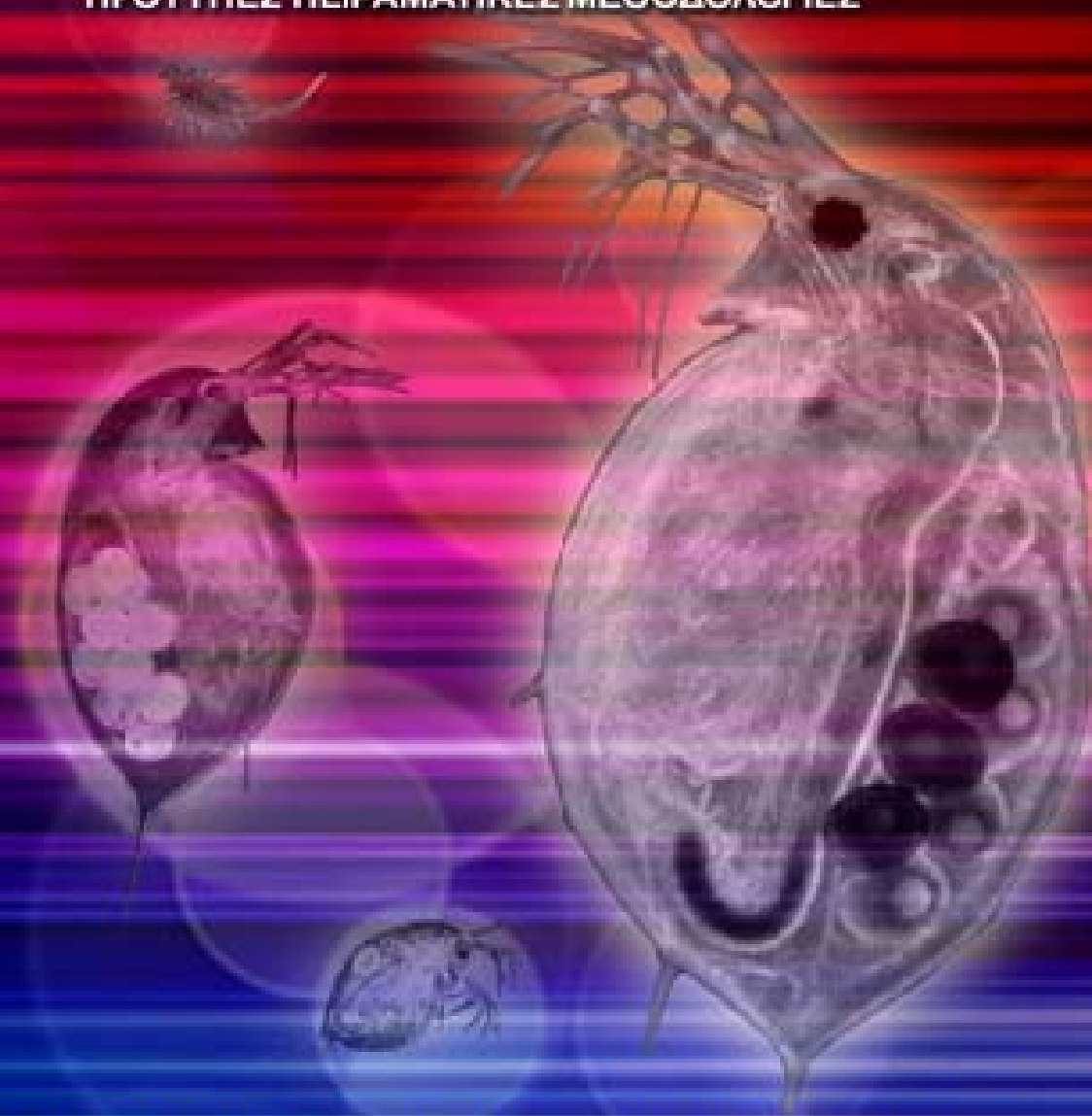


Θωμαΐς Βλαχογιάννη, Αθανάσιος Βαλαβανίδης

ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ, ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ,
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ,
ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΘΗΝΑ 2010

Θ. Βλαχογιάννη, Αθ. Βαλαβανίδης

**ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΚΑΙ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ**

**ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ,
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ,
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ
ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ**

Εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος
Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Αθηνών
Αθήνα 2010

Πρόλογος

Το εγχειρίδιο αυτό αναπτύχθηκε για τις ανάγκες του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης Ωκεανογραφίας και Διαχείρισης Θαλασσίου Περιβάλλοντος, σε μια προσπάθεια να καλυφθεί το κενό όσον αφορά βιβλία και συγγράμματα τοξικολογικών και οικοτοξικολογικών πειραμάτων με υδρόβιους οργανισμούς και των μεθοδολογικών τους λεπτομερειών.

Το εγχειρίδιο αυτό παρουσιάζει τις βασικές αρχές της τοξικολογίας και αποτελεί μια εισαγωγή στην επεξεργασία και εκτίμηση των τοξικολογικών δεδομένων. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στις μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται σε τοξικολογικές και οικοτοξικολογικές μελέτες. Περιγράφονται λεπτομερώς οι βασικές σύγχρονες δοκιμασίες τοξικότητας, όπως η δοκιμασία τοξικότητας *Microtox*, η δοκιμασία ανάπτυξιακής τοξικότητας φύκους, δοκιμασία τοξικότητας με *Daphnia magna* & *Artemia salina*, η χρήση βιοδεικτών οξειδωτικού stress σε τοξικολογικές μελέτες, κ.λπ. Τέλος, παρέχονται λεπτομερή παραδείγματα στατιστικής ανάλυσης αποτελεσμάτων, τα οποία είναι απαραίτητα για κάθε τοξικολογική μελέτη.

Αθήνα 2010

Θωμάς Βλαχογιάννη
Αθανάσιος Βαλαβανίδης

Περιεχόμενα

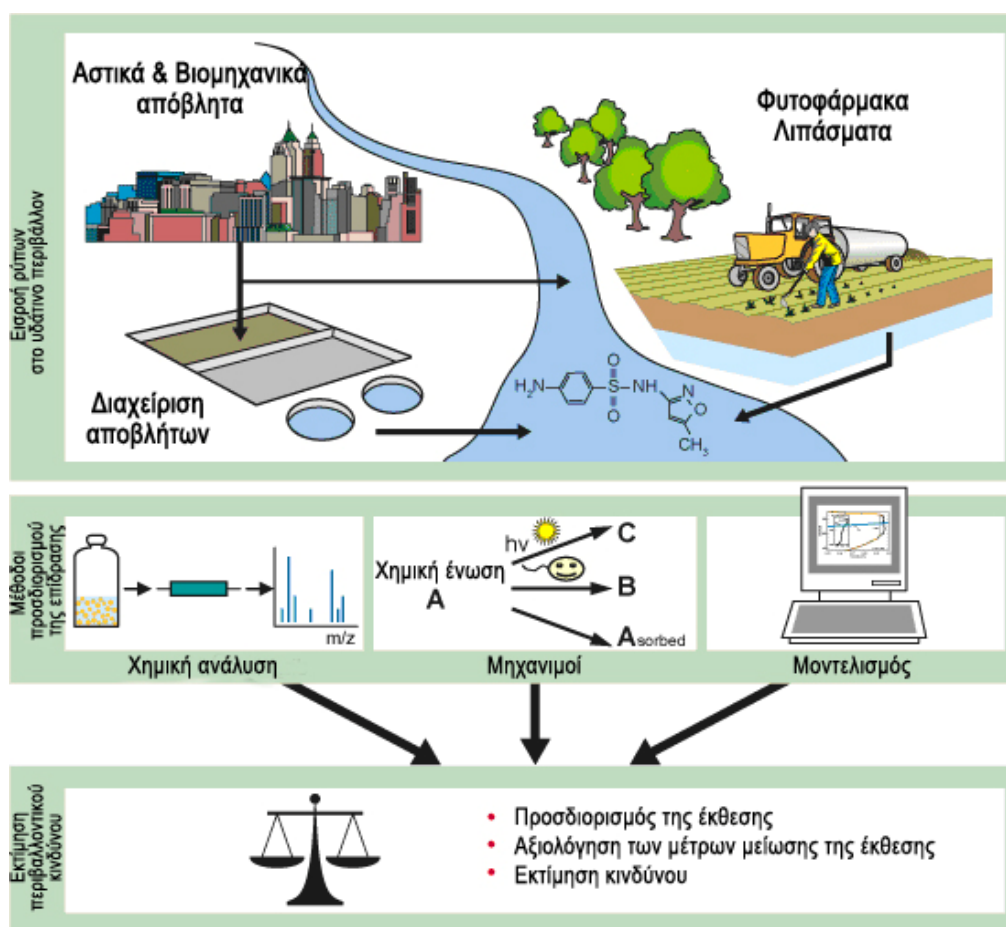
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ.....	1
1.1. Εισαγωγή στις έννοιες της περιβαλλοντικής τοξικολογίας και οικοτοξικολογίας	1
1.2. Βασικοί όροι και έννοιες της τοξικολογίας και της περιβαλλοντικής τοξικολογίας. ..	2
1.2.1. Βιοδιαθεσιμότητα και βιοσυσσωρευση	2
1.2.2. Η σχέση δόσης-αποτελέσματος για τις χημικές ουσίες	3
1.3. Οικοτοξικολογία και υδάτινα συστήματα	5
1.4. Βιβλιογραφία	6
ΒΑΣΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΡΥΠΩΝ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	7
2.1. Εισαγωγή.....	7
2.2. Είδη ρυπογόνων ουσιών στο υδάτινο περιβάλλον	8
2.3. Υδάτινα οικοσυστήματα και υδρόβιοι οργανισμοί	9
2.2. Οδοί πρόσληψης χημικών ουσιών και παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση τους στα υδάτινα συστήματα	12
2.3. Τοξικές επιδράσεις χημικών ουσιών στους υδρόβιους οργανισμούς	13
2.4. Βιβλιογραφία	15
Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΤΟΞΙΚΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΡΥΠΩΝ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	17
3.1. Εισαγωγή.....	17
3.2. Βιοδείκτες έκθεσης	19
3.3. Βιοδείκτες επίδρασης	20
3.4. Βιοδείκτες ευαισθησίας	21
3.5. Ερμηνεία των βιοδεικτών.....	22
3.6. Κριτήρια επιλογής βιοδεικτών	23
3.7. Βιβλιογραφία	24
ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	25
4.1. Εισαγωγή.....	25
4.2. Βασικές αρχές και παράμετροι που επηρεάζουν τις δοκιμασίες τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς	26
4.3. Υδρόβιοι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες τοξικότητας και οικοτοξικότητας	27
4.4. Μέθοδοι περιβαλλοντικής τοξικολογίας.....	29
4.5. Δοκιμασίες τοξικότητας.....	31
4.6. Βιβλιογραφία	32
ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	33
5.1. Εισαγωγή στις δοκιμασίες οξείας και χρόνιας τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς	33
5.2. Πρότυπες δοκιμασίες οξείας και χρόνιας τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς... ..	34
5.3. Οικοτοξικολογικές μελέτες πεδίου	36
5.4. Βιβλιογραφία	39
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ..	41
6.1. Έλεγχος τοξικότητας χημικών ουσιών σε <i>Artemia</i> (24-hours)	41
6.1.1. Χημικά αντιδραστήρια και οργανολογία	42
6.1.2. Προετοιμασία της <i>Artemia</i>	42
6.1.3. Χρήση της <i>Artemia</i> για τον έλεγχο τοξικότητας χημικών ουσιών	43
6.1.4. Βιβλιογραφία	46
6.2. Δοκιμασία οξείας τοξικότητας με <i>Daphnia Magna</i> (48-hours)	47
6.2.1. Χημικά αντιδραστήρια και οργανολογία	48
6.2.2. Προετοιμασία της <i>Daphnia Magna</i>	48
6.2.3. Χρήση της <i>Daphnia Magna</i> για τον έλεγχο της οξείας τοξικότητας χημικών ουσιών.....	49
6.2.4. Παράδειγμα διεξαγωγής τη δοκιμασίας οξείας τοξικότητας με <i>Daphnia Magna</i> (48-hours).....	50

6.2.5. Βιβλιογραφία	55
6.3. Πείραμα αναπτυξιακής τοξικότητας φύκους (Algal growth toxicity test, 96-hours) .	56
6.3.1. Χημικά αντιδραστήρια και οργανολογία	57
6.3.2. Προετοιμασία του φύκους	57
6.3.3. Η διαδικασία του εμβολιασμού	58
6.3.4. Έναρξη και τερματισμός της δοκιμασίας	59
6.3.5. Αποτελέσματα	59
6.3.6. Παράδειγμα διεξαγωγής τη δοκιμασίας αναπτυξιακής τοξικότητας φύκους (Algal growth toxicity test, 96-hours).	60
6.4. Δοκιμασία Microtox	68
6.4.1. Μεθοδολογία για τη δοκιμασία Microtox	68
6.4.2. Βιβλιογραφία	71
6.5. Δοκιμασία τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών (FET)	72
6.5.1. Παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας FET	74
6.5.2. Μεθοδολογία για τη δοκιμασία FET	75
6.5.3. Βιβλιογραφία	78
6.6. Δοκιμασία τοξικότητας σε μύδια (48-hours)	79
6.6.1. Μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της τιμής της θανατηφόρου συγκέντρωσης LC ₅₀ (Lethal Concentration) για 48h, των μυδιών	81
6.6.2. Βιβλιογραφία	83
6.7. Προσδιορισμός βιοδεικτών οξειδωτικού stress σε μύδια σε τοξικολογικές και οικοτοξικολογικές μελέτες	84
6.7.1. Η χρήση των μυδιών σε τοξικολογικές και οικοτοξικολογικές μελέτες	84
6.7.2. Βιοδείκτες οξειδωτικών βλαβών σε βιολογικά συστήματα	84
6.7.3. Βιοδείκτες λιπιδικής υπεροξειδωσης	85
6.7.3.1. Προσδιορισμός της μηλονικής διαλδεϋδης με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος. Αρχή της μεθόδου	85
6.7.3.2. Αντιδραστήρια	86
6.7.3.3. Προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων και πειραματική πορεία	86
6.7.4. Αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί σε αερόβιους οργανισμούς ως βιοδείκτες οξειδωτικού stress	88
6.7.5. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ένζυμου καταλάση (CAT). Αρχή μεθόδου	89
6.7.5.1. Αντιδραστήρια	90
6.7.5.2. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων και πειραματική πορεία	90
6.7.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ένζυμου υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD). Αρχή μεθόδου	91
6.7.6.1. Αντιδραστήρια	92
6.7.6.2. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων και πειραματική πορεία	92
6.7.7. Βιβλιογραφία	94
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	95
7.1. Ανάλυση Probit	95
7.1.1. Η ανάλυση Probit στην τοξικολογία	95
7.2. Μονόδρομη Ανάλυση της Διακύμανσης	98
7.2.1. Η μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης στην τοξικολογία	98
7.2.2. Παράδειγμα στατιστικής επεξεργασίας αποτελεσμάτων με τη μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης με τη χρήση του λογισμικού πακέτου SPSS.	101
7.3. Βιβλιογραφία	103

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

1.1. Εισαγωγή στις έννοιες της περιβαλλοντικής τοξικολογίας και οικοτοξικολογίας

Οι επιστημονικοί τομείς που αναπτύχθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες για την έρευνα των ποικίλων τοξικών επιδράσεων των χημικών ουσιών, καλύπτονται κάτω από τον όρο της επιστήμης της τοξικολογίας. Οι εφαρμογές των βασικών αρχών της τοξικολογίας και των πειραματικών μεθοδολογιών που μελετούσαν τις επιβλαβείς επιδράσεις των χημικών ρύπων, αλλά με έμφαση την περιβαλλοντική ρύπανση δημιούργησαν τις επιστήμες της περιβαλλοντικής τοξικολογίας και της οικοτοξικολογίας.



Σχήμα 1.1. Προσδιορισμός και μελέτη των επιδράσεων των χημικών ρύπων και εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου.

Η περιβαλλοντική τοξικολογία μελετά την έκθεση, τις τοξικοκινητικές και τοξικοδυναμικές μεταβολές, και τις αρνητικές επιπτώσεις των επικίνδυνων χημικών παραγόντων σε ζωντανούς οργανισμούς στα περιβαλλοντικά διαμερίσματα.

Η οικοτοξικολογία, που είναι νεότερη επιστήμη, μελετά τις επιδράσεις των τοξικών χημικών ουσιών στο οικοσύστημα και βασίζεται στην επιστημονική έρευνα που χρησιμοποιεί τόσο εργαστηριακές μεθόδους όσο και μελέτες πεδίου. Γενικά, η οικοτοξικολογία λαμβάνει υπόψη της, τις οικολογικές διαστάσεις και την πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βιολογικών οργανισμών και των οργανισμών με το φυσικό περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσονται. Ο προσδιορισμός των βιολογικών επιπτώσεων των τοξικών χημικών ενώσεων στους βιολογικούς οργανισμούς επιτυγχάνεται είτε με τη μελέτη συγκεκριμένων επιδράσεων σε συγκεκριμένα είδη (species specific responses), είτε με τη μελέτη επιδράσεων σε ανώτερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης σε μεμονωμένους οργανισμούς ή πληθυσμούς. Η οικοτοξικολογία βασίζεται στην επιστήμη της τοξικολογίας και στις βασικές αρχές των τοξικολογικών δοκιμασιών, με έμφαση όμως στο επίπεδο των πληθυσμών, κοινωνιών ή οικοσυστημάτων.

1.2. Βασικοί όροι και έννοιες της τοξικολογίας και της περιβαλλοντικής τοξικολογίας.

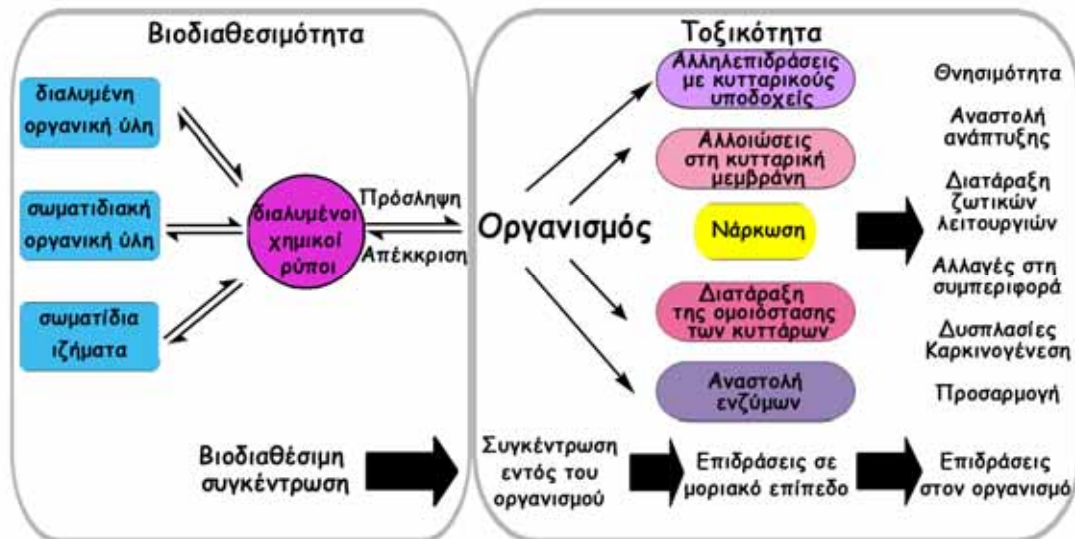
Βασικές έννοιες της περιβαλλοντικής τοξικολογίας, της επιστήμης που μελετά τις επιπτώσεις των χημικών ρύπων στους βιολογικούς οργανισμούς και τα οικοσυστήματα, στα οποία ζουν και αναπτύσσονται, αποτελούν η βιοδιαθεσιμότητα, η βιοσυσσώρευση, καθώς και οι θανατηφόροι (π.χ. LC₅₀) και υπο-θανατηφόροι (sub-lethal) δείκτες τοξικότητας, που αναφέρονται στη σχέση 'δόσης-αποτελέσματος' των χημικών ουσιών στον βιολογικούς οργανισμούς.

1.2.1. Βιοδιαθεσιμότητα και βιοσυσσώρευση

Ως βιοδιαθεσιμότητα (bioavailability) ορίζεται το κλάσμα της συνολικής συγκέντρωσης των χημικών ρύπων που προσλαμβάνεται από τους οργανισμούς. Δηλαδή η βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται στην ποσότητα του χημικού ρύπου που βρίσκεται στο περιβάλλον (νερό, φερτές ύλες, τροφή, κ.λπ) και μπορεί να εισέλθει με ποικίλους τρόπους στο εσωτερικό ενός οργανισμού.

Ορισμένοι χημικοί ρύποι όπως για παράδειγμα τα βαρέα μέταλλα, παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα για βιοσυσσώρευση, φαινόμενο κατά το οποίο οι ρύποι αυτοί έχουν την ιδιότητα να συσσωρεύονται αυξητικά στους διάφορους ιστούς των οργανισμών της τροφικής αλυσίδας. Η ποσότητα του χημικού ρύπου μπορεί να προσλαμβάνεται από τους οργανισμούς, είτε απευθείας από το περιβάλλον (βιοσυγκέντρωση), είτε από την τροφή (διαιτητική συσσώρευση).

Όσο περισσότερο βιοδιαθέσιμος είναι ένας χημικός ρύπος τόσο μεγαλύτερη είναι η βιοσυσσώρευση του και τόσο πιο σοβαρές οι τοξικές του επιδράσεις. Η βιοδιαθεσιμότητα επηρεάζεται από το είδος του χημικού ρύπου και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του περιβάλλοντος μέσου, το οποίο και ρυθμίζει την πρόσληψη του χημικού ρύπου.



Σχήμα 1.2. Σχηματική αναπαράσταση της βιοδιαθεσιμότητας των χημικών ρύπων και των επιπτώσεων τους στους υδρόβιους οργανισμούς.

1.2.2. Η σχέση δόσης-αποτελέσματος για τις χημικές ουσίες

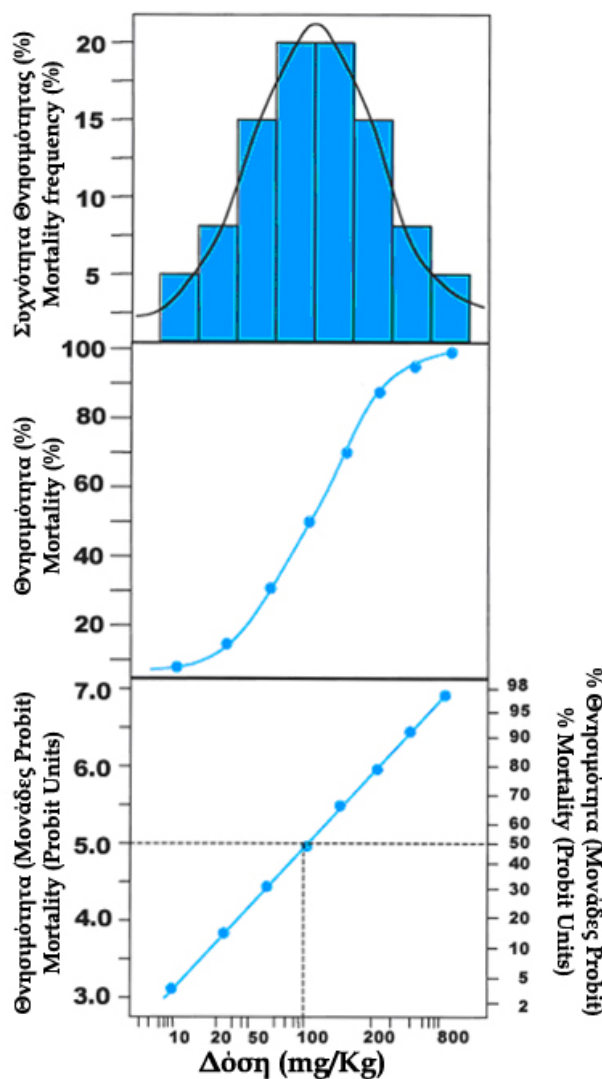
Οι χημικές ουσίες με την είσοδό τους στους βιολογικούς οργανισμούς δύνανται να προκαλέσουν βλάβες (θανατηφόρες, μη-θανατηφόρες) ανάλογες της ποσότητας της τοξικής ουσίας αλλά και του είδους της έκθεσης των βιολογικών οργανισμών σε αυτή. Η δόση μιας χημικής ουσίας εκφράζεται είτε ως προς το βάρος του βιολογικού οργανισμού (πειραματόζωου), είτε ως προς τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στον αέρα, νερό κ.λπ. Τα χαρακτηριστικά της έκθεσης σε κάποια χημική ουσία και το φάσμα των διαφορετικών επιδράσεων της στους

Βιολογικούς οργανισμούς, συσχετίζονται μεταξύ τους με την καμπύλη δόσης-αποτελέσματος (dose-response curve).

Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται μια τυπική καμπύλη δόσης-αποτελέσματος. Δύο είναι οι παράμετροι αυτής της καμπύλης που χρησιμοποιούνται για την ακριβή περιγραφή της:

(α) η συγκέντρωση ή η δόση στην οποία το 50% των πειραματόζων υφίσταται κάποια επίδραση ή πεθαίνει,

(β) η κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης που περνά από το μέσο σημείο (midpoint). Το μέσο σημείο αναφέρεται συνήθως ως LD₅₀, LC₅₀, EC₅₀ ή IC₅₀.



Σχήμα 1.3. Διάγραμμα των τριών τρόπων παρουσίασης τοξικολογικών δεδομένων: (α) θνησιμότητα (συχνότητα %), (β) % θνησιμότητα, (γ) θνησιμότητα σε μονάδες Probit.

- ↪ **LD₅₀** (mean lethal dose for 50% mortality): η δόση που προκαλεί το θάνατο του 50% των οργανισμών.
- ↪ **LC₅₀** (mean lethal concentration for 50% mortality): η συγκέντρωση που προκαλεί το θάνατο του 50% των οργανισμών.
- ↪ **EC₅₀** (Effect concentration 50%, concentration that causes an effect, not death, on 50% of tested organism): η συγκέντρωση πρόκλησης αποτελέσματος σε 50% των οργανισμών (για επιδράσεις πλην του θανάτου).
- ↪ **IC₅₀** (inhibitory concentration that reduces the normal response, growth rates of algae, bacteria and other organisms by 50%): η συγκέντρωση που αναστέλλει κατά 50% τη φυσιολογική απόκριση, τους ρυθμούς ανάπτυξης φυκών, βακτηρίων και άλλων οργανισμών.

1.3. Οικοτοξικολογία και υδάτινα συστήματα

Όσον αφορά τα υδάτινα συστήματα, η οικοτοξικολογία μελετά την έκταση και τις διαχρονικές τάσεις της ρύπανσης των υδάτινων συστημάτων, τις διεργασίες του οικοσυστήματος που επιδρούν στις συγκεντρώσεις, την κατάληξη και διασπορά των χημικών ρύπων, τις περίπλοκες οδούς μέσω των οποίων εκτίθενται οι υδρόβιοι οργανισμοί στους ρύπους αυτούς και τις δυσμενείς επιδράσεις των ρύπων, ως μια αλληλουχία αντιδράσεων σε όλα τα επίπεδα της βιολογικής οργάνωσης και των τροφικών αλυσίδων.

Ωστόσο, ο διαχωρισμός του υδάτινου και χερσαίου περιβάλλοντος στην οικοτοξικολογία είναι συχνά αδύνατος, αφού οι ρυπογόνες ουσίες μεταφέρονται από το ένα σύστημα στο άλλο. Για παράδειγμα, ρύποι του χερσαίου περιβάλλοντος δύνανται να μεταφερθούν στα υδάτινα συστήματα μέσω των επιφανειακών απορροών, οδηγώντας σε έκθεση και επιδράσεις σε οργανισμούς οι οποίοι διαβιούν σε υπολογίσιμες αποστάσεις μακριά από την πηγή ρύπανσης.

1.4. Βιβλιογραφία

1. Truhaut R: Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1977, **1**: 151-173.
2. Rand GM, Petrocelli SR, Fundamentals of aquatic toxicology. New York, Hemisphere Publishing Corporation, 1985: 666-668.
3. Marquis JA, Karger E. A Guide to General Toxicology. New York, 1989: 179-189.
4. Cockerham LG, Shane BS, eds. Basic Environmental Toxicology. CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.
5. Forbes VE, Forbes TL, Ecotoxicology in Theory and Practice. Chapman and Hall, London, 1994.
6. Hoffman DJ, Ratter BA, Burton GA Jr, Cairns J. Handbook of Ecotoxicology. Boca Raton, FL: Lewis/CRC, 1995.
7. Landis WG, Yu M-H. Introduction to Environmental Toxicology. Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1995.
8. Luoma SN. The developing framework of marine ecotoxicology: Pollutants as a variable in marine ecosystems. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1996, **200**: 29-55.
9. Hughes WW. Essentials of Environmental Toxicology. Taylor & Francis, London, 1996.
10. Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB. Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis, London, 1997.
11. Shaw IC, Chadwick J. Principles of Environmental Toxicology. Taylor & Francis, London, 1999.
12. Casarett LJ, Klaassen CD, Doull J. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill Professional, 2001.
13. Chapman PM. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Mar Pollut Bull*, 2002, **44**: 7-15.
14. Eggen, RIL, Behra R, Escher BI, Schweigert N, Burkhardt-Holm P. Challenges in ecotoxicology. *Environ Sci Technol*, 2004, **38**: 58A-64A.
15. Βαλαβανίδης Α, Βλαχογιάννη Θ. Περιβαλλοντική Χημεία και Οικοτοξικολογία. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2008.
16. Barile FA: Principles of Toxicology Testing. CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
17. Σκούλλος Μ. Χημική Ωκεανογραφία, μια εισαγωγή στη χημεία του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Εκδόσεις Συμμετρία, 2008.

ΒΑΣΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΡΥΠΩΝ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

2.1. Εισαγωγή

Το νερό, καταλαμβάνει το 70% της επιφάνειας της Γης και αποτελεί τον πιο πολύτιμο φυσικό πόρο του πλανήτη. Το νερό και η ηλιακή ακτινοβολία αποτελούν ακρογωνιαίους λίθους της ύπαρξης ζωής στη Γη. Παρόλο, που είναι ευρύτατα διαδεδομένη η αξία του νερού και των υδάτινων συστημάτων (ωκεανοί, θάλασσες, λίμνες, ποταμοί, χείμαρροι, λιμνοθάλασσες, παράκτιες περιοχές, υγρότοποι, υπόγεια νερά) για τους βιολογικούς οργανισμούς και τα οικοσυστήματα, καθημερινά πολυάριθμοι οργανισμοί πεθαίνουν και είδη εξαφανίζονται, ενώ η διαθεσιμότητα καθαρού νερού μειώνεται, ως αποτελέσματα της ρύπανσης του υδάτινου περιβάλλοντος.

Ως ρύπανση του υδάτινου περιβάλλοντος ορίζεται η φυσική ή χημική μεταβολή του ύδατος, που προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις στους βιολογικούς οργανισμούς. Οι κυριότερες πηγές ρύπανσης συνδέονται άμεσα με ανθρώπινες δραστηριότητες, όπως είναι οι γεωργικές καλλιέργειες, η βιομηχανία, οι θαλάσσιες μεταφορές, η παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας (θερμική αλλοίωση), τα αστικά λύματα, τα βιομηχανικά απόβλητα και άλλες πηγές ρύπανσης.

Οι βασικότερες επιδράσεις της ρύπανσης στα υδάτινα συστήματα περιλαμβάνουν δυσμενείς επιπτώσεις στην ποιότητα του ύδατος, την καταστροφή του φυσικού περιβάλλοντος (habitat) των υδρόβιων οργανισμών, οξείες και υπο-οξείες τοξικές επιδράσεις για την υγεία τους και κατ' επέκταση στην υγεία των ανθρώπων.



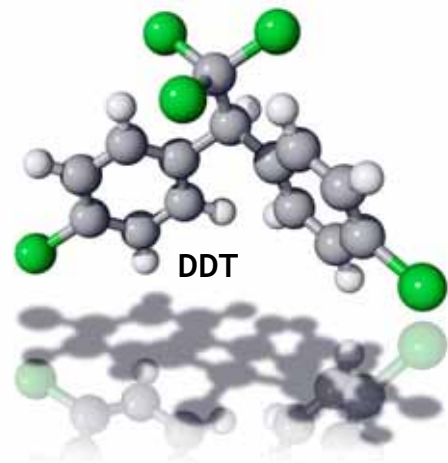
2.2. Είδη ρυπογόνων ουσιών στο υδάτινο περιβάλλον

Τα είδη των ρυπογόνων ουσιών που εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον καθορίζονται από το είδος των ανθρώπινων δραστηριοτήτων και το είδος των ρυπαντών. Τα βασικότερα είδη χημικών ρύπων είναι τα εξής:

➤ **Τα βαρέα μέταλλα και μεταλλοειδή:** Τα μέταλλα αποτελούν φυσικά συστατικά του θαλάσσιου περιβάλλοντος, αν και εισάγονται σε αυτό και από ανθρωπογενείς πηγές. Περισσότερα από 40 στοιχεία χαρακτηρίζονται ως μέταλλα. Πολλά από αυτά, είναι απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία των οργανισμών και κατ' επέκταση για τη διατήρηση της ισορροπίας των οικοσυστημάτων ενώ άλλα είναι ιδιαίτερος τοξικά. Μακροθρεπτικά στοιχεία όπως ο σίδηρος, το μαγνήσιο, το ασβέστιο, το κάλιο και το νάτριο, είναι απαραίτητα για την επιβίωση των οργανισμών, αλλά καθίστανται τοξικά σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ιχνοστοιχεία όπως το χρώμιο, το κοβάλτιο, ο χαλκός, το μαγγάνιο, το νικέλιο, το σελήνιο και ο ψευδάργυρος, αποτελούν βασικά δομικά συστατικά σημαντικών βιολογικών μορίων (ένζυμα), τα οποία όμως σε υψηλές συγκεντρώσεις επιφέρουν σοβαρές τοξικές επιδράσεις στους βιολογικούς οργανισμούς και τα οικοσυστήματα. Άλλα μέταλλα όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο και ο υδράργυρος, είναι τοξικά σε οποιαδήποτε συγκέντρωση.

➤ **Ανόργανες ενώσεις:** Από τις ανόργανες ενώσεις ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αμμωνιακά, τα φωσφορικά και τα νιτρικά άλατα, τα οποία είναι τα κυριότερα είδη λιπασμάτων που χρησιμοποιούνται στη γεωργία και τα οποία ευθύνονται για σημαντικά προβλήματα ρύπανσης των υδάτων, με αποτέλεσμα αρνητικές επιπτώσεις (θάνατος, φαινόμενα ευτροφισμού, κ.λπ) στα υδάτινα οικοσυστήματα.

➤ **Οργανικές ενώσεις:** Υπάρχουν πολλά είδη οργανικών ενώσεων με δυσμενείς επιδράσεις στα υδάτινα οικοσυστήματα και μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται πολυχλωριωμένα διφαινύλια (polychlorinated biphenyls, PCB's), διοξίνες (dioxins), πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια (PCDFs) και πολυχλωριωμένες φαινόλες, φυτοφάρμακα (Alachlor, Atrazine), παρασιτοκτόνα (DDT, Aldrin, Dieldrin, Heptachlor, κλπ) και



πετρελαιοειδή τα οποία είναι μίγμα άκυκλων, κυκλικών και πολυκυκλικών υδρογονανθράκων (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs).

➤ **Ραδιενεργά υλικά:** Τα ραδιενεργά υλικά εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον είτε από φυσικές πηγές, όπως από πετρώματα, είτε από ανθρωπογενείς πηγές, όπως βιομηχανικές ή ιατρικές εφαρμογές. Η σοβαρότητα των δυσμενών επιδράσεων της ραδιενέργειας στους υδρόβιους οργανισμούς, έχει καταστήσει απαραίτητη τη συστηματική παρακολούθηση της ραδιενεργούς περιβαλλοντικής ρύπανσης.

➤ **Παθογόνοι μικροοργανισμοί:** Κύρια πηγή παθογόνων παραγόντων στο υδάτινο περιβάλλον αποτελούν τα αστικά λύματα, τα οποία δύνανται να περιέχουν ιούς, βακτήρια ή πρωτόζωα. Οι κυριότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί που περιέχονται στα αστικά λύματα και εισέρχονται στα υδάτινα συστήματα, είναι οι μικροοργανισμοί *Salmonella spp*, *Escherichia Coli*, *Streptococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, ο μύκητας *Candida* και ιοί όπως της ηπατίτιδας, της πολιομυελίτιδας και της γρίπης.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί, ότι εκτός από την ρύπανση που οφείλεται στα προαναφερθέντα είδη ρυπογόνων ουσιών, υπάρχει και η βιολογική ρύπανση (biological invasion), η οποία αναφέρεται στην εισαγωγή/εισβολή οργανισμών που είναι ξένοι για συγκεκριμένο οικοσύστημα. Στα υδάτινα συστήματα έχουν παρατηρηθεί αρκετές περιπτώσεις βιολογικής ρύπανσης και έχουν διεξαχθεί μελέτες για τις δυσμενείς επιπτώσεις της.

2.3. Υδάτινα οικοσυστήματα και υδρόβιοι οργανισμοί

Οι υδρόβιοι οργανισμοί αποτελούν ακρογωνιαίο παράγοντα της βιοποικιλότητας του πλανήτη μας. Με βάση την ικανότητα τους να διαβιούν σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας, διακρίνονται σε οργανισμούς των αλμυρών νερών (θάλασσα), οργανισμούς των υφαλμυρών νερών και οργανισμούς των γλυκών νερών (λίμνες, ποτάμια).

Η βασικότερη διάκριση τους σχετίζεται με την κατανομή τους στο υδάτινο περιβάλλον και με τον τρόπο ζωής τους και έτσι διαχωρίζονται στο πλαγκτόν (σύνολο μικροσκοπικών οργανισμών που ζουν αιωρούμενα στο νερό, φυτοπλαγκτόν και ζωοπλαγκτόν), στο νευστόν (υδρόβιοι οργανισμοί που διαβιούν στην επιφανειακή στοιβάδα των υδάτινων εκτάσεων), στο βένθος (υδρόβιοι

οργανισμοί που διαβιούν πάνω ή μέσα στον πυθμένα των υδάτινων εκτάσεων ή εξαρτώνται άμεσα από αυτόν) και στο νηκτόν (υδρόβιοι οργανισμοί που κινούνται με ιδιαίτερες ικανότητες κολύμβησης εντός των υδάτινων εκτάσεων).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, τόσο από οικολογική όσο και από οικονομική άποψη, παρουσιάζουν τα βενθικά οικοσυστήματα τα οποία απαντώνται σε όλες τις θάλασσες του κόσμου. Τα βενθικά οικοσυστήματα, ειδικά αυτά που γειτνιάζουν με την παράκτια ζώνη, είναι εκείνα τα οποία δέχονται άμεσα την επίδραση ποικίλων ανθρωπογενών δραστηριοτήτων, με αποτέλεσμα συχνά τα οικοσυστήματα αυτά, να βρίσκονται σε καθεστώς μόνιμης ή πρόσκαιρης περιβαλλοντικής υποβάθμισης ή περιβαλλοντικού stress, γεγονός που έχει αρνητική αντανάκλαση και στους υπόλοιπους πληθυσμούς των θαλάσσιων οικοσυστημάτων.

Με βάση το κριτήριο της κύριας Ταξινόμικης Ομάδας (Βασίλειο) στο οποίο ανήκουν, οι βενθικοί οργανισμοί διακρίνονται στο:

- **Φυτοβένθος:** (α) *Υποβασίλειο Θαλόφυτα:* χλωροφύκη, φαιοφύκη, ερυθροφύκη, βενθικά μακροφύκη, (β) *Υποβασίλειο Αγγειόσπερμα:* θαλάσσια φανερόγαμα ή γρασίδια, βενθικά μακρόφυτα,
- **Ζωοβένθος:** το οποίο περιλαμβάνει ζωικούς οργανισμούς, που ανήκουν στη συντριπτική τους πλειοψηφία (>95%) στα *Ασπόνδυλα* (σπόγγοι, κνιδόζωα, πλατυέλμινθες, νεμερτίνοι, νηματώδεις, πολύχαιτοι, σωληνοειδή, εχινώδη, πωγωνοφόρα, βρυόζωα, φορωνοειδή, μαλάκια, καρκινοειδή, εχινόδερμα, εντερόπνευστα, ασκίδια, κεφαλοχορδωτά) και λίγα στα *Σπονδυλωτά* (ορισμένα είδη ψαριών, παραβενθικά είδη).

Με βάση το κριτήριο του μεγέθους τους, κυρίως για τους ζωοβενθικούς οργανισμούς, διαχωρίζονται στο *μικροβένθος* (βακτήρια, πρωτόζωα), *μειοβένθος* (νηματώδεις, κωπήποδα, ορισμένα είδη μαλακίων, πολυχαίτων και καρκινοειδών), *μακροβένθος* (τα περισσότερα είδη ασπόνδυλων) και *μεγαβένθος* (μεγαλόσωμα είδη ασπόνδυλων και παραβενθικά ψάρια), ενώ με βάση το κριτήριο του τρόπου λήψεως τροφής διαχωρίζονται σε αιωρηματοφάγους (suspension feeders), ιζηματοφάγους (deposit feeders), φυτοφάγους (grazers), σαρκοφάγους (carnivorous) και σαπρονεκροφάγους (scavengers).

Οι θαλάσσιοι οργανισμοί αλληλεπιδρούν και συνδέονται μεταξύ τους με πολλούς και ποικίλους τρόπους, με αποτέλεσμα η ρύπανση του υδάτινου περιβάλλοντος να επηρεάζει άμεσα την βιοποικιλότητα και την εξέλιξη των

θαλάσσιων οικοσυστημάτων. Όπως ήδη αναφέρθηκε, από τους θαλάσσιους οργανισμούς αυτοί που υφίστανται πιο έντονα τις επιδράσεις της ρύπανσης είναι οι βενθικοί οργανισμοί, με αποτέλεσμα να καθίσταται αναγκαία η μελέτη και η παρακολούθησή τους. Από τους βενθικούς οργανισμούς, τα δίθυρα μαλάκια έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό, αφενός μεν γιατί είναι διηθητές οργανισμοί και έρχονται σε επαφή με μεγάλες ποσότητες χημικών ρύπων και αφετέρου, γιατί δύνανται να αναπτύσσονται σε περιοχές με υψηλά επίπεδα ρύπανσης.



Σχήμα 2.1. Τροφικό πλέγμα (food web) ωκεάνιου οικοσυστήματος.

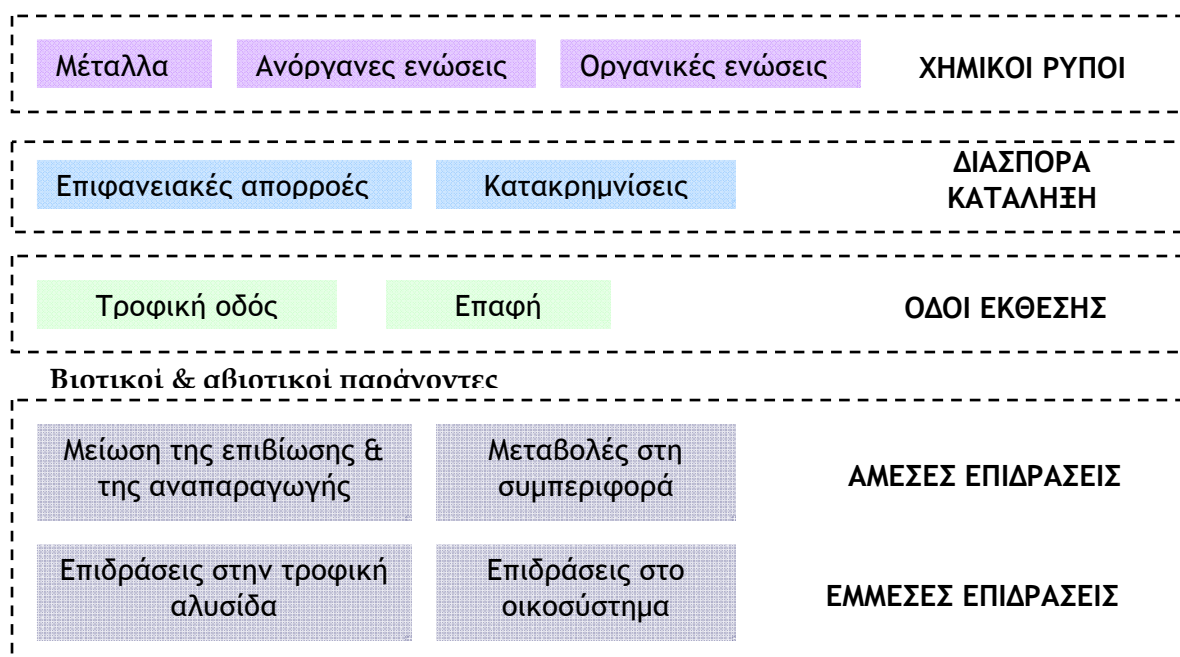
2.2. Οδοί πρόσληψης χημικών ουσιών και παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση τους στα υδάτινα συστήματα

Οι χημικοί ρύποι προσλαμβάνονται από τους υδρόβιους οργανισμούς είτε με την τροφή, μέσω του πεπτικού συστήματος, είτε από το νερό, σε διαλυμένη ή αιωρούμενη μορφή, μέσω των βραγχίων τους. Οι χημικοί ρύποι, μετά την εισαγωγή τους στους υδρόβιους οργανισμούς, δύνανται να βιοσυσσωρευθούν, να απεκκριθούν ή να υποστούν μεταβολισμό από αυτούς.

Οι χημικοί ρύποι και οι μεταβολίτες τους απαντώνται στα υδάτινα συστήματα σε διάφορες μορφές, που καθορίζονται είτε από τη χημική τους δομή και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, είτε από αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες.

Οι κυριότεροι αβιοτικοί παράγοντες είναι οι φυσικοχημικές ιδιότητες του ύδατος όπως το pH, η θερμοκρασία, η αλατότητα, οι βαθμοί σκληρότητας, το διαλυμένο οξυγόνο, η παρουσία άλλων ουσιών (συνεργική ή ανταγωνιστική δράση), η ακτινοβολία και άλλοι.

Οι κυριότεροι βιοτικοί παράγοντες συνίστανται σε χαρακτηριστικά των οργανισμών, όπως είναι το είδος, ο κύκλος ζωής τους, η ηλικία, το φύλο, η φυσική και η μεταβολική τους κατάσταση (εποχικές αλλαγές), η γενική φυσιολογική συμπεριφορά των οργανισμών και η κατάσταση του ανοσολογικού συστήματος του οργανισμού (προϋπάρχουσα κατάσταση stress).



Σχήμα 2.2. Έκθεση υδρόβιων οργανισμών σε χημικούς ρύπους και τελικές επιδράσεις της ρύπανσης στα υδάτινα οικοσυστήματα.

2.3. Τοξικές επιδράσεις χημικών ουσιών στους υδρόβιους οργανισμούς

Οι επιδράσεις των χημικών ρύπων στους υδρόβιους οργανισμούς εκδηλώνονται ως μία αλυσιδωτή αλληλουχία βιοχημικών αλλοιώσεων, φυσιολογικών επιπτώσεων και αλλαγών στη δυναμική των πληθυσμών των διαφόρων ειδών. Καθώς αυξάνουν οι συγκεντρώσεις των χημικών ρύπων, στις οποίες εκτίθενται οι οργανισμοί, προκαλούνται δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία τους, που ποικίλλουν μεταξύ σοβαρών βιοχημικών αλλοιώσεων και θνησιμότητας.



Οι βασικότερες επιδράσεις της ρύπανσης πραγματοποιούνται αρχικά σε χαμηλότερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης, όπως για παράδειγμα σε μοριακό επίπεδο (βασικά βιομόρια), με άμεσο αποτέλεσμα την διατάραξη ζωτικών λειτουργιών (μεταβολισμός, ορμονικό, ανοσολογικό ή αναπαραγωγικό σύστημα) των υδρόβιων οργανισμών.



Σχήμα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας επιδράσεων της ρύπανσης στα βιολογικά συστήματα, οι οποίες ξεκινούν με βλάβες στα βασικά βιομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA) και στα κυτταρικά συστατικά (λιπιδική μεμβράνη, ένζυμα, κ.λπ) και τελικά οδηγούν σε τελικές δυσμενείς επιδράσεις στο οικοσύστημα.

Στη συνέχεια, εάν δεν αντιμετωπιστούν οι αρνητικές επιπτώσεις της ρύπανσης στα χαμηλότερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης, παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις σε ανώτερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης (ιστοί, όργανα, οργανισμοί), με τελικό αποδέκτη των επιδράσεων αυτών το οικοσύστημα. Οι μεταβολές που παρατηρούνται σε κυτταρικές ή βιοχημικές διεργασίες, δομές και λειτουργίες των οργανισμών, και κατ' επέκταση μεταβολές στο επίπεδο δυναμικής των πληθυσμών και λειτουργίας του οικοσυστήματος, δύνανται να εκτιμηθούν με τη χρήση κάποιου μετρήσιμου μεγέθους/δείκτη, που καλείται βιοδείκτης (biomarker).

Οι υδρόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για την αντιμετώπιση των επιδράσεων των ξеноβιοτικών ουσιών, όπως είναι η απέκκριση, η απομόνωση τους από τα κυτταρικά συστατικά (φλεγμονές, λυσοσώματα, κοκκία) και η εξουδετέρωση της οξειδωτικής ανισορροπίας με τη βοήθεια των αντιοξειδωτικών ενζύμων (υπεροξειδάση της γλυουταθειόνης, καταλάση, υπεροξειδική δισμουτάση, κα). Στην περίπτωση όμως, που δεν καταστούν επαρκείς οι μηχανισμοί αυτοί, τότε οι οργανισμοί δύνανται να υποστούν δυσμενείς επιδράσεις και διαταραχές στις φυσιολογικές τους λειτουργίες, όπως περιορισμός στην ανάπτυξη, δυσλειτουργία στην αναπνοή, διατροφικές δυσκολίες, ανωμαλίες στην αναπαραγωγή, στις καρδιακές λειτουργίες, στις νευρικές λειτουργίες, στις ανοσολογικές, στις ενδοκρινολογικές λειτουργίες, καθώς επίσης και μεταβολές στη συμπεριφορά τους.

Ο παράγοντας εκείνος που είναι καθοριστικός, για την έκταση των τοξικών επιδράσεων τόσο σε μοριακό, όσο και σε ανώτερο επίπεδο βιολογικής οργάνωσης είναι η βιοδιαθεσιμότητα των χημικών ρύπων. Η βιοδιαθεσιμότητα των χημικών ρύπων είναι κρίσιμη παράμετρος, όσον αφορά την πρόσληψη τους και την τελική συγκέντρωση τους στους υδρόβιους οργανισμούς και κατ' επέκταση καθορίζει την τοξικότητα τους. Η βιοδιαθεσιμότητα των χημικών ρύπων σε συνδυασμό με την πρόσληψη και τη βιοσυσσώρευσή τους δύνανται να προκαλέσουν διάφορες δυσμενείς επιπτώσεις, τόσο σε βασικά βιομόρια όσο και σε διάφορα όργανα και επίπεδα βιολογικής οργάνωσης διαφόρων οργανισμών.

2.4. Βιβλιογραφία

1. Depledge MH, Rainbow PS. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates: a mini review. *Comp Biochem Physiol*, 1990, **97**: 1-7.
2. Kieffer F. *Metals and Their Compounds in the Environment, Occurrence, Analysis and Biological Relevance*. Verlag Chemie, New York, 1991: 481-490.
3. Walker CH, Livingstone DR. *Persistent pollutants in marine ecosystems*. Pergamon Press Ltd, Oxford, 1992.
4. Jonnalagadda SB, Prasada Rao PVV. Toxicity, Bioavailability and metal speciation. *Comp Biochem Physiol*, 1993, **106C (3)**: 585-595.
5. Depledge MH, Agard A, Gyorkos P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. *Mar Pollut Bull*, 1995, **31**: 19-27.
6. Σκούλλος Μ. Χημική Ωκεανογραφία. Μια εισαγωγή στη χημεία του θαλάσσιου περιβάλλοντος. 3^η εκδ, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Αθηνών, Αθήνα, 1997.
7. Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis, London, 1997.
8. Witters HE. Chemical Speciation Dynamics and Toxicity Assessment in Aquatic Systems. *Ecot Environ Saf*, 1998, **41**: 90-95.
9. Rouse JD, Bishop CA, Struger J. Nitrogen pollution: an assessment of its threat to amphibian survival. *EHP*, 1999, **107**: 799-803.
10. Shaw IC, Chadwick J. *Principles of Environmental Toxicology*. Taylor & Francis, London, 1999.
11. Grillo V, Parsons ECM, Shrimpton JH. A review of sewage pollution and cetaceans: a Scottish perspective. 53rd Meeting of the International Whaling Commission, London, 3-16 July, 2001.
12. Casarett LJ, Klaassen CD, Doull J. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, McGraw-Hill Professional, 2001.
13. Strand P, Howard BJ, Aarkrog A, Balonov M, Tsaturov Y, Bewers J, Salo MA, Sickel M, Bergman R, Rissanen K. Radioactive contamination in the Arctic—sources, dose assessment and potential risks. *J Environ Radioact*, 2002, **60 (1-2)**: 5-21.

14. Fleegeer JW, Carman KR, Roger NM. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci Total Environ*, 2003, **317**: 207-233.
15. Driscoll C, Whitall D, Aber J, Boyer E, Castro M, et al. Nitrogen pollution: sources and consequences in the US northeast. *Environment*, 2003, **45**: 9-22.
16. Braune BM, Outridge PM, Fisk AT, Muir DCG, Helm PA, Hobbs K, Hoekstra PF, Kuzyk ZA, Kwan M, Letcher RJ, et al. Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: An overview of spatial and temporal trends. *Sci Total Environ*, 2005, **351-352(1)**:4-56.
17. Boundouresque CF, Verlaque VM. Biological pollution in the Mediterranean Sea: invasive versus introduced macrophytes. *Mar Pollut Bull*, 2002, **44**: 32-38.
18. Βαλαβανίδης Α. Βασικές Αρχές Περιβαλλοντικής Χημείας, Οικοτοξικολογίας και Εκτίμησης Οικολογικού Κινδύνου. Εκδοτική Εταιρία Σύγχρονα Θέματα, Αθήνα, 2002.
19. Elliot M. Biological pollutants and biological pollution - an increasing cause for concern. *Mar Pollut Bull*, 2003, **46**: 275-280.
20. Fleegeer JW, Carman KR, Nisbet RM. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci Total Environ*, 2003, **317**: 207-233.
21. Oost R, Beyer J, Vermeulen N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2003, **13**: 57-149.
22. Scott GR, Sloman KA. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicator of toxicity. *Aquat Toxicol*, 2004, **68**: 368-392.
23. Valavanidis A, Vlachogianni Th, Dassenakis M, Scoullas M. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metal's pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar Pollut Bull*, 2007, **54**: 1361-1371.
24. Barnthouse LW, Munns WR, Sorensen MT. Population-Level Ecological Risk Assessment. CRC Press - Taylor & Francis, Boca Raton, London, 2008: 296-297.

Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΤΟΞΙΚΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΡΥΠΩΝ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

3.1. Εισαγωγή

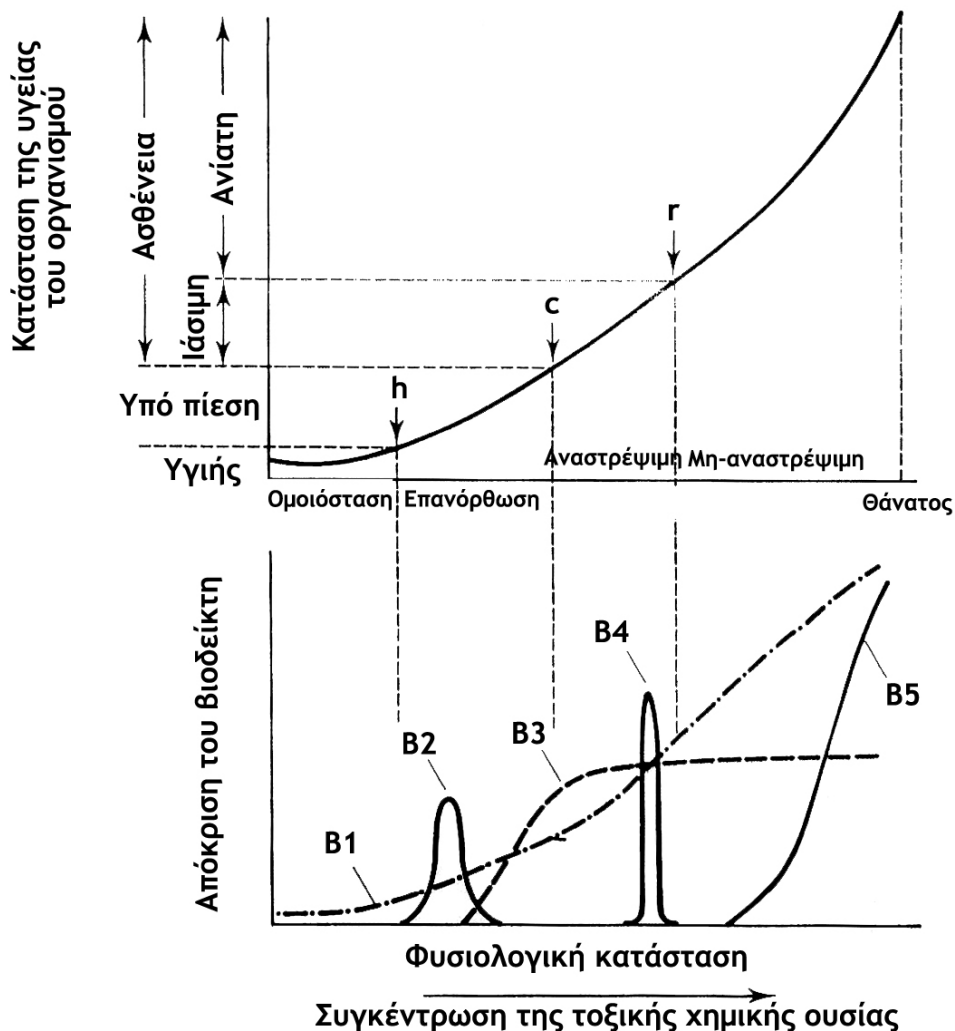
Η μεγαλύτερη πρόκληση της περιβαλλοντικής τοξικολογίας είναι η συσχέτιση της παρουσίας μιας χημικής ουσίας στο περιβάλλον με κάποια αξιόπιστη εκτίμηση κινδύνου για κάποιους βιολογικούς οργανισμούς. Η έκθεση των βιολογικών οργανισμών σε κάποιο ρυπογόνο παράγοντα δύναται να οδηγήσει σε δυσμενείς επιδράσεις για την υγεία τους, επιδράσεις που πραγματοποιούνται αρχικά σε χαμηλότερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης (βλάβες σε κυτταρικά συστατικά) και στη συνέχεια αυτές οι επιδράσεις δύνανται να επεκταθούν σε ανώτερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης (βλάβες στο κύτταρο, σε ιστό ή όργανο).

Στο παρελθόν η εκτίμηση του οικολογικού κινδύνου πραγματοποιούνταν με προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ρυπογόνου παράγοντα σε δείγματα κάποιου περιβαλλοντικού μέσου (νερό, αέρας, έδαφος) σε συνδυασμό με τις τοξικές επιδράσεις του παράγοντα αυτού σε κάποιο είδος που βρίσκεται σε επαφή με το μέσο αυτό. Παρόλο που αυτού του είδους οι μελέτες οδηγούν στη συλλογή χρήσιμων δεδομένων, υπόκεινται σε αρκετούς περιορισμούς. Ο προσδιορισμός μιας χημικής ουσίας σε κάποιο περιβαλλοντικό μέσο δεν είναι μια απλή διαδικασία, αφού πολλές φορές απαιτείται εκτενής καθαρισμός του δείγματος, οδηγώντας σε υψηλά κόστη. Η μεθοδολογική αυτή προσέγγιση δεν μπορεί να προσδιορίσει τη διαθεσιμότητα των χημικών ουσιών, που βρίσκονται σε κάποιο περιβαλλοντικό μέσο, στους οργανισμούς ή τη βιοδιαθεσιμότητα τους. Η βιοδιαθεσιμότητα εξαρτάται από παράγοντες όπως είναι το είδος της χημική ουσίας, το είδος του οργανισμού και το περιβαλλοντικό μέσο.

Μια άλλη μεθοδολογική προσέγγιση είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας σε κάποιο ιστό του βιολογικού οργανισμού, αλλά και αυτή η προσέγγιση συχνά συνδέεται με πολλές αναλυτικές δυσκολίες και υψηλά κόστη και επιπλέον δεν παρέχει πληροφορίες για τις τοξικές επιδράσεις της χημικής ουσίας στον οργανισμό. Η μεθοδολογική προσέγγιση που χρησιμοποιεί βιοδείκτες

ξεπερνά πολλές από τις παραπάνω δυσκολίες αφού πραγματοποιεί απευθείας μέτρηση των τοξικών επιδράσεων σε κάποιο οργανισμό.

Ως βιοδείκτης ορίζεται κάποιο μετρήσιμο μέγεθος/δείκτης σε βιολογικό σύστημα ή δείγμα, που οφείλεται σε μεταβολές κυτταρικών ή βιοχημικών διεργασιών, δομών, λειτουργιών και συμπεριφορών των οργανισμών, που προκαλούνται από κάποιο ξеноβιοτικό παράγοντα. Οι βιοδείκτες διακρίνονται στους βιοδείκτες έκθεσης, επίδρασης και δεκτικότητας/ευαισθησίας. Η επιλογή των κατάλληλων βιοδεικτών για την εκτίμηση του οικολογικού κινδύνου βασίζεται στο μηχανισμό απόκρισης του βιοδείκτη υπό την επίδραση κάποιας χημικής ουσίας.



Σχήμα 3.1. Η προσέγγιση της χρήσης βιοδεικτών για την εκτίμηση περιβαλλοντικού κινδύνου. Γραφική αναπαράσταση της σχέσης μεταξύ έκθεσης σε κάποιο ρύπο και της κατάστασης της υγείας του και της απόκρισης του βιοδείκτη.

Πίνακας 3.1. Ορισμένοι βιοδείκτες κατά σειρά μείωσης της εξειδίκευσης τους σε ορισμένους ρύπους. (OPs: οργανοφωσφορικές ενώσεις, OCs: οργανο-χλωριωμένες ενώσεις).

Βιοδείκτης	Ρύπος	Σχολιασμός
Αναστολή της ALAD	Pb	Αρκετά αξιόπιστη μέθοδος για να αντικαταστήσει τις χημικές αναλύσεις.
Αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονών	Cd	Πιο δύσκολος προσδιορισμός από ότι οι μετρήσεις της συγκέντρωσης του Cd.
Αναστολή της AChE	Καρβαμίδια, OPs	Αξιόπιστη και εύχρηστη μέθοδος.
Κατανομή πορφυρινών Κατανομή ρετινολών	Ορισμένες OCs OCs	Καλά ανεπτυγμένη μέθοδος. Οι λόγοι είναι πιο αξιόπιστοι από ότι οι απόλυτες τιμές.
Προϊόντα οξειδωτικής προσβολής του DNA	Μέταλλα, PAHs	Καθιερωμένη μέθοδος.
Πρωτεΐνες stress	Μέταλλα, OCs	Έχει μελετηθεί μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών stress.

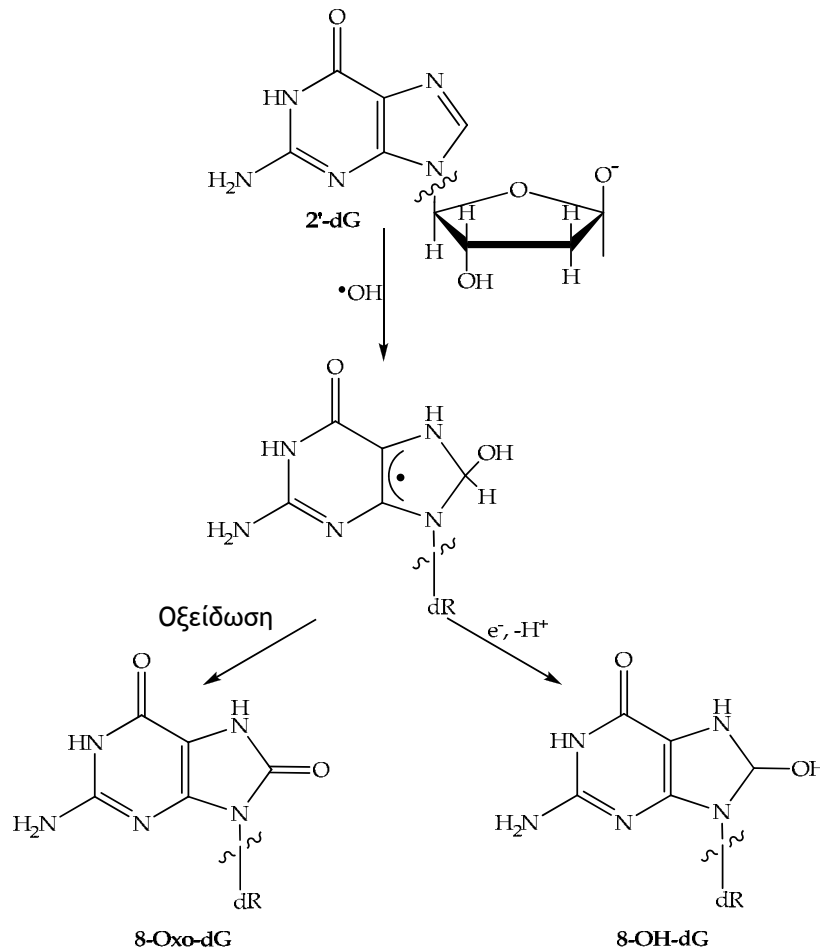
3.2. Βιοδείκτες έκθεσης

Βιοδείκτης έκθεσης (biomarker of exposure) καλείται μια χημική ουσία (ξеноβιοτική), ο μεταβολίτης της ή το προϊόν αλληλεπίδρασης μεταξύ της χημικής ουσίας και κάποιου μορίου-στόχου ή κυττάρου-στόχου που προσδιορίζεται στον ιστό ενός οργανισμού. Γενικά, οι βιοδείκτες έκθεσης χρησιμοποιούνται για να προβλέψουν την ποσότητα της ξеноβιοτικής ουσίας στην οποία έχει εκτεθεί ένας μεμονωμένος οργανισμός, που στη συνέχεια μπορεί να συσχετισθεί με κάποιες από τις δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία του. Σε πολλές περιπτώσεις οι βιοδείκτες έκθεσης είναι εύκολο να προσδιοριστούν, επειδή είτε η ξеноβιοτική ουσία είτε οι μεταβολίτες της, μπορούν να ποσοτικοποιηθούν σε δείγματα που προέρχονται από ιστούς οργανισμών (για υδρόβιους οργανισμούς).

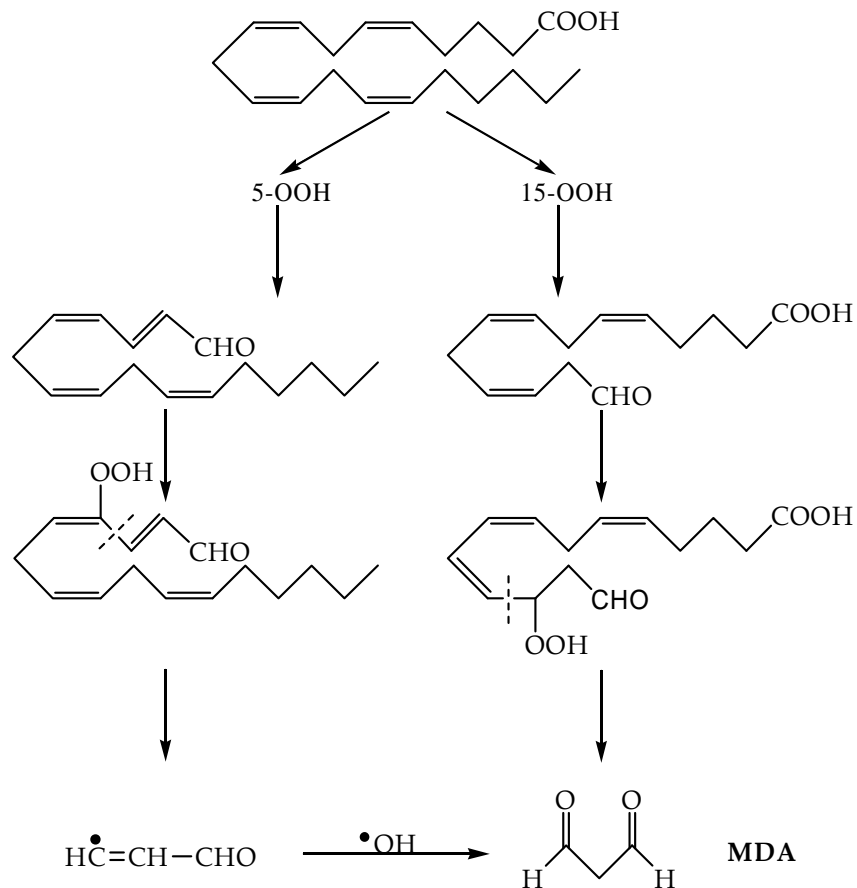
3.3. Βιοδείκτες επίδρασης

Βιοδείκτες επίδρασης (biomarker of effect) καλούνται οι μετρήσιμες αλλαγές σε βιοχημικές και φυσιολογικές παραμέτρους, αλλαγές στη συμπεριφορά ή άλλες αλλαγές εντός του οργανισμού, που ανάλογα με την έκταση σου μπορούν να καθιερωθούν ως μια πιθανή δυσμενή επίπτωση στην υγεία ή ως ασθένεια. Ιδανικά, ένας βιοδείκτης επίδρασης θα πρέπει να επαρκεί για την διεξαγωγή συμπερασμάτων και να μην απαιτεί επιβεβαίωση με περαιτέρω χημικούς προσδιορισμούς ή βιολογικές δοκιμασίες. Αυτοί οι δείκτες εμφανίζουν υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης και για το λόγο αυτό έχουν περιορισμένες εφαρμογές.

Ορισμένα παραδείγματα βιοδεικτών επίδρασης είναι η αύξηση της δραστηριότητας οξειδασών, ο σχηματισμός DNA-πρόσθετων (DNA adducts), μεταβολές στο DNA όπως θραύση των κλώνων, κα.



Σχήμα 3.2. Σχηματισμός του βιοδείκτη επίδρασης 8-υδροξυ-7,8-διϋδρο-2'-δεοξυγουανοσίνη (8-OH-dG) και της οξειδωμένης μορφής 8-οξο-2'-δεοξυγουανοσίνης (8-οξο-dG) από την αρχική ρίζα γουανισίλο-, που προέκυψε με την επίδραση της ρίζας υδροξυλίου στη 2'-δεοξυγουανοσίνη (2'-dG).



Σχήμα 3.3. Πιθανοί μηχανισμοί παραγωγής του βιοδείκτη επίδρασης MDA, μέσω μηχανισμών οξείδωσης των ενδιάμεσων πολυακόρεστων αλδεϊδών που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη (β-διάσπαση του 5-υδροπεροξυ ή 15-υδροπεροξυ αραχιδονικό οξέος).

3.4. Βιοδείκτες ευαισθησίας

Ως βιοδείκτης ευαισθησίας/δεκτικότητας (biomarker of susceptibility) ορίζεται μια τελικά προσδιοριζόμενη παράμετρος φυσιολογικής ή βιοχημικής κατάστασης, που έχει υποστεί κάποια μεταβολή και οδηγεί τον βιολογικό οργανισμό σε επιπτώσεις, εξαιτίας κάποιου χημικού, φυσικού ή μολυσματικού παράγοντα. Αυτοί οι βιοδείκτες δύνανται να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη ανθρώπινων ασθενειών με τη χρήση οργανισμών - βιολογικών δεικτών. Για παράδειγμα έκθεση σε χαμηλή συγκέντρωση κάποιου ρύπου (π.χ. μέταλλο) δύναται να αυξήσει τη δραστηριότητα του κυτοχρώματος P4501A1 ή 1A2 σε κάποιο οργανισμό χωρίς να του προκαλέσει μη αναστρέψιμες επιδράσεις.

Ωστόσο, η αυξημένη δραστικότητα αυτών των ενζύμων στους ανθρώπους συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη κακοηθών νεοπλασιών. Ανάλογες παρατηρήσεις έχουν γίνει και για μειωμένες δραστικότητες άλλων ένζυμων. Επιπλέον, ορισμένες ξеноβιοτικές ουσίες αναστέλλουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγώντας στην αύξηση της ευαισθησίας του οργανισμού σε μολυσματικούς παράγοντες, παράσιτα και κακοήθεις νεοπλασίες. Ο διαχωρισμός μεταξύ των βιοδεικτών επίδρασης και των βιοδεικτών ευαισθησίας δύναται να είναι δύσκολος. Ωστόσο, η διάκριση τους μπορεί να επιτευχθεί με βάση το είδος της μεταβολής που παρατηρείται στον οργανισμό, φυσιολογική ή βιοχημική, η οποία είναι ενδεικτική για κατάσταση ασθένειας ή μειωμένης ικανότητας για αντίσταση σε βιολογικούς, φυσικούς ή χημικούς παράγοντες.

3.5. Ερμηνεία των Βιοδεικτών

Η διαδικασία ερμηνείας των αποτελεσμάτων μέτρησης βιοδεικτών και οι εκτιμήσεις για άλλα είδη οργανισμών απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή. Η ίδια χημική ουσία δύναται να οδηγεί στην παραγωγή διαφορετικών πρωτεϊνών σε διαφορετικούς βιολογικούς οργανισμούς ή το ίδιο ένζυμο να έχει διαφορετική εξειδίκευση όσον αφορά το υπόστρωμα. Η αξιοποίηση των μετρήσεων των βιοδεικτών απαιτεί διεξοδική γνώση της συγκριτικής φυσιολογίας και της βιοχημείας. Η χρήση και η εφαρμογή τους απαιτεί την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην απόκριση τους. Παράγοντες που επηρεάζουν τους μηχανισμούς αυτούς, είναι η κατάσταση της υγείας, το φύλο, η ηλικία, η διατροφή, ο μεταβολισμός, η αποδημητική συμπεριφορά, ο αναπαραγωγικός κύκλος των οργανισμών που χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί δείκτες ρύπανσης, καθώς και άλλοι παράγοντες όπως οι εποχές, η θερμοκρασία και η ανομοιογένεια της περιβαλλοντικής ρύπανσης.

Η αξία των βιοδεικτών έγκειται στην ικανότητα τους να ενσωματώνουν πολλαπλές εκθέσεις σε ποικιλία χημικών ρύπων σε μια περιοχή, συνθήκες που αντιπροσωπεύουν την κατάσταση που υπάρχει σε περιοχές διάθεσης αποβλήτων. Για παράδειγμα, οι αποκρίσεις της CYP1A1 στα ιζήματα που έχουν ρυπανθεί με διοξίνες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) ή πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) μπορούν να δώσουν μια εικόνα για την κατάσταση των ρύπων στην περιοχή, την βιοδιαθεσιμότητα τους και τον κίνδυνο που εγκυμονούν.

Παρόμοια, οι αλλαγές στην κατανομή της πορφυρίνης, η συγκέντρωση των μεταλλοθειονινών, κα μπορούν να δώσουν μια εικόνα για τις συνεργικές επιδράσεις μετάλλων. Είναι σημαντικό κατά τη χρήση των βιοδεικτών να κατανοεί κανείς πλήρως τις δυνατότητες αλλά και τους περιορισμούς των τεχνικών και να είναι πολύ προσεκτικός όταν πραγματοποιεί εκτιμήσεις μεταξύ ειδών.

Την τελευταία δεκαετία παρατηρείται η τάση για την ανάπτυξη μοριακών βιοδεικτών και κυρίως μη-θανατηφόρων βιοδεικτών. Παράλληλα, όπως επισημαίνεται από ορισμένους ερευνητές είναι αναγκαία η ανάπτυξη πιστοποιημένων βιοδεικτών με μεγαλύτερη ευαισθησία, ώστε να μπορούν να βοηθήσουν στην εκτίμηση των επιπέδων ρύπανσης του περιβάλλοντος.

3.6. Κριτήρια επιλογής βιοδεικτών

Οι βασικές ιδιότητες/προϋποθέσεις που πρέπει να χαρακτηρίζουν κάποια μετρούμενη παράμετρο ως βιοδείκτη συνοψίζονται στα ακόλουθα κριτήρια:

- Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βιοδείκτη πρέπει να είναι αξιόπιστη, να έχει χαμηλό κόστος, να χαρακτηρίζεται από επαναληψιμότητα και να είναι σχετικά εύκολη και απλή στην εφαρμογή της.
- Ο βιοδείκτης πρέπει να είναι ευαίσθητος στην έκθεση ή στις επιδράσεις των τοξικών παραγόντων στον οργανισμό, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έγκαιρη προειδοποίηση.
- Τα επίπεδα αναφοράς του βιοδείκτη πρέπει να είναι σαφώς προσδιορισμένα, ώστε να μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ της φυσικής διακύμανσης (θόρυβος) και της έντασης/stress που προκαλείται από την έκθεση του οργανισμού σε ξеноβιοτικούς παράγοντες (ένδειξη).
- Θα πρέπει να είναι ξεκάθαρες οι επιπτώσεις/επιδράσεις άλλων παραγόντων στην απόκριση του βιοδείκτη.
- Θα πρέπει να είναι ξεκάθαροι οι μηχανισμοί που συνδέουν την απόκριση του βιοδείκτη με την έκθεση σε κάποιο ρυπογόνο/τοξικό παράγοντα (δόση, χρόνος).
- Θα πρέπει να είναι εδραιωμένη η τοξικολογική σημασία του βιοδείκτη, όπως η σχέση της απόκρισης του βιοδείκτη και των (μακροπρόθεσμων) επιπτώσεων του στον οργανισμό.
- Οι βιοδείκτες θα πρέπει να επιτρέπουν τη χρήση τους για την παρακολούθηση των επιδράσεων της ρύπανσης σε προστατευόμενα ή απειλούμενα είδη.

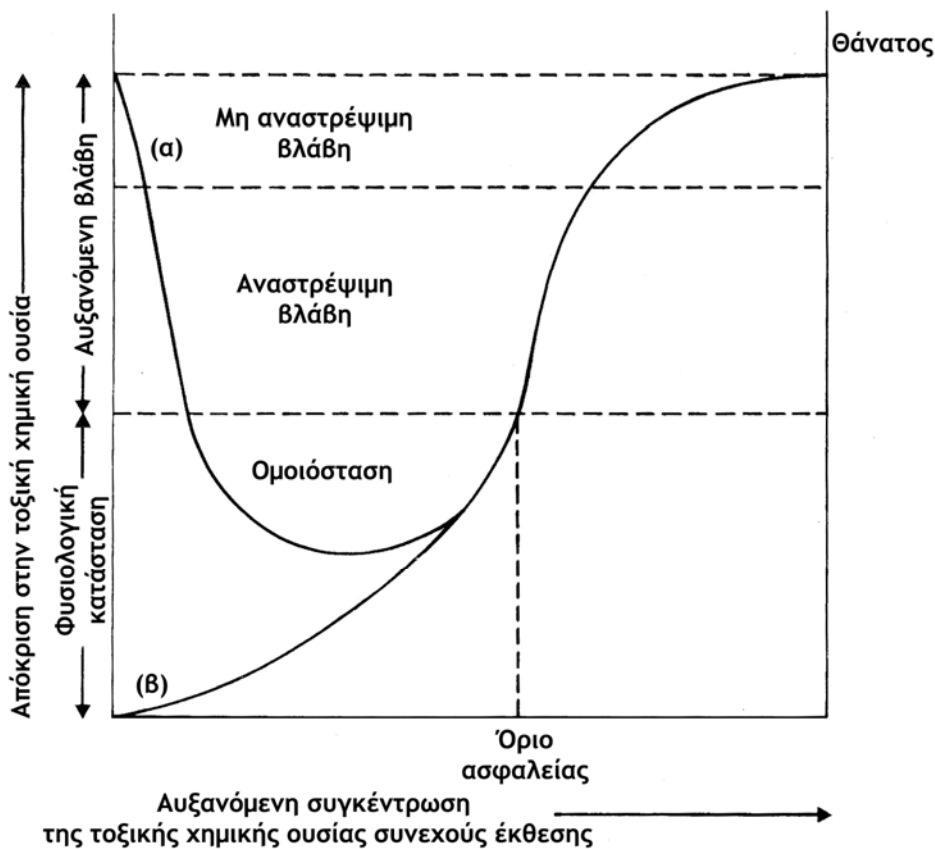
3.7. Βιβλιογραφία

1. Committee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. *Environ Health Perspect*, 1987, **74**: 3-9.
2. Mc Carthy JF, Shugart LR. *Biomarkers of Environmental Contamination*, Lewis Publishers, Chelsea, 1990.
3. Dickerson RL, Hooper MJ, Gard NW, et al. Toxicological foundations of ecological risk assessment: Biomarker development and interpretation based on laboratory and wildlife species. *Environ Health Perspect*, 1994, **102(12)**:65-69.
4. McCarty LS, Power M, Munkittrick KR, Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment, *Human and Ecological Risk Assessment*, 2002, **8**:159-164.
5. Bainy ACD, Marques MRF. Global analysis of biomarker responses in aquatic organisms exposed to contaminants. *Comments on Toxicology*, 2003, **9**: 271-278.
6. Casarett & Doull's *Toxicology - The Basic Science of Poison*. 2001: 1018-1021.
7. Handy RD, Galloway TS, Depledge MH. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicol*, 2003, **12**: 331-343.
8. Parvez S, Raisuddin S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ Toxicol Pharmacol*, 2005, **20**: 112-117.
9. Valavanidis A, Vlahogianni Th, Dasenakis M, Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2006, **64**: 178-189.
10. Vlahogianni T, Dasenakis M, Scoullou M, Valavanidis A. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metal's pollution in coastal areas from Saronikos gulf of Greece. *Mar Pollut Bull*, 2007, **54**: 1361-1371.
11. Sanchez W, Porcher JM. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union, *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, **28(2)**: 150-15.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

4.1. Εισαγωγή

Οι δοκιμασίες τοξικότητας και οικοτοξικότητας είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την παρακολούθηση και τη εκτίμηση της ποιότητας του υδάτινου περιβάλλοντος. Οι δοκιμασίες αυτές στοχεύουν στην ποσοτικοποίηση της έκθεσης σε συγκεκριμένη συγκέντρωση κάποιας ουσίας, χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο οργανισμό για το σκοπό αυτό. Οι πιο απλές δοκιμασίες περιλαμβάνουν την έκθεση του οργανισμού σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του μελετούμενου υλικού, σε ιδιαίτερα προσεγγμένες και καθορισμένες συνθήκες έως ότου σε ένα προκαθορισμένο ποσοστό (συνήθως 50%) επέλθουν μη αναστρέψιμες επιπτώσεις ή επέλθει ο θάνατος.



Σχήμα 4.1. Σχηματική αναπαράσταση των επιδράσεων έκθεσης σε οργανισμούς κατά τις δοκιμασίες τοξικότητας.

Μια μεγάλη ποικιλία βιομηχανικών κα ανθρωπογενών ρύπων έχουν εξετασθεί σε δοκιμασίες τοξικότητας, όπως για παράδειγμα φυτοφάρμακα, μέταλλα, κα. Αυτοί οι ρύποι, καθώς και η όξινη βροχή, εισέρχονται στα υδάτινα οικοσυστήματα και προκαλούν οξείες και χρόνιες επιδράσεις στους οργανισμούς, όπου η έκταση των επιδράσεων διαφέρουν από είδος σε είδος, ενώ πολλοί ρύποι έχουν συνεργικές επιδράσεις.

4.2. Βασικές αρχές και παράμετροι που επηρεάζουν τις δοκιμασίες τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς

Υπάρχουν ορισμένες βασικές αρχές οι οποίες διέπουν τις δοκιμασίες τοξικότητας. Καταρχήν δύνανται να εμφανισθούν δυσκολίες κατά την διαδικασία ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Για παράδειγμα είναι σημαντικό, ο χρόνος έκθεσης να είναι επαρκής ώστε να καταστούν ορατές οι επιδράσεις στους οργανισμούς που χρησιμοποιούνται κατά τη δοκιμασία. Όπως σε όλα τα ελεγχόμενα πειράματα, έτσι και εδώ, θα πρέπει όλοι οι άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την έκβαση της δοκιμασίας να είναι σταθεροί, όπως η θερμοκρασία, η ένταση του φωτός και η διάρκεια αυτού, καθώς επίσης και η σύσταση του μέσου σε σχέση με διαλυμένα αέρια και pH.

Άλλα προβλήματα των δοκιμασιών τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς είναι η προμήθεια υγρών οργανισμών. Πολλά από τα είδη ψαριών που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες μπορούν να αγοραστούν από ιχθυοτροφεία. Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ψάρια από το φυσικό τους περιβάλλον, αλλά πρώτα πρέπει να εγκλιματισθούν στις συνθήκες των εργαστηρίων πριν από τις δοκιμασίες τοξικότητας. Το κυριότερο μειονέκτημα είναι ότι τα είδη αυτά μπορεί να είναι ανομοιογενή και να παρουσιάζουν διαφορετικές ευαισθησίες στην χημική ουσία-ρύπο και στις εργαστηριακές συνθήκες. Πρέπει να δοθεί προσοχή στο στρες που υπόκεινται οι οργανισμοί αυτοί όταν απομονωθούν από το φυσικό τους περιβάλλον και στην ποιότητα του ύδατος που θα χρησιμοποιηθεί. Το νερό σε πολλά εργαστήρια υπόκειται σε διύλιση με ιοντοανταλλακτικές ρητίνες και μετά απόσταση για να χρησιμοποιηθεί στις δοκιμασίες και για να αποφευχθούν προβλήματα επιμόλυνσης, αυξάνοντας όμως με τον τρόπο αυτό το κόστος των πειραμάτων.

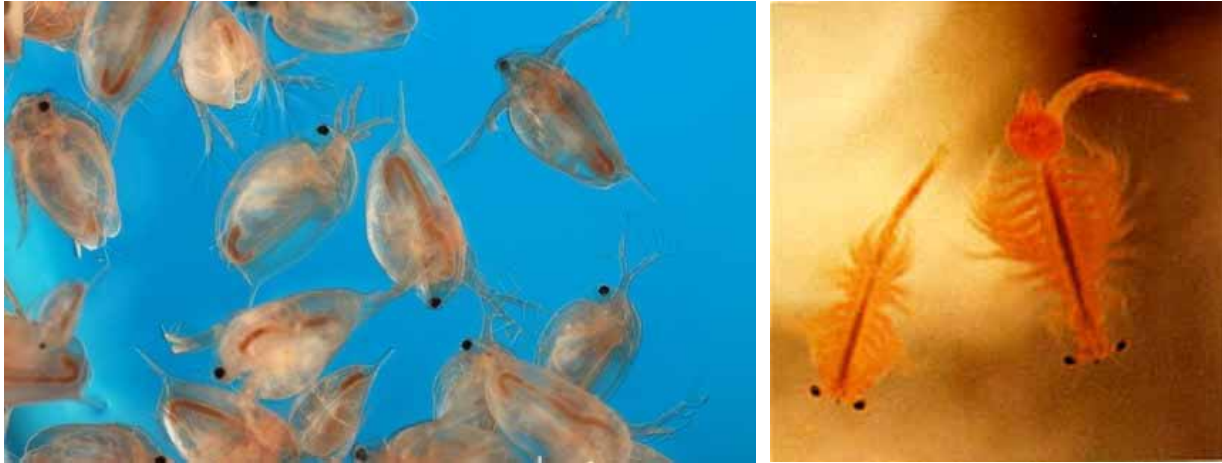
4.3. Υδρόβιοι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες τοξικότητας και οικοτοξικότητας

Εδώ και αρκετές δεκαετίες, οι επιστήμονες χρησιμοποιούν διάφορους υδρόβιους οργανισμούς σε τοξικολογικά και οικοτοξικολογικά πειράματα, με σκοπό να μελετήσουν τις επιπτώσεις των χημικών ρύπων στα οικοσυστήματα και να εκτιμήσουν το βαθμό ρύπανσης αυτών. Το είδος των οργανισμών που επιλέγεται για δοκιμασίες τοξικότητας χημικών ρύπων και για τον έλεγχο των επιπέδων ρύπανσης των οικοσυστημάτων (biomonitoring), καθορίζεται από συγκεκριμένες ιδιότητες των οργανισμών αυτών, όπως είναι η αφθονία τους, η ευκολία στη συλλογή, η ανθεκτικότητά και η ευκολία ανάπτυξη τους σε εργαστηριακές συνθήκες, η γνώση της γενετικής τους σύνθεση και η ευαισθησία τους στους διάφορους χημικούς ρύπους, η οποία πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική των άλλων ειδών που διαβιούν στο ίδιο οικοσύστημα.

Οι οργανισμοί εκείνοι που είναι ιδιαίτερα διαδεδομένοι και χρησιμοποιούνται σε περιβαλλοντικές τοξικολογικές μελέτες υδάτινων οικοσυστημάτων ως βιοδείκτες (sentinel organisms, bioindicators), είναι φύκη, ψάρια και βενθικά μακροασπόνδυλα τα οποίοι διαθέτουν τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- Υπάρχουν στα περισσότερα υδάτινα οικοσυστήματα.
- Αποτελούνται από μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ειδών, τα οποία αντιδρούν διαφορετικά υπό την επίδραση χημικών ρύπων.
- Γενικά εμφανίζουν περιορισμένη κινητικότητα με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί δείκτες ρύπανσης συγκεκριμένης περιοχής.
- Βιοσυσσωρεύουν τοξικούς χημικούς ρύπους.
- Είναι ευαίσθητα στους διάφορους χημικούς ρύπους.
- Αποτελούν τροφή για άλλους υδρόβιους οργανισμούς (π.χ. ψάρια εμπορικής σημασίας).
- Είναι εύκολη η συλλογή τους και η αναγνώρισή τους.

Τα κυριότερα είδη που χρησιμοποιούνται ως ευαίσθητοι οργανισμοί είτε σε δοκιμασίες τοξικότητας, είτε σε τοξικολογικές μελέτες παρακολούθησης του βαθμού ρύπανσης υδάτινων συστημάτων παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.



(α)

(β)

Σχήμα 4.2. Φωτογραφίες των υδρόβιων οργανισμών (α) *Daphnia magna* και (β) *Artemia salina*, που χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί δείκτες ρύπανσης υδάτινων οικοσυστημάτων.

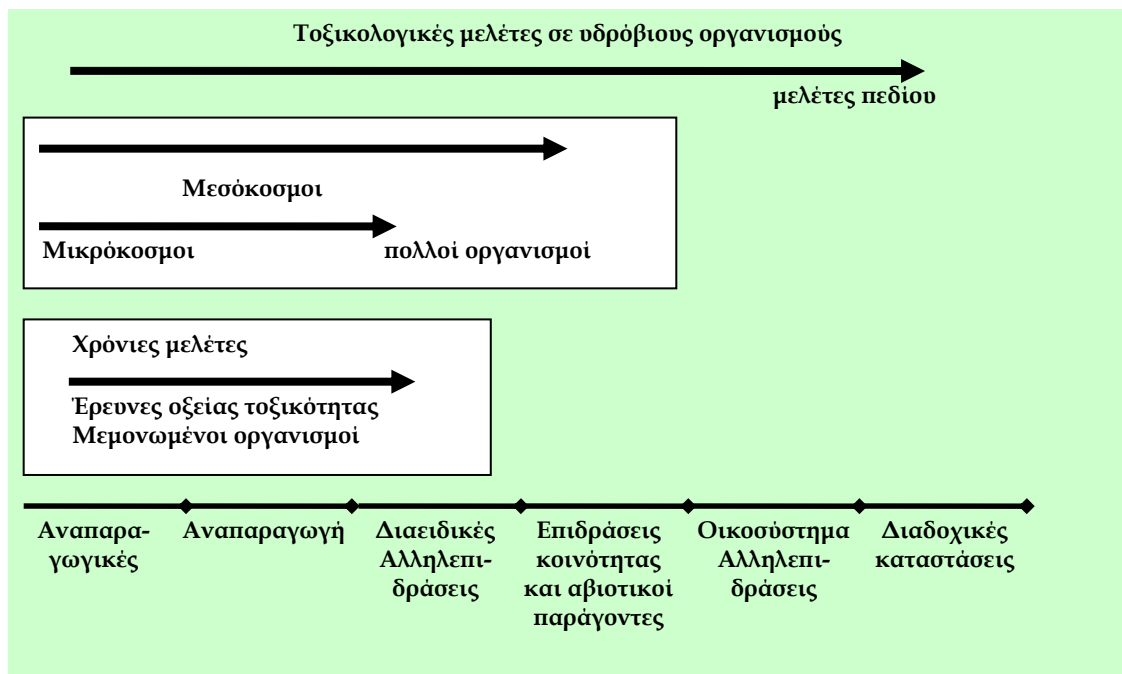
Πίνακας 4.1. Είδη υδρόβιων οργανισμών που χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί δείκτες τοξικότητας χημικών ρύπων ή ρύπανσης υδάτινων οικοσυστημάτων.

Είδος νερού	Οργανισμοί
Γλυκό νερό	Ασπόνδυλα <ul style="list-style-type: none"> ▪ Κλαδόκερα: <i>Daphnia magna</i>, <i>D. pulex</i>, <i>D. Pulicaria</i>, <i>Ceriodaphnia dubia</i> ▪ Αμφίποδα: <i>Gammarus lacustis</i>, <i>G. Fasciatus</i>, <i>Gammarus pulex</i>, ▪ Οστρακόδερμα: <i>Orconectes sp.</i>, <i>Combarus sp.</i> ▪ Έντομα: Megaloptera, Plecoptera, Ephemeroptera, Trichoptera, Odonata, Hemiptera, Coleoptera
Γλυκό νερό	Σπονδυλωτά <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ψάρια: rainbow trout (<i>Oncorhynchous mykiss</i>), brook trout (<i>Salvenilus fontinalis</i>), goldfish (<i>Carassius auratus</i>), fathehead minnow (<i>Pimephales promelas</i>), κλπ ▪ Αμφίβια: frog (<i>Rana sp.</i>), toad (<i>Bufo sp.</i>) ▪ Μύδια: <i>Unio tumidus</i>
Αλμυρό νερό	Ασπόνδυλα <ul style="list-style-type: none"> ▪ Κοπήποδα: <i>Acartia clause</i>, <i>A. tonsa</i> ▪ Γαρίδες: <i>Penaeus sertiferus</i>, <i>P. duorarum</i> ▪ Μύδια: <i>Mytilus galloprovincialis</i>, <i>Mytilus edulis</i>, <i>Perna perna</i>, <i>Perna viridis</i> ▪ Γαστρόποδα: <i>Nucella lapillus</i>, <i>Littorina littorea</i> ▪ Στρείδια: <i>Crassostrea gigas</i>
Αλμυρό νερό	Σπονδυλωτά <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ψάρια: sheephead minnow (<i>Cyprinodon variegates</i>), fathehead minnow (<i>Pimephales promelas</i>) lonnose killifish (<i>Fundulus similis</i>), bluefish (<i>Lepomis machrochirus</i>), channel catfish (<i>Ictuluturs punctatus</i>) pinfish (<i>Lagodon rhomboids</i>), κ.π

4.4. Μέθοδοι περιβαλλοντικής τοξικολογίας

Υπάρχουν πολλές δοκιμασίες τοξικολογίας που αναπτύχθηκαν με σκοπό τη μελέτη περιβαλλοντικών προβλημάτων, ιδιαίτερα για χημικές ουσίες οι οποίες είναι τοξικές για διάφορους οργανισμούς και οικοσυστήματα. Η ταξινόμηση των μεθόδων αυτών γίνεται ανάλογα με τον χρόνο διάρκειας της πειραματικής παρακολούθησης σε σχέση με το χρόνο ζωής των οργανισμών και της πολυπλοκότητας του οργανισμού, της βιοκοινότητας όπου ζει και εξελίσσεται, του οικοσυστήματος μέσα στο οποίο αλληλεπιδρά με άλλα είδη και με το αβιογενές περιβάλλον (έδαφος, υδάτινα συστήματα, κλίμα, ατμόσφαιρα).

Ένας σχηματικός τρόπος για δοκιμασίες και μελέτες περιβαλλοντικής τοξικολογίας παρουσιάζεται παρακάτω:



Σχήμα 4.3. Ταξινόμηση των δοκιμασιών τοξικότητας στην περιβαλλοντική τοξικολογία.

Ορισμένες συνιστώσες που πρέπει να ληφθούν υπόψη στην μεθοδολογία της περιβαλλοντικής τοξικολογίας είναι:

- Ο σχεδιασμός των βασικών παραμέτρων των μετρήσεων και της μεθοδολογίας: οι μέθοδοι και οι τεχνικές πρέπει να είναι απλές και εύχρηστες.
- Ο σχεδιασμός των διαφόρων σεναρίων έκθεσης των οργανισμών σε τοξικές ουσίες: για υδρόβιους οργανισμούς απαιτείται έκθεση ολόκληρου του σώματος.

- Οι οργανισμοί που θα χρησιμοποιηθούν στα πειράματα: πρέπει να είναι εύκολοι να συγκεντρωθούν και να αναπτύσσονται σε εργαστηριακές συνθήκες, να είναι γνωστή η γενετική τους σύνθεση, να είναι ευαίσθητοι στους διάφορους ρύπους. Η ευαισθησία αυτή να είναι αντιπροσωπευτική των άλλων ειδών που ζουν στον βίοτοπο ή το οικοσύστημα που εξετάζεται, ιδιαίτερα για πειράματα με πολλούς οργανισμούς όταν είναι γνωστές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών.
- Η σύγκριση των μεθόδων σε διάφορα είδη οργανισμών: λόγω της εξέλιξης και της ανάπτυξης οργανισμών στα οικοσυστήματα υπάρχουν σημαντικές διαφορές ευαισθησίας ορισμένων ειδών σε ορισμένες χημικές ουσίες-ρύπους.
- Ο σχεδιασμός στατιστικών και τοξικολογικών παραμέτρων για τα πειραματικά δεδομένα: υπάρχει μεγάλη ποικιλία μεθόδων στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό των διαφόρων παραμέτρων και «τελικών σημείων» τοξικολογίας (toxic endpoints).

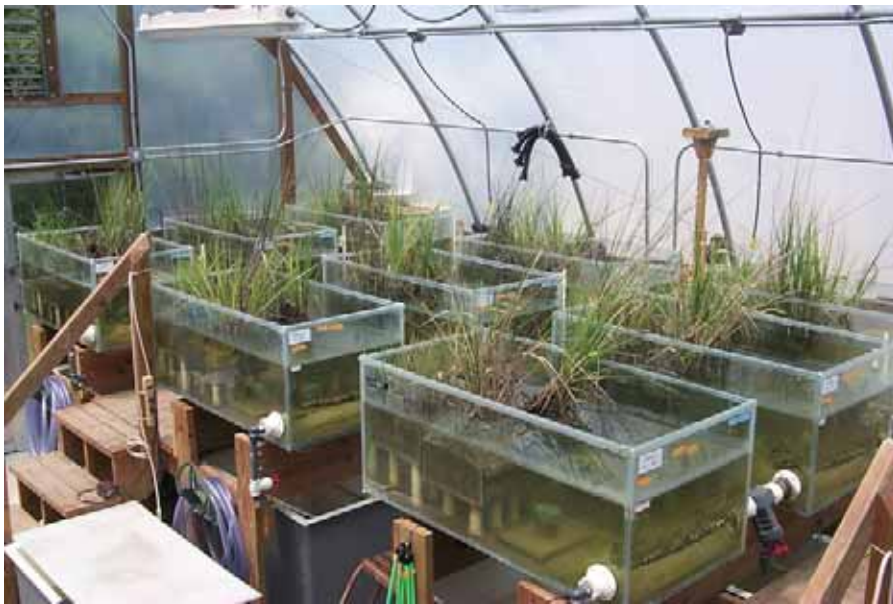


Σχήμα 4.4. Δοκιμασίες οξείας τοξικότητας σε δίθυρα.

4.5. Δοκιμασίες τοξικότητας

Οι δοκιμασίες τοξικότητας διακρίνονται στις **δοκιμασίες οξείας τοξικότητας** (acute toxicity tests) και **χρόνιας τοξικότητας** (chronic toxicity tests). Οι δοκιμασίες οξείας (acute) και χρόνιας (chronic) τοξικότητας σχεδιάστηκαν για τον προσδιορισμό βραχυπρόθεσμων (short-term) μακροπρόθεσμων (long-term) επιδράσεων κατόπιν έκθεσης σε χημικές ουσίες για μια ποικιλία τελικών παραμέτρων (endpoint), όπως η επιβίωση, η αναπαραγωγή, η φυσιολογικές και βιοχημικές επιδράσεις. Η μελέτη των επιδράσεων μιας χημικής ουσίας στους βιολογικούς οργανισμούς αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο για την εκτίμηση των επιδράσεων τοξικών μιγμάτων σε αυτούς. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας των συνθηκών που επικρατούν στο πεδίο, οι δοκιμασίες οξείας και χρόνιας τοξικότητας αποτελούν τη βάση για την αξιολόγηση της έκθεσης και της επίδρασης των βιολογικών οργανισμών σε συγκεκριμένες χημικές ενώσεις.

Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών οξείας και χρόνιας τοξικότητας δύνανται να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των παθολογικών επιδράσεων ρύπων, για την παροχή δεδομένων απαραίτητων για την ανάλυση των επιδράσεων που παρατηρούνται στις μελέτες πεδίου, για τον προσδιορισμό πιθανών επιδράσεων που θα πρέπει να παρακολουθούνται στις μελέτες πεδίου και στην παροχή δεδομένων δόσης-αποτελέσματος για συγκρίσεις με τα επίπεδα έκθεσης στο πεδίο.



Σχήμα 4.5. Μονάδα δοκιμασιών τοξικότητας χημικών ουσιών για ψάρια

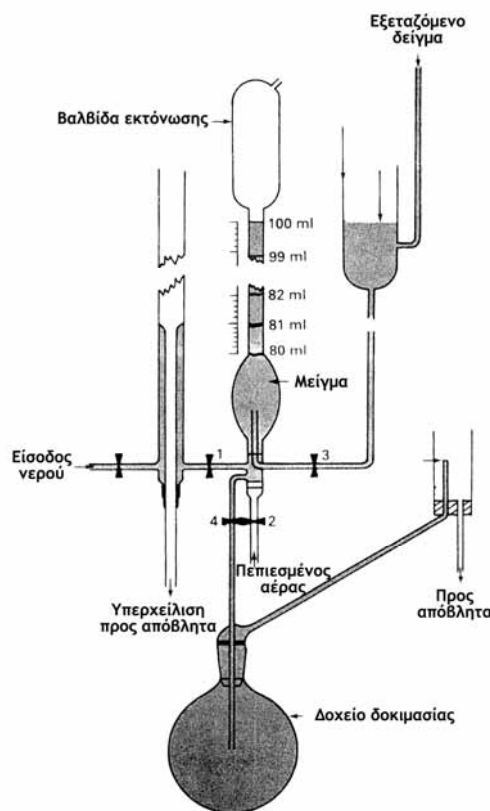
4.6. Βιβλιογραφία

1. Adams WJ. Aquatic Toxicology Testing Methods. In ‘Handbook of Ecotoxicology’. Hoffman DJ, Tattner BA, Burton GA, Cairus J, eds, Lewis, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995.
2. Lagadic L, Caquet T. Invertebrates in Testing of Environmental Chemicals: Are They Alternatives? Environ Health Perspect Supp, 1998, **106(2)**: 593-611.
3. Witters HE. Chemical Speciation Dynamics and Toxicity Assessment in Aquatic Systems. Ecot Environ Saf, 1998, **41**: 90-95.
4. Barile FA: Principles of Toxicology Testing. CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
5. Monteiro DA, de Almeida JA, Rantin FT, Kalinin AL. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). Comp Biochem Physiol C, 2006, **143**: 141-149.
6. Sun Y, Yu H, Zhang J, Yin Y, Shi H, Wang X. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. Chemosphere, 2006, **63**: 1319-1327.
7. Valavanidis A, Vlahogianni Th, Dasenakis M, Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicol Environ Saf, 2006, **64**: 178-189.
8. Vlahogianni T, Dasenakis M, Scoullou M, Valavanidis A. Intergrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metal’s pollution in coastal areas from Saronikos gulf of Greece. Mar Pollut Bull, 2007, **54**: 1361-1371.
9. Βλαχογιάννη Θωμαΐς. Μελέτη βιοδεικτών οξειδωτικού stress στο θαλάσσιο οργανισμό *Mytilus galloprovincialis* σε σχέση με τις συγκεντρώσεις μετάλλων και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Καποδιστριακό Παν/μιο Αθηνών, 2007.
10. Βαλαβανίδης Α, Βλαχογιάννη Θ. Περιβαλλοντική Χημεία και Οικοτοξικολογία. Σύγχρονα Θέματα, Αθήνα, 2008.
11. Gagnaire B, Gagné F, André C, Blaise C, Abbaci K, Budzinski H, Dévier MH, Garric J. Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. Aquat Toxicol, 2009, **92** (3): 155-167.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

5.1. Εισαγωγή στις δοκιμασίες οξείας και χρόνιας τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς

Στις δοκιμασίες οξείας και χρόνιας τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς, ψάρια, ασπόνδυλα ή φύκη εκτίθενται σε υδατικά διαλύματα χημικών ουσιών. Ο σχεδιασμός αυτών των δοκιμασιών περιλαμβάνει στατικά συστήματα (το υδάτινο μέσο δεν ανανεώνεται κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας), συστήματα στατικής ανανέωσης (το υδάτινο μέσο ανανεώνεται περιοδικά) και συστήματα συνεχούς ροής (το υδάτινο μέσο ανανεώνεται συνεχώς).



Σχήμα 5.1. Σύστημα συνεχούς ροής όπου το υδάτινο μέσο ανανεώνεται συνεχώς.

Οι οργανισμοί δύνανται να εκτίθενται για σύντομα ή μεγάλα χρονικά διαστήματα. Ο στατικός σχεδιασμός χρησιμοποιείται μόνο για δοκιμασίες οξείας τοξικότητας, ενώ στις δοκιμασίες χρόνιας τοξικότητας συχνά χρησιμοποιείται ο σχεδιασμός συνεχούς ροής.

Οι δοκιμασίες οξείας και χρόνιας τοξικότητας δεν διαφέρουν μόνο στη διάρκεια τους αλλά και στις προσδιοριζόμενες τελικές παραμέτρους (endpoints). Στις δοκιμασίες οξείας τοξικότητας η προσδιοριζόμενη τελική παράμετρος είναι η επιβίωση των οργανισμών. Ωστόσο, στις δοκιμασίες χρόνιας τοξικότητας δύνανται να παρατηρούνται οι επιδράσεις στην ανάπτυξη και στην αναπαραγωγή. Για το σκοπό αυτό η διάρκεια αυτών των δοκιμασιών είναι μεγαλύτερη από τη διάρκεια ενός πλήρη κύκλου ζωής του χρησιμοποιούμενου οργανισμού. Η δοκιμασίες χρόνιας τοξικότητας συχνά είναι δύσκολο να διεξαχθούν εξαιτίας της μεγάλης διάρκειας τους (9-30 μήνες για δοκιμασίες σε ψάρια) και έχουν αρκετά μεγάλο κόστος, καθιστώντας τη χρήση τους απαγορευτική.

Ωστόσο, υπάρχουν τρεις εναλλακτικές οδοί αντί των χρόνων δοκιμασιών που απαιτούν χρόνο όσο ο κύκλος ζωής του οργανισμού:

- ↪ Δοκιμασίες χρόνιας τοξικότητας σε τμήμα του κύκλου ζωής του οργανισμού (partial life-cycle tests).
- ↪ Δοκιμασίες χρόνιας τοξικότητας σε πρώιμο στάδιο του κύκλου ζωής του οργανισμού (early-life-stage tests).
- ↪ Δοκιμασίες χρόνιας τοξικότητας σύντομης διάρκειας (short term chronic tests).

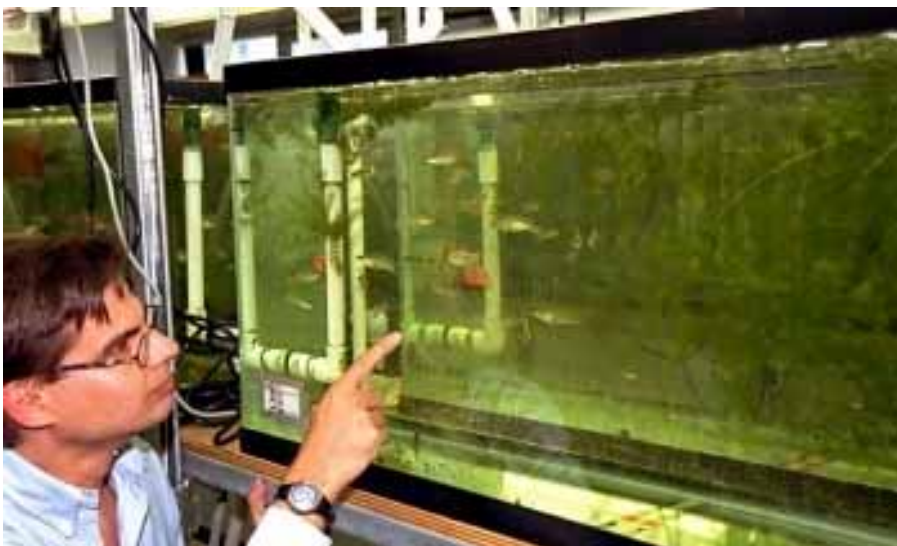
5.2. Πρότυπες δοκιμασίες οξείας και χρόνιας τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς

Ορισμένες από τις πιο διαδεδομένες δοκιμασίες τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς είναι οι εξής:

- **Οξεία τοξικότητα για ψάρια:** προσδιορισμός της LC_{50} σε συγκεκριμένα είδη ψαριών και σε διάφορες συγκεντρώσεις της ουσίας στο νερό για 48-96 ώρες. Ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας (διαλυτότητα κ.λπ) η έκθεση μπορεί να γίνει με τρόπο στατικό.
- **Οξεία τοξικότητα του υδρόβιου οργανισμού *Daphnia magna*:** προσδιορισμός της αποτελεσματικής συγκέντρωσης (effective concentration, EC_{50}) με την οποία ακινητοποιείται η *Daphnia magna*. Έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις της ουσίας στο νερό για 24 ή 48 ώρες.



- **Οικοτοξικολογικά πειράματα σε φύκια (algae):** προσδιορισμός της αναστολής ανάπτυξης του οργανισμού για διάρκεια 4 ημερών.
- **Προσδιορισμός της βιοσυσσώρευσης χημικών ουσιών:** συλλογή στοιχείων βιοσυσσώρευσης με προσδιορισμό φυσικοχημικών σταθερών και δεικτών: συντελεστής κατανομής, κ-οκτανόλη/νερό, διαλυτότητα σε λιπαρές ύλες, διαλυτότητα στο νερό, βιοδιασπασιμότητα κάτω από ορισμένες συνθήκες.
- **Προσδιορισμός της βιοδιασπασιμότητας της ουσίας (ή βιοαποικοδόμησης, biodegradation):** διάφορες μέθοδοι ανάλογα με τα είδη των μικροοργανισμών που βιοδιασπούν τις χημικές ουσίες. Βασική μέθοδος, επώαση της ουσίας με μικροοργανισμούς και μέτρηση του εναπομένου άνθρακα ή της έκλυσης διοξειδίου του άνθρακα ή της κατανάλωσης οξυγόνου. (Μέθοδοι: τροποποιημένη μέθοδος ΟΟΣΑ, τροποποιημένη μέθοδος ελέγχου AFNOR NF T90/302, τροποποιημένη μέθοδος Sturm, μέθοδος κλειστής φιάλης, τροποποιημένη μέθοδος MITI. Προτείνεται η μέτρηση του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου, BOD (biological oxygen demand), ως έμμεσου δείκτη βιοδιασπασιμότητας. Επίσης, μέτρηση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (οξειδωση με διχρωμικό κάλιο) ως μέτρο οξειδωσης της ουσίας.
- **Αβιοτική αποικοδόμηση-υδρόλυση ως συνάρτηση του pH:** προσδιορισμός του χρόνου ημιζωής της ουσίας σε άσηπτα υδατικά διαλύματα διαφόρων pH (4.0, 7.0 και 9.0), σε διάφορες θερμοκρασίες μεγαλύτερες ή μικρότερες των 50°C, απουσία οξυγόνου.



Σχήμα 5.2. Μονάδα δοκιμασιών τοξικότητας χημικών ουσιών για ψάρια.

Daphnia magna

Μέση διάρκεια ζωής: 30-40 ημέρες



Guppy

Μέση διάρκεια ζωής: 33-54 μήνες



Σχήμα 5.3. Οργανισμοί που χρησιμοποιούνται σε οικοτοξικολογικές έρευνες τοξικότητας χημικών ουσιών.

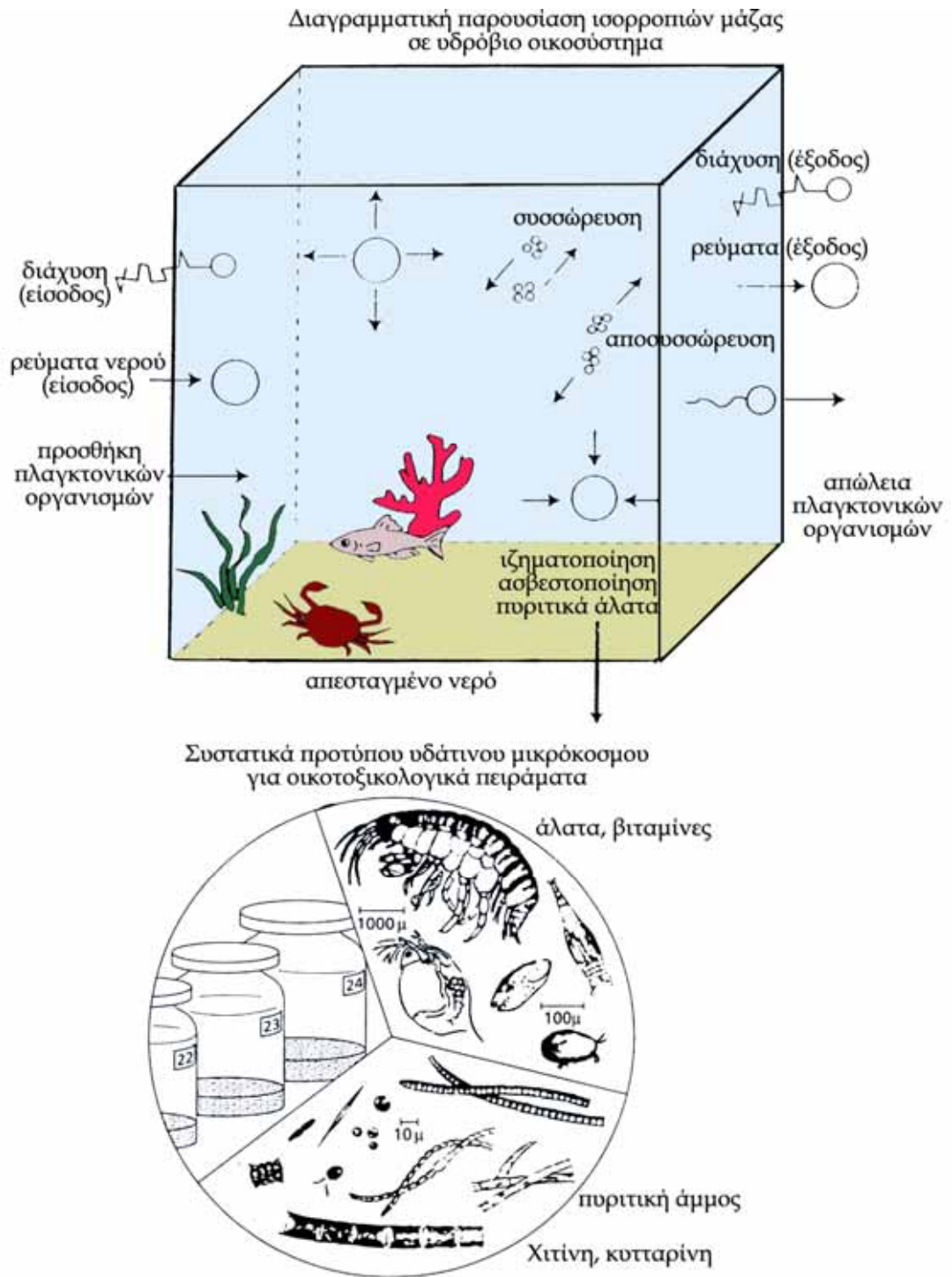
5.3. Οικοτοξικολογικές μελέτες πεδίου

Οι μελέτες πεδίου είναι οι πλέον σημαντικές οικοτοξικολογικές έρευνες που πλησιάζουν σε μεγάλο βαθμό τις φυσικές και οικολογικές συνθήκες που επικρατούν σε διάφορες περιοχές. Οι μελέτες πεδίου απαιτούν καλό σχεδιασμό και κατάλληλες συνθήκες για να εκπροσωπούν ένα οικοσύστημα ή τμήμα βιοκοινότητας, πάνω στην οποία θα μελετηθεί η επίδραση της τοξικής ουσίας ή μίγματος ή κάποιου τοξικού αποβλήτου.

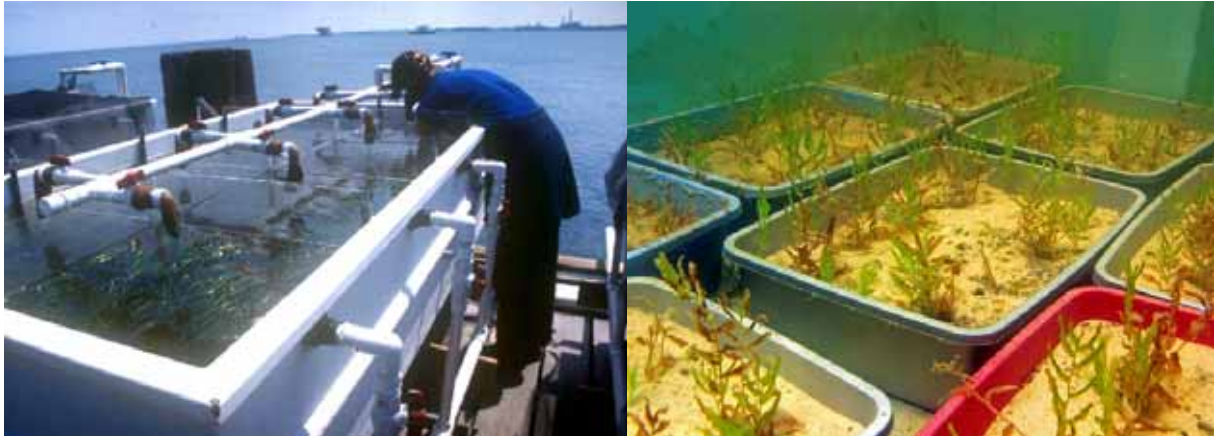
Οι μελέτες πεδίου με υδρόβιους οργανισμούς δύνανται να διακριθούν στις ελεγχόμενες (manipulative) μελέτες και στις μελέτες παρατήρησης (observational). Στις ελεγχόμενες μελέτες, χρησιμοποιούνται οργανισμοί οι οποίοι δεν είχαν εκτεθεί σε κάποιο ρυπογόνο παράγοντα και στη συνέχεια εκτίθενται σε ελεγχόμενες συγκεντρώσεις χημικών ουσιών. Στις μελέτες παρατήρησης, οι συγκεντρώσεις των τοξικών ουσιών στις οποίες εκτίθενται οι οργανισμοί δεν είναι ελεγχόμενες και ο στόχος αυτών των μελετών είναι η συλλογή δεδομένων για ανεξάρτητες έρευνες ή η παρακολούθηση της υγείας των οργανισμών και του περιβάλλοντος (biomonitoring).

Οι μελέτες πεδίου με υδρόβιους οργανισμούς περιλαμβάνουν τις μελέτες με μικρόκοσμους ή μεσόκοσμους. Η διαφορά μεταξύ μικρόκοσμου και μεσόκοσμου είναι το μέγεθος. Οι μικρόκοσμοι αποτελούνται από μεγάλα δοχεία, ενυδρεία ή τεχνητές πισίνες. Οι μεσόκοσμοι συνίστανται σε τεχνητές λίμνες, περιφράξεις από πλαστικό σε λίμνες, κα. Τα κοινά χαρακτηριστικά των μικρόκοσμων και των

μεσόκοσμων είναι ότι περιέχουν περισσότερα από ένα είδος οργανισμού, είναι τοποθετημένοι σε εξωτερικό χώρο και εμφανίζουν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα από ένα συνηθισμένο ενυδρείο. Συχνά περιέχουν ιζήματα ή φυτά και παρέχουν κάποια επίπεδα πολυπλοκότητας και ρεαλισμού.



Σχήμα 5.4. Πρότυπος μικρόκοσμος υδρόβιων οργανισμών και τα είδη οργανισμών και ανόργανων συστατικών που περιλαμβάνει.



(Aachen, 2006)

Σχήμα 5.5. Φωτογραφίες μεσόκοσμων.

Οι μελέτες παρακολούθησης (biomonitoring) περιλαμβάνουν δειγματοληψίες οργανισμών από το φυσικό τους περιβάλλον για να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες των επιπτώσεων της ρύπανσης που οφείλεται σε ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Αυτές οι μελέτες περιλαμβάνουν είτε τη συλλογή αυτοχθόνων οργανισμών μιας περιοχής είτε τη μεταφορά οργανισμών με κλουβιά στην μελετώμενη περιοχή.

5.4. Βιβλιογραφία

1. Rand GM, Petrocelli SR, eds. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publishing Corporation, Washington DC, 1985.
2. Suter GW, Lewis MA, eds. Aquatic Toxicology and Environmental Fate, vols 1-12. American Society for Testing and Material (ASTM), Philadelphia PA, 1989.
3. Bartell SM, Fardner RH, O'Neill RV. Ecological Risk Estimation. Lewis, Boca Raton, 1992.
4. Sugiura K. A multispecies laboratory microcosm for screening ecotoxicological impacts of chemicals. Environ Toxicol Chem, 1992, **11**: 1217-1226.
5. Landis WG, Yu M-H. Introduction to Environmental Toxicology. Impacts of Kersting K, van Wungaarden R. Effects of chloropyrifos an a microecosystem. Environ Toxicol Chem, 1992, **11**: 365-372.
6. ASTM. Conducting static acute toxicity tests on wastewaters with Daphnia. D 4229-84, Annual Book of ASTM Standards. American Society of Testing and Material. Philadelphia, PA, 1993.
7. Pyatt BF, Storey DM. Toxicity testing using Daphnia magna Straus in student assessments of water pollution. Journal of Biological Education, 1993, **3(3)**: 164-169.
8. ASTM. Standard guide for the collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing. E 1391-90. Annual Book of ASTM Standards. ASTM, Philadelphia, PA, 1993.
9. Graney RL, Kennedy JH, Rodgers JH. Aquatic Mesocosm Studies in Ecological Risk Assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1994.
10. ASTM. Standard practice for standardized aquatic microcosms: Freshwater. E 1366-91. Annual Book of ASTM Standards. ASTM, Philadelphia, PA, 1993.
11. ASTM. Standard guide for conducting acute toxicity tests with fishes, macro-invertebrates and amphibians. E 729-88a. Annual Book of ASTM Standards. American Society of Testing and Materials. Philadelphia, PA, 1993.
12. ASTM. Standard guide for conducting a terrestrial soil-core microcosm test. E 1197-87. Annual Book of ASTM Standards. ASTM, Philadelphia, PA, 1993.
13. Chemicals Upon Ecological Systems. Lewis Publs, Boca Raton, 1995.

14. Adams WJ. Aquatic Toxicology Testing Methods. In 'Handbook of Ecotoxicology'. Hoffman DJ, Tattner BA, Burton GA, Cairus J, eds, Lewis, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995.
15. Calow P, editor. Handbook of Ecotoxicology. Blackwell Science Ltd, Oxford, 1998.
16. Lagadic L, Caquet T. Invertebrates in Testing of Environmental Chemicals: Are They Alternatives? Environ Health Perspect Supp, 1998, **106(2)**: 593-611.
17. Thompson DG, Chartrand DT, Kreutzweiser DP. Fate and effects of azadirachtin in aquatic mesocosms: fate in water and bottom sediments. Ecotoxicol Environ Saf, 2004, **59(2)**: 186-193.
18. Kurtz HD, Cox R, Reisch C. A microcosm system for the study of cryptoendolithic microbial biofilms from desert ecosystem. Biofilms, 2005, **2**: 145-152.
19. Βαλαβανίδης Α. Οικοτοξικολογία και Περιβαλλοντική Τοξικολογία. Ερευνητική μεθοδολογία για την εκτίμηση οικολογικού κινδύνου από επικίνδυνες χημικές ουσίες. Σύγχρονα Θέματα, 2008.
20. Findlay HS, Kendall MA, Spicer JI, Turley C, Widdicombe S. Novel microcosm system for investigating the effects of elevated carbon dioxide and temperature on intertidal organisms. Aquat Biol, 2008, **3**: 51-62.
21. Pestana JLT, Alexander AC, Culp JM, Baird DJ, Cessna AJ, Soares AMVM. Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms, Environ Pollut, 2009.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

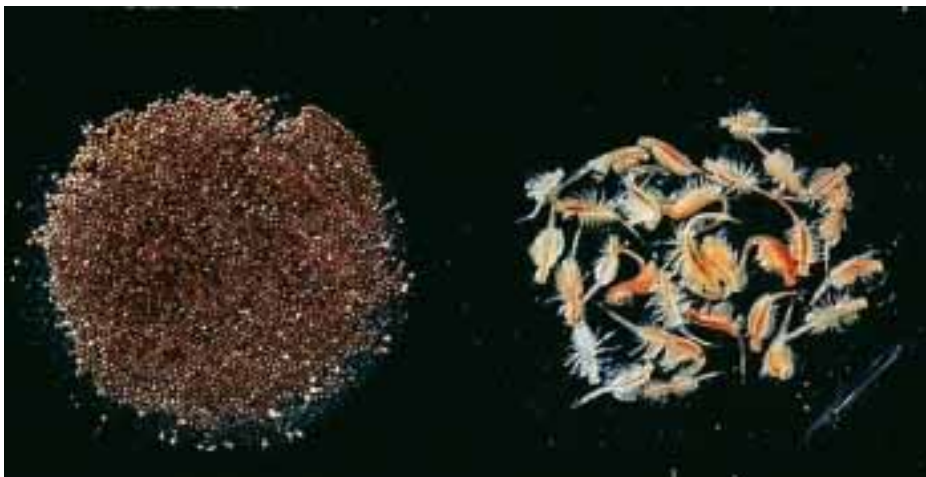
6.1. Έλεγχος τοξικότητας χημικών ουσιών σε *Artemia* (24-hours)

Η γαρίδα *Artemia salina* είναι ένας πολύ διαδεδομένος υδρόβιος οργανισμός σε πειράματα ελέγχου της τοξικότητας διαφόρων χημικών ουσιών. Η *Artemia salina* είναι ο πρώτος οργανισμός που χρησιμοποιήθηκε σε τοξικολογικά πειράματα, ξεκινώντας με τη χρήση των κυστών του. Η διαθεσιμότητα του



στο εμπόριο είναι ο κύριος λόγος που ο οργανισμός αυτός χρησιμοποιείται ευρύτατα σε τοξικολογικά πειράματα τα τελευταία 30 χρόνια. Πρόκειται για έναν πολύ εύχρηστο οργανισμό, ιδιαίτερα για τέτοιου είδους πειράματα αφού ο οργανισμός αυτός εκκολάπτεται από ξηρές κύστες, οι οποίες βρίσκονται εύκολα στο εμπόριο, αποθηκεύονται εύκολα και μπορούν να καλλιεργηθούν σε λίγες ημέρες χωρίς ιδιαίτερη φροντίδα.

Οι έλεγχοι τοξικότητας με την *Artemia nauplii* (προνύμφη) περιλαμβάνουν κυρίως ελέγχους οξείας τοξικότητας (short-term toxicity tests) που διακριβώνουν την ανεκτικότητα αυτών των οργανισμών σε διάφορες χημικές ουσίες, χρησιμοποιώντας ως κριτήριο τον αριθμό των θανάτων.



Σχήμα 6.1. Η *Artemia nauplii* πριν και μετά την εκκόλαψη της.

6.1.1. Χημικά αντιδραστήρια και οργανολογία

- Κύστες *Artemia*
- Πλαστικά μπουκάλια του 1 l
- Αναδευτήρες
- Θάλαμο επώασης
- Λάμπες φθορισμού
- Ποτήρια των 100 ml
- Πλαστικά πετρί με διάμετρο 10 cm
- Απεσταγμένο νερό
- 1-2 l τεχνητό θαλασσινό νερό: σε 1 l απιονισμένο νερό διαλύονται 27.50 g NaCl, 7.0 g MgSO₄ 7H₂O, 5.20 g MgSO₄, 5.20 g MgCl₂ 6H₂O, 0.70 g KCl, 0.21 g NaHCO₃, 1.30 CaCl₂ και η τιμή του pH του διαλύματος ρυθμίζεται με προσθήκη HCl μεταξύ 8-8.5.
- Πλαστικές πιπέτες του 1 ml
- Μικροσκόπιο

6.1.2. Προετοιμασία της *Artemia*

Ο οργανισμός *Artemia* προτού χρησιμοποιηθεί σε τοξικολογικά πειράματα πρέπει πρώτα να εκκολαφτεί. Οι βέλτιστες συνθήκες για την εκκόλαψη της *Artemia* είναι:

- Θερμοκρασία μεγαλύτερη από 25 °C, με βέλτιστη θερμοκρασία τους 28 °C
- Αλατότητα της τάξης των 5 ppt
- Έντονο και συνεχή αερισμό
- Συνεχή φωτισμό με λάμπα φθορισμού
- Το pH να βρίσκεται στην περιοχή του 8
- Η ποσότητα των κύστεων της *Artemia* δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 5 g ανά λίτρο νερού
- Απαιτείται συνεχής ανάδευση

Τα στάδια που πρέπει να ακολουθηθούν κατά την προετοιμασία της *Artemia* περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της μάζας της *Artemia* που θα χρησιμοποιηθεί (<5g/l), την ενυδάτωση των κύστεων σε απεσταγμένο νερό σε θερμοκρασία 25 °C για 60 - 90 min, την εκκόλαψη των κύστεων (15 -20 h) και τον διαχωρισμό των *Artemia* που έχουν εκκολαφθεί, από τα κελύφη.

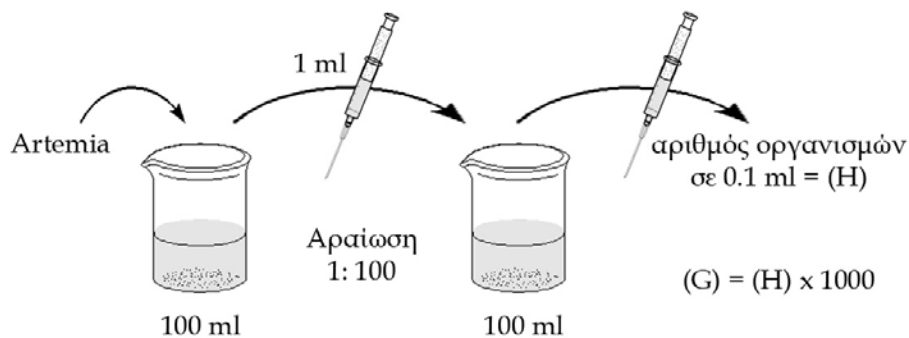
Αρχικά φέρεται μια ποσότητα κυστών *Artemia* σε πλαστικό μπουκάλι και προστίθενται ~ 50 ml απεσταγμένου νερού. Οι κύστες αφήνονται να ενυδατωθούν για για 60 - 90 min, σε θερμοκρασία 25 °C. Στη συνέχεια προστίθεται 1l τεχνητό θαλασσινό νερό και οι κύστες αφήνονται να εκκολαφτούν για 15-20 h σε θάλαμο επώασης, υπό συνεχή ανάδευση, αερισμό και φωτισμό. Το πλαστικό μπουκάλι, του οποίου έχει αφαιρεθεί ο πάτος, πρέπει να είναι τοποθετημένο με το στόμιο προς τα κάτω, ώστε να διευκολυνθεί στη συνέχεια η απομάκρυνση των νεκρών κελυφών. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της εκκόλαψης της *Artemia*, το διάλυμα από καφέ μετατρέπεται σε ανοιχτό πορτοκαλί. Στη συνέχεια διαχωρίζονται τα κελύφη από τους ζωντανούς οργανισμούς, ανοίγοντας το καπάκι του μπουκαλιού και επιτρέποντας στα νεκρά κελύφη που βρίσκονται στο στόμιο του μπουκαλιού να απομακρυνθούν.

6.1.3. Χρήση της *Artemia* για τον έλεγχο τοξικότητας χημικών ουσιών

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία εκκόλαψης της *Artemia* θα πρέπει να προσδιοριστεί ο αριθμός των οργανισμών στο διάλυμα. Για το λόγο αυτό μεταγγίζεται το διάλυμα που περιέχει τους οργανισμούς σε ποτήρι των 100 ml. Καθώς το διάλυμα αναδεύεται διαρκώς, λαμβάνεται δείγμα 1 ml και φέρεται σε άλλο ποτήρι των 100 ml και το δείγμα αραιώνεται μέχρι τη χαραγή. Από αυτό το διάλυμα λαμβάνεται 0.1 ml διαλύματος και σε αυτό καταμετρούνται οι ζωντανοί οργανισμοί.

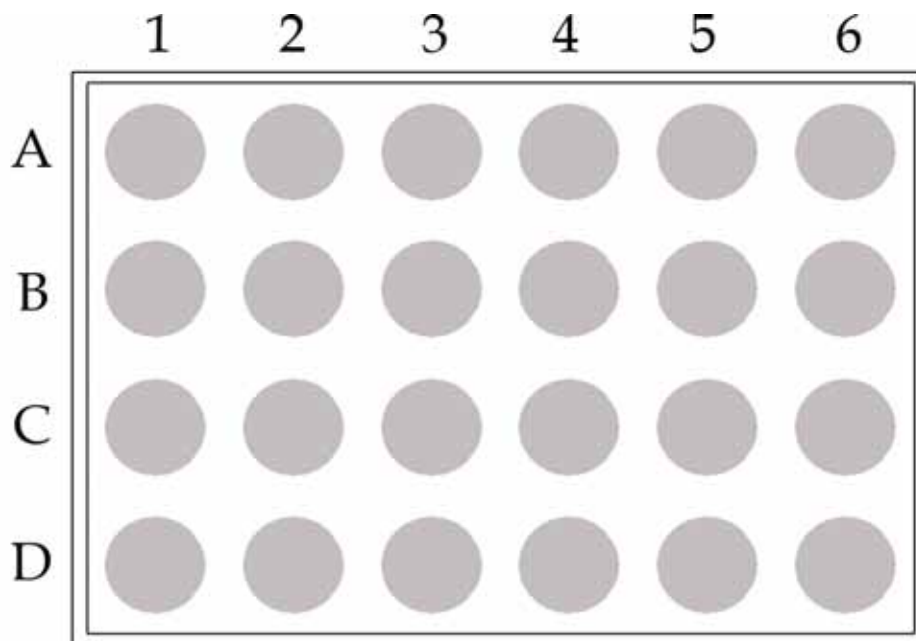


Πολλαπλασιάζοντας το αριθμό που προκύπτει (H) με το 1000 προκύπτει ο αριθμός των οργανισμών που περιέχονται στο αρχικό δοχείο ($G = H \times 1000$).



Σχήμα 6.2. Καταμέτρηση των οργανισμών στο αρχικό διάλυμα.

Για τη δοκιμασία τοξικότητας των ουσιών απαιτούνται συνολικά 24 πετρί, τα οποία τοποθετούνται σε δίσκο και αριθμούνται, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα. Στη στήλη 1 θα βρίσκεται το δείγμα αναφοράς και κατευθυνόμενοι προς τα δεξιά θα φέρονται δείγματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην μελετώμενη για τοξικότητα ουσία. Σε κάθε πετρί προσθέτουμε της στήλης 1 ml προσθέτουμε τεχνητό θαλασσινό νερό. Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία και στα υπόλοιπα πετρί μόνο που σε αυτά προσθέτουμε ανά στήλη αυξανόμενες ποσότητες της χημικής ουσίας που θέλουμε να ελέγξουμε.



Σχήμα 6.3. Διάταξη των πετρί που θα χρησιμοποιηθούν για τη δοκιμασία τοξικότητας χημικής ουσίας.

Χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο με ικανότητα μεγέθυνσης 10-12 μεταφέρουμε με μικροπιπέτα περίπου 50 οργανισμούς *Artemia* στα πετρί της σειράς D (rinsing petri). Στη συνέχεια μεταφέρουμε διαδοχικά 10 οργανισμούς από το πετρί της σειράς D στα πετρί της στήλης 1. Προσέχουμε να ελαχιστοποιήσουμε τη μεταφορά του μέσου κατά τη μεταφορά των οργανισμών. Επαναλαμβάνουμε αυτή τη διαδικασία για τις υπόλοιπες στήλες.

Η δοκιμασία τοξικότητας με τον παραπάνω τρόπο εξασφαλίζει τη χρήση ενός δείγματος αναφοράς (control) και 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις τις εξεταζόμενης χημικής ουσίας, εις τριπλούν με χρήση περίπου 10 οργανισμών ανά πετρί.



Σχήμα 6.4. Καταμέτρηση των νεκρών Artemia με τη χρήση μικροσκοπίου.

Στη συνέχεια καλύπτουμε τον παραπάνω δίσκο με παραφίλμ, τον σκεπάζουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι. Μετά από 24 h, μετράμε τους νεκρούς οργανισμούς σε κάθε πετρί και καταγράφουμε τα αποτελέσματα. Νεκρός θεωρείται εκείνος ο οργανισμός που δεν επιδεικνύει κάποια κίνηση μετά από 10 sec παρατήρησης.

Στη συνέχεια προσδιορίζονται τα ποσοστά θνησιμότητας και προσδιορίζονται οι τιμές LC_{50} με κάποια πρότυπη μέθοδο. Για να είναι αποδεκτά τα αποτελέσματα, θα πρέπει το ποσοστό θνησιμότητας στα πετρί αναφοράς να είναι $< 10\%$.

Πίνακας 6.1. Παράδειγμα πίνακα αποτελεσμάτων μετά από έκθεση 24 ωρών του οργανισμού *Artemia* (n=3) σε κάποια χημική ουσία.

Α/Α	Συγκέντρωση (%)	Αριθμός ζωντανών οργανισμών ανά πετρί			Αριθμός ζωντανών οργανισμών Τ	Ποσοστό % νεκρών οργανισμών Π
		A	B	C		
1	0 (μάρτυρες)	9	13	9	31	0
2	0.001	12	12	9	33	0
3	0.005	10	10	12	32	0
4	0.010	12	13	12	37	5
5	0.050	10	7	11	28	18
6	0.100	5	4	9	18	42
7	1.00	3	1	2	6	80

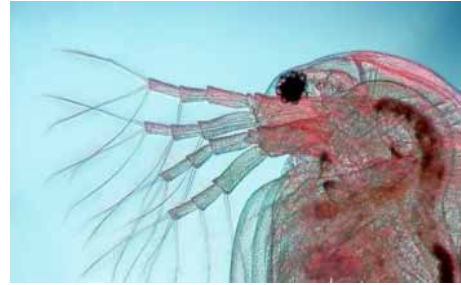
Παρατηρείται ότι το ποσοστό θνησιμότητας στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις κυμαίνεται μεταξύ 5%-80% και η θνησιμότητα στους 'μάρτυρες' είναι 0%, οπότε τα δεδομένα είναι αποδεκτά (αποδεκτά δεδομένα όταν το $5\% \leq \Pi \leq 95\%$ και $\Pi_{\text{μάρτύρων}} < 10\%$).

6.1.4. Βιβλιογραφία

1. Sleet RB, Brendel K. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. *Ecot Environ Saf*, 1983, 7: 435-446.
2. EPA. Brine Shrimp. Distribution, life cycle, taxonomy and culture methods.
3. ASTM. Standard practice for using brine shrimp nauplii as food for test animals in aquatic toxicology. Standard E1203-87, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.04, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
4. Sorgeloos P, Remiche - Van Der Wielen C, Persoone G. The use of *Artemia Nauplii* for toxicity tests - A critical analysis. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1978, 2: 249-255.
5. Nunes S, Carvahlo F, Guilhermino L, Van Stappen G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ Pollut*, 2006, 144: 453-462.
6. Blaise C. Microbotesting: An expanding field in aquatic toxicology. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1998, 40: 115-119.
7. Soares A, Galow P (ed). Progress in standarization of aquatic toxicity tests. Setac Publications, 1993.
8. Treece GD. *Artemia* production for marine larval fish culture. Southern Regional Aquaculture Center, 2000, 702.

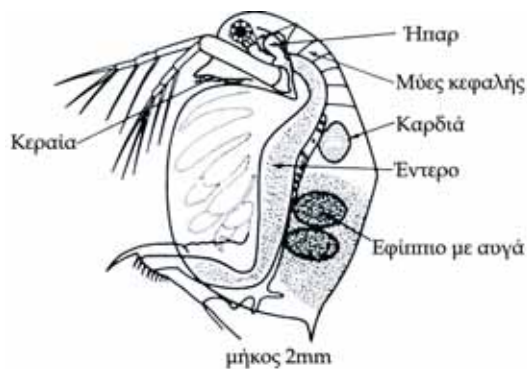
6.2. Δοκιμασία οξείας τοξικότητας με *Daphnia Magna* (48-hours)

Οι δαφνίδες συγκαταλέγονται μεταξύ των υδρόβιων οργανισμών που χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε δοκιμασίες τοξικότητας. Για δοκιμασίες οξείας αλλά και χρόνιας τοξικότητας χρησιμοποιείται ο οργανισμός *Daphnia Magna* με ηλικία μικρότερη από 24 h, επειδή θεωρείται



πως οι νεαροί οργανισμοί είναι πιο ευαίσθητοι. Η δοκιμασία οξείας τοξικότητας *Daphnia Magna* (48-h) μαζί με τη δοκιμασία τοξικότητας ψαριών (96-h) είναι από τις πιο διαδεδομένες δοκιμασίες για τον έλεγχο της τοξικότητας διαφόρων ουσιών στο υδάτινο περιβάλλον.

Οι οργανισμοί *Daphnia Magna* διαθέτουν ευκρινές μέγεθος (5 - 6 mm) είναι εύκολο να αναπτυχθούν και να διατηρηθούν σε εργαστηριακές συνθήκες. Οι οργανισμοί *Daphnia Magna* απαιτούν σχετικά σκληρό νερό για την καλλιέργειά τους. Επίσης, επειδή η ποιότητα του ύδατος παίζει σημαντικό ρόλο στη διεξαγωγή της δοκιμασίας τοξικότητας, για να περιοριστούν άλλες πηγές θνησιμότητας των οργανισμών όπως χλωριωμένες ενώσεις, βαρέα μέταλλα και διάφορες οργανικές ενώσεις, θα πρέπει αυτές να απομακρυνθούν.



Σχήμα 6.5. Ο οργανισμός *Daphnia Magna*.

Η δοκιμασία τοξικότητας της *Daphnia Magna* (48-h) είναι πολύ χρήσιμη για τον έλεγχο της τοξικότητας ενώσεων, μειγμάτων και τοξικών υγρών αποβλήτων. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η συντομία της, το μικρό κόστος και η δημιουργία μικρών ποσοτήτων τοξικών αποβλήτων. Τα μειονεκτήματα είναι η χρονοβόρα διαδικασία καλλιέργειας, οι δυσκολίες στη διατήρηση των οργανισμών για τις δοκιμασίες και η ευαισθησία του οργανισμού στην ποιότητα του νερού.

6.2.1. Χημικά αντιδραστήρια και οργανολογία

- Απιονισμένο νερό
- Όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3)
- Ένυδρο θειικό ασβέστιο ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Θειικό μαγνήσιο (MgSO_4)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl)
- Οργανισμοί *Daphnia Magna*
- Γυάλινα δοχεία των 4 L
- Ποτήρια των 200 ml
- Θερμόμετρο
- Πεχάμετρο
- Πιπέτες Παστέρ
- Σιφώνια των 5 ή 10 ml

6.2.2. Προετοιμασία της *Daphnia Magna*

Ο οργανισμός *Daphnia Magna* προτού χρησιμοποιηθεί σε τοξικολογικά πειράματα πρέπει πρώτα να καλλιεργηθεί. Οι βέλτιστες συνθήκες για τις καλλιέργειες του οργανισμού είναι:

- Θερμοκρασία 20 ± 2 °C
- Αλατότητα της τάξης των 3-4 ppt
- Φωτισμό για 16 h με λάμπα φθορισμού και 8 h σκοτάδι
- Το pH να βρίσκεται στην περιοχή 7.0 - 8.6
- Διαλυμένο οξυγόνο 60-100%
- Σκληρότητα νερού ως CaCO_3 να κυμαίνεται στο 160-180 mg/L

Αρχικά λαμβάνονται 60 οργανισμοί από το εμπόριο. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε δύο ποτήρια του 4 L, τα οποία περιέχουν συνθετικό νερό και καλλιεργούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να διασφαλίζονται οι παραπάνω συνθήκες. Καθημερινά αναπαράγονται νεαροί οργανισμοί οι οποίοι δύνανται να παραληφθούν με ειδικό δίκτυο ή με σιφώνιο των 10 ml όπου το άκρο του έχει κοπεί και λειανθεί (με φωτιά), ώστε να μεγαλώσει η διατομή του. Δεν θα πρέπει να απομακρύνονται περισσότεροι οργανισμοί από το $\frac{1}{4}$ του συνόλου τους καθημερινά. Οι οργανισμοί μπορούν να διατηρηθούν για μερικές ημέρες στο ψυγείο σε καθαρό νερό και να χρησιμοποιηθούν αφού αποκτήσουν τη θερμοκρασία δωματίου. Αξίζει να σημειωθεί

ότι από 30 οργανισμούς μπορούν να παραχθούν 300 νεαροί οργανισμοί εβδομαδιαίως. Οι οργανισμοί χρειάζεται να τρέφονται κατά τη διαδικασία καλλιέργειας τους με κάποιο από τα είδη τροφής που διατίθενται στο εμπόριο (π.χ. CEROPHYLL). Επίσης, τα δοχεία των καλλιεργειών θα πρέπει να καθαρίζονται καθημερινά για να μην επηρεαστούν αρνητικά οι καλλιέργειες. Οι οργανισμοί *Daphnia Magna* που παράγονται με αυτόν τον τρόπο μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για τις δοκιμασίες οξείας τοξικότητας.

Πίνακας 6.2. Συγκεντρώσεις χημικών ενώσεων στο συνθετικό νερό.

Χημική ένωση	Συγκέντρωση (g/L)
NaHCO ₃	0.192
CaSO ₄ 2H ₂ O	0.120
MgSO ₄	0.120
KCl	0.008

6.2.3. Χρήση της *Daphnia Magna* για τον έλεγχο της οξείας τοξικότητας χημικών ουσιών

Για τη δοκιμασία της οξείας τοξικότητας των ουσιών απαιτούνται γυάλινα δοχεία των 200 ml στα οποία φέρεται 50 ml συνθετικό νερό (μέσο καλλιέργειας) και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα της εξεταζόμενης ουσίας, ώστε να προκύψουν διαλύματα με τουλάχιστον 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κάθε συγκέντρωση γίνεται εις τριπλούν και επίσης υπάρχει και διάλυμα αναφοράς. Σε κάθε δοχείο φέρονται περίπου 10 οργανισμοί (1 οργανισμός/5 ml διαλύματος) με τη χρήση σιφώνιου ή πιπέτας και καταγράφονται οι θάνατοι τους μετά από 24 και 48 h έκθεσης. Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας οι συνθήκες είναι όμοιες με αυτές που εφαρμόζονται κατά την καλλιέργεια των οργανισμών, με τη μόνη διαφορά ότι κατά τη δοκιμασία οξείας τοξικότητας οι οργανισμοί δεν ταΐζονται. Κατά τη μεταφορά των οργανισμών από το ένα δοχείο στο άλλο θα πρέπει αυτοί να εξέρχονται από το σιφώνιο ή την πιπέτα απευθείας μέσα στο διάλυμα και όχι στην επιφάνεια αυτού, διότι υπάρχει κίνδυνος θνησιμότητας. Επίσης, θα πρέπει να μεταφερθούν αρχικά 3 οργανισμοί στο 1^ο δοχείο, 3 στο 2^ο, 3 στο 3^ο, ... και στη συνέχεια να φτάσει ο αριθμός των οργανισμών το 10 σταδιακά, ώστε να διασφαλιστεί ότι στο 1^ο δοχείο δεν θα συγκεντρωθούν οι οργανισμοί που πιάστηκαν πιο εύκολα.

Η δοκιμασία τοξικότητας με τον παραπάνω τρόπο εξασφαλίζει τη χρήση ενός δείγματος αναφοράς (control) και 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις τις εξεταζόμενης χημικής ουσίας, εις τριπλούν με χρήση περίπου 10 οργανισμών δοχείο. Νεκρός θεωρείται εκείνος ο οργανισμός που δεν επιδεικνύει κάποια κίνηση μετά από 10 sec παρατήρησης.

Στη συνέχεια προσδιορίζονται τα ποσοστά θνησιμότητας και προσδιορίζονται οι τιμές LC_{50} με κάποια πρότυπη μέθοδο. Για να είναι αποδεκτά τα αποτελέσματα, θα πρέπει το ποσοστό θνησιμότητας στα δοχεία αναφοράς να είναι $< 10\%$.



6.2.4. Παράδειγμα διεξαγωγής τη δοκιμασίας οξείας τοξικότητας με *Daphnia Magna* (48-hours).

Παρακάτω παρουσιάζονται τα βασικά στάδια της δοκιμασίας οξείας τοξικότητας της *Daphnia magna* με τη χρήση DAPHTOXKIT MAGNA.



Προετοιμασία του τεχνητού νερού και αερισμός για 15 min.



Εκκόλαψη της *Daphnia magna*. Μεταφορά των οργανισμών στο μικρο-κόσκινο.



Έκπλυση της *Daphnia* με απεστ. νερό.

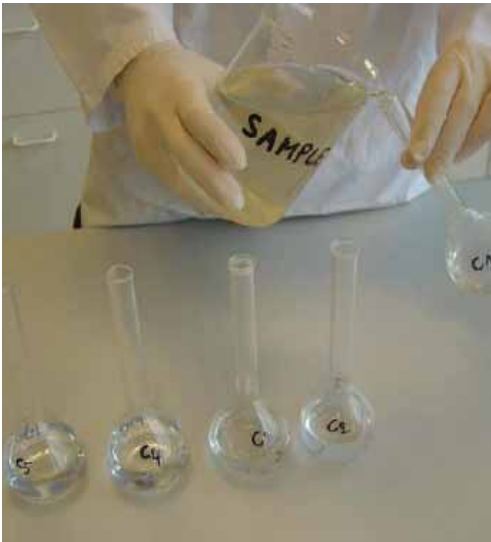


Μεταφορά της *Daphnia* σε πετρί επώασης και επώαση για 72h στους 20-22 °C υπό συνεχή φωτισμό 6 000 LUX.

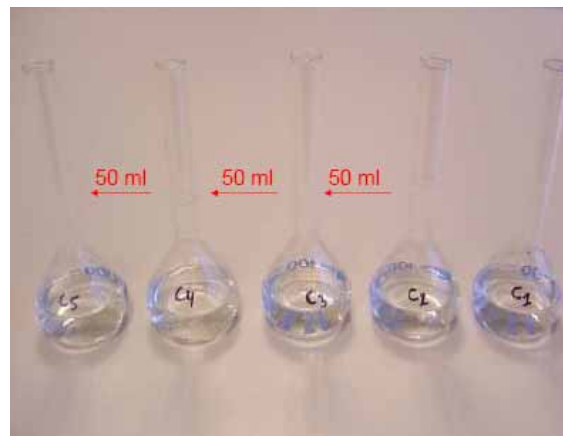
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Προετοιμασία των δ/των της τοξικής ουσίας. Προσθήκη 50 ml νερού σε κάθε ογκομετρική φιάλη των 100 ml.

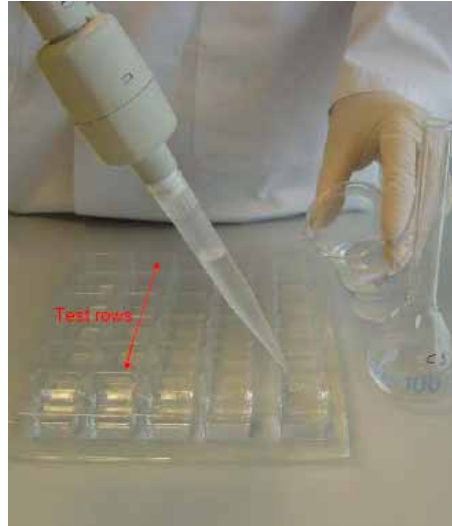
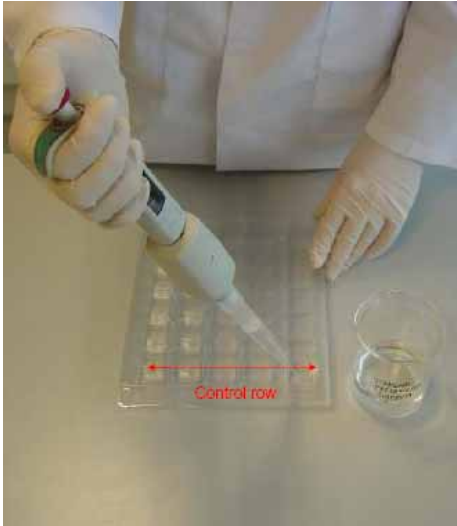


Προσθήκη δ/τος της τοξικής ουσίας μέχρι τα 100 ml στο δ/μα C₁ και μεταφορά 50 ml αυτού του δ/τος στο δ/μα C₂.



Διαδοχική επανάληψη της διαδικασίας.

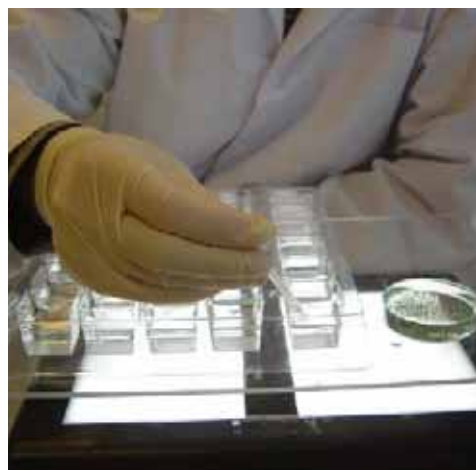
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Μεταφορά 10 ml συνθετικού νερού στα κατάλληλα δοχεία και προσθήκη 10 ml τοξικού δ/τος αντίστοιχα.

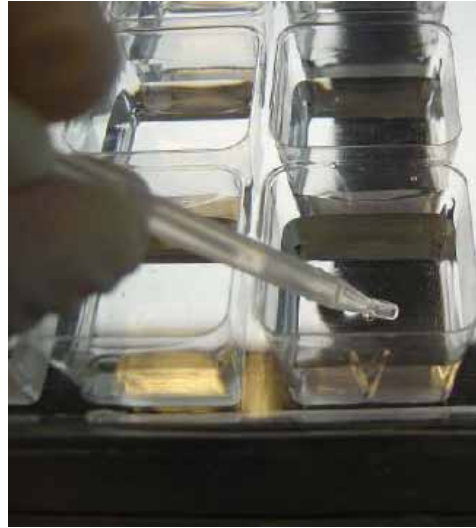


Εκκόλαψη των οι οργανισμών *Daphnia magna* μετά από επώαση 72 - 80 h.

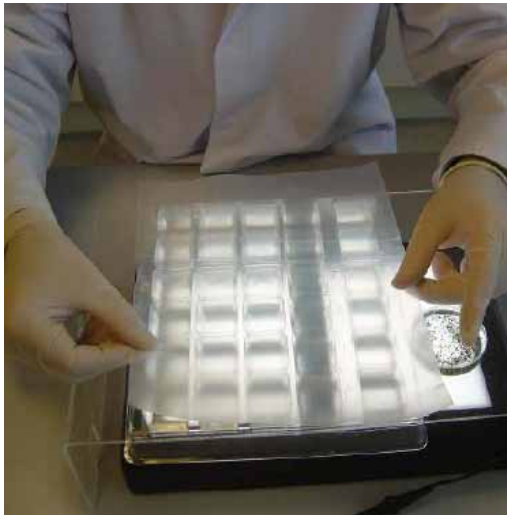


Αφού οι οργανισμοί ταϊστούν με *Spirulina* για 2h, στη συνέχεια 20 από αυτούς μεταφέρονται στα 5 δοχεία της 1^{ης} σειράς.

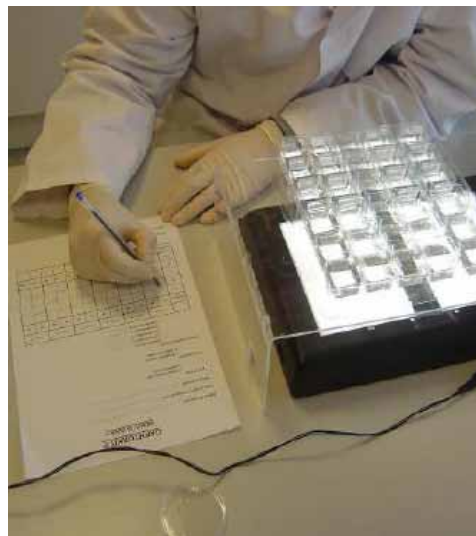
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Μεταφορά 5 οργανισμών από κάθε αρχικό δοχείο στα τέσσερα δοχεία της κάθε σειράς.



Τα δοχεία καλύπτονται με παραφίλμ και αφήνονται σε θάλαμο επώασης (20° C).



Μετά από 24 και 48 h επώασης τα δοχεία φέρονται σε φωτιζόμενη πλάκα και μετρώνται οι ζωντανοί οργανισμοί.

6.2.5.Βιβλιογραφία

1. Baird DJ, Barber I, Bradley M, Calow P, and. Soares AMVM. The Daphnia bioassay: a critique. *Hydrobiologia*, 1989, 188-189 (1): 403-406.
2. Versteeg DJ, Stalmanst M, Dyer SD, Janssen C. Ceriodaphnia and daphnia: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere*, 1997, 34 (4): 869-892.
3. EC. Method for the determination of ecotoxicity, part C2: Acute toxicity for Daphnia (Directive 92/69/EEC (Annex V, 1992 adaptation to 67/548/EEC)), Off J Eur. Comm, 1992, 383(L): 172-178.
4. Lilius H, Hastbacka T, Isomaa B. A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to Daphnia magna and Daphnia pulex. *Environ Toxicol Chem*, 1995, 14: 2085-2088.
5. Persoone G, Janssen CR. Freshwater invertebrate toxicity tests. In *Handbook of Ecotoxicology*, Edited by Calow P, Blackwell Scientific Publisher, Ambleside, UK 1993: 55-57.
6. U.S. EPA, Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, Fourth Edition, EPA/600/4-90/02TF, 1993: 293-296.
7. Zeman FA, Gilbin R, Alonzo F, Lecomte-Pradines C, Garnier-Laplace J, Aliaume C. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran Daphnia magna. *Aquat Toxicol*, 2008, 86: 370-378.
8. OECD. Daphnia magna reproduction test, guidelines for testing of chemicals. Rep. No. 211. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 1998.
9. Guilhermino L, Diamantino T, Silva C, Soares AMM. Acute Toxicity Test with Daphnia magna: An Alternative to Mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity? *Ecotoxicol Environ Saf*, 2000, 46: 357-362.
10. Pyatt FB, Storey DM. Toxicity testing using Daphnia magna Straus in student assessments of water pollution. *J Biol Educ*, 1999, 33(3): 164-170.

6.3. Πείραμα αναπτυξιακής τοξικότητας φύκους (Algal growth toxicity test, 96-hours)

Ο σκοπός της δοκιμασίας αυτής είναι να προσδιορίσει την τοξικότητα χημικών ουσιών σε ποικιλία φυκιών (algae) θαλάσσης και γλυκού νερού. Τα φύκη σε υδάτινα συστήματα είναι υπεύθυνα για ένα μεγάλο ποσοστό της πρωτογενούς παραγωγής οργανικής ύλης και οι επιπτώσεις της ρύπανσης στους μονοκύτταρους αυτούς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς μπορεί να είναι μεγάλης σημασίας και για το υδάτινο οικοσύστημα. Έχουν προσδιορισθεί αρκετοί οργανισμοί που συμβάλλουν στην πρωτογενή παραγωγή, και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.3. Οργανισμοί που προτείνονται από την ASTM (American Society of Testing Materials) για τη μελέτη των επιπτώσεων της ρύπανσης.

Γλυκό νερό:	Green algae: <i>Selenastrum capricornutum</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> Blue-green algae (bacteria): <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Anabena flos-aquae</i> Diatom: <i>Navicula pelliculosa</i>
Αλμυρό νερό:	Diatom: <i>Skeletonema costatum</i> , <i>Thalassiosira pseudonana</i> Flagellate : <i>Dunaliella tertiolecta</i>

Η μεθοδολογία για τοξικολογικά πειράματα με φύκη είναι αρκετά ελαστική για τη χρήση και άλλων ειδών φυκιών στα πειράματα αυτά. Ανάλογα με το είδος του οργανισμού χρησιμοποιούνται από 2×10^4 μέχρι 5×10^4 κύτταρα στις φιάλες δοκιμασιών και η συγκέντρωση κυττάρων προσδιορίζεται καθημερινά.

Ο πληθυσμός των φυκιών εκτίθεται σε μια σειρά διαλυμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης στην εξεταζόμενη χημική ένωση ή μείγμα για 96 h. Η απόκριση των οργανισμών παρακολουθείται με μετρήσεις των αλλαγών στη συγκέντρωση των κυττάρων (αριθμός κυττάρων/ml διαλύματος), μετρήσεις βιομάζας, χλωροφύλλης ή απορρόφησης. Η χλωροφύλλη μπορεί να μετρηθεί φασματοσκοπικά ή φθορισμομετρικά. Για τη μέθοδο αυτή απαιτείται μικροβιακή αποστείρωση των φιαλών για να μειωθεί στο ελάχιστο η μόλυνση των φυκιών από άλλα είδη και από βακτήρια. Τα βακτήρια μπορούν να διασπάσουν την τοξική ουσία και να μεταβάλλουν την τοξικότητα στο διάλυμα.

6.3.1. Χημικά αντιδραστήρια και οργανολογία

- Θάλαμο επώασης με λάμπα φθορισμού 4306 lux και θερμοστάτη ρυθμισμένο στους $(25 \pm 1^\circ \text{C})$
- Μηχανικό αναδευτήρα 100 (rpm)
- Απιονισμένο νερό
- Αναλυτικό ζυγό με ικανότητα ζύγισης 0.00001 g
- Γυάλινες ογκομετρικές φιάλες και κυλίνδροι (10-1000 mL)
- Γυάλινες πιπέτες 1-100 mL
- Φιάλες Erlenmeyer των 250 ml με ασάλινα πώματα για τη δοκιμασία
- Φιάλες Erlenmeyer των 4 L για τις καλλιέργειες
- Οργανισμοί (φύκη)
- Πεχάμετρο
- Όργανο μέτρησης πυκνότητας κυττάρων
- Φυγόκεντρος

6.3.2. Προετοιμασία του φύκους

Το είδος του φύκους που θα χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμασία τοξικότητας (π.χ. *Selenastrum capricornutum*) πρέπει πρώτα να καλλιεργηθεί. Αρχικά λαμβάνεται η καλλιέργεια εκκίνησης (start culture) από το εμπόριο, που συνήθως έχει όγκο 10 ml. Στη συνέχεια, 1 ml από την καλλιέργεια εκκίνησης φέρεται σε φιάλη Erlenmeyer των 125 ml και προστίθενται 25 ml θρεπτικού διαλύματος. Η καλλιέργεια αυτή (stock culture), φέρεται



σε θάλαμο επώασης, όπου η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους $25 \pm 1^\circ \text{C}$ και το διάλυμα αναδύεται με μηχανικό αναδευτήρα. Δύο φορές την ημέρα η καλλιέργεια πρέπει να αναδύεται χειροκίνητα. Μετά από μία εβδομάδα λαμβάνονται 2 ml από την καλλιέργεια και φέρονται σε 50-100 ml θρεπτικού διαλύματος. Κατά τις μεταφορές θα πρέπει όλα τα σκεύη να είναι αποστειρωμένα ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση των καλλιεργειών με μικροοργανισμούς. Στη δοκιμασία αναπτυξιακή τοξικότητας του φύκους χρησιμοποιούνται φύκη τα οποία είναι προέκυψαν από καλλιέργειες 4 - 7 ημερών.

Πίνακας 6.4. Συγκεντρώσεις χημικών ενώσεων στο θρεπτικό διάλυμα.

Χημική ένωση	Συγκέντρωση (μg/L)
H ₃ BO ₃	185.0
MnCl ₂ 4H ₂ O	416.0
ZnCl ₂	3.27
CoCl ₂ 6H ₂ O	1.43
CuCl ₂ 2H ₂ O	0.012
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	7.26
FeCl ₃ 6H ₂ O	160.0
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	300.0
Na ₂ SeO ₄	2.39

6.3.3. Η διαδικασία του εμβολιασμού

Κατά τη δοκιμασία αναπτυξιακής τοξικότητας του φύκους, ο εμβολιασμός θα πρέπει να γίνεται το πολύ 2-3 h πριν την έναρξη της δοκιμασίας, χρησιμοποιώντας φύκη που προέκυψαν από αποθεματικές καλλιέργειες 4-7 ημερών. Κάθε ml εμβολίου πρέπει να περιέχει αρκετά κύτταρα ώστε να παρέχει αρχική πυκνότητα κυττάρων ~ 10.000 cells/mL (\pm 10%) στα δοκιμαστικά δοχεία. Δεδομένου ότι στη δοκιμασία χρησιμοποιούνται δοχεία των 250 ml, όπου το καθένα περιέχει 100 ml διαλύματος, το εμβολιασμένο δείγμα πρέπει να περιέχει 1.000.000 cells/mL.

Θα πρέπει σε πρώτο στάδιο να γίνει μια εκτίμηση του όγκου της αποθεματικής καλλιέργειας. Για παράδειγμα, εάν η 4-7 ημερών αποθεματική καλλιέργεια που θα χρησιμοποιηθεί για τον εμβολιασμό έχει πυκνότητα κυττάρων 2.000.000 cells/mL, η δοκιμασία που θα χρησιμοποιήσει 24 δοχεία, όπου το καθένα θα περιέχει 100 mL διαλύματος δοκιμασίας και θα πρέπει να εμβολιαστεί με 1.000.000 κύτταρα, απαιτεί 24.000.000 κύτταρα ή 15 mL αποθεματικού διαλύματος (24.000.000/2.000.000). Συνίσταται να προετοιμάζεται 20-50 % μεγαλύτερος όγκος αποθεματικού διαλύματος για την περίπτωση απωλειών ή ατυχημάτων κατά τους εμβολιασμούς.

$$\text{Όγκος (mL) της αποθεματικής καλλιέργειας που απαιτείται} = \frac{\text{Αριθμός των δοχείων} \times \text{Όγκος του δ/τος δοκιμασίας/δοχείο} \times 10.000 \text{ cells/mL}}{\text{Πυκνότητα των κυττάρων στην αποθεματική καλλιέργεια}}$$

6.3.4. Έναρξη και τερματισμός της δοκιμασίας

- Βάλτε ετικέτες στις δοκιμαστικές φιάλες. Κάθε δοκιμασία γίνεται εις τριπλούν. Απαιτείται ένα ελάχιστος αριθμός 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων της εξεταζόμενης χημικής ουσίας ή μείγματος και ένα δείγμα αναφοράς για κάθε διαφορετική συγκέντρωση. Τοποθετείστε τα δοχεία της δοκιμασίας σε τυχαία διάταξη.
- Η δοκιμασία ξεκινά όταν προστεθούν τα φύκη στα δοχεία. Αναμείξτε την αποθεματική καλλιέργεια καλά και προσθέστε 1 mL αυτής σε κάθε δοκιμαστικό δοχείο. Κάντε ένα τελικό έλεγχο της πυκνότητας των κυττάρων σε τρία από τα διαλύματα δοκιμασίας τη στιγμή '0' (εντός 2 h από τον εμβολιασμό).
- Μετρήστε την αλκαλικότητα και η σκληρότητα του διαλύματος σε υψηλή, μεσαία και χαμηλή συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας και μείγματος, καθώς επίσης και του διαλύματος αναφοράς.
- Οι δοκιμαστικές φιάλες επωάζονται υπό συνεχή φωτισμό $86 \pm 8.6 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ και σε θερμοκρασία $25 \pm 1^\circ\text{C}$, και πρέπει να αναδεύονται συνεχώς στα 100 rpm σε μηχανικό αναδευτήρα ή δύο φορές την ημέρα χειροκίνητα. Οι θέσεις των δοκιμαστικών δοχείων θα πρέπει να αλλάζουν ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι επιδράσεις των διαφορών φωτισμού και θερμοκρασίας στο ρυθμό ανάπτυξης.
- Κατά τις δοκιμασίες δεν απαιτείται αερισμός.
- Θα πρέπει να μετράται η θερμοκρασία καθημερινά στα δοχεία αναφοράς.

Η δοκιμασία τελειώνει μετά από 96 h επώασης. Υπολογίζεται η ανάπτυξη των φυκιών με τη μέθοδο μέτρησης των κυττάρων. Πριν τη μέτρηση των κυττάρων στο δείγμα θα πρέπει κάθε δοχεία αναδευτεί καλά και στη συνέχεια να ληφθεί με πιπέτα του 1 ml δείγμα γρήγορα και τοποθετηθεί στο κατάλληλο όργανο. Στη συνέχεια προστίθενται 9 ή 19 mL ηλεκτρολύτη και προσδιορίζεται η πυκνότητα των κυττάρων του δείγματος.

6.3.5. Αποτελέσματα

Για να είναι αποδεκτά τα αποτελέσματα θα πρέπει η πυκνότητα των φυκιών στα δοχεία αναφοράς να μην υπερβαίνει την τιμή $1 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ με EDTA ή $2 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ χωρίς EDTA, στο τέλος τη δοκιμασίας και να μην διαφέρουν οι αντίστοιχες τιμές περισσότερο από 20% μεταξύ των ίδιων συγκεντρώσεων διαλυμάτων.

Πίνακας 6.4. Παράδειγμα αποτελεσμάτων δοκιμασίας τοξικότητας 96 h σε φύκη.

		Συγκέντρωση τοξικής ουσίας (μg Cd/mL)					
Δείγμα	Αναφοράς	5	10	20	40	80	
A	1209	1212	826	493	127	49.3	
B	1180	1186	628	416	147	40.0	
C	1340	1204	816	413	147	44.0	
Log ₁₀	A	3.082	3.084	2.917	2.693	2.104	1.693
	B	3.072	3.074	2.619	2.619	2.167	1.602
	C	3.127	3.081	2.616	2.616	2.167	1.643
Μέσος όρος	3.094	3.080	2.876	2.643	2.146	1.646	

Μετά από κατάλληλη μαθηματική επεξεργασία και πολύπλοκους υπολογισμούς προκύπτει η τιμή LC₅₀ (βλέπε οδηγίες της EPA/600/4-91/002 July 1994).

6.3.6. Παράδειγμα διεξαγωγής τη δοκιμασίας αναπτυξιακής τοξικότητας φύκους (Algal growth toxicity test, 96-hours).

Στο ακόλουθο παράδειγμα περιγράφονται όλα τα στάδια της δοκιμασίας αναπτυξιακής τοξικότητας φύκους για 96-h με τη χρήση του Algaltox-kit ξεκινώντας με την προετοιμασία του θρεπτικού διαλύματος και φτάνοντας μέχρι την μέτρηση της απορρόφησης μετά από 24 h, 48 h, 72 h έκθεσης.



Προετοιμασία του θρεπτικού διαλύματος από τα δ/τα A, B, C, D

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Ρύθμιση του pH του θρεπτικού δ/τος



Ενεργοποίηση του φύκους



Ανάδευση του φύκους μέχρι την πλήρη διάλυση των σφαιροειδών φυκιών



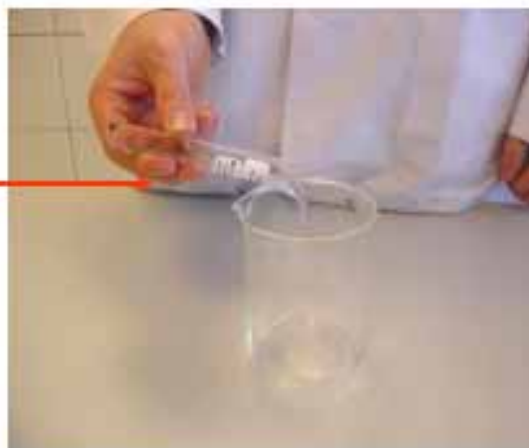
Φυγοκέντρηση



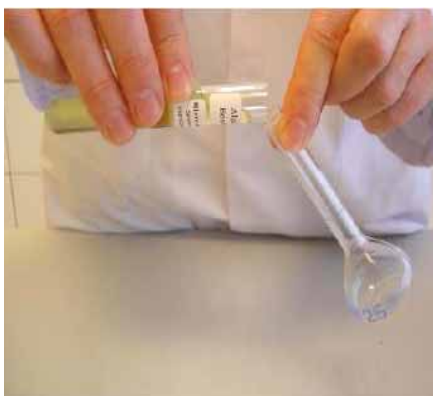
Μεταφορά του υπερκείμενου υγρού



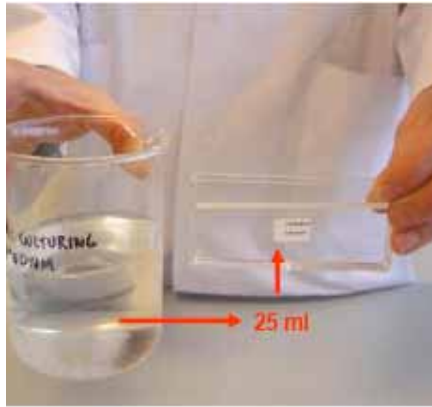
Προσθήκη 10 ml απεσταγμένου ύδατος



Φυγοκέντρηση



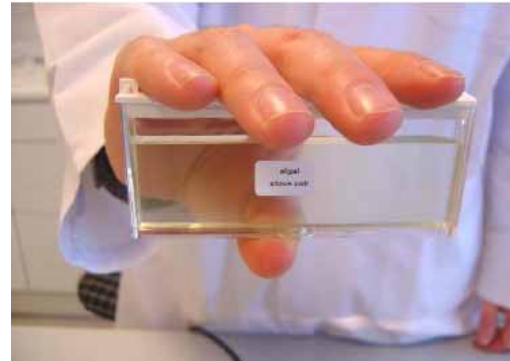
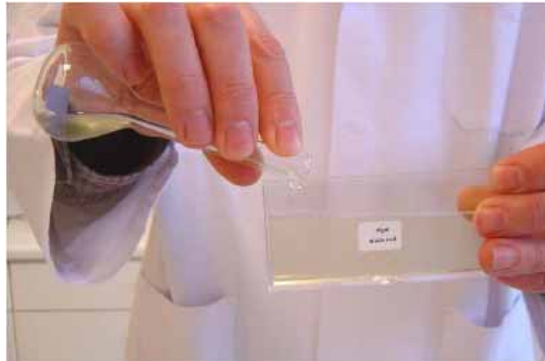
Προετοιμασία της καλλιέργειας φυκιών



Προσθήκη του θρεπτικού δ/τος στην κυψελίδα.



Ρύθμιση του μηδενός στα 670nm.

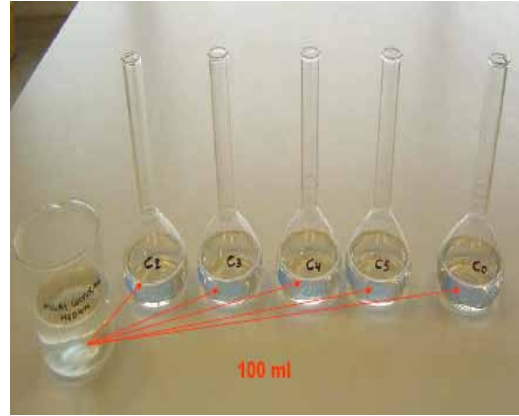


Μεταφορά 25 ml δ/τος φύκους στην κυψελίδα και ανάδευση.

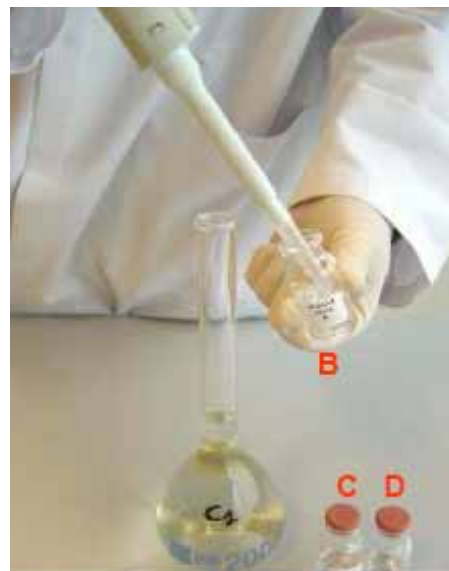


Μέτρηση της απορρόφησης (OD1) μετά από 10 sec που αντιστοιχεί σε N1 αριθμό κυττάρων. Στη συνέχεια υπολογίζεται η απαιτούμενη αραιώση ώστε ο αριθμός των κυττάρων $N2 = 1 \cdot 10^6$ φύκη/ml (OD2).

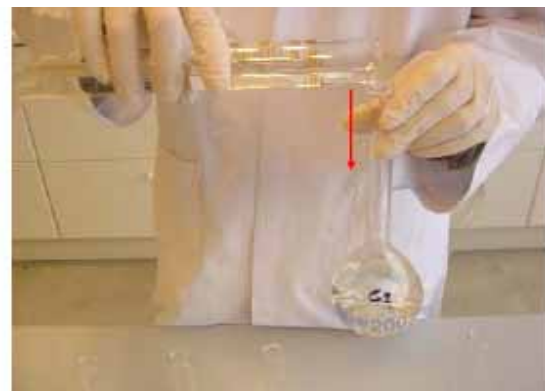
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Τα δείγματα για να μην είναι θολά πρέπει να διηθούνται σε ηθμό 0.45 μm . Στη συνέχεια προσθέτουμε 100 ml διαλύματος καλλιέργειας σε ογκομετρικές των 200 ml C_0 , C_1 , C_2 , C_3 , C_4 και C_5 .

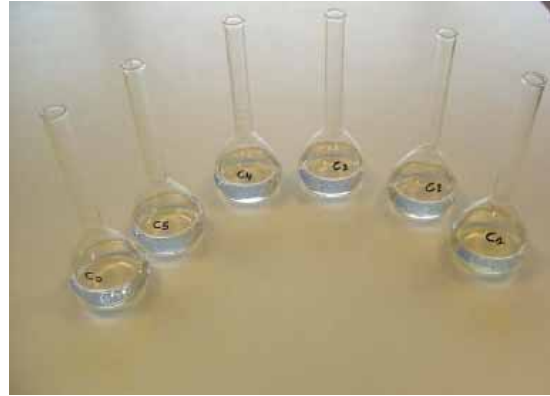
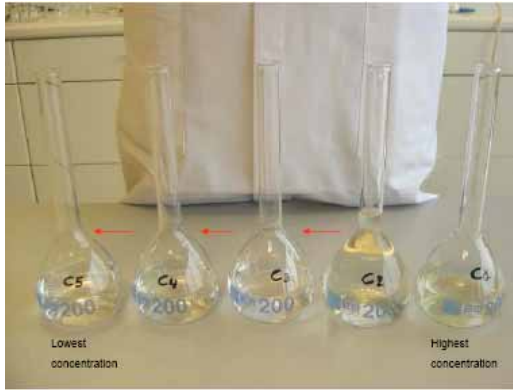


Αφού προσθέσουμε 100 ml δείγματος στην ογκομετρική C_1 προσθέτουμε 2 ml δ/τος A και 0.2 ml από τα δ/τα B, C και D.



Στην συνέχεια παίρνουμε 100 ml από το C_1 και το προσθέτουμε στο C_2 .

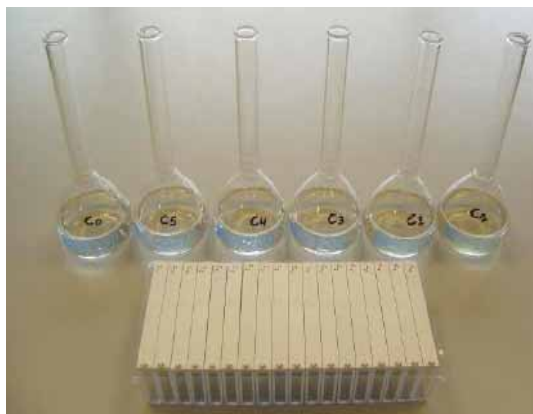
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Την διαδικασία αυτή την επαναλαμβάνουμε διαδοχικά και για τα υπόλοιπα δ/τα και στο τέλος αφαιρούμε 100 ml δ/τος από το C₅ για να έχουν όλες οι ογκομετρικές 100 ml δ/τος.



Σε κάθε δείγμα προσθέτουμε 1 ml δ/τος καλλιέργειας ($1 \cdot 10^6$ φύκη/ml), οπότε σε κάθε δοχείο θα έχουμε αρχικά $1 \cdot 10^4$ φύκη/ml.



Στη συνέχεια φέρουμε τα δείγματα στις κυψελίδες και τις τοποθετούμε τυχαία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Ακολουθεί επώαση για 72 h σε λάμπα 10000 lux και θερμοκρασία $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.



Μέτρηση της απορρόφησης μετά από 24 h, 48 h, 72 h και 96 h έκθεσης.

6.3.7. Βιβλιογραφία

1. Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.5400 Algal Toxicity, Tiers I and II.
2. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, DC, 1975.
3. Payne AG, Hall RH. A method for measuring algal toxicity and its application to the safety assessment of new chemicals. pp 171-180 in Marking LL and Kimerle RA (eds.). Aquatic Toxicology, ASTM STM 667, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1979.
4. Walsh GE. Cell death and inhibition of population growth of marine unicellular algae by pesticides. Aquatic Toxicology, **3**: 209-214, 1983.
5. Bruce RD, Versteeg DJ. A statistical procedure for modeling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, **11**:1485-1494, 1992.
6. Lewis MA. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. Environ Pollut, **87 (3)**: 319-336, 1995.
7. ASTM. Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae. E 1218-97a. In: 1998 Annual Book of Standards, Section 11 Water and Environmental Technology. Volume 11.05 Biological Effects and Environmental Fate, Biotechnology, Pesticides, 1998.
8. Ward TJ, Rausina GA, Stonebraker PM, Robinson WE. Apparent toxicity resulting from the sequestering of nutrient trace metals during standard *Selenastrum capricornutum* toxicity tests. Aquatic Toxicology, **60**: 1-16, 2002.
9. Geoffroy L, Gilbin R, Simon O, Floriani M, Adam C, Pradines C, Cournac L, Garnier-Laplace J. Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquatic Toxicology, **83**: 149-158, 2007.
10. Βαλαβανίδης Α. Βλαχογιάννη Θ. Περιβαλλοντική Χημεία & Οικτοξικολογία, Διαχείριση Οικοσυστημάτων και οικολογικού κινδύνου. Τμήμα Χημείας, Σύγχρονα Θέματα, Αθήνα 2008.

6.4. Δοκιμασία *Microtox*

Η δοκιμασία οξείας τοξικότητας *Microtox* υπήρξε καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη απλών δοκιμασιών τοξικότητας σε επίπεδο μικροκλίμακας. Τα κύρια χαρακτηριστικά της δοκιμασίας αυτής είναι η ταχύτητα, η απλότητα, η επαναληψιμότητα, η ακρίβεια, η ευαισθησία, το χαμηλό κόστος, η αποτελεσματικότητα και η ευχρηστία της.

Η δοκιμασία *Microtox* χρησιμοποιεί συγκεκριμένο είδος φθορίζοντων βακτηρίων, τα οποία αρχικά βρίσκονται σε λυοφιλιωποιημένη μορφή. Η δοκιμασία *Microtox* είναι μια πρότυπη δοκιμασία τοξικότητας που μπορεί να εφαρμοστεί εναλλακτικά αντί των παραδοσιακών, συχνά πολύπλοκων και πολύ πιο δαπανηρών δοκιμασιών που χρησιμοποιούν ασπόνδυλα και ψάρια. Η δοκιμασία *Microtox* εφαρμόζεται με μεγάλη επιτυχία για μεγάλη ποικιλία δειγμάτων:

- Σε λυμματολάσπη από μονάδες κατεργασίας υδάτινων αποβλήτων.
- Σε επιφανειακά νερά, για τον έλεγχο και τη συνεχή παρακολούθηση της ποιότητας του ύδατος για την αναγνώριση σημειακών και μη σημειακών πηγών ρύπανσης.
- Σε πόσιμο νερό για την ανίχνευση πιθανής ρύπανσης, επιμόλυνσης.
- Σε ιζήματα και δοκιμασίες εδάφους.
- Κατά την παρακολούθηση διαδικασιών αποκατάστασης.
- Σε μετρήσεις φυτοδραστικών ουσιών (ζιζανιοκτόνων) σε βιομηχανικά νερά.
- Σε αξιολογήσεις και καταχωρίσεις προϊόντων (product evaluation & registration).

6.4.1. Μεθοδολογία για τη δοκιμασία *Microtox*

Η δοκιμασία *Microtox* στηρίζεται στη χρήση του φθορίζοντων βακτηρίων *Vibrio fischeri* NPPA B11177, τα οποία προέρχονται από καλλιέργειες που ελαχιστοποιούν τις πιθανές γενετικές διαφοροποιήσεις και διασφαλίζουν τη μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία της μεθόδου. Τα βακτήρια αποθηκεύονται σε ξηρή μορφή υπό κενό και όταν αναπτύσσονται παράγουν φως ως παραπροϊόν της κυτταρικής τους αναπνοής. Η έκθεση των βακτηρίων σε δείγμα που περιέχει τοξικές χημικές ουσίες οδηγεί στην αναστολή της διαδικασίας της αναπνοής με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση του φθορίζοντος φωτός (φωταύγεια). Όσο μεγαλύτερη η τοξικότητα του δείγματος τόσο μεγαλύτερη η εκατοστιαία μείωση του φωτός. Η μείωση αυτή δύναται να μετρηθεί αυτόματα με χρήση τυφλού δείγματος.

Προετοιμασία δείγματος: Το δείγμα που θα εξεταστεί πρέπει να είναι σε υγρή μορφή, διαλυμένο είτε σε νερό είτε σε οργανικό διαλύτη. Ωστόσο, η συμβατότητα του οργανικού διαλύτη με τη δοκιμασία Microtox θα πρέπει να ελεγχθεί. Έχει βρεθεί ότι οι πιο συμβατοί οργανικοί διαλύτες είναι η ακετόνη, η αιθανόλη και το DMSO.

Εξοπλισμός: Για τη δοκιμασία Microtox απαιτείται μια συσκευή Microtox, η οποία διαθέτει έναν θάλαμο επώασης και ένα φθορισμόμετρο. Στο πάνω τμήμα της συσκευής υπάρχουν 30 υποδοχές ελεγχόμενης θερμοκρασίας (15°C), έχουν οριζόντιες γραμμές (A-F) και στήλες (1-5). Επίσης, υπάρχει μια υποδοχή για stock καλλιέργεια βακτηρίων (Reagent) που διατηρείται σε θερμοκρασία 5°C. Στη θέση A1 τοποθετείται το τυφλό και στις θέσεις από A2 έως A5 τέσσερα δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης.



Σχήμα 6.6. Συσκευή δοκιμασίας Microtox.

Προετοιμασία βακτηρίων: Τα λυοφιλοποιημένα βακτήρια ενυδατώνονται με ειδικό διάλυμα (reconstitution solution) το οποίο τα ενεργοποιεί.

Προετοιμασία δειγμάτων: Προστίθενται 2ml διαλύτη (diluent) στην κυψελίδα A5, 1ml διαλύτη σε κάθε μια από τις τέσσερις κυψελίδες της σειράς A και 0.5ml διαλύτη στις κυψελίδες της σειράς B. Στη συνέχεια προστίθεται το εξεταζόμενο δείγμα στην κυψελίδα A5. Ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex και στη συνέχεια λαμβάνεται 1ml από την κυψελίδα A5 και μεταφέρεται στην κυψελίδα A4. Ακολουθεί ανάδευση και στη συνέχεια 1ml μεταφέρεται από την κυψελίδα A4 στην A3. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται όμοια και για την κυψελίδα A2. Μετά την ανάδευση της κυψελίδας

A2 απομακρύνεται 1ml δείγματος ώστε ο τελικός όγκος αυτού στην κυψελίδα να είναι 1ml. Η κυψελίδα A1 περιέχει το δείγμα αναφοράς (τυφλό). Στη συνέχεια σε κάθε μία από τις κυψελίδες της σειράς B μεταφέρονται 10μl του διαλύματος των βακτηρίων και ακολουθεί ανάδευση ώστε να διασκορπιστούν τα βακτήρια. Στη συνέχεια αφού εισαχθούν οι κατάλληλες παράμετροι στη συσκευή Microtox ξεκινάνε οι μετρήσεις των δειγμάτων. Φέρονται 0.5ml δείγματος από την κυψελίδα A5 στην B5. Τα δείγμα αφήνεται για κάποιο χρονικό διάστημα 5 ή 15 min σε 15°C και στη συνέχεια ακολουθεί η μέτρηση. Αντίστοιχα, μεταφέρονται 0.5ml δείγματος από την κυψελίδα A4 στη B4 και μετά από 5 ή 15 min ακολουθεί η μέτρηση.



Σχήμα 6.7. Βασικά στάδια της δοκιμασίας Microtox.

Στη συνέχεια η τιμή EC_{50} προκύπτει από τη γραφική παράσταση της της έντασης της γάμμα ακτινοβολίας συναρτήσει της συγκέντρωσης του δείγματος σε κλίμακα log-log. Απαιτούνται τουλάχιστον 3 σημεία δεδομένων για να χαραχτεί η γραμμή τάσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι επειδή η παραγωγή φωτός από τα βακτήρια με το πέρασμα του χρόνου φθίνει, θα πρέπει αυτή να ελέγχεται. Σε περίπτωση που το τυφλό δείγμα παρουσιάσει εκπομπή φωτός μικρότερη του 90%, οι καλλιέργεια των βακτηρίων θα πρέπει να αντικατασταθεί. Συνήθως, κάθε καλλιέργεια βακτηρίων έχει περίπου 2-4 h αποδεκτή φυσιολογική δραστηριότητα. Η ένταση της γάμμα ακτινοβολίας προκύπτει από τη σχέση:

$$\Gamma = I_0 / I_t - 1$$

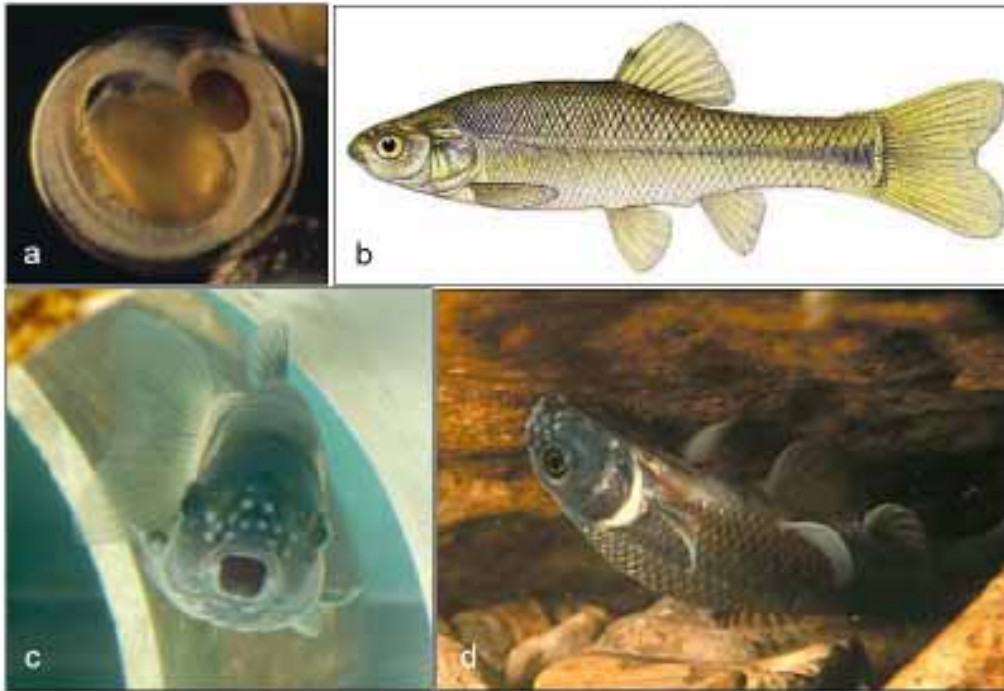
Όπου, I_0 = η ακτινοβολία εκπομπής των βακτηρίων που έχει χαθεί, I_t = η τελική τιμή εκπεμπόμενης ακτινοβολίας μετά την έκθεση των βακτηρίων.

6.4.2. Βιβλιογραφία

1. Hinwood AL, McCormick MJ. The effect of ionic solutes on EC50 values measured using the Microtox test. *Toxicol Assessment*, **2**: 499-502, 1987.
2. Ingersoll CG, Nelson, MK. Testing sediment toxicity with *Hyalella azteca* (amphipoda) and *Chironomus riparius* (diptera), In: Landis WG, van der Schalie WH (eds). *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*. 13th volume, ASTM STP 1096, ASTM, Philadelphia, PA, 1990: 93-109.
3. USEPA. Technical support document for water-quality based toxic control. EPA 505/2-90/001. USEPA, Washington, DC, 1991.
4. USEPA. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA 600/R-94/024, USEPA, Office of Research and Development, Duluth, MN. 1994.
5. Doherty FG. A Review of the Microtox super Toxicity Test System for Assessing the Toxicity of Sediments and Soils. *Water Qual Res J Can*, 2001, **36 (3)**: 475-518.
6. ASTM (American Society for Testing and Materials). 2002. Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, E1706-00, In *Annual Book of ASTM standards*, Vol. 11.05, Weste Conshohochen, PA, USA, 2002.
7. Burton GA, Denton D, Ho KT, Ireland DS. Sediment toxicity testing, issues and methods in quantifying and measuring ecotoxicological effects. In: Hoffman D, Rattner D, Burton Jr, GA, Cairns JJ (eds). *Handbook of Ecotoxicology*. CRC Press/Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 2002.
8. De Besten PJ, Munawar M. *Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems: Emerging Techniques, Trends and Strategies*. Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2005: 41-42.
9. Summary of Microtox toxicity test systems. Science Lives. <http://www.sciencelives.com/microtox.html>, 2008.

6.5. Δοκιμασία τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών (FET)

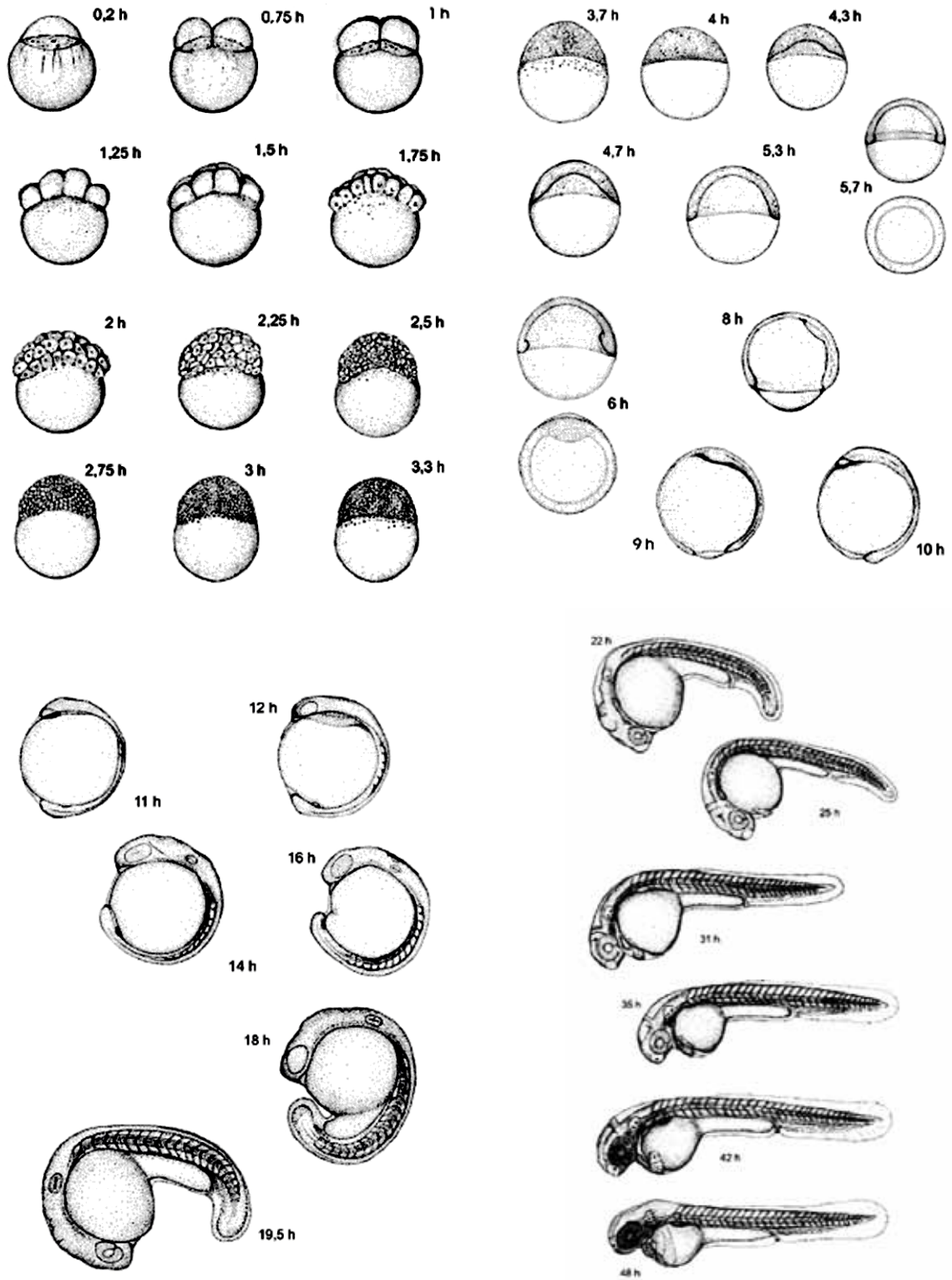
Η δοκιμασία τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών γνωστή ως δοκιμασία FET (Fish Embryo Toxicity) εφαρμόζεται κυρίως σε ψάρια *Danio rerio* (zebrafish) ή *Pimephales promelas* (fathead minnow). Η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των θανατηφόρων επιδράσεων χημικών ουσιών σε εμβρυικά στάδια ανάπτυξης ψαριών και αποτελούν μια εναλλακτική δοκιμασία οξείας τοξικότητας έναντι των δοκιμασιών σε ψάρια.



Σχήμα 6.8. Φωτογραφίες *Pimephales promelas* (α) έμβρυο, (β) θηλυκό ψάρι, (γ, δ) αρσενικό ψάρι.

Έμβρυα ψαριών *Danio rerio* εκτίθενται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της υπό εξέταση χημικής ουσίας, αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και η δοκιμασία ολοκληρώνεται μετά από 48h. Στη συνέχεια προσδιορίζονται οι LC₅₀, NOEC και LOEC τιμές σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς. Η δοκιμασία πραγματοποιείται με τη χρήση τουλάχιστον 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων της χημικής ουσίας, κατάλληλα τυφλά δείγματα και 10 έμβρυα για κάθε έκθεση. Η δοκιμασία για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιείται εις διπλούν ή εις τριπλούν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Σχήμα 6.9. Επιλεγμένα στάδια της ανάπτυξης των εμβρύων ψαριών *Danio rerio*.

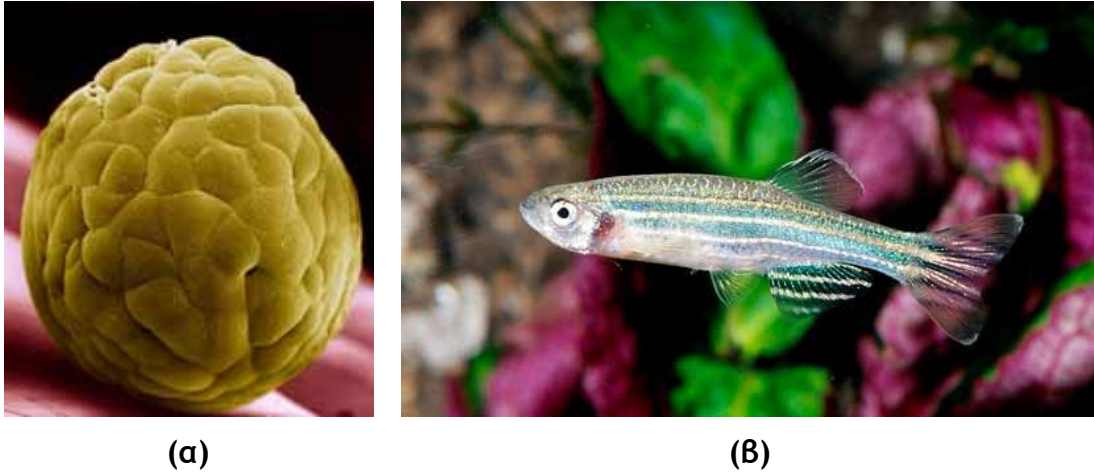
6.5.1. Παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας FET

Η διαλυτότητα κι η πίεση ατμών της εξεταζόμενης χημικής ουσίας πρέπει να είναι γνωστή, καθώς επίσης θα πρέπει να υφίσταται κάποια αναλυτική μέθοδος για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χημικής ένωσης στα υπό εξέταση δείγματα. Πριν την έναρξη της βιο-δοκιμασίας πρέπει να είναι γνωστά για την εξεταζόμενη χημική ένωση η δομή της, η καθαρότητα της, η σταθερότητα της σε υδατικά διαλύματα και στο φως, η pK_a και η K_{ow} .

Συνήθως χρησιμοποιούνται πλακίδια έκθεσης των 2.5 - 5 ml κατασκευασμένα από γυαλί ή πολυστυρένιο, τα οποία θα πρέπει να τοποθετούνται τυχαία στο χώρο έκθεσης. Για τη διατήρηση των ψαριών θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό παρασκευασμένο με βάση τα πρότυπα ISO ή νερό που έχει διηθηθεί με ενεργό άνθρακα και θα πρέπει να έχει σταθερή σύσταση κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας. Το pH το νερού μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 6.8 -8.0. Η θερμοκρασία στις δεξαμενές θα πρέπει να βρίσκεται στους $26 \pm ^\circ C$ και το οξυγόνο στο 80%. Η σκληρότητα του ύδατος θα πρέπει να είναι ισοδύναμο με 150-175 mg/L $CaCO_3$. Το νερό θα πρέπει να ελέγχεται κάθε τρεις μήνες για βαρέα μέταλλα (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), για ανιόντα και κατιόντα (π.χ. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), φυτοφάρμακα (οργανοφωσφορικές και οργανοχλωριωμένες ενώσεις) και για ολικό οργανικό άνθρακα.

Για την παραγωγή αυγών χρησιμοποιούνται υγιή ώριμα ψάρια ηλικίας 4-12 μηνών τα οποία διατηρούνται σε ενυδρεία (1 L νερού/ψάρι) με συγκεκριμένη περίοδο φωτισμού 12-16 h. Θα πρέπει να χορηγείται τροφή στα ψάρια 3-5 φορές την ημέρα όταν πρόκειται για ξηρή τροφή και 1 φορά την ημέρα όταν πρόκειται για φρέσκια τροφή (*Artemia nauplii*).





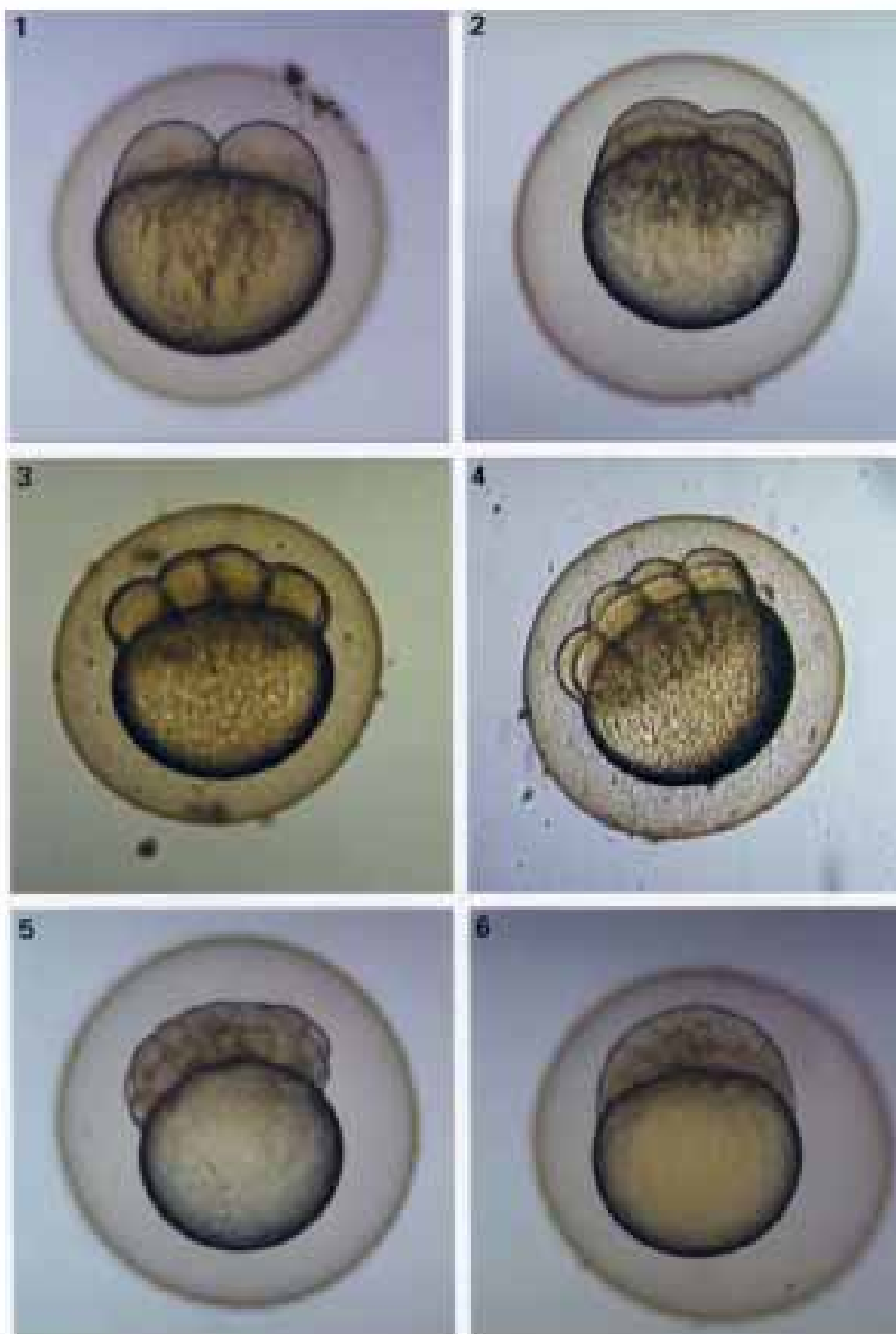
Σχήμα 6.10. Φωτογραφία από (α) αυγό και (β) ενήλικου ψαριού *Danio rerio*.

6.5.2. Μεθοδολογία για τη δοκιμασία FET

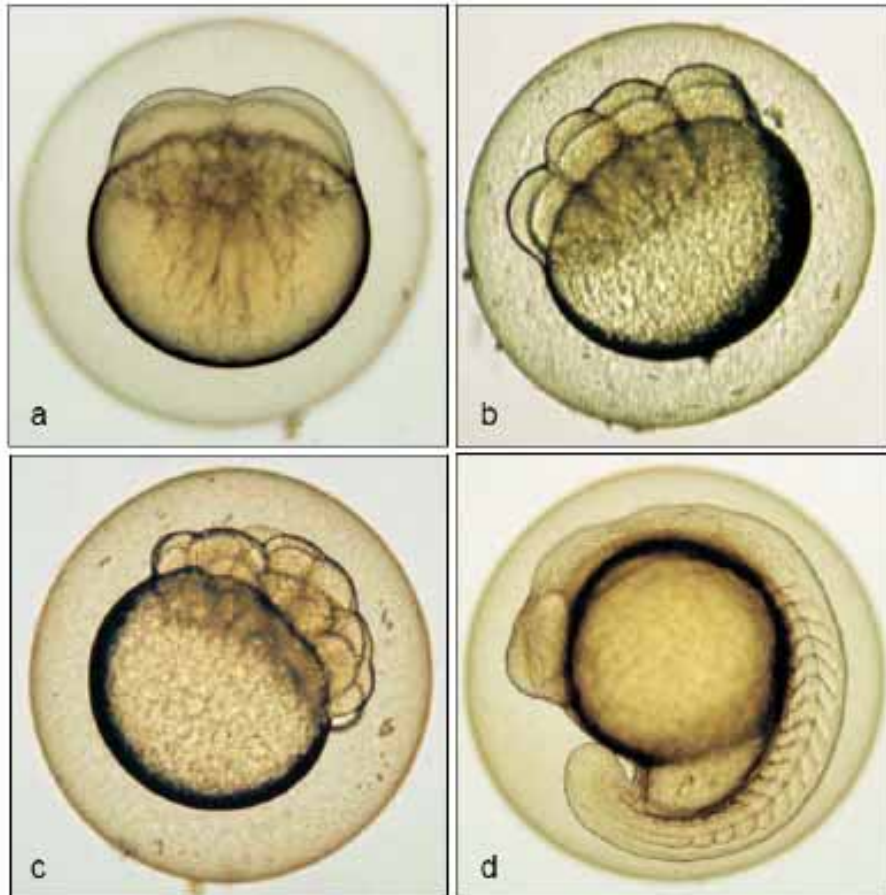
Έναρξη της έκθεσης και διάρκεια της δοκιμασίας: Η δοκιμασία ξεκινά αμέσως στα δισκία έκθεσης κατά προτίμηση πριν την έναρξη της διαίρεσης του βλαστικού κυττάρου. Με τη βοήθεια στερεο-μικροσκοπίου με ικανότητα μεγέθυνσης 30-φορές, τα γονιμοποιημένα αυγά διαχωρίζονται από τα μη γονιμοποιημένα και στη συνέχεια μεταφέρονται στα δείγματα με τη βοήθεια πιπέττας ή ηθμού. Τα γονιμοποιημένα αυγά τοποθετούνται σε κατάλληλες υποδοχές των 2 ml στις οποίες προστίθεται το εξεταζόμενο δείγμα, ενώ στις εναπομένουσες 4 υποδοχές τοποθετούνται 4 αυγά και προστίθεται νερό (τυφλό).

Συγκεντρώσεις δειγμάτων: Παρασκευάζονται τουλάχιστον 5 διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης στην εξεταζόμενη χημική ουσία. Η υψηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να οδηγεί σε θάνατο σε ποσοστό 100% και η χαμηλότερη συγκέντρωση δεν θα πρέπει να επιφέρει καμιά επίδραση στα έμβρυα των ψαριών.

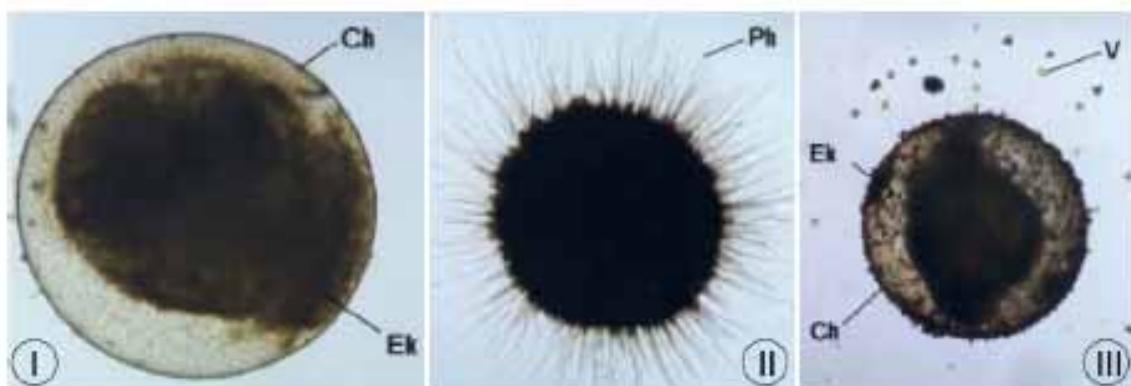
Παρατηρήσεις: Η επιβίωση των γονιμοποιημένων αυγών στα τυφλά δείγματα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 90%. Πήξη των εμβρύων, ανωμαλίες κατά την ανάπτυξη τους, μη αποκόλληση της ουράς καθώς και απουσία των χτύπων της καρδιάς θεωρούνται ως τα τελικά σημεία της δοκιμασίας. Συνήθως η παρακολούθηση των τελικών αυτών σημείων μετά από 24 h ή 48 h είναι επαρκής. Τα έμβρυα των ψαριών *Danio rerio* θεωρούνται νεκρά εάν καταγραφεί ως θετικό ένα από τα προαναφερθέντα τελικά σημεία.



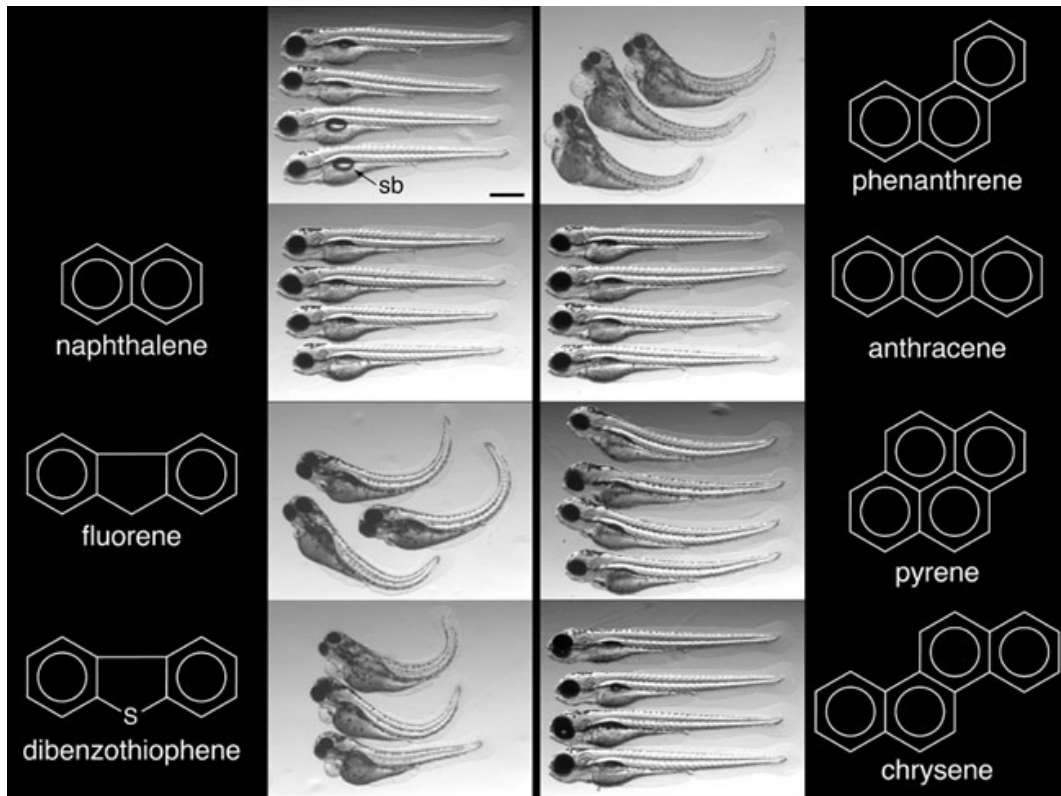
Σχήμα 6.11. Κανονική ανάπτυξη των εμβρύων ψαριών *Danio rerio* μετά από: (1) 0.75 h; (2) 1 h; (3) 1.2 h; (4) 1.5 h; (5) 4.7 h; (6) 5.3 h.



Σχήμα 6.12. Επιλεγμένα στάδια της ανάπτυξης των εμβρύων ψαριών *Danio rerio* μετά από: (α) 4-κύτταρο στάδιο (~ 1 h), (β) 16-κύτταρο στάδιο (~ 1.3 h), (γ) 64-κύτταρο στάδιο (~ 1.8 h), (δ) αποκόλληση της ουράς (~ 17.5 h).



Σχήμα 6.13. Θνησιμότητα εμβρύων ψαριών *Danio rerio*: (α) πήξη, (β) σφοδρή προσβολή από μύκητες, (γ) εισβολή από *Vorticella* sp. (Ch: chorion, Ek: coagulated egg, Ph: fungi).



Σχήμα 6.14. Επίδραση διαφόρων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων στην ανάπτυξη εμβρύων *Danio rerio*.

6.5.3. Βιβλιογραφία

1. Braunbeck T, Lammer E. Background Paper on Fish embryo toxicity assays. German Federal Environment Agency. March 30, 2006.
2. OECD. Guideline for testing of Chemicals. Fish Embryo Toxicity (FET) Test. May 30, 2006.
3. Braunbeck T, Böttcher M, Hollert H, Kosmehl T, Lammer E, Leist, E, Rudolf M, Seitz, N. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. ALTEX, 2005, **22**: 87-102.
4. OECD. Test Guideline 203. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Fish, Acute Toxicity Test. 1992. [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
5. Lange M, Gebauer W, Markl J, Nagel R. Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RGT-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere, 1995, **30/11**: 2087-2102.

6.6. Δοκιμασία τοξικότητας σε μύδια (48-hours)

Τα δίθυρα είναι υδρόβιοι οργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως βιολογικοί δείκτες και έχουν καθιερωθεί από διεθνή προγράμματα, όπως το “International Mussel Watch” ως δείκτες για την παρακολούθηση των επιπέδων ρύπανσης στα υδάτινα συστήματα.

Τα δίθυρα των θαλάσσιων οικοσυστημάτων είναι βενθικοί οργανισμοί με αποτέλεσμα να δέχονται τις επιδράσεις ποικίλων ανθρωπογενών δραστηριοτήτων, που δύνανται να επιφέρουν μέσω της ρύπανσης δυσμενείς επιδράσεις στους βιολογικούς οργανισμούς. Πρόκειται για οργανισμούς που καίρουν ευρείας γεωγραφικής εξάπλωσης, είναι εύχρηστοι, είναι ανθεκτικοί στη ρύπανση, είναι προσκολλημένοι σε κατάλληλο υπόστρωμα κάποιας περιοχής, οπότε αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα ρύπανσης αυτής και διηθούν μεγάλες ποσότητες ύδατος (βιοσυσσωρεύουν ρύπους), οπότε καθίστανται κατάλληλοι για μελέτες παρακολούθησης των επιπέδων ρύπανσης των υδάτινων οικοσυστημάτων. Τα δίθυρα και ιδιαίτερα τα μύδια χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε τοξικολογικά πειράματα, για τον έλεγχο της τοξικότητας χημικών ρύπων στο υδάτινο περιβάλλον.



Mytilus edulis



Perna viridis



Unio tumidus

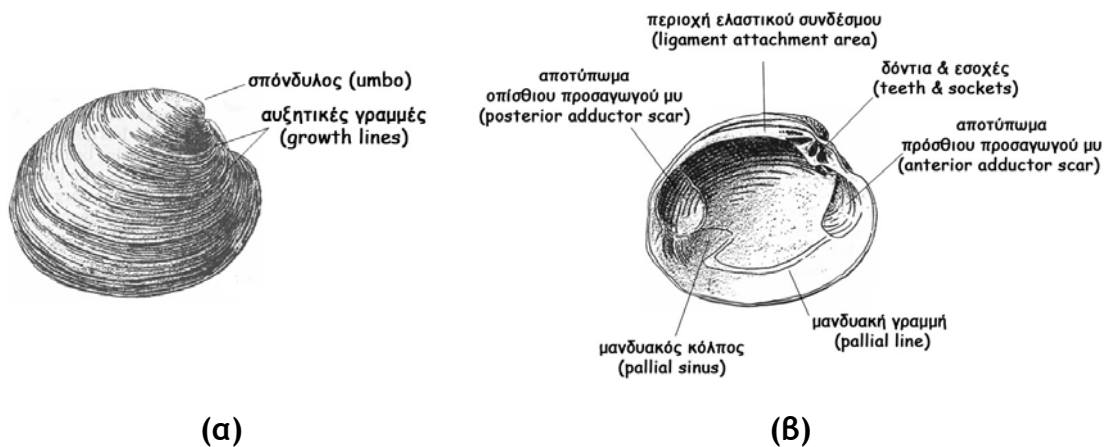


Modiolus modiolus

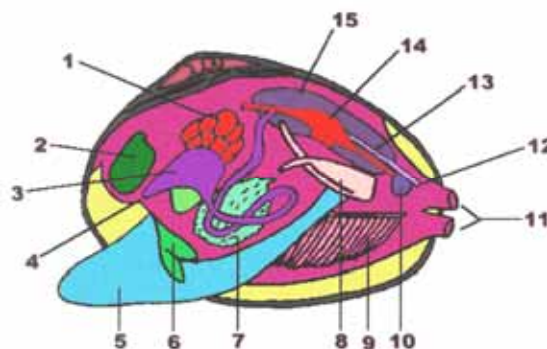
Σχήμα 6.15. Διάφορα είδη μυδιών που χρησιμοποιούνται σε τοξικολογικές και οικοτοξικολογικές μελέτες.



Σχήμα 6.16. Φωτογραφία μυδιών *Mytilus galloprovincialis* διαφόρων μεγεθών και ηλικιών.



Σχήμα 6.17. (α) Εσωτερική όψη κενής αριστερής θυρίδας δίθυρου και (β) εξωτερική όψη αριστερής θυρίδας δίθυρου.



Σχήμα 6.18. Εσωτερική όψη δίθυρου. (1) πεπτικός αδένας, (2) πρόσθιος προσαγωγός μυς, (3) στομάχι, (4) στόμα, (5) πόδι, (6) χειλικοί αισθητήρες, (7) γονάδες, (8) συκώτι, (9) πνεύμονας, (10) οπίσθιος προσαγωγός μυς, (11) σιφόνια, (12) έδρα, (13) έντερο, (14) κοιλία, (15) περικάρδιο.

6.6.1. Μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της τιμής της θανατηφόρου συγκέντρωσης LC_{50} (Lethal Concentration) για 48h, των μυδιών

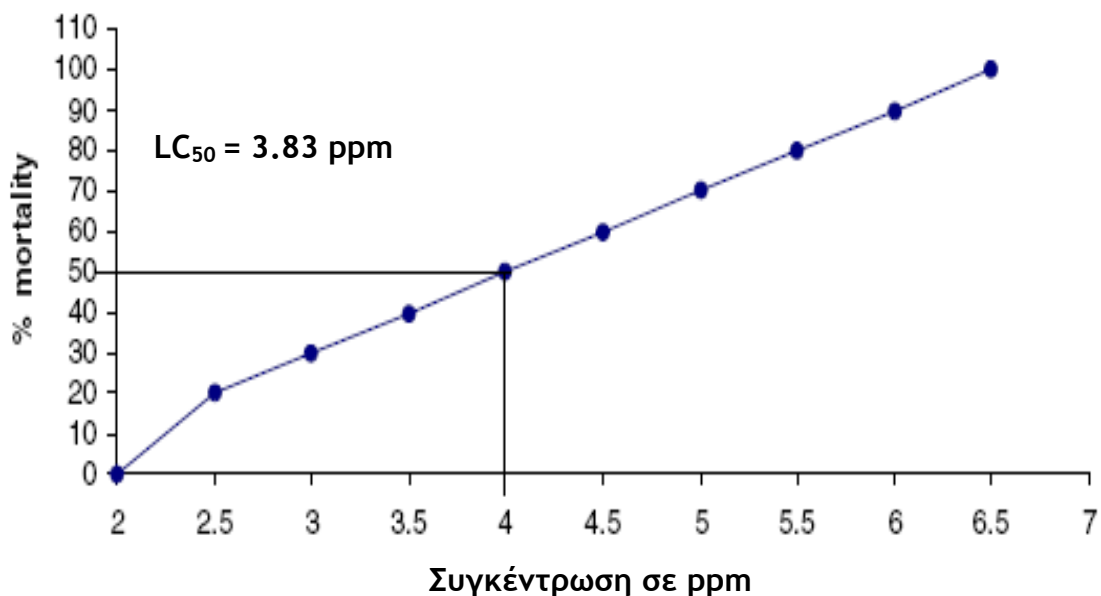
Κατά τη δοκιμασία τοξικότητας σε μύδια, προσδιορίζεται η τιμή LC_{50} για 48h ή/και 96 h των μυδιών για κάποια χημική ένωση ή μείγμα (π.χ. μέταλλο, πολυκυκλικό αρωματικό υδρογονάνθρακα, κα). Η πορεία που ακολουθείται βασίζεται στη μέθοδο 1005.0 της EPA (Environmental Protection Agency) και είναι η εξής:

- Τα μύδια, αφού διαχωριστούν μεταξύ τους και καθαριστούν τα κελύφη τους από πεταλίδες, φέρονται σε ενυδρείο με θαλασσινό νερό συνεχώς αεριζόμενο, όπου παραμένουν για χρονικό διάστημα 2 ημερών, ώστε να εγκλιματιστούν. Τα μύδια θα πρέπει να έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος.
- Μετά τον εγκλιματισμό στις εργαστηριακές συνθήκες και αφού απομακρυνθούν τα νεκρά μύδια (αν τυχόν υπάρχουν), χωρίζονται σε ομάδες των 10 ατόμων και τοποθετούνται σε δοχεία όγκου 2l και εκτίθενται σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις μετάλλου, ενώ σε ένα δοχείο διατηρούνται μύδια χωρίς την προσθήκη μετάλλου (αναφοράς).
- Το νερό των δοχείων αλλάζεται καθημερινά και οι συγκεντρώσεις των μετάλλων διατηρούνται σταθερές, με την προσθήκη νέων ποσοτήτων μετάλλων. Ο αερισμός των δοχείων είναι συνεχής. Για κάθε συγκέντρωση μετάλλου γίνονται τρεις επαναλήψεις.
- Μετά από 48h καταγράφεται ο αριθμός των νεκρών ατόμων για κάθε δοχείο και γίνονται οι κατάλληλοι υπολογισμοί για τον προσδιορισμό της τιμής της LC_{50} . Νεκρά θεωρούνται τα μύδια εκείνα, που διατηρούν τις θύρες τους ανοιχτές και δεν αντιδρούν σε εξωτερικά ερεθίσματα. Πρακτικά, όταν οι θύρες του μυδιού κλείνουν εν μέρει αφού πιεστούν, το μύδι φέρεται σε καθαρό και αεριζόμενο θαλασσινό νερό για να εξεταστεί εάν αναρρώσει. Εφόσον το μύδι δεν παρουσιάσει κάποια αντίδραση, θεωρείται νεκρό.



Πίνακας 6.6. Πειραματικές συνθήκες για την εύρεση της LC_{50} για 48h για μύδια

Είδος πειράματος:	Στατική ανανέωση χημικής ένωσης ή μείγματος
Αλατότητα:	35 ‰ (± 2‰)
Θερμοκρασία:	25 ± 3 °C
Φωτισμός:	Περιβάλλον εργαστηριακός φωτισμός
Περίοδος φωτισμού:	16h φωτισμός, 8h σκοτάδι
Μέγεθος δοχείων πειράματος:	2.5l
Όγκος διαλύματος πειράματος:	2l
Ανανέωση διαλυμάτων πειράματος:	Καθημερινά
Αριθμός μυδιών/λίτρο διαλύματος	4
Αριθμός επαναλήψεων:	3
Παροχή τροφής:	Δεν ήταν απαραίτητη
Αερισμός:	Συνεχής με αντλίες παροχής αέρα
Νερό:	Θαλασσινό φυσικό (όχι συνθετικό)
Συγκεντρώσεις μετάλλου:	5 και μία αναφοράς (χωρίς μέταλλο)
Διάρκεια πειράματος:	2 ημέρες (48h)
Τελικό σημείο (endpoint):	Επί τοις εκατό νεκρά μύδια
Κριτήριο αποδοχής πειραμάτων:	≥ 80% επιβίωση των οργανισμών στα δοχεία αναφοράς
Προϋποθέσεις χειρισμού των μυδιών για test τοξικότητας:	Εγκλιματισμός τους σε εργαστηριακές συνθήκες για 24h πριν την έκθεσή τους



Σχήμα 6.19. Παράδειγμα διαγράμματος % θνησιμότητας μυδιών *Perna viridis* συναρτήσει της συγκέντρωσης αργύρου.

6.6.2. Βιβλιογραφία

1. US Environmental Agency: www.epa.gov/waterscience/WET.
2. Ahsanullah M. Acute toxicity of cadmium and zinc to seven invertebrate species from Western Port, Victoria. *Aust J Mar Freshw Res*, 1976, **27**: 187-196.
3. Ostapczuk P, Burow M, May K, Mohl C, Froning M, Süßenbach B, Waidmann E, Emons H. Mussels and algae as bioindicators for long-term tendencies of Element pollution in marine ecosystems. *Chemosphere*, 1997, **34 (9110)**: 2049-2058.
4. Petushok N, Gabryelak T, Patecz D, Zavodnik L, Szollosi Varga I, Deer KA. Comparative study of the xenobiotic metabolising system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments. *Aquat Toxicol*, 2002, **61**: 65-72.
5. Yap CK, Ismail A, Omar H, Tan SG. Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*), *Environment International*, 2004, **29**: 1097-1104.
6. MaréchalJP, Culioli G, Hellio C, Thomas-Guyon H, Callow ME, Clare AS, Ortalo-Magné A. Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, **313 (115)**: 47-62.
7. Quinn B, Gagné F, Blaise C, Costello MJ, Wilson JG, Mothersill C. Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2006, **142(1-2)**: 118-127.
8. Nakhle KF, Cossa D, Khalaf G, Beliaeff B. *Brachidontes variabilis* and *Patella* sp. as quantitative biological indicators for cadmium, lead and mercury in the Lebanese coastal waters. *Environ Pollut*, 2006, **142**: 73-82.
9. Vijayavel K, Gopalakrishnan S, Balasubramanian MP. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere*, 2007, **69(6)**: 979-986.

6.7. Προσδιορισμός βιοδεικτών οξειδωτικού stress σε μύδια σε τοξικολογικές και οικοτοξικολογικές μελέτες

6.7.1. Η χρήση των μυδιών σε τοξικολογικές και οικοτοξικολογικές μελέτες

Τα μύδια όπως ήδη έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα ως οργανισμοί-βιοδείκτες σε μελέτες αποτίμησης θαλάσσιας ρύπανσης. Η χρήση των μυδιών ενδείκνυται για τους εξής λόγους:

- ✓ Έχουν ευρεία γεωγραφική εξάπλωση και αποτελούν κυρίαρχα μέλη παράκτιων βιοκοινωνιών.
- ✓ Είναι οργανισμοί που αγκιστρώνονται σε κατάλληλο υπόστρωμα κάποιας περιοχής, οπότε αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα ρύπανσης στην περιοχή αυτή.
- ✓ Είναι σχετικά ανθεκτικοί οργανισμοί, ακόμη και σε δυσμενείς για αυτά, περιβαλλοντικές συνθήκες, στις οποίες παρατηρούνται μεταβολές στις φυσιολογικές τους λειτουργίες.
- ✓ Διηθούν μεγάλο όγκο ύδατος, κατά την πρόσληψη τροφής, με αποτέλεσμα να βιοσυσσωρεύουν ρύπους.
- ✓ Οι πληθυσμοί τους είναι σχετικά σταθεροί και συνήθως αρκετά μεγάλοι, κατάλληλοι για επαναλαμβανόμενες δειγματοληψίες.
- ✓ Είναι εύχρηστοι για οικοτοξικολογικά πειράματα, εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους και των πολύ απλών συνθηκών συντήρησής τους, στο εργαστήριο.

6.7.2. Βιοδείκτες οξειδωτικών βλαβών σε βιολογικά συστήματα

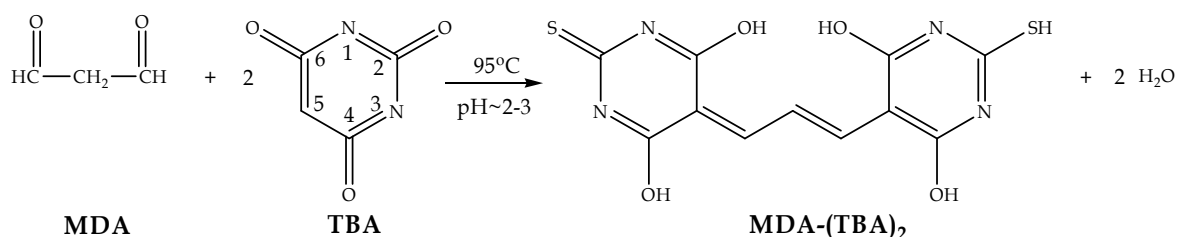
Οι δραστικές οξυγονούχες ενώσεις (ROS), που σχηματίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων των βιολογικών οργανισμών, δύνανται να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες σε όλα τα δομικά συστατικά των κυττάρων, οι οποίες στη συνέχεια δύνανται να οδηγήσουν στο θάνατο των κυττάρων και σε βλάβες των ιστών. Αν και δεν είναι εφικτή η άμεση ανίχνευση των ROS στα βιολογικά συστήματα, εξαιτίας του μικρού χρόνου ημιζωής τους και της έλλειψης επαρκώς ευαίσθητων αναλυτικών τεχνικών, είναι δυνατό να ανιχνευθούν τα τελικά προϊόντα των επιδράσεών τους, όπως τα προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης, τα προϊόντα υδροξυλίωσης και οξειδωσης του DNA, τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων και ουσιών, τις μεταλλοθειονίνες (metallothioneins), κα.

6.7.3. Βιοδείκτες λιπιδικής υπεροξειδωσης

Στις περισσότερες μεθόδους προσδιορισμού των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης, ως βιοδείκτες χρησιμοποιούνται τα δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης των λιπιδίων από τις ROS, που είναι κυρίως αλδεΐδες και κετόνες, επειδή η άμεση ανάλυση των ενδογενών προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι δύσκολη, εξαιτίας της μεγάλης αστάθειας και δραστικότητας τους. Ο πιο διαδεδομένος βιοδείκτης της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι η μηλονική διαλδεΐδη (malondialdehyde, MDA), η οποία προκύπτει από τη διάσπαση των υπεροξειδίων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και σε πολλές περιπτώσεις είναι το δευτερογενές αλδεϊδικό προϊόν οξειδωσης των λιπιδίων που υπάρχει σε μεγαλύτερη αφθονία.

6.7.3.1. Προσδιορισμός της μηλονικής διαλδεΐδης με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος. Αρχή της μεθόδου

Υπάρχει μεγάλος αριθμός μεθόδων προσδιορισμού της Μηλονικής διαλδεΐδης (malondialdehyde, MDA) σε ελεύθερη ή/και δεσμευμένη μορφή, με πιο διαδεδομένη τη μέθοδο του Θειοβαρβιτουρικού οξέος (Thiobarbituric Acid Assay, TBA Assay). Η μέθοδος του θειοβαρβιτουρικού οξέος βασίζεται στην στοιχειομετρική αντίδραση 1 μορίου μηλονικής διαλδεΐδης με δύο μόρια 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος που πραγματοποιείται σε pH~2-3 (πιο όξινες συνθήκες pH<2 παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του χρώματος του προϊόντος). Το προϊόν που προκύπτει απορροφά ισχυρά σε μήκος κύματος 532-535 nm και προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Σχήμα 6.20. Σχηματισμός του έγχρωμου παραγώγου (adduct) MDA-(TBA)₂ με μηχανισμό πυρηνόφιλης προσθήκης σε όξινο περιβάλλον, που πιθανότατα ξεκινά με προσβολή του C-5 του TBA και του C-1 της MDA, που ακολουθείται από την απόσπαση ενός μορίου H₂O και οδηγεί στο 1:1 ενδιάμεσο προϊόν το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με ένα ακόμη μόριο TBA.

6.7.3.2. Αντιδραστήρια

- Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) 0.375 % m/v. Προκύπτει με διάλυση 0.1875g 2-TBA σε 50 ml H₂O
- Τριχλωροξικό οξύ (TCA) 15% v/v. Προκύπτει με διάλυση 15 ml TCA σε 5ml H₂O
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 0.25 N. Προκύπτει με διάλυση 5 ml HCl 1 M σε 15 ml H₂O
- 1,1,3,3 τετρααιθοξυ προπάνιο
- Ρυθμιστικό διάλυμα Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH~7.2-7.4
- Βουτυλουδροξυ τολουόλιο (BHT)

6.7.3.3. Προετοιμασία των Βιολογικών Δειγμάτων και Πειραματική Πορεία

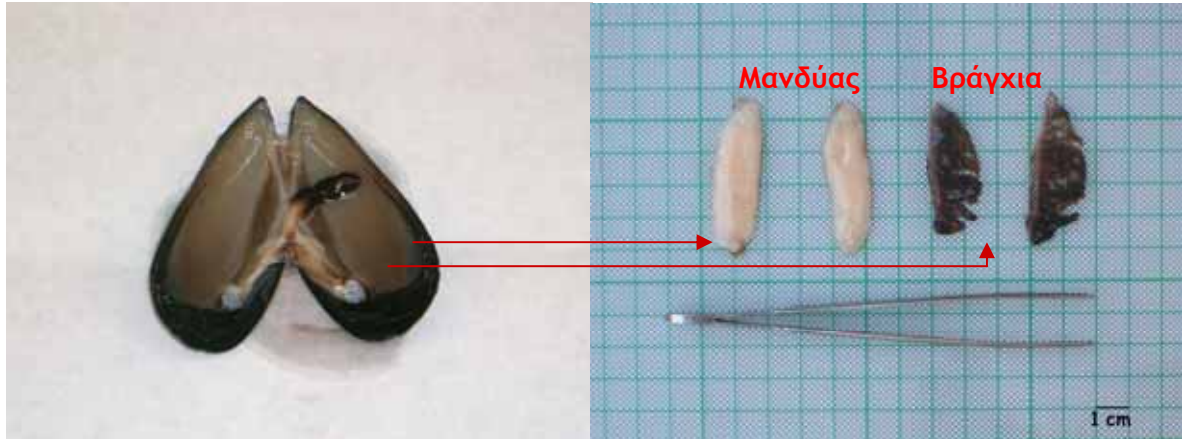
Αφαιρούνται προσεκτικά (για να μην ληφθούν άλλοι ιστοί) με τη χρήση πλαστικού νυστεριού, ο μανδύας (mantle) και τα βράγχια (gills) από n=10 μύδια *Mytilus galloprovincialis*. Οι ιστοί στεγνώνονται με διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια ομογενοποιούνται ξεχωριστά ως εξής:

- Ζυγίζονται 1000 mg υγρού ιστού (wet tissue), μανδύα ή βράγχια.
- Προστίθενται σε 7.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH~7.2-7.4, το οποίο περιέχει 0.05 % m/v BHT που χρησιμεύει στην αναστολή της περαιτέρω οξείδωσης των λιπιδίων που περιέχονται στα βιολογικά δείγματα.
- Ακολουθεί ομογενοποίηση με τη βοήθεια blender, πάνω σε πάγο (για αποφυγή υπεροξείδωσης των λιπιδίων λόγω θέρμανσης), όπου και αφήνονται για χρονικό διάστημα 1h.
- Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστίθενται 15 ml διαλύματος TBA/TCA/HCl που προέκυψε με 1:1:1 ανάμιξη των παραπάνω παρασκευασθέντων διαλυμάτων (πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένα).
- Ακολουθεί θέρμανση σε υδρόλουτρο στους 95 °C για 45 min για να σχηματιστεί το έγχρωμο σύμπλοκο MDA-(TBA)₂.
- Αφήνονται τα δείγματα να ψυχθούν για 5 min.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 10 min στις 3000 x g.

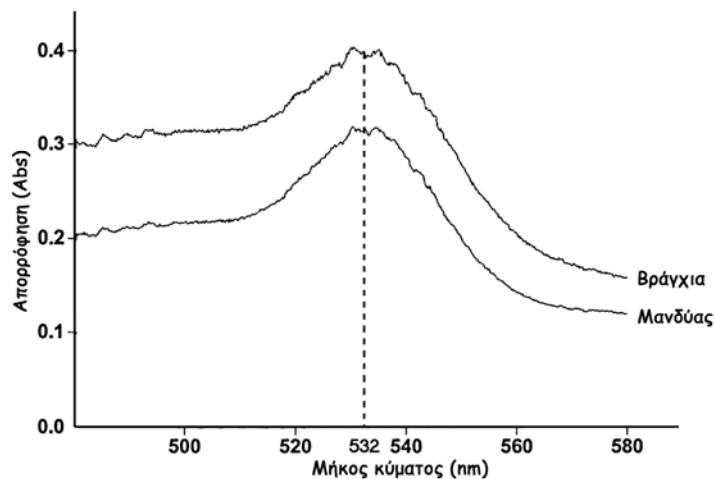


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

- Λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό και μετράται η τιμή της μέγιστης απορρόφησης $\lambda_{max} \sim 532-535 \text{ nm}$, έναντι τυφλού δείγματος, που περιέχει όλα τα αντιδρώντα πλην του ιστού.



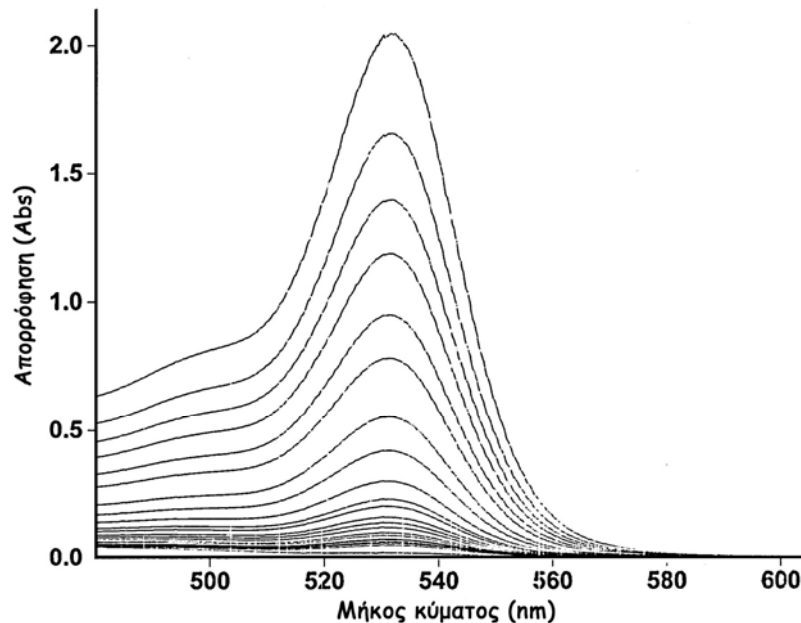
Σχήμα 6.21. Φωτογραφία μανδύα και βραγχίων από μύδι *Mytilus galloprovincialis*.



Σχήμα 6.22. Τυπικό UV/Vis φασματογράφημα του $\text{MDA}-(\text{TBA})_2$ συμπλόκου που προκύπτει από τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος κατά τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης στο μανδύα και στα βράγχια μυδιών *Mytilus galloprovincialis*, με μέγιστη απορρόφηση στα 532nm.

Η ποσοτικοποίηση του παραγόμενου $\text{MDA}-(\text{TBA})_2$ συμπλόκου, επιτυγχάνεται με κατασκευή καμπύλης αναφοράς με πρότυπα διαλύματα του συμπλόκου $\text{MDA}-(\text{TBA})_2$. Αυτά προκύπτουν με την ίδια μεθοδολογία, όπου αντί για βιολογικά δείγματα, έχουμε πρότυπα διαλύματα MDA διαφορετικών συγκεντρώσεων που παρασκευάζονται με όξινη υδρόλυση ως εξής:

- Διαλύονται 0.1 mmol 1,1,3,3 τετρααιθοξυ ή μεθοξυ προπάνιο σε 50 ml H₂O στο οποίο περιέχεται 0.1 ml HCl 0.1 M.
- Ακολουθεί θέρμανση στους 50 °C για 1h.
- Στη συνέχεια ακολουθεί αραιώση μέχρι τα 100 ml και από το διάλυμα αυτό με αραιώσεις παρασκευάζονται τα πρότυπα (standards) διαλύματα.



Σχήμα 6.23. Καμπύλη αναφοράς με πρότυπα διαλύματα MDA.

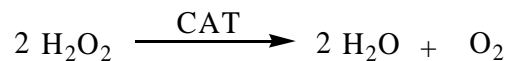
6.7.4. Αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί σε αερόβιους οργανισμούς ως βιοδείκτες οξειδωτικού stress

Οι αερόβιοι οργανισμοί διαθέτουν αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς, ενζυμικούς και μη ενζυμικούς, που μεταβολίζουν τις ROS ή αναστέλλουν την παραγωγή τους και επιδιορθώνουν ή αποσυνθέτουν τα προϊόντα οξειδωτικής προσβολής των δομικών συστατικών των κυττάρων. Αλλαγές στα επίπεδα των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ουσιών ή μεταβολές στη δραστηριότητα ενζυμικών μηχανισμών χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες οξειδωτικού stress. Οι κυτταρικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί ενζυμικοί και μη ενζυμικοί δύνανται να εξασθενίσουν ή να μειωθεί η συγκέντρωσή τους στην προσπάθειά τους να προστατεύσουν τα βιολογικά συστήματα από οξειδωτικές προσβολές που οφείλονται σε έκθεση σε τοξικούς ρύπους του περιβάλλοντος, όμως δύνανται και να ενισχυθούν ή να αυξηθεί

η παραγωγή τους για να αντιμετωπιστούν οι ROS και το οξειδωτικό stress. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ενζύμων που χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια ως βιοδείκτες οξειδωτικού stress είναι η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση.

6.7.5. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ένζυμου καταλάση (CAT). Αρχή μεθόδου

Η καταλάση (CAT) είναι σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο για τους αερόβιους οργανισμούς. Καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) κατά την αντίδραση:



Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης πραγματοποιείται με μεθόδους, στις οποίες μετράται ο ρυθμός κατανάλωσης του H₂O₂. Η μέτρηση της κατανάλωσης του H₂O₂ επιτυγχάνεται, είτε με άμεσο τρόπο μετρώντας της μείωση της απορρόφησης του H₂O₂, είτε με έμμεσο τρόπο προσδιορίζοντας το H₂O₂ που δεν καταναλώθηκε. Η άμεση μέθοδος, είναι η πιο διαδεδομένη και εφαρμόζεται ευρύτατα για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της καταλάσης, ακόμη και σε βιολογικά δείγματα.

Κατά τη μέθοδο αυτή, υπολογίζεται ο ρυθμός μείωσης της απορρόφησης στα 240nm, που αντιστοιχεί σε μείωση της συγκέντρωσης του H₂O₂. Ο ρυθμός μείωσης της απορρόφησης στη μονάδα του χρόνου $\Delta A_{240}/\Delta t$ αποτελεί μέτρο της δραστηριότητας της καταλάσης.

$$\frac{\Delta A_{240}}{\Delta t} \equiv \text{δραστηριότητα CAT στο βιολογικό ιστό}$$

Η δραστηριότητα της καταλάσης εκφράζεται ως μονάδες ενζύμου (Enzyme Units):

$$\text{Enzyme Units} = [\ln(A_1/A_2)/t]/\text{mg protein}$$

όπου A₁ και A₂ είναι οι τιμές της απορρόφησης δύο επιλεγμένες χρονικές στιγμές, t είναι ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ των δύο επιλεγμένων χρονικών στιγμών, mg protein είναι τα mg πρωτεΐνης που περιέχονται στο δείγμα του βιολογικού ιστού.

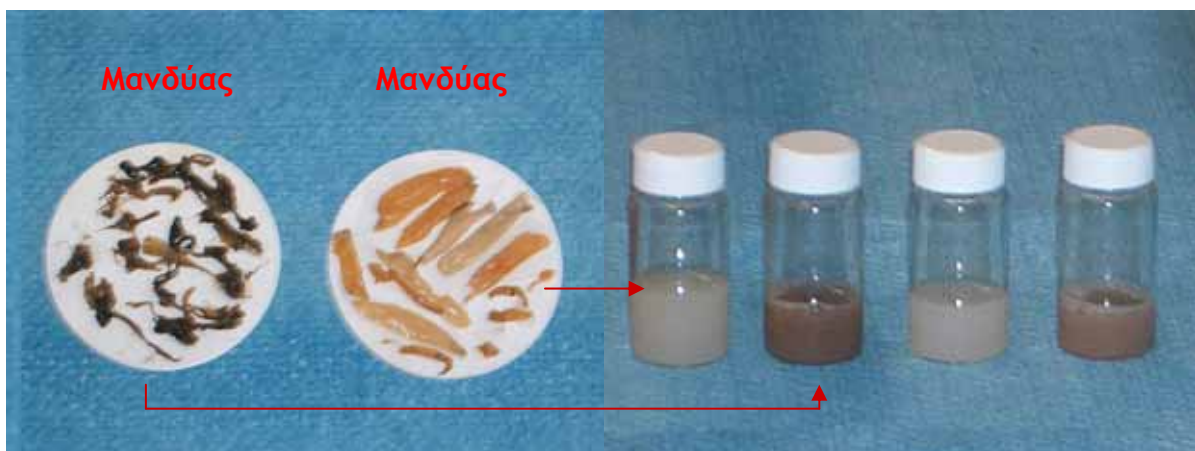
6.7.5.1. Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH~7.2-7.4
- Ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2PO_4 50 mM pH~7.0 στους 25 °C
- H_2O_2 0.036% w/w. Προκύπτει από H_2O_2 30% w/w. Η αρχική απορρόφηση του διαλύματος αυτού στα 240 nm πρέπει να είναι $A_{\text{max}} \sim 0.550-0.520$ μονάδες απορρόφησης
- Διάλυμα καταλάσης (CAT). Προετοιμάζεται αμέσως πριν την χρήση διάλυμα καταλάσης ώστε να περιέχει 50-100 Units/ml διαλύματος

6.7.5.2. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων και πειραματική πορεία

Αφαιρείται προσεκτικά (για να μην ληφθούν άλλοι ιστοί) με τη χρήση πλαστικού νυστεριού, ο μανδύας (mantle) και τα βράγχια (gills) από n=10 μύδια (*Mytilus Galloprovincialis*), στεγνώνονται με διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια ομογενοποιούνται ξεχωριστά ως εξής:

- Ζυγίζονται 2 g υγρού ιστού, βράγχια ή μανδύας.
- Προστίθενται σε 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH~7.2-7.4
- Ακολουθεί ομογενοποίηση σε blender για 5 min, σε πάγο.
- Το δείγμα και τα σωληνάκια φυγοκέντρησης ψύχονται για 5 min σε πάγο, για να αποφευχθεί η διάσπαση των πρωτεϊνών.
- Ακολουθώντας το δείγμα φυγοκεντρείται για 20 min στις 3000 x g και ακολουθείται το Πρωτόκολλο EC 1.11.1.6 που έχει καθιερωθεί στη διεθνή βιβλιογραφία, για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT).

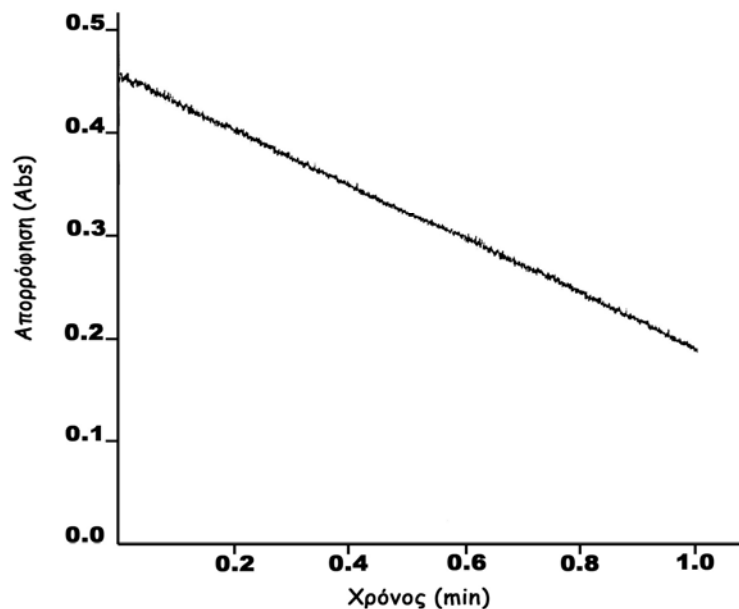


Σχήμα 6.24. Ιστοί από βράγχια και μανδύα μυδιών και ομογενοποιημένα δείγματα.

Η δρατικότητα της καταλάσης προσδιορίζεται φωτομετρικά σε κυψελίδα διαδρομής 1 cm και όγκου 1.4 ml, όπου προσθέτουμε 1.0 ml τελικού όγκου διαλύματος που περιέχει:

- 980 μL ρυθμιστικού διαλύματος NaH_2PO_4 50 mM pH~7.0 στους 25°C .
- 10 μL H_2O_2 1.2 M.
- 10 μL δείγματος από μανδύα ή βράγχια μυδιού.

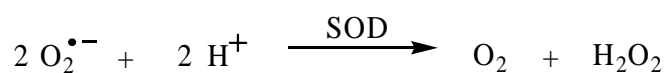
Μετά την προσθήκη του βιολογικού δείγματος στην κυψελίδα και ανάδευση αυτού (ελαφρά με το χέρι), παρακολουθείται φωτομετρικά για 1-2 min η μείωση της απορρόφησης στα 240 nm, που οφείλεται στην κατανάλωση του H_2O_2 από την CAT του βιολογικού δείγματος.



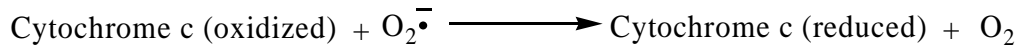
Σχήμα 6.25. Τυπικό UV/Vis φασματογράφημα κατά τον προσδιορισμό της δρατικότητας του ενζύμου καταλάσης, όπου παρακολουθείται φωτομετρικά για 1min η μείωση της απορρόφησης στα 240 nm.

6.7.6. Προσδιορισμός της δρατικότητας του ένζυμου υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD). Αρχή μεθόδου

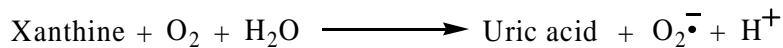
Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) καταλύει την καταστροφή του υπεροξειδικού ανιόντος κατά την αντίδραση:



Η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης προσδιορίζεται ως η αναστολή του ρυθμού μείωσης της αναγωγής του κυτοχρώματος c (cytochrome c) από το υπεροξειδικό ανιόν, στα 550 nm:



Το ανιόν της υπεροξειδικής ρίζας παράγεται ενζυματικά από την αντίδραση:



6.7.6.1. Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH~7.2-7.4
- Ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2PO_4 48 mM pH~7.0
- Ρυθμιστικό διάλυμα Na_2HPO_4 50 mM pH~7.8
- EDTA 96 μM
- Κυτόχρωμα c 19.2 μM (cyt c). Παρασκευάζεται με διάλυση 24.8 mg (2mmol) κυτοχρώματος c σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος pH~7.8 0.1 mM EDTA
- Ξανθίνη 48 μM (HX). Παρασκευάζεται με διάλυση 0.76 mg (5mmol) HX σε 10 ml NaOH 0.001 N
- Οξειδάση της ξανθίνης 0.2 Units (XOD)
- NaOH 0.001 N
- Υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD)

6.7.6.2. Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων και πειραματική πορεία

Αφαιρείται προσεκτικά (για να μην ληφθούν άλλοι ιστοί) με τη χρήση πλαστικού νυστεριού, ο μανδύας (mantle) και τα βράγχια (gills) από n=10 μύδια (*Mytilus Galloprovincialis*), στεγνώνονται με διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια ομογενοποιούνται ξεχωριστά ως εξής:

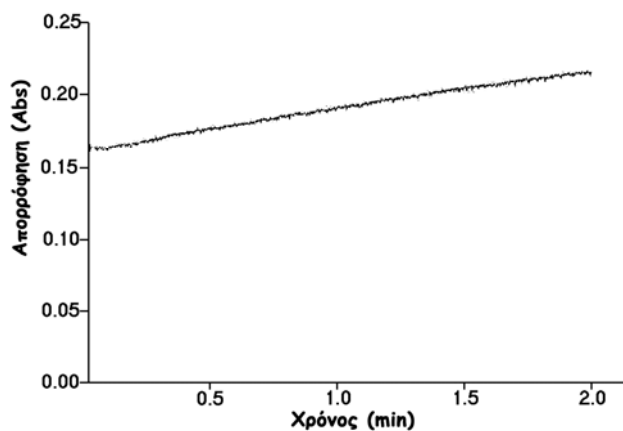
- Ζυγίζονται 2 g υγρού ιστού, βράγχια ή μανδύας.
- Προστίθενται σε 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH~7.2-7.4.
- Ακολουθεί ομογενοποίηση σε blender για 5 min, σε πάγο.

- Το δείγμα και τα σωληνάκια φυγοκέντρησης ψύχονται για 5 min σε πάγο, για να αποφευχθεί η διάσπαση των πρωτεϊνών.
- Ακολούθως το δείγμα φυγοκεντρείται για 20 min στις 3000 x g και ακολουθείται το Πρωτόκολλο EC 1.15.11, που έχει καθιερωθεί στη διεθνή βιβλιογραφία, για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD).

Η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης προσδιορίζεται φωτομετρικά σε κυψελίδα διαδρομής 1 cm και όγκου 1.4 ml, όπου προσθέτουμε τα εξής:

- 960 -980 μ L διαλύματος εργασίας (Working buffer), το οποίο προκύπτει από την ανάμιξη των 10 ml διαλύματος HX 48 μ M με τα 100 ml διαλύματος cyt c 19.2 μ M. Το working buffer μπορεί να διατηρηθεί στους 4°C για 3 ημέρες.
- 0.2 Units XOD.
- 20 μ L του βιολογικού δείγματος (ή ρυθμιστικού διαλύματος pH-7.2-7.4 για το τυφλό).

Μετά την προσθήκη του βιολογικού δείγματος στην κυψελίδα και ανάδευση αυτού, παρακολουθείται φωτομετρικά για 1-2 min η μείωση του ρυθμού αναγωγής του cyt c στα 550 nm, σε σχέση με το ρυθμό αναγωγής (Abs/min) του cyt c, απουσία του βιολογικού δείγματος (τυφλό). Ο ρυθμός του τυφλού πρέπει να είναι γραμμικός και να παίρνει τιμές 0.025-0.030 Abs/min (ελέγχεται κάθε 30-60 min και αν παρατηρηθεί πτώση του ρυθμού αυτού προστίθεται 0.5, 1 ή 2 μ L XOD). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για να ληφθούν ακριβέστερα και επαναλήψιμα αποτελέσματα θα πρέπει το βιολογικό δείγμα να έχει υποστεί κατάλληλες αραιώσεις, ώστε μετά την προσθήκη του να προκαλείται αναστολή της αρχικής αντίδρασης (τυφλού) μεταξύ 20-40%.



Σχήμα 6.26. Τυπικό UV/Vis φασματογράφημα του ρυθμού αναγωγής του κυτοχρώματος c (Abs/min) στα 550nm.

6.7.7. Βιβλιογραφία

1. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem, 1952, **195**: 133-140.
2. Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. Anal Biochem, 1970, **34**: 30-38.
3. Fridovich I. Superoxide Radical and Superoxide Dismutase, Acc Chem Res, 1972, **5**: 312-325.
4. Flohè L, Ötting F. Superoxide Dismutase Assays. Methods Enzymol, 1984, **105**: 93-96.
5. Aebi H. Catalase in Vitro. Methods Enzymol, 1984, **105**: 121-127.
6. Regoli F. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis*. Arch Environ Contam Toxicol, 1998, **34**: 48-63.
7. Almeida EA, Miyamoto S, Bainy ACD, Medeiros MHG, Di Mascio P. Protective effects of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. Mar Pollut Bull, 2004, **49**: 386-392.
8. Franco JL, Trivella DBB, Trevisan R, Dinslaken DF, Marques MRF, Bainy ACD, Dafre AL. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. Chemico-Biological Interactions, 2006, **160**: 232-240.
9. Lima I, Moreira SM, Rendón-Von Osten J, Soares AMVM, Guilhermino L. Biochemical responses of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. Chemosphere, 2007, **66**: 1230-1242.
10. Valavanidis A, Vlachogianni Th, Dassenakis M, Scoullou M. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metal's pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. Mar Pollut Bull, 2007, **54**: 1361-1371.
11. Vlachogianni T, Valavanidis A. Heavy metals effects on lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*. Chemistry and Ecology, 2007, **23**: 1-11.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

7.1. Ανάλυση Probit

Η ανάλυση Probit (ποσοστιαία στατιστική ανάλυση) είναι μια μαθηματική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της δυνωμικής απόκρισης μεταβλητών. Μέσω αυτής της ανάλυσης είναι δυνατή η μετατροπή της σιγμοειδούς καμπύλης δόσης-απόκρισης σε ευθεία γραμμή μέσω επεξεργασίας των δεδομένων είτε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, είτε με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανότητας. Η ανάλυση Probit μπορεί να πραγματοποιηθεί με τους εξής τρόπους:

- Με τη χρήση πινάκων για τον υπολογισμό των probit μονάδων
- Μέσω πολύπλοκων υπολογισμών
- Με τη βοήθεια κάποιου λογισμικού στατικής επεξεργασίας όπως είναι για παράδειγμα το SPSS, Biostat, κτλ.

Η ανάλυση Probit χρησιμοποιείται για να μετατρέψει τη σχέση της απόκρισης μιας εξαρτημένης μεταβλητής (Y) από μια ανεξάρτητη μεταβλητή (X) σε γραμμική.

$$Y = a + bX + e$$

Όπου a: σταθερά, b: η κλίση της ευθείας, e: σφάλμα

7.1.1. Η ανάλυση Probit στην τοξικολογία

Η ανάλυση Probit χρησιμοποιείται στην τοξικολογία για τον προσδιορισμό της τοξικότητας χημικών ουσιών σε βιολογικούς οργανισμούς. Αυτό επιτυγχάνεται με την καταγραφή της απόκρισης των οργανισμών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις έκθεσης σε κάποια χημική ουσία και στη συνέχεια στη συσχέτιση των συγκεντρώσεων αυτών με τις αποκρίσεις. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η απόκριση των βιολογικών οργανισμών είναι δυνωμική (π.χ. θάνατος/ επιβίωση), με αποτέλεσμα η σχέση απόκρισης-συγκέντρωσης να είναι σιγμοειδής. Με την ανάλυση Probit μετατρέπεται η σιγμοειδής καμπύλη σε ευθεία και στη συνέχεια μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση εκείνη της χημικής ουσίας που επιφέρει για παράδειγμα το θάνατο σε 50% του πληθυσμού των βιολογικών οργανισμών (LC₅₀).

Ένας τρόπος να υπολογίσει κανείς τις μονάδες probit είναι με τη βοήθεια του πίνακα του Finney (1952) που δείχνει την αντιστοιχία του % ποσοστού με τις μονάδες probit.

Πίνακας 7.1. Μετατροπή των % ποσοστών σε μονάδες probit.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.60	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.30	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Για παράδειγμα μία απόκριση 17% αντιστοιχεί σε μονάδα probit στο 4.05. Μία απόκριση της τάξης 50% (LC50), αντιστοιχεί σε μονάδα probit στο 5.00.

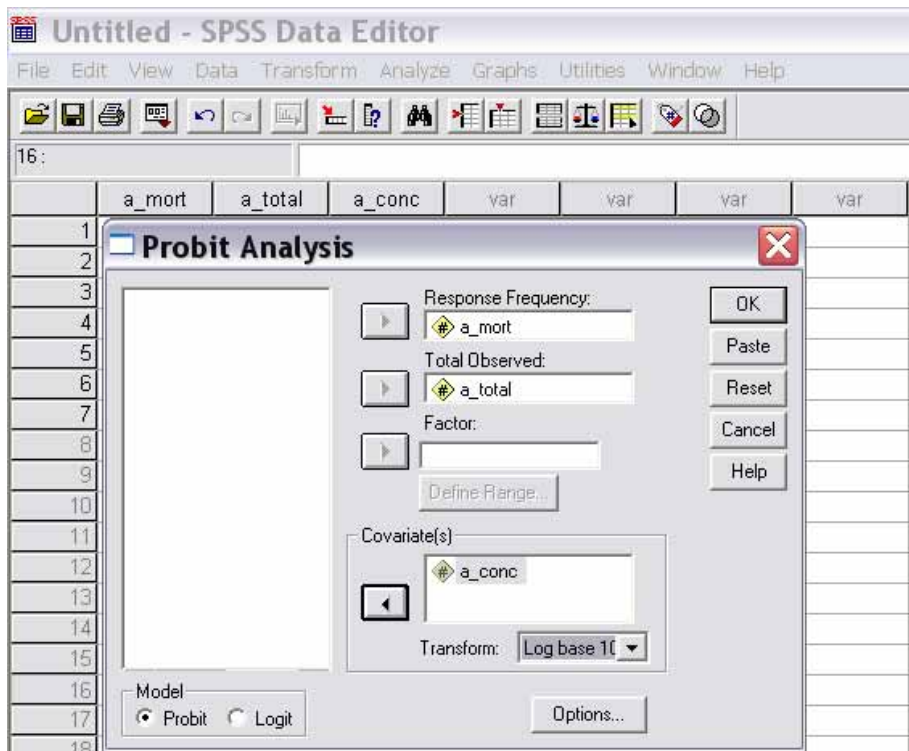
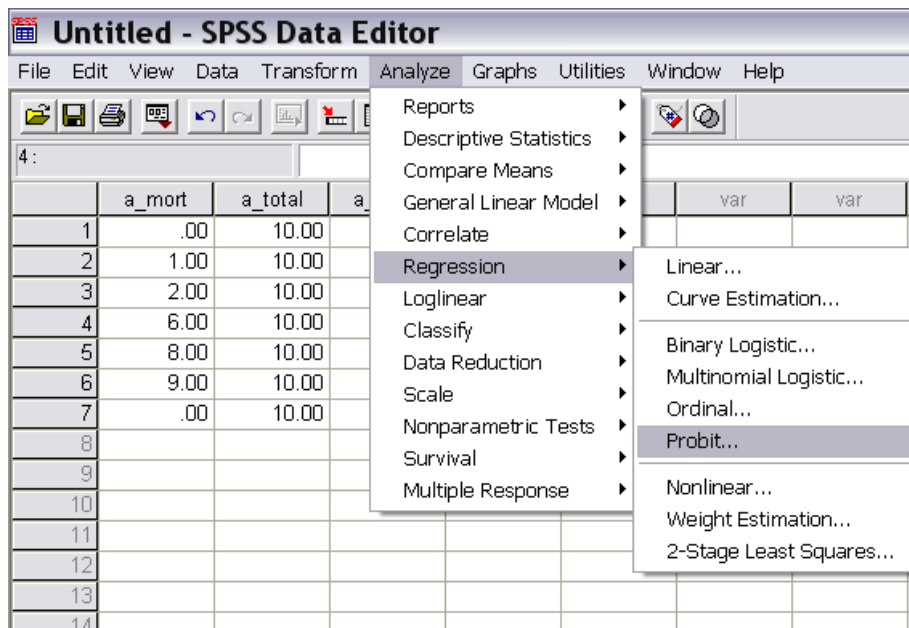
Το LC50 για μια χημική ουσία μπορεί να υπολογιστεί με τη χρήση κάποιου λογισμικού πακέτου όπως είναι το SPSS, ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα:

Εισάγουμε σε τρεις στήλες δεδομένων τα ακόλουθα:

- Αριθμό των οργανισμών σε κάθε δοχείο που αποκρίθηκαν
- Συνολικό αριθμό οργανισμών σε κάθε δοχείο
- Συγκεντρώσεις έκθεσης

The screenshot shows the SPSS Data Editor interface. The title bar reads 'Untitled - SPSS Data Editor'. The menu bar includes File, Edit, View, Data, Transform, Analyze, Graphs, Utilities, Window, and Help. Below the menu is a toolbar with various icons. The main window displays a data table with the following content:

	a_mort	a_total	a_conc	var	var	var	var
1	.00	10.00	2.00				
2	1.00	10.00	4.00				
3	2.00	10.00	9.00				
4	6.00	10.00	16.00				
5	8.00	10.00	25.00				
6	9.00	10.00	36.00				
7	.00	10.00	.00				
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							



Εάν παρατηρηθεί θνησιμότητα για τους οργανισμούς αναφοράς μεγαλύτερη του 10% θα πρέπει τα δεδομένα να διορθωθούν.

Ένας τρόπος είναι να χρησιμοποιήσει κανείς τη σχέση του Schneider-Orelli (1947):

$$\text{Διορθωμένη τιμή} = \frac{\% \text{ Θνησιμότητα} - \% \text{ Θνησιμότητα οργανισμών αναφοράς}}{100 - \% \text{ Θνησιμότητα οργανισμών αναφοράς}} \times 100$$

7.2. Μονόδρομη Ανάλυση της Διακύμανσης

Η μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης (One-way Analysis of Variance, ANOVA) είναι μια τεχνική ανάλυσης που επιτρέπει τη διάκριση της διακύμανσης που οφείλεται στον ελεγχόμενο παράγοντα, από εκείνη που προέρχεται από καθαρά τυχαία σφάλματα (ανομοιογενή δείγματα, διαφορετικές ημερομηνίες λήψης δειγμάτων, τρόπος επεξεργασίας και συντήρησης του δείγματος).

Κριτήριο για τον αν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των υπό εξέταση δεδομένων αποτελεί ο παράγοντας p . Όταν τα δεδομένα που προκύπτουν από δύο σειρές μετρήσεων, δεν εμφανίζουν πραγματική διαφορά μεταξύ τους, σημαίνει ότι ισχύει η μηδενική υπόθεση (null hypothesis, H_0). Όταν το $p < 0.05$, σημαίνει ότι η πιθανότητα να ισχύει η μηδενική υπόθεση είναι μικρότερη από 5%, οπότε απορρίπτεται και συνεπώς υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των συγκρινόμενων δεδομένων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του p , τόσο αυξάνει η στατιστική διαφορά μεταξύ των συγκρινόμενων δεδομένων.

7.2.1. Η μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης στην τοξικολογία

Η μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης είναι μια προέκταση της δοκιμασίας t , η οποία πραγματοποιεί ανεξάρτητες συγκρίσεις μεταξύ ζευγών τιμών. Η δοκιμασία t όμως δεν είναι κατάλληλη για τη σύγκριση όλων των πιθανών ζευγών τιμών που εξαρτώνται από κάποιο ελεγχόμενο παράγοντα, διότι όσο αυξάνει ο αριθμός των συγκρίσεων τόσο αυξάνει το σφάλμα τύπου I. Αν έχουμε 4 τιμές για τον ελεγχόμενο παράγοντα τότε ο αριθμός των συγκρίσεων των ζευγών δίδεται από τη σχέση $4!/2!2!$, όπου $4! = 4 \times 3 \times 2 \times 1$. Εάν το σφάλμα τύπου I για μια τέτοια σύγκριση είναι 0.05, τότε η πιθανότητα να μην κάνει κανείς αυτό το σφάλμα είναι $1 - 0.05 = 0.95$. Εάν οι 6 συγκρίσεις υποθεθεί ότι είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους, τότε η πιθανότητα να μην έχει κανείς σφάλμα τύπου I σε μία από αυτές είναι $0.95^6 = 0.74$. Έτσι όμως η πιθανότητα να κάνει κανείς σφάλμα σε μία από αυτές τις συγκρίσεις είναι $1 - 0.74 = 0.26$. Άρα το ποσοστό σφάλματος παρόλο που σε κάθε σύγκριση είναι 5% σε όλη τη δοκιμασία καταλήγει να είναι 26%.

Στη μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης, για προσδιοριστεί η διακύμανση των τιμών χρησιμοποιούνται οι διακυμάνσεις των πειραματικών τιμών αντί οι τιμές της τυπικής απόκλισης (standard deviation). Η διακύμανση n τιμών ($x_1, x_2 \dots x_n$) δίδεται από τη σχέση:

$$\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Πίνακας 7.2. Ενδεικτικές τιμές από αποτελέσματα τοξικολογικών πειραμάτων.

	Επεξεργασία 1	Επεξεργασία 2	Επεξεργασία 3
	10	19	14
	12	20	16
	14	21	18
Μέσος όρος	12	20	16
Τυπική απόκλιση	2	1	2

Ο συνολικός μέσος όρος όλων των τιμών είναι το άθροισμα όλων των παρατηρήσεων διαιρεμένος με τον συνολικό αριθμό των παρατηρήσεων. Για τα στοιχεία του παραπάνω πίνακα ο συνολικός μέσος όρος είναι 16. Για μια παρατηρούμενη τιμή x , η διαφορά μεταξύ του x και του συνολικού μέσου όρου μπορεί να διαιρεθεί σε δύο τμήματα ως εξής:

$$X - \text{συνολικός μέσος όρος} = (\text{μέσος όρος τιμών επεξεργασίας} - \text{συνολική μέση τιμή}) + (x - \text{μέσος όρος τιμών επεξεργασίας})$$

$$\text{Συνολική τυπική απόκλιση} = \text{τυπική απόκλιση που οφείλεται στην επεξεργασία} + \text{τυπική απόκλιση που οφείλεται σε άλλες αιτίες}$$

Το συνολικό άθροισμα των τετραγώνων των τιμών αντίστοιχα διαιρείται σε ‘μεταξύ των επεξεργασιών’ άθροισμα των τετραγώνων και σε ‘εντός των επεξεργασιών’ άθροισμα των τετραγώνων, το οποίο αναφέρεται ως σφάλμα ή υπόλοιπο του αθροίσματος των τετραγώνων.

Οι βαθμοί ελευθερίας (df) για αυτά τα αθροίσματα των τετραγώνων προκύπτου ως εξής:

$$\text{Σύνολο df} = n - 1 \text{ (όπου } n \text{ είναι το σύνολο των παρατηρήσεων)} = 9 - 1 = 8$$

$$\text{Μεταξύ των εξεργασιών df} = \text{αριθμός επεξεργασιών} - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$\text{Εντός των εξεργασιών df} = \text{ολικοί df} - \text{μεταξύ των εξεργασιών df} = 8 - 2 = 6$$

Πίνακας 7.3. Επεξεργασία ενδεικτικών αποτελεσμάτων από τοξικολογικές δοκιμασίες.

Επεξεργασία	Παρατήρηση (x)	Μέσος όρος επεξεργασίας	Μέσος όρος επεξεργασίας - συνολική μέση τιμή	x - μέσος όρος επεξεργασίας (υπόλοιπο)	x - συνολική μέση τιμή (συνολική τυπική απόκλιση)
1	10	12	-4	-2	-6
1	12	12	-4	0	-4
1	14	12	-4	2	-2
2	19	20	4	-1	3
2	20	20	4	0	4
2	21	20	4	1	5
3	14	16	0	-2	-2
3	16	16	0	0	0
3	18	16	0	2	2
		Άθροισμα τετραγώνων	96	18	114

Η παραπάνω διαίρεση του ολικού αθροίσματος των τετραγώνων παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα. Οι μέσες τιμές των τετραγώνων (mean squares, MS) που αντιστοιχούν σε εκτιμήσεις της διακύμανσης προκύπτουν από τη διαίρεση των αθροισμάτων των τετραγώνων (sum of squares, SS) με τους βαθμούς ελευθερίας.

Η στατιστική δοκιμασία F ισούται με το μέσο όρο των 'μεταξύ των εξεργασιών' τιμών διαιρεμένο με το σφάλμα του αθροίσματος των τετραγώνων. Η τιμή P προκύπτει από τη σύγκριση της στατιστικής δοκιμασίας με την κατανομή του F για 2 και 6 βαθμούς ελευθερίας (όπου 2 είναι οι βαθμοί ελευθερίας για τον αριθμητή και 6 για τον παρανομαστή). Στην παραπάνω περίπτωση η τιμή F με τη βοήθεια κάποια στατιστικού πακέτου επεξεργασίας. Η τιμή P = 0.0039 υποδεικνύει ότι τουλάχιστον δύο από τις επεξεργασίες διαφέρουν μεταξύ τους.

Πίνακας 7.4. Ενδεικτική ανάλυση διακύμανσης. (df: βαθμοί ελευθερίας, F: στατιστική δοκιμασία, MS: μέση τιμή των αθροισμάτων των τετραγώνων, SS: άθροισμα των τετραγώνων).

Αιτία διακύμανσης	df	SS	MS	F	P
Μεταξύ των επεξεργασιών	2	96	48	16	0.0039
Σφάλμα (εντός των επεξεργασιών)	6	18	3		
Σύνολο	8	114			

Η στατιστική δοκιμασία, Μονόδρομη Ανάλυση της Διακύμανσης (One-Way Analysis of Variance, One-Way ANOVA) πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών πακέτων λογισμικού όπως είναι το SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), κα.

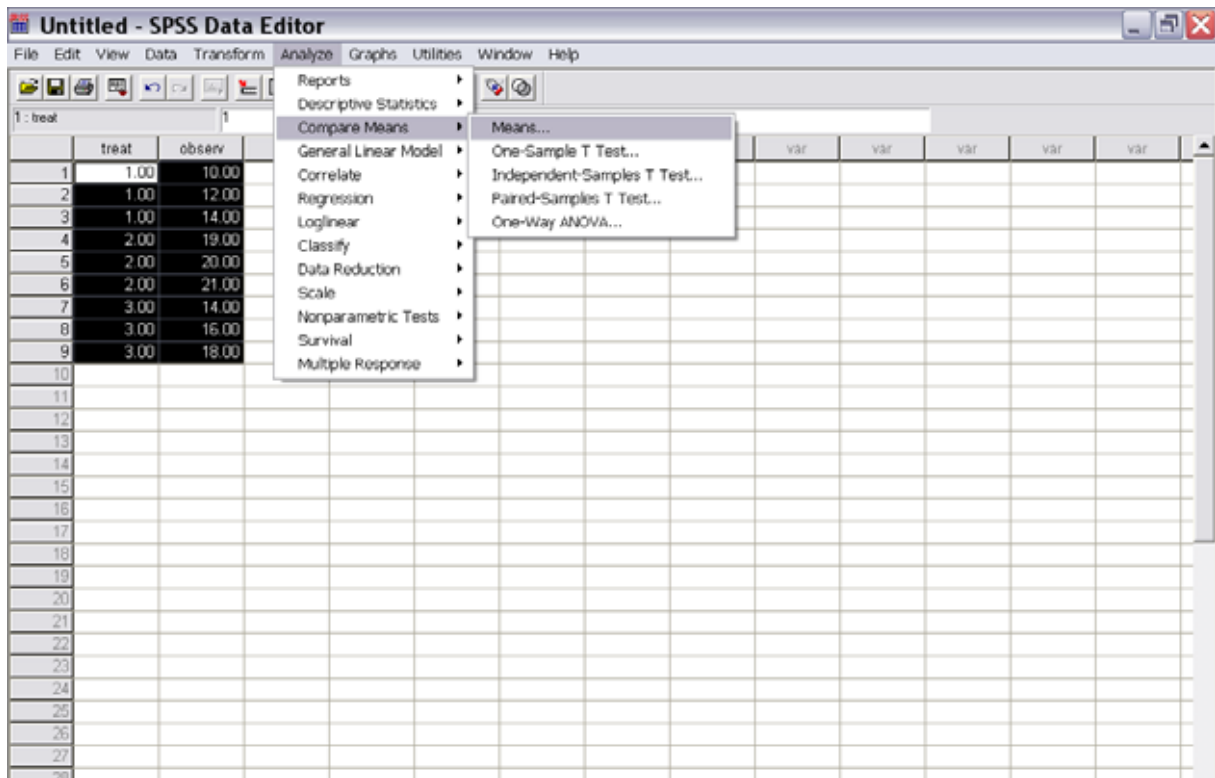
7.2.2. Παράδειγμα στατιστικής επεξεργασίας αποτελεσμάτων με τη μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης με τη χρήση του λογισμικού πακέτου SPSS.

1. Εισάγουμε τα δεδομένα για την κάθε επεξεργασία 1, 2, 3, κτλ.

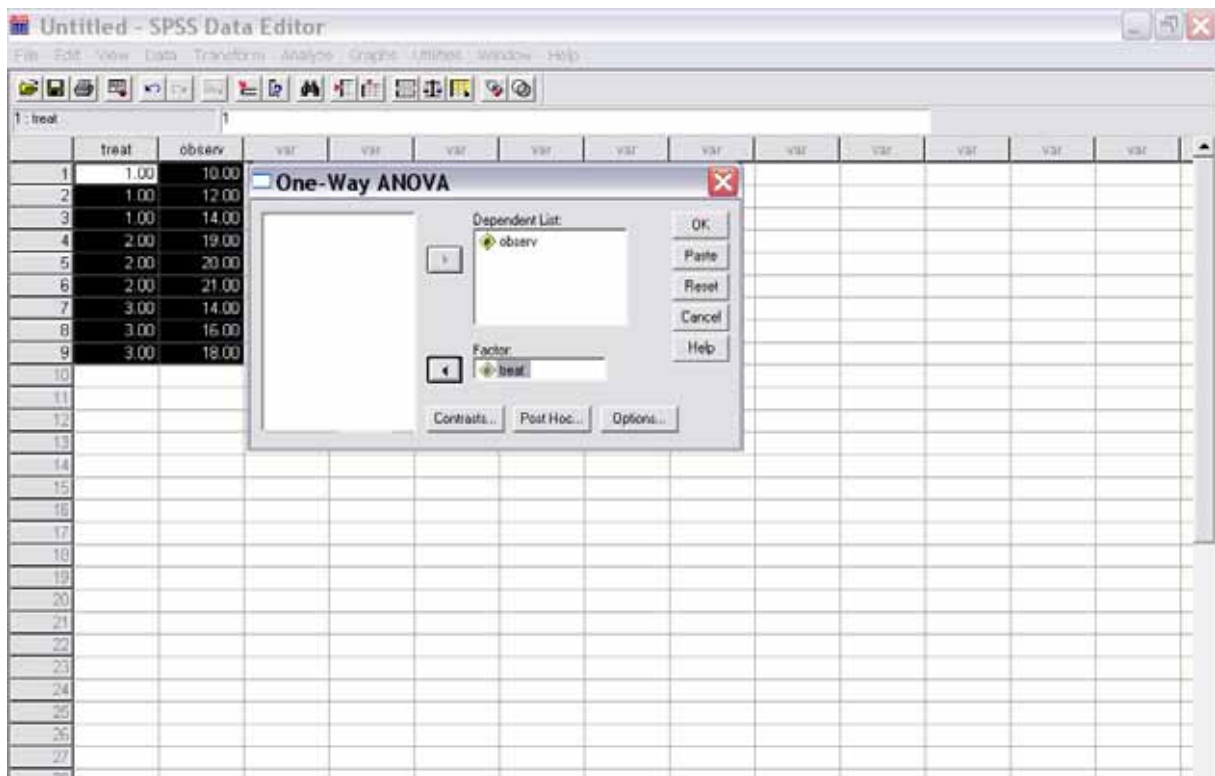
The screenshot shows the SPSS Data Editor window titled 'Untitled - SPSS Data Editor'. The menu bar includes File, Edit, View, Data, Transform, Analyze, Graphs, Utilities, Window, and Help. The toolbar contains various icons for file operations and data manipulation. The data grid shows the following data:

	treat	observ	var	var	var	var	var	var	var	var	var	var	var
1	1.00	10.00											
2	1.00	12.00											
3	1.00	14.00											
4	2.00	19.00											
5	2.00	20.00											
6	2.00	21.00											
7	3.00	14.00											
8	3.00	16.00											
9	3.00	18.00											
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16													
17													
18													
19													
20													
21													
22													
23													
24													
25													
26													
27													

2. Επιλέγουμε την στατιστική δοκιμασία μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης.



3. Επιλέγουμε ποιος είναι ο παράγοντας που επηρεάζει τις παρατηρήσεις και ποιες είναι οι παρατηρούμενες τιμές.



4. Πραγματοποιούμε τη δοκιμασία και στη συνέχεια προκύπτει ο ακόλουθος πίνακας των αποτελεσμάτων

The screenshot shows the SPSS Output1 - SPSS Viewer window. The main content area displays an ANOVA table for an Oneway test. The table is titled 'ANOVA' and has a column labeled 'OBSERV'. The table contains the following data:

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	96.000	2	48.000	16.000	.004
Within Groups	18.000	6	3.000		
Total	114.000	8			

7.3. Βιβλιογραφία

1. Finney, DJ. Probit Analysis. Ed. Cambridge, England, Cambridge University Press. 1952.
2. Finney DJ, Stevens WL. A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. *Biometrika*, 1948, **35(1-2)**: 191-201.
3. Greenberg BG. *International Statistical Review*, 1980. **8(1)**: 135-136.
4. Calvin D. *Choosing and Using Statistics*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 1999.
5. Bewick V, Cheek L, Ball J. *Statistics review 9: One-way analysis of variance*. *Crit Care*, 2004, **8**:130-136.
6. Whitely E, Ball J. *Statistics review 5: Comparison of means*. *Crit Care*, 2002, **6**:424-428.
7. Barile F. *Principle of Toxicology Testing*. CRC Press, Francis & Taylor, Boca Raton, 2008: 252-257.

Το εγχειρίδιο αυτό περιλαμβάνει τις βασικές αρχές και έννοιες της περιβαλλοντικής τοξικολογίας και της οικοτοξικολογίας, καθώς επίσης περιγράφει αναλυτικά πρότυπες πειραματικές μεθοδολογίες δοκιμασιών τοξικότητας και οικοτοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου την πειραματική πορεία και την τελική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Αθανάσιος Βαλαβανίδης. Αθήνα 1945. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Μεταπτυχιακές σπουδές στο UMIST (Manchester), King's College (Παν/μιο Λονδίνo). Μεταδιδακτορικές σπουδές και έρευνα: University of Birmingham, University of York, State University of Louisiana. Από το 1978 διδάσκει στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Έχει ασχοληθεί ερευνητικά τα τελευταία 25 χρόνια με τον τομέα της Χημείας των Ελευθέρων Ριζών (μηχανισμούς καρκινογόνων ουσιών, αιωρούμενα σωματίδια της ατμοσφαιρικής ρύπανσης, αντιοξειδωτικές ουσίες σε φυτικά προϊόντα, επίδραση τοξικών ουσιών (μέταλλα, ΠΑΥ) σε υδρόβιους οργανισμούς μέσω μηχανισμών ελευθέρων ριζών. Διδάσκει μαθήματα περιβαλλοντικής χημείας και οικοτοξικολογίας σε προπτυχιακό και μεταπτυχιακό επίπεδο. Έχει δημοσιεύσει πολυάριθμες εργασίες σε επιστημονικά περιοδικά και έχει εκδόσει τα παρακάτω βιβλία: «Χημική Εξέλιξη και η Προέλευση της Ζωής (εκδ. Παπαζήσης, 1974), «Βασικές Αρχές Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία» (Σύγχρονα Θέματα, 1990), «Εργασιακό Περιβάλλον: προβλήματα υγιεινής και ασφάλειας των εργαζομένων στην Ελλάδα» (Σύγχρονα Θέματα, 1985), «Χημικοί Παράγοντες στο Εργασιακό Περιβάλλον και Προβλήματα Υγείας και Ασφάλειας των Εργαζομένων» (Σύγχρονα Θέματα, 1995), «Επαγγελματικός Καρκίνος» (Ελληνική Αντικαρκινική Εταιρεία, 1997), «Εγχειρίδιο Υγιεινής και Ασφάλειας σε Χημικά και Βιοχημικά Εργαστήρια» (ΙΥΑΣΕ, 2000), «Περιβάλλον και Κακοήθεις Νεοπλασίες» (εκδ. ΒΗΤΑ, 2000), «Ελεύθερες Ρίζες και Μηχανισμοί Καρκινογένεσης» (εκδ. ΒΗΤΑ, 2003), «Ελεύθερες Ρίζες και ο Ρόλος τους στα Βιολογικά Συστήματα» (εκδ. ΒΗΤΑ, 2006), «Ελεύθερες Ρίζες στην Οργανική Χημεία» (2η έκδοση βελτιωμένη, Σύγχρονα Θέματα, 2008), «Βασικές Αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία» (2η έκδοση βελτιωμένη, Σύγχρονα Θέματα, 2008), «Βασικές Αρχές Υγιεινής και Ασφάλειας σε Χημικά και Βιοχημικά Εργαστήρια» (Σύγχρονα Θέματα, 2008), «Οικοτοξικολογία και Περιβαλλοντική Τοξικολογία» (Σύγχρονα Θέματα, 2008).

Θωμάϊς Βλαχογιάννη. Μόναχο 1977. Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Αθηνών (2001). Μεταπτυχιακές σπουδές στο Τμήμα Χημείας, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος (2003). Διδάκτωρ του Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήμα Χημείας (2007). Θέμα του διδακτορικού: «Μελέτη βιοδεικτών οξειδωτικού stress στο θαλάσσιο οργανισμό *Mytilus galloprovincialis* σε σχέση με τις συγκεντρώσεις μετάλλων και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων». Έχει δημοσιεύσει τις βασικές αρχές βιοδεικτών τοξικολογίας και τα αποτελέσματα της εργασίας της στα περιοδικά: *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2006), *Chemosphere* (2006) *Marine Pollution Bulletin* (2007), *Chemistry and Ecology* (2007). Επίσης, έχει διεξάγει πειράματα οικοτοξικολογίας σε υδρόβιους οργανισμούς για τη μέτρηση της τοξικότητας χημικών υλικών στο θαλάσσιο περιβάλλον. Τέλος, έχει επιβλέψει διπλωματικές και μεταπτυχιακές εργασίες με θέμα οικοτοξικολογικά πειράματα με βαρέα μέταλλα και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες σε μύδια.