

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ρύπανση είναι πια προφανής στο θαλάσσιο περιβάλλον (στο νερό, στο ιζήματα ή στους οργανισμούς), ανόργανοι και οργανικοί ρύποι εμφανίζονται σε υψηλά επίπεδα, οδηγώντας κατά συνέπεια στην αλλαγή του οικοσυστήματος. Η μελέτη της θαλάσσιας ρύπανσης είναι ιδιαίτερα σημαντική στα παράκτια και εκβολικά συστήματα, όπου γίνεται η απόρριψη των βιομηχανικών και των αστικών αποβλήτων (Andral *et al.*, 2004).

Οι στρατηγικές που εμφανίζονται για τη μελέτη της θαλάσσιας ρύπανσης είναι ο προσδιορισμός του επιπέδου των ρύπων (μέταλλα, υδρογονάνθρακες, φυτοφάρμακα, κ.λπ.) στο νερό και στο ίζημα και ο προσδιορισμός δηλητηριωδών επιδράσεων των ρύπων στους θαλάσσιους οργανισμούς (Schlenk, 1999).

Τα αποτελέσματα των ρύπων στους θαλάσσιους οργανισμούς μπορούν να αξιολογηθούν σε διαφορετικά επίπεδα βιολογικής οργάνωσης (μοριακό, κυτταρικό, επίπεδο οργανισμού, πληθυσμού, βιοκοινότητας). Η μελέτη των αποτελεσμάτων των ρύπων σε επίπεδο οργανισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη πιθανών συνεπειών σε πιο υψηλά επίπεδα βιολογικής οργάνωσης (Viarengo and Canesi, 1991).

Επομένως, η μέτρηση των βιολογικών επιπτώσεων, που προκαλούνται από τη ρύπανση είναι σημαντική στην περιβαλλοντική εκτίμηση κινδύνου. Στα προγράμματα έρευνας έχουν ενσωματωθεί μέθοδοι για τον προσδιορισμό και τη μέτρηση των ρύπων, προκειμένου να παρασχεθούν πληροφορίες για την επίδραση τους στην υγεία των οργανισμών. Πρόσφατα, έχει υπάρξει μια σημαντική αύξηση της χρήσης των βιοδεικτών. Οι βιοδείκτες βοηθούν στην εκτίμηση των συγκεντρώσεων χημικών ουσιών στα υδρόβια οικοσυστήματα. Η εκτίμηση αυτή στοχεύει στην αξιολόγηση της έκθεσης των φυσικών πληθυσμών στους ρύπους (Moreira and Guilhermino, 2005).

Τα μαλάκια (κυρίως τα μύδια *Mytilus* sp.) και τα ψάρια (*Mullus* sp., *Platichthys flesus* L., *Zoarcetes viviparus*, *Perca* sp.) έχουν υιοθετηθεί ως οργανισμοί «δείκτες» σε μελέτες ρύπανσης σε εθνικό και διεθνές επίπεδο. Τα μαλάκια χρησιμοποιούνται ως οργανισμοί δείκτες με βάση την ευρεία γεωγραφική τους κατανομή, τη διαθεσιμότητά τους στο φυσικό περιβάλλον άλλα και με βάση την προσαρμογή τους σε αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών (Viarengo *et al.*, 2007). Λόγω του τρόπου σιτισής τους, με

διήθηση του νερού, είναι σε θέση να συσσωρεύουν στους ιστούς τους ένα ευρύ φάσμα χημικών και τοξικών ενώσεων (Viarengo and Canesi, 1991). Συγχρόνως όμως η χρήση των ψαριών στα προγράμματα βιοπαρακολούθησης θεωρείται πιο δύσκολη λόγω του κόστους της δειγματοληψίας και της δυσκολίας εγκατάστασης τους σε κλωβούς (Viarengo *et al.*, 2007).

Η εγκατάσταση των οργανισμών σε κλωβούς στις περιοχές μελέτης γίνεται για χρονικό διάστημα 3 έως 4 εβδομάδων, ώστε να μην επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό η φυσιολογία του οργανισμού από τις περιβαλλοντικές αλλαγές. Παρόλα αυτά υπάρχουν μικρές αλλαγές στη θερμοκρασία, στη διαθεσιμότητα τροφής και στην αλατότητα, που μπορούν να δημιουργηθούν κατά τη διάρκεια της μελέτης. Με αυτόν τον τρόπο παρατηρούνται αλλαγές στη φυσιολογία των οργανισμών, οι οποίες είναι αποτέλεσμα των τοξικών και χημικών ουσιών που περιέχονται στο νερό και συσσωρεύονται στους ιστούς των μυδιών (Dellai *et al.*, 2001).

