδόσεις των ιδίων.
3. Μαχαίρα Κ. (2002). Σημειώσεις οικοτοξικολογίας.
4. Bukowska B., Rychlik B., Krokosz A, and Michalowicz J. (2008). Phenoxyherbicides induce production of free radicals in the human erythrocytes: Oxidation of dichlorodihydrofluoresceine and dihydrorhodamine 123 by 2,4-D-Na and MCPA-Na. *Food Chem Toxicol*, 46: 359-367.
5. Collins A.R., Dobson V.L., Dusinska M., Kennedy G., and Stetina R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*, 375(2): 183-193.
6. Doyotte A., Cossu C, Jacquin M-C, Babut M, and Vasseur P. (1997). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat Toxicol*, 39:93-110.
7. Duez P., Dehon G., Kumps A., and Dubois J. (2003). Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 18(2):159-166.
8. Emmanouil C. (2007). Oxidative stress and macromolecular damage caused by pollutants and repair of oxidised DNA in the gill of *Mytilus edulis* PhD thesis, University of Birmingham, UK.

9. Marsh J.W., Chipman J.K., and Livingstone D.R. (1992). Activation of xenobiotics to reactive and mutagenic products by the marine invertebrates *Mytilus edulis*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*. *Aquat Toxicol*, 22: 115-128.
10. McCarthy J.F., and Shugart L.R. (1990). Biomarkers of environmental contamination. Lewis Pbl, Florida, USA
11. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C. and Sasaki Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35(3): 206-21.

B. Δικτυακοί Τόποι

12. Υπ.Α.Α.Τ. 2009 Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής. Διαθέσιμο on-line: http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bycat_byactive.aspx (τελευταία πρόσβαση: Αύγουστος,).
13. EXTOKNET, 1996a. MCPA. Διαθέσιμο on-line: <http://extoknet.orst.edu/pips/MCPA.htm> (τελευταία πρόσβαση: Αύγουστος, 2009).
14. EXTOKNET, 1996b. Thiram. Διαθέσιμο on-line: <http://extoknet.orst.edu/pips/thiram.htm> (τελευταία πρόσβαση: Αύγουστος, 2009).
15. FAO. 2009 *Mytilus galloprovincialis*. Διαθέσιμο on-line: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis/en (τελευταία πρόσβαση: Αύγουστος,).

16. U.S. EPA, 2004a. Reregistration Eligibility Decision for MCPA. Διαθέσιμο on-line: http://envirocancer.cornell.edu/turf/pdf/mcpa_red.pdf (τελευταία πρόσβαση: Αύγουστος, 2009).
17. U.S. EPA, 2004b. Reregistration Eligibility Decision for thiram. Διαθέσιμο on-line: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/0122red_thiram.pdf (τελευταία πρόσβαση: Αύγουστος, 2009).
18. Wikipedia, 2009. MCPA. Διαθέσιμο on-line: <http://en.wikipedia.org/wiki/MCPA> (τελευταία πρόσβαση: Αύγουστος, 2009).