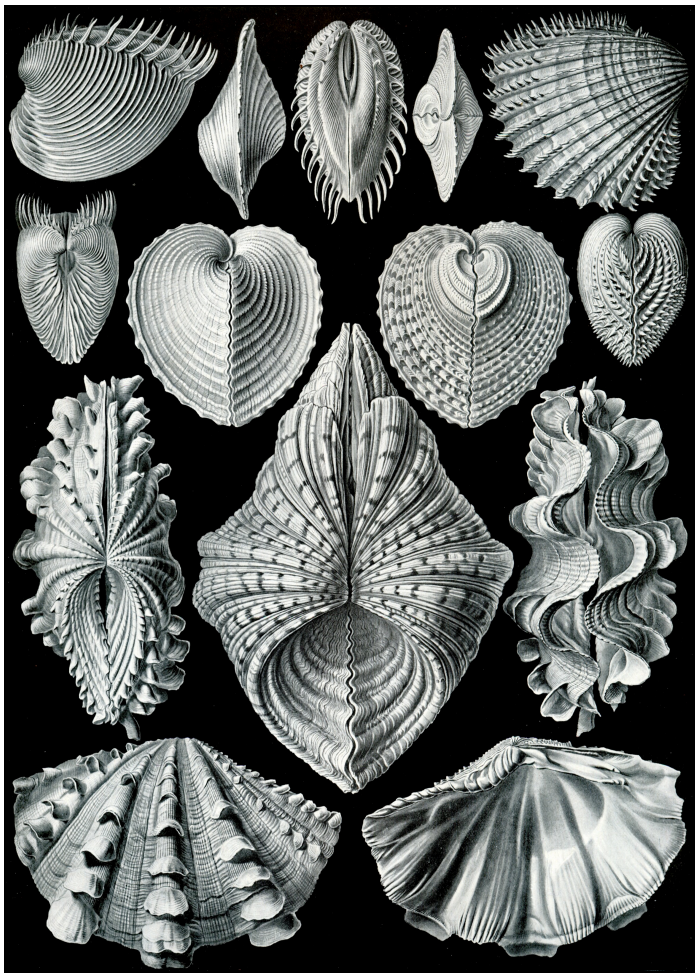
Πολυτεχνείο Κρήτης

Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος

Μ.Π.Σ. Περιβαλλοντική & Υγειονομική Μηχανική

<u>Μεταπτυχιακή Διατριβή</u>: "ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΡΥΠΑΝΣΗΣ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ".



Μεταπτυχιακός Φοιτητής: Καπετανάκης Νικόλαος (Α.Μ. 2006057080)

Διπλωματούχος Μηχανολόγος & Αεροναυπηγός

Μηχανικός Πανεπιστημίου Πάτρας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Βενιέρη Δανάη, Λέκτορας Περιβαλλοντικής

Μικροβιολογίας Πολυτεχνείου Κρήτης

Χανιά, Ιούλιος 2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 4

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ 5

1. Εισαγωγή 5

2. Βιοδείκτες. 7
2.1 Τί είναι οι Βιοδείκτες; 8
2.2 Χρήσεις και Είδη Βιοδεικτών. 10
2.3 Είδη Δεικτών. 11
2.4 Κριτήρια χρήσης βιοδεικτών. 12
2.5 Δειγματοληψία και Βιοδείκτες. 13
2.6 Η Επιστήμη – Πως Δουλεύουν οι Βιοδείκτες. 16
2.6.1 Παραδοσιακές Βιοαναλύσεις. 17
2.6.2 Βασισμένης – Βιοτεχνολογίας Βιοαναλύσεις. 17
2.6.3 Βιοτεχνολογία και Βιοδείκτες. 20
2.6.4 Τρέχουσες Περιοχές Έρευνας στους Βιοδείκτες. 20
2.6.5 Αειφόρος Ανάπτυξη και Βιοδείκτες. 20

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ 21

1. Ο ρόλος των μικροοργανισμών στις τροφικές αλυσίδες και στον κύκλο των θρεπτικών. 21

2. Για ποιο λόγο χρησιμοποιούμε μικροβιακούς δείκτες; 24

3. Μέθοδοι οι οποίες εφαρμόζονται στον μικροβιολογικό έλεγχο. 26
3.1 Προσδιορισμός του ποσού μικροβιακής βιομάζας. 27
3.2 Καθορισμός μικροβιολογικής ενεργότητας. 28
3.3 Χημικές τεχνικές για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλομορφίας. 30
3.4 Γενετικές τεχνικές για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλομορφίας. 31
3.5 Φυσιολογικές τεχνικές για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλομορφίας. 33
3.6 Σημεία αναφοράς. 34
3.7 Προσδιορισμός των αιτιωδών σχέσεων μεταξύ ρύπανσης και παρατηρήσεων πεδίου. 34

4. Επιδράσεις των βαρέων μετάλλων στις μικροβιακές κοινότητες. 36
4.1 Μόλυνση με χαλκό (Cu). 37
4.2 Μόλυνση αμμωδών εδαφών (i) με χαλκό (Cu), (ii) με νικέλιο (Ni) και χρώμιο (Cr), και (iii) με ψευδάργυρο (Zn). 37

ΑΣΠΟΝΔΥΛΑ 44

1. Η Εμφάνιση και Εξέλιξη των Βιολογικών Μεθόδων και Δεικτών Υδάτων. 44

2. Τα Ασπόνδυλα σαν Δείκτες. 45

3. Τα Βενθικά Μακροασπόνδυλα ως Δείκτες Οικολογικής Ποιότητας των Επιφανειακών Υδάτων. 48
3.1 Μεσοβένθος. 51
3.2 Ολιγόχαιτα. 54

ΜΑΛΑΚΙΑ 57

1. Ο Ρόλος των Μαλακίων στην Οικοτοξικολογία..... 57

2. Υδατική Βιοένδειξη και Βιοέλεγχος με Χρήση Μαλακίων. 64
2.1 Βιοσυσσώρευση. 66

3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα χρήσης μυδιών ως βιοδεικτών. 77

ΙΧΘΥΕΣ 79

1. Τα Ψάρια ως Βιοδείκτες. 79

2. Ακριβής Αποτίμηση Περιβαλλοντικής Υγείας. 83

3. Ευκολία Χρήσης και Εξαγωγή Συμπερασμάτων. 84

4. Τα ψάρια ως δείκτες περιβαλλοντικής ρύπανσης. 85
4.1. Τοξική Συσσώρευση στους Ιστούς Ψαριών. 88

5. Τελικές Παρατηρήσεις..... 91

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΒΙΟΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ 93

1. Βιοσυσσώρευση. 93

2. Βιοχημικές Μεταβολές..... 98

3. Προσεγγίσεις στη Μεταβολή του Πληθυσμού και των Βιοκοινοτήτων..... 98

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 101

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 102

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ 102

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ 104

ΑΣΠΟΝΔΥΛΑ 108

ΜΑΛΑΚΙΑ 110

ΙΧΘΥΕΣ 115

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΒΙΟΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ 119

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 120

Γραφικές Παραστάσεις. 120

Πίνακες. 120

Διαγράμματα. 121

Εικόνες. 122

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

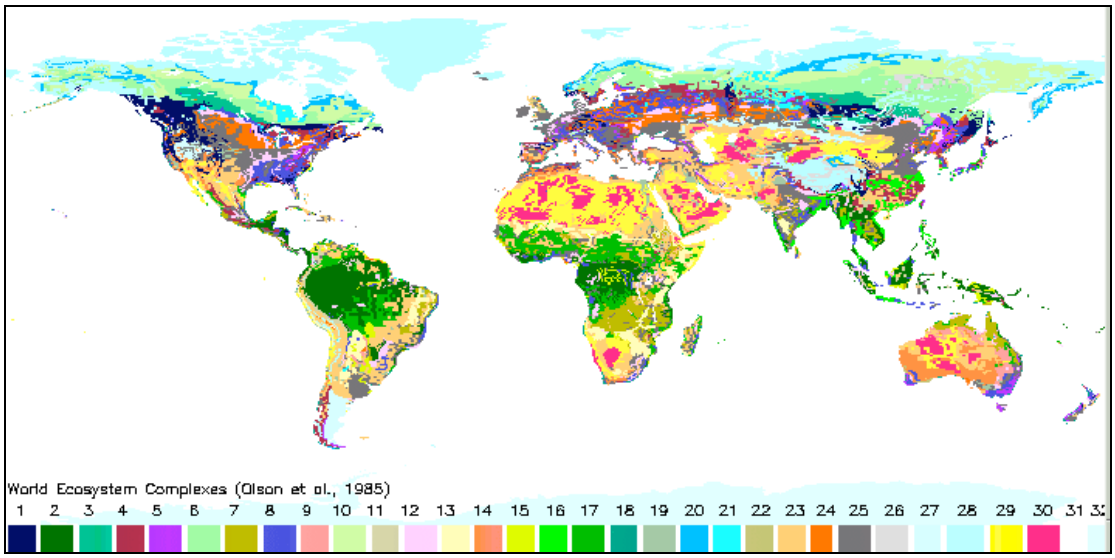
Ευχαριστώ θερμά την κ. Βενίερη Δανάη για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη συγκεκριμένη εργασία υπό την επίβλεψή της καθώς και για την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής αυτής. Η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να είχε πραγματοποιηθεί χωρίς τη συμβολή της κ. Βενιέρη η οποία με περίσσεια υπομονή με βοήθησε να προχωρήσω με σταθερά βήματα μέχρι το τέλος.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου αλλά και την αδερφή μου Γεωργία, οι οποίοι όπως πάντα έτσι και τώρα με στήριξαν και με βοήθησαν με τον δικό τους μοναδικό. Τους ευχαριστώ πολύ.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

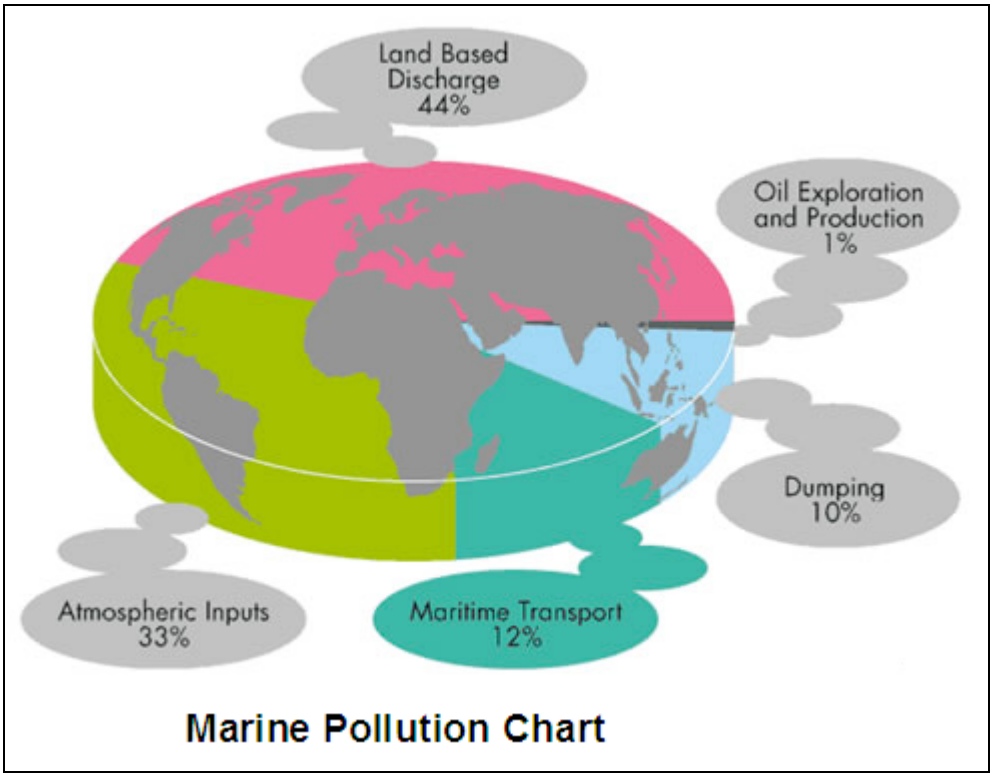
1. Εισαγωγή.

Οργανισμοί, πληθυσμοί, βιοκοινότητες και σε τελευταία ανάλυση ολόκληρα οικοσυστήματα επηρεάζονται με φυσικό τρόπο από πολυάριθμους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες άγχους όπως διακυμάνσεις στο κλίμα, μεταβαλλόμενη ακτινοβολία, μεταβαλλόμενα αποθέματα τροφής, σχέσεις θηρευτή – θηράματος, παράσιτα, ασθένειες, καθώς και από τον ανταγωνισμό μέσα αλλά και ανάμεσα στα βιολογικά είδη. Αυτή η κατάσταση άγχους είναι ζωτικής σημασίας σε κάθε επίπεδο του βιολογικού οργανισμού. Συμπερασματικά, η ικανότητα αντίδρασης σε ερεθίσματα άγχους αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό όλων των έμβιων συστημάτων, και αντίστροφα είναι αδύνατη η ανάπτυξη των βιολογικών ειδών και του οικοσυστήματος στο σύνολο, χωρίς την ύπαρξη τέτοιων ερεθισμάτων άγχους φυσικής προέλευσης (1). Το άγχος είναι η κινητήρια δύναμη της εξέλιξης. Κατά τη διάρκεια των διαφόρων εποχών εξέλιξης η ακτίνα δράσης του μέτρου της μεταβολής των ερεθισμάτων άγχους είναι γενικά σταθερή, επιτρέποντας στα βιολογικά είδη να προσαρμόζονται στις περιβαλλοντικές συνθήκες.



Εικόνα 1. Τα παγκόσμια σύνθετα οικοσυστήματα.

Στους πρόσφατους αιώνες αυτές οι αλλαγές αυτές έχουν φτάσει σε μία νέα διάσταση όσον αφορά την ποιότητα αλλά και την ποσότητα. Εξαιτίας της ανθρώπινης δραστηριότητας, το περιβάλλον έχει να αντιμετωπίσει ολοκληρωτικά νέες ουσίες οι οποίες προηγουμένως δεν υπήρχαν (ξενοβιοτικά, πολλοί ραδιενεργοί πυρήνες) και ενδεχομένως επιβλαβείς ουσίες οι οποίες απελευθερώνονται σε ποσότητες αδιανόητες για το παρελθόν (βαρέα μέταλλα, φυσικοί ραδιενεργοί πυρήνες). Επιπλέον, αυτά τα καινούρια ερεθίσματα άγχους συνήθως έχουν συσωρευτική επίδραση. Τα ερεθίσματα άγχους είτε προστίθενται στις επιδράσεις των φυσικών συστημάτων, είτε δρουν συνδυαστικά, με αποτέλεσμα να υπερβαίνεται το "επίπεδο ανοχής" (tolerance level) της ικανότητας των οργανισμών να αφομοιώνουν ή και να προσαρμόζονται σε αυτά τα ερεθίσματα (2).



Εικόνα 2. Διάγραμμα θαλάσσιας μόλυνσης.

Οι εντατικές επεκτάσεις νέων τεχνολογιών, η καταπάτηση της αστικοποίησης και ο συνεχώς αυξανόμενος ανθρώπινος καταναλωτισμός οδηγούν σε καταστρεπτικές και συχνά ανεπανόρθωτες αλλαγές του περιβάλλοντος. Η συνεχής επέκταση του φάσματος των μολυσματικών στοιχείων, τα οποία προέρχονται κυρίως από

ανθρωπογενητικές πηγές, οδηγεί στην εισβολή αυτών των μολυσματικών στοιχείων στον αέρα, στα επιφανειακά νερά και στο χώμα. Ταυτόχρονα, εξαιτίας μηχανισμών μεταφοράς και χημικών διαδικασιών, φωτοχημικών και βιοχημικών μονοπατιών, τα επίπεδα δεδομένων μολυσματικών στοιχείων, διαφοροποιούνται σε συγκρινόμενους αβιοτικούς παράγοντες. Έτσι λοιπόν οι χημικές ενώσεις εισέρχονται στο νερό, στα φυτά, στους οργανισμούς των ζώων και τελικά στον άνθρωπο. Η έκθεση σε τέτοιες μολυσματικές ενώσεις είναι ικανή να προκαλέσει βραχυπρόθεσμα ή και μακροπρόθεσμα, ποικιλία αρνητικών αποτελεσμάτων στον εκάστοτε οργανισμό. Τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα από μία τέτοια έκθεση συχνά αποκαλούνται "μακροπρόθεσμα τοξικά αποτελέσματα". Εξαιτίας των παραπάνω αναφερθέντων λόγων, οι αναλυτικοί χημικοί οφείλουν να καθορίσουν με κάθε λεπτομέρεια τα επίπεδα των συγκεκριμένων τοξινών στα βιοτικά και αβιοτικά τμήματα του περιβάλλοντος (3).

Εξαιτίας της ραγδαίας εξέλιξης στον τομέα της υδρόβιας τοξικολογίας τα τελευταία χρόνια, είναι πολύ πιο εύκολο να κατανοηθούν τα αποτελέσματα των μολυσματικών ουσιών στους υδρόβιους οργανισμούς σε μοριακό, κυτταρικό επίπεδο, επίπεδο ιστών / οργάνων καθώς και σε οργανικό επίπεδο. Εντός του πλαισίου εργασίας "2001 – 2004 EU Πρόγραμμα Βιολογικών Αποτελεσμάτων Περιβαλλοντικής Μόλυνσης" (2001 – 2004 EU Biological Effects of Environmental Pollution Program – BEEP), δόθηκε επιπλέον έμφαση στη σπουδαιότητα του καθορισμού των κατάλληλων φυσιολογικών αποκρίσεων ώστε να ποσοτικοποιηθεί η αναπαραγωγική ικανότητα των υπό μελέτη ζώων, συνδέοντας τις παρατηρούμενες αλλαγές στη δράση ενός βιοδείκτη με τα θεωρούμενα αποτελέσματα της μόλυνσης σε επίπεδο πληθυσμού (4).

2. Βιοδείκτες.

Αρκετοί ορισμοί έχουν δοθεί στον όρο "βιοδείκτης", ο οποίος γενικά χρησιμοποιείται με την ευρεία αίσθηση ώστε να συμπεριλάβει σχεδόν κάθε μέτρηση η οποία αντανακλά μια αντίδραση μεταξύ ενός βιολογικού συστήματος και ενός ενδεχομένου κινδύνου ο οποίος μπορεί να είναι χημικού, φυσικού ή και βιολογικού περιεχομένου (5).

2.1 Τί είναι οι Βιοδείκτες;

Οι βιοδείκτες είναι οργανισμοί όπως λειχήνες, πτηνά και βακτήρια τα οποία χρησιμοποιούνται για να ελέγχουν την υγεία του περιβάλλοντος. Οι οργανισμοί παρατηρούνται για αλλαγές οι οποίες μπορούν να φανερώσουν ένα πρόβλημα μέσα στο οικοσύστημα στο οποίο ζουν. Οι αλλαγές μπορούν να είναι χημικές, φυσιολογικές, ή συμπεριφοράς (6).

Ως βιοδείκτης ορίζεται η αλλαγή στην βιολογική αντίδραση (η οποία ποικίλει από μοριακή σε κυτταρική και από φυσιολογική απόκριση σε αλλαγή συμπεριφοράς) η οποία μπορεί να συσχετιστεί με την έκθεση σε τοξικές ουσίες ή και τοξικά αποτελέσματα τα οποία εκρέουν από περιβαλλοντικά χημικά σύμφωνα με τον Peakall (1994). Ο Van Gastel και ο Van Brummelen το 1994 επανακαθόρισαν τους όρους *βιοσημειωτής* (biomarker), *βιοδείκτης* (bioindicator) και *οικολογικός δείκτης* (ecological indicator), συνδέοντας τους παραπάνω με διαφορετικά επίπεδα βιολογικής οργάνωσης. Θεώρησαν σαν *βιοσημειωτή* κάθε βιολογική απόκριση σε ένα περιβαλλοντικό χημικό σε υποατομικό επίπεδο, το οποίο μπορεί να μετρηθεί εντός του οργανισμού ή στα προϊόντα του (ούρα, περιττώματα, τρίχωμα, φτερά κ.τ.λ.). Η βιολογική αυτή απόκριση υποδηλώνει παρέκκλιση από την κανονική κατάσταση και δεν μπορεί να παρατηρηθεί στον άθικτο οργανισμό. Ο *βιοδείκτης* ορίζεται σαν ο οργανισμός ο οποίος δίνει πληροφορίες σχετικά με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτές προκύπτουν από το μέρος στο οποίο ζει ο οργανισμός, από την παρουσία ή την απουσία του ή και από την συμπεριφορά του. Τέλος σαν *οικολογικός δείκτης* ορίζεται μια παράμετρος του οικοσυστήματος η οποία περιγράφει την υποδομή και την λειτουργία των οικοσυστημάτων. (7)

Υπάρχουν πολλοί ορισμοί για τους βιοδείκτες π.χ.: "Ο βιοδείκτης είναι μια ξενοβιοτική προκληθείσα μεταβολή η οποία λαμβάνει χώρα στα κυτταρικά ή στα βιοχημικά συστατικά ή στις διαδικασίες, στις δομές, ή στις λειτουργίες στις οποίες είναι μετρήσιμη σε ένα βιολογικό σύστημα ή ένα δείγμα" (8).

Σύμφωνα με το NRC (National Research Council) και τον WHO (World Health Organization) οι βιοδείκτες μπορούν να υποδιαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες:

<u>Βιοδείκτες Έκθεσης</u>: καλύπτουν την ανίχνευση και την μέτρηση μιας εξωγενούς ουσίας ή το προϊόν του μεταβολισμού της ή το προϊόν το οποίο προκύπτει από την αντίδραση του ξενοβιοτικού παράγοντα με το μόριο στόχο ή κύτταρο στόχο, το οποίο προϊόν μετριέται σε κάποιο τμήμα μέσα στον οργανισμό.

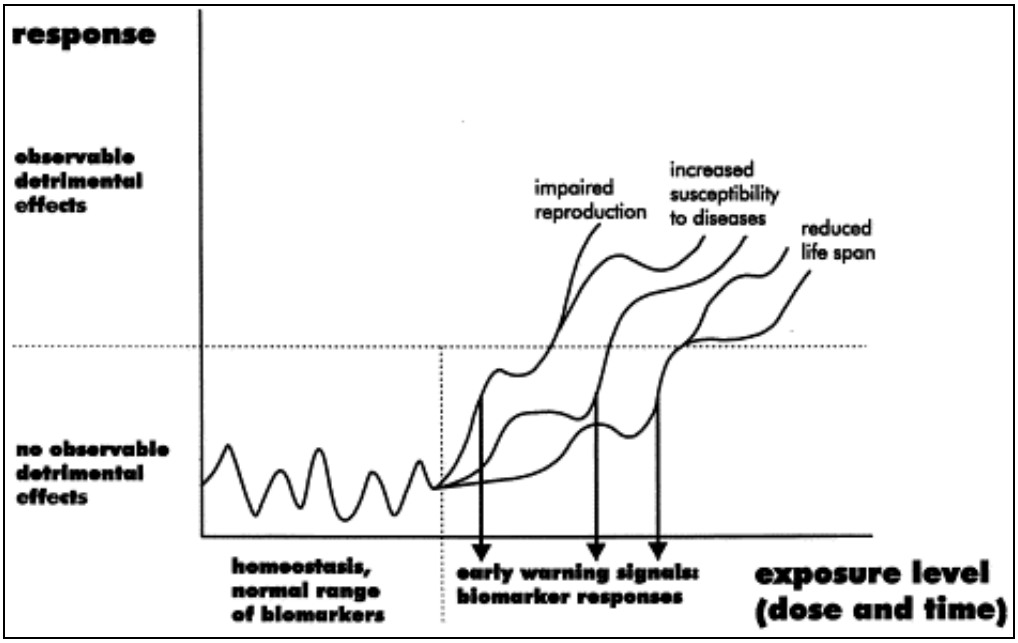
Βιοδείκτες Επίδρασης: συμπεριλαμβάνουν μετρήσιμες βιοχημικές, φυσιολογικές ή άλλες μεταβολές στους ιστούς ή στα σωματικά υγρά ενός οργανισμού και μπορούν να αναγνωριστούν με τον συσχετισμό τους με την επαληθευμένη ή και πιθανή βλάβη στην υγεία, ή και ασθένεια.

Βιοδείκτες Ευαισθησίας: φανερώνουν την έμφυτη ή επίκτητη ικανότητα ενός οργανισμού να αντιδρά στην πρόκληση της έκθεσης σε μια συγκεκριμένη ξενοβιακή ουσία, συμπεριλαμβανομένου γενετικών παραγόντων και αλλαγών σε υποδοχείς οι οποίοι αλλάζουν την ευαισθησία ενός οργανισμού σε αυτή την έκθεση.

Η υποδιαίρεση των βιοδεικτών στην βιβλιογραφία είναι μάλλον διάχυτη από τη στιγμή που οι *βιοδείκτες έκθεσης* και οι *βιοδείκτες επίδρασης* ξεχωρίζονται από τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται. Οι αποκρίσεις των βιοδεικτών μπορούν να θεωρηθούν σαν βιολογικές ή βιοχημικές συνέπειες έπειτα από μια τοξική έκθεση, η οποία τους καθιστά θεωρητικά χρήσιμους σαν δείκτες έκθεσης και επίδρασης μαζί. Οι *βιοδείκτες έκθεσης* μπορούν να πιστοποιήσουν και να αποτιμήσουν την έκθεση ατόμων ή και πληθυσμών σε μια συγκεκριμένη ουσία, εξασφαλίζοντας μια σύνδεση μεταξύ εξωτερικής έκθεσης και εσωτερικής δοσομετρίας (dosimetry). Οι *βιοδείκτες επίδρασης* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να καταγράψουν είτε προκλινικές μεταβολές, είτε εχθρικά αποτελέσματα στην υγεία εξαιτίας εξωτερικής έκθεσης ή απορρόφησης ενός χημικού στοιχείου. Οι *βιοδείκτες ευαισθησίας* βοηθούν στο να διασαφηνιστούν αποκλίσεις στον βαθμό εκείνο των αποκρίσεων σε τοξική έκθεση η οποία παρατηρείται ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα. Η βιοσυσσώρευση συγκεκριμένων επίμονων περιβαλλοντικών μολυσματικών στοιχείων στους ιστούς των ζώων μπορεί να θεωρηθεί σαν *βιοδείκτης έκθεσης* για αυτά τα χημικά (8, 9).

Πάνω από ένα συγκεκριμένο κατώφλι (μολυσματικής δόσης ή χρόνου έκθεσης) η μολυσματική ουσία και το σημάδια απόκρισης του βιοδείκτη αποκλίνουν από το κανονικό πεδίο σε μια κατάστασης απουσίας άγχους, και τελικά οδηγούνται στην εκδήλωση μιας κατάστασης πολλαπλών συνεπειών σε ιεραρχικά υψηλότερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης (βλέπε *Γραφική Παράσταση 1*) (10). Εσφαλμένη εφαρμογή ή ερμηνεία των αποκρίσεων των βιοδεικτών όμως μπορούν να οδηγήσουν σε εσφαλμένα συμπεράσματα σχετικά με το στρες το οποίο προκύπτει από τη μολυσματική ουσία ή την περιβαλλοντική ποιότητα. Συγκεκριμένες αποκρίσεις αποδεδειγμένες για μια κατηγορία βιολογικού είδους, δεν είναι απαραίτητα έγκυρες / εφαρμόσιμες και σε άλλα βιολογικά είδη. Επιπλέον οικοτοξικολογικά στοιχεία τα οποία έχουν αποκομισθεί από εργαστηριακές μελέτες μπορούν πολύ δύσκολα να

μεταφραστούν σε έγκυρες προβλέψεις αποτελεσμάτων τα οποία μπορεί να πάρουν μέρος στο πεδίο (11). Από τη στιγμή που από κοινού η υπερεκτίμηση και η κακή χαμηλά εκτίμηση των αποτελεσμάτων είναι πολύ πιθανό να συμβούν, οι εργαστηριακές παρατηρήσεις πρέπει πάντα να επικυρώνονται με έρευνα στο πεδίο. Οι βιοδείκτες οι οποίοι βρίσκουν εφαρμογή στο εργαστήριο αλλά και στο πεδίο, μπορούν να εξασφαλίσουν ένα σημαντικό σύνδεσμο μεταξύ τοξικότητας στο εργαστήριο και αποτίμησης στο πεδίο. Όσον αφορά τα δείγματα πεδίου, τα στοιχεία του βιοδείκτη μπορούν να προβλέψουν ένα σημαντικό περιεχόμενο του συνολικού εξωτερικού φορτίου το οποίο είναι βιολογικά διαθέσιμο στην έκθεση του 'αληθινού κόσμου' (12).



Γραφική Παράσταση 1. Η κύρια μορφή αποκρίσεων των οργανισμών στα καταστρεπτικά αποτελέσματα της μολυσματικής έκθεσης.

2.2 Χρήσεις και Είδη Βιοδεικτών.

Κάθε οργανισμός μέσα σε ένα οικοσύστημα έχει την ικανότητα να περιγράφει την υγεία του περιβάλλοντός του (6). Οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται για να:

- Αποκαλύπτουν αλλαγές στο φυσικό περιβάλλον.
- Καταγράφουν την ύπαρξη μόλυνσης και την επιρροή στο οικοσύστημα στο οποίο ο οργανισμός ζει.
- Παρακολουθούν την εξέλιξη του περιβαλλοντικού καθαρισμού.

- Ελέγχουν ουσίες όπως το πόσιμο νερό, για την πιθανή ύπαρξη μολυσματικών παραγόντων.

2.3 Είδη Δεικτών.

Τα διάφορα είδη βιολογικών δεικτών αποτελούν ξεχωριστούς δείκτες διότι υποδεικνύουν την βιολογική κατάσταση σε ένα υδάτινο περιβάλλον. Με το να χρησιμοποιούνται βιοδείκτες σαν προάγγελοι της μόλυνσης ή του εκφυλισμού ενός οικοσυστήματος, μπορεί να βοηθήσει στην διατήρηση κρίσιμων πηγών πληροφοριών. Αν και συχνά χρησιμοποιείται ο όρος "βιολογικός δείκτης ", σε κάποιο βαθμό αυτό είναι ανακριβές. Στην πραγματικότητα οι δείκτες είναι ομάδες ή είδη βιολογικής υπόστασης οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό μιας περιβαλλοντικής συνθήκης. Σε κάθε ομάδα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αφενός ξεχωριστά βιολογικά είδη ούτως ώστε να γίνουν μετρικοί υπολογισμοί όπως καθορισμός του ποσοστού Achnanthes minutissima (όπως π.χ. διατομικά είδη) και αφετέρου ομάδες βιολογικών ειδών (όπως π.χ. EPT taxa) ή ξεχωριστά γένη (όπως π.χ. Caddisfly larvae – Γένος Trichoptera) ούτως ώστε να αποτιμηθούν οι ποιοτικές συνθήκες του νερού. Τις κυριότερες ομάδες αποτελούν (7):

- Τα ψάρια
- Τα ασπόνδυλα
- Τα περίφυτα (Periphyton)
- Τα μακρόφυτα (Macrophytes)

- **Δείκτες Φυτά.**

Η παρουσία ή η απουσία συγκεκριμένων φυτών ή άλλης φυτικής ζωής σε ένα οικοσύστημα, μπορεί να εξασφαλίσει σημαντικές πληροφορίες για την υγεία του περιβάλλοντος.

Οι λειχήνες που συχνά εντοπίζονται σε βράχους και κορμούς δέντρων, είναι μικροοργανισμοί οι οποίοι αποτελούνται από μύκητες (fungi) και άλγη (algae). Αποκρίνονται σε περιβαλλοντικές αλλαγές που συμβαίνουν στα δάση, συμπεριλαμβανομένου των αλλαγών στη δομή των δασών, στην ποιότητα του αέρα και στο κλίμα. Η απουσία λειχήνων σε ένα δάσος μπορεί να υποδηλώνει περιβαλλοντικό άγχος, που με τη σειρά του μπορεί να σημαίνει υψηλά επίπεδα διοξείδιου του θείου, θειούχων ενώσεων, αζώτου.

- **Δείκτες Ζώα.**

Μία αύξηση ή μείωση ενός ζωικού πληθυσμού μπορεί να υποδηλώνει ζημιά στο οικοσύστημα που έχει προκληθεί από μόλυνση. Για παράδειγμα, εάν η μόλυνση ελαττώσει σημαντικά πηγές τροφής, τα ζωικά είδη, τα οποία βασίζονται σε αυτές τις πηγές τροφής, θα ελαττωθούν. Εκτός του ελέγχου του μεγέθους και του αριθμού συγκεκριμένων ειδών, και άλλοι μηχανισμοί ζωικής ένδειξης όπως η παρακολούθηση της συγκέντρωσης τοξινών στους ζωικούς ιστούς, και η παρακολούθηση του ρυθμού στον οποίο οι δυσμορφίες αυξάνονται σε πληθυσμούς ζώων.

- **Μικροβιακοί Δείκτες.**

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες της υγείας του υδάτινου ή χερσαίου περιβάλλοντος. Εντοπιζόμενοι σε μεγάλες ποσότητες, οι μικροοργανισμοί είναι πιο εύκολο να ελεγχθούν με δειγματοληψία σε σχέση με άλλους οργανισμούς. Μερικοί μικροοργανισμοί θα παράγουν καινούριες πρωτεΐνες, αποκαλούμενες πρωτεΐνες άγχους, όταν θα εκτεθούν σε μολυσματικές ενώσεις όπως το κάδμιο και το βενζένιο. Αυτές οι πρωτεΐνες άγχους μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν πρώιμη ειδοποίηση για τον εντοπισμό χαμηλών επιπέδων μόλυνσης (6).

2.4 Κριτήρια χρήσης βιοδεικτών.

Πρακτικά οι "χρήσιμοι βιοδείκτες" θα πρέπει να είναι (13):

- Αντιπροσωπευτικοί για ένα δεδομένο οικοσύστημα
- Απλοί και οικονομικοί στο να μετρηθούν
- Εύκολα "μεταφράσιμοι" και προβλέψιμοι από έγκυρα ποσοτικά μοντέλα
- Διεθνώς εφαρμόσιμοι
- Σχετικοί με την δεδομένη περιβαλλοντική απειλή

2.5 Δειγματοληψία και Βιοδείκτες.

Οργανισμοί όπως τα μύδια πρέπει να συλλέγονται από ελεύθερους δύτες ή δύτες με αναπνευστικές συσκευές (σε βάθη υδάτων μέχρι 40m). Τα ψάρια από την άλλη συλλέγονται με δίχτυα ή με επαγγελματική αλιεία σε κεκλιμένες περιοχές όπου εντοπίζεται η ρύπανση όπως π.χ. στις εκβολές ποταμών, στα προβληματικά σημεία (hot spots) ή σε περιοχές εισαγωγής εκπομπών.

Ένας άλλος πολύ κοινός τρόπος αξιολόγησης των μολυσμένων περιοχών από τους βιοδείκτες είναι η έκθεση, εγκλωβισμένων ψαριών ή μυδιών (14). Ο εγκλωβισμός των οργανισμών έχει το πλεονέκτημα της αποκαλούμενης επιτόπιας (in situ) βιολογικής ανάλυσης. Αλλά για να είναι εφικτή μια "έγκαιρη προειδοποίηση" (έγκαιρος συναγερμός) είναι πολύ δύσκολο. Αυτό συμβαίνει αφενός διότι ο χειρισμός αυτού του συναγερμού είναι αρκετά πολύπλοκος και αφετέρου (βλέπε *Πίνακα 1*) θα υπάρχει πάντα μια καθυστέρηση εξαιτίας του χρόνου επώασης και έγκυρης απάντησης στα πλαίσια των χρησιμοποιημένων βιοδεικτών.

Αποκρίσεις Βιοδεικτών και Αντιδράσεις των Βιολογικών Συστημάτων	
[> 2 χρόνια]	*Επίπεδο Οικοσυστήματος*: ● Μεταβολή στη δομή του οικοσυστήματος – ανάπτυξη εκ νέου των στοιχείων και της δομής του συστήματος. Η παθολογία και η υγεία του οικοσυστήματος μειώνονται.
[0.5–1 χρόνια]	*Επίπεδο Πληθυσμού*: ● Μεταβολές στην δυναμική του πληθυσμού και στη σύνθεση – αυτο-οργάνωση – οργάνωση εκ νέου
[1–2 μήνες]	● Αλλαγή στην ανάπτυξη και στην προσαρμογή. Η παθολογία και η υγεία του πληθυσμού μειώνεται.
[20–120 ημέρες]	*Επίπεδο Οργανισμού (έκθεση)*: ● Αλλαγή στην ανάπτυξη, στην αναπαραγωγή, στην αντι-ξενοβιοτική άμυνα και στην ανοσολογική άμυνα. Περιβαλλοντική παθολογία.
[1–3 ημέρες]	*Κυτταρικό Επίπεδο*: ● Μεσοκυττάρια αντι-ξενοβιοτική άμυνα όπως MXRtr (Multi Xenobiotic Resistance transporter – Πολλαπλή Ξενοβιοτική

	Αντίσταση μεταφορέα) και SATOA (System of Active Transport of Organic Anions – Σύστημα Ενεργής Μεταφοράς Οργανικών Ανιόντων) ● Μεσοκυττάρια ανοσολογική άμυνα γενετική βλάβη – διόρθωση γενετικής βλάβης αντίδραση με μακρομόρια – παθολογία κυττάρου *Μοριακό Επίπεδο*: Σχηματισμός συμπλεγμάτων DNA, μεταλλακτική ικανότητα, το DNA ξεδιπλώνεται, δημιουργία μικροπυρήνων, μετάφασική χρωμοσωμική ανωμαλία
[10 λεπτά.]	● "Βιοαισθητήρες", άμεσα συνδεδεμένοι – Πρόωρη Ειδοποίηση Συστήματος Βιοαισθητήρες διαθέσιμοι για περαίωση ("σήματα"): τοξικότητα γ – πιθανή γονοτοξικότητα - ανοσοκαταστολή
↑ Εισροή ρυπαντών (*φυσικό* και *χημικό επίπεδο*)	

<u>*Πίνακας 1*</u>. Χρονική διαβάθμιση αποκρίσεων βιολογικών συστημάτων και "σήματα" οικοτοξικολογικών βιοδεικτών.

Στον *Πίνακα 1* φαίνεται ξεκάθαρα πως υπάρχει χρονική καθυστέρηση από το μοριακό επίπεδο στο επίπεδο του οικοσυστήματος. Οι αρχές που συνδέονται με τις διαφορετικές κλίμακες των βιοχημικών απαντήσεων εξαρτώνται από τις κινητικές των βιολογικών συστημάτων. Προκειμένου να γίνει κατανοητή η πολύπλοκη αλληλεπίδραση στο οικοσύστημα, είναι απαραίτητο να χωριστούν τα λειτουργικά και τα δομικά συστατικά στα αντίστοιχα μέρη τους. Για την αξιολόγηση στο επίπεδο του οργανισμού, στο πλαίσιο της αναπαραγωγής, θα πρέπει να απαιτούνται περίοδοι επώασης 20 έως 120 ημερών. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου θα μπορούσε να υπάρξει η αρχή μιας διαδικασίας προσαρμογής στον οργανισμό. Αυτό θα αντανακλούσε τις αλλαγές τελικά στο οικοσύστημα. Οι διαδικασίες προσαρμογής

μπορούν να ελεγχθούν και να ποσοτικοποιηθούν με χρήση κατάλληλων βιοδεικτών. Αυτή η αξιολόγηση θα περιλάμβανε επίσης διαδικασίες όπως η αναδιοργάνωση και η αναδιαμόρφωση της δομής του συστήματος. Έπειτα από τη δειγματοληψία οργανισμών πολλοί ιστοί απαιτούν απότομη ψύξη με υγρό άζωτο (π.χ. ιστός συκωτιού), άλλοι ιστοί απαιτούν ψύξη σε –20°C (π.χ. συκώτι ή εγκέφαλος) ενώ για άλλα βιοδείκτες πρέπει να μετρηθούν με πρόσφατα επιλεγέντες ιστούς. Ιδανικά, τα "σήματα έγκαιρης προειδοποίησης" στα οικοσυστήματα χρησιμοποιώντας βιοδείκτες (15, 16) όχι μόνο φανερώνουν τα αρχικά επίπεδα ζημίας, αλλά αυτά τα σήματα θα μπορούσαν επίσης να δώσουν τις απαντήσεις για να αναπτυχθούν στρατηγικές ελέγχου και προληπτικών μέτρων. Οι πληροφορίες για αυτά τα αρχικά σήματα μπορούν να ληφθούν με διαδικασίες όπως η αποτοξίνωση, η γενοτοξικότητα, η ανοσοκαταστολή και η δυνατότητα του οργανισμού που αναπαράγεται.

Η γενοτοξικότητα είναι ένα καλό παράδειγμα για μια λειτουργική εφαρμογή ενός σχετικού βιοδείκτη. Η εκτεταμένη έκθεση των οργανισμών σε περιβαλλοντικές γενοτοξίνες θα οδηγούσε σε διάφορες φυσιολογικές αναταραχές όπως η αναπαραγωγική εξασθένιση και άλλες σχετικές ανωμαλίες. Οι μετρήσεις αποκρίσεων στη γενοτοξικότητα στα πλαίσια της αναπαραγωγικής τοξικότητας είναι ουσιαστικές για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των ανθρωπογενών παραγόντων άγχους. Οι συνέπειες της ζημίας του DNA (γενοτοξική δυνατότητα) περιγράφονται από το μοριακό στο επίπεδο οικοσυστήματος του βιολογικού συστήματος στον *Πίνακα 2*.

Επίπεδο Βιολογικής Οργάνωσης	**Αποτελέσματα**
DNA	Μεταλλάξεις
Κύτταρο	Θανάτωση κυττάρου Διαταραγμένος πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση Νεοπλαστικός μετασχηματισμός
Ιστός / Όργανο	Λειτουργικά ελαττώματα Δυσμορφίες Όγκοι
Οργανισμός	Μειωμένη βιωσιμότητα Μειωμένη γονιμότητα

Πληθυσμός	Μείωση μεγέθους πληθυσμού Εξάλειψη
Οικοσύστημα	Μείωση της ποικιλομορφίας ειδών

Πίνακας 2. Επιπτώσεις των διαφόρων επιπέδων βιολογικής οργάνωσης στα βιολογικά συστήματα εξαιτίας φθοράς του DNA.

2.6 Η Επιστήμη – Πως Δουλεύουν οι Βιοδείκτες.

Συγκεκριμένες φυσιολογικές αλλαγές και αλλαγές στην συμπεριφορά των βιοδεικτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να εντοπιστούν αλλαγές στην περιβαλλοντική υγεία. Οι συγκεκριμένες αλλαγές διαφέρουν από οργανισμό σε οργανισμό. Η χρήση οργανισμών σαν βιοδείκτες περικλείει πολλές περιοχές στην επιστήμη. Η συντήρηση της γενετικής της άγρια ζωής αποτελεί ένα παράδειγμα του πως οι παραδοσιακές προσεγγίσεις μπορούν να συνδυαστούν με τις αναδυόμενες βιοτεχνολογίες για να βελτιώσουν την ακρίβεια και να συλλέξουν πληροφορίες όχι διαθέσιμες με την βοήθεια συμβατικών μεθόδων. Η διατήρηση της γενετικής της άγριας ζωής συνδυάζει τον παραδοσιακό έλεγχο άγριων πληθυσμών, όπως τα ρακούν, με την επιστημονική πειθαρχία της γενετικής, ώστε να αυξηθούν οι πληροφορίες για την υγεία των οικοσυστημάτων.

Αλλαγές στην συμπεριφορά και τον πληθυσμό ενός ζωικού είδους μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί από τους επιστήμονες, αλλά οι φυσιολογικές αλλαγές θα πρέπει κάθε φορά να ελέγχονται με τη χρήση ειδικών μεθόδων ελέγχου. Βιοαναλύσεις απαιτούν δείγματα από οργανισμούς ώστε να εντοπιστούν περιβαλλοντικές αλλαγές. Αυτοί οι έλεγχοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διασφαλίσουν την ασφάλεια του πόσιμου νερού ή για να μετρήσουν την υγεία των ποταμών. Στο μέλλον, καθώς μελέτες ανακαλύπτουν καινούριους τρόπους χρήσεις μικροβίων, οι τεχνικές αυτές θα επεκταθούν και θα συμπεριλάβουν ελέγχους στο έδαφος και τον αέρα.

Case Study: Έλεγχος Νερού.

Φθορίζοντα βακτήρια χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του νερού από περιβαλλοντικές τοξίνες. Εφόσον οι τοξίνες εντοπίζονται στο νερό, ο κυτταρικός μεταβολισμός των βακτηρίων αναστέλλεται ή διακόπτεται. Αυτό επηρεάζει την ποιότητα ή την ποσότητα του φωτός που εκπέμπεται από τα βακτήρια. Αντίθετα

προς τους παραδοσιακούς ελέγχους, ο παραπάνω έλεγχος είναι πολύ γρήγορος – χρειάζονται μόλις με 5 έως 30 λεπτά να ολοκληρωθεί. Όμως, αυτός ο έλεγχος φανερώνει την παρουσία μόνο μιας τοξίνης και δεν μπορεί να προσδιορίσει την συγκεκριμένη τοξίνη η οποία προκαλεί την αλλαγή στον μικροοργανισμό (17).

2.6.1 Παραδοσιακές Βιοαναλύσεις.

Στις παραδοσιακές βιοαναλύσεις, ένας βιοδείκτης (οργανισμός) εισάγεται στα περιβαλλοντικά δείγματα, όπως στο χώμα ή το νερό, και οι ερευνητές παρατηρούν πιθανές αλλαγές που συμβαίνουν σαν αποτέλεσμα της έκθεσης (18). Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται κυρίως στην παρατήρηση για ανίχνευση αλλαγών. Παραδείγματα παραδοσιακών βιοαναλύσεων συμπεριλαμβάνουν τα ακόλουθα:

- Μέτρηση της ανάπτυξης της ρίζας ενός φυτού σε ύποπτα μολυσμένα περιβάλλοντα και σύγκριση της μετρούμενης τάξης ανάπτυξης σε σχέση με φυσιολογικής τάξης ανάπτυξης της ρίζας.
- Έκθεση μικροοργανισμών σε ένα περιβάλλον και παρατήρηση τυχών αλλαγών στον οργανισμό ο οποίος σχετίζεται με την έκθεση στην τοξίνη, όπως παρουσία πρωτεϊνών άγχους οι οποίες παράγονται όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε βλαβερές περιβαλλοντικές συνθήκες.

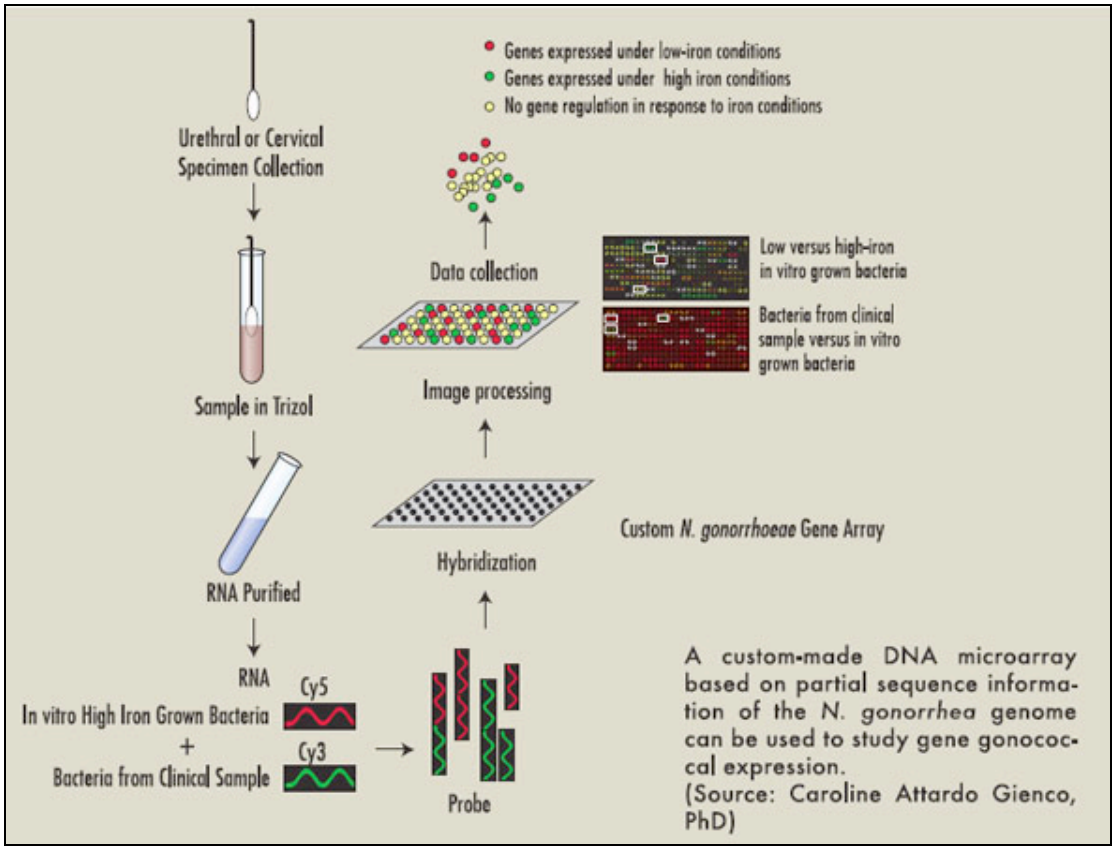
2.6.2 Βασισμένης – Βιοτεχνολογίας Βιοαναλύσεις.

Πολλές μέθοδοι βασισμένης – βιοτεχνολογίας χρησιμοποιούν μικροοργανισμούς για να ελέγξουν την υγεία του περιβάλλοντος. Αντίθετα με τις παραδοσιακές μεθόδους, οι βιοαναλύσεις βασισμένης – βιοτεχνολογίας δεν βασίζονται εξολοκλήρου στην παρατήρηση αλλά προτίθενται να δημιουργήσουν συγκεκριμένες αντιδράσεις οι οποίες θα φανερώνουν την παρουσία ενός συγκεκριμένου μολυσματικού στοιχείου ή ενός ανεπιθύμητου μικροοργανισμού. Με αυτόν τον τρόπο είναι παρεμφερείς με τις παραδοσιακές χημικές αναλύσεις των περιβαλλοντικών δειγμάτων.

- **DNA Microarray Τεχνολογία.**

Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία DNA Microarray, τα περιβαλλοντικά δείγματα, όπως το νερό, ελέγχονται για το ακριβές γενετικό υλικό ενός οργανισμού. Αυτός ο τρόπος ελέγχου χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει επικινδύνους μικροοργανισμούς σε ένα περιβάλλον, όπως το βακτήριο E. Coli στο νερό.

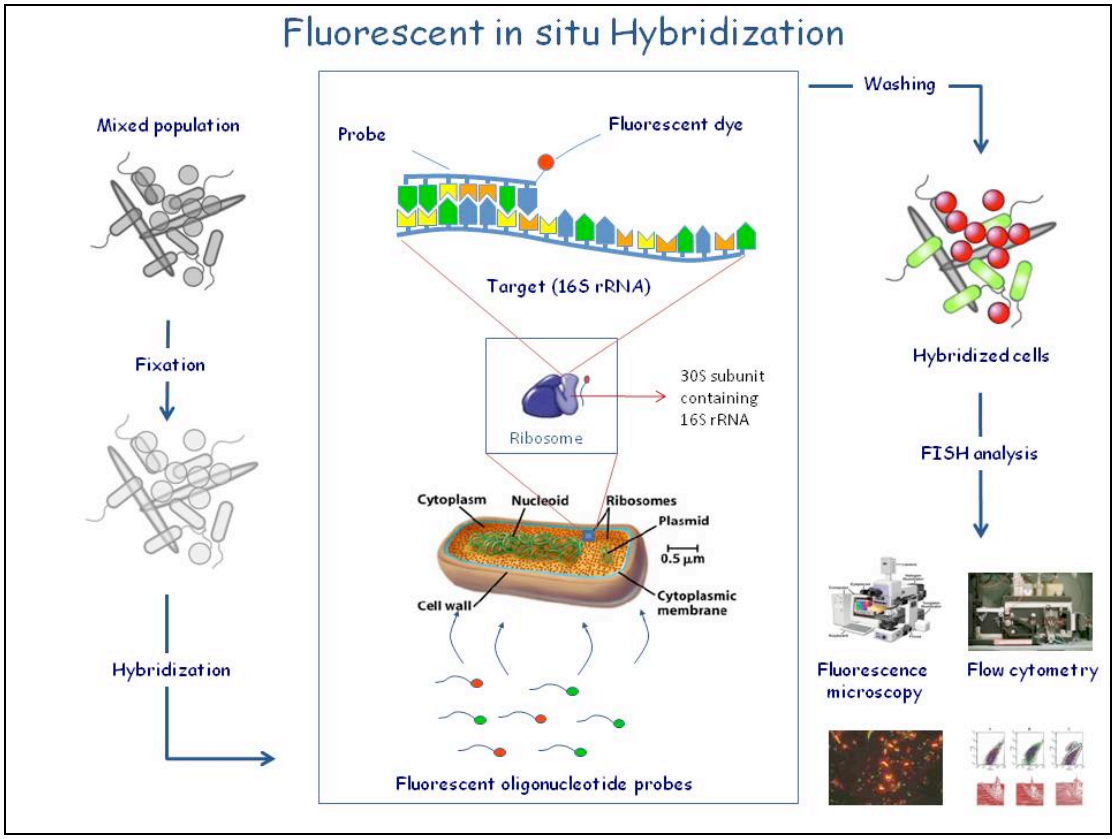
Οι DNA microarrays είναι αποτυπώματα ορισμένου μεγέθους σε γυαλί ή microchip πυριτίου τα οποία εμποτίζονται με χιλιάδες μονόκλωνα DNA ή RNA. Σε αυτήν την περίπτωση, το DNA είναι του ίδιου τύπου με αυτό του μικροοργανισμού ο οποίος πρόκειται να ελεγχθεί. Τα microarrays κατασκευάζονται χρησιμοποιώντας δείγματα από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς. Εάν ο ίδιος τύπος των μικροοργανισμών είναι παρόν στο δείγμα νερού, το DNA ή το RNA microarray θα αντιδράσει με το συμπληρωματικό DNA ή RNA του μικροοργανισμού στο δείγμα. Αυτό υποδεικνύει την παρουσία του στο δείγμα. Όταν αυτοί οι έλεγχοι είναι πλήρως εξελιγμένοι, χρειάζεται περίπου 4 ώρες για να ελεγχθεί η μικροβιολογική παρουσία στα περιβαλλοντικά δείγματα, όπως αυτά του πόσιμου νερού και του εδάφους. Οι παραδοσιακά βασισμένοι έλεγχοι απαιτούν κατά μέσο όρο 48 ώρες για την διεξαγωγή αποτελεσμάτων (19).



Εικόνα 3. Η μέθοδος των DNA microarrays.

- **Φθορίζουσα Υβριδικότητα In – Situ (Fluorescence In–Situ Hybridisation, FISH).**

Αυτή είναι μία μέθοδος για τον εντοπισμό παρουσίας συγκεκριμένων γονιδίων σε ένα δείγμα. Σαν βιοδείκτης, το FISH μπορεί να προσδιορίσει εάν ένας συγκεκριμένος μικροοργανισμός μολύνει ιδιαίτερες περιοχές. Αυτό πραγματοποιείται ελέγχοντας περιβαλλοντικά δείγματα για την παρουσία μικροβιακών γονιδίων. Ένας φθορίζων σημειωτής προσκολλάται στο DNA του τύπου του μικροοργανισμού ο οποίος ελέγχεται. Αυτό το σημειωμένο DNA καλείται πλέον "probe". Τα περιβαλλοντικά δείγματα στερεώνονται σε ένα γυαλί δείγματος μικροσκοπίου (slide) και το slide εκτίθενται στο φθορίζον DNA probe. Εάν ο μικροοργανισμός που μολύνει είναι παρόν στο slide, το DNA του θα δεσμεύσει το φθορίζον probe, και σαν αποτέλεσμα το slide θα κοκκινίσει με έκθεση υπεριώδους φωτός. Η ανίχνευση αυτού του υπεριώδους φωτός αποδεικνύει την παρουσία του μικροοργανισμού που μολύνει στο δείγμα (21).



Εικόνα 4. Φθορίζουσα Υβριδικότητα In – Situ.

2.6.3 Βιοτεχνολογία και Βιοδείκτες.

Επί του παρόντος, οι έλεγχοι βασισμένης βιοτεχνολογίας χρησιμοποιούνται για να προσδιορίσουν αλλαγές σε βιοδείκτες και να εκτιμήσουν την παρουσία μολυσματικών παραγόντων στο περιβάλλον. Πολλοί από αυτούς τους ελέγχους εξελίσσονται και σχεδιάζονται ώστε να ανιχνεύουν μολυσματικούς παράγοντες σε ποτάμια και σε πηγές πόσιμου νερού. Αυτοί οι έλεγχοι θα γίνουν πιο γρήγοροι και πιο ακριβείς από τους συμβατικούς ελέγχους στην ανίχνευση μεταβολικών αλλαγών εντός των μικροοργανισμών. Μικροβιακοί βιοδείκτες ερευνώνται ούτως ώστε να ανιχνεύσουν μόλυνση σε άλλα υποστρώματα όπως π.χ. το έδαφος (19).

2.6.4 Τρέχουσες Περιοχές Έρευνας στους Βιοδείκτες.

Η έρευνα όσον αφορά τους βιοδείκτες αυτή τη στιγμή έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη πιο γρήγορων και αξιόπιστων ελέγχων για την παρουσία μικροοργανισμών στο νερό και το χώμα. Οι έλεγχοι για το πόσιμο νερό αποτελεί μία ξεχωριστή κατηγορία ενδιαφέροντος για αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες. Αν και οι έλεγχοι βασισμένης βιοτεχνολογίας επί του παρόντος υπάρχουν για το πόσιμο νερό, υπάρχουν ακόμα πολλοί μολυσματικοί παράγοντες που δεν είναι ακόμη ανιχνεύσιμοι. Οι επιστήμονες απασχολούνται προσπαθώντας να αντικαταστήσουν τον καταναλισκόμενο χρόνο, τις παραδοσιακές μεθόδους με νεότερες, γρηγορότερες και πιο αξιόπιστες βασισμένες στην βιοτεχνολογία (20).

2.6.5 Αειφόρος Ανάπτυξη και Βιοδείκτες.

Οι βιοδείκτες συνιστούν μια μέθοδο ελέγχου και ανίχνευσης των αρνητικών επιρροών που μια βιομηχανική δραστηριότητα προκαλεί στο περιβάλλον. Αυτή η πληροφορία βοηθά στην ανάπτυξη στρατηγικών οι οποίες θα αποτρέψουν ή θα μειώσουν τέτοιες επιδράσεις και θα κάνουν την βιομηχανία πιο αειφόρο. Ο ρόλος των βιοδεικτών στην αειφόρο ανάπτυξη θα αφήσει τα μικρότερα δυνατά αποτυπώματα στο περιβάλλον (19, 20).

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

1. Ο ρόλος των μικροοργανισμών στις τροφικές αλυσίδες και στον κύκλο των θρεπτικών.

Οι μικροοργανισμοί είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι είναι ορατοί μόνο με μικροσκόπιο. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από περίπου 0,2 έως 200 μm (< 0,2 mm). Περιλαμβάνουν τους μύκητες, τα βακτήρια, τα πρωτόζωα, και τα άλγη. Οι μικροοργανισμοί είναι παρόντες σε πολλά διαφορετικά μέρη της γης όπως στο χώμα και στο νερό, ψηλά στον αέρα και ακόμα σε βάθη μεγαλύτερα των 1000m κάτω από την επιφάνεια. Εμφανίζονται ακόμη σε ρεύματα αέρα υψηλής θερμοκρασίας καθώς και στον αρκτικό πάγο, σε αερόβια αλλά και αναερόβια περιβάλλοντα. Οι μικροοργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στη ζωή σχεδόν σε όλους τους τύπους περιβαλλόντων. Μπορούν να εξασφαλίσουν την ενέργειά τους από το φως ή από την οξείδωση χημικών ενώσεων. Οι δότες ηλεκτρονίων μπορούν να είναι οργανικές ή ανόργανες ενώσεις και η πηγή άνθρακα μπορεί να είναι το CO_2 ή άλλες σύνθετες οργανικές ενώσεις. Στον *Πίνακα 3* φαίνεται οι διαφορετικοί τύποι μεταβολισμού των βακτηριδίων, οι οποίοι αποτελούν την πιο πολυπληθή κατηγορία μικροοργανισμών και ταυτόχρονα με τις περισσότερες διαφορετικές ομάδες.

Δότης Ηλεκτρονίων		Πηγή Άθρακα	
Ανόργανα	Οργανικά	CO_2	Οργανικά
Πηγή Ενέργειας: φως			
φωτολιθότροφα	Φωτοοργανότρο-φα	φωτολιθοαυτότροφα	Φωτοοργανοετερότ-ροφα
H_2O, H_2S, S, H_2	άλατα οξικού οξέως Succinate, acetate	Κυανοβακτήρια, πράσινα και μωβ θειούχα βακτήρια	Rhodospirillaceae βακτήρια

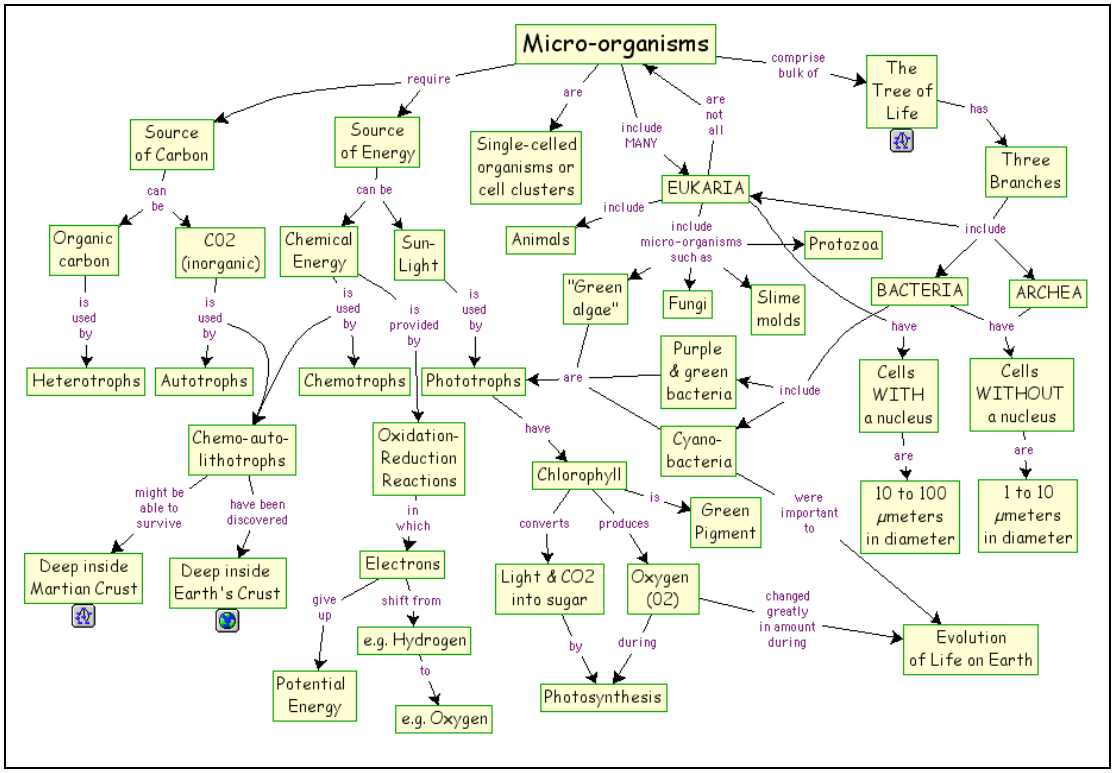
Πηγή Ενέργειας: χημικές ενώσεις			
Chemolithotrophy	Chemo-organotrophy	Chemolithoautotrophs	Chemo-organo heterotrophs
H_2, H_2S, NH_3, Fe^{2+}, NO_2	Πολλές οργανικές ενώσεις	Βακτήρια υδρογόνου, άχρωμα θειούχα βακτήρια, βακτήρια αζώτου, βακτήρια σιδήρου, μεθανογενή, μεθανότροφα	Περισσότερα βακτήρια

Πίνακας 3. Διαφορετικοί τύποι μεταβολισμού βακτηρίων.

Τα μικροσκοπικά φύκη / άλγη και τα κυανοβακτήρια (φυτοπλαγκτόν) είναι οι σημαντικότεροι πρωτογενείς παραγωγοί βιομάζας στα υδρόβια οικοσυστήματα. Στις λίμνες και τους ωκεανούς, κυρίως τα βακτηρίδια αποσυνθέτουν τα εκκρίματα του φυτοπλαγκτόν και τα υπολείμματα των κυττάρων. Η βακτηριακή δευτερογενής παραγωγή είναι κατά μέσον όρο, περίπου το 20% της πρωτογενούς παραγωγής του φυτοπλαγκτόν (22, 23). Αν και τα ετεροτροφικά βακτήρια έχουν βρεθεί να διατηρούν υψηλά ποσοστά ανάπτυξης, η διαφοροποίηση στους βακτηριακούς αριθμούς είναι σχετικά μικρή. Ο Azam και οι συνεργάτες του (24) αναγνώρισε ότι τα ενεργά αναπτυσσόμενα θαλάσσια βακτήρια (με μέγεθος 0,2 – 2 μm) διατηρούνται χαμηλότερα της πυκνότητας του ενός εκατομμύριου βακτηρίων ανά ml έναντι των πρωτόζωων. Στο νερό, τα κυριότερα "bacterivores" (καταναλωτές βακτηρίων) είναι ετερότροφα μαστιγωτά (με μέγεθος 2 –20μm), το πλήθος των οποίων αγγίζει τον αριθμό των χιλίων κυττάρων ανά ml. Τα μαστιγωτά με τη σειρά τους καταναλώνονται από μεγαλύτερα πρωτόζωα, όπως τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα της υποδιαίρεσης ciliophora, τα οποία έχουν το ίδιο μέγεθος με το φυτοπλαγκτόν (20–200μm). Για αυτό το λόγο η ενέργεια η οποία απελευθερώνεται με τη μορφή οργανικού περιεχομένου από το φυτοπλαγκτόν, επιστρέφει στην κύρια τροφική αλυσίδα μέσω ενός μικροβιακού βρόχου βακτηριδίων και πρωτόζωων.

Στα εδαφικά οικοσυστήματα τα ανώτερα φυτά είναι οι κύριοι πρωτογενείς παραγωγοί της βιομάζας. Ο άνθρακας και η ενέργεια απελευθερώνονται στο χώμα από τις εκκρίματα ριζών καθώς και από τα υπολείμματα των ίδιων των φυτών. Στο χώμα, τα

βακτήρια και οι μύκητες είναι οι κύριοι οργανισμοί οι οποίοι αποσυνθέτουν τη νεκρή οργανική ύλη όπως τα υπολείμματα φυτών, τα εκκρίματα ριζών, τους αποσυντιθέμενους μικροοργανισμούς και το ζωικό λίπασμα. Τα μικρόβια αποτελούν την πηγή τροφής των "microbivores", όπως τα πρωτόζωα και τα νηματοειδή, και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις τροφικές αλυσίδες και στην ανακύκλωση των θρεπτικών (25, 26). Μία τροφική αλυσίδα μπορεί να οριστεί σαν ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων καταναλωτή – πόρων, ανάμεσα σε διαφορετικές λειτουργικές ομάδες οργανισμών. Η διάσπαση σύνθετων βιοπολυμερών σε CO_2, H_2O, ανόργανο άζωτο (N), φώσφορο (P) και άλλα ανόργανα στοιχεία καλείται ανοργανοποίηση. Η ανοργανοποίηση πραγματοποιείται όχι μόνο από τα μικρόβια αλλά και από τα "microbivores" και τους θηρευτές, οι οποίοι αποσυνθέτουν τα μικρόβια και άλλους οργανισμούς. Οι ανόργανες θρεπτικές ουσίες οι οποίες απελευθερώνονται από τους αποσυντιθέμενους οργανισμούς είναι διαθέσιμες για απορρόφηση από τα φυτά και τα μικρόβια για την παραγωγή της καινούριας βιομάζας. Κατά συνέπεια, οι θρεπτικές ουσίες ανακυκλώνονται μέσω των οικοσυστημάτων.



Εικόνα 5. Διάγραμμα κατανόησης μικροοργανισμών.

2. Για ποιο λόγο χρησιμοποιούμε μικροβιακούς δείκτες;

Οι μικροοργανισμοί είναι χρήσιμοι δείκτες για τον περιβαλλοντικό έλεγχο και την οικολογική αξιολόγηση του κινδύνου επειδή είναι παρόντες στα υψηλά επίπεδα σε όλα τα είδη περιβάλλοντος και διαδραματίζουν τους βασικούς ρόλους στις τροφικές αλυσίδες και τους κύκλους στοιχείων όπως π.χ. του αζώτου, του άνθρακα, του θείου, και του φωσφόρου (27, 28). Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί είναι απαραίτητοι για τη ζωή των ανώτερων οργανισμών. Το μικρό μέγεθος τους και η μεγάλη επιφάνεια τους στην αναλογία του όγκου των μικροβίων προξενούν μια υψηλή διασύνδεση για τις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των ουσιών. Λόγω της πολύ στενής επαφής και της αλληλεπίδρασης με το περιβάλλον, τα μικρόβια είναι πολύ ευαίσθητα και αποκρίνονται γρήγορα στη μόλυνση και άλλους τύπους περιβαλλοντικών πιέσεων (29, 30). Η μικροβιακή δραστηριότητα εκφράζει το ποσό όλων των φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων οι οποίοι ρυθμίζουν την αποσύνθεση και το μετασχηματισμό των θρεπτικών ουσιών (31, 32). Οι μικροβιολογικοί δείκτες μπορούν επομένως να χρησιμεύσουν ως οι έγκαιρες προειδοποιήσεις στα προγράμματα ελέγχου (33). Ένα αξιοσημείωτο ποσό της συνολικής βιομάζας και ένα τεράστιο ποσό βιοποικιλότητας είναι παρόντα στα μικρόβια (34, 35). Οι γενετικές διαφορές μεταξύ φυτικών και ζωικών ειδών είναι συχνά πολύ μικρότερες από τις διαφορές εντός των μικροβιακών κοινοτήτων (36). Επειδή οι μικροοργανισμοί είναι πολυπληθείς και από τις μικρότερες βιολογικές οντότητες στα οικοσυστήματα, το πρόβλημα της γεωμετρικής κλίμακας δεν υφίστανται. Η στρατηγική δειγματοληψίας καθορίζει άμεσα την κλίμακα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η περιβαλλοντική ανάλυση κινδύνου σε περιπτώσεις ρύπανσης του νερού, των ιζημάτων και του εδάφους βασίζεται γενικά στη χημική ανάλυση επιλεγμένων ξενοβιοτικών ενώσεων. Οι συνολικές συγκεντρώσεις οι οποίες μετρούνται, χρησιμοποιούνται για να προβλέψουν το βαθμό ρύπανσης και των πιθανών κινδύνων. Εντούτοις, σε μια δεδομένη συνολική συγκέντρωση η βιολογική διαθεσιμότητα των μολυσματικών παραγόντων ποικίλλει έντονα ανάλογα με τις ιδιότητες του περιβάλλοντος, π.χ. στα εδάφη και τα ιζήματα η διαθεσιμότητα και η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων συσχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με το pH, το οργανικό περιεχόμενο καθώς και με την περιεκτικότητα σε άργιλο (37, 38). Παρά την μερική

κατανόηση των κύριων παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα μολυσματικών παραγόντων, είναι ακόμα δύσκολο να αξιολογηθούν τα αποτελέσματά τους επακριβώς. Σήμερα χρησιμοποιούνται πολλές μέθοδοι για τον υπολογισμό αποτελεσμάτων της παρουσίας μολυσματικών παραγόντων. Εντούτοις, ο οικοτοξικολογικός εργαστηριακός έλεγχος εστιάζει γενικά, στα τοξικά αποτελέσματα των καθαρών χημικών ουσιών σε μεμονωμένα είδη. Επιπλέον, οι έλεγχοι τοξικότητας έχουν γενικά (υπό) θανάσιμα σημεία τοξικότητας και βασίζονται σε σχετικά βραχυπρόθεσμες περιόδους δοκιμών. Τα αποτελέσματά τους επομένως δεν είναι απαραίτητα οικολογικά σχετιζόμενα. Στις εργαστηριακές βιολογικές αναλύσεις καθορίζεται η οξεία τοξικότητα (διαταραχή), ενώ στον έλεγχο ο οποίος λαμβάνει χώρα στο πεδίο καθορίζεται η μακροπρόθεσμη χρόνια τοξικότητα (πίεση) (30). Πολύ λιγότερα αποτελέσματα στο πεδίο μπορούν να αναμένονται σε περιπτώσεις όπου η ρύπανση είναι παρούσα για δεκαετίες ήδη. Υπάρχουν δύο λόγοι για αυτό το φαινόμενο: (i) οι περισσότεροι μολυσματικοί παράγοντες μπορεί να έχουν ήδη απορροφηθεί στο εδαφικό οργανικό περιεχόμενο και στα ανόργανα εδαφικά μόρια, και (ii) οι εδαφικοί οργανισμοί μπορεί να έχουν προσαρμοστεί στην παρουσία των βαρέων μετάλλων (39, 40).

Επιπλέον, ένα συχνά σύνθετο μίγμα μολυσματικών παραγόντων είναι παρόν στο πεδίο, και καθιστά δυσκολότερη την εκτίμηση των αποτελεσμάτων λόγω έλλειψης ικανοποιητικών μοντέλων για την τοξικότητα μίγματος (41). Ο τελευταίος παράγοντας ο οποίος περιπλέκει, είναι ότι η ρύπανση δεν είναι συχνά η μόνη περιβαλλοντική πίεση. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες πίεσης στα οικοσυστήματα μπορεί να είναι ο ευτροφισμός, η αποξήρανση, η οξύτητα ή οι ανθρώπινες διαχειριστικές πρακτικές. Ένας απλός τρόπος να ξεπεραστεί το πρόβλημα στο πεδίο, είναι η εφαρμογή της άμεσης αξιολόγησης της τοξικότητας των επωαζόμενων δειγμάτων πεδίου χρησιμοποιώντας βιολογικές αναλύσεις με τους οργανισμούς δοκιμής στο εργαστήριο (42).

Τα οικολογικά αποτελέσματα της περιβαλλοντικής πίεσης περιλαμβάνουν επίσης την απώλεια βιοποικιλότητας και την εξασθένιση των ζωτικών λειτουργιών υποστήριξης όπως η αποσύνθεση και η ανακύκλωση των θρεπτικών. Είναι δύσκολη η άμεση μέτρηση των διαδικασιών αποσύνθεσης και ανοργανοποίησης στο εργαστήριο (in situ). Απαιτούνται συχνά οι μακροχρόνιες επωάσεις και οι διαθέσιμες μέθοδοι υπόκεινται σε “trial and error” (artifacts). Επιπλέον μπορεί να πάρει χρόνια προτού τα αποτελέσματα της μόλυνσης και της διαταραχής σε αυτές τις διαδικασίες να

γίνουν προφανή. Επομένως, ευαίσθητοι βιολογικοί δείκτες απαιτούνται για να ανιχνεύσουν αλλαγές στα οικοσυστήματα.

Φυσικά υπάρχουν προβλήματα. Η αρχή των ειδών έχει αναπτυχθεί προς την ωριμότητα της φυτικής και ζωικής οικολογίας, αλλά δεν είναι εύκολα εφαρμόσιμη στη μικροβιακή οικολογία. Ο αριθμός των μικροβιακών ειδών (γονότυποι) στο περιβάλλον είναι τεράστιος. Για το έδαφος, οι εκτιμήσεις υποδεικνύουν 104–105 διαφορετικά είδη ανά γραμμάριο (34, 43). Κατά συνέπεια, είναι αδύνατον να περιληφθεί όλη η μικροβιακή ποικιλομορφία σε οποιαδήποτε αξιολόγηση. Αντ' αυτού, οι τρέχουσες τεχνικές ανάλυσης κοινοτήτων περιλαμβάνουν τους κυρίαρχους μικροβιακούς πληθυσμούς. Γενικά, η πολυπλοκότητα αυτού του είδους ανάλυσης αντιστοιχεί σε 10 έως 100 διαφορετικά είδη, η οποία είναι συγκρίσιμη με τις οικολογικές μελέτες πεδίου ζώων και φυτών. Χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους "εκκινητές" (primers) για τον πολλαπλασιασμό τμημάτων του DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), είναι δυνατόν να μεγεθύνει κανείς το "σήμα" συγκεκριμένων πληθυσμών που βρίσκονται στο περιβάλλον σε πολύ χαμηλές συχνότητες.

3. Μέθοδοι οι οποίες εφαρμόζονται στον μικροβιολογικό έλεγχο.

Διαφορετικές τεχνικές μπορούν να εφαρμοστούν για να καθορίσουν τις μικροβιολογικές παραμέτρους. Τρεις τύποι πληροφοριών μπορούν να ληφθούν: το ποσό βιομάζας, η ενεργότητα και η ποικιλομορφία των μικροβιακών κοινοτήτων. Και για τους τρεις τύπους πληροφοριών χρησιμοποιούνται διαφορετικές τεχνικές. Καινούριες μέθοδοι για την ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων είναι πλέον διαθέσιμες εξαιτίας των εξελίξεων της αναλυτικής χημείας, της μοριακής βιολογίας, του αυτοματοποιημένου εξοπλισμού, της εικονικής ανάλυσης, και της βελτιωμένης επεξεργασίας δεδομένων.

Σε γενικές γραμμές ο προσδιορισμός των μικροβιολογικών παραμέτρων μπορεί να πραγματοποιηθεί με βακτήρια από όλα τα είδη φυσικού περιβάλλοντος (νερό, έδαφος, ίζημα). Πολλές από τις μεθόδους όπως π.χ. για τον καθορισμό της μικροβιακής βιομάζας (μικροσκόπηση και ανάλυση εικόνας), του ποσοστού

ανάπτυξης (ενσωμάτωση ^{3}H-θυμιδίνης) και της ποικιλομορφίας (DGGE και Biolog) προέρχονται από την υδρόβια οικολογία (44).

Οι μικροοργανισμοί έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί αρκετά ως δείκτες της ποιότητας νερού. Τα ολικά και κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή χρησιμοποιούνται συνήθως για να αξιολογήσουν την πιθανή μόλυνση με τα παθογόνα βακτηρίδια εντερικής προέλευσης του πόσιμου νερού και του νερού των θαλασσών. Ο βαθμός ευτροφισμού και η οικολογική ποιότητα νερού αξιολογούνται εδώ και δεκαετίες με τον υπολογισμό του πλήθους διαφορετικών ειδών φυκών (αλγών) και κυανοβακτηρίων καθώς και με τη μέτρηση της ενεργότητάς τους στη φωτοσύνθεση (παραγωγή οξυγόνου) και την αναπνοή (βιολογική απαίτηση οξυγόνου).

Τα βακτήρια χρησιμοποιούνται συχνότερα ως δείκτες απ' ότι οι μύκητες και τα πρωτόζωα. Αν και οι δύο τελευταίες λειτουργικές ομάδες είναι αρκετά σημαντικές για τη λειτουργία των οικοσυστημάτων, είναι περισσότερο δύσκολο να μετρηθούν.

3.1 Προσδιορισμός του ποσού μικροβιακής βιομάζας.

Ο κλασσικός τρόπος καθορισμού του ποσού ζώντων μικροοργανισμών είναι με τον εμβολιασμό μικροοργανισμών σε στερεό θρεπτικό υλικό εντός τρυβλίου όπως περίγραψε πρώτα ο Petri (1887). Τα ενεργά αναπτυσσόμενα βακτήρια διαμορφώνουν αποικίες στα τρυβλία. Ο αριθμός των αποικιών οι οποίες δημιουργούν μονάδες (CFU, Colony Forming Units) εξαρτάται από τον τύπο του μέσου που χρησιμοποιείται στα τρυβλία. Περίπου το 1% του συνολικού αριθμού των παρόντων βακτηρίων σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα μπορεί να καθοριστεί κατ' αυτό τον τρόπο.

Χρησιμοποιώντας την άμεση μικροσκόπηση και την αυτόματη ανάλυση εικόνας, είναι δυνατό να ληφθούν οι πληροφορίες για το συνολικό αριθμό, τη βιομάζα και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της μικροβιακής κοινότητας (26, 45). Ο συνολικός αριθμός και ο συνολικός όγκος των φθοριζόντων βακτηριδίων και των μυκήτων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της βιομάζας. Εκτός από τα βακτηρίδια και τους μύκητες, τα πρωτόζωα και τα νηματοειδή μπορούν να συμβάλουν σημαντικά στη συνολική μικροβιακή βιομάζα (35). Η συγκεκριμένη περιεκτικότητα τους σε άνθρακά είναι παρόμοια με αυτήν των μυκήτων. Τα πρωτόζωα (μαστιγωτά, αμοιβάδες, βλεφαριδωτά) μετρούνται συνήθως με την πιθανότερη αριθμητική μέθοδο χρησιμοποιώντας σειρά διαλύσεων σε ένα μέσο με θρεπτικό υλικό βακτήρια (46). Οι αριθμοί υπολογίζονται από το διάλυμα όπου κανένα πρωτόζωο δεν υφίσταται. Τα

νηματοειδή εξάγονται από το χώμα και μετρούνται επίσης με χρήση μικροσκοπίου (47).

Ένας άλλος συνηθισμένος τρόπος μέτρησης της συνολικής βιομάζας στο χώμα είναι ο προσδιορισμός του ολικού οργανικού άνθρακα (και αζώτου) έπειτα από κλιβανισμό του χώματος με χλωροφόρμιο. Το χλωροφόρμιο διαλύει τις μεμβράνες των κυττάρων και απελευθερώνει έτσι τα συστατικά τους (48). Το ποσό του οργανικού άνθρακα (και αζώτου) σε ένα μη κλιβανισμένο δείγμα αφαιρείται από το ποσό του κλιβανισμένου δείγματος. Επειδή δεν μπορεί όλη η βιομάζα να εξαχθεί από το χώμα (περίπου το 50%) η βιομάζα η οποία υπολογίζεται πολλαπλασιάζεται με έναν διορθωτικό παράγοντα.

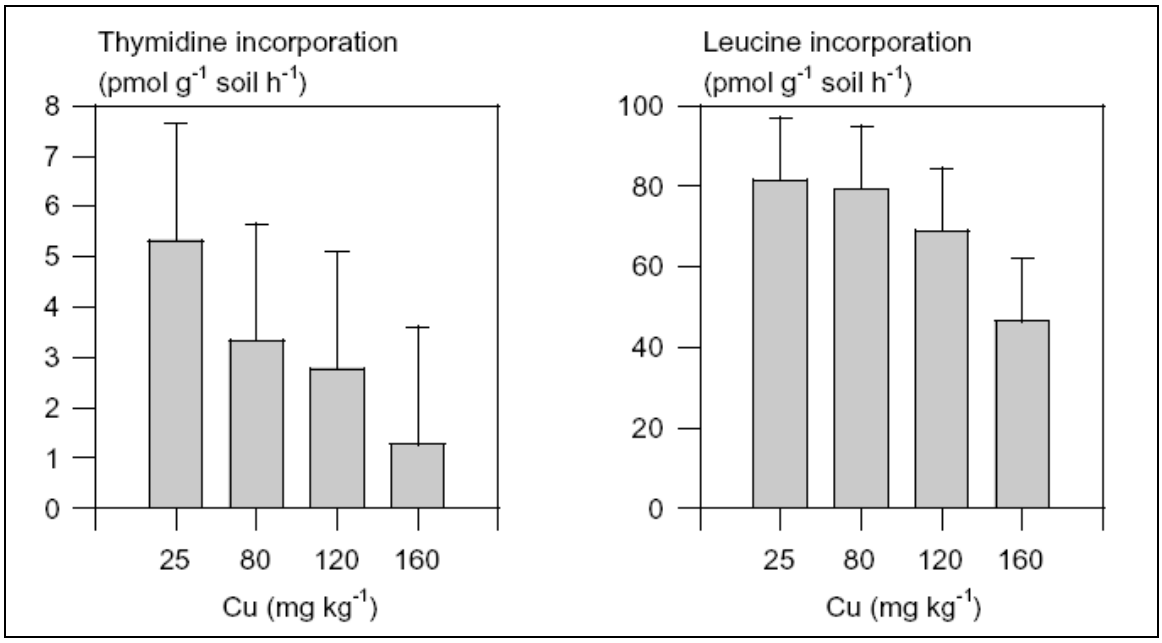
3.2 Καθορισμός μικροβιολογικής ενεργότητας.

Η μικροβιακή ενεργότητα μπορεί να καθοριστεί σχετικά εύκολα με τη μέτρηση της εδαφικής αναπνοής κάτω από τυποποιημένες προϋποθέσεις στο εργαστήριο. Αυτό απαιτεί σχετικά μακροχρόνιες επωάσεις (2 – 6 εβδομάδες) στα περισσότερα χώματα όπου η διαθεσιμότητα των εύκολα διασπώμενων υποστρωμάτων είναι περιορισμένη.

Μια άλλη τεχνική είναι η αποκαλούμενη "υπόστρωμα – προκαλούμενη αναπνοή" (SIR) (49), η οποία χρησιμοποιείται στη Γερμανία για λόγους ελέγχου. Σε αυτήν τη μέθοδο η αυξανόμενη αναπνοή (ανάπτυξη CO_2) τις πρώτες ώρες μετά από την προσθήκη ενός εύκολα διασπάσιμου υποστρώματος (γλυκόζη) στο χώμα, χρησιμοποιείται ως μέτρο της μικροβιακής βιομάζας.

Ο βακτηριακός ρυθμός ανάπτυξης μπορεί να οριστεί ως το ποσοστό ενσωμάτωσης ^{3}H-θυμιδίνης και ^{14}C-λευκίνης στο βακτηριακό DNA και στις πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια μιας σύντομης επώασης μιας ώρας (50). Χρησιμοποιώντας αυτήν την προσέγγιση (dual label approach), οι δύο παράμετροι μετρούνται σε μια ενιαία δοκιμή. Επειδή το περιεχόμενο στο βακτηριακό DNA είναι πιο σταθερό από το περιεχόμενο στην πρωτεΐνη, η ενσωμάτωση θυμιδίνης είναι περισσότερο ανάλογη του ποσοστοού ρυθμού ανάπτυξης σε σχέση με την ενσωμάτωση λευκίνης. Δεδομένου ότι τα κύτταρα συνθέτουν περισσότερες πρωτεΐνες απ' ότι DNA, η ενσωμάτωση λευκίνης είναι υψηλότερη απ' ότι η ενσωμάτωση θυμιδίνης (*Διάγραμμα 1 και 2*). Επομένως οι μετρήσεις της ενσωμάτωσης λευκίνης είναι περισσότερο ακριβείς, ειδικά στα χαμηλά ποσοστά ανάπτυξης. Μόνο τα βακτήρια ενσωματώνουν τη θυμιδίνη, αλλά δεν μπορούν όλα να ενσωματώσουν την ^{3}H-θυμιδίνη. Όλα τα βακτηρίδια ενσωματώνουν τη λευκίνη, αλλά η λευκίνη μπορεί να ενσωματωθεί

επίσης από άλλους οργανισμούς. Δεδομένου ότι και οι δύο μέθοδοι παρουσιάζουν περιορισμούς χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα.



Διάγραμμα 1 και 2. Μειωμένος ρυθμός βακτηριακής ανάπτυξης σε αυξανόμενα επίπεδα μόλυνσης χαλκού στο χώμα. Το ποσοστό ανάπτυξης μετρήθηκε ως ενσωμάτωση της θυμιδίνης και της λευκίνης στο DNA και τις πρωτεΐνες.

Το πιθανό ποσοστό ανοργανοποίησης του αζώτου και το πιθανό ποσοστό ανοργανοποίησης του άνθρακα στο χώμα μπορούν να καθοριστούν ταυτόχρονα από την επώαση για έξι εβδομάδες στους 20°C και σε 50% υδατοχωρητικότητα (WHC, Water Holding Capacity) (35). Ο ρυθμός ανοργανοποίησης του αζώτου υπολογίζεται από την αύξηση της συγκέντρωσης του ανόργανου αζώτου μεταξύ της πρώτης και της έκτης εβδομάδας. Τα αποτελέσματα της πρώτης εβδομάδας δεν χρησιμοποιούνται για να αποφύγουν τα αποτελέσματα διαταραχής του χειρισμού δειγμάτων. Το πιθανό ποσοστό ανοργανοποίησης του άνθρακα στο χώμα υπολογίζεται από την εξέλιξη του CO_2 (αναπνοή) μεταξύ της πρώτης και της έκτης εβδομάδας. Σε μερικά χώματα θαλάσσιας προέλευσης, τα οποία περιέχουν υψηλά ποσά του $CaCO_3$, η εξέλιξη του CO_2 δεν είναι αξιόπιστη. Σε τέτοιο εδάφη η κατανάλωση O_2 χρησιμοποιείται υποθέτοντας ότι 1 mol του O_2 το οποίο καταναλώνεται αντιστοιχεί σε 1 mol του CO_2 που εξελίσσεται. Η ποσότητα του O_2 που χρησιμοποιήθηκε για τη νιτροποίηση αφαιρείται (25).

3.3 Χημικές τεχνικές για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλομορφίας.

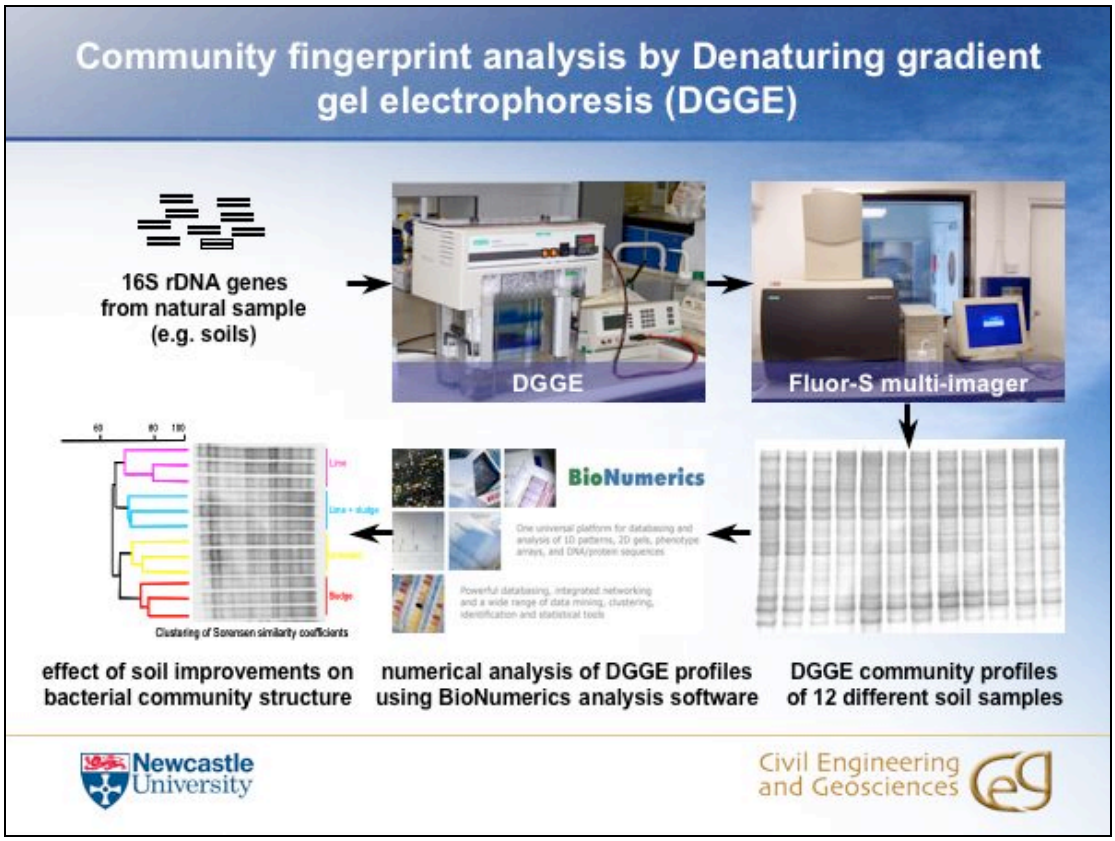
Η μέθοδος βιοδείκτη με υπογραφή λιπιδίων (SLB, Signature Lipid Biomarker) είναι μια μοριακή προσέγγιση που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτης μικροβιακών κοινοτήτων. Τα λιπίδια στους μικροοργανισμούς βρίσκονται καταρχήν στα τοιχώματα των κυττάρων αλλά και σαν υλικά αποθήκευσης. Έχει υποστηριχτεί ότι οι SLBs στην περιπλοκότερη και εκτενέστερη ανάλυσή τους μπορούν να παρέχουν ταξινομικές και ταυτόχρονα φυσιολογικές πληροφορίες για τις μικροβιακές κοινότητες (51). Τα λιπίδια από τους μικροοργανισμούς μπορούν να εξαχθούν, να διαχωριστούν σε διάφορες κατηγορίες και να αναλυθούν με την αέρια χρωματογραφία. Είναι σπάνιο, εντούτοις, να βρεθούν μελέτες στις οποίες όλες οι κατηγορίες των λιπιδίων να έχουν ποσοτικοποιηθεί, διότι αυτή θα ήταν μία πολύ χρονοβόρα διαδικασία. Μια από αυτές τις κατηγορίες, τα φωσφολιπίδια, είναι ουσιαστικά τμήματα των μεμβρανών των μικροοργανισμών αλλά δεν βρίσκονται στα υλικά αποθήκευσης ή στα νεκρά κύτταρα. Οι περισσότερες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει μια απλουστευμένη ανάλυση λιπαρών οξέων φωσφολιπιδίων (PLFA) για να ερευνήσουν τη μικροβιακή δομή κοινοτήτων (52). Αν και μεμονωμένα PLFAs δεν είναι συχνά συγκεκριμένα για έναν οργανισμό, ή ακόμα για ομάδες οργανισμών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοχημικοί δείκτες επειδή υπερισχύουν σε ορισμένες ταξινομικές ομάδες και είναι σχετικά συντηρητικά στις συγκεντρώσεις τους εντός των οργανισμών. Η μέτρηση των συγκεντρώσεων διαφορετικών PLFAs τα οποία εξάγονται από το έδαφος μπορεί, επομένως, να παρέχει ένα βιοχημικό δακτυλικό αποτύπωμα της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας (53). Τα προφίλ των PLFA απεικονίζουν την δομή κοινοτήτων και παρουσιάζουν ποιες ομάδες είναι κυρίαρχες. Τα PLFA όμως, δεν δίνουν καμία ποσοτική πληροφορία για τον αριθμό ειδών αυτών.

Η μέτρηση της βιομάζας είτε από τη συνολική ποσότητα παρόντων PLFAs, είτε ως ποσότητα ενός υποσυνόλου συγκεκριμένου PLFAs, έχει αποδειχθεί πως συσχετίζεται καλά και με άλλες τεχνικές (54). Τα προφίλ των PLFA επηρεάζονται από τον τύπο του εδάφους, τη βλάστηση, το κλίμα και τη διαχείριση (Bossio and Scow, 1998; Yao et al., 2000). Γενικά, η ανάλυση των PLFA συγκρίνει καλά από την άποψη ευαισθησίας, ανιχνεύοντας συχνά την αλλαγή λόγω της μολυσματικής πίεσης όταν άλλες συμβατικές μέθοδοι δεν μπορούν (55, 56).

Η ανάλυση των PLFA είναι ενδεχομένως μια καλή μέθοδος για τον περιβαλλοντικό έλεγχο εξαιτίας της σχετικής απλότητάς της, της ταχύτητας της και της δυνατότητάς της για ημι-αυτοματοποίηση και τυποποίηση. Η υπεροχή της μεθόδου ωστόσο απαιτεί (i) καθιέρωση της ερμηνείας των αποτελεσμάτων μέσα σε ένα οικοτοξικολογικό πλαίσιο λαμβάνοντας υπόψη τα κανονικά χωρικά και χρονικά στοιχεία διαφοροποίησης και υποβάθρου, (ii) το συσχετισμό των παρατηρούμενων αλλαγών από την πιθανή βλάβη στο περιβάλλον και (iii) την περαιτέρω σύγκριση της μεθόδου με τις παραδοσιακές μεθόδους ελέγχου.

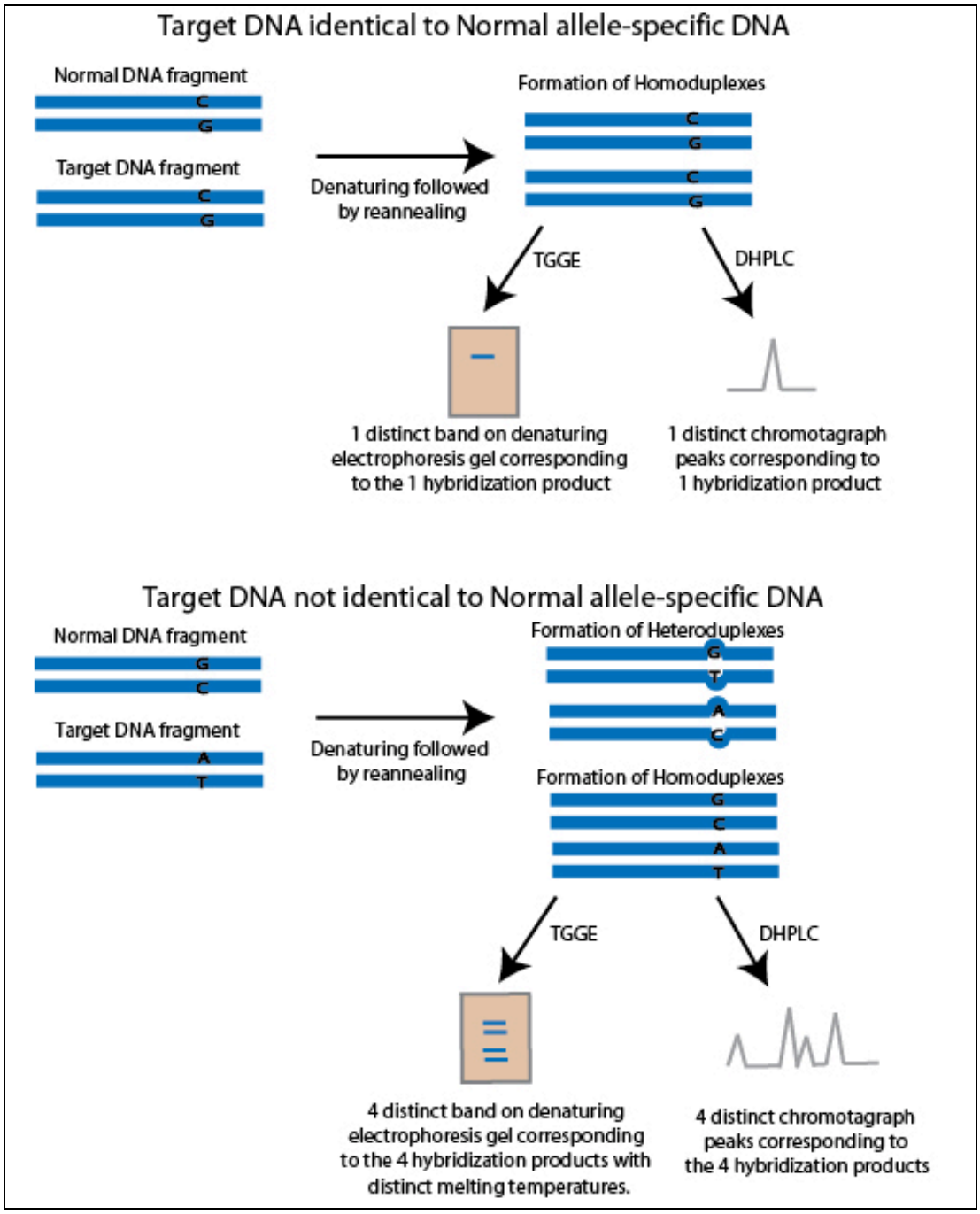
3.4 Γενετικές τεχνικές για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλομορφίας.

Για να καθοριστεί η γενετική ποικιλομορφία διαφορετικές μοριακές τεχνικές είναι διαθέσιμες. Το DNA εξάγεται από τα περιβαλλοντικά δείγματα (χώμα, νερό, ίζημα) (57) και πολλαπλασιάζεται με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιώντας ένα "probe" (ιχνηθέτης) για το βακτηριακό 16S – ριβοσωμικό DNA. Όταν το βακτηριακό DNA αναλύεται χρησιμοποιώντας την ηλεκτροφόρηση DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (58), τα τμήματα DNA ίσου μήκους προσκολλώνται σε ένα gel το οποίο περιέχει ένα βαθμονομητή μετουσιώσης μέσου. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης τα τμήματα του DNA υποβάλλονται σε αυξανόμενη συγκέντρωση μετουσίωσης. Ανάλογα με τη δύναμη (σύνθεση) του DNA, τα τμήματα αρχίζουν να λειώνουν και να διαμορφώνουν μια ζώνη σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση μετουσίωσης. Αυτή η τεχνική παράγει ένα δεσμικό σύστημα όπου ο αριθμός ζωνών DNA εκφράζει τον αριθμό των "ειδών" (γονότυποι) βακτηρίων, και η ένταση του δεσμικού συστήματος εκφράζει τη σχετική αφθονία των ειδών. Τα δεσμικά συστήματα αναλύονται και ποσοτικοποιούνται από την ανάλυση εικόνας.



Εικόνα 6. Ανάλυση βακτηριακού DNA με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης.

Επίσης άλλες, σχετικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της γενετικής ποικιλομορφίας της μικροβιακής βιομάζας, όπως η ηλεκτροφόρηση TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), κατά την οποία υπάρχει μια διαφορά θερμοκρασίας στο gel του πολυακρυλαμιδίου ώστε να επιτευχθεί η αλλοίωση των μορίων DNA. Μια ελαφρώς διαφορετική τεχνική ονομάζεται ανάλυση περιορισμού ενισχυμένου ριβοσωμικού DNA (ARDRA, Amplified Ribosomal DNA Restriction Technique). Αυτή η τεχνική δακτυλικού αποτυπώματος DNA βασίζεται σε PCR ενίσχυση του 16S ριβοσωμικού DNA χρησιμοποιώντας primers (εκκινητές) για τις συντηρούμενες περιοχές, οι οποίες ακολουθούνται από πέψη με ένζυμα περιορισμού και την ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης (36). Τα δακτυλικά αποτυπώματα της ARDRA αποκαλύπτουν ποιοτικές διαφορές μεταξύ κοινοτήτων, αλλά δεν απεικονίζουν τον αριθμό ειδών.



Εικόνα 7. Οι μέθοδοι DGGE και TGGE για ανίχνευση SNPs (single-nucleotide polymorphisms).

3.5 Φυσιολογικές τεχνικές για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλομορφίας.

Φυσιολογικές προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί βασισιζόμενες στο καταβολισμό (διάσπαση / οξείδωση) των συγκεκριμένων ενώσεων άνθρακα (61) ή τη δυνατότητα της κοινότητας να μεταβολίσει συγκεκριμένα υποστρώματα άνθρακα στα Biolog

τρυβλία (59, 60). Ο έλεγχος της ικανότητας των μικροβιακών κοινοτήτων να χρησιμοποιήσουν μια σειρά (31 ή 95) υποστρωμάτων πηγής μονού άνθρακας (sole-carbon-source substrate) σε multiwell Biolog™ τρυβλία χαρακτηρίζει τη λειτουργική ποικιλομορφία. Ο Garland και ο Mills (60) πρότειναν την εφαρμογή των Biolog τρυβλίων για το χαρακτηρισμό των μικροβιακών κοινοτήτων. Λόγω της εξαρτώμενης απόκρισης της πυκνότητας του υλικού εμβολιασμού, ο Garland πρότεινε την τυποποίηση του υλικού εμβολίου, δηλ. ο αριθμός των αποικιών ο οποίος δημιουργεί τις μονάδες, για να επιτρέψουν τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των οποίων επιτεύχθηκαν, με τις κοινότητες που προήλθαν από τα διαφορετικά σημεία.

3.6 Σημεία αναφοράς.

Τα μικροβιακά χαρακτηριστικά επηρεάζονται όχι μόνο από την ανθρωπογενή πίεση αλλά και από τα εδαφικά χαρακτηριστικά όπως το pH, ο άργιλος, το οργανικό περιεχόμενο, και η ποιότητα των διαθέσιμων οργανικών υποστρωμάτων. Επομένως, για να καθιερωθούν τα αποτελέσματα της πίεσης απαιτείται έλεγχος με τα ίδια εδαφικά χαρακτηριστικά αλλά χωρίς κάποιο είδος μόλυνσης. Σε περιπτώσεις όπου κανένας έγκυρος έλεγχος δεν μπορεί να βρεθεί, μπορεί να είναι χρήσιμο να χρησιμοποιηθούν πηλίκα όπως το συγκεκριμένο μεταβολικό πηλίκο αναπνοής (= ποσό του CO_2 το οποίο δημιουργείται ανά μονάδα της βιομάζας) (49, 62), ή η βιομάζα C στην οργανική αναλογία C. Τέτοιες αναλογίες αποτελούν ένα είδος εσωτερικών προτύπων, αλλά δεν λύνουν όλα τα προβλήματα αναφοράς (63). Επομένως, οι τιμές αναφοράς πρέπει να συναχθούν από πολλές παρατηρήσεις με ικανοποιητική επαναληψιμότητα ανά εδαφικό τύπο.

3.7 Προσδιορισμός των αιτιωδών σχέσεων μεταξύ ρύπανσης και παρατηρήσεων πεδίου.

Οι προαναφερθείσες τεχνικές δίνουν την ευκαιρία να μετρηθεί μια ποιοτική πτυχή του οικοσυστήματος. Ένα επιπλέον πρόβλημα είναι ο καθορισμός της αιτίας της ποιότητας. Δεν υπάρχει απαραίτητα μια αιτιώδης σχέση μεταξύ των μετρημένων τιμών των μικροβιακών δεικτών και της περιβαλλοντικής πίεσης. Μια τέτοια σχέση μπορεί να καθοριστεί μόνο μέσω των στατιστικών τεχνικών, δεδομένου ότι ικανοποιητικά στοιχεία είναι διαθέσιμα. Αυτό είναι το κύριο πρόβλημα στην εξαγωγή συμπερασμάτων του πεδίου σχετικά με τα στοιχεία τοξικότητας τα οποία προκύπτουν στο εργαστήριο.

Ένα από τα πιθανά αποτελέσματα της ρύπανσης είναι ότι τα χαρακτηριστικά των κοινοτήτων σε ένα οικοσύστημα μετατοπίζονται προς την αυξανόμενη ανοχή ως αποτέλεσμα της έκθεσης στους μολυσματικούς παράγοντες. Οι κοινότητες μπορούν να αναπτύξουν την αυξανόμενη γενική ανοχή με τη φυσιολογική ή γενετική προσαρμογή διάφορων μηχανισμών των τοπικών πληθυσμών, με την απώλεια του πιο ευαίσθητου μέρους των πληθυσμών, και της επανάκτησης της περιοχής από τα ανεκτικά είδη.

Ο Blanck και οι συνεργάτες του (64) αναγνώρισε ότι αυτό το φαινόμενο, δηλ. η ανοχή των κοινοτήτων στην προκληθείσα ρύπανση (PICT, Pollution Induced Community Tolerance) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει τα αποτελέσματα τομέων των ρυπαντών. Τα ακόλουθα ζητήματα αναγνωρίζονται:

Καταρχήν, σχετικά με την ερώτηση στο ρόλο των ύποπτων ενώσεων στην πρόκληση των οικολογικών αποτελεσμάτων, η έννοια PICT καλύπτει το ζήτημα της αιτιότητας καλύτερα από τις κλασσικές παραμέτρους απόκρισης οικολογικών κοινοτήτων όπως οι δείκτες πυκνότητας ειδών ή ποικιλομορφίας ειδών, δεδομένου ότι η ύποπτη ένωση (ή ενώσεις) η οποία προκαλεί την παρατηρηθείσα επίδραση μπορεί να συναχθεί με το σχετικά σαφές συμπέρασμα από τα τεχνητά πειράματα έκθεσης.

Δεύτερον, η PICT εξετάζει άμεσα ένα επίπεδο βιολογικής ολοκλήρωσης (την κοινότητα), το επίπεδο ανησυχίας για πολλές οικολογικές μεθόδους αξιολόγησης του κινδύνου. Άλλες μέθοδοι για την αξιολόγηση του κινδύνου, όπως οι έλεγχοι τοξικότητας ή οι βιολογικές αναλύσεις, εστιάζουν στα επίπεδα των αποτελέσματα ατόμων ή πληθυσμών, και εξάγουν συμπεράσματα για αυτά τα στοιχεία στο πιο υψηλό επίπεδο από της οικολογικής ολοκλήρωσης. Ένα τέτοιο βήμα εξαγωγής συμπεράσματος μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα σχετικά με την ισχύ.

Χρησιμοποιώντας την PICT προσέγγιση μια αιτιώδη σχέση μεταξύ της παρουσίας μιας μολυσματικής και οικολογικής επίδρασης μπορεί να καθοριστεί. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί στις μετρήσεις απόκρισης εργαστηριακών δόσεων, με τους οργανισμούς οι οποίοι επιλέγονται στο πεδίο και τον ύποπτο μολυσματικό παράγοντα. Για αυτήν την προσέγγιση οι διαφορετικοί τύποι μέτρησης δραστηριότητας μπορούν να εκτελεστούν όπως η ανοργανοποίηση του οξικού άλατος (65), η εφαρμογή των Biolog τρυβλίων (66, 67) ή η ενσωμάτωσης 3H-θυμιδίνης (68). Μια μειωμένη ευαισθησία μιας μικροβιακής κοινότητας που προέρχεται από μια μολυσμένη περιοχή δείχνει την προσαρμογή στον ρυπαντή και συνεπώς, ότι ο

ρυπαντής είναι παρών σε μια βιοδιαθέσιμη μορφή και ασκεί μια επίδραση στη μικροβιακή κοινότητα του πεδίου.

4. Επιδράσεις των βαρέων μετάλλων στις μικροβιακές κοινότητες.

Χρησιμοποιώντας τις διαφορετικές τεχνικές μπορεί να αποδειχθεί ότι τα βαρέα μέταλλα έχουν επιπτώσεις στις μικροβιακές κοινότητες. Η αναπνοή εμφανίζεται να είναι ευαίσθητη στη μόλυνση μετάλλων στα δασικά χώματα (69), αλλά για τα γεωργικά εδάφη τα αποτελέσματα συγκρούονται (30). Η αναπνοή από μόνη της δεν είναι ευαίσθητος δείκτης μόλυνσης επειδή εμφανίζεται να είναι απρόσβλητη στις συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στα τρέχοντα υποχρεωτικά όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης (29). Εντούτοις, η συγκεκριμένη αναπνοή ή το μεταβολικό πηλίκο έχει αποδειχθεί πως είναι ένας πιο ευαίσθητος δείκτης της πίεσης (70, 62). Γενικά η ενσωμάτωση της ^{3}Η-θυμιδίνης έχει βρεθεί να είναι πιο ευαίσθητη στη μόλυνση από τη βιομάζα και το ποσοστό αναπνοής στο νερό και το χώμα (71).

Τα αποτελέσματα όσον αφορά την ευαισθησία των μυκήτων στα βαρέα μέταλλα είναι συγκρουόμενα. Ο Nordgren και οι ομάδα του (72) και ο Baath (71) παρουσίασαν μία χαμηλή ευαισθησία ενώ ο Pennanen και η ομάδα του (73) βρήκε το μυκητώδες μέρος της μικροβιακής βιομάζας για να είναι πιο ευαίσθητο στα βαρέα μέταλλα.

4.1 Μόλυνση με χαλκό (Cu).

Για τον καθορισμό των αποτελεσμάτων του χαλκού, αυξανόμενα ποσά ένυδρου θειϊκού χαλκού προστέθηκαν αρχικά σε καθαρό αμμώδες χώμα (pH 5.0) και έπειτα στους μικροοργανισμούς. Δύο ημέρες μετά από την τροποποίηση του χαλκού το βακτηριακό ποσοστό ανάπτυξης (ενσωμάτωση ^{3}H-θυμιδίνης) μειώθηκε σημαντικά ήδη σε μια πολύ χαμηλή συγκέντρωση χαλκού (10 mg Cu / kg). Η βακτηριακή βιομάζα και το ποσοστό αναπνοής μειώθηκαν σε αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις χαλκού της τάξεως των100–1000 mg Cu / kg. Κατά συνέπεια, το μικροβιακό ποσοστό ανάπτυξης / αναπαραγωγής εμφανίστηκε να είναι πιο ευαίσθητος δείκτης της μόλυνσης μετάλλου (Cu) απ' ότι η βιομάζα ή η αναπνοή.

4.2 Μόλυνση αμμωδών εδαφών (i) με χαλκό (Cu), (ii) με νικέλιο (Ni) και χρώμιο (Cr), και (iii) με ψευδάργυρο (Zn).

συγκεντρώσεις μετάλλων:

Cu max 160 mg Cu / kg

Ni και Cr 2800 και 430 mg / kg αντίστοιχα

Zn 10,000 mg / kg

Η περιοχή η οποία μολύνθηκε με χαλκό αποτελούνταν από καλλιεργήσιμα εδάφη τα οποία εκτέθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα χαλκού (70–160 mg / kg) και του pH (4–6), σε μια παραγοντική μελέτη, για περισσότερο από 10 χρόνια (74). Το χώμα περιείχε 4% οργανικό περιεχόμενο και 3% αργίλου.

Η περιοχή η οποία μολύνθηκε με νικέλιο και χρώμιο ήταν λιβάδι με ένα παρακείμενο εργαστήριο γαλβανισμού. Τα δείγματα λήφθηκαν στο πιο μολυσμένο σημείο γύρω από μια προγενέστερη λεκάνη απορροής, και σε αποστάσεις των 10 και των 50m. Τα χαρακτηριστικά του εδάφους ήταν pH 6.0, 4% οργανικό περιεχόμενο και 5% αργίλου.

Το έδαφος το οποίο μολύνθηκε με ψευδάργυρο ανήκε σε μια φυσική περιοχή γύρω από ένα προγενέστερο χυτήριο τσίγκου, το οποίο είχε προκαλέσει μια εξαιρετικά υψηλή μόλυνση με Zn, αλλά ταυτόχρονα και με κάδμιο (Cd), με χαλκό (Cu), αλλά και με μόλυβδο (Pb). Αυτό είχε συντελέσει στην πλήρη εξαφάνιση της βλάστησης σε έκταση 135 εκταρίων. Σε ένα πείραμα που καθιερώθηκε το 1990, τρία εκτάρια του βαριά μολυσμένου απογυμνωμένου εδάφους αποκαταστάθηκαν χρησιμοποιώντας

κυκλωνικές τέφρες οι οποίες αδρανοποιούν τα μέταλλα, αποκαλούμενες επίσης "beringite" (75). Αυτό συνδυάστηκε με την προσθήκη των δημοτικών αποβλήτων και τη διασπορά χλόης ανεκτικής στον ψευδάργυρο. Συνεπώς, το pH των υδατικών πόρων αυξήθηκε από 5.5 σε 7.5. Αυτό οδήγησε σε μια δραστική μείωση της διαλυτότητας όλων των μετάλλων. Επιπλέον, τα δημοτικά απόβλητα παρείχαν στο φτωχό χώμα τις θρεπτικές ουσίες για την ανάπτυξη των φυτών και αύξησαν την υδατοχωρητικότητα του χώματος.

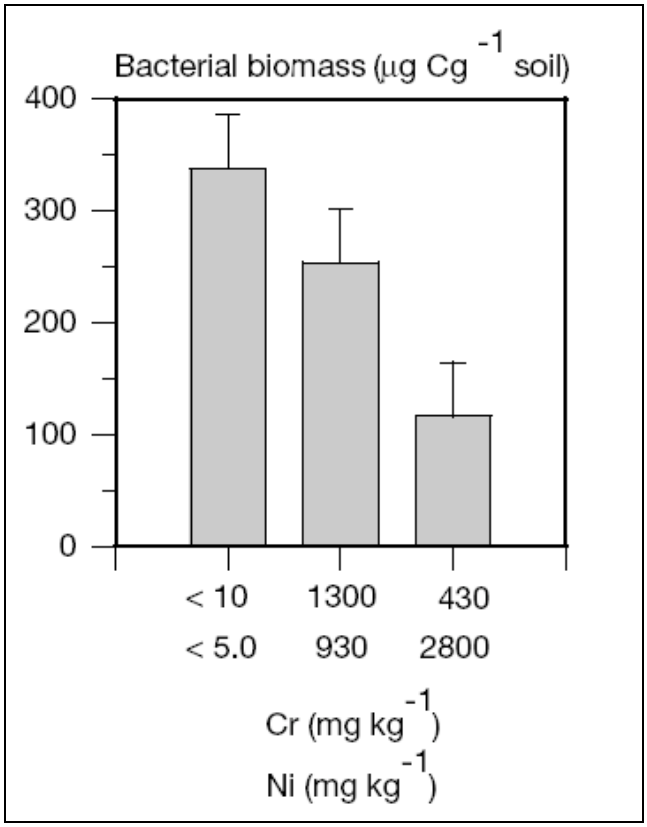
Το ελαφρά μολυσμένο με Cu χώμα, και τα ποσοστά της ενσωμάτωσης ^{3}H-θυμιδίνης (-76%) καθώς και της ενσωμάτωσης ^{14}C-λευκίνης (-43%) έδειξαν ένα σημαντικά μειωμένο βακτηριακό ρυθμό αναπαραγωγής, σε σύγκριση με το καθαρό δείγμα όπου η συγκέντρωση Cu ήταν σε κανονικό επίπεδο υποβάθρου εδάφους 25 mg Cu / kg (*Διάγραμμα 1 και 2*). Η ενσωμάτωση της ^{3}H-θυμιδίνης μειώθηκε στις συγκεντρώσεις πεδίου κάτω από το τρέχον όριο της Ευρωπαϊκής Ένωσης 140 mg Cu / kg χώματος. Οι περισσότερες άλλες παράμετροι, όπως η βακτηριακή και μυκητώδης βιομάζα, τα πρωτόζωα και τα νηματοειδή, το ποσοστό εδαφικής αναπνοής και ποσοστό ανοργανοποίησης του αζώτου (N) έτειναν επίσης να είναι χαμηλότερες στις υψηλότερες συγκεντρώσεις χαλκού αλλά αυτές οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (*Πίνακας 4*). Οι περισσότερες από τις παραμέτρους που δεν επηρεάστηκαν από το χαλκό επηρεάστηκαν σημαντικά από το pH. Κατά συνέπεια, όπως στο πείραμα του μικρόκοσμου, ένα μειωμένο βακτηριακό ποσοστό αναπαραγωγής εμφανίστηκε να είναι ο πιο ευαίσθητος δείκτης της μόλυνσης από χαλκού.

Parameter	Change in metal contaminated soil (% of control)		
	Cu 160 mg/kg	Ni/Cr 2800/430 mg/kg	Zn 10,000 mg/kg
Bacteria			
Growth rate	−76*	−82*	−89*
Biomass	−4	−66*	−95*
No of DNA bands	−16	−2	−38*
DNA profile	23*	18 *	33*
Fungal hyphae	−34	ND	−81*
Protozoa	−9	ND	−98*
Nematodes	−19	−92*	−99*
Respiration	−33	ND	−99*
N-mineralisation	−10	ND	ND

* Significant difference ($P < 0.05$)

Πίνακας 4. Οικολογικές παράμετροι μολυσμένων εδαφών από μέταλλα. Η μείωση ή η αλλαγή εκφράζεται ως ποσοστό της τιμής στον έλεγχο μη μολυσμένου δείγματος.

Στο χώμα το οποίο μολύνθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό με το νικέλιο (Ni) και το χρώμιο (Cr), όχι μόνο το βακτηριακό ποσοστό αναπαραγωγής αλλά και η βακτηριακή βιομάζα μειώθηκαν με την αύξηση της συγκέντρωσης χρωμίου (Cr) και νικελίου (Ni) (*Διάγραμμα 3, Πίνακας 4*).



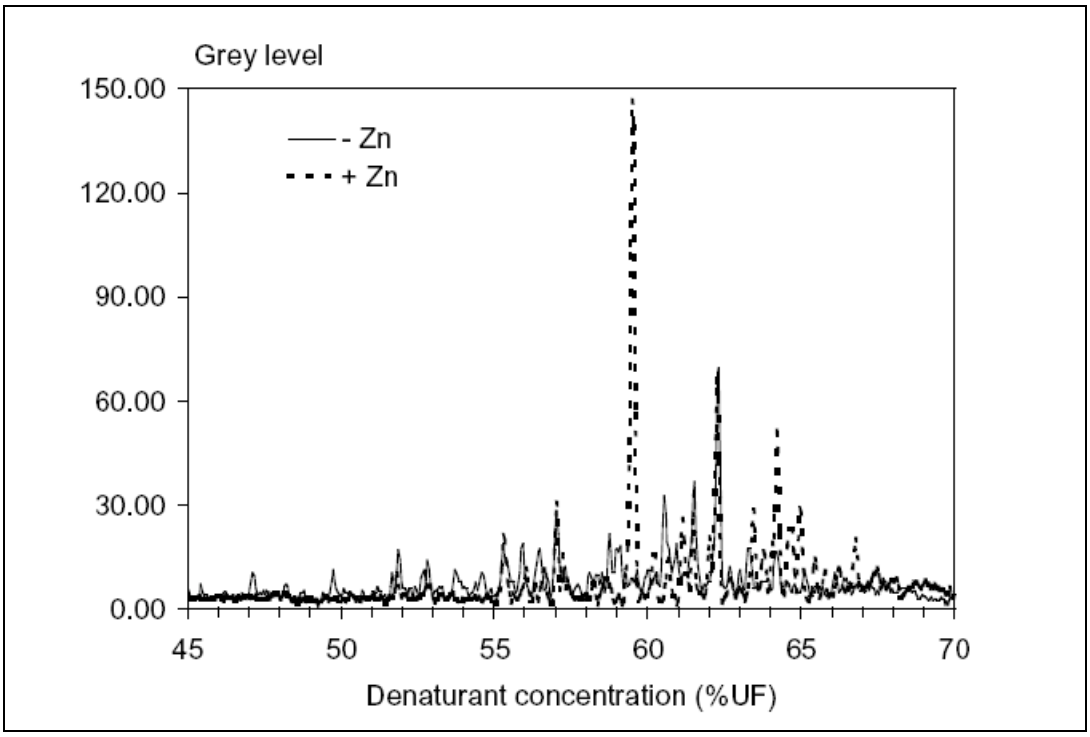
Διάγραμμα 3. Μειωμένη βακτηριακή βιομάζα στο χώμα το οποίο μολύνεται με νικέλιο και χρώμιο. Η βακτηριακή βιομάζα μετρήθηκε αυτόματα με την μικροσκόπηση ομοεστιακού λέιζερ-ανιχνευτή και την ανάλυση εικόνας.

Όπως στο μολυσμένο από χαλκό χώμα, η ενσωμάτωση της ^{3}H-θυμιδίνης (-82%) μειώθηκε περισσότερο από την ενσωμάτωση ^{14}C-λευκίνης (-66%). Η εμπειρία έχει δείξει πως τα βαρέα μέταλλα εμποδίζουν τη σύνθεση DNA (ενσωμάτωση ^{3}H-θυμιδίνης) περισσότερο από την πρωτεϊνική σύνθεση (ενσωμάτωση ^{14}C-λευκίνης). Η μείωση στο βακτηριακό ρυθμό ανάπτυξης και τη βιομάζα εκφράστηκε στις μειωμένες πυκνότητες των νηματοειδών (-90%).

Στην εξαιρετικά μολυσμένη από Zn περιοχή όλες οι παράμετροι όπως οι μικροοργανισμοί, τα "microbivores" και το ποσοστό ανοργανοποίησης του C ήταν εξαιρετικά χαμηλό, τουλάχιστον 85% χαμηλότερα απ' ότι στα αγροτεμάχια, τα οποία είχαν υποστεί αποκατάσταση με χρήση κυκλωνικής τέφρας η οποία αδρανοποιεί τα μέταλλα ("beringite") καθώς και με διασπορά χλόης ανεκτικής στον ψευδάργυρο (*Πίνακας 2*). Στα αποκατεστημένα αγροτεμάχια τα μικρόβια και τα "microbivores" είχαν επανέλθει σε επίπεδα παρόμοια με εκείνα στα αμόλυντα εδάφη. Οι εδαφικές μικροβιακές παράμετροι μετρήθηκαν έξι χρόνια μετά από την αποκατάσταση.

Η ενσωμάτωση της ^{3}H-θυμιδίνης εμφανίζεται να είναι πιο ευαίσθητη στη μόλυνση απ' ότι τα ποσοστά της βιομάζας και της αναπνοής. Μια εύλογη εξήγηση για ένα μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης στα μολυσμένα περιβάλλοντα είναι ότι οι μικροοργανισμοί κάτω από την πίεση εκτρέπουν την ενέργεια για αναπαραγωγή σε ενέργεια συντήρησης λειτουργιών των κυττάρων (76, 30). Οι φυσιολογικές διαδικασίες οι οποίες απαιτούνται για την αποτοξίνωση φέρουν ένα πρόσθετο ενεργειακό φορτίο στους μικροοργανισμούς. Κατά συνέπεια, λιγότερη ενέργεια είναι διαθέσιμη για τη σύνθεση νέας βιομάζας (αναπαραγωγή), και ένα μεγαλύτερο μέρος του διαθέσιμου υποστρώματος καταναλώνεται κατά την αναπνοή και μετατρέπεται στο CO_2. Τελικά αυτό οδηγεί στη μειωμένη βιομάζα και την αυξανόμενη συγκεκριμένη αναπνοή.

Και στις τρεις διαφορετικές περιοχές μόλυνσης τα προφίλ του DNA υπέδειξαν διαφορές στη μικροβιακή κοινοτική δομή μεταξύ του μολυσμένου χώματος και του μη μολυσμένου χώματος (*Πίνακας 4, Διάγραμμα 4*).



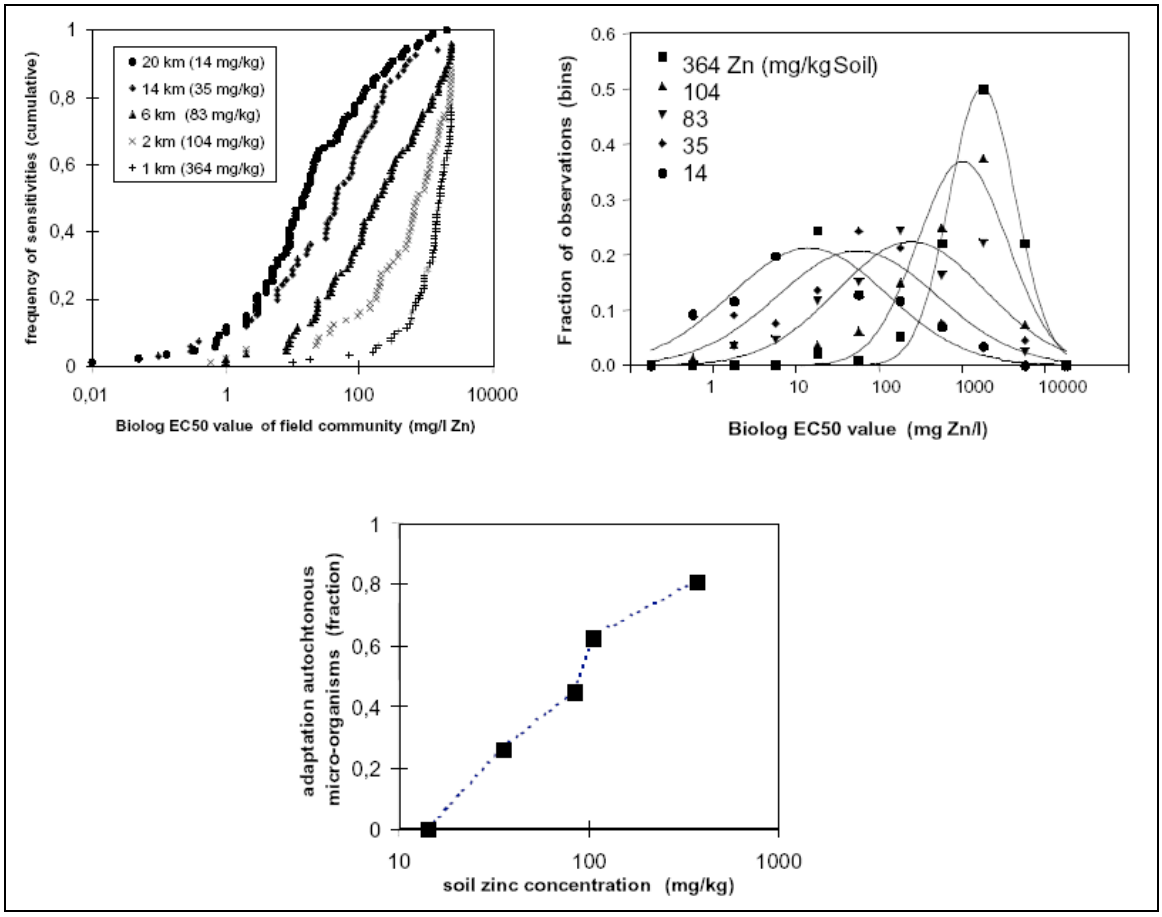
Διάγραμμα 4. Η μειωμένη γενετική ποικιλομορφία σε έδαφος μολυσμένο με ψευδάργυρο (10,000 mg Zn kg). Ο αριθμός των DNA δεσμών (κορυφές), ο οποίος λαμβάνεται από την DGGE, είναι 31 στο μολυσμένο έδαφος (+ ZN) και 50 στο αποκαταστημένο έδαφος (- Zn).

Στα μολυσμένα με Cu πειραματικά αγροτεμάχια οι μεγαλύτερες διαφορές στις δέσμες διαγραμμάτων DNA βρέθηκαν μεταξύ του μη μολυσμένου χώματος σε ουδέτερο pH (6.1), και του πιο μολυσμένου χώματος στο χαμηλότερο pH (4.0), το οποίο περιείχε 125 mg Cu / kg. Στο χαμηλότερο pH, η κινητικότητα του Cu και η τοξικότητα ήταν οι υψηλότερες. Ο αριθμός των τμημάτων DNA ήταν 42 ± 2 έναντι των 50 ± 0 στο καθαρό χώμα. Ο χαλκός και το pH μαζί προκάλεσαν διαφοροποιήσεις στα προφίλ του DNA και έτειναν να μειώσουν τον αριθμό ζωνών DNA. Χρησιμοποιώντας μια άλλη τεχνική DNA (ARDRA) ο Smit et al. (1997) βρήκε τις μετατοπίσεις στη μικροβιακή κοινοτική δομή στο ίδιο μολυσμένο από χαλκό χώμα.

Στο μολυσμένο χώμα από νικέλιο (Ni) και χρώμιο (Cr) ο αριθμός ζωνών DNA (48,5 ± 0.5) δεν μειώθηκε σημαντικά έναντι του αμόλυντου χώματος (47,5 ± 0.5), αλλά τα προφίλ του DNA είχαν σημαντικές διαφορές. Η διαφορά ήταν 18%.

Η μεγαλύτερη διαφορά 33% βρέθηκε μεταξύ των προφίλ DNA του βαριά μολυσμένου χώματος από ψευδάργυρο (Zn) και του εδάφους υπό αποκατάσταση όπου η ρύπανση ήταν ακινητοποιημένη (σχέδιο 3). Στο μολυσμένο από Zn χώμα ο αριθμός ζωνών DNA ήταν 31 ± 1 έναντι των 50 ± 1 του χώματος το οποίο υπέστη αποκατάσταση. Συνεπώς, και στα τρία μολυσμένα εδάφη τα προφίλ μικροβιακού DNA (δομή κοινοτήτων) ήταν διαφορετικά, αλλά η ποικιλομορφία (αριθμός ζωνών DNA) δεν μειώθηκε απαραίτητα. Η αλλαγή των δομών των μικροβιακών κοινοτήτων σε εδάφη μολυσμένα με βαρέα μέταλλα, έχει βρεθεί με διάφορες τεχνικές DNA και με την ανάλυση λιπαρών οξέων φωσφολιπιδίων (77, 78, 79, 80).

Στο *Διάγραμμα 5* δίνονται τα αποτελέσματα της μέτρησης PICT σε αμμώδη εδαφικά δείγματα από την μεταβολή της ρύπανσης Zn σε μια περιοχή όπου υφίσταται ένα χυτήριο ψευδάργυρου χρησιμοποιώντας τρυβλία Biolog (66). Η παρουσία του μολυσματικού παράγοντα στο χώμα έχει οδηγήσει σε μια ανοχή της μικροβιακής κοινότητας στον ψευδάργυρο, η οποία είναι ανάλογη με τις συγκεντώσεις του Zn στο πεδίο. Η μορφή των καμπυλών του Gauss στο Διάγραμμα 5b φανερώνει ότι η λειτουργική ποικιλομορφία του πληθυσμού στην περισσότερο μολυσμένη πλευρά της καμπύλης είναι μικρότερη απ' ότι στην άλλη πλευρά της καμπύλης. Αυτές είναι ισχυρές ενδείξεις, ότι ο ψευδάργυρος μπορεί να προκαλέσει μια μείωση στη βιοποικιλότητα των εδαφικών οργανισμών.



Διάγραμμα 5. Αποτελέσματα από το πείραμα PICT το οποίο χρησιμοποιεί δείγματα από μία μολυσμένη περιοχή από ψευδάργυρο κοντά σε ένα χυτήριο ψευδαργύρου (Budel, Ολλανδία):

(a) Διανομή συχνότητας όλων των υπολογισμένων Biolog EC_{50} τιμών πέντε κοινοτήτων γύρω από το χυτήριο ψευδαργύρου. Όλοι οι δείκτες σε μια καμπύλη δείχνουν τις διαφορετικές μετατροπές υποστρωμάτων Biolog. Οι συνολικές συγκεντρώσεις ψευδάργυρου στα δείγματα και η απόσταση από το χυτήριο υποδεικνύονται στο υπόμνημα.

(b) Εναρμονισμένες κοινοτικές πυκνότητες των μικροβιακών κοινοτήτων (καμπύλες Gauss μη γραμμική παλινδρόμηση, σταθερή περιοχή) βασίζονται στη συχνότητα της διανομής των Biolog EC50 τιμών.

(c) Συνοψισμένα αποτελέσματα από τη μέτρηση PICT της περίπτωσης 1 παρουσιάζει τη μετατόπιση της κοινότητας στην πυκνότητα των τιμών ευαισθησίας σχετικά με την αναφερόμενη περιοχή (που υπολογίζεται από b) (66).

ΑΣΠΟΝΔΥΛΑ

1. Η Εμφάνιση και Εξέλιξη των Βιολογικών Μεθόδων και Δεικτών Υδάτων.

Ως βιολογικός δείκτης ποιότητας υδάτων ορίζεται "ένας αλγόριθμος που εκφράζει ποσοτικά την εκτίμηση της ποιότητας των υδάτων. Είναι μια απλοποιημένη έκφραση περίπλοκων συνδυασμών αρκετών παραγόντων και η εφαρμοσιμότητά του βασίζεται στην αξιοπιστία του και στην ποσότητα των πληροφοριών που παρέχει. Ο τελικός δείκτης μπορεί να εκφρασθεί είτε ως ένα χαρακτηριστικό σύμβολο, είτε ως ένας συνδυασμός αριθμητικών και ποιοτικών μεταβλητών" (81). Ο βιολογικός δείκτης δηλαδή παρέχει πληροφορίες για την κατάσταση του οικοσυστήματος και συνήθως εκφράζεται με έναν αριθμό ο οποίος περιγράφει την απόκλιση από κάποιον αριθμό αναφοράς. Αυτή η απόκλιση αντανακλά στο περιβάλλον την απόκλιση της ποιότητας μίας δεδομένης περιοχής από την ποιότητα της περιοχής αναφοράς.

Η χρήση βιολογικών δεικτών ή βιοδεικτών όπως αλλιώς ονομάζονται, για την εκτίμηση της ποιότητας των επιφανειακών υδάτων μπορεί να θεωρηθεί ότι ξεκίνησε από τους Kolenati και Cohn, όπως αναφέρει ο Liebmann (83). Οι ερευνητές αυτοί διαπίστωσαν την παρουσία διαφορετικών βιοκοινοτήτων οργανισμών μεταξύ καθαρών και μη υδάτων. Από τότε έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων για την εκτίμηση της ποιότητας των υδάτων οι οποίες συνοψίζονται σε δύο κατηγορίες: Στο σαπροφυτικό σύστημα των Kolkwitz & Marsson (82), το οποίο αναπτύχθηκε στην Ευρώπη, τροποποιήθηκε αργότερα από άλλους ερευνητές (84, 85) και βασίζεται κυρίως στην παρουσία μικροσκοπικών ειδών που λειτουργούν ως δείκτες και ανήκουν στις πλαγκτονικές και περιφυτικές κοινότητες και στο σύστημα το οποίο αναπτύχθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (85, 86) το οποίο εστιάζει στην παρουσία ή απουσία των μακροασπονδύλων ως βιολογικών δεικτών.

Τελικά, στη δεκαετία του '70 υπήρχαν τόσοι δείκτες και μέθοδοι βιολογικής εκτίμησης, όσοι και οι επιστήμονες που εργάζονταν σε αυτόν τον τομέα (86). Έτσι άρχισαν να γίνονται προσπάθειες εναρμόνισης και βαθμονόμησης όλων των μεθόδων προκειμένου τα αποτελέσματά τους να είναι συγκρίσιμα. Η προσπάθεια αυτή ξεκίνησε από την Ευρωπαϊκή Ένωση με τη διοργάνωση τριών μελετών εναρμόνισης

και βαθμονόμησης στην Γερμανία (87), τη Μεγάλη Βρετανία (88) και την Ιταλία (90). Σκοπός των μελετών αυτών ήταν να γίνει σύγκριση των διαφορετικών μεθόδων βιολογικής δειγματοληψίας, σύγκριση των μεθόδων βιολογικής εκτίμησης και ανάπτυξη αρμονικών σχέσεων μεταξύ των μεθόδων. Από τις παραπάνω μελέτες έγινε φανερό ότι:

1. Οι μέθοδοι βιολογικής εκτίμησης θα πρέπει να αποτελούν αναπόσπαστο μέρος των διαδικασιών εκτίμησης της ποιότητας των υδάτινων σωμάτων.
2. Θα πρέπει οι βιολογικές μέθοδοι να συνδυαστούν με τις χημικές προκειμένου να επιτευχθεί μία πλήρης εκτίμηση της ποιότητας των υδάτων.
3. Τα βενθικά μακροασπόνδυλα παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα ώστε να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί δείκτες και
4. Θα πρέπει να γίνει τυποποίηση όλων των μεθόδων που ακολουθούνται στις χώρες της Ευρώπης ώστε αυτές να δίνουν συγκρίσιμα αποτελέσματα.

Πιο συγκεκριμένα, θα πρέπει να καθοριστούν οι περιβαλλοντικές πληροφορίες που πρέπει να καταγραφούν ως υπόβαθρο για την ερμηνεία των βιολογικών πληροφοριών, να δημιουργηθεί ένα κατάλληλο πρωτόκολλο που να καθορίζει τις τεχνικές και τις μεθόδους δειγματοληψίας, να καθοριστεί ένα συγκεκριμένο επίπεδο ταξινομικής αναγνώρισης των οργανισμών και να καθοριστούν και να διευκρινισθούν πλήρως οι μέθοδοι για τον υπολογισμό των βιολογικών δεικτών και των ορίων εφαρμογής τους.

2. Τα Ασπόνδυλα σαν Δείκτες.

Τα υδρόβια ασπόνδυλα ζουν στους πυθμένες των νερών. Καλούνται επίσης ωκεάνια μακροασπόνδυλα, ή βένθος (οργανισμοί βυθών) και αποτελούν καλούς δείκτες της υγείας του γλυκού νερού διότι:

- Ζουν στο νερό για όλη τους τη ζωή ή για το μεγαλύτερο μέρος αυτής.
- Παραμένουν σε περιοχές κατάλληλες για την επιβίωσή τους.
- Είναι εύκολο να συλλεχθούν.
- Διαφέρουν στην ανοχή τους ως προς την ποσότητα και τον τύπο της μόλυνσης.
- Είναι εύκολο να αναγνωριστούν στο εργαστήριο.

- Συχνά ζουν για περισσότερο από ένα χρόνο.
- Έχουν περιορισμένη κινητικότητα.
- Εξαρτώνται άμεσα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

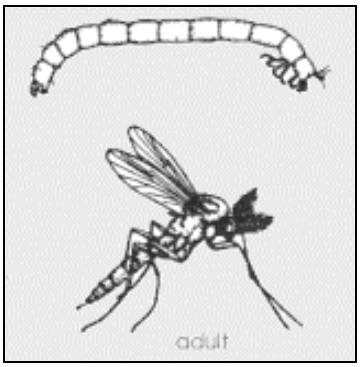
Βενθικά Μακροασπόνδυλα	
Ευαίσθητοι Βενθικοί Οργανισμοί	Έντομο της τάξης *plecoptera* (stoneflies)
	Σκαθάρι της τάξης *coleoptera* (water penny beetles)
	Έντομο της τάξης *ephemeroptera* (mayflies)
	Έντομο της τάξης *megaloptera* (dobsonflies)
	Έντομο της τάξης *megaloptera* (alderflies)
	Έντομο της τάξης *diptera* (snipeflies)
	Μύδι του γένους *mytilus*(mussels)
	Έντομο της τάξης *coleoptera* (riffle beetles)
Μέτριας Ανεκτικότητας Βενθικοί Οργανισμοί	Έντομο της τάξης *odonata* (damselflies)
	Έντομο του γένους *anisoptera* (dragonflies)
	Καραβίδα (crayfish)
	Αμφίποδο (amphipods)
	Έντομο της τάξης *diptera* (blackflies)
	Έντομο της τάξης *trichoptera* (caddisflies)
	Ισόποδο (αρθρόποδο) (isopods)
	Μύγα του γένους *tipulidae* (craneflies)
Ανεκτικοί Βενθικοί Οργανισμοί	Έντομο της τάξης *diptera* (midgeflies)
	Γαιοσκώληκας (worms)
	Βδέλλα (leeches)
	Μαλάκιο της τάξης *gastropoda* (pouch snails)

Πίνακας 9: Διαφορές σε ανεκτικότητα στη μόλυνση των βενθικών μακροασπονδύλων.

Μερικά βένθη εντοπίζονται πιο συχνά και σε μεγάλες ποσότητες, σε νερά τα οποία είναι καθαρά, ή αμόλυντα από οργανικά απόβλητα. Χωρίς μεγάλη ποσότητα οργανικής ύλης, το νερό συνήθως έχει αρκετό οξυγόνο για τα βένθη. Η χρήση των βενθών ως δεικτών της ποιότητας του νερού συμβαίνει εδώ και πολλά χρόνια. Για

παράδειγμα, τα stoneflies συχνά θεωρούνται σαν οργανισμοί που ζουν σε καθαρά νερά. Αλλά όταν εντοπίζονται σκουλήκια και σκνίπες, οι επαγγελματίες κρίνουν την ποιότητα του νερού σαν κακή αφού τέτοιοι δείκτες εντοπίζονται σε βρώμικα νερά, ιδιαίτερα σε ποτάμια και ρυάκια.

Εικόνα 8. Έντομο της τάξης *plecoptera* (stoneflies).



Εικόνα 9. Έντομο της τάξης *diptera* (midgeflies) στην φάση της προνύμφης και στην ενήλικη φάση.

Δυστυχώς, δεν είναι πάντα τόσο εύκολο να βγει ένα αποτέλεσμα. Το οξυγόνο είναι μόνο ένας παράγοντας ο οποίος επηρεάζει τα βένθη. Άλλοι τέτοιοι παράγοντες είναι τα τοξικά χημικά, τα θρεπτικά και η ποιότητα του περιβάλλοντος. Μερικά είδη stoneflies μπορούν να εντοπιστούν σε ύδατα τα οποία δεν είναι ιδιαίτερα καθαρά και παρόμοια μερικά είδη σκουληκιών και σκνιπών μπορούν να εντοπιστούν σε καθαρότερα νερά. Έτσι λοιπόν είναι ιδιαίτερα σημαντικό να κατανοηθεί πως υπάρχουν κάποιες ακόμα πολύπλοκες μέθοδοι για να ληφθούν τέτοιου είδους αποφάσεις και να προσδιοριστεί εάν τα νερά είναι υγιή ή μολυσμένα για την υδρόβια ζωή.

3. Τα Βενθικά Μακροασπόνδυλα ως Δείκτες Οικολογικής Ποιότητας των Επιφανειακών Υδάτων.

Ο όρος μακροασπόνδυλα δεν αποτελεί όρο της συστηματικής αλλά καθιερώθηκε για να περιγράψει μία μερίδα μόνο της ομάδας των ασπόνδυλων. Τα μακροασπόνδυλα θα μπορούσαν να περιγραφούν ως οι οργανισμοί εκείνοι οι οποίοι μπορούν να συγκρατηθούν από δίχτυ με άνοιγμα ματιού 500 έως 1000μm, είναι αντιληπτοί με γυμνό μάτι και το μέγεθός τους είναι περίπου 1mm . Είναι οργανισμοί υδρόβιοι και περνούν κάποιο στάδιο ή και ολόκληρη τη ζωή τους στο βυθό ενός υδάτινου σώματος. Οι κοινωνίες των βενθικών μακροασπονδύλων αποτελούνται από τα παρακάτω φύλα: αρθρόποδα (προνύμφες εντόμων, ισόποδα, αμφίποδα και άλλα καρκινοειδή), αννελίδες (σκώληκες και βδέλλες), μαλάκια (γαστερόποδα, δίθυρα) και πλατυέλμινθες (*Πίνακας 5, Εικόνα 10*).

Οι προνύμφες των εντόμων που απαντούν στο βυθό των ποταμών περιλαμβάνουν τις τάξεις: εφημερόπτερα, οδοντόγναθα, πλεκόπτερα, κολεόπτερα, δίπτερα, τριχόπτερα, ετερόπτερα, λεπιδόπτερα, νευρόπτερα και μεγαλόπτερα. Τα έντομα αποτελούν την καλύτερα μελετημένη ομάδα μακροασποδύλων.

Τα αμφίποδα και τα ισόποδα ανήκουν στα μαλακόστρακα καρκινοειδή. Αποτελούν και αυτά μία ευρέως απαντώμενη ομάδα μακροασπονδύλων του γλυκού νερού και περιορίζονται σε περιοχές που το νερό είναι καθαρό και πλούσιο σε οξυγόνο.

Οι σκώληκες (ολιγόχαιτοι), έχουν κυλινδρικό σώμα, με αμφίπλευρη συμμετρία και αποτελούνται από μεταμερίδια. Αναπτύσσουν πυκνές αποικίες και είναι πολύ ανθεκτικοί στη ρύπανση, ειδικά τα άτομα της οικογένειας Tubificidae, με αποτέλεσμα να αποτελούν δείκτη κακής ποιότητας, ιδιαίτερα όταν δεν απαντά άλλη ομάδα ασπόνδυλων.

Τα γαστερόποδα και τα δίθυρα ανήκουν στα μαλάκια και έχουν προσαρμοστεί σε μία ποικιλία υποστρωμάτων και επιπέδων ρύπανσης. Πρόκειται για την ομάδα ασπονδύλων με τη μεγαλύτερη ποικιλία.

Αρθρόποδα	
Έντομα	**Καρκινοειδή**
Πλεκόπτερα	Ισόποδα
Εφημερόπτερα	Αμφίποδα
Τριχόπτερα	Δεκάποδα
Οδοντόγναφα	
Ετερόπτερα	
Κολεόπτερα	
Μεγαλόπτερα	
Δίπτερα	
Μή Αρθρόποδα	
Σκώληκες (Ολιγόχαιτοι)	
Βδέλες	
Γαστερόποδα	
Δίθυρα	
Πλατυέλμινθες	

Πίνακας 5. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες ομάδες μακροασπονδύλων του γλυκού νερού.

Εικόνα 10. Διάφορα βενθικά μακροασπόνδυλα (από αριστερά προς τα δεξιά: πλεκόπτερο, εφημερόπτερο, τριχόπτερο, οδοντόγναθο, αμφίποδο, σκώληκας).

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης βενθικών μακροασπονδύλων για την εκτίμηση της ποιότητας των επιφανειακών υδάτων είναι αρκετά γι' αυτό και η χρησιμοποίησή τους ως βιολογικών δεικτών είναι τόσο διαδεδομένη:

1. Οι βιοκοινότητές τους αποκρίνονται διαβαθμισμένα σε ευρύ φάσμα ειδών και βαθμών περιβαλλοντικής έντασης.
2. Είναι ευρέως διαδεδομένα, πολυπληθή και έυκολα στη συλλογή και αναγνώριση συγκριτικά με άλλους οργανισμούς όπως τα διάτομα ή το πλαγκτόν.
3. Έχουν τέτοια διάρκεια ζωής ώστε παρέχουν μία ικανή καταγραφή της περιβαλλοντικής ποιότητας.
4. Οι κοινωνίες τους έχουν μεγάλο βαθμό ετερογένειας, αποτελούμενες από αντιπροσώπους πολλών διαφορετικών ομάδων ταξινόμησης (taxa) και έτσι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα, τουλάχιστον κάποιοι οργανισμοί να αντιδράσουν σε μία συγκεκριμένη μεταβολή στις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Ωστόσο, θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθούν και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως το γεγονός ότι μερικοί οργανισμοί μπορεί να μην συλλεχθούν κάποιες φορές κατά τη διάρκεια του έτους καθώς η παρουσία τους εξαρτάται από την εποχή αλλά και ότι στον καθορισμό της σύνθεσης των βενθικών βιοκοινοτήτων συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες εκτός της ποιότητας των υδάτων όπως η ταχύτητα ροής και η φύση του υποστρώματος.

Τα μακροασπόνδυλα χρησιμοποιούνται ως δείκτες της ποιότητας των επιφανειακών υδάτων εδώ και πολλά χρόνια ενώ η καταλληλότητά τους για τη συγκεκριμένη χρήση είναι πλέον γενικά αποδεκτή. Πολλές χώρες της Ευρώπης έχουν δημιουργήσει μεθόδους δειγματοληψίας και συστήματα εκτίμησης της οικολογικής ποιότητας των ρέοντων υδάτων τα οποία είναι προσαρμοσμένα στα δεδομένα της κάθε χώρας και εφαρμόζονται σε τοπικό ή εθνικό επίπεδο (*Πίνακας 6*).

Χώρα	Δείκτης	Επίπεδο Αναγνώρισης	Κλίμακα
Βέλγιο	BBI	Τάξη / Οικογένεια / Γένος	0-10
Δανία	S	Οικογένεια / Γένος / Είδος	1-4
Γαλλία	IGB	Οικογένεια	0-20
Γερμανία	BEOL / S	Είδος	0-100 / 1-4
Ιρλανδία	Q-rating	Οικογένεια / Γένος / Είδος	0-5
Ιταλία	EBI / IBE	Τάξη / Οικογένεια / Γένος	0-14
Λουξεμβούργο	IB	Τάξη / Οικογένεια	0-10
Ολλανδία	K135	Οικογένεια / Γένος / Είδος	100-500
Πορτογαλλία	BBI	Τάξη / Οικογένεια / Γένος	0-10
Ισπανία	IBMWP / IASPT	Οικογένεια	0-150+/0-10
Μεγάλη Βρετανία	BMWP / ASPT	Οικογένεια	0-150+/0-10

Πίνακας 6. Οι κυριότεροι δείκτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται στις χώρες της Ευρώπης μέχρι την έκδοση της οδηγίας για τα νερά (WFD 2000/60).

3.1 Μεσοβένθος.

Στις οικολογικές μελέτες οι κοινότητες μεσοβενθικών οργανισμών (ενδιάμεση κατηγορία μεγέθους μεταξύ του μικροβένθους και του μακροβένθους) έχουν παραμεληθεί εδώ και πολύ καιρό. Το 1984, ο Bruce Coull επισήμανε ότι "οι οικολόγοι οι οποίοι καταπιάνονται με μεσοβενθικούς οργανισμούς είναι πιο αργοί στην αξιοποίηση πειραματικών προσεγγίσεων πεδίου από τους συναδέλφους τους οι οποίοι καταπιάνονται με μακροβενθικούς οργανισμούς" (91). Κατά συνέπεια, επίσης στις αποτιμήσεις της ρύπανσης οι μεσοβενθικοί οργανισμοί ταξινομούνται πριν από τους μακροβενθικούς, από τη στιγμή που η οικολογική γνώση απαιτείται για την αξιολόγηση της ρύπανσης η οποία προξένησε αλλαγές στις κοινότητες. Το γενικά μικρό μέγεθος των μεσοβενθικών οργανισμών (διαπερνούν κόσκινα κλάσης 500μm, παρακρατούνται από κόσκινα κλάσης 42μm), (92) και η μορφολογική ομοιομορφία τους, προκαλούν ταξινομικά και πειραματικά προβλήματα, τα οποία ερμηνεύουν την καθυστερημένη πρόοδο της έρευνας των μεσοβενθικών οργανισμών. Εντούτοις, η ενασχόληση με την ταξινόμηση των μεσοβενθικών οργανισμών και με την οικολογία αυξήθηκε αισθητά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, αυξάνοντας τη σημασία χρήσης

αυτών στην αξιολόγηση του αντίκτυπου της ρύπανσης (92, 90, 93, 94, 95). Το κίνητρο για τη χρησιμοποίηση των μεσοβενθικών οργανισμών στις περιβαλλοντικές μελέτες βασίζεται σε διάφορα πλεονεκτήματα του μεσοβένθους έναντι του μακροβένθους (96, 94, 97):

- Υψηλή αφθονία: Οι μεσοβενθικοί οργανισμοί αντιπροσωπεύουν τα πολυπληθέστερα μετάζωα σε χώμα και ιζήματα. Μπορούν να φθάσουν πυκνότητες της τάξεως των $40*10^6$ / m^2 (98). Λόγω αυτών των υψηλών πυκνοτήτων, η στατιστικά έγκυρη δειγματοληψία μπορεί να επιτευχθεί ευκολότερα απ' ότι με τους μακροβενθικούς οργανισμούς, ακόμη και με μικρά, εύκολα επεξεργάσιμα δείγματα.
- Υψηλή βιοποικιλότητα: Η ποικιλότητα ειδών μεσοβένθους, τα οποία ανήκουν σε ενιαία ζωολογική διαίρεση (phylum) σε έναν δεδομένο βιότοπο μπορούν να είναι υψηλότερου μεγέθους έναντι του μακροβένθους. Εξαιτίας αυτής της ποικιλομορφίας, οι μεσοβενθικοί οργανισμοί καλύπτουν μεγάλο εύρος φυσιολογικών και διατροφικών τύπων, και παρέχουν με αυτό τον τρόπο μια ισορροπημένη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των επικρατούντων συνθηκών στις τροφικές αλυσίδες και τις κοινοτικές διαδικασίες.
- Διεισδυτικότητα και ανοχή: Οι αντιπρόσωποι του μεσοβένθους εντοπίζονται σε όλα είδη περιβάλλοντος τα οποία έχουν εξεταστεί μέχρι τώρα. Αυτά περιλαμβάνουν είδη περιβάλλοντος με υψηλές θερμοκρασίες ηφαιστειακής προέλευσης, με ιζήματα στα οποία απουσιάζει το οξυγόνο, με θαλάσσια παγόβουνα, και με μολυσμένα ιζήματα. Αυτό είναι δυνατό, δεδομένου ότι οι οργανισμοί του μεσοβένθους περιλαμβάνουν είδη τα οποία είναι ανεκτικά σε μια σειρά διαφορετικών περιβαλλοντικών πιέσεων. Εντούτοις, η ομάδα περιλαμβάνει επίσης ευαίσθητα είδη μη ανεκτικά σε περιβαλλοντικές πιέσεις. Κατά συνέπεια, οι αλλαγές στο ευρύ φάσμα των καταστάσεων πίεσης μπορούν να αξιολογηθούν για έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών οικοσυστημάτων.
- Χαμηλή κινητικότητα: Οι κοινότητες των οργανισμών του μεσοβένθους εκτίθενται συνεχώς σε επιβλαβή υλικά τα οποία εισάγονται στο περιβάλλον τους, λόγω της περιορισμένης δυνατότητάς διαφυγής τους. Επομένως, η κοινοτική δομή είναι πιο άμεσα σχετιζόμενη με τη φυσικοχημεία του βιότοπου από τον οποίο λαμβάνεται το δείγμα απ' ότι στην περίπτωση των κοινοτήτων οργανισμών του μακροβένθους.

- Χρόνος γενεάς: Τα αποτελέσματα των βραχυπρόθεσμων καθώς επίσης και των μακροπρόθεσμων επιρροών γίνονται φανερά στις κοινότητες των οργανισμών του μεσοβένθους, δεδομένου ότι οι κύκλοι ζωής τους καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα χρόνου (από περιόδους έξι ημερών έως περιόδους μεγαλύτερους των δύο ετών). Τα περισσότερα είδη έχουν έναν χρόνο γενεάς περίπου ενός έως τρεις μήνες (99).

Εντός των περισσότερων κοινοτήτων οργανισμών του μεσοβένθους, τα νηματοειδή είναι η κυρίαρχη ομάδα οργανισμών. Αυτό βρέθηκε για το γλυκό νερό (βιότοποι στάσιμων νερών: π.χ. 100, 101, 102; βιότοποι τρεχούμενων νερών: 103, 104), και για θαλάσσια ιζήματα (98) και χώμα (105). Ο αριθμός των βασικών ειδών νηματοειδών ελεύθερης διαβίωσης ο οποίος έχει περιγραφεί μέχρι τώρα είναι περίπου 11.000 (106), αλλά υπάρχει μια γενικότερη συμφωνία, ότι τα περισσότερα είδη νηματοειδών χρήζουν περιγραφής. Τα νηματοειδή έχουν αντιπροσώπους οι οποίοι ζουν μέσα σε διάκενα αλλά και αντιπροσώπους οι οποίοι φωλιάζουν στο έδαφος καταλαμβάνοντας έτσι πολλά διαφορετικά τροφικά επίπεδα: Υπάρχουν είδη που τρέφονται με κατάλοιπα αποσύνθεσης, με βακτήρια, με άλγη, με μύκητες, και με ανώτερα φυτά, όπως επίσης και με παμφάγα και αρπακτικά είδη (107, 108). Με αυτόν τον τρόπο, τα νηματοειδή καταλαμβάνουν σημαντικές θέσεις στις βενθικές τροφικές αλυσίδες, επηρεάζοντας ουσιαστικά τη ροή μάζας και ενέργειας στα ιζήματα. Τα νηματοειδή τα οποία καταναλώνουν βακτήρια για παράδειγμα, είναι σε θέση να ενισχύσουν την περίσσεια και τη βιομάζα των βενθικών βακτηρίων (107), υποκινώντας έτσι το μικροβιακό μεταβολισμό στα ιζήματα.

Η οικολογική σημασία των νηματοειδών και τα γενικά πλεονεκτήματα των οργανισμών μεσοβένθους σχετικά με την αξιολόγηση της ρύπανσης όπως απαριθμούνται παραπάνω, έχουν οδηγήσει σε μια αυξανόμενη προσήλωση περιβαλλοντικών επιστημόνων σε αυτήν την ομάδα οργανισμών.

3.2 Ολιγόχαιτα.

Το ολιγόχαιτα θεωρούνται γενικά ως ιδιαίτερα κατάλληλοι βιοδείκτες (109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116). Τα κύρια πλεονεκτήματά τους είναι:

- Στα ολιγόχαιτα περιλαμβάνονται βασικά είδη για τη λειτουργία του οικοσυστήματος, ειδικότερα για την αποσύνθεση και τη συντήρηση εδαφικών δομών.
- Τα σκουλήκια της τάξης oligochaeta είναι ευρέως διαδεδομένα στο έδαφος και το υδάτινο περιβάλλον.
- Εξαιτίας της συμπεριφοράς και της μορφολογίας τους είναι σε επαφή με την υδάτινη αλλά και τη στερεά φάση του υποστρώματος.
- Τα περισσότερα είδη είναι σχετικά μεγάλα σε μέγεθος και επομένως πιο εύκολα στο να χειριστούν και να καλλιεργηθούν.
- Τα περισσότερα είδη δεν είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε χαμηλά επίπεδα μόλυνσης.
- Οι αντιδράσεις τους προς την πίεση είναι μετρήσιμες και μπορούν να αναπαραχθούν σε διάφορα επίπεδα οργάνωσης.
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε συνθήκες εργαστηρίου αλλά και πεδίου.
- Υπάρχει μεγάλη και συνεχώς αυξανόμενη γνώση σχετικά με τη βιολογία, την οικολογία και την οικοτοξικολογία τους.
- Η εσωτερική οργάνωσή τους δεν είναι ιδιαίτερα σύνθετη, όμως έχουν έντονα διαφοροποιημένα όργανα και τους ιστούς.
- Η χημική σύνθεση του σώματός τους είναι αρκετά σταθερή, παρέχοντας μια ομοιογενή αναφορά για τις τοξικές ουσίες.
- Τα ολιγόχαιτα είναι μη αμφιλεγόμενα ως πειραματόζωα.

Τα σκουλήκια του γένους oligochaerta, ειδικότερα τα Lumbricidae, είναι η πιο μελετημένη ομάδα στον τομέα οικοτοξικολογίας και βιοελέγχου, εξαιτίας του μεγέθους και του σχετικά εύκολου χειρισμού τους.

Εικόνα 11. Το Lumbricidae (σκουλήκι του γένους oligochaerta).

Η ύπαρξη τους, εντούτοις, περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό σε εδαφικούς βιότοπους, το οποίο περιορίζει τη χρήση τους. Για μελέτες οι οποίες συνδέονται με ιζήματα γίνεται εντατική χρήση των ειδών Lumbriculidae και Tubificidae, ενώ τα τελευταία χρόνια αυξανόμενη προσήλωση έχει αφιερωθεί στα Enchytraeidae, μια διαδεδομένη ομάδα η οποία εμφανίζεται και σε εδαφικά αλλά και σε υδάτινα είδη περιβάλλοντος (116).

Εικόνα 12. Το σκουλήκι Tubificidae.

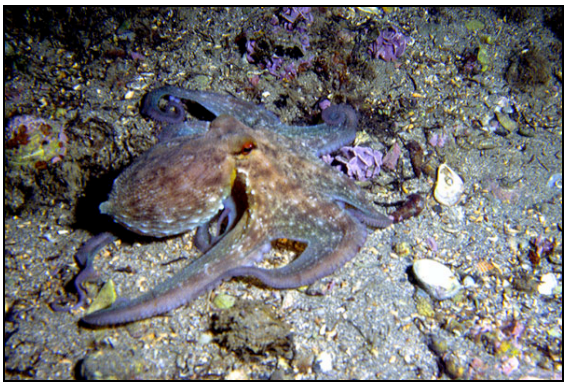
Εικόνα 13. Το σκουλήκι Enchytraeidae.

ΜΑΛΑΚΙΑ

1. Ο Ρόλος των Μαλακίων στην Οικοτοξικολογία.

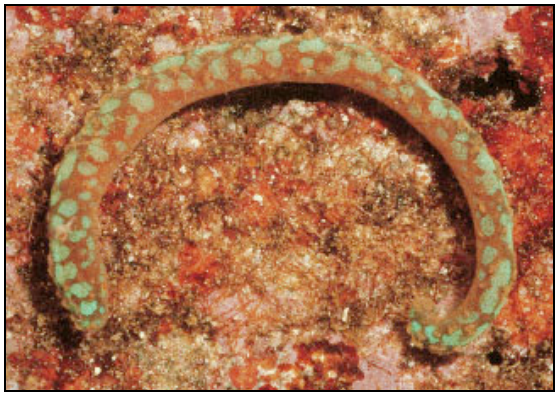
Τα μαλάκια αντιπροσωπεύουν μία από τις πιο διαφορετικές και πλούσιας ζωολογικής διαίρεσης οικογένεια του ζωικού βασιλείου. Με περισσότερα από 130000 γνωστά είδη κατέχουν τη δεύτερη θέση μετά τα αρθρόποδα (117, 118). Από τις επτά τάξεις μαλακίων, τα γαστερόποδα αποτελούν περισσότερο από το 80% των ειδών, με τα δίθυρα να αποτελούν το σημαντικότερο μέρος του υπολοίπου ποσοστού (15%). Οι άλλες πέντε κατηγορίες, με μικρότερα ποσοστά αριθμού ειδών, είναι τα πολυπλακόφορα (Polyplacophora), τα ιδιαίτερα εξελιγμένα κεφαλόποδα (cephalopods) και τελικά τα σκαφόποδα (scaphopods), τα απλακόφορα (Aplacophora) και τα μονοπλακόφορα (Monoplacophora) (*Πίνακας 7*). Ειδικά τα κεφαλόποδα αν και ασπόνδυλα, παρουσιάζουν έναν συγκριτικό βαθμό φυσιολογικής και νευρωνικής πολυπλοκότητας και οργάνωσης ως σπονδυλωτά. Τα κεφαλόποδα του γένους *Architeuthis* εμφανίζονται με συνολικό μήκος περισσότερο από 20m καθιστώντας τα ως τα μεγαλύτερα ζώντα ασπόνδυλα, αλλά και τα μικρότερα μετάζωα βρίσκονται ανάμεσα στα μαλάκια, όπως τα Aplacophora με μέγεθος λιγότερο από mm.

Εικόνα 14. *Chiton tuberculatus* της κατηγορίας Polyplacophora.



Εικόνα 15. Octopus vulgaris (το κοινό χταπόδι) της κατηγορίας cephalopods.

Εικόνα 16. Το κέλυφος του σκαφόποδου *Antalis vulgaris*.



Εικόνα 17. Epimenia australis της κατηγορίας απλακοφόρα.

Εικόνα 18. *Neopilina* της κατηγορίας μονοπλακοφόρα.

Τάξη	Υπόταξη	Αριθμός Ειδών	Διανομή
Aplacophora		250	Αποκλειστικά θαλάσσιοι βενθικοί οργανισμοί από το χαμηλό επίπεδο παλίρροιας σε βάθη > 6000m
Polyplacophora		1000	Αποκλειστικά θαλάσσιοι βενθικοί οργανισμοί κυρίως στη εύφωτη ζώνη, αλλά και σε βάθη μέχρι 4000m
Monoplacophora		20	Αποκλειστικά θαλάσσιοι βενθικοί οργανισμοί σε βάθη μεταξύ 170 και 6500m σύμφωνα με αναφορές από τον Ειρηνικό, νότιο Ατλαντικό, την Ανταρκτική περιοχή και τον Ινδικό Ωκεανό (κόλπος Aden)
Gastropoda (110000)	Prosobranchia	60000	Βρίσκονται παγκοσμίως σε όλα τα εδαφικά, υδάτινα και θαλάσσια είδη περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένων των στεπών, των ερήμων, των αλπικών βουνών, των πολικών περιοχών, των μεγάλων θαλασσίων βαθών και της πελάγιας ζώνης
	Pulmonata	44000	
	Opisthobranchia	6000	
Bivalvia (20500)	Protobranchia	550	Παγκόσμια σε όλα τα υδάτινα και θαλάσσια είδη περιβάλλοντος από την εύφωτη στην απύθμενη ζώνη και από τροπικές σε πολικές περιοχές
	Filibranchia	2200	
	Eulamellibranchia	17500	
	Septibranchia	250	
Scaphopoda		350	Αποκλειστικά σε όλες τις θάλασσες, σε ιζήματα από την εύφωτη ζώνη έως βάθη των 7000m
Cephalopoda		760	Αποκλειστικά σε όλες τις θάλασσες, ως βενθικοί ή πελάγιοι οργανισμοί σε επιφανειακά ύδατα έως μεγάλα θαλάσσια βάθη

Πίνακας 7: Σύνοψη των διαφορετικών τάξεων και υποτάξεων των μαλακίων η οποία δείχνει τον αριθμό των ειδών τους και τη γεωγραφική κατανομή τους.

Αν και τα μαλάκια είναι βασικά θαλάσσια ομάδα ζώων, τα γαστερόποδα και τα δίθυρα έχουν επεκτείνει επίσης την κατανομή τους στα διάφορα είδη περιβάλλοντος γλυκού νερού. Τα γαστερόποδα έχουν διεισδύσει σε μεγάλη ποικιλία εδαφικών βιότοπων έτσι ώστε τα μαλάκια να μπορούν να βρεθούν σήμερα από τις αβύσσους της θάλασσας σε λασπότοπους, από τις λίμνες και τους ποταμούς και τις όχθες τους στα δάση, σε αλπικά βουνά, αλλά και στις στέπες και στις ερήμους. Γενικά,

εμφανίζονται σχεδόν σε όλα τα γεωγραφικά πλάτη του πλανήτη από πολικές σε τροπικές θερμοκρασίες (119, 120).

Εξαιτίας της ευρέως διαδεδομένης κατανομής τους και του τεράστιου αριθμού των ειδών τους, τα μαλάκια διαδραματίζουν έναν από τους σημαντικούς οικολογικούς ρόλους στα διαφορετικά υδρόβια και εδαφικά οικοσυστήματα του κόσμου. Συνιστούν βασικά βιολογικά είδη για τη λειτουργία του οικοσυστήματος, π.χ. για την αποσύνθεση απορριμμάτων αλλά και επειδή συμβάλλουν στα τεράστια ποσά της βιομάζας στα διαφορετικά τροφικά επίπεδα των οικοσυστημάτων (από τους αρχικούς καταναλωτές έως του ανώτερους θηρευτές). Πολλές άλλες ομάδες τρέφονται με τα μαλάκια, όπως τα εχινοδέρμα, τα ψάρια, τα πουλιά και τα θηλαστικά. Τα μαλάκια ενεργούν ως ενδιάμεσοι ξενιστές για διάφορα ανθρωπίνως σχετιζόμενα παράσιτα και ασθένειες, π.χ. ως ενδιάμεσοι ξενιστές των τρηματοδών (trematodes), καθώς και διάφορα είδη μαλακίων τα οποία ζουν τα ίδια ως ενδοπαράσιτα (endoparasites) (120, 121).

Σε αντίθεση με την οικολογική σημασία τους, η συμβολή των μαλακίων στην οικοτοξικολογική έρευνα και τις μετρήσεις ρουτίνας στο εργαστήριο είναι πολύ μικρότερη. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για την τυποποιημένη δοκιμή των χημικών ουσιών, όπου τα είδη από άλλες ασπόνδυλες ομάδες, όπως τα αρθρόποδα, κυρίως τα έντομα και τα καρκινοειδή, αλλά και νηματώδη (nematodes) και τα σκουλήκια (annelids) είναι πιο συχνά εξεταζόμενα. Αυτό οφείλεται ιδιαίτερα στο γεγονός ότι οι κύκλοι ζωής των μαλακίων είναι συνήθως πιο μακροχρόνιοι απ' ότι των περισσότερων άλλων ασπόνδυλων και στο ότι η συντήρηση των υγιών εκκολαπτόμενων αποθεμάτων μαλακίων απαιτεί πιο περίπλοκες τεχνικές και κατά συνέπεια περισσότερες οικονομικές προσπάθειες, ήτοι για εκείνα τα υδρόβια είδη που έχουν πλαγκτονική (planktonic) λαρβική (larval) φάση. Η εξαίρεση από αυτόν τον γενικό κανόνα είναι οι τομείς της βιοένδειξης και του βιοελέγχου όπου τα μαλάκια έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να εξασφαλίσουν τις πληροφορίες για την ποιότητα των εδαφικών, θαλάσσιων και γλυκών υδάτινων οικοσυστημάτων και για να ποσοτικοποιήσουν την έκθεση και τα αποτελέσματα των μολυσματικών παραγόντων στο περιβάλλον τους (122). Η χρήση αυτή βρίσκει εφαρμογή στις δύο πιο διαφορετικές τάξεις μαλακίων, τα γαστερόποδα και τα δίθυρα, ενώ τα κεφαλόποδα διαδραματίζουν έναν πιο δευτερεύοντα ρόλο, και οι αντιπρόσωποι από τις υπόλοιπες τέσσερις τάξεις δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες σύμφωνα με τις υπάρχουσες επιστημονικές δημοσιεύσεις.

Όπως τα καναρίνια προειδοποιούσαν τους ανθρακωρύχους στα ευρωπαϊκά ανθρακωρυχεία του 19ου αιώνα για τον "κακό άνεμο", την ύπαρξη μεθανίου και τον κίνδυνο έκρηξης εκρηκτικών αερίων, έτσι και τα μαλάκια από καιρό ήταν γνωστό πως είναι καλοί βιοδείκτες της κακής ποιότητας νερού. Περισσότερο από 90 χρόνια πριν, ο Ortmann περιέγραψε για τα ρεύματα της Βόρειας Αμερικής και οι Kolkwitz και Marsson για τα γερμανικά επιφανειακά νερά, πως η απουσία ή η μείωση των πληθυσμών μυδιών του γλυκού νερού ήταν αποτέλεσμα των ρυπαντών.

Το 1976, η παρατήρηση των μυδιών ("Mussel Watch") άρχισε στις Ενωμένες Πολιτείες της Αμερικής ως ένα από τα πρώτα μεγάλης κλίμακας γεωγραφικά προγράμματα παρατήρησης του περιβάλλοντος στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν ζώντες οργανισμοί (123, 124). Το αρχικό σχέδιο περιλάμβανε συντονισμένες και τυποποιημένες δειγματοληψίες και μετρήσεις ρυπαντών σε τέσσερα δίθυρα (δύο είδη *Mytilus*, το *Crassostrea virginica* και το *Ostrea equestris*) σε περισσότερες από 100 περιοχές δειγματοληψίας κατά μήκος της ακτής της Βόρειας Αμερικής. Οι ιστοί των μαλακίων αναλύθηκαν για βαρέα μέταλλα, για ραδιενεργούς πυρήνες, για αλογονο-υδρογονάνθρακες, και για υδρογονάνθρακες πετρελαίου και διασφάλισε χρήσιμα στοιχεία σχετικά με τα επίπεδα βασικών γραμμών / τιμών αυτών των ουσιών. Το πρόγραμμα "Mussel Watch" υιοθετήθηκε και από άλλες χώρες μέσα στα επόμενα χρόνια και απασχόλησε σχεδόν σε παγκόσμια κλίμακα, ώστε οι πληροφορίες για την παράκτια ρύπανση οικοσυστήματος με συγκεκριμένες ουσίες να είναι διαθέσιμες σήμερα.

Τα μαλάκια είναι για διάφορους λόγους καλοί βιοδείκτες. Αν και αυτές τις πτυχές μοιράζονται επίσης με άλλες συστηματικές ομάδες του ζωικού βασιλείου, είναι ο μοναδικός συνδυασμός αυτών των διαφορετικών χαρακτηριστικών γνωρισμάτων που χαρακτηρίζει τα μαλάκια ως ιδανικούς βιοδείκτες. Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά είναι:

- Τα γαστερόποδα και τα δίθυρα είναι διαδεδομένα και άφθονα σε όλα τα οικοσυστήματα θαλάσσιου και γλυκού νερού παγκοσμίως. Επιπλέον, τα γαστερόποδα μπορούν επίσης να βρεθούν σχεδόν σε όλα τα εδαφικά είδη περιβάλλοντος.
- Αν και μερικά γαστερόποδα τα οποία ζουν στο έδαφος είναι ενδημικά με μια μάλλον περιορισμένη κατανομή, τα περισσότερα μαλάκια, και ειδικά εκείνα τα οποία ζουν στο υδάτινο περιβάλλον, παρουσιάζουν μια ευρεία κατανομή μέσα αλλά και μεταξύ των ηπείρων, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο τη

χρήση τους σε γεωγραφικές έρευνες μεγάλης κλίμακας. Επιπλέον, διάφορα είδη και γένη είναι παγκόσμια (π.χ. τα μύδια του γένους *Mytilus* με τα δύο είδη *M. edulis* και *M. galloprovincialis* που είναι τα πιο διαδεδομένα).

- Πολλά μαλάκια είναι βασικά είδη για τη λειτουργία οικοσυστημάτων θαλάσσιου νερού, γλυκού νερού αλλά και χερσαίων οικοσυστημάτων έτσι ώστε να είναι πιθανό όταν ένας ρυπαντής ο οποίος επηρεάζει έναν τέτοιο πληθυσμό μαλακίων, να εκδηλώνει επίσης έναν αρνητικό αντίκτυπο για ολόκληρο το οικοσύστημα.
- Η πλειοψηφία των γαστερόποδων και των δίθυρων παρουσιάζουν μια εξαιρετικά περιορισμένη κινητικότητα. Επομένως, αυτά τα μαλάκια απεικονίζουν τη μόλυνση του βιότοπού τους με ιδανικό τρόπο. Οι μόνες εξαιρέσεις είναι πελαγικά σαλιγκάρια των γαστερόποδων προσωβράγχιων (prosobranch) του γένους *Janthina*, τα ετερόποδα (*Atlanta*, *Carinaria*, *Pterotrachea*) και πτερόποδα (*Hyalela*, *Creseis*, *Styliola*) (125). Τα περισσότερα από τα υδρόβια είδη μαλακίων, ειδικά στις εύκρατες, υποτροπικές και τροπικές περιοχές, έχουν ένα πλαγκτονικό λαρβικό στάδιο, το οποίο εγγυάται μια υψηλή δυνατότητα διασποράς και επιτρέπει τη στρατολόγηση των πληθυσμών ακόμη και σε εκείνους τους βιότοπους όπου σεξουαλικά οι ώριμοι ενήλικοι έχουν εκλείψει εξαιτίας του υψηλού επιπέδου μόλυνσης.
- Τα μαλάκια εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα αναπαραγωγικών μεθόδων, όπως τον ταυτόχρονο και διαδοχικό ερμαφροδιτισμό, τη διασταύρωση με παρουσία των δύο φύλων και την παρθενογένεση, κάθε μια από τις οποίες συνδυάζεται έτσι ώστε τα αποτελέσματα των μολυσματικών παραγόντων τα οποία έχουν επιπτώσεις συγκεκριμένα σε αυτούς τους τύπους αναπαραγωγών, να μπορούν να ελεγχθούν. Επιπλέον, τα μαλάκια παρουσιάζουν μια εξαιρετική μεταβλητότητα στις στρατηγικές του κύκλου ζωής, ειδικά με σεβασμό στη μακροζωία τους. Ενώ ο κύκλος ζωής για την πλειοψηφία των κεφαλόποδων, των θαλάσσιων οπισθοβράγχιων σαλιγκαριών και των περισσότερων γαστερόποδων του γλυκού νερού και του εδάφους είναι μικρός με μέγιστη διάρκεια ζωής αυτής του ενός έτους, τα θαλάσσια γαστερόποδα προσωβράγχια σαλιγκάρια και πολλά δίθυρα έχουν μεγάλο κύκλο ζωής, έτσι ώστε να μπορούν να ενσωματώσουν τις μολύνσεις του περιβάλλοντός τους κατά τη διάρκεια μεγάλων χρονικών διαστημάτων. Περίπου το 40% των

θαλασσίων δίθυρων ειδών και περισσότερο από το 20% των θαλάσσιων γαστερόποδων προσωβράγχιων επιτυγχάνουν τους μέγιστους κύκλους ζωής, αυτών των περισσότερων των 14 χρόνων σύμφωνα με τον Heller (126). Για μεμονωμένα είδη έχει αναφερθεί ακόμα πιο μακροχρόνια διάρκεια ζωής, όπως παραδείγματος χάριν περισσότερο από 50 χρόνια ζωής για το γαστερόποδο γένους haliotis *Haliotis cracherodii* από τους Powell και Cummins (127) και περισσότερο από 100 χρόνια ζωής για μερικά θαλάσσια (120 χρόνια για *το Panope generosa*, 150 χρόνια για *το Crenomytilus grayanus* και 220 χρόνια για *το Arctica islandica* σύμφωνα με τον Jones, (128)) και δίθυρα του γλυκού νερού (116 χρόνια για *το Margaritifera margaritifera* σύμφωνα με τον Bauer, (129)).

- Τα περισσότερα γαστερόποδα και δίθυρα τα οποία χρησιμοποιούνται για λόγους βιοελέγχου είναι σχετικά μεγάλα σε μέγεθος και επομένως εύκολα στο να διαχειριστούν. Συνεπώς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο εργαστήριο και στο πεδίο για ενεργητικό και παθητικό βιοέλεγχο.
- Λόγω της έλλειψης εξωσκελετού (exoskeleton), δεδομένου ότι είναι παρών στα αρθρόποδα, τα μαλάκια είναι σε άμεση επαφή με το περιβαλλοντικό μέσο (νερό ή χώμα). Επομένως, οι χημικές ουσίες μπορούν να ληφθούν όχι μόνο από τη διατροφή (μέσω της γαστρεντερικής οδού) αλλά και πρόσθετα από το περιβάλλον νερό ή χώμα μέσω του περιβλήματος, συμπεριλαμβανομένων των αναπνευστικών οργάνων στα υδρόβια είδη, με αποτέλεσμα την αύξηση της δυναμικότητας της συσσώρευσης των μολυσματικών παραγόντων.
- Συγκρινόμενα με άλλες ομάδες ασπόνδυλων όπως τα αρθρόποδα αλλά και με τα σπονδυλωτά, τα μαλάκια εκδηλώνουν περιορισμένη ικανότητα έκκρισης ρυπαντών άμεσα μέσω των νεφρών τους ή άλλων απεκκριτικών οργάνων και ιστών, για μεταβολισμό οργανικών χημικών ουσιών, και φυσιολογικής αδρανοποίησης τοξικών βαρέων μετάλλων. Κατά συνέπεια, τα μαλάκια επιτυγχάνουν τους υψηλότερους παράγοντες βιοσυσσώρευσης ή βιοσυγκέντρωσης για πολλές τοξικές ουσίες σε σχέση με άλλες συστηματικές ομάδες. Επομένως, οι ρυπαντές μπορεί να εκδηλώσουν αρνητικές επιδράσεις στα μαλάκια στις χαμηλότερες περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις απ' ότι σε άλλα ασπόνδυλα ή σπονδυλωτά, διευκολύνοντας τη χρήση τους ως είδος οικολογικού συστήματος έγκαιρης προειδοποίησης.

- Η υψηλή ευαισθησία των μαλακίων στις περιβαλλοντικές χημικές ουσίες φανερώνεται επίσης από το γεγονός ότι συμβάλλουν με δυσανάλογο τρόπο στους "κόκκινους καταλόγους" ("red lists") απειλούμενων ειδών άγριας φύσης παγκοσμίως. Στοιχεία από τη Γερμανία δείχνουν ότι όχι περισσότερα από 204 (= 61%) των 333 ειδών μαλακίων τα οποία εμφανίζονται στο γλυκό νερό και στα εδάφη απειλούνται ή έχουν ήδη εκλείψει (130). Παρόμοια στοιχεία είναι μόνο διαθέσιμα για τη Σουηδία και τη Μαδέρα, όπου 25 από τα 133 και 72 από τα 190 εδαφικά γαστερόποδων βρίσκονται σε κίνδυνο ή έχουν ήδη εξολοθρευτεί (131). Δυστυχώς, για το θαλάσσιο και παράκτιο περιβάλλον καμία συγκριτική έρευνα δεν έχει γίνει στο παρελθόν αλλά υπάρχουν πολυάριθμες αναφορές για μείωση του πληθυσμού διαφόρων θαλάσσιων μαλακίων ειδών, οι οποίες έχουν επιτύχει ένα συγκεκριμένο οικονομικό ή επιστημονικό ενδιαφέρον. Για μερικές από αυτές τις αναφορές έχει αποδειχθεί ότι οι περιβαλλοντικές χημικές ουσίες είναι ο αιτιολογικός παράγοντας.
- Η εσωτερική οργάνωση, ειδικά η κανονική μορφολογική και ιστολογική δομή των διαφορετικών οργάνων και των ιστών, και η φυσιολογία των αφθονότερων γαστερόποδων και των δίθυρων ειδών τα οποία χρησιμοποιούνται για βιοέλεγχο χαρακτηρίζονται αρκετά καλά. Η γνώση μας σχετικά με τη βιολογία και την οικολογία αυτών των ειδών έχει βελτιωθεί αρκετά τις τελευταίες δεκαετίες.
- Συμπερασματικά, τα βιολογικά αποτελέσματα της περιβαλλοντικής πίεσης γενικά και της έκθεσης σε μολυσματικούς παράγοντες ειδικότερα, είναι μετρήσιμα σε διάφορα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης (από τα μόρια στις κοινότητες).
- Τα μαλάκια είναι μη αμφιλεγόμενα ως οργανισμοί για την οικοτοξικολογική έρευνα, ειδικά ως πειραματόζωα για τον περιβαλλοντικό έλεγχο.

2. Υδατική Βιοένδειξη και Βιοέλεγχος με Χρήση Μαλακίων.

Τα μαλάκια χρησιμοποιούνται σαν βιοδείκτες, επιλεγόμενα ανάλογα με το επίπεδο γεωγραφικής διασποράς τους, την άμεση διαθεσιμότητά τους στο πεδίο μέσω της

καλλιέργειάς τους σε υδατικά διαλύματα και την ικανότητα εγκλωβισμού τους για πειράματα κατά μήκος ακτογραμμών.

Τα μαλάκια και τα μύδια (Mytilus sp.) συγκεκριμένα, μπορούν εύκολα να εγκλειστούν σε επαρκείς χαλύβδινους κλωβούς (containers) οι οποίοι συνήθως τοποθετούνται 3 με 4 μέτρα κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας. Έχει αποδειχθεί πως τα μύδια είναι οι πλέον κατάλληλοι "οργανισμοί φρούρησης" για την βιοπαρακολούθηση του θαλάσσιου νερού σε ακτογραμμές, σε λίμνες και στα δέλτα των ποταμών. Ο εγκλωβισμός των οργανισμών για 3 με 4 εβδομάδες επιτρέπει στις φυσιολογικές παραμέτρους να μην επηρεάζονται από τις διαφορετικές αλλαγές του αναπαραγωγικού κύκλου αν και ταυτόχρονα μικρές μεταβολές στη θερμοκρασία, στη διαθεσιμότητα τροφής και στην αλατότητα μπορεί να υφίστανται σε κάθε πεδίο.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, οι παρατηρούμενες αλλαγές στην φυσιολογία των οργανισμών πιστεύεται πως σχετίζεται άμεσα με τις επιδράσεις των τοξικών χημικών ουσιών οι οποίες είναι παρούσες στο νερό και οι οποίες βιοσυσσωρεύονται στους ιστούς των ηθμοφάγων μαλακίων.

Η χρήση έγκλειστων οργανισμών σε μελέτες βιοελέγχου καθώς επίσης και σε σχετιζόμενη έρευνα, διευκολύνει την τυποποίηση των αποτελεσμάτων και τη σύγκριση οργανισμών ελέγχου με τα συλλεγόμενα ζώα από πεδία ενδεχομένως μολυσμένα, καθιστώντας ικανή τη σωστή μέτρηση της διαφορετικής βιοσυσσώρευσης χημικών σε ιστούς ατόμων ελέγχου και έγκλειστων ατόμων σε μολυσμένες περιοχές. Στην πραγματικότητα, η συνάρτηση των βιολογικών επιδράσεων με τις συγκεντρώσεις των μολυσματικών ουσιών είναι δύσκολο να συναχθεί με λογική ανάλυση χρησιμοποιώντας άγρια ζώα από τη στιγμή που οι επιβλαβείς ενώσεις μπορεί να έχουν διαφορετικό χρόνο βιολογικής ημιζωής στα μύδια: από ημέρες (χαλκός και φυτοφάρμακα) μέχρι μήνες (κάδμιο) και χρόνια (POPs). Επιπλέον, οι μολυσματικές ουσίες μπορούν κάλλιστα να αποθηκεύονται μερικώς στα κύτταρα υπό μη τοξικές μορφές. Για αυτό το λόγο, οι επιβλαβείς ενώσεις εντοπίζονται σε διάφορες ποσότητες ανά άτομο ανάλογα με την ηλικία του κάθε ατόμου ξεχωριστά (132).

Αν και έξι από τις επτά τάξεις των μαλακίων περιλαμβάνουν αποκλειστικά υδρόβια είδη και ακόμη και αν η πλειοψηφία των ειδών της υπολειπόμενης κατηγορίας, τα γαστερόποδα, είναι μη εδαφικά, είναι εμφανές, ότι τα σαλιγκάρια και τα δίθυρα είναι οι μόνες δύο ομάδες μαλακίων οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για βιοένδειξη και βιοέλεγχο στο παρελθόν. Οι αντιπρόσωποι από τις υπόλοιπες τάξεις εμφανίζουν

κάποιο ενδιαφέρον για τον οικοτοξικολογικό έλεγχο των χημικών ουσιών στο εργαστήριο αλλά καμία προσπάθεια δεν έχει γίνει μέχρι τώρα να χρησιμοποιηθούν σε έρευνες στο πεδίο.

2.1 Βιοσυσσώρευση.

Η κοινά αποκαλούμενη παρατήρηση μυδιών (mussel watch), η οποία ξεκίνησε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το 1976, ήταν ένα από τα πρώτα περιβαλλοντικά προγράμματα παρατήρησης, το οποίο χρησιμοποίησε ζώντες οργανισμούς σε μια εκτεταμένη γεωγραφική περιοχή (123, 124). Στην αρχή, η παρατήρηση μυδιών περιελάμβανε συντονισμένη, τυποποιημένη δειγματοληψία και μέτρηση των βαρέων μετάλλων, ραδιενεργών πυρήνων, αλογονανθράκων και υδρογονανθράκων πετρελαίου σε τέσσερα θαλάσσια είδη διθύρων (*Mytilus edulis*, *M. californicus*, *Crassostrea virginica* και *Ostrea equestris*) σε περισσότερα από 100 σημεία δειγματοληψίας κατά μήκος της ακτής της Βόρειας Αμερικής.

Σε αυτά τα πρώτα χρόνια ελέγχου συσσώρευσης με τη χρήση διθύρων, διάφορες τοπικές έρευνες πραγματοποιήθηκαν για να ερευνηθεί η δυναμική της απορρόφησης βαρέων μετάλλων από τους βιοδείκτες και για να αναλυθούν οι εποχιακές επιρροές των περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο Frazier (133, 134) παρατήρησε στις μελέτες του ότι οι συγκεντρώσεις μαγγανίου (Mn) και σιδήρου (Fe), αλλά όχι επίπεδα ψευδαργύρου (Zn) και χαλκού (Cu) στους μαλακούς ιστούς του στρειδιού *Crassostrea virginica* συσχετίζονταν με το ρυθμό εναπόθεση κοχυλιών στα ιζήματα. Οι συγκεντρώσεις των δύο τελευταίων βαρέων μετάλλων αυξήθηκαν βαθμιαία στους ιστούς κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του πρώιμου καλοκαιριού, και ακολουθήθηκαν από μια ραγδαία απώλεια κατά τη διάρκεια του τέλους του καλοκαιριού και του φθινοπώρου, εφόσον οι περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις στο θαλάσσιο νερό ήταν χαμηλές.

Εικόνα 19. Το στρείδι *Crassostrea virginica*.

Κάτω από περιβαλλοντικές καταστάσεις υψηλής έκθεσης σε βαρέα μέταλλα, ο Frazier εντόπισε αλματώδεις και εξαρτώμενες συγκεντρώσεις λαμβανόμενης δόσης σιδήρου (Fe), ψευδαργύρου (Zn) και χαλκού (Cu) κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και του φθινοπώρου και μια βραδεία συσσώρευση κατά την πρώιμη άνοιξη. Συγχρόνως, η δυνατότητα των δίθυρων του γλυκού νερού αναλύθηκε επίσης στις πρώτες έρευνες όπως από τον Anderson (135), ο οποίος πραγματοποίησε μια συγκριτική αξιολόγηση της συσσώρευσης βαρέων μετάλλων σε κελύφη και στους μαλακούς ιστούς έξι ειδών μαλακίων στον ποταμό Fox σε Illinois και Wisconsin.

Από το 1976, τα δίθυρα έχουν χρησιμοποιηθεί για να αξιολογήσουν τα επίπεδα μόλυνσης σε θαλάσσια οικοσυστήματα, και συγκεκριμένες συστηματικές ομάδες. Ειδικότερα τα μύδια και τα στρείδια, έχουν μελετηθεί εκτενώς παγκόσμια (136, 137). Το κύριο πλεονέκτημά τους είναι ότι τα επίπεδα μόλυνσης σε αυτούς τους οργανισμούς παρέχουν μια χρονικά ενοποιημένη μέτρηση της μολυσματικής βιοδιαθεσιμότητας του ρυπαντή, και αποκρίνονται ουσιαστικά σε εκείνο το μέρος του συνολικού περιβαλλοντικού φορτίου, το οποίο είναι άμεσης οικοτοξικολογικής σχετικότητας. Η βιοδιαθεσιμότητα και η λαμβανόμενη δόση μετάλλων και άλλων ρυπαντών εξαρτώνται ιδιαίτερα από τους χημικούς και βιολογικούς παράγοντες. Μεταξύ των βιολογικών παραγόντων, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη βιοσυσσώρευση ανάμεσα στα διάφορα είδη δίθυρων (137). Σε ένα ενιαίο είδος, η συσσώρευση μπορεί να είναι συνάρτηση της ηλικίας, του μεγέθους, του φύλου, του γονότυπου, της θρεπτικής και αναπαραγωγικής κατάστασης. Οι χημικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη βιοσυσσώρευση είναι ο οργανικός άνθρακας, σκληρότητα

του νερού, η θερμοκρασία, το pH, το διαλυμένο οξυγόνο, το μέγεθος της κόκκων των ιζημάτων και τα υδρολογικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα του συστήματος (138). Η ανάλυση ιστών επηρεάζεται από τα ιζήματα και τα κατάλοιπα της πεπτικής οδού κατά τη στιγμή συλλογής, έτσι ώστε ένας χρόνος απολύμανσης 24 έως 48 ωρών σε καθαρό νερό να είναι γενικά απαραίτητος. Εντούτοις, οι υπερβολικοί χρόνοι απαλλαγής από ρύπους μπορούν να προκαλέσουν τα ανακριβή αποτελέσματα λόγω μιας μερικής αποβολής των μολυσματικών παραγόντων από τους ιστούς σωμάτων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η απαλλαγή από ρυπαντές αρχίζει με μια γρήγορη αρχική εκκαθάριση του ρυπαντή, ο οποίος έπειτα απομακρύνεται με πολύ αργό ρυθμό έως ότου φθάσει σε ένα ορισμένο επίπεδο (139). Η λαμβανόμενη δόση και η συσσώρευση στους οργανισμούς εναπόθεσης (deposit-feeders) θα αναμενόταν να συσχετίζονται με τις συγκεντρώσεις των μολυσματικών παραγόντων στα ιζήματα, ενώ η συσσώρευση στους ηθμοφάγους οργανισμούς θα εξέφραζε πιθανότατα τις περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις στο νερό (137).

Τα μύδια (π.χ. *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californicus*), τα στρείδια (π.χ. *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis*) και οι αχιβάδες (π.χ. *Mercenaria mercenaria*, *Venerupis* spec., *Macoma balthica*) είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ομάδες δίθυρων στις μελέτες ελέγχου της συσσώρευσης, ενώ διαφορετικά από τα αναφερόμενα είδη χρησιμοποιούνται μόνο περιστασιακά εφόσον προσφέρουν συγκεκριμένα πλεονεκτήματα, όπως η υψηλή αφθονία (μεγάλος αριθμός πληθυσμού), ή εάν οι συνθήκες του φυσικού περιβάλλοντος, της υπό εξέταση περιοχής μελέτης είναι ακατάλληλες για τους καθιερωμένους βιοδείκτες. Συγκεκριμένα στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές διαφορετικά είδη διθύρων έχουν υιοθετηθεί ως δείκτες. Η συσσώρευση των μετάλλων στο *Donax trunculus* (μύδι το οποίο κατοικεί σε ιζήμα) αναλύθηκε από τον Fishelson και την ομάδα του (140) στη μεσογειακή ακτή του Ισραήλ, όπου *το Donax trunculus* φθάνει πυκνότητες της τάξεως των 2000 δειγμάτων στο τετραγωνικό μέτρο Οι ομάδα του Fishelson εντόπισε σε συγκεκριμένες περιοχές και σε συγκεκριμένες ηλικιακές ομάδες βιοδεικτών, συσσωρεύσεις καδμίου (Cd), μόλυβδου (Pb), χαλκού (Cu) και υδραργύρου (Hg). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Hg μετρήθηκαν κοντά μια μονάδα παραγωγής PVC ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd σε μια περιοχή η οποία μολυνόταν με πετρέλαιο και με απόβλητα από γειτονική πετροχημική βιομηχανία. Τα κατάλοιπα του Cd, του Cu και του Hg ήταν σχετικά υψηλά στα νεότερης ηλικίας και αισθητά λιγότερα στα μέσου μεγέθους δείγματα μυδιών.

Εικόνα 20. Το *Donax trunculus*.

Ο Gregory και οι συνεργάτες του (141) επιβεβαίωσαν τη δραστική βιοσυσσώρευση του Hg στη μελέτη τους με το μύδι *Perna perna*. Το ίδιο είδος μυδιών χρησιμοποιήθηκε επίσης από Avelar (142) ως δείκτης ρύπανσης από βαρέα μέταλλα στη Βραζιλία. Αν και ο κύριος στόχος αυτής της μελέτης ήταν η ανάλυση των εποχιακών διακυμάνσεων των συγκεντρώσεων του καδμίου (Cd), του χαλκού (Cu), του χρωμίου (Cr), του μόλυβδου (Pb) και του ψευδαργύρου (Zn) στα δίθυρα, οι μελετητές ανίχνευσαν υψηλότερες τιμές Cd (μέχρι 4,57 μg ανά g ξηρού βάρους), Cr (μέχρι 48,5 μg ανά g ξηρού βάρους) και Pb (μέχρι 60,0 μg ανά g ξηρού βάρους) έναντι άλλων μελετών βιοελέγχου τροπικών περιοχών. Τα αποτελέσματα παρουσίασαν επιπλέον μεγαλύτερο βαθμό συσσώρευσης μετάλλων κατά τη διάρκεια του Ιουλίου έναντι της άνοιξης και του φθινοπώρου. Ο Sarkar και η ομάδα του (143) πρότειναν δύο άλλα είδη δίθυρων, το *Crassostrea cucullata* και *το Anadara granosa* ως κατάλληλους βιοδείκτες για τη ρύπανση βαρέων μετάλλων στην Ινδία και άλλες ασιατικές χώρες. Από την άλλη μεριά ο Szefer (144) πρότεινε το μύδι *Mytella strigata* για τον ίδιο σκοπό στην Κεντρική και Νότια Αμερική.

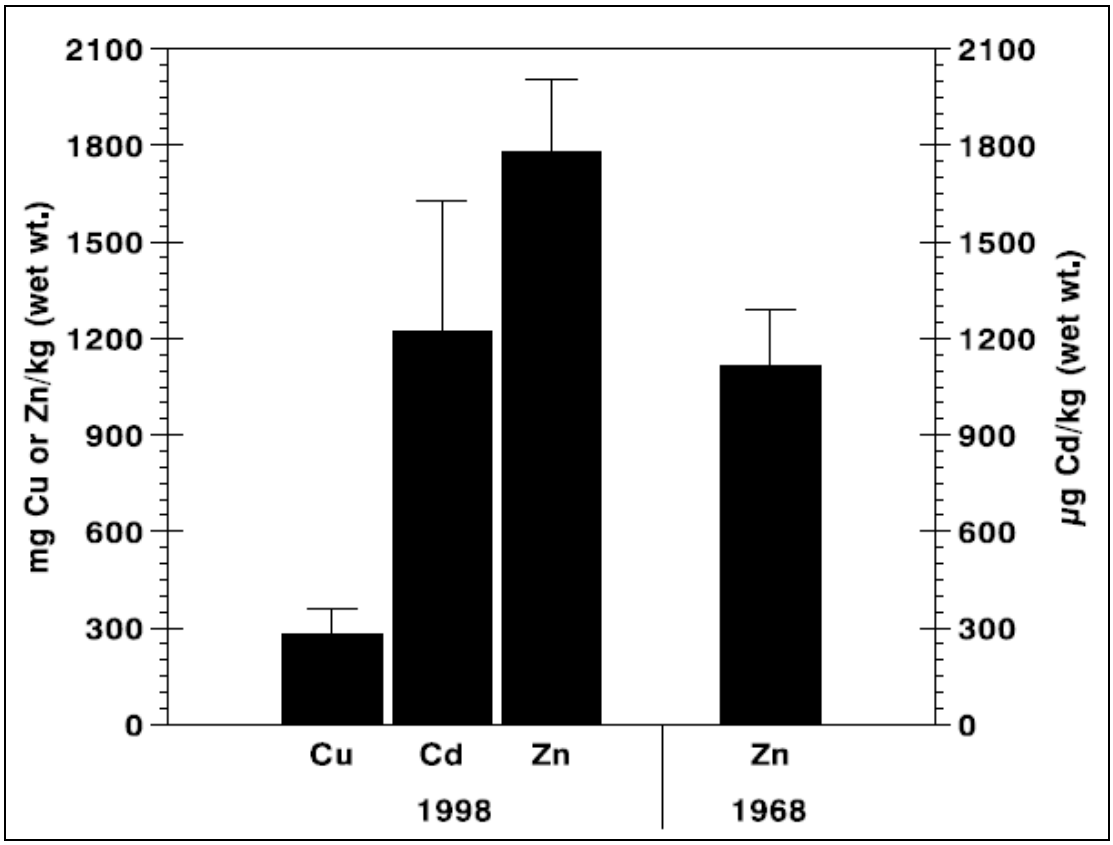
Εικόνα 21. Το μύδι *Perna perna*.

Γενικά όταν νέα είδη εισάγονται ως όργανα ελέγχου συσσώρευσης, το ερώτημα έγκειται στο συγκεκριμένο χρόνο μόλυνσης κατά τον οποίο οι συνολικές συγκεντρώσεις είναι κρίσιμες στα μαλάκια. Η παραπάνω ιδέα έχει ήδη μελετηθεί για καθιερωμένα όργανα ελέγχου, όπως για τα δίθυρα *Mytilus galloprovincialis* για παράδειγμα από τον Boisson (145) και τον Regoli, καθώς και από τον Orlando (146). Ο Boisson και η ομάδα του (145) εξέτασαν τη συσσώρευση μολύβδου από θαλασσινό νερό κατόπιν τεχνητής ρύπανσης με το συγκεκριμένο μέταλλο. Μια ισορροπία επιτεύχθηκε μετά από 21 μέρες. Η εξουδετέρωση του μόλυβδου (Pb) μετά από τη μεταφορά του στο καθαρό θαλάσσιο νερό είχε δύο φάσεις. Κατά την πρώτη φάση σημειώθηκε ραγδαία απώλεια μολύβδου (ημιζωή: 1,4 ± 0,3 ημέρες). Κατά τη δεύτερη φάση παρατηρήθηκε μια πολύ αργή έκκριση (ημιζωή: 2,5 ± 0,7 μήνες). Ο Regoli και ο Orlando (146) μετέφεραν *τα Mytilus galloprovincialis* από μια καθαρή περιοχή σε μια ρυπασμένη με βαρέα μέταλλα. Οι μελετητές διαπίστωσαν ότι οι συγκεντρώσεις των μετάλλων έφθασαν σε μια σταθερή κατάσταση έπειτα από μόνο δύο εβδομάδες, υποδεικνύοντας ότι τα μύδια μπορούσαν γρήγορα να φθάσουν σε ισορροπία με τα ενισχυμένα περιβαλλοντικά επίπεδα των εν λόγω ρυπαντών. Έπειτα από μεταφορά τους σε καθαρό το θαλασσινό νερό στο εργαστήριο, οι ερευνητές βρήκαν ένα συγκεκριμένο ποσοστό έκκρισης μολυσματικών παραγόντων, το οποίο είχε σαν αποτέλεσμα ποικίλους βιολογικούς χρόνους ημιζωής. Εξαιτίας της γρήγορης σχετικά λαμβανόμενης δόσης και των μεγάλων χρόνων ημιζωής απαλλαγής από ρύπους των διάφορων μετάλλων, η ικανότητα των μυδιών να σημειώνουν με ακρίβεια βραχυπρόθεσμες μεταβολές στις συγκεντρώσεις στοιχείων στα περιβάλλοντα ύδατα είναι περιορισμένη, γεγονός το οποίο πρέπει να ληφθεί υπόψη προκειμένου να καθοριστεί η κατάλληλη συχνότητα δειγματοληψίας για τα μύδια τα

οποία χρησιμοποιούνται σε προγράμματα βιοελέγχου. Πολύ λιγότερα είναι γνωστά όσον αφορά την κινητική των τοξικών των οργανικών μολυσματικών παραγόντων σε αυτά τα καλά καθορισμένα είδη ελέγχου και για τα διάφορα μη κλασσικά μύδια, τα οποία χρησιμοποιούνται παγκοσμίως ως υποκατάστατα.

Η αρχική ιδέα του προγράμματος παρατήρησης μυδιών, το οποίο κατά κύριο λόγο στόχευσε στην ολοκληρωμένη αξιολόγηση περιοχών με παράκτια θαλάσσια ρύπανση αναπτύχθηκε περαιτέρω στο παρελθόν. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ανάλυση των χρονικών κατευθύνσεων της μόλυνσης, αλλά και στη χρήση των μυδιών ως φρουρών έπειτα από περιστατικά ατυχημάτων με απελευθέρωση μεγαλύτερων ποσών ρύπων απ' ότι κανονικά. Ο Zatta και οι συνεργάτες του (147) πραγματοποίησαν μια έρευνα για τα βαρέα μέταλλα και για μόλυνση με αρσενικό (As) με χρήση *Mytilus galloprovincialis* στην λιμνοθάλασσα Venetian το 1988. Η σύγκριση με στοιχεία από μελέτες, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στην ίδια περιοχή αλλά μια δεκαετία νωρίτερα, αποκάλυψαν ότι ο βαθμός ρύπανσης από βαρέα μέταλλα στη λιμνοθάλασσα είχε βελτιωθεί. Οι έρευνες που δημοσιεύονται από τον Hung και την ομάδα του (148) δείχνουν ότι η μόλυνση χαλκού στα στρείδια του Ταϊβάν αυξήθηκε από το χρονικό διάστημα 1980–1985 (174 ± 71 μg ανά g ξηρού βάρους, n = 142) έως το 1986–1993 (513 ± 369 μg ανά g ξηρού βάρους, n = 188) με μια επακόλουθη πτώση την περίοδο 1994–1996 (214 ± 89 μg ανά g ξηρού βάρους, n = 207) και 1997/1998 (185 ± 110 μg ανά g ξηρού βάρους, n = 58). Ένα παράδειγμα για τη χρήση δύο διθύρων, *Crassostrea angulata* και *Scrobicularia plana*, ως φρουρών ελέγχου έκτασης μιας χημικής έκχυσης εξασφαλίστηκε από τον Blasco (149) μετά από το ατύχημα Aznalcollar στην Ισπανία. Τον Απρίλιο του 1998, η λεκάνη συγκράτησης του ορυχείου Aznalcollar εξερράγη με αποτέλεσμα τα αναχώματα της λεκάνης να καταρρεύσουν και 5 εκατομμύρια m^2 λάσπης κατεργασμένων αποβλήτων να χυθούν στον παρακείμενο ποταμό Guadiamar (= παραπόταμος του ποταμού Guadalquivir). Ώρες αργότερα του ατυχήματος, περίπου 2,5 Hm^2 όξινου ύδατος με υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων, ειδικά ψευδαργύρου Zn, είχε εισαχθεί στον ποταμό. Στα πλαίσια του βιοελεγκτικού προγράμματος αξιολόγησης του αντίκτυπου αυτής της εκχείλισης στην πανίδα των δύο ποταμών και της εκβολής του Guadalquivir (δέλτα του ποταμού Guadalquivir), διάφορα υδρόβια είδη, συμπεριλαμβανομένων δύο μαλακίων, αναλύθηκαν για συσσώρευση μετάλλων. Στο στρείδι *Crassostrea angulata*, οι συγκεντρώσεις Cd και Cu ήταν πολύ μεγαλύτερες από τα ανθρώπινα όρια κατανάλωσης για οστρακόδερμα. Μια αύξηση του επιπέδου

ψευδαργύρου (Zn) παρατηρήθηκε, δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις Zn στο *C. angulata* ήταν υψηλότερες από εκείνες οι οποίες είχαν αναφερθεί 30 χρόνια πριν (*Γραφική Παράσταση 2*).



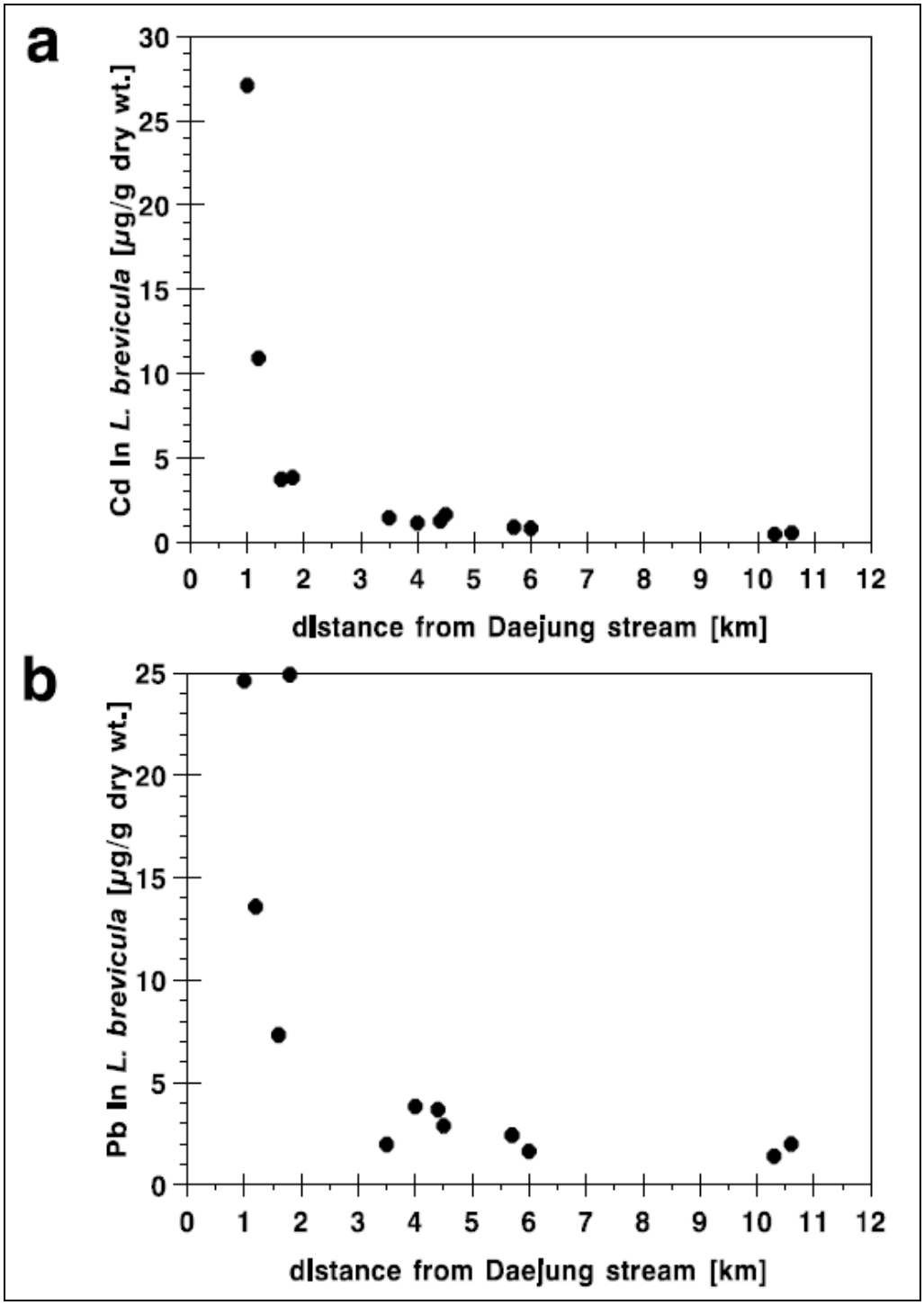
Γραφική Παράσταση 2. Συγκεντρώσεις χαλκού (Cu), καδμίου (Cd) και ψευδαργύρου (Zn) (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) στους μαλακούς ιστούς του στρειδιού *Crassostrea angulata* στο δέλτα του ποταμού Guadalquivir της Ισπανίας, από τον Απρίλιο έως τον Σεπτέμβριο του 1998 μετά το ατύχημα του Aznalcollar το 1998 συγκρινόμενες με τα υπολείμματα τα οποία μετρήθηκαν σε στρείδια από τον ίδιο σταθμό το 1968.

Οι έρευνες παρακολούθησης μυδιών πραγματοποιήθηκαν επίσης με ιδιαίτερη έμφαση σε οργανικούς μολυσματικούς παράγοντες, κυρίως σε PCBs, στο DDT και στο πετρέλαιο (150, 151, 152). Σε μια χρονική περίοδο 15 ετών, από το 1977–1992, συλλέχθηκαν μύδια σε 378 σταθμούς στην Καλιφόρνια. Από αυτούς τους σταθμούς, επιλέχτηκαν 47 για να καθοδηγήσουν τις στατιστικές αναλύσεις βασισμένες στα κριτήρια επιλογής τουλάχιστον έξι φορών για το συνολικό DDT, τα συνολικά PCBs,

και τα συνολικά ισχυρά παρασιτοκτόνα (chlordanes). Ελάττωση του συνολικού DDT και ισχυρών παρασιτοκτόνων σημειώθηκαν περίπου στους μισούς από τους σταθμούς (151). Ο Villeneuve (152) ανέφερε για το μεσογειακό πρόγραμμα παρακολούθησης μυδιών ότι τα υπολείμματα DDT και PCBs μειώθηκαν περισσότερο από 80% μεταξύ 1973 και 1989 στα μύδια. Αυτή η μείωση είναι σύμφωνη με την απαγόρευση του DDT η οποία εφαρμόστηκε το 1975 στη δυτική Ευρώπη και τη βαθμιαία διακοπή παραγωγής των PCBs κατά τη δεκαετία του '70 και τη δεκαετία του '80. Εντούτοις, τα υπολείμματα αυτών των ενώσεων τα οποία μετρούνται στα μύδια επιβεβαιώνουν τη γνωστή μακροχρόνια επιμονή του DDT και των PCBs, τα οποία είναι ακόμα παρόντα σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις σε μερικές περιοχές.

Σε πολλές περιοχές, τα θαλάσσια γαστερόποδα έχουν θεωρηθεί ως πρόσθετα όργανα ελέγχου συσσώρευσης, μετασχηματίζοντας το αρχικό "mussel watch" σε "mollusk watch". Ίσως η πιο εκτενής συγκριτική έρευνα διεξήχθη από τον Hung και την ομάδα του (148), ο οποίος ανέλυσε την ιχνηλασιμότητα των διαφορών της συσσώρευσης μετάλλων σε 30 είδη μαλακίων στα παράκτια ύδατα της Ταϊβάν. Ο Hung και η ομάδα του έδειξαν ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του Cu, του Zn, του Cd, του Pb και του Cr μετρήθηκαν στα είδη γαστερόποδων, ενώ τα δίθυρα ήταν καλύτεροι συσσωρευτές του Ni, του As και του κασσίτερου (Sn). Ο Szefer και οι συνεργάτες του (153) σύγκριναν τη συσσώρευση μετάλλων σε τέσσερα είδη μαλακίων, στα δίθυρα *Ostrea cucullata* και *Pitar* spec., στο γαστερόποδο *Turbo coronatus* και στο πολυπλακοφόρο *Acanthopleura haddoni* στον κόλπο Aden και εκτίμησαν τα δύο τελευταία είδη ως κατάλληλους βιοδείκτες.

Η χρήση των θαλάσσιων γαστερόποδων ως όργανα ελέγχου συσσώρευσης για τα βαρέα μέταλλα αναθεωρήθηκε από τον Bryan και την ομάδα του (154, 155, 156). Ειδικά η εδώδιμη λιττορίνη (γαστερόποδο), *Littorina littorea*, έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της ρύπανσης ιχνών μετάλλων και στις δύο πλευρές του Ατλαντικού ωκεανού όπως επίσης και άλλα είδη από της ίδιας οικογένειας σε άλλες περιοχές του κόσμου (π.χ. *Littorina brevicula* από τον Kang, (157, 158)) (Βλέπε σύγκριση στην *Γραφική Παράσταση 3*). Ο Campanella και οι συνεργάτες του (159) πρότειναν τα δύο άλλα θαλάσσια γαστερόποδα, το *Monodonta turbinata* και το *Patella caerulea*, ως παγκόσμιους βιοδείκτες. Επιπλέον, τα θαλάσσια σαλιγκάρια χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς ως βιοσυσσωρευτές των οργανικών μολυσματικών παραγόντων στο παρελθόν (160,161).



Γραφική Παράσταση 3. Μείωση του Cd (a) και των συγκεντρώσεων Pb (b) στους ιστούς του *Littorina brevicula* συναρτήσει της απόστασης από την είσοδο του ιδιαίτερα μολυσμένου ρεύματος Daejung στο νοτιοανατολικό σημείο της Κορέας (τιμές από τον Kang και την ομάδα του (157)).

Τα μαλάκια του γλυκού νερού επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά ως βιοσυσσωρευτικοί οργανισμοί. Δύο σημαντικά πλεονεκτήματα των σαλιγκαριών και των δίθυρων πέρα από τους περισσότερους άλλους οργανισμούς του γλυκού νερού, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε παρόμοιες έρευνες είναι το μεγάλο μέγεθος και η περιορισμένη κινητικότητά τους. Επιπλέον, είναι άφθονοι σε πολλά είδη περιβάλλοντος γλυκού νερού και είναι σχετικά εύκολο να συλλεχθούν και να προσδιοριστούν. Σε συγκεντρώσεις μετάλλων και οργανικών ρυπαντών που έχουν κοινά εύρη με αυτά των φυσικών υδάτων, είναι γενικά αποτελεσματικοί βιοσυσσωρευτές. Οι μελέτες βιοελέγχου με μαλάκια του γλυκού νερού έχουν καλύψει μια ευρεία ποικιλομορφία ειδών, μολυσματικών παραγόντων, και ειδών περιβάλλοντος. Η κύρια γενίκευση η οποία μπορεί να προέλθει από αυτήν την έρευνα είναι ότι η βιοσυσσώρευση και η τοξικότητα είναι καταστάσεις εξαιρετικά εξαρτώμενες, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να εξαχθούν αποτελέσματα από οποιαδήποτε ιδιαίτερη μελέτη άλλων καταστάσεων όπου τα βιολογικά είδη ή οι περιβαλλοντικές συνθήκες διαφέρουν. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, οι παράγοντες βιοσυγκέντρωσης μπορούν να βρίσκονται μεταξύ 10^3 και 10^6, όσον αφορά το νερό. Οι περισσότερες μελέτες οι οποίες παρέχουν συγκρίσεις μεταξύ των ταξινομικών ομάδων δείχνουν ότι η βιοσυσσώρευση στα μαλάκια είναι μεγαλύτερη από αυτή στα ψάρια (138).

Ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη συσσώρευσης – δίθυρα του γλυκού νερού είναι το zebra μύδι *Dreissena polymorpha*, το οποίο μπορεί εύκολα να περιοριστεί και να τοποθετηθεί σε διάφορες περιοχές μέσα σε ποτάμια, που διευκολύνοντας το χωρικό και χρονικό έλεγχο της μολυσματικής έκθεσης (162). Επίσης για τον ίδιο σκοπό έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα δίθυρα του γλυκού νερού (163), γαστερόποδα προσωβράγχια (prosobranch), όπως *το Bithynia tentaculata*, και γαστερόποδα της τάξης pulmonata όπως *το Physa gyrina* και *το Biomphalaria glabrata* (164, 165). Στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες τα βαρέα μέταλλα ήταν στο κέντρο ενδιαφέροντος, αλλά υπάρχουν επίσης παραδείγματα προσεγγίσεων βιοελέγχου για ραδιενεργούς πυρήνες, οργανομεταλλικές ενώσεις όπως ο μεθυλικός υδράργυρος και οργανικούς ρυπαντές (166, 167).

Εικόνα 22. Το zebra μύδι *Dreissena polymorpha*.

Τα δίθυρα μαλάκια διαδραματίζουν επίσης έναν σημαντικό ρόλο στα περιβαλλοντικά αντιπροσωπευτικά δείγματα τραπεζών (ESB, Environmental Specimen Banking) των προγραμμάτων σε διάφορες χώρες, όπως π.χ. το zebra μύδι (zebra mussel) *Dreissena polymorpha* για το γλυκό νερό και το μπλε μύδι (blue mussel) *Mytilus edulis* για τα θαλάσσια οικοσυστήματα στην γερμανική ESB (168). Οι ESB επιτρέπουν όχι μόνο τον έλεγχο των τρεχόντων επιπέδων των μολυσματικών παραγόντων στα διάφορα οικοσυστήματα αλλά προσφέρουν επιπλέον τη δυνατότητα για μια αναδρομική ανίχνευση των ρύπων στα αποθηκευμένα δείγματα δεδομένης της περίπτωσης ότι μια ορισμένη ένωση μπορεί να προσδιοριστεί ως απειλή για το περιβάλλον στο μέλλον (169, 170).

Αν και ο έλεγχος της βιοσυσσώρευσης με τα υδρόβια μαλάκια μπορεί να παρέχει ουσιαστική γνώση σχετικά με την έκθεση και τη βιολογική διαθεσιμότητα των ενώσεων στα θαλάσσια και γλυκού νερού οικοσυστήματα, δεν επιτρέπει προβλέψεις για άντληση βιολογικών αποτελεσμάτων από αυτές τις ουσίες στα άτομα ή τους πληθυσμούς. Αυτό το ζήτημα έχει προσδιοριστεί ως σημαντικός περιορισμός στις εθνικές ESB και στα προγράμματα παρακολούθησης μυδιών. Αυτήν την περίοδο, γίνονται διάφορες προσπάθειες για να εξεταστούν επίσης τα βιολογικά αποτελέσματα σε αυτά τα προγράμματα, όπως προτείνεται από τον Klein (168) για το γερμανικά ESB και από τον Goldberg και τον Bertine (171) για την παρακολούθηση των μυδιών.

3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα χρήσης μυδιών ως βιοδεικτών.

Τα μύδια έχουν διάφορα σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων υδρόβιων οργανισμών, τα οποία αποδεικνύουν τη χρησιμότητά τους (172, 173, 174):

- Αν και ο διαδοχικός χειρισμός των οργανισμών έχει φανερώσει μια αρνητική επίπτωση στη ανάπτυξη των δίθυρων (175), οι περιστάσεις οι οποίες προκαλούν άγχος όπως είναι η διακίνηση και η συσσώρευση της πίεσης είναι λιγότερο σημαντικές στα δίθυρα ενώ μπορούν να είναι μια σοβαρή πηγή πίεσης σε άλλους υδρόβιους οργανισμούς. Ένα πρόσθετο όφελος είναι η χρήση μικρότερων κλουβιών από τη στιγμή που οι απαιτήσεις χώρου για διαβίωση των μυδιών είναι ελάχιστες.
- Το μύδια είναι σχετικά ανθεκτικά στη ρύπανση, αν και αυτό το χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι προφανώς εξαρτώμενο ανά είδος. Οι συνηθέστεροι έλεγχοι οι οποίοι χρησιμοποιούνται για μελέτες βιοελέγχου αλμυρού αλλά και γλυκού νερού εμφανίζουν μια σχετικά υψηλή ανοχή στη ρύπανση, χωρίς αυτό να σημαίνει απαραίτητα ότι τα μύδια είναι ευαίσθητα σε αυτήν.
- Σαν ηθμοφάγοι οργανισμοί, τα μύδια εκτίθενται στο νερό, στην τροφή, και στα αιωρούμενα σωματίδια. Και τα τρία μαζί είναι οι πιο πιθανές πηγές ρύπανσης. Αυτό εξασφαλίζει ένα ολοκληρωμένο μέτρο της έκθεσης σε ρύπανση, το οποίο συνήθως δε λαμβάνει χώρα σε άλλα είδη ελέγχων. Ο Roditi και οι συνεργάτες του (183) έδειξαν ότι τα zebra μύδια συσσώρευσαν διαμέσου της τροφής έναν μέσο όρο, 77% αργύρου (Ag), 78% ολικού καδμίου (Cd) και 65% ολικού υδραργύρου (Hg), δίνοντας έμφαση με αυτόν τον τρόπο στη σημασία των διαφορετικών διόδων της έκθεσης στους ελέγχους τοξικότητας (182).
- Τα μύδια παρουσιάζουν υψηλό δυναμικό βιοσυσσώρευσης και χαμηλό δυναμικό βιολογικής μεταβολής / βιομετασχηματισμού στους οργανικούς αλλά και ανόργανους μολυσματικούς παράγοντες. Αυτό στην πράξη σημαίνει πως σε κατάσταση ύπαρξης μικρομολυσματικών παραγόντων τα μύδια θα έχουν μικρό βιομετασχηματισμό και έτσι θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως

μακροπρόθεσμοι βιοσυσσωρευτές. Αυτό το πλεονέκτημα μπορεί να επεξηγηθεί από την σύμφωνη βιοσυσσώρευση ανάμεσα στα μύδια και τις συσκευές ημιπερατών μεμβρανών (SPMDs, SemiPermeable Membrane Devices) στα γλυκά νερά (176) αλλά και στα θαλάσσια είδη περιβάλλοντος (177).

- Τα μύδια του θαλασσινού νερού είναι στατικοί οργανισμοί και συχνά πολύ εύκολα μπορούν να συλλεχθούν. Συνήθως, είναι προσαρτημένα στα βραχώδη ή ξύλινα υποστρώματα σε υψηλές πυκνότητες, το οποίο καθιστά εύκολη τη συλλογή μεγάλου αριθμού οργανισμών από την ίδια θέση αναφοράς σε μια ορισμένη περίοδο έτους. Τα μύδια του γλυκού νερού, εκτός από *το D. polymorpha*, δεν μοιράζονται αυτό το πλεονέκτημα.

Εντούτοις, υπάρχουν διάφορα αρνητικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα που συνδέονται με τη χρήση των μυδιών ως βιοδεικτών:

- Η αναπαραγωγή ως οικοτοξικολογικό σημείο αναφοράς της πολύ υψηλής οικολογικής σχετικότητας είναι σχετικά δύσκολο να μετρηθεί στα μύδια και εξαρτάται ιδιαίτερα από την εποχικότητα (178). Η προσρόφηση 10 – 5 M σεροτονίνης από το *D. polymorpha* εντούτοις, μπορεί τεχνητά να υποκινήσει τα μύδια για να ωοτοκήσουν (179, 180), γεγονός το οποίο δημιουργεί ένα βιώσιμο σημείο αναφοράς στον έλεγχο τοξικότητας.
- Δεν υπάρχει κανένας σαφής πληθυσμός αναφοράς, σε αντίθεση με άλλους υδρόβιους οργανισμούς (όπως *π.χ.* τα daphnids) στους οποίους έχουν σαφώς καθοριστεί οι αποκρίσεις σε καταστάσεις καμίας μορφής πίεσης ή σε καταστάσεις εργαστηριακού ελέγχου. Αυτό μπορεί να δημιουργήσει συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών και σχετικά δύσκολων μελετών όταν ληφθούν μύδια μεταμόσχευσης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές συλλογής δεδομένου ότι συνήθως υπάρχουν ίχνη ή και καθόλου πληροφορίες σχετικά με την ιστορία των οργανισμών.
- Τα μύδια εμφανίζουν απουσία ή σχετικά χαμηλή δυνατότητα βιολογικής μεταβολής / βιομετασχηματισμού των οργανικών μολυσματικών παραγόντων. Αν και αυτό το χαρακτηριστικό γνώρισμα μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως ένα πλεονέκτημα (βλέπε παραπάνω), η έλλειψη ενζύμων βιολογικής μεταβολής περιορίζει τη χρήση ορισμένων βιοδεικτών ως γρήγορων και ευαίσθητων σημείων αναφοράς της μολυσματικής έκθεσης (181).

ΙΧΘΥΕΣ

1. Τα Ψάρια ως Βιοδείκτες.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 150 ετών, τα υδρόβια συστήματα παγκοσμίως έχουν δεχθεί σειρά επιδράσεων από ανθρωπογενείς παράγοντες (184, 185, 186). Οι ανθρώπινες δραστηριότητες μπορούν να αλλάξουν τις φυσικές, χημικές ή βιολογικές διαδικασίες οι οποίες συνδέονται με τους υδάτινους πόρους και να τροποποιήσουν έτσι την εσωτερική βιολογική κοινότητα. Ο Karr (187) προσδιόρισε πέντε βασικές κατηγορίες περιβαλλοντικών παραγόντων οι οποίοι, όταν επηρεάζονται από τις ανθρώπινες δραστηριότητες συντελούν στην υποβάθμιση οικοσυστήματος:

- Πηγή τροφής / ενέργειας: π.χ. τύπος, ποσό, και μέγεθος μορίων του οργανικού περιεχομένου και εποχιακό σχέδιο διαθέσιμης ενέργειας.
- Ποιότητα νερού: π.χ. διαλυμένο οξυγόνο, θρεπτικές ουσίες, τοξικές ουσίες.
- Δομή βιότοπων: π.χ. τύπος υποστρωμάτων, ελίκωση, μορφολογία καναλιών, πτυχές σύνδεσης.
- Καθεστώς ροής: π.χ. χρονική διανομή των πλημμυρών και των χαμηλών ροών.
- Βιοτικές αλληλεπιδράσεις: π.χ. ανταγωνισμός, παρασιτισμός.

Στις περισσότερες περιπτώσεις οι βιολογικές κοινότητες είναι έγκυροι και ακριβείς δείκτες της κατάστασης του υδρόβιου συστήματος δεδομένου ότι υπόκεινται στην πλήρη σειρά των χημικών και φυσικών επιρροών, των πρόσθετων και συνεργιστικών αποτελεσμάτων. Σε αυτό το πλαίσιο τα ψάρια διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο ως βιοδείκτες στη διαχείριση των υδάτινων πόρων και την εφαρμοσμένη λιμνολογική έρευνα: τα ψάρια χρησιμεύουν ως "οικολογικοί δείκτες", "θεμέλιοι λίθοι", "ομπρέλες", "ναυαρχίδες" (188).

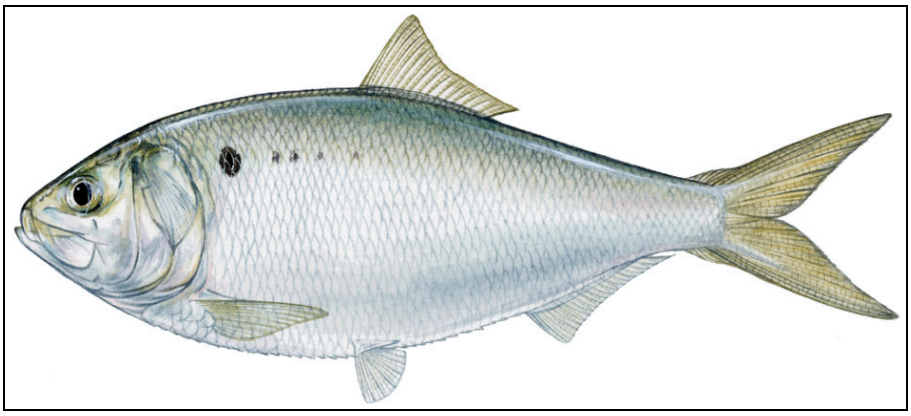
Σύμφωνα με τον Markert (189) ένας βιοδείκτης είναι ένας οργανισμός (ή ένα μέρος ενός οργανισμού ή κοινότητα των οργανισμών) ο οποίος περιέχει πληροφορίες για την ποιότητα του περιβάλλοντος. Κατά συνέπεια, η χρήση των βιοδεικτών πρέπει να βοηθήσει στην περιγραφή του φυσικού περιβάλλοντος, να ανιχνεύσει και να αξιολογήσει τις ανθρώπινες επιδράσεις και να αξιολογήσει τα μέτρα αποκατάστασης

ή επανόρθωσης. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις τα ψάρια χρησιμοποιούνται εντατικά για λόγους ένδειξης.

Οι χωρικές αλλαγές των κοινοτήτων των ψαριών κατά μήκος της πορείας των ποτάμιων συστημάτων και η χρήση των σχεδίων καταμερισμού των ψαριών για την ταξινόμηση ποταμών, είναι μερικά παραδείγματα των παραδοσιακότερων προσεγγίσεων βιοένδειξης (190, 191, 192). Τα ψάρια επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για την ταξινόμηση των διαφορετικών τύπων λιμναζόντων υδάτων. Η φύση της πανίδας στους οργανισμούς οι οποίοι διαμένουν σε λιμνάζοντα ύδατα απεικονίζει τη μορφομετρία, την τροφική θέση, τη θερμική στρωματοποίηση, τη στρωματοποίηση του οξυγόνου και την έκταση της παράκτιας ανάπτυξης.

Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τους οποίους τα ψάρια χρησιμοποιούνται ευρέως για να περιγράψουν τα φυσικά χαρακτηριστικά των υδρόβιων συστημάτων και για να αξιολογήσουν τις αλλαγές βιοτόπων (118, 193, 194, 195, 196, 197):

- Μια μακρόχρονη παράδοση οικολογικής, φυσιολογικής και οικοτοξικολογικής έρευνας πάνω στα ψάρια έχει οδηγήσει σε μια προηγμένη γνώση των οικολογικών απαιτήσεων ενός μεγάλου αριθμού ειδών ψαριών. Η αποτελεσματικότητα των προσεγγίσεων βιοένδειξης εξαρτάται από την καλή γνώση των οικολογικών απαιτήσεων και της φυσιολογίας των δεικτών (198).
- Ένας μεγάλος αριθμός αβιοτικών περιβαλλοντικών μεταβλητών στις διαφορετικές χωροχρονικές κλίμακες συνδέεται με τις σύνθετες απαιτήσεις των ιδιαίτερων ειδών των βιότοπων και των οντογενετικών σταδίων τους. Εξαιτίας των συγκεκριμένων απαιτήσεων των σταθερών και μη βιοτόπων κατά τη διάρκεια των λαρβικών (larval) και νεανικών σταδίων, 0+ ψάρια για παράδειγμα είναι κατάλληλοι δείκτες της οικολογικής κατάστασης των ποτάμιων ποταμών (199, 200).
- Δεδομένου ότι οι μεταναστευτικοί οργανισμοί αλιεύουν, είναι κατάλληλοι δείκτες της σύνδεσης ή του διαχωρισμού βιοτόπων (201, 202). Οι Waidbacher και Haidvogl (203) επισήμαναν ότι ψάρια, μέλη των οικογενειών Clupeidae (*Alosa pontica, Alosa caspia nordmanni*) και Acipenseridae (*Huso huso, Acipenser gueldenstaedti, Acipenser stellatus*) μεταναστεύουν σε αποστάσεις μεγαλύτερες των 300 χιλιομέτρων στο ποτάμιο σύστημα του Δούναβη. Είδη σχετικά με τα παραπάνω είναι το ιδιαίτερα άφθονο μπαρμπούνι *Barbus barbus* και το *Chondrostoma nasus* τα οποία μεταναστεύουν διανύοντας αποστάσεις περισσότερων των 50 χιλιομέτρων.



Εικόνα 23. Ψάρι μέλος της οικογένειας *Clupeidae*.

Εικόνα 24. Ψάρι μέλος της οικογένειας *Acipenseridae*.

- Λόγω του μεγέθους των ψαριών (και των οργάνων τους) μια μεγάλη ποικιλία αναλυτικών διαδικασιών μπορεί να πραγματοποιηθεί. Τα παθολογικά αποτελέσματα τα οποία αφορούν τα ψάρια επεξηγούν τα αποτελέσματα της ρύπανσης των υδάτων στην επιστημονική κοινότητα, στη διαχείριση ύδατος και στο κοινό. Μερικές μέθοδοι, όπως οι αιματολογικές και ιστοπαθολογικές προσεγγίσεις, λαμβάνονται από την ανθρώπινη ιατρική.
- Λόγω της μακροζωίας των ψαριών αυξάνονται ορισμένα αποτελέσματα ένδειξης όπως π.χ. διαδικασίες συσσώρευσης.
- Δεδομένου ότι τα ψάρια είναι καταναλωτές πρώτης και δεύτερης τάξης, απεικονίζουν τις τροφικές παραμέτρους των υδρόβιων συστημάτων σε διαφορετικά επίπεδα.
- Η αναδημιουργία των παλιών κοινοτήτων αναφοράς είναι εφικτή, εξαιτίας της ύπαρξης ιστορικών πληροφοριών (204).

- Η επαγγελματική και η ιδιωτική αλιεία έχουν μια μακροχρόνια ιστορία, στην οποία τα ψάρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως δείκτες της ποιότητας νερού. Λόγω της χρήσης των ψαριών από τον άνθρωπο σαν πηγή τροφής, η κατάσταση των κοινοτήτων των ψαριών είναι ένας σημαντικός παράγοντας διαχείρισης υδάτινων πόρων.
- Ανάλογα με το πρόβλημα και την επιλεγόμενη προσέγγιση ένδειξης, η βιοένδειξη επιτυγχάνεται με τη χρήση των ψαριών καλύπτοντας τις απαιτήσεις των μεθόδων από πάνω προς τα κάτω (αλλαγές αξιολόγησης στις κοινότητες του φυσικού περιβάλλοντος και έλεγχος των πηγών και των αιτιών των πιθανών προβλημάτων) και των αποτιμήσεων από κάτω προς τα πάνω (χρησιμοποίηση εργαστηριακών στοιχείων για μοντελοποίηση των αλλαγών στα πιο σύνθετα φυσικά οικοσυστήματα).
- Ο αριθμός ειδών είναι σχετικά μικρός και τα είδη είναι ήδη προσδιορισμένα στον πεδίο.

Κατά τη χρησιμοποίηση των ψαριών σαν βιοδείκτες τα εξής προβλήματα μπορούν να προκύψουν:

- Η αλιεία από μόνη της προκαλεί αλλαγές, όπως μεταφορά ειδών, εκτροφή, υπερβολική αλιεία, γεγονός το οποίο καθιστά δυσκολότερο να συζητηθούν άλλες ανθρωπογενείς υποβαθμίσεις των υδρόβιων οικοσυστημάτων.
- Η κινητικότητα πολλών ειδών καθιστά ιδιαίτερα δύσκολο τον προσδιορισμό όχι μόνο της ακριβής πηγής ρύπανσης, αλλά και του χρόνου και της διάρκειας της έκθεσης.

Η βιοένδειξη η οποία βασίζεται στη χρήση των ψαριών, ικανοποιεί γενικά πολλά από τα κριτήρια άλλων προγραμμάτων βιολογικού ελέγχου (205, 193, 206, 207, 208, 209):

- Ευαισθησία στους παράγοντες πίεσης: Το εύρος των αποκρίσεων θα πρέπει να είναι κατάλληλο για την προοριζόμενη εφαρμογή. Οι παράγοντες της διαφορετικής ισχύος / σταθερότητας θα πρέπει να οδηγήσουν σε αντιδράσεις διαφορετικής έντασης (ανεπιθύμητη η απουσία αποκρίσεων αλλά και εμφάνιση όλων των γνωστών αποκρίσεων, καμία ακραία φυσική μεταβλητότητα).
- Το εύρος της απόκρισης πρέπει να είναι ευάλωτο στους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τις συνθήκες οι οποίες παρατηρούνται.

- Οι μέθοδοι πρέπει να εφαρμόζονται ευρέως σε ένα ευρύ φάσμα παραγόντων πίεσης και περιοχών.
- Τα αποτελέσματα τα οποία επιτυγχάνονται από τα προγράμματα βιοένδειξης θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικά πολλών περιοχών των υδρόβιων κοινοτήτων.
- Οι πληροφορίες θα πρέπει να παρασχεθούν αρκετά γρήγορα ώστε να αρχίσει η αποτελεσματική διοικητική δράση προτού εμφανιστεί η ανεπιθύμητη ζημία.
- Οι τυποποιημένες μέθοδοι είναι απαραίτητες για την επίτευξη συγκρίσιμων αποτελεσμάτων.
- Οι βιοδείκτες θα πρέπει να είναι οικονομικά αποδοτικοί κατά τη συλλογή τους και την επεξεργασία τους.
- Η εφαρμογή των βιοδεικτών θα πρέπει να είναι δυνατή σε τοπική κλίμακα καθώς επίσης και σε περιφερειακή ή χωροταξική κλίμακα.
- Οι βιοδείκτες θα πρέπει να τουλάχιστον να ανήκουν σε έναν από τους ακόλουθους τρεις σημαντικούς τύπους (193):
    - Δείκτες συμμόρφωσης, οι οποίοι επιλέγονται για να αξιολογήσουν την επίτευξη και τη συντήρηση αντικειμένων του οικοσυστήματος σχετικών με την αποκατάσταση και τη συντήρηση της περιβαλλοντικής ποιότητας.
    - Διαγνωστικοί δείκτες, οι οποίοι παρέχουν τη διορατικότητα στην αιτία της μη συμμόρφωσης.
    - Δείκτες έγκαιρης προειδοποίησης, οι οποίοι επιτρέπουν στις διοικητικές δράσεις να εφαρμόζονται προτού οι συνθήκες επιδεινωθούν σε τέτοιο σημείο ώστε οι δείκτες συμμόρφωσης να γίνονται σχετικοί.

Σε πολλά προγράμματα βιοένδειξης τα ψάρια καλύπτουν τις απαιτήσεις και των τριών αυτών τύπων.

2. Ακριβής Αποτίμηση Περιβαλλοντικής Υγείας.

- Οι πληθυσμοί των ψαριών καθώς και τα μεμονωμένα άτομα γενικά παραμένουν στην ίδια περιοχή κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού.

- Οι κοινότητες είναι σταθερές και ανακάμπτουν γρήγορα από φυσικές διαταράξεις.
- Συγκρίσιμα αποτελέσματα προκύπτουν από αδιατάρακτες τοποθεσίες ανά διάφορες χρονικές στιγμές.
- Τα ψάρια έχουν μεγάλες διακυμάνσεις και επηρεάζονται λιγότερο από φυσικές μικροπεριβαλλοντικές διαφορές σε σχέση με άλλους μικρότερους οργανισμούς. Αυτό κάνει τα ψάρια εξαιρετικά χρήσιμα στην εκτίμηση τοπικών και μακροπεριβαλλοντικών αλλαγών.
- Τα περισσότερα είδη ψαριών έχουν μεγάλη περίοδο ζωής (2 – 10+ χρόνια) και μπορούν να εκφράσουν την ποιότητα του νερού για μεγάλες χρονικά αλλά και τρέχουσες χρονικές περιόδους.
- Τα ψάρια ζουν λαμβάνοντας συνεχώς νερό και ενοποιούν την χημική, φυσική και βιολογική ιστορική ταυτότητα του νερού.
- Τα ψάρια αντιπροσωπεύουν μια κοινωνία, με ευρύ φάσμα ανοχής εκδηλώνοντας είτε μεγάλη ευαισθησία είτε μεγάλη αντοχή. Η κοινωνία αυτή αντιδρά στην χημική, φυσική και βιολογική υποβάθμιση με χαρακτηριστικά μοτίβα αντίδρασης.
- Τα ψάρια είναι πολύ αναγνωρίσιμες και πολύτιμες συνιστώσες της υδρόβιας ζωής για το κοινό.
- Η χρησιμότητα και γενικά η ρύθμιση της υδρόβιας ζωής χαρακτηρίζεται σε σχέση με τα ψάρια.

3. Ευκολία Χρήσης και Εξαγωγή Συμπερασμάτων.

- Η συχνότητα λήψης δειγμάτων για μια γενική αποτίμηση είναι μικρότερη σε σχέση με οργανισμούς που ζουν μικρότερη διάρκεια.
- Η ταξινόμηση των ψαριών είναι πολύ καλά αποδεδειγμένη, δίνοντας τη δυνατότητα σε επαγγελματίες βιολόγους να ελαττώσουν το χρόνο ανάλυσης στα εργαστήρια με το να προσδιορίζουν πολλά δείγματα με μεγάλη ακρίβεια στο πεδίο.

- Η κατανομή, η ιστορική μελέτη πληθυσμών καθώς και η ανοχή σε περιβαλλοντικό στρες πολλών ειδών ψαριών της βόρειας Αμερικής είναι καταγεγραμμένα στην βιβλιογραφία.

4. Τα ψάρια ως δείκτες περιβαλλοντικής ρύπανσης.

Παρά τις αυξανόμενες προσπάθειες πολλών βιομηχανοποιημένων χωρών να μειώσουν τα τοξικά διαλυμάτων από τις εξατμίσεις βιομηχανικών και μηχανοκίνητων οχημάτων και να καθαρίσουν τα βιομηχανικά και κοινοτικά υγρά απόβλητα, τα οικοσυστήματά μας περιέχουν ακόμα επιβλαβείς συγκεντρώσεις αυξανόμενου αριθμού χημικών ουσιών. Συσσωρεύονται στο χώμα και τα ιζήματα μέσα στα οποία μπορούν να ακινητοποιηθούν μέσω της αλλαγής των φυσικοχημικών όρων τους, και πολλές από αυτές τις ουσίες εμμένουν για δεκαετίες (π.χ. DDTs, PCBs). Οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στα ιζήματα μπορούν να υπερβούν εκείνες των υδάτων με παράγοντα αναλογίας από ένα έως δέκα χιλιάδες (210). Ακόμη και οι απομακρυσμένες περιοχές όπως τα ψηλά βουνά και οι αρκτικές περιοχές λαμβάνουν σημαντικά ποσά ρυπαντών από την ατμοσφαιρική απόθεση μέσω της μεταφοράς μεγάλων αποστάσεων (211).

Οι σχετικά μικρές ποσότητες τοξικών προϊόντων μπορούν να απειλήσουν τα ιδιαίτερα ευάλωτα οικοσυστήματα (212).

Η ποιότητα του νερού πολλών ποταμών και λιμνών έχει βελτιωθεί σημαντικά λόγω του αυξανόμενου αριθμού εγκαταστάσεων καθαρισμού. Εντούτοις, η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων μειώνει όχι μόνο τη συγκέντρωση των τοξικών ουσιών αλλά και αυτήν των μη τοξικών οργανικών ενώσεων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη βιολογική διαθεσιμότητα των χημικών ουσιών και της τοξικότητας, ειδικότερα σε εκείνες οι οποίες εισάγονται στο νερό μέσω της απορροής και της ατμοσφαιρικής απόθεσης. Τα αιωρούμενα ανόργανα και οργανικά σωματίδια έχουν μια μεγάλη επιφάνεια επιφάνειας και έτσι εμφανίζουν υψηλή φυσική ικανότητα απορρόφησης τοξικών προϊόντων. Οι τοξικές χημικές ουσίες έχει αποδειχθεί πως αλληλεπιδρούν με το διαλυμένο ή κολλοειδές οργανικό περιεχόμενο με διάφορους τρόπους δέσμευσης και απορρόφησης (213). Πολλά από αυτά τα σύμπλοκα είναι πάρα πολύ μεγάλα ή πάρα πολύ πολωμένα για να διαχυθούν πέρα από τη μεμβράνη

των βραγχίων (214). Μερικά κατιόντα μετάλλων μπορούν να δημιουργήσουν λιπόφιλα σύμπλοκα με συγκεκριμένες οργανικές ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στη γεωργία, τη δασοκομία και τη βιομηχανία (π.χ. ditiocarbamates, diethyldithiophosphate) και μπορούν να περνούν εύκολα τη μεμβράνη των βραγχίων. Αυτό οδηγεί και σε πιο υψηλά επίπεδα συσσώρευσης μετάλλων από τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις στο νερό και σε ένα αλλαγμένο σχέδιο διανομής, με υψηλότερη αύξηση στον εγκέφαλο και τα μάτια των ψαριών (215). Η λαμβανόμενη δόση και η τοξικότητα του υδραργύρου εξαρτώνται έντονα από τη μεθυλίωση μέσω της βακτηριακής δραστηριότητας (216). Λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα του, ο μεθυλικός υδράργυρος απορροφάται δέκα φορές γρηγορότερα απ' ότι στην ιοντική μορφή του. Από την άλλη μεριά, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι το σελήνιο μπορεί να μειώσει την τοξικότητα υδραργύρου (217).

Η βιοδιαθεσιμότητα και η τοξικότητα των μετάλλων ελέγχονται όχι μόνο από τα αιωρούμενα στερεά και το διαλυμένο οργανικό περιεχόμενο αλλά και από τις παραμέτρους του ίδιου του νερού όπως η σκληρότητα, η αλκαλικότητα, το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση οξυγόνου (218). Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες προσαρμόζουν τη διαφοροποίηση σε νέα είδη των μετάλλων (219). Τα ιόντα του υδροξειδίου και τα σύμπλοκα του υδροξειδίου είναι οι πιο βιοδιαθέσιμες μορφές μετάλλων οι οποίες απορροφώνται από τα βράγχια ψαριών (220). Εντούτοις, τα μέταλλα συμπεριφέρονται διαφορετικά στα φυσικά ύδατα: Η διαφοροποίηση του Pb, του Cu, του Hg, και του Al επηρεάζεται ιδιαίτερα από το pH, ενώ αυτό του Cd και του Zn είναι σχεδόν ανεπηρέαστο στις αλλαγές του pH (221). Η συγκέντρωση ασβεστίου στο νερό ασκεί σημαντική επίδραση στη διαπερατότητα των βαρέων μετάλλων στις μεμβράνες των βραγχίων. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των δισθενών μεταλλικών ιόντων και του ασβεστίου για τις περιοχές πρόσδεσης στην επιφάνεια των βραγχίων και τη μετάβαση μέσω των καναλιών ευαίσθητων ιόντων μειώνει τη λαμβανόμενη δόση και την τοξικότητα των μετάλλων στο σκληρό νερό (222, 223). Η λήψη των χημικών ουσιών από τις μεμβράνες των βραγχίων είναι επίσης μια λειτουργία της ροής του νερού κατά μήκος των βραγχίων (224). Κατά συνέπεια, η αύξηση της θερμοκρασίας, η μείωση του οξυγόνου και η μεταβολική διέγερση (π.χ. κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής ή της πίεσης) επιταχύνουν τον εξαερισμό των βραγχίων και έτσι τη λήψη των τοξικών προϊόντων.

Αυτά τα παραδείγματα καταδεικνύουν ότι οι απλές προσεγγίσεις των χημικών αναλύσεων του νερού αποτυγχάνουν συχνά να ανιχνεύσουν τις περιβαλλοντικές

αλλαγές οι οποίες είναι επιβλαβείς για τους υδρόβιους οργανισμούς. Η σύνθετη κατάσταση στα φυσικά ύδατα, με τα συνεργιστικά και ανταγωνιστικά αποτελέσματά τους, καθιστά δύσκολη την πρόβλεψη του αντίκτυπου των τοξικών προϊόντων στο οικοσύστημα. Σε πολλές περιπτώσεις, η εισαγωγή των τοξικών δεν είναι σταθερή αλλά διακοπτόμενη / ασυνεχής και μπορεί να παραμείνει μη ανιχνεύσιμη.

Οι βιοδείκτες και ειδικότερα οι οργανισμοί μακράς διαβίωσης όπως τα ψάρια, είναι ευαίσθητοι στον αντίκτυπο ενός σύνθετου μίγματος χημικών ουσιών σε ένα συγκεκριμένο υδρόβιο οικοσύστημα, ενσωματώνοντας το περιβαλλοντικό φορτίο κατά τη διάρκεια χρόνου και διαστήματος. Οι ρυπαντές προκαλούν συνήθως ένα ευρύ φάσμα επιδράσεων και αποκρίσεων στους οργανισμούς που κυμαίνονται από το κυτταρικό και βιοχημικό επίπεδο ως το επίπεδο συμπεριφοράς, ανάπτυξης και αναπαραγωγής. Κατά τη διάρκεια της χαμηλής και περιορισμένης έκθεσης σε τοξικές ουσίες, τα ψάρια αποκρίνονται σε υποκυτταρικό επίπεδο, αλλά συνήθως οι οργανισμοί μπορούν να αντισταθμίσουν την τοξική επίδραση, και η υγεία τους δεν επηρεάζεται σοβαρά. Η παρατεταμένη και σφοδρή έκθεση, εντούτοις, μπορεί να προκαλέσει μια ακολουθία λειτουργικών και δομικών αλλαγών οι οποίες εξασθενίζουν λειτουργίες ζωτικής σημασίας. Οι συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών στους ιστούς είναι άριστοι δείκτες του περιβαλλοντικού φορτίου μιας συγκεκριμένης τοξικής ουσίας αλλά συνήθως δεν απεικονίζουν άμεσα τις φυσιολογικές και οικολογικές συνέπειες. Οι περισσότερες από τις τεχνικές βιοπαρακολούθησης, εστιάζουν στα διαφορετικά είδη αποκρίσεων από την πίεση οι οποίες είναι αρκετά ή λιγότερο γενικές αποκρίσεις και δεν μπορούν να αποδοθούν στις συγκεκριμένες τοξικές ουσίες. Η μόνιμη άσκηση πίεσης – ακόμα κι αν είναι μέτρια – παρεμποδίζει τις ορμονικές και βιοχημικές διαδικασίες οι οποίες οδηγούν στην αύξηση του μεταβολισμού, στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, στη διαταραγμένη ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης, στην αποτυχία της αναπαραγωγής ή σε ζημιές στους ιστούς. Η χαμηλή τοξική ιδιαιτερότητα πολλών αποκρίσεων πίεσης δεν αποτελεί μονάχα ένα μειονέκτημα, αλλά αυξάνει παράλληλα την αξία των βιοδεικτών για τον έλεγχο του γενικού περιβαλλοντικού φορτίου στους φυσικούς υδάτινους οργανισμούς οι οποίοι μπορούν να περιέχουν αρκετές εκατοντάδων διαφορετικών επιβλαβών χημικών ουσιών. Για πρακτική χρήση στο πεδίο, οι μέθοδοι βιοπαρακολούθησης οι οποίες βασίζονται στα ψάρια θα πρέπει να είναι απαθείς στην πίεση της φυλάκισης / αιχμαλωσίας η οποία μπορεί να καλύψει τα αποτελέσματα των τοξικών προϊόντων. Οι βιολογικές παράμετροι οι οποίες αναλύονται στη χημική ανάλυση θα πρέπει να

γίνουν καλά κατανοητοί και η ρύθμισή τους η οποία επηρεάζεται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες εκτός από τις τοξικές ουσίες, θα πρέπει να είναι γνωστή. Τα στοιχεία όσον αφορά στα εμπορικά χειριζόμενα είδη ψαριών θα πρέπει να αντιμετωπιστούν με προσοχή, και τα πιθανά φορτία γεωγονικής προέλευσης (π.χ. μέταλλα) θα πρέπει να εξεταστούν.

4.1. Τοξική Συσσώρευση στους Ιστούς Ψαριών.

Οι συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών στους ιστούς αποτελούν ένδειξη της λαμβανόμενης δόσης, της αποθήκευσης, και της έκκρισης. Στα ψάρια, δύο διαφορετικές διαδρομές της λαμβανόμενης δόσης είναι σημαντικές, (i) άμεσα από το νερό, στα ψάρια του γλυκού νερού σχεδόν αποκλειστικά μέσω των βραγχίων, στα θαλάσσια είδη σε ένα μικρό ποσοστό επίσης μέσω της κατανάλωσης του νερού, και (ii) η της λήψης από το στόμα και αφομοίωσης από μολυσμένη τροφή. Τα υδρόφιλα μόρια είναι απίθανο να περάσουν τη μεμβράνη των βραγχίων εκτός αν είναι πολύ μικρά (διάχυση κατά μήκος της ωσμωτικής κλίσης) ή εάν μεταφέρονται από τις αντλίες ιόντων ή τα κανάλια. Οι λιπόφιλες ενώσεις από την άλλη μεριά, είναι διαλυτές στις βιολογικές μεμβράνες και διασχίζουν όλα τα εμπόδια. Η σχετικά χαμηλή διαλυτότητα του οξυγόνου στο νερό απαιτεί μια εξαιρετικά μεγάλη αναπνευστική επιφάνεια και ένα υψηλό ποσοστό άντλησης ύδατος. Συνεπώς, η άμεση λήψη των μεταδιδόμενων από το νερό τοξικών ουσιών (η συγκέντρωση των οποίων είναι δύο φορές μεγαλύτερη απ' ότι στον αέρα) αποτελεί την κύρια διαδρομή στα ψάρια (για βιοσυγκέντρωση, βλέπε *Πίνακα 8*).

Βιοσυσσώρευση (BA)	Η συσσώρευση των μολυσματικών παραγόντων στους οργανισμούς ως αποτέλεσμα της λήψης νερού ή τροφής.
Βιοσυγκέντρωση (BC)	Η συσσώρευση των μολυσματικών παραγόντων οι οποίοι μεταφέρονται άμεσα από το νερό μέσω μιας μη-διατροφικής διαδρομή.
Βιομεγέθυνση /	Η συσσώρευση των τοξικών ουσιών ως αποτέλεσμα της απορρόφησης μολυσμένης διατροφής.
Παράγοντας Βιοσυγκέντρωσης (BCF)	Πηλίκο συγκέντρωσης μιας χημικής ουσίας σε υδρόβιο οργανισμό προς την αντίστοιχη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο νερό. Ο BCF μπορεί να προβλεφθεί από τη

	συγκέντρωση μιας λιπόφιλης χημικής ουσίας στο ύδωρ και το K_{ow} του.
log K_{ow}	Συντελεστής κατάτμησης οκτανόλης-νερού: Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο BCF είναι ανάλογος προς το λογάριθμο K_{ow} (Banjeree και Baughman, 1991).

Πίνακας 8. Όροι που χρησιμοποιούνται στην οικοτοξικολογία.

Η διατροφή, η οποία είναι η σημαντικότερη πηγή τοξικών προϊόντων που οδηγούν στη βιοδιόγκωση κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας, περιορίζεται συνήθως στις λιπόφιλες ενώσεις οι οποίες είναι σχεδόν αδιάλυτες στο νερό (ενώσεις τιμές log K_{ow} 5 – 8) και χαρακτηρίζονται από τον αργό μεταβολισμό τους, π.χ. αλογονωμένες μολυσματικές ουσίες και φυτοφάρμακα τα οποία αντιστέκονται στο βιομετασχηματισμό (225, 226, 227). Οι λιπόφιλοι μολυσματικοί παράγοντες είναι κυρίως αποθηκευμένοι στα λιπίδια συμπεριλαμβανομένων των βιολογικών μεμβρανών και των μυών, και κατά συνέπεια είναι σημαντικού ενδιαφέροντος για την ανθρώπινη διατροφή. Αφ' ετέρου, τα λιπίδια χρησιμεύουν ως προστατευτική δεξαμενή (reservoir) για τις λιπόφιλες χημικές ουσίες, και επομένως η τοξικότητάς τους μειώνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας σε λιπίδια στα ψαριών (228). Τα κορυφαία αρπακτικά ζώα (π.χ. ψάρια τα οποία τρώνε ψάρια) και τα είδη με το υψηλό περιεχόμενο λιπιδίων έχει αποδειχθεί ότι είναι οι πιο ευαίσθητοι δείκτες για την περιβαλλοντική μόλυνση με λιπόφιλες ενώσεις (229).

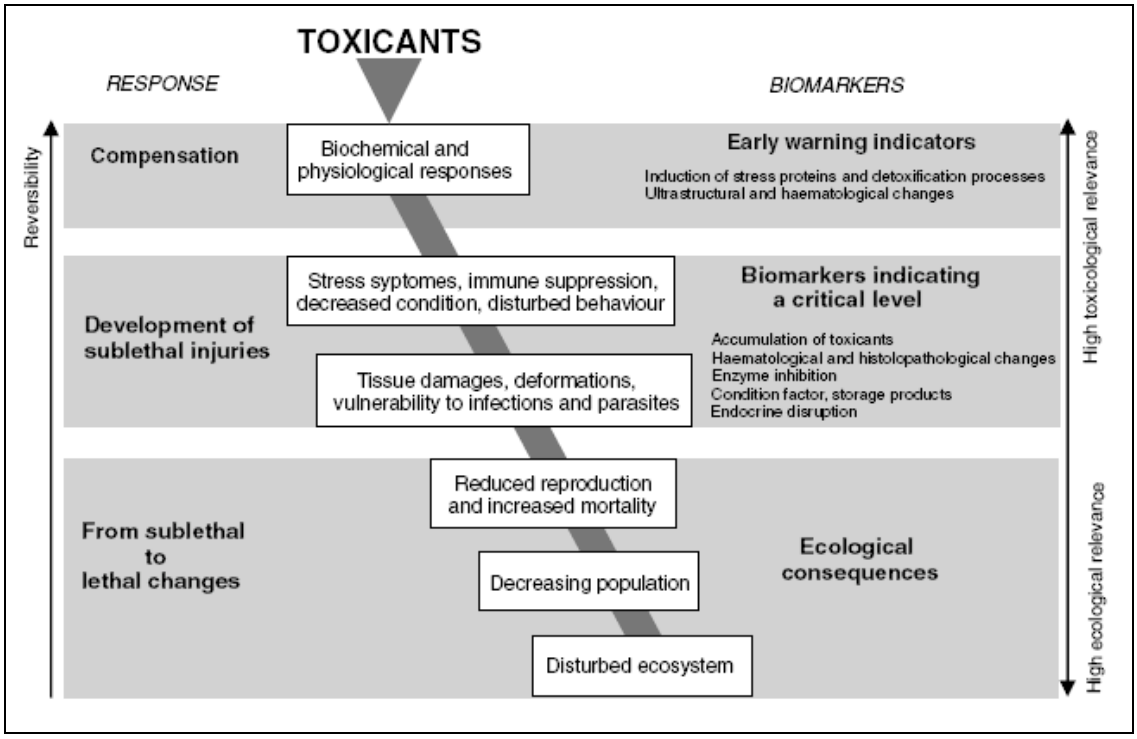
Το συκώτι και ο νεφρός αποτελούν τις κύριες περιοχές συσσώρευσης των περισσότερων τοξικών ουσιών συμπεριλαμβανομένων και των μετάλλων. Αυτά τα όργανα είναι πλούσια σε μεταλλοπρωτεΐνες με υψηλές έλξεις με Cd, Hg, Zn, και Cu. Το συκώτι περιλαμβάνει επίσης ποικιλία διαδικασιών αποτοξίνωσης οι οποίες μετασχηματίζουν τις επιβλαβείς ενώσεις σε λιγότερο τοξικά και υδροδιαλυτά προϊόντα μεταβολισμού τα οποία εκκρίνονται στη χολή. Αυτά τα προϊόντα μεταβολισμού είτε αποβάλλονται με τα περιττώματα είτε απορροφώνται εκ νέου από το έντερο και επιστρέφουν στο συκώτι από την εντεροηπατική κυκλοφορία η οποία μπορεί να αυξήσει την ημιζωή των τοξικών ουσιών στα ψάρια. Στη χολή της πέστροφας που εκτέθηκε σε διάφορες συγκεκριμένες οργανικές ουσίες ο Statham και οι συνεργάτες του (230) βρήκαν συγκεντρώσεις μεταξύ 11 και 10.000 φορές

υψηλότερες απ' ότι στο νερό. Ακόμη και υπό συνθήκες πεδίου έχει αποδειχθεί ότι η ανάλυση των χολών των ψαριών είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για να αξιολογηθεί το περιβαλλοντικό φορτίο των ξενοβιοτικών παραγόντων (231).

Το ποσοστό των συσσωρευμένων τοξικών ουσιών ανάμεσα στους διαφορετικούς ιστών των ψαριών εξαρτάται κατά ένα μεγάλο μέρος από τις δυναμικές διαδικασίες μεταξύ της λήψης, της αποθήκευσης, και της αποβολής. Μετά από βραχυπρόθεσμη έκθεση, τα βράγχια ή η πεπτική οδός και το συκώτι παρουσιάζουν συνήθως υψηλό φορτίο σε τοξικές ουσίες, ενώ οι συγκεντρώσεις στο νεφρό, κόκκαλα (Pb, Zn), και τους μύες (λιπόφιλες ουσίες) αυξάνονται πιο αργά με μια καθυστέρηση, αλλά οι συσσωρευμένες χημικές ουσίες είναι πιο επίμονες απ' ότι σε άλλα όργανα (232, 233). Λόγω του ενεργού συντονισμού η συσσώρευση των ουσιωδών μετάλλων στους ιστούς (Cu, Zn) επέρχεται σε κορεσμό σε χαμηλά επίπεδα, και είναι έτσι ένας σχετικά αδύνατος δείκτης της περιβαλλοντικής μόλυνσης (234). Η οξεία δηλητηρίαση υποκινεί την έκκριση βλέννας η οποία μπορεί να ενεργήσει ως παγίδα μεταλλικών ιόντων (235). Αυτό μπορεί να εξηγήσει τουλάχιστον μερικές από τις υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων οι οποίες παρατηρούνται στα βράγχια ψαριών (236). Τα έντονα και ποικίλα ποσοστά των ανόργανων και οργανικών μολυσματικών παραγόντων μεταξύ των συγκεντρώσεων στους ιστούς άγριων φυλακισμένων ψαριών όπως παρουσιάζεται από τον Kime (237) δεν οφείλονται μόνο στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και τους χρόνους έκθεσης αλλά και στα παραδειγματικά συγκεκριμένα είδη ή οικογένειες. Τα ψάρια της οικογένειας του σολομού για παράδειγμα έχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις χαλκού στο συκώτι απ' ότι άλλες οικογένειες.

5. Τελικές Παρατηρήσεις.

Τα ψάρια είναι από τις πιο συχνά χρησιμοποιημένες ομάδες βιοδεικτών στις οικοτοξικολογικές μελέτες πεδίων. Το πλεονέκτημα μιας περιεκτικής βασικής γνώσης της τοξικολογίας, της φυσιολογίας, και της ιστολογίας υπερβαίνει το μειονέκτημα της κινητικότητας των ψαριών. Κανένας άλλος υδρόβιος οργανισμός δεν είναι κατάλληλος για την εφαρμογή τόσων πολλών διαφορετικών μεθόδων οι οποίες επιτρέπουν την αξιολόγηση της δριμύτητας των τοξικών επιδράσεων (*Διάγραμμα 6*).



Διάγραμμα 6. Διαφορετικά επίπεδα αποκρίσεων των ψαριών τα οποία εκτίθενται σε τοξικές ουσίες και η χρήση των ψαριών ως βιοδεικτών περιβαλλοντικής ρύπανσης.

Η βιοένδειξη της ύπαρξης συγκεκριμένων ουσιών και ο αντίκτυπός τους στο συγκεκριμένο βιόκοσμο και το οικοσύστημα είναι η κύρια εστίαση των οικοτοξικολογικών μελετών. Διάφορες μέθοδοι οικολογικής και τοξικολογικής σχετικότητας με ποικίλη ιδιαιτερότητα πρέπει να εφαρμοστούν ταυτόχρονα για να αξιολογήσουν την οικοτοξικολογική κατάσταση υπό τις σύνθετες περιβαλλοντικές συνθήκες στον τομέα.

Λόγω των σύνθετων απαιτήσεων βιότοπών της, η πανίδα των ψαριών είναι ένας κρίσιμος δείκτης της οικολογικής ακεραιότητας των υδρόβιων συστημάτων σε διαφορετικές κλίμακες, από το μικροπεριβάλλον στην αιχμαλωσία. Η υγεία των ειδών ψαριών στο μεμονωμένο επίπεδο (π.χ. απόδοση ανάπτυξης) αλλά και στο επίπεδο πληθυσμών (π.χ. δομή πληθυσμών) καθορίζεται από τη σύνδεση των διαφορετικών στοιχείων βιότοπων σε ένα ευρύ χωροχρονικό πλαίσιο. Κατά συνέπεια η βιοένδειξη η οποία χρησιμοποιεί τα ψάρια, αντιπροσωπεύει ένα καλό εργαλείο ελέγχου ειδικά όσον αφορά την εφαρμοσμένη μηχανική ποταμών, π.χ. αποκατάσταση ποταμών και διαχείριση.

Προκειμένου να ενισχυθεί περαιτέρω ο ρόλος των ψαριών ως πολύτιμων δεικτών της οικολογικής ακεραιότητας των υδρόβιων συστημάτων, απαιτείται έρευνα η οποία θα κυμαίνεται από τις οικολογικές απαιτήσεις ορισμένων ειδών στόχων στις διαδικασίες των οικοσυστημάτων.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΒΙΟΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ

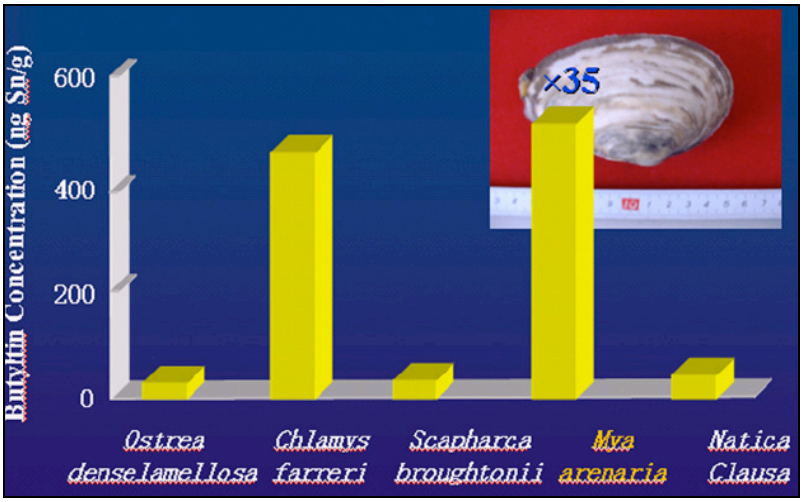
Κατά την βιοπαρακολούθηση των βαρέων μετάλλων στο νερό, μπορούν να υιοθετηθούν διαφορετικές μέθοδοι ή τεχνικές, οι οποίες βασίζονται σε διαφορετικούς στόχους και απαιτήσεις. Μερικές από αυτές είναι η δυναμική ανάλυση σε μολυσμένους οργανισμούς (238), ο προσδιορισμός του περιεχομένου σε βαρέα μέταλλα σε μολυσμένους οργανισμούς (239, 240), η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας σε μολυσμένους βιοδείκτες (241), η ιστοπαθολογική παρατήρηση (242) και η ανάλυση των εκάστοτε περιεχομένων των βιοδεικτών όπως π.χ. η φωτοσυνθετική χρωστική ουσία των αλγών (243). Όλες οι διαφοροποιήσεις στη φυσιολογική λειτουργία, την αφθονία ειδών, τον πληθυσμό και τις κοινότητες των υδρόβιων οργανισμών αντικατοπτρίζουν την κατάσταση του υδάτινου οικοσυστήματος. Κάθε τεχνική παρουσιάζει τα δικά της συγκεκριμένα πλεονεκτήματα και μπορεί να εφαρμοστεί σε ποικίλα επίπεδα ανάλυσης.

1. Βιοσυσσώρευση.

Η βιοσυσσώρευση είναι μια σημαντική διαδικασία μέσω της οποίας οι χημικές ουσίες μπορούν να έχουν επιπτώσεις στους ζωντανούς οργανισμούς. Η αύξηση στη συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας σε έναν βιολογικό οργανισμό κατά τη διάρκεια του χρόνου μπορεί να συγκριθεί αν όχι ταυτιστεί, με τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο περιβάλλον. Η βιοσυσσώρευση εμφανίζεται όταν ένας οργανισμός απορροφά μια τοξική ουσία σε ένα ποσοστό μεγαλύτερο από αυτό κατά το οποίο η ουσία χάνεται. Αρκετά φυσικά φαινόμενα με σταδιακές αλλαγές συμπεριλαμβανομένης της λαμβανόμενης δόσης, της αποθήκευσης και της εξουδετέρωσης συνθέτουν τη διαδικασία της βιοσυσσώρευσης. Η βιοσυσσώρευση προκύπτει από μια δυναμική εξισορρόπηση μεταξύ της έκθεσης του εξωτερικού περιβάλλοντος και της λήψης, της έκκρισης, της αποθήκευσης, και της χημικής αποικοδόμησης μέσα σε έναν οργανισμό. Η κατανόηση της δυναμικής διαδικασίας

της βιοσυσσώρευσης αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τη ρύθμιση και τον έλεγχο των χημικών ουσιών όπως είναι τα μέταλλα στα υδάτινα οικοσυστήματα.

Ένα ιδανικό πείραμα προσομοίωσης έκθεσης πραγματοποιήθηκε για να εξετάσει την καταλληλότητα του *Mya arenaria* ως νέου, ευαίσθητου βιοδείκτη της ρύπανσης από βουτύλιο στο θαλάσσιο σύστημα, βασιζόμενο στην ειδική υψηλή δυνατότητα βιοσυσσώρευσής του στο συγκεκριμένο οργανισμό όπως φαίνεται στην Γραφική Παράσταση 1 (244). Σύμφωνα με ένα δεδομένο κινητικό μοντέλο (245) υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι της συσσώρευσης, σταθερές Ku και BCF. Η παράμετρος Ku κυμάνθηκε μεταξύ 0,54 και 2,97 στα *M. arenaria* και από 0,062 έως 0,30 στα *Mytilus edulis*, αντίστοιχα. Ο παράγοντας βιοσυγκέντρωσης (BCF) κυμάνθηκε από 15538 έως 91800 στα *M. arenaria* και από1813 έως 9000 στα *M. edulis* (είδη ελέγχου) αντίστοιχα, μετά από έκθεση 28 ημερών. Κατά τη διάρκεια της επόμενης δοκιμής απαλλαγής από ρύπους, διαπιστώθηκε ότι ο ρυθμός απαλλαγής από ρύπους κυμάνθηκε από 0.0074 έως 0.0098 ανά ημέρα για τα *M. arenaria* και από 0,019 έως 0.0328 ανά ημέρα για τα *M. edulis*. Ο χρόνος ημιζωής τουτριβουτυλοκασσιτέρου ($t_{1/2}$) κυμάνθηκε από 71 έως 94 ημέρες για τα *M. arenaria* και από 21 έως 36 ημέρες για τα *M. edulis*. Το εξαιρετικά υψηλό επίπεδο του TBT στα *M. arenaria* έδειξε ότι έχουν ισχυρότερη ικανότητα συσσώρευσης ή χαμηλότερο ποσοστό μεταβολισμού αυτού του είδους περιβαλλοντικών ρύπων σε σχέση με άλλα επιλεγέντα είδη, γεγονός το οποίο προμήνυσε το *M. arenaria* ως έναν πιθανό νέο βιοδείκτη εκδήλωσης της ρύπανσης από βουτύλιο στο ωκεάνιο περιβάλλον (246).



Γραφική Παράσταση 4. Υψηλή ικανότητα βιοσυσσώρευσης των *Mya arenaria* στη ρύπανση βουτυλίου.

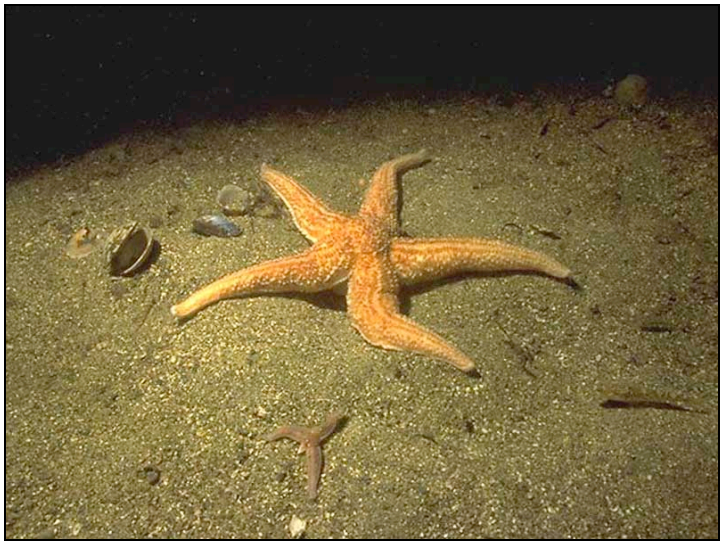
Διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων των διαφόρων ρύπων μπορούν να εμφανιστούν σε διαφορετικά όργανα των ίδιων ειδών. Μελέτες σχετιζόμενες με τη λαμβανόμενη δόση και τη διανομή του ^{110m}Ag στο στρείδι *Crassostrea gigas*, από το περιβάλλον νερό και την τροφή, έδειξαν ότι το στρείδι μπορούσε γρήγορα να λάβει αρκετά μεγάλη δόση ^{110m}Ag από το νερό. Ο συντελεστής συγκέντρωσης σε ολόκληρο το σώμα του στρειδιού για το ^{110m}Ag έφτασε την υψηλή τιμή του 2467 κατά τη διάρκεια των 23 ημερών της έκθεσης. Οι συντελεστές συγκέντρωσης στα όργανα ήταν κατά σειρά: βράγχια (33.661) > νευρικό σύστημα (23.119) > σιφώνιο (21.818) > υπόλοιπο μέρος (17.685) > προσαγωγός μυς (9.915) > κέλυφος (189) (247) (Οι παραπάνω τιμές δηλώνουν πόσες φορές το βάρος του κάθε οργάνου ή του σώματος μπορεί να συσσωρευθεί ο ρύπος). Οι έρευνες για τα επίπεδα του Zn, του Cu, του Cd, του As και του Pb στο νεφρό, το συκώτι, τα βράγχια και την καρδιά των αφρικανικών γατόψαρων (*Clarias ariepinus*) από τον ποταμό της Νιγηρίας Ogun έδειξαν την εξής κατεύθυνση της βιοσυσσώρευσης των βαρέων μετάλλων: καρδιά, Zn>Cu>Pb>As>Cd; βράγχια, Zn>Cu>Pb>Cd>As; νεφροί, Zn>Cu>Pb>As>Cd; συκώτι, Zn>Cu>Pb>As>Cd.

Η σειρά της συγκέντρωσης των μετάλλων στα όργανα ήταν η ακόλουθη: αρσενικό → νεφρό > συκώτι > βράγχια > καρδιά, ψευδάργυρος → βράγχια > συκώτι > νεφρό > καρδιά, μόλυβδος → συκώτι > νεφρό > βράγχια > καρδιά, χαλκός → νεφρό > συκώτι > βράγχια > καρδιά, κάδμιο → συκώτι > βράγχια > νεφρό > καρδιά (248).

Τα βράγχια των μυδιών αποτελούν σημαντικά όργανα για τη συσσώρευση μετάλλων (249). Επειδή τα βράγχια είναι το όργανο με τη μεγαλύτερη συσσώρευση μετάλλων και έχουν τη μεγαλύτερη περιοχή επιφάνειας είναι καλύτερος συσσωρευτής του Cd, του Pb και του Zn του περιβάλλοντος νερού της θάλασσας σε σχέση με τον υπόλοιπο μαλακό ιστό, γεγονός το οποίο τα καθιστά ενδεδειγμένο δυναμικό δείκτη των περιβαλλοντικών επιπέδων διαλυμένων μετάλλων στο νερό της θάλασσας (250). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Hg βρέθηκαν στα βράγχια των *P. viridis* συγκρινόμενα με άλλους ιστούς των μυδιών (251).

Εικόνα 24. Το *Anadara granosa*.

Σε άλλα δίθυρα αναφέρθηκε ότι η υψηλότερη συγκέντρωση Cd βρέθηκε στα βράγχια του *Anadara granosa*. Ο Szefer και οι συνεργάτες του (252) διαπίστωσαν ότι τα βράγχια του κοχυλιού / κυδωνιού *Cerastoderma glaucum* περιείχαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις Co και Ni απ' ότι άλλα όργανα. Ο υψηλός παράγοντας βιοσυγκέντρωσης στα βράγχια μυδιών σε ένα μέσο ελεύθερο από μέταλλα έδειξε ότι τα βράγχια ήταν οι κύριες περιοχές για την αφομοίωση Pb και Z στο *M. edulis* (253).
Η λήψη, η κατάληξη και τα αποτελέσματα των ρύπων στους οργανισμούς μπορούν να επηρεαστούν σύμφωνα με το φύλο δεδομένου ότι διαδραματίζουν σημαντικότατο ρόλο στη γενετική, τη φυσιολογία, τη μορφολογία και τη συμπεριφορά των οργανισμών. Η διαφορά του φύλου σχετιζόμενη με τα επίπεδα των βαρέων μετάλλων στην άγρια φύση σύμφωνα με την Burger (254), ήταν υπαρκτή σε μία σειρά υδρόβιων βιοδεικτών συμπεριλαμβανομένων των ασπόνδυλων (π.χ. αστερίας, *Asterias rubens*), των ψαριών (π.χ. πέρκα *Largemouth*, ψάρι *Micropterus* της οικογένειας σολομού), των ερπετών (π.χ. νερόφιδα, *Nerodia sipedon*), των θηλαστικών (π.χ. δελφίνι, *Stenella*). Οι φυλετικά σχετιζόμενες διαφορές της συσσώρευσης μετάλλων στους οργανισμούς μπορούν να εξαρτηθούν από διάφορους παράγοντες όπως τα είδη μετάλλων, τους ιστούς συσσώρευσης, την εποχή κ.λπ.



Εικόνα 25. Ο αστερίας *Asterias rubens*.

Για παράδειγμα, τα υψηλότερα επίπεδα χαλκού βρέθηκαν στις αρσενικές γαρίδες, ενώ οι θηλυκές γαρίδες είχαν τα υψηλότερα επίπεδα νικελίου στους μύες και τον εξωσκελετό (255). Οι πληροφορίες σχετικά με τις επιπτώσεις που μπορεί να επιφέρει το φύλο στα επίπεδα μετάλλων είναι ακόμα ανομοιόμορφες και αντιφατικές.

Μερικοί άλλοι παράγοντες μπορούν επίσης να έχουν επιπτώσεις στη βιοσυσσώρευση των βαρέων μετάλλων στους διάφορους οργανισμούς. Τα μέταλλα τα οποία συσσωρεύονται στο μαλακό ιστό των θαλασσίων μυδιών μπορούν να επηρεαστούν από τους βιοτικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου της ηλικίας, του μεγέθους του σώματος, της διατροφής, της φάσης της αναπαραγωγής καθώς επίσης και από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η αλατότητα (256) εκτός βέβαια από την ίδια τη ρύπανση των παράκτιων υδάτων. Ο περιεχόμενος Pb και το περιεχόμενο Mn στο στρείδι *C. corteziensis* σχετίστηκαν άμεσα με τη γεννητική ωρίμανση και παρουσίασαν εποχιακή διαφοροποίηση (257). Η μέτρηση των μετάλλων στους μαλακούς ιστούς μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την έκταση της έκθεσης μετάλλων σε έναν οργανισμό καθώς και μία χρονικά ολοκληρωμένη μέτρηση της βιολογικής διαθεσιμότητας μετάλλων (258). Τα όστρακα των ωκεάνιων μυδιών ως δείκτες για τη συσσώρευση βαρέων μετάλλων, είναι τα καταλληλότερα για την ιστορική καταγραφή της μόλυνσης των μαλακών ιστών στο σώμα (259).

2. Βιοχημικές Μεταβολές.

Με την ανάπτυξη των βιολογικών τεχνικών, οι έρευνες για την αλληλεπίδραση μεταξύ των ρύπων και των βιολογικών μακρομορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα ένζυμα και τα νουκλεϊνικά οξέα, μπορούν να υποδείξουν το μηχανισμό δράσης των ρύπων. Η προφύλαξη μπορεί με αυτόν τον τρόπο να γίνει με ευαισθησία σε ποικίλα επίπεδα.

Πολλοί βιοδείκτες έχουν αναπτυχθεί όπως η μεταλλοθειονίνη (επίπεδα μεταλλοπρωτεϊνών), το οξειδωτικό στρες, οι κυτοτοξικολογικές αποκρίσεις όπως η γενοτοξικότητα, οι λυσοσωματικές αλλαγές, η ανοσοαπόκριση, η ενεργότητα χολινεστερασών κ.α. Κάποια ειδική πρωτεΐνη μπορεί να καθαριστεί ώστε χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την έκθεση σε βαρέα μέταλλα. Η κατάλληλη επιλογή των βιοχημικών βιοδεικτών πρέπει να βασίζεται σε συγκεκριμένες συνθήκες όπως στους ρυπαντές στόχους, στους δοκιμασμένους οργανισμούς, στις εξετασμένες περιοχές κ.λπ.

3. Προσεγγίσεις στη Μεταβολή του Πληθυσμού και των Βιοκοινοτήτων.

Οι αποκρίσεις που σχετίζονται με το επίπεδο του πληθυσμού (πυκνότητα, διανομή μεγέθους) καθώς και με το επίπεδο των κοινοτήτων (μετρική αφθονία ειδών, η ανάλυση πολλών μεταβλητών οι οποίες συνθέτουν την κοινωνία) των υδρόβιων οργανισμών στη ρύπανση μετάλλων του υδρόβιου οικοσυστήματος, είναι υψίστης σημασίας όσον αφορά στην αξιολόγηση της οικολογικής ισορροπίας η οποία προκαλείται από τις διαφορετικές ποιότητες του νερού στην υπό μελέτη περιοχή. Οι μεμονωμένοι ή οι ποικίλοι πληθυσμοί μπορούν να συνδεθούν για διαφορετικούς στόχους.

Ο βιοέλεγχος κοινοτήτων των πρωτόζωων περιλαμβάνει τη συλλογή τους και τη διερεύνηση ικανότητάς τους δημιουργίας αποικιών σε συγκεκριμένα υλικά και διατάξεις (μέθοδος PFU - polyurethane foam unit). Με αυτόν τον τρόπο παίρνουμε πληροφορίες για την πληθυσμιακή διαμόρφωση και τις λειτουργικές παραμέτρους για

την αντίστοιχη αξιολόγηση του νερού. Οι κοινότητες των πρωτόζωων διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο και παρουσιάζουν σαφή πλεονεκτήματα βιοελέγχου όσον αφορά στην ποιότητα νερού. Τα σημεία αναφοράς μετρήσεων για το πιο υψηλό επιτρεπόμενο επίπεδο των ρύπων στο υδάτινο σύστημα μπορούν να βασιστούν στα στοιχεία τα οποία λαμβάνονται με την μέθοδο PFU. Η μέθοδος PFU έχει καθιερωθεί ως εθνική τυποποιημένη μέθοδος για την ποιότητα του νερού στην Κίνα (260). Μπορεί να εφαρμοστεί (i) για τον έλεγχο της ρύπανσης του γλυκού νερού ο οποίος πραγματοποιείται στο πεδίο, συμπεριλαμβανομένων των λιμνών, των δεξαμενών, των ποταμών, των ρευμάτων και των ρυακιών, (ii) για τον έλεγχο των τοξικών σε βοθρολύματα τα οποία προκύπτουν από τη βιομηχανική εκφόρτιση, από τα αστικά λύματα, και (iii) για τη συνολική αξιολόγηση του κινδύνου της ποιότητας του νερού. Πολλές από τις έρευνες έδειξαν ότι η ρύπανση από βαρέα μέταλλα μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία των πρωτόζωων (261, 262). Σε συγκεκριμένη περίπτωση η μέθοδος PFU εφαρμόστηκε για τον έλεγχο λειτουργίας τεχνητού υγροβιότοπου, προκειμένου να γίνει διαχείριση των αποβλήτων υδάτων από ένα ορυχείο Pb / Zn. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του απόβλητου ύδατος αναλύθηκαν επίσης για περεταίρω σύγκριση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αφθονία ειδών καθώς και το μέγεθος πληθυσμών πρωτοζώων και πιο συγκεκριμένα ο δείκτης της βιοποικιλότητας ήταν χρήσιμα για την αξιολόγηση της ποιότητας του νερού. Η μέθοδος PFU και η φυσικοχημική ανάλυση έδειξαν ότι τα απόβλητα ύδατα του ορυχείου θα μπορούσαν να καθαριστούν ομαλά από τον τεχνητό υγροβιότοπο (263).

Τα πειράματα in situ στον μικρόκοσμο μπορούν να πραγματοποιηθούν για να αξιολογήσουν τις αποκρίσεις πληθυσμών αλλά και κοινοτήτων στην υδρόβια ρύπανση από βαρέα μέταλλα. Η έρευνα για τα μακροασπόνδυλα στον ποταμό Αρκάνσας, ένα μολυσμένο ρεύμα από μεταλλεία στο Κολοράντο στις ΗΠΑ παρουσίασε σημαντική θνησιμότητα στις περιοχές οι οποίες είχαν μολυνθεί από μέταλλα κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού όταν οι πληθυσμοί εντόμων της τάξης ephemeroptera (mayflies) κυριαρχήθηκαν από τα μικρά, πρόωρα αρθρόποδα ενδιάμεσης φάσης. Στη συγκεκριμένη μελέτη εξακριβώθηκαν οι σχέσεις συγκέντρωσης – απόκρισης μεταξύ των βαρέων μετάλλων και της πυκνότητας των μακροασπονδύλων και της αφθονίας ειδών για την τάξη ephemeroptera. Η αφθονία των ομάδων ταξινόμησης για την υδρόβια βενθική κοινότητα εντόμων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να φανερώσει τον αντίκτυπο της ρύπανσης στη βιοκοινότητα κάθε περιοχής.

Εικόνα 25. Ενήλικη mayfly.

Η πληθυσμιακή δομή των δίθυρων μαλακίων μπορεί να δηλώσει την υδρόβια έκθεση μετάλλων. Η υψηλότερη βενθική πυκνότητα οργανισμών του ωκεάνιου μυδιού *Arctica islandica L.* (μαλάκιο, δίθυρο) βρέθηκε στη λιγότερο-μολυσμένη τοποθεσία σε σύγκριση με την περιοχή απόρριψης. Επίσης, πληθυσμοί μερικών γαστερόποδων χρησιμοποιούνται συχνά ως βιοδείκτες για την εκτίμηση βαθμού ρύπανσης από ενώσεις του βουτυλίου.

Εικόνα 26. Το ωκεάνιου μυδιού *Arctica islandica L.*.

Αλλαγές στον πληθυσμό και στο επίπεδο κοινότητας εξαιτίας φαινομένων ρύπανσης, μπορούν να δείξουν διαταραχή της κανονικής ισορροπίας στο υπό μελέτη οικοσύστημα. Έτσι, οι βιοέλεγχοι είναι μεγάλης σπουδαιότητας, καθώς αντικατοπτρίζουν πλήρως τις επιδράσεις της ρύπανσης στο οικοσύστημα (264).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση βιοδεικτών για τον προσδιορισμό του υδάτινου περιβάλλοντος έχει εφαρμογή λίγων μόνο ετών αλλά χρησιμοποιεί εδραιωμένες αρχές και πάγιες τεχνικές της βιολογίας, της χημείας, της φυσικής κ.α. προσπαθώντας παράλληλα να τις αναπτύξει προς όφελός της.

Αρκετά έμβια όντα αλλά και χημικές ουσίες και σύμπλοκα έχουν χρησιμοποιηθεί σαν βιοδείκτες. Βασική προϋπόθεση για τον έλεγχο της ποιότητας του υδάτινου περιβάλλοντος είναι ο προς μελέτη βιοδείκτης να υφίσταται στο υπό μελέτη οικοσύστημα. Όσο περισσότερο μελετημένος είναι ένας βιοδείκτης τόσο πιο εύκολα απτά και ακριβή αποτελέσματα δύναται να δώσει σε μία καινούρια μελέτη. Τα μαλάκια αποτελούν τον κατεξοχήν πολυχρησιμοποιημένο βιοδείκτη. Η ύπαρξή τους σε παγκόσμια κλίμακα σε πλήθος οικοσυστημάτων, το μεγάλο πλήθος στις περιοχές όπου εμφανίζονται, το μεγάλο μέγεθός τους, η βιοσυσσωρευτική τους ικανότητα σε ρύπους είναι μονάχα μερικά από τα χαρακτηριστικά τους που τα κατατάσσει ανάμεσα στους καλύτερους βοδείκτες.

Και άλλοι έμβιοι οργανισμοί θα μπορούσαν να μελετηθούν σε μεγαλύτερο βαθμό. Τα πτηνά, τα θηλαστικά και πιο τολμηρά ο άνθρωπος ικανοποιούν στο έπακρο βασικά κριτήρια χρήσης τους ωσάν βιοδείκτες. Η λεπτή διαχωριστική γραμμή μεταξύ της Βιοηθικής και της ασύμβατης Επιστήμης αποτελεί εμπόδιο ή προνόμιο της ομαλής εξέλιξης της καθολικής βιωσημότητας του πλανήτη μας;

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

(1) Schuurmann, G., Markert, B. (Eds), 1998. Ecotoxicology – Ecological Fundamentals, Chemical Exposure and Biological Effects. John Wiley, New York, and Spectrum Akademischer Verlag, Stuttgart.
(2) Oehlmann, J., Markert, B. (Eds), 1999. Okotoxikologie – Okosystemare Ansatze und Methoden. Ecomed, Landsberg.
(3) "Application of Biotests in Envirnmental Research." Agnieszka Kuczynska, Lidia Wolska, and Jacek Namiesnik
(4) "The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant – induced stress syndrome in sentinel organisms." A. Viarengo, D. Lowe, C. Bolognesi, E. Fabbri, A. Koehler
(5) www.who.int/en/
(6) www.biobasics.gc.ca
(7) www.epa.gov
(8) National Research Council – NRC, 1987. Committee on biological markers. Environmental Health Perspective 74, 3.
(9) WHO, 1993. WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.
(10) McCarthy et al., 1991. McCarthy, J.F., Halbrook, R.S., Shugart, L.R., 1991. Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker-based biomonitoring capability. Publication no. 3072, ORNL/TM-11783. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.
(11) ECETOC, 1993. Environmental hazard assessment of substances. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals: Technical Report No. 51. Brussels, Belgium.
(12) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review
Ron van der Oost[a], Jonny Beyer[b] and Nico P. E. Vermeulen[c]
[a] Department of Environmental Toxicology, OMEGAM Environmental Research Institute, PO Box 94685, 1090 GR, Amsterdam, The Netherlands
[b] Department of Marine Environment, RF-Rogaland Research, Stavanger, Norway
[c] Department of Molecular Toxicology, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands
(13) "A review on operational bioindicators for sustainable coastal management – Criteria, motives and relationships." Lars Hakanson, Thorsten Blenckner
(14) Gagnı, F.C., Blaise, C., Salazar, M., Salazar, S., Hansen, P.D., 2001. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel Elliptio complanata. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 128, 213–223.
(15) Hansen, P.D., 1992. On-line Monitoring mit Biosensoren am Gewδsser zur ereignisgesteuerten Probenahme. Acta hydrochimica hydrobiologica 20 (2), 92–95.
(16) Hansen, P.D., 1993. Regulatory significance of toxicological monitoring by summarizing effect parameters. In: Richardson, M. (Ed.), Ecotoxicology Monitoring. VCH, New York, p. 384.

(17) Environment Canada. "Testing the World's Drinking Water." Science and Technology Bulletin. www.ec.gc.ca/science/sandemar99/article6_e.html December 2001.
(18) European Centre for Nature Conservation. "ELISA: Environmental Indicators for Sustainable Agriculture Final Report." European Centre for Nature Conservation. www.ecnc.nl/doc/projects/elisa.html December 2001.
(19) European Initiative for Biotechnology Education (EIBE). "Biotechnology and the Environment." EIBE. www.rdg.ac.uk/EIBE/ENGLISH/U16.HTM December 2001.
(20) Faculty of Medicine, University of Ottawa. "Centre For Research on Environmental Biotechnology (CREM) Brochure." University of Ottawa. www.uottawa.ca/academic/med/microbio/bmi/bmicrem.html. December 2001.
(21) Jacobson, K. Bruce. "Biosensors and Other Medical and Environmental Probes." Oak Ridge National Laboratory. www.ornl.gov/ORNLReview/rev29_3/text/biosens.htm December 2001.

(22) Cole, J.J., Findlay, S., Pace, M.L., 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a crosssystem overview. Mar. Ecol. Prog. Ser. 43, 1–10.
(23) Schwaerter, S., Sψndergaard, M., Riemann, B., Jensen, L.M., 1988. Respiration in eutrophic lakes: the contribution of bacterioplankton and bacterial growth yield. J. Plankt. Res. 10, 515–531.
(24) Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L.-A., Thingstad, F., 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 10, 257–263.
(25) Bouwman, L.A., Bloem, J., Van den Boogert, P.H.J.F., Bremer, F., Hoenderboom, G.H.J., De Ruiter, P.C., 1994. Short-term and long-term effects of bacterivorous nematodes and nematophagous fungi on carbon and nitrogen mineralization in microcosms. Biol. Fertil. Soils 17, 249–256.
(26) Bloem, J., Veninga, M., Shepherd, J., 1995. Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. Appl. Environ. Microbiol. 61, 926–936.
(27) Domsch, K.H., 1977. Biological aspects of soil fertility. In: Proceedings of the International Seminar on Soil Environment and Fertility Management in Intensive Agriculture, Tokyo, pp. 737–743.
(28) Bloem, J., De Ruiter, P.C., Bouwman, L.A., 1997. Food webs and nutrient cycling in agro-ecosystems. In: Van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E. (Eds), Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker, New York, pp. 245–278.
(29) Brookes, P.C., 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. Biol. Fertil. Soils 19, 269–279.
(30) Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. Soil Biol. Biochem. 20, 1389–1414.
(31) Elliot, E.T., 1997. Rationale for developing bioindicators of soil health. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds), Biological Indicators of Soil Health. CAB International, Wallingford, pp. 49–78.
(32) Stenberg, B., 1999. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. Acta Agric. Cand., Sect B, Soil and Plant Sci. 49, 1–24.
(33) Jordan, D., Kremer, R.J., Bergfield, W.A., Kim, K.Y., Cacnio, V.N., 1995. Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. Biol. Fertil. Soils 19, 297–302.
(34) Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L., 1990. High diversity of DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56, 782–787.
(35) Bloem, J., Lebbink, G.M., Zwart, K.B., Bouwman, L.A., Burgers, S.L.G.E., De Vos, J.A., De Ruiter, P.C., 1994. Dynamics of microorganisms, microbivores and nitrogen mineralisation in winter wheat fields under conventional and integrated management. Agric. Ecosys. Environ. 51, 129–143.
(36) Karp, A., Isaac, P.G. Ingram, D.S., 1998. Molecular Tools for Screening Biodiversity – Plants and Animals, 1st edn. Chapman & Hall, London.
(37) Peijnenburg, W.G.J.M., Posthuma, L., Eijsackers, H.J.P., Allen, H.E., 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. Ecotox. Environ. Saf. 37, 163–172.

(38) Wuertz, S., Mergeay, M., 1997. Impact of heavy metals on soil microbial communities and their activities. In: Van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E. (Eds), Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker, New York, pp. 607–642.
(39) Alexander, M., 1995. How toxic are toxic chemicals in soil. Environ. Sci. Technol. 29, 2713–2717.
(40) Boivin, M.-E.Y., Breure, A.M., Posthuma, L., Rutgers, M., 2002. Determination of field effects of contaminants. The importance of pollution-induced community tolerance. Human Ecol. Risk Assess. 8, 1035–1055.
(41) Van der Geest, H.G., Greve, G.D., Boivin, M.E., Kraak, M.H.S., Van Gestel, C.A.M., 2000. Mixture toxicity of copper and diazinon to larvae of the mayfly (Ephoron virgo) judging additivity at different effect levels. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2900–2905.
(42) Van Gestel, C.A.M., Van der Waarde, J.J., Derksen, J.G.M., Van der Hoek, E.E., Veul, M.F.X.W., Bouwens, S., Rusch, B., Kronenburg, R., Stokman, G.N.M., 2001. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. Environ. Toxicol. Chem. 20, 1438–1449.
(43) Dykhuizen, D.E., 1998. Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 73, 25–33.
(44) Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695–700.
(45) Paul, E.A., Harris, D., Klug, M., Ruess, R., 1999. The determination of microbial biomass. In: Robertson, G.P., Coleman, D.C., Bledsoe, C.S., Sollins, P. (Eds), Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research. Oxford University Press, New York, pp. 291–317.
(46) Darbyshire, J.F., Wheatley, R.E., Greaves, M.P., Inkson, R.H.E., 1974. A rapid micromethod for estimating bacterial and protozoan populations in soil. Rev. Icol. Biol. Soil. 11, 465–475.
(47) Boon, G.T., Bouwman, L.A., Bloem, J., Rφmkens, P.F.A.M., 1998. Effects of a copper tolerant grass (Agrostis capillaris) on the ecosystem of a copper-contaminated arable soil. Environ. Toxicol. Chem. 17, 1964–1971.
(48) Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biol. Biochem. 19, 703–707.
(49) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. Soil Boil. Biochem. 10, 215–221.
(50) Michel, P.H., Bloem, J., 1993. Conversion factors for estimation of cell production rates of soil bacteria from thymidine and leucine incorporation. Soil Biol. Biochem. 25, 943–950.
(51) White, D.C., Ringelberg, D.B., 1998. Signature lipid biomarker analysis. In: Burlage, R.S., Atlas, R.M., Stahl, D.A., Geesey, G., Sayler, G.S. (Eds), Techniques in Microbial Ecology. Oxford University Press, New York, pp. 255–272.
(52) Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. Biol. Fertil. Soils 29, 111–129.
(53) Tunlid, A., White, D.C., 1991. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status and metabolic activity of microbial communities in soil.

In: Bollag, J.-M., Stotzky, G. (Eds), Soil Biochemistry. Marcel Dekker, New York, pp. 229–262.
(54) Bardgett, R.D., McAlister, E., 1999. The measurement of soil fungal: bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. Biol. Fertil. Soils 29, 282–290.
(55) Pennanen, T., 2001. Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH – a summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog (R) and H-3-thymidine incorporation methods in field studies. Geoderma 100, 91–126.
(56) Bundy, J.G., Paton, G.I., Campbell, C.D., 2001. Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. J. Appl. Microbiol. 91, 1–13.
(57) Van Elsas, J.D., Smalla, K., 1995. Extraction of microbial community DNA from soils. In: Akkermans, A.D.L., Van Elsas, J.D., De Bruijn, F.J. (Eds), Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 1.3.3.1–1.3.3.11.
(58) Griffiths, B.S., Ritz, K., Bardgett, R.D., Cook, R., Christensen, S., Ekelund, R., Sφrensen, S.J., Bεεth, E., Bloem, J., De Ruiter, P.C., Dolfing, J, Nicolardot, B., 2000. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity ecosystem function relationship. Oikos 90, 279–294.
(59) Winding, A., 1994. Finger printing bacterial soil communities using Biolog micro titer plates. In: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K.E. (Eds), Beyond the Biomass. Wiley-Sayce, London, pp. 85–94.
(60) Garland, J.L., 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. FEMS Microbiol. Ecol. 24, 289–300.
(61) Degens, B.P., Harris, J., 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. Soil Biol. Biochem. 29, 1309–1320.
(62) Dahlin, S., Witter, E., Mεrtensson, A., Turner, A., Baath, E., 1997. Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal contamination. Soil Biol. Biochem. 29, 1405–1415.
(63) Wardle, D.A., Ghani, A., 1995. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. Soil Biol. Biochem. 27, 1601–1610.White, D.C., 1993. In-situ measurement of microbial biomass, community structure and nutritional status. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A – Mathematical Physical and Engineering Sciences 344, 59–67.
(64) Blanck, H., Wangberg, S.A., Molander, S., 1988. Pollution-induced community tolerance. A new ecotoxicological tool. In: Cairns, J.J., Pratt, J.R. (Eds), Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals, ASTM STP 988, 1986, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 219–230.
(65) Van Beelen, P., Fleuren-Kemila, A.K., Aldenberg, T., 2001. The relation between extrapolated risk, expressed as potentially affected fraction, and community effects, expressed as pollution-induced community tolerance. Environ. Toxicol. Chem. 20, 1133–1140.
(66) Rutgers, M., Sweegers, B.M.C., Wind, B., Veen, R.P.M. van, Folkerts, A.J., Posthuma, L., Breure, A.M. 1998a. Pollution induced community tolerance in soil microbial populations. In: Contaminated Soil '98, Vol. I. Thomas Telford, London, pp. 337–343.

(67) Rutgers, M., Van ‘t Verlaat, I., Wind, B., Posthuma, L., Breure, A.M., 1998b. Rapid method for assessing pollution-induced community tolerance in contaminated soil. Environ. Toxicol. Chem. 17, 2210–2213.
(68) Baah, E., Dvaz-Ravina, M., Frostegard, E, Campbell, C. 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. Appl. Environ. Microbiol. 64, 238–245.
(69) Baath, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). Water
Air Soil Poll. 47, 335–379.
(70) Anderson, T.-H., Domsch, K.H., 1986. Carbon link between microbial biomass and soil organic matter. In: Megusar, F., Ganter, M. (Eds), Proceedings of the Fourth International Symposium on Microbial Ecology. Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, Jugoslavia, pp. 467–471.
(71) Baath, E., 1992. Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria after homogenization-centrifugation. Soil Biol. Biochem. 24, 1167–1172.
(72) Nordgren, A., Kauri, T., Baath, E., Soderstrom, B., 1986. Soil microbial activity, mycelial lengths and physiological groups of bacteria in a heavy metal polluted area. Environ. Poll. 41, 89–100.
(73) Pennanen, T., Frostegard, E., Fritze, H., Baath, E., 1996. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. Appl. Environ. Microbiol. 62, 420–428.
(74) Korthals, G.W., Alexiev, A.D., Lexmond, T.M., Kammenga, J.E., Bongers, T., 1996. Long-term effects of copper and pH on the nematode community in an agroecosystem. Environ. Toxicol. Chem. 15, 979–985.
(75) Vangronsveld, J., Van Assche, F., Clijsters, H., 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. Environ. Pollut. 87, 51–59.
(76) Killham, K., 1985. A physiological determination of the impact of environmental stress on the activity of microbial biomass. Environ. Poll. 38, 283–294.
(77) Frostegard, E., Tunlid, A., Baath, E., 1996. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. Soil Biol. Biochem. 28, 55–63.
(78) Griffiths, B.S., Dvaz-Ravina, M., Ritz, K., Mcnicol, J.W., Ebblewhite, N., Bεεth, E., 1997. Community DNA hybridisation and %G+C profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils. FEMS Microbiol. Ecol. 24, 103–112.
(79) Baath, E., Frostegard, E., Dvaz-Ravina, M., Tunlid, A., 1998b. Microbial community-based measurements to estimate heavy-metal effects in soil: the use of phospholipid fatty acid patterns and bacterial community tolerance. AMBIO 27, 58–61.
(80) Sandaa, R.-A., Torsvik, V., Enger, , Daae, F.L., Castberg, T., Hahn, D., 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. FEMS Microbiol. Ecol. 30, 237–251.

ΑΣΠΟΝΔΥΛΑ

(81) Couillard, D. & Lefebre, Y., 1985. Analysis of water quality indices. Journal of Environmental Management, 21, 161-179.
(82) Kolkwitz, R. & Marsson, M., 1902. Grundsatze fur die biologische beurteilung des wassers nach seiner flora und fauna. Mitt. Prufungsanst. Wasserversorg. Abswasserrein., 1, 33-72.
(83) Liebmann, H., 1962. Hanbuchc der frischwasser und abwasser biologie. Vol 1, 2nd Ed, R. Oldenburg, Munchen, 588.
(84) Sladecek, V., 1973. Systems of water quality from the biological point of view. Arch. Hydrobiol. Beih., 7, 1-218.
(85) Richardson, R.E., 1928. The bottom fauna of the middle Illinois river 1913-1925: its distribution, abundance, variation and indexvalue in the study of stream pollution. Bull. Illinois State National History Survey, 17, 387-475.
(86) Bartch, A.F. & Ingram, W.M., 1966. Biological analysis of water pollution in North America. Verhandlungen Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewadte Limnologie, 16, 786-800.
(87) Tittitzer, T.G., 1976. Comparative study of biological-ecological water quality assessment methods. Practical demonstration of the river Main (June 1975). Summary Report. Comparison of biological-ecological procedures for assessment of water quality. In: Principles and methods for determining ecological criteria on hydrocoenoses. Amavis, R. & Smeets, I. (Eds). Pergamon Press. Oxford, pp. 403-463.
(88) Woodiwiss, F.S., 1978. Comparative study of biological-ecological water quality assessment methods. Second practical demonstration. Summary Report. Commission of the European communities.
(89) Ghetti, P.F. & Bonazzi, G., 1980. 3rd technical seminar "Biological water assessment methods: Torrente Parma, Torrente Stirone, Fiume Po". Final Report, Commission of the European communities.
(90) Coull, B.C., Palmer, M.A., 1984. Field experimentation in meiofaunal ecology. Hydrobiologia 118, 1–19.
(91) Fenchel, T., 1978. The ecology of micro and meiobenthos. Annual Review of Ecology and Systematics 9, 99–121.
(92) Coull, B.C., Chandler, G.T., 1992. Pollution and meiofauna: field, laboratory and mesocosm studies. Oceanography and Marine Biology Annual Reviews 30, 191–271.
(93) Ferris, V.R., Ferris, J.M., 1979. Thread worms (Nematoda). In: Pollution Ecology of Estuarine Invertebrates. Academic Press, London, pp. 1–33.
(94) Kennedy, A.D., Jacoby, C.A., 1999. Biological indicators of marine environmental health: meiofauna – a neglected benthic component? Environmental Monitoring and Assessment 54, 47–68.
(95) Moore, C.G., Bett, B.J., 1989. The use of meiofauna in marine pollution impact assessment. Zoological Journal of the Linnean Society 96, 263–280.
(96) Heip, C., 1980. Meiobenthos as a tool in the assessment of marine environmental quality. Rapport et Proces Verbaux des Reunins Conseils Permanant International pour l'Exploration de la Mer 179, 182–187.
(97) Trett, M.W., Calvo-Urbano, B., Forster, S.J., Hutchinson, J.D., Feil, R.L., Trett, S.P., Best, J.G., 2000. Terrestrial meiofauna and contaminated land assessment. Environmental Science and Technology 34, 1594–1602.
(98) Heip, C., Vincx, M., Vranken, G., 1985. The ecology of marine nematodes. Oceanography and Marine Biology Annual Reviews 23, 399–489.

(99) Traunspurger, W., 2002. Freshwater nematodes: biology and ecology. In: Rundle, S.D., Robertson, A., Schmid-Araya, J. (Eds), Freshwater Meiofauna: Biology and Ecology. Backhuys, London.
(100) Prejs, K., 1977. The species diversity, numbers and biomass of benthic nematodes in central part of lakes with different trophy. Ecologia Polska 25, 31–44.
(101) Traunspurger, W., 1996a. Distribution of benthic nematodes in the littoral of an oligotrophic lake (Konigssee, Nationalpark Berchtesgaden, FRG). Archiv fur Hydrobiologie 135, 393–412.
(102) Traunspurger, W., 1996b. Distribution of benthic nematodes in the littoriprofundal of an oligotrophic lake (Konigssee, Nationalpark Berchtesgaden, FRG). Archiv fur Hydrobiologie 135, 557–575.
(103) Anderson, R.V., 1992. Free-living nematode associations in Pool 19, Mississippi river. Journal of Freshwater Biology 7, 243–250.
(104) Traunspurger, W., 2000. The biology and ecology of lotic nematodes. Freshwater Biology 44, 29–45.
(105) Yeates, G.W., 1981. Nematode populations in relation to soil environmental factors: a review. Pedobiologia 22, 312–338.
(106) Andrassy, I., 1992. A short census of free-living nematodes. Fundamental and Applied Nematology 15, 187–188.
(107) Traunspurger, W., Bergtold, M., Goedkoop, W., 1997. The effect of nematodes on bacterial activity and abundance in a freshwater sediment. Oecologia 112, 118–122.
(108) Yeates, G.W., Bongers, T., De Goede, R.G.M., Freckman, D.W., Georgieva, S.S., 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera – an outline for soil ecologists. Journal of Nematology 25, 315–331.
(109) Stenersen, J., Brekke, E., Engelstad, F., 1992. Earthworms for toxicity testing: species differences in response towards cholinesterase inhibiting insecticides. Soil Biol. Biochem. 24, 1761–1764.
(110) Goven, A.J., Fitzpatrick, L.C., Venables, B.J., 1994. Chemical toxicity and host defense in earthworms – an invertebrate model. Ann. N. Y. Acad. Sci. 712, 280–300.
(111) Abdul Rida, A.M.M., Bouchı, M.B., 1995. Earthworm contribution to ecotoxicological assessments. Acta Zool. Fennica 196, 307–310.
(112) Bunn, K.E., Thompson, H.M., Tarrant, K.A., 1996. Effects of agrochemicals on the immune systems of earthworms. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57, 632–639.
(113) Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., 1998. The use of earthworms in ecotoxicological evaluation and risk assessment: new approaches. In: Edwards, C.A. (Ed.), Earthworm Ecology. St. Lucie, Boca Raton, pp. 273–293.
(114) Cortet, J., Gomot-De Vauflery, A., Poinsot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D., 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. Eur. J. Soil Biol. 35, 115–134.
(115) Prygiel, J., Rosso-Darmet, A., Lafont, M., Lesniak, C., Durbec, A., Ouddane, B., 2000. Use of oligochaete communities for assessment of ecotoxicological risk in fine sediment of rivers and canals of the Artois-Picardie water basin (France). Hydrobiologia 410, 25–37.
(116) Didden, W., Rombke, J., 2001. Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems. Ecotoxicol. Environ. Safety 50, 25–43.

ΜΑΛΑΚΙΑ

(117) Gruner, H.-E. (Ed.), 1993. Lehrbuch der Speziellen Zoologie. Vol. 1: Wirbellose Tiere. Vol. 1, Part 3: Mollusca, Sipunculida, Echgiurida, Annelida, Onychophora, Tardigrada, Pentastomida, 5th edn. Gustav Fischer Verlag, Jena.
(118) Gruner, H.-E., Hannemann, H.-J., Hartwich, G., Kilias, R., 1993. Urania-Tierreich. Wirbellose Tiere. Urania-Verlag, Leipzig.
(119) Hyman, L.H., 1967. The Invertebrates, Vol. VI, Mollusca I. McGraw-Hill, New York.
(120) Purchon, R.D., 1968. The Biology of the Mollusca. Pergamon Press, Oxford.
(121) Gotting, K.-J., 1996. Mollusca, Weichtiere. In: Westheide, W., Rieger, R. (Eds), Spezielle Zoologie. 1. Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 276–330.
(122) Markert, B., Wappelhorst, O., Weckert, V., Herpin, U., Siewers, U., Friese, K., Breulmann, G., 1999. The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 240, 425–429.
(123) Goldberg, E.D., 1975. The mussel watch – a first step in global marine monitoring. Marine Pollution Bulletin 6, 111.
(124) Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Riseborough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 1978. The mussel watch. Environmental Conservation 5, 101–126.
(125) Fioroni, P., 1981. Einfóhrung in die Meereszoologie. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.
(126) Heller, J., 1990. Longevity in molluscs. Malacologia 31, 259–295.
(127) Powell, E.N., Cummins, H., 1985. Are molluscan maximum life spans determined by long-term cycles in benthic communities? Oecologia 67, 177–182.
(128) Jones, D., 1983. Sclerochronology: reading the record of the molluscan shell. American Scientist 71, 384–391.
(129) Bauer, G., 1987. Reproductive strategy of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. Journal of Animal Ecology 56, 691–701.
(130) Jungbluth, J.H., von Knorre, D., 1995. Rote Liste der Binnenmollusken [Schnecken (Gastropoda) und Muscheln (Bivalvia)] in Deutschland. Mitteilungen der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft 56/57, 1–17.
(131) Waldın, H.W., 1986. Endangered species of land molluscs in Sweden and Madeira. In: Kay, E.A. (Ed.), The conservation biology of molluscs. Proceedings of a symposium held at the 9th International Malacological Congress, Edinburgh, Scotland. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) and Species Survival Commission (SSC), New York, pp. 19–24.
(132) Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A., 2008, *The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutantinduced stress syndrome in sentinel organisms*, Comp. Biochem. Phys. C, 146 (3)
(133) Frazier, J.M., 1975. The dynamics of metals in the American oyster, *Crassostrea virginica*. I. Seasonal effects. Chesapeake Science 16, 162–171.
(134) Frazier, J.M., 1976. The dynamics of metals in the American oyster, *Crassostrea virginica*. II. Environmental effects. Chesapeake Science 17, 188–197.
(135) Anderson, R.V., 1977. Contamination of cadmium, copper, lead, and zinc in six species of freshwater clams. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 18, 492–496.

(136) Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H., 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. Marine Pollution Bulletin 26, 593–601.
(137) Boening, D.W., 1999. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. Environmental Monitoring and Assessment 55, 459–470.
(138) Elder, J.F., Collins, J.J., 1991. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 122, 36–79.
(139) McKinney, J.D., Rogers, R., 1992. Metal bioavailability. Environmental Science and Technology 26, 1298–1299.
(140) Fishelson, L., Bresler, V., Manelis, R., Zuk-Rimon, Z., Dotan, A., Hornung, H., Yawetz, A., 1999. Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment. The Science of the Total Environment 226, 121–131.
(141) Gregory, M.A., George, R.C., Marshall, D.J., Anandraj, A., McClug, T.P., 1999. The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). Marine Pollution Bulletin 39, 116–121.
(142) Avelar, W.E.P., Mantelatto, F.L.M., Tomazelli, A.C., Silva, D.M.L., Shuhama, T., Lopes, J.L.C., 2000. The marine mussel *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) as an indicator of contamination by heavy metals in the Ubatuba Bay, Sao Paulo, Brazil. Water, Air and Soil Pollution 118, 65–72.
(143) Sarkar, S.K., Bhattachaya, B., Debnath, S., 1994. The suitability of tropical marine bivalves as biomonitors of heavy metals in deltaic Sundarbans, northeast India. Chemosphere 29, 759–770.
(144) Szefer, P., Geldon, J., Ali, A.A., Osuna, F.P., Ruiz-Fernandes, A.C., Galvan, S.R.G., 1998. Distribution and association of trace metals in soft tissue and byssus of *Mytella strigata* and other benthal organisms from Mazatlan harbour, Mangrove lagoon of the northwest coast of Mexico. Environment International 24, 359–374.
(145) Boisson, F., Cotret, O., Fowler, S.W., 1998. Bioaccumulation and retention of lead in the mussel *Mytilus galloprovincialis* following uptake from seawater. The Science of the Total Environment 222, 55–61.
(146) Regoli, F., Orlando, E., 1999. Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment. Marine Pollution Bulletin 28, 592–600.
(147) Zatta, P., Gobbo, S., Rocco, P., Perazzolo, M., Favarato, M., 1992. Evaluation of heavy metal pollution in the Venetian lagoon by using *Mytilus galloprovincialis* as biological indicator. The Science of the Total Environment 119, 29–41.
(148) Hung, T.C., Meng, P.J., Han, B.C., Chuang, A., Huang, C.C., 2001. Trace metals in different species of Mollusca, water and sediments from Taiwan coastal area. Chemosphere 44, 833–841.
(149) Blasco, J., Arias, A.M., Sαenz, V., 1999. Heavy metals in organisms of the River Guadalquivir estuary: possible incidence of the Aznalcollar disaster. The Science of the Total Environment 242, 249–259.
(150) Geyer, H., Freitag, D., Korte, F., 1984. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the marine environment, particularly in the Mediterranean. Ecotoxicology and Environmental Safety 8, 129–51.
(151) Stephenson, M.D., Martin, M., Tjeerdema, R.S., 1995. Long-term trends in DDT, polychlorinated biphenyls, and chlordane in California mussels. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 28, 443–450.

(152) Villeneuve, J.P., Carvalho, F.P., Fowler, S.W., Cattini, C., 1999. Levels and trends of PCBs, chlorinated pesticides and petroleum hydrocarbons in mussels from the NW Mediterranean coast: comparison of concentrations in 1973/1974 and 1988/1989. The Science of the Total Environment 237–238, 57–65.
(153) Szefer, P., Ali, A.A., Ba-Haroon, A.A., Rajeh, A.A., Geldon, J., Nabrzyski, M., 1999. Distribution and relationships of selected trace metals in molluscs and associated sediments from the Gulf of Aden, Yemen. Environmental Pollution 106, 299–314.
(154) Bryan, G.W., Potts, G.W., Forster, G.R., 1977. Heavy metals in the gastropod mollusc *Haliotis tuberculata* (L.). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 57, 379–390.
(155) Bryan, G.W., Langston, W.J., Hummerstone, L.G., Burt, G.R., Ho, Y.B., 1983. An assessment of the gastropod, *Littorina littorea*, as an indicator of heavy-metal contamination in United Kingdom estuaries. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 63, 327–345.
(156) Bryan, G.W., Langston, W.J., Hummerstone, L.G., Burt, G.R., 1985. A guide to the assessment of heavymetal contamination in estuaries using biological indicator. Occasional Publications of the Marine Biological Association of the United Kingdom 4, 1–92.
(157) Kang, S.G., Choi, M.S., Oh, I.S., Wright, D.A., Koh, C.H., 1999. Asessment of metal pollution in Onsan Bay, Korea using Asian periwinkle *Littorina brevicula* as a biomonitor. The Science of the Total Environment 234, 127–137.
(158) Kang, S.G., Wright, D.A., Koh, C.H., 2000. Baseline metal concentration in the Asian periwinkle *Littorina brevicula* employed as a biomonitor to assess metal pollution in Korean coastal water. The Science of the Total Environment 263, 143–153.
(159) Campanella, L., Conti, M.E., Cubadda, F., Sucapane, C., 2001. Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean. Environmental Pollution 111, 117–126.
(160) Walsh, K., Dunstan, R.H., Murdoch, R.N., Conroy, B.A., Roberts, T.K., Lake, P., 1994. Bioaccumulation of pollutants and changes in population parameters in the gastropod mollusk *Austrocochlea constricta*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 26, 367–373.
(161) Walsh, K., Dunstan, R.H., Murdoch, R.N., 1995. Differential bioaccumulation of heavy metals and organopollutants in the soft tissue and shell of the marine gastropod, *Austrocochlea constricta*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 28, 35–39.
(162) Camusso, M., Balestrini, R., Muriano, F., Mariani, M., 1994. Use of freshwater mussel *Dreissena polymorpha* to assess trace metal pollution in the lower river Po (Italy). Chemosphere 29, 729–745.
(163) Renaud, C.B., Kaiser, K.L.E., Comba, M.E., Metcalfe-Smith, J.L., 1995. Comparison between lamprey ammocoetes and bivalve mollusks as biomonitors of organochlorine contaminants. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 52, 376–282.
(164) Abd Allah, A.T., Thompson, S.N., Borchardt, D.B., Wanas, M.Q.A., 1999. *Biomphalaria glabrata*: A laboratory model illustrating the potential of pulmonate gastropods as freshwater biomonitors of heavy metal pollutants. Malocologia 41, 345–353.
(165) Flessas, C., Couillard, Y., Pinel-Alloul, B., St-Cyr, L., Campbell, P.G.C., 2000. Metal concentrations in two freshwater gastropods (Mollusca) in the St. Lawrence

River and relationships with environmental contamination. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 57, 126–137.
(166) Hameed, P.S., Shaheed, K., Iyengar, M.A.R., 1996. 228Radium in the Kaveri river ecosystem. Current Science 70, 1076–1080.
(167) Desy, J.C., Archambault, J.F., Pinel-Alloul, B., Hubert, J., Campbell, P.G.C., 2000. Relationships between total mercury in sediments and methyl mercury in the freshwater gastropod prosobranch *Bithynia tentaculata* in the St. Lawrence River, Quebec. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 57, 164–173.
(168) Klein, R., 1999. Retrospektive Wirkungsforschung mit lagerfδhigen Umweltproben. In: Oehlmann, J., Markert, B. (Eds), Φkotoxikologie – φkosystemare Ansδtze und Methoden. Ecomed, Landsberg, pp. 285–293.
(169) Weis, P., Weis, J., Couch, J., 1993. Histopathology and bioaccumulation in oysters *Crassostrea virginica* living on wood preserved with chromated copper arsenate. Diseases of Aquatic Organisms 17, 41.
(170) Rossbach, M., Kniewald, G., 1997. Concepts of marine specimen banking. Chemosphere 34, 1997–2010.
(171) Goldberg, E.D., Bertine, K.K. 2000. Beyond the mussel watch – new directions for monitoring marine pollution. The Science of the Total Environment 247, 165–174.
(172) Forbes VE and Forbes TL. 1994. Ecotoxicology in Theory and Practice. Chapman and Hall, London, UK
(173) Metcalfe-Smith JL. 1994. Influence of species and sex on metal residues in freshwater mussels (family unionidae) from the St. Lawrence river, with implications for biomonitoring programs. Environ Toxicol Chem 13(9):1433-43
(174) Widdows J and Donkin P. 1992. Mussels and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects. In: Gosling EM (ed), The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands
(175) Salazar MH and Salazar SM. 1996. Mussels as bioindicators: Effects of TBT on survival, bioaccumulation, and growth under natural conditions. In: Champ MA and Seligman PF (eds), Organotin, pp 305-30. Chapman & Hall, London, UK
(176) Sabaliunas D, Lazutka J, Sabaliuniene I, *et al*. 1998. Use of semipermeable membrane devices for studying effects of organic pollutants: Comparison of pesticide uptake by semipermeable membrane devices and mussels. Environ Toxicol Chem 17(9):1815-24
(177) Baussant T, Sanni S, Jonsson G, *et al*. 2001. Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil. Environ Toxicol Chem 20(6):1175- 84
(178) Seed R and Suchanek TH. 1992. Population and community ecology of *Mytilus*. In: Gosling EM (ed), The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands
(179) Fong PP, Duncan J, and Ram JL. 1994. Inhibition and sex-specific induction of spawning by serotonergic licands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). Experientia 50(5):506- 9
(180) Fong PP, Kyozuka K, Duncan J, *et al*. 1995. The effect of salinity and temperature on spawning and fertilization in the Zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas) from North America. Biol Bull 189:320-9
(181) Daubenschmidt C, Dietrich DR, and Schlatter C. 1997. Esterases in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: Activities, inhibition and binding to organophosphates. Aquat Toxicol 37:295- 305

(182) Smolders R., Bervoets L., Wepener V., Blust R., 2003. A Conceptual Framework for Using Mussels as Biomonitors in Whole Effluent Toxicity. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal. 9:3,741 — 760
(183) Roditi HA, Fisher NS, and Sanudo-Wilhelmy SA. 2000. Field testing a metal bioaccumulation model for zebra mussels. Environ Sci Technol 34:2817-25

(184) Falkenmark, M., Allard, B., 1991. Water quality genesis and disturbances of natural freshwaters. In: Hutzinger, O. (Ed.), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 5, Part A, Water Pollution. Springer Verlag, Berlin, pp. 45–78.
(185) Dynesius, M., Nilsson, C., 1994. Fragmentation and flow regulation of river systems in the northern third of the world. Science 266, 753–762.
(186) Rahel, F.J., 2000. Homogenization of fish faunas across the United States. Science 288, 854–856.
(187) Karr, J.R., 1991. Biological integrity: a long neglected aspect of water resource management. Ecol. Appl. 1, 66–84.
(188) Noss, R.F., 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. Conserv. Biol. 4, 355–364.
(189) Markert, B., 1994. Biomonitoring – Quo vadis. UWSF-Z. Umweltchem. Okotox. 6 (3), 145–149.
(190) Fritsch, A.J., 1872. Die Wirbeltiere Bohmens. Ein Verzeichnis aller bisher in Bohmen beobachteten
Saugetiere, Vogel, Amphibien und Fische. Archiv fór die naturwissenschaftliche Landesdurchforschung
von Bohmen 2 (2), 1–152.
(191) Thienemann, A., 1912. Der Bergbach des Sauerlandes – Faunistische Untersuchungen. Internat. Revue ges. Hydrobiol. Suppl. 4, 1–125.
(192) Thienemann, A., 1925. Die Binnengewasser Mitteleuropas. Die Binnengewasser, Band 1. Scheizerbart'sche
Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
(193) Cairns, J., McCormick, P.V., Niederlehner, B.R., 1993. A proposed framework for developing indicators of ecosystem health. Hydrobiologia 263, 1–44.
(194) Chovanec, A., Spindler, T., 1997. Zur Verwendung von Fischen als Bioindikatoren in Φsterreich. In: Spindler, T., Fischfauna in Φsterreich. Φkologie – Gefδhrdung – Bioindikation – Fischerei – Gesetzgebung. Monographien des Umweltbundesamtes, Band 87, Wien, pp. 76–86.
(195) Boon, P.J., Davies, B.R., Petts, G.E., 2000. Global perspectives on river conservation. Science, policy and practice. Wiley, Chichester.
(196) Schiemer, F., 2000. Fish as indicators for the assessment of the ecological integrity of large rivers. Hydrobiologia 422/423, 271–278.
(197) Schmutz, S., Kaufmann, M., Vogel, B., Jungwirth, M., Muhar, S., 2000. A multi-level concept for fishbased, river-type-specific assessment of ecological integrity. Hydrobiologia 422/423, 279–289.
(198) Schiemer, F., Keckeis, H. (Eds), 2001. 0+ fish as indicators of the ecological status of large rivers. Riverine 0+ fish workshop. Arch. Hydrobiol. Suppl. 135/2–4, Large Rivers 12, 105–522.
(199) Schiemer, F., Spindler, T., Wintersberger, H., Schneider, A., Chovanec, A., 1991. Fish fry associations: important indicators for the ecological status of large rivers. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24,
2497–2500.
(200) Keckeis, H., Frankiewicz, P., Schiemer, F., 1996. The importance of inshore areas for spawning nase *Chondrostoma nasus* (Cyprinidae) in a free-flowing section of a large river (Danube, Austria). Arch. Hydrobiol. Suppl. 113, Large Rivers 10, 51–64.

(201) Jungwirth, M., 1998. River continuum and fish migration – going beyond the longitudinal river corridor in understanding ecological integrity. In: Jungwirth, M., Schmutz, S., Weiss, S. (Eds), Fish Migration and Fish Bypasses. Fishing News Books, Oxford, pp. 19–32.
(202) Chovanec, A., Schiemer, F., Waidbacher, H., Spolwind, R., 2002. Rehabilitation of a heavily modified river section of the Danube in Vienna (Austria): biological assessment of landscape linkages on different scales. Internat. Rev. Hydrobiol. 87 (2/3), 183–195.
(203) Waidbacher, H.G., Haidvogl, G., 1998. Fish migration and fish passage facilities in the Danube: past and present. In: Jungwirth, M., Schmutz, S., Weiss, S. (Eds), Fish Migration and Fish Bypasses. Fishing News Books, Oxford, pp. 85–98.
(204) Muhar, S., Schwarz, S., Schmutz, S., Jungwirth, M., 2000. Identification of rivers with high and good habitat quality: methodological approach and applications in Austria. Hydrobiologia 422/423, 343–358.
(205) Halbwachs, G., Arndt, U., 1992. Mφglichkeiten und Grenzen der Bioindikation. VDI-Berichte 901, 7–15.
(206) Yoder, C.O., Rankin, E.T., 1995. Biological criteria program development and implementation in Ohio. In: Davis, W.S., Simon, T.P. (Eds), Biological Assessment and Criteria – Tools for Water Resource Planning and Decision Making. Lewis, Boca Raton, pp. 109–144.
(207) Chovanec, A., Koller-Kreimel, V., 1999. Indikatoren einer nachhaltigen Nutzung von Oberflachengewassern. In: Federal Environment Agency Vienna Umweltbundesamt Wien (Ed.), Umweltindikatoren fur Osterreich – Regionale und nationale Mazahlen zur Dokumentation der Umweltsituation auf dem Weg zu einer nachhaltigen Entwicklung. Conference Papers, Tagungsberichte Vol. 26, pp. 38–52.
(208) Karr, J.R., Chu, E.W., 1999. Restoring Life in Running Waters. Better Biological Monitoring. Island Press, Washington, DC.
(209) Chovanec, A., Schiemer, F., Cabela, A., Gressler, S., Grφtzer, C., Pascher, K., Raab, R., Teufl, H., Wimmer, R., 2000a. Constructed inshore zones as river corridors through urban areas – the Danube in Vienna: preliminary results. Regul. Rivers: Res. Mgmt. 16, 175–187.
(210) Bryan, G.W., Langston, W.J., 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. Environ. Poll. 76, 89–131.
(211) Wania, F., 1999. On the origin of elevated levels of persistent chemicals in the environment. Environ. Sci. & Pollut. Res. 6, 11–19.
(212) Skielkvale, B.L., Wright, R.F., 1998. Mountain lakes, sensitivity to acid deposition and global climate change. Ambio 27, 280–286.
(213) Spry, D.J., Wiener, J.G., 1991. Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: a critical review. Environ. Pollut. 71, 243–304.
(214) Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C. 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms – a review. Chemosphere 37, 1335–1362.
(215) Tjalve, H., Gottofry, J. 1991. Effects of lipophilic complex formation on the uptake and distribution of some metals in fish. Pharmacol. & Toxicol. 69, 430–439.
(216) Boening, D.W., 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. Chemosphere 40, 1335–1351.
(217) Cuvin-Aralar, M.L.A., Furness, R.W., 1991. Mercury and selenium interaction: a review. Ecotoxicol. And Environ. Safety 21, 348–364.

(218) Kock, G., Hofer, R., 1998. Origin of cadmium and lead in clear softwater lakes of high-altitude and highlatitude, and their bioavailability and toxicity to fish. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds), Fish Ecotoxicology. Birkhauser Verl., Basel, pp. 225–257.
(219) Davies, P.H., Goettl, J.P., Sinley, J.R., Smith, N.F., 1976. Acute and chronic toxicity of lead to rainbow trout, *Salmo gairdenri*, in hard and soft water. Wat. Res. 10, 199–206.
(220) Erickson, R.J., Bills, T.D., Clark, J.R., Hansen, D.J., Knezovich, J.P., Mayer, F.L., McElroy, A.E., 1994. Synopsis of discussion session on physico-chemical factors affecting toxicity. In: Hamelink, J.L., Landrum, P.F., Bergman, H.L., Benson, W.H. (Eds), Bioavailability: Physical, Chemical, and Biological Interactions. Lewis, Boca Raton, pp. 31–38.
(221) Campbell, P.G.C., Stokes, P.M., 1985. Acidification and toxicity of metals of aquatic biota. Can. J. Fish. Aquat. Sci 42, 2034–2049.
(222) Wicklund, A., Runn, P., 1988. Calcium effects on cadmium uptake, redistribution and elimination in minnows, *Phoxinus phoxinus*, acclimated to different calcium concentrations. Aquat. Toxicol. 13, 109–122.
(223) Kock, G., Hofer, R., Wograt, S., 1995. Accumulation of trace metals (Pb, Cd, Cu, Zn) in Arctic char (Salvelinus alpinus) from oligotrophic Alpine lakes: relation to lake alkalinity. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52, 2367–237
(224) McKim, J.M., Erickson, R.J., 1991. Environmental impact on the physiological mechanisms controlling xenobiotic transfer across fish gills. Physiol. Zool. 64, 39–67.
(225) Thomann, R.V., 1989. Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23, 699–707.
(226) Suedel, B.C., Boraczek, J.A., Peddicord, R.K., Clifford, P.A., Dilton, T.M., 1994. Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 136, 21–89.
(227) Mackay, D., Fraser, A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. Environ. Pollut. 110, 375–391.
(228) Geyer, H.J., Scheunert, I., Bróggemann, R., Matthies, M., Steinberg, C.E.W., Zitko, V., Kettrup, A., Garrison, W., 1994. The relevance of aquatic organisms' lipid content to the toxicity of lipophilic chemicals: toxicity of lindane to different fish species. Ecotoxical. Environ. Safety 28, 53–70.
(229) Geyer, H.J., Scheunert, I., Bróggemann, R., Langer, D., R., Korte, F., Kettrup, A., Mansour, M., Steinberg, C.E.W., Nyholm, N., Muir, D.C.G., 1997. Half-lives and bioconcentration of lindane (_-HCH) in different fish species and relationship with their lipid content. Chemosphere 35, 343–351.
(230) Statham, C.N., Melancon, M.J., Lech, J.J., 1976. Bioconcentration of xenobiotics in trout bile: a proposed monitory aid for some waterborne chemicals. Science 193, 680–681.
(231) Pointet, K., Milliet, A., 2000. PAHs analysis of fish whole gall bladders and livers from the Natural Reserve of Camargue by GC/MS. Chemosphere 40, 293–299.
(232) Olson, K.R., Squibb, K., Crusin, R.J., 1978. Tissue uptake, cellular distribution, and metabolism of 14CH3HgCl and CH3 ^{203}HgCl by rainbow trout, Salmo gairdneri. J. Fish. Res. Board Can. 35, 381–390.
(233) Kock, G., Triendl, M., Hofer, R., 1996. Seasonal patterns of metal accumulation in Arctic char (Salvelinus alpinus) from oligotrophic Alpine lakes related to temperature. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 780–786.

(234) McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 2. Tissue specific metal accumulation. Aquat. Toxicol. 50, 245–256.
(235) Shephard K.L., 1994. Functions for fish mucus. Rev. in Fish Biol. and Fisheries 4, 401–429.
(236) Felts, P.A., Heath, A.G., 1984. Interactions of temperature and sublethal environmental copper exposure on the energy metabolism of bluegill, *Lepomis macrochirus*. J. Fish Biol. 25, 445–453.
(237) Kime, D.E., 1998. Endocrine Disruption in Fish. Kluwer Academic, Dordrecht.

(238) B. Inza, F. Ribeyre, A. Boudou, Aquat. Toxicol. 43 (1998) 273.
(239) B. Fraysse, J.P. Baudin, J.G. Laplace, C. Adam, A. Boudou, Environ. Pollut. 118 (2002) 297.
(240) H.A. Rodtti, N.S. Fisher, S.A.S. Wilhelmy, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 2817.
(241) D.R. Lai, Acta Oceanologica Sinica 5 (1983) 230.
(242) S.J. Teh, J.S.L. Clark, C.L. Brown, S.N. Luoma, D.E. Hinton, Biomark 4 (1999) 497.
(243) Y.T. Hao, J.H. Li, X. Pan, Y.X. Ma, X.F. Wang, J. Lake Sci. 13 (2001) 158
(244) Q.F. Zhou, Z.Y. Li, G.B. Jiang, R.Q. Yang, Environ. Pollut. 125 (2003) 301.
(245) H. Yamada, K. Takayanagi, Water Res. 26 (1992) 1589.
(246) R.Q. Yang, Q.F. Zhou, G.B. Jiang, Chemosphere 63 (2006) 1.
(247) C.G. Zhong, S.H. Chen, Y.X. Li, R.W. Xie, Acta Agri. Nucleatae Sinica 17 (2003) 388.
(248) E.O. Farombi, O.A. Adelowo, Y.R. Ajimoko, Int. J. Environ. Res. Public Health 4 (2007) 158.
(249) C. Gundacker, Chemosphere 38 (1999) 3339.
(250) C.K. Yap, A. Ismail, A.R. Ismail, S.G. Tan, Wetland Sci. 4 (2006) 247.
(251) P.T. Lakshmanan, P.N.K. Nambisan, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 43 (1989) 131.
(252) P. Szefer, M. Wolowiez, A. Kusak, J.-M. Deslous-Paoli, W. Czarnowski, K. Frelek, M.-J. Belzunce, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36 (1999) 56.
(253) C.K. Yap, A. Ismail, S.G. Tan, H. Omar, Hydrobiologia 498 (2003) 151.
(254) J. Burger, Environ. Res. 104 (2007) 153.
(255) F. Paez-Osuna, L. Tron-Mayen, Environ. Int. 22 (1996) 443.
(256) V.P. Chelomin, N.O. Lukjanova, E.A. Bobkova, Oceanic and Anthropogenic Controls of Life in the Pacific Ocean, Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 1992, 287.
(257) M.G. Frias-Esperieueta, J.I. Osuna-Lopez, F. Paez-Osuna, Sci. Total Environ. 231 (1999) 115.
(258) D.J.H. Phillips, P.S. Rainbow, Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants, Elsevier Science, London, 1993, p. 371.
(259) G.A. Liehr, M.L. Zettler, T. Leipe, G. Witt, Mar. Biol. (Berlin) 147 (2005) 671.
(260) SEPA, GB/T 12990—91, Water quality-Microbial community biomonitoring-PFU method.
(261) M.S. Henebry, J. Cairns Jr., Trans. Am. Micro. Soc. 99 (1980) 151.
(262) J. Cairns Jr., J.L. Plafkin, R.L. Kaesler, R.L. Lowe, J. Protozool. 31 (1983) 47.
(263) C.S. Yang, W.S. Shu, R. Xu, Z. Lan, Environ. Pollut. Control. 22 (2000) 20.
(264) *Qunfang Zhou, Jianbin Zhang, Jianjie Fu, Jianbo Shi, Guibin Jiang* Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. 2007.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Γραφικές Παραστάσεις.

Γραφική Παράσταση 1. Η κύρια μορφή αποκρίσεων των οργανισμών στα καταστρεπτικά αποτελέσματα της μολυσματικής έκθεσης.

Γραφική Παράσταση 2. Συγκεντρώσεις χαλκού (Cu), καδμίου (Cd) και ψευδαργύρου (Zn) (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) στους μαλακούς ιστούς του στρειδιού *Crassostrea angulata* στο δέλτα του ποταμού Guadalquivir της Ισπανίας, από τον Απρίλιο έως τον Σεπτέμβριο του 1998 μετά το ατύχημα του Aznalcollar το 1998 συγκρινόμενες με τα υπολείμματα τα οποία μετρήθηκαν σε στρείδια από τον ίδιο σταθμό το 1968.

Γραφική Παράσταση 3. Μείωση του Cd (a) και των συγκεντρώσεων Pb (b) στους ιστούς του *Littorina brevicula* συναρτήσει της απόστασης από την είσοδο του ιδιαίτερα μολυσμένου ρεύματος Daejung στο νοτιοανατολικό σημείο της Κορέας.

Γραφική Παράσταση 4. Υψηλή ικανότητα βιοσυσσώρευσης των *Mya arenaria* στη ρύπανση βουτυλίου.

Πίνακες.

Πίνακας 1. Χρονική διαβάθμιση αποκρίσεων βιολογικών συστημάτων και “σήματα” οικοτοξικολογικών βιοδεικτών.

Πίνακας 2. Επιπτώσεις των διαφόρων επιπέδων βιολογικής οργάνωσης στα βιολογικά συστήματα εξαιτίας φθοράς του DNA.

Πίνακας 3. Διαφορετικοί τύποι μεταβολισμού βακτηρίων.

Πίνακας 4. Οικολογικές παράμετροι μολυσμένων εδαφών από μέταλλα. Η μείωση ή η αλλαγή εκφράζεται ως ποσοστό της τιμής στον έλεγχο μη μολυσμένου δείγματος.

Πίνακας 5. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες ομάδες μακροασπονδύλων του γλυκού νερού.

Πίνακας 6. Οι κυριότεροι δείκτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται στις χώρες της Ευρώπης μέχρι την έκδοση της οδηγίας για τα νερά (WFD 2000/60).

Πίνακας 7: Σύνοψη των διαφορετικών τάξεων και υποτάξεων των μαλακίων η οποία δείχνει τον αριθμό των ειδών τους και τη γεωγραφική κατανομή τους.

Πίνακας 8. Όροι που χρησιμοποιούνται στην οικοτοξικολογία.

Πίνακας 9: Διαφορές σε ανεκτικότητα στη μόλυνση των βενθικών μακροασπονδύλων.

Διαγράμματα.

Διάγραμμα 1 και 2. Μειωμένος ρυθμός βακτηριακής ανάπτυξης σε αυξανόμενα επίπεδα μόλυνσης χαλκού στο χώμα. Το ποσοστό ανάπτυξης μετρήθηκε ως ενσωμάτωση της θυμιδίνης και της λευκίνης στο DNA και τις πρωτεΐνες.

Διάγραμμα 3. Μειωμένη βακτηριακή βιομάζα στο χώμα το οποίο μολύνεται με νικέλιο και χρώμιο. Η βακτηριακή βιομάζα μετρήθηκε αυτόματα με την μικροσκόπηση ομοεστιακού λέιζερ-ανιχνευτή και την ανάλυση εικόνας.

Διάγραμμα 4. Η μειωμένη γενετική ποικιλομορφία σε έδαφος μολυσμένο με ψευδάργυρο (10,000 mg Zn kg). Ο αριθμός των DNA δεσμών (κορυφές), ο οποίος λαμβάνεται από την DGGE, είναι 31 στο μολυσμένο έδαφος (+ ZN) και 50 στο αποκαταστημένο έδαφος (- Zn).

Διάγραμμα 5. Αποτελέσματα από το πείραμα PICT το οποίο χρησιμοποιεί δείγματα από μία μολυσμένη περιοχή από ψευδάργυρο κοντά σε ένα χυτήριο ψευδαργύρου (Budel, Ολλανδία):

(a) Διανομή συχνότητας όλων των υπολογισμένων Biolog EC50 τιμών πέντε κοινοτήτων γύρω από το χυτήριο ψευδαργύρου. Όλοι οι δείκτες σε μια καμπύλη δείχνουν τις διαφορετικές μετατροπές υποστρωμάτων Biolog. Οι συνολικές συγκεντρώσεις ψευδάργυρου στα δείγματα και η απόσταση από το χυτήριο υποδεικνύονται στο υπόμνημα.

(b) Εναρμονισμένες κοινοτικές πυκνότητες των μικροβιακών κοινοτήτων (καμπύλες Gauss μη γραμμική παλινδρόμηση, σταθερή περιοχή) βασίζονται στη συχνότητα της διανομής των Biolog EC50 τιμών.

(c) Συνοψισμένα αποτελέσματα από τη μέτρηση PICT της περίπτωσης 1 παρουσιάζει τη μετατόπιση της κοινότητας στην πυκνότητα των τιμών ευαισθησίας σχετικά με την αναφερόμενη περιοχή (που υπολογίζεται από b).

Διάγραμμα 6. Διαφορετικά επίπεδα αποκρίσεων των ψαριών τα οποία εκτίθενται σε τοξικές ουσίες και η χρήση των ψαριών ως βιοδεικτών περιβαλλοντικής ρύπανσης.

Εικόνες.

Εικόνα 1. Τα παγκόσμια σύνθετα οικοσυστήματα (www.cdiac.ornl.gov).

Εικόνα 2. Διάγραμμα θαλάσσιας μόλυνσης (www.saferenvironment.files.wordpress.com).

Εικόνα 3. Η μέθοδος των DNA microarrays (www.pharmaasia.com).

Εικόνα 4. Φθορίζουσα Υβριδικότητα In – Situ (www.biovisible.com).

Εικόνα 5. Διάγραμμα κατανόησης μικροοργανισμών (www.cmex.ihmc.us).

Εικόνα 6. Ανάλυση βακτηριακού DNA με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης (www.ceg.ncl.ac.uk).

Εικόνα 7. Οι μέθοδοι DGGE και TGGE για ανίχνευση SNPs (single-nucleotide polymorphisms) (www.upload.wikimedia.org).

Εικόνα 8. Έντομο της τάξης *plecoptera* (stoneflies) (www.epa.gov).

Εικόνα 9: Έντομο της τάξης *diptera* (midgeflies) στην φάση της προνύμφης και στην ενήλικη φάση (www.epa.gov).

Εικόνα 10. Διάφορα βενθικά μακροασπόνδυλα (από αριστερά προς τα δεξιά: πλεκόπτερο, εφημερόπτερο, τριχόπτερο, οδοντόγναθο, αμφίποδο, σκώληκας) (www.epa.gov).

Εικόνα 11. Το Lumbricidae (σκουλήκι του γένους oligochaerta) (www.animaldiversity.ummz.umich.edu).

Εικόνα 12. Το σκουλήκι Tubificidae (www.waliboo.com).

Εικόνα 13. Το σκουλήκι Enchytraeidae (www.sazp.sk).

Εικόνα 14. *Chiton tuberculatus* της κατηγορίας Polyplacophora (www.cryptosula.nl).

Εικόνα 15. Octopus vulgaris (το κοινό χταπόδι) της κατηγορίας cephalopods (www.cryptosula.nl).

Εικόνα 16. Το κέλυφος του σκαφόποδου *Antalis vulgaris* (www.wpcontent.answers.com).

Εικόνα 17. Epimenia australis της κατηγορίας απλακοφόρα (www.whoi.edu).

Εικόνα 18. *Neopilina* της κατηγορίας μονοπλακοφόρα (www.upload.wikimedia.org).

Εικόνα 19. Το στρείδι *Crassostrea virginica* (www.jjphoto.dk).

Εικόνα 20. Το *Donax trunculus* (www.naturamediterraneo.com).

Εικόνα 21. Το μύδι *Perna perna* (www.idscaro.net).

Εικόνα 22. Το zebra μύδι *Dreissena polymorpha* (www.noticenature.ie).

Εικόνα 23. Ψάρι μέλος της οικογένειας *Clupeidae* (www.floridasportfishing.com).

Εικόνα 24. Το *Anadara granosa* (www.upload.wikimedia.org).

Εικόνα 25. Ενήλικη mayfly (www.almadenelementary.org).

Εικόνα 26. Το ωκεάνιου μυδιού *Arctica islandica L.* (www.fugleognatur.dk).