Στα δίθυρα μαλάκια ένας βιοχημικός βιοδείκτης που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η ακετυλοχολινεστεράση (ACHE). Η ακετυλοχολινεστεράση συνδέεται με τη μετάδοση νευρικών παλμών. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως δείκτης νευροτοξικότητας και ως ειδικός βιοδείκτης έκθεσης σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά φυτοφάρμακα (Dailianis *et al.*, 2003). Η ακετυλοχολινεστεράση, επίσης, είναι πιθανό να είναι χρήσιμος βιοδείκτης για το στρες στους υδρόβιους οργανισμούς (Damiens *et al.*, 2007).

Η παρούσα μελέτη έχει στόχο τη σύγκριση του επιπέδου της ρύπανσης μεταξύ παράκτιων περιοχών στον Ελλαδικό χώρο. Το επίπεδο της ρύπανσης μετρήθηκε με βάση τη δραστηριότητα του βιοδείκτη ακετυλοχολινεστεράση. Οι περιοχές αυτές είναι επιβαρυνμένες από διαφορετικές πηγές ρύπανσης. Πρόκειται για περιοχές κοντά σε εκβολές ποταμών, σε βιομηχανικές περιοχές, σε αστικές περιοχές και σε περιοχές που δε ρυπαίνονται άμεσα.

Βιολογία του είδους *Mytilus galloprovincialis*

Το μύδι της Μεσογείου *Mytilus galloprovincialis*, είναι ένα είδος δίθυρου μαλακίου της οικογένειας Mytilidae.



Εικόνα 1: *Mytilus galloprovincialis*
(<http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=W16510>).

Μορφολογία

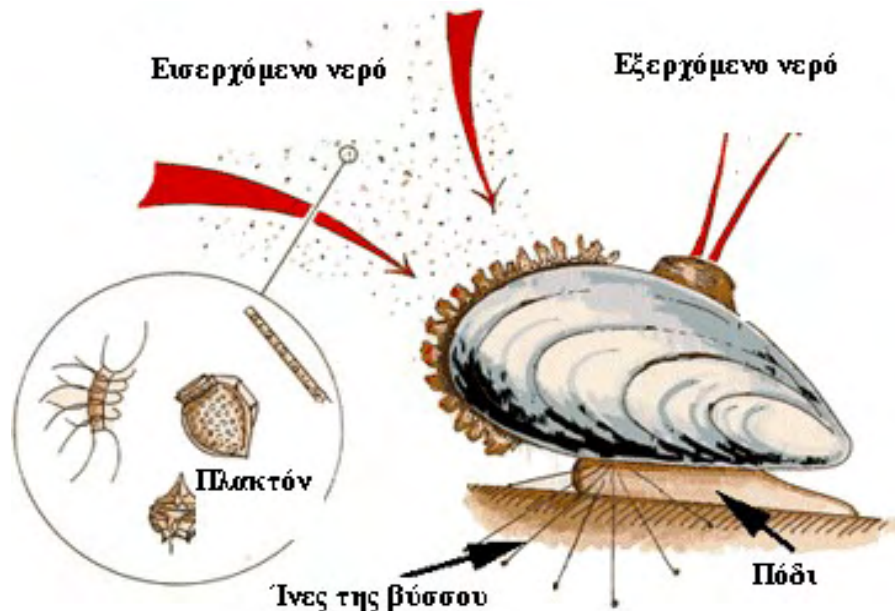
Το είδος αυτό βρίσκεται στη Μεσόγειο και στις νότιες αφρικανικές ακτές. Το μύδι αυτό φτάνει μέχρι και στα 140 cm μήκος. Το όστρακο έχει χρώμα μαύρο με μπλε, η επιφανειά του είναι ομαλή και αποτελείται από δύο θυρίδες. Οι θυρίδες πραγματοποιούν ποικίλες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της υποστήριξης των μαλακών ιστών, της προστασίας από τα αρπακτικά ζώα και της προστασίας ενάντια στη ξήρανση. Τα μύδια ανήκουν στη κατηγορία των δίθυρων με βύσσο, εκκρίνουν ίνες αποτελούμενες από μια πρωτεϊνούχο ουσία, με τις οποίες το μύδι *Mytilus galloprovincialis* στερεώνεται στο βυθό (Hickman *et al.*, 2001).

Διατροφή

Τα μύδια *Mytilus galloprovincialis* τρέφονται διηθώντας το νερό της θάλασσας. Με τον τρόπο αυτό συγκρατούν το πλαγκτόν και μικροσκοπικούς οργανισμούς που πλέουν στο νερό της θάλασσας. Στη συνέχεια βλεφαριδοφόροι οδοί τα οδηγούν σε μικροσκοπικούς πόρους των βραγχίων. Τα αδενικά κύτταρα στα βράγχια και στις χειλικές προσακτρίδες εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες βλέννας, η οποία συγκρατεί αιωρούμενα σωματίδια στο νερό, τα οποία διέρχονται από τους πόρους των βραγχίων. Τα σωματίδια κινούνται κατά μήκος των τροφικών αυλακών προς τις χειλικές προσακτρίδες, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν τις βλεννώδης μάζες στο στόμα (Hickman *et al.*, 2001).

Αναπαραγωγή

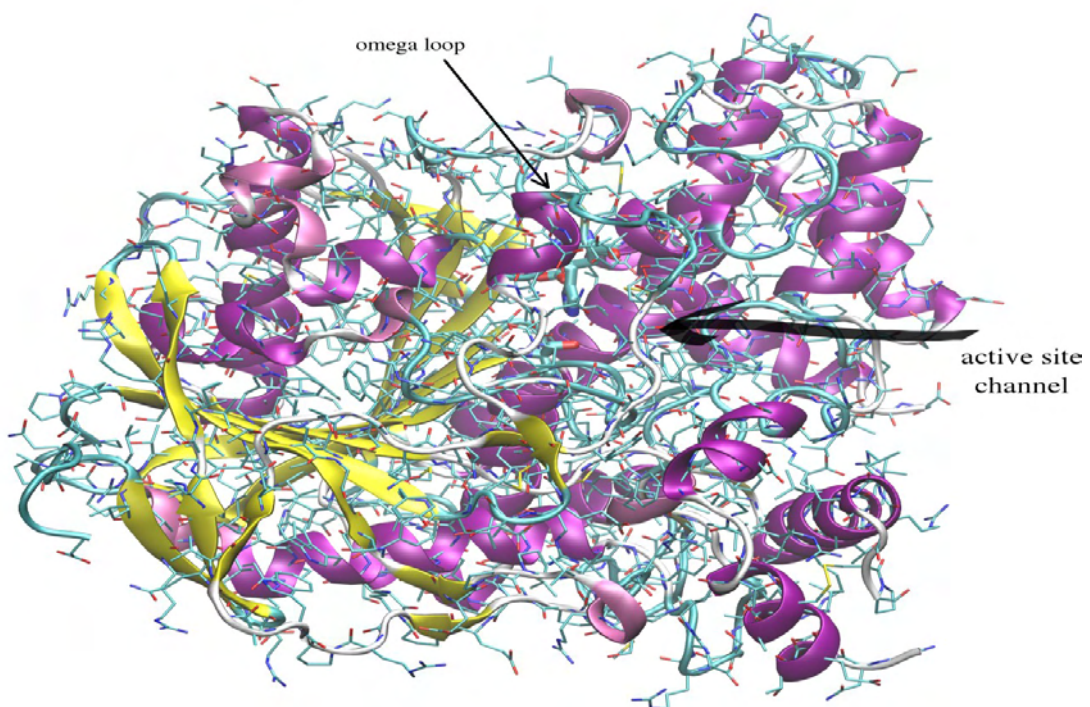
Το μύδια της μεσογείου είναι γονοχωριστικό, υπάρχουν δηλαδή αρσενικά και θηλυκά άτομα. Οι γαμέτες του αποβάλλονται στον υπερβραγχιακό θάλαμο, για να μεταφερθούν στο εξωτερικό περιβάλλον από το νερό που εξέρχεται. Τα μύδια στο λαρβικό στάδιο παρασύρονται για τρεις εβδομάδες έως και έξι μήνες, πριν εγκαθιστούν σε μια σκληρή επιφάνεια (Hickman *et al.*, 2001).



Εικόνα 2: Διατροφή του *Mytilus galloprovincialis*
(http://www.weichtiere.at/english/bivalvia/common_mussel.html)

Η ακετυλοχολινεστεράση

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένα ένζυμο που διασπά (μέσω της υδρόλυσης) το νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, παράγοντας τη χολίνη και μια ομάδα οξικού άλατος. Βρίσκεται κυρίως στις νευρομυϊκές συνδέσεις και τις χολινεργικές συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς η δραστηριότητά της χρησιμεύει στην ολοκλήρωση της μετάδοσης του νευρικού παλμού. Η ακετυλοχολινεστεράση αναπτύσσει μια πολύ υψηλή καταλυτική δραστηριότητα, στη οποία κάθε μορίο της διασπά περίπου 5000 μόρια της ακετυλοχολίνης ανά δευτερόλεπτο.

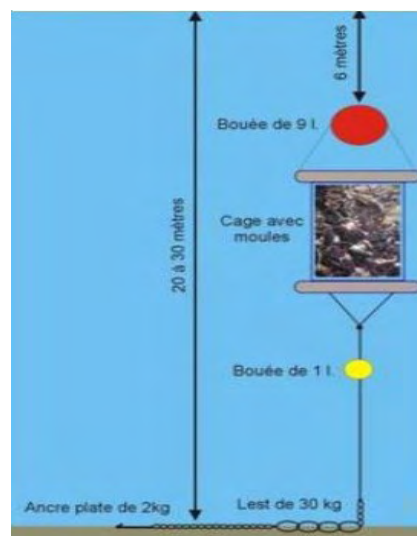


Εικόνα 3: Κρυσταλλική δομή της ακετυλοχολινεστεράσης
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholinesterase>).

Η χολίνη που παράγεται από τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης ανακυκλώνεται και μεταφέρεται πίσω στα τερματικά των νευρών όπου χρησιμοποιείται για να συνθέσει τα νέα μόρια ακετυλοχολίνης. Η ακετυλοχολινεστεράση υπάρχει με πολλές μοριακές μορφές, οι οποίες έχουν παρόμοιες καταλυτικές ιδιότητες, αλλά διαφέρουν στον τρόπο σύνδεσής τους στην επιφάνεια των κυττάρων υποδοχέων (Purves *et al.*, 2008).

Βιοπαρακολούθηση με χρήση μυδιών σε κλωβούς που ποντίζονται στις περιοχές μελέτης

Η μέθοδος αυτή μας δίνει τη δυνατότητα να ελέγχουμε το μέγεθός και την αναπαραγωγική ωρίμανση των οργανισμών-δεικτών. Η συγκέντρωση των ρύπων στο σώμα των οργανισμών είναι στενά συνδεδεμένη με το βιολογικό κύκλο, συμπεριλαμβανομένου της ηλικίας και της σεξουαλικής ωρίμανσης, καθώς επίσης και με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (αλατότητα, θερμοκρασία, τροφικές συνθήκες κ.ά.). Επίσης επηρεάζει το μεταβολισμό και την αύξηση των μυδιών “στόχο”. Αν η συγκέντρωση στους ιστούς είναι συνδεδεμένη με τη συγκέντρωση των υπαρχόντων ρύπων στο περιβάλλοντος, η βιοσυσσώρευση εξαρτάται από τα τροφικά επίπεδα.



Εικόνες 4,5: Τοποθέτηση του κλωβού στη περιοχή μελέτης

(http://wwz.ifremer.fr/envlit/region/provence_alpes_cote_d_azur/qualite/rinbio).

Η μέθοδος βασίζεται στον υπολογισμό του βιοδείκτη σε κάθε περιοχή μελέτης. Με τη χρήση των βιοδεικτών επιτυγχάνεται ομογενοποιημένη και συγκρίσιμη συγκέντρωση ρύπων. Η μεθοδολογία αυτή και η διαχείριση των δεδομένων εφαρμόζονται για να περιοριστεί η παρέμβαση του τροφικού επιπέδου στα αποτελέσματα της βιοσυσσώρευσης. Με την χρήση της μεθόδου σε μεγάλη κλίμακα παίρνουμε στοιχεία ανεξάρτητα από τους φυσικοχημικούς παραμέτρους της τοποθεσίας που μελετάμε (http://wwz.ifremer.fr/envlit/region/provence_alpes_cote_d_azur/qualite/rinbio).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία είναι μέρος του ερευνητικού προγράμματος του Ινστιτούτου Ωκεανογραφίας του Ελληνικού κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) και του Interreg III B MEDOCC, MYTIMED -Développement d'un réseau interrégional de surveillance de la qualité des eaux côtières par des bio-intégrateurs pour la protection durable de la Méditerranée Orientale.

Σταθμοί - Περιοχές Δειγματοληψίας

Οι σταθμοί δειγματοληψίας είναι οι: «Μηλίνα», «Αξιός ποτάμος», «Λάρυμνα», «Νάξος» και «Νέστος ποταμός». Για τις περιοχές της δειγματοληψίας επιλέχθηκαν σταθμοί σε περιοχές που δέχονται διαφορετικά είδη ρύπανσης κοντά σε βιομηχανικές μονάδες (Λάρυμνα), εκβολές ποταμών (Νέστος και Αξιός), καθώς και σταθμοί μακριά από πηγές ρύπανσης ως περιοχές αναφοράς (Νάξος, Μηλίνα).

«Λάρυμνα» (GR 18)

Ο σταθμός βρίσκεται βορειοανατολικά της Λάρυμνας. Η Λάρυμνα είναι ένα παραθαλάσσιο χωριό, χτισμένο στο μυχό του όρμου Λάρμες, 103 χιλιόμετρα νοτιοανατολικά από τη Λαμία. Σε απόσταση τριών χιλιομέτρων από το χωριό βρίσκονται τα μεταλλεία της «Γ.Μ.Μ.ΑΕ ΛΑΡΚΟ», τα μεγαλύτερα της Ελλάδας σε χρωμονικελιούχο μέταλλευμα (<http://hellas.teipir.gr/prefectures/greek/Fthiotidas/Larimna.htm>).



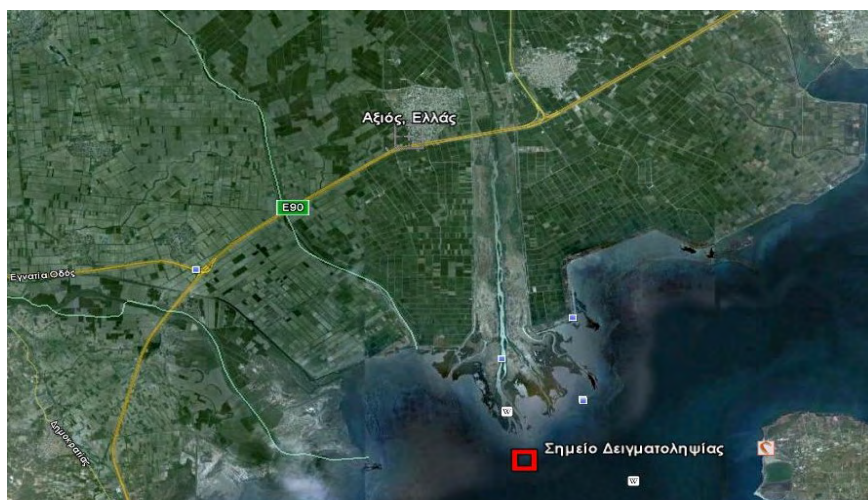
Εικόνα 5: Σημείο δειγματοληψίας στη Περιοχή της Λάρυμνας (Google earth)

Η θαλάσσια περιοχή της Λάρυμνας ρυπαίνεται από απόβλητα καθώς και από τα μεταλλεύματα και τα προϊόντα τους κατά τις δραστηριότητες της μεταλλουργικής μονάδας της «Γ.Μ.Μ.ΑΕ. ΛΑΡΚΟ». Κατά συνέπεια στον όρμο της Λάρυμνας εμφανίζεται ρύπανση από βαρέα μέταλλα. Επιπλέον η περιοχή δέχεται τα λύματα της πόλης της Λάρυμνας (Tsangaris *et al.*, 2007).

«Αξιός ποταμός» (GR 24)

Ο σταθμός βρίσκεται στη θαλάσσια περιοχή που επικοινωνεί με το Δέλτα του Αξιού ποταμού. Ο Αξιός ή Βαρδάρης είναι ο μεγαλύτερος ποταμός που διασχίζει τη Μακεδονία και ο δεύτερος μεγαλύτερος των Βαλκανίων (μετά τον Έβρο), με μήκος 380 χιλιόμετρα, από τα οποία μόνο τα 76 χιλιόμετρα είναι σε ελληνικό έδαφος. Το πλάτος του κυμαίνεται από 50-600 μέτρα και το βάθος του φτάνει τα 4 μέτρα. Πηγάζει από το όρος Σκάρδος (Σάρ), στα σύνορα Σερβίας και Αλβανίας, διασχίζει την κοιλάδα των Σκοπίων, μπαίνει στο ελληνικό έδαφος, διασχίζει τη Μακεδονία και χύνεται στο Θερμαϊκό κόλπο. Σχηματίζει δέλτα συνολικού εμβαδού 22.000 στρεμμάτων, που μαζί με τις εκβολές του Λουδία, του Αλιάκμονα και τις Αλυκές Κίτρους, αποτελούν υγρότοπο διεθνούς σημασίας που προστατεύεται από τη συνθήκη Ραμσάρ (<http://el.wikipedia.org/wiki/Αξιός>).

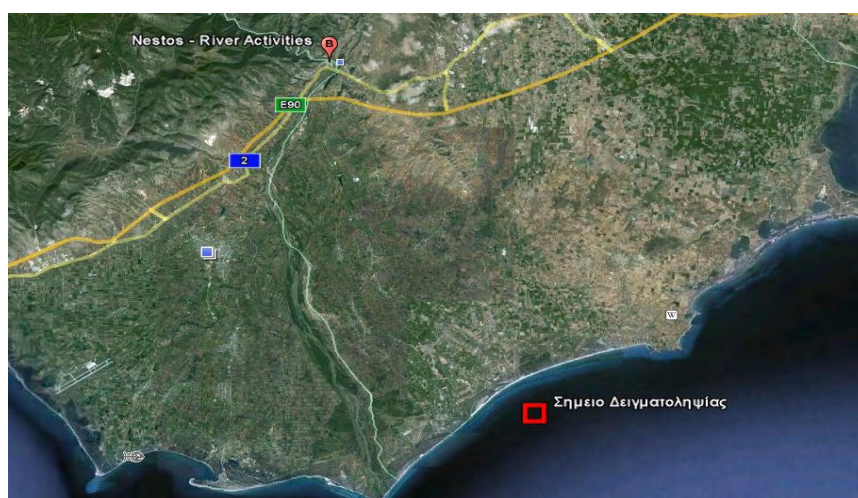
Σε ετήσια βάση η παράκτια ζώνη του στόματος του Αξιού ποταμού χαρακτηρίζεται ευτροφική ως προς τα νιτρικά και τα φωσφορικά άλατα, ενώ ως προς τη α-χλωροφύλλη χαρακτηρίζεται μεσοτροφική. Οι θρεπτικές ουσίες εισέρχονται στην περιοχή από τις γειτονικές πρόσθετες πηγές και ιδιαίτερα από τον κόλπο της Θεσσαλονίκης, που φαίνεται να έχει τις μεγαλύτερες επιπτώσεις στην περιοχή, από ότι ο ίδιος ο Αξιός ποταμός (Nikolaidis *et al.*, 2009).



Εικόνα 4: Σημείο δειγματοληψίας στη Περιοχή του Αξιού Ποταμού (Google earth)

«Νέστος Ποταμός» (GR 28)

Ο σταθμός βρίσκεται στη θαλάσσια περιοχή βορειοανατολικά από τις εκβολές του Νέστου Ποταμού. Ο Νέστος είναι ένα από τα πέντε μεγαλύτερα ποτάμια της Ελλάδας, ενώ ο ρους του οριοθετεί τα σύνορα ανάμεσα στη Μακεδονία και τη Θράκη, καθώς επίσης τους νομούς Καβάλας, Δράμας και Ξάνθης. Η συνολική του πορεία καλύπτει 243 χιλιόμετρα, 130 από τα οποία βρίσκονται σε Ελληνικό έδαφος. Πηγάζει από τα όρη Ρίλα της Βουλγαρίας, ενώ εκβάλλει στο Θρακικό Πέλαγος, αφού πρώτα έχει διασχίσει τους ορεινούς όγκους της Δυτικής Ροδόπης και το όρος Φαλακρό (<http://el.wikipedia.org/wiki/Νέστος>).

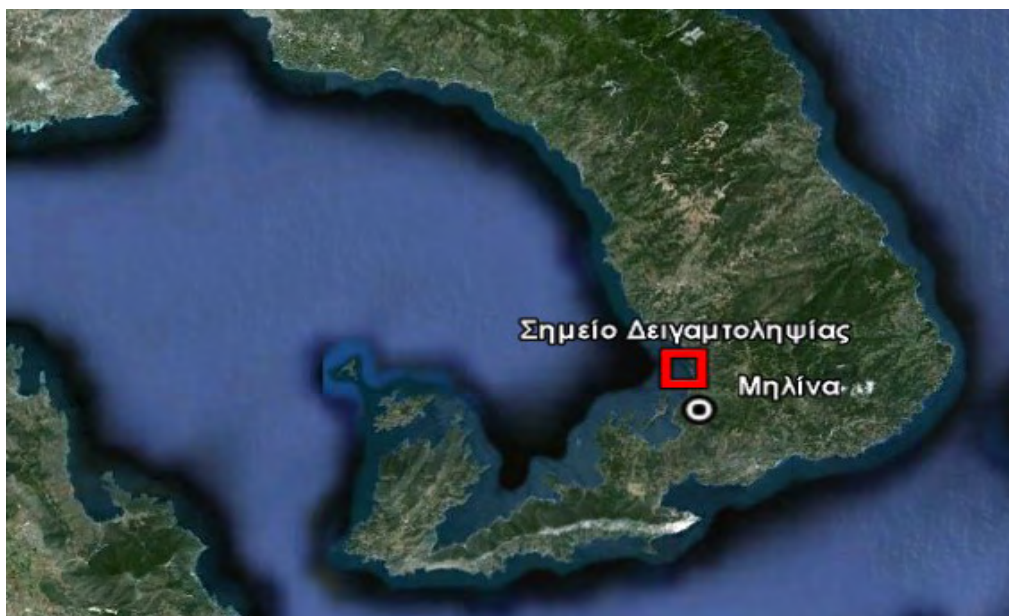


Εικόνα 7: Σημείο δειγματοληψίας στη Περιοχή του Νέστου Ποταμού (Google earth)

Από έρευνα που πραγματοποιήθηκε στα ύδατα του Νέστου ποταμού (Christoforidis et al., 2008), διαπιστώθηκαν χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης οργανοχλωρικών φυτοφαρμάκων και PCBs, κάτω από τα επιτρεπτά όρια για την επιβίωση των υδρόβιων οργανισμών, καθώς επίσης και κάτω από τα όρια για την ανθρώπινη κατανάλωση των ειδών αυτών. Όσον αφορά στον υδράργυρο, παρουσιάστηκαν χαμηλά ή μετρία επίπεδα ρύπανσης. Τα επίπεδα υδραργύρου ήταν κάτω από το όριο για την ανθρώπινη κατανάλωση που συνίσταται από τα ευρωπαϊκά όρια. Παρόλα αυτά υπάρχουν περιβαλλοντικές επιπτώσεις από τις εκτεταμένες αστικές, γεωργικές και βιομηχανικές δραστηριότητες κατά μήκος του Νέστου ποταμού από τη Βουλγαρία, καθώς επίσης και από μερικές Ελληνικές περιοχές (Christoforidis et al., 2008).

«Μηλίνα» (GR 21)

Ο σταθμός βρίσκεται στο Παγασητικό κόλπο βορειοδυτικά της Μηλίνας. Η Μηλίνα είναι ένα παραθαλάσσιο χωριό στις ανατολικές ακτές του Παγασητικού κόλπου και βρίσκεται 50 περίπου χιλιόμετρα νοτιοανατολικά από το Βόλο (<http://www.epelion.gr/milina.php>).



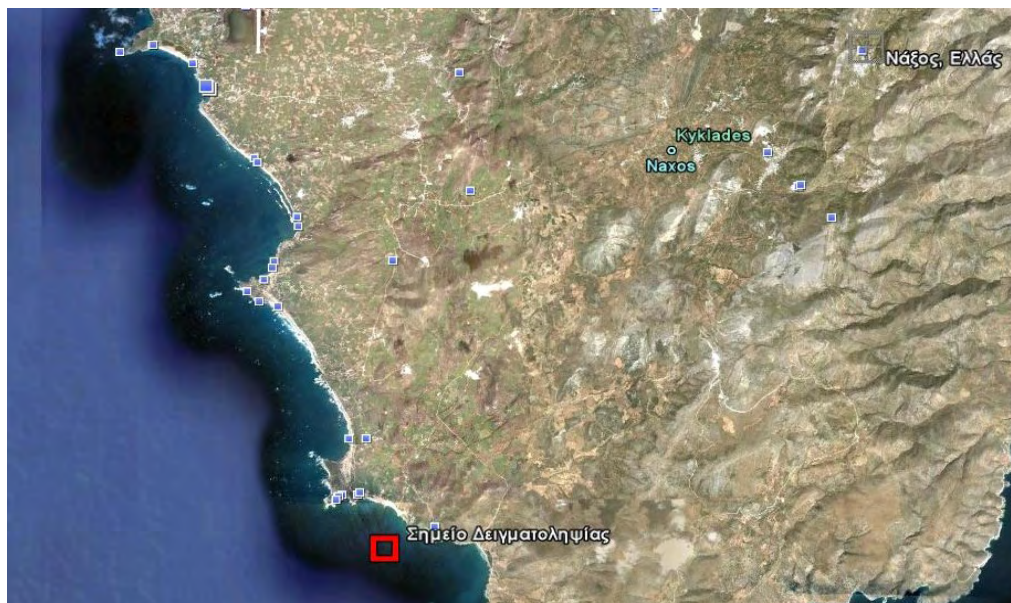
Εικόνα 6: Σημείο δειγματοληψίας στη Περιοχή της Μηλίνας (Google earth)

Ο Παγασητικός κόλπος είναι ο λιγότερο ευτροφικός κόλπος στην Ελλάδα με σημαντικά χαμηλές θρεπτικές συγκεντρώσεις. Ο Παγασητικός διανύει περιόδους με

περιορισμένες συγκεντρώσεις αζώτου. Σύμφωνα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, ο Παγασητικός μπορεί να χωριστεί σε τρία μέρη, όπου το ένα χαρακτηρίζεται μεσοτροφικό με ευτροφικά ξεσπάσματα, ένα oligοτροφικού σύστημα και ένα τρίτο το οποίο χαρακτηρίζεται από συνεχή παράγωγη θρεπτικών. Λόγο όμως της αντικυκλωνικής κυκλοφορίας στο κέντρο του κόλπου τα οργανικά μεταφέρονται από την υδάτινη στήλη στα βαθιά στρώματα, καθώς επίσης μεταφέρονται και στο υπόλοιπο Αιγαίο Πέλαγος, χωρίς να συσσωρεύονται μεγάλες περιεκτικότητες θρεπτικών στο εσωτερικό του κόλπου (Petihakis *et al.*, 2005).

«Νάξος» (GR 12)

Ο σταθμός βρίσκεται νοτιοδυτικά της Νάξου. Η Νάξος είναι το μεγαλύτερο νησί των Κυκλάδων, στο Αιγαίο Πέλαγος. Ο περίπλους της είναι 44 ναυτικά μίλια και η έκτασή της φθάνει τα 428 τετραγωνικά χιλιόμετρα. Βρίσκεται ακριβώς στο κέντρο του Αιγαίου, στις ανατολικές Κυκλάδες (<http://el.wikipedia.org/wiki/Νάξος>).



Εικόνα 8: Σημείο δειγματοληψίας στη Περιοχή της Νάξου (Google earth)

Για την περιοχή της Νάξου δεν υπάρχει βιβλιογραφία που να αναφέρει πηγές ρύπανσης, που προκαλούν προβλήματα στις θαλάσσιες περιοχές. Παρόλα αυτά αποτελεί τουριστική περιοχή και υπάρχει κίνδυνος υποβάθμισης του θαλάσσιου περιβάλλοντος.

Βιοπαρακολούθηση

Η βιοπαρακολούθηση πραγματοποιήθηκε σε διάστημα τριών μηνών σε κάθε σταθμό. Τα μύδια είχαν μέγεθος 5-6cm και προέρχονταν από μυδοτροφείο του Β.Δ Σαρωνικού. Τοποθετήθηκαν σε κλωβούς και ποντίστηκαν στα 6 μέτρα από την επιφάνεια σε δίκτυο 14 σταθμών (στα πλαίσια της πτυχιακής θα αναφερθούν μόνο οι πέντε σταθμοί) βάθους 20-30 μέτρων σε ελληνικές παράκτιες περιοχές (Tsangaris *et al.*, 2010).

Εκχύλιση της ακετυλοχολινεστεράσης

Τα βράγχια των μυδιών αφαιρέθηκαν αμέσως μετά τη συλλογή τους (πέντε ομαδοποιημένα δείγματα) και στη συνέχεια ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Τοποθετήθηκε 1g ιστού από βράγχια σε διάλυμα 2ml ρυθμιστικού διαλύματός Tris - HCl 0.1M, 0.1%TRITON X 100, pH 7.

Οι ιστοί ομογενοποιούνται σε ομογενοποιητή Potter-Elvehjem, σε πάγο (4°C), για να μην χαθεί η δραστηριότητα του ενζύμου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 20 λεπτά, ώστε η ακετυλοχολινεστεράση να συγκεντρωθεί στο υπερκείμενο.

Μέτρηση της ολικής δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης

Οι ενζυμικές δραστηριότητες προσδιορίστηκαν φασματομετρικά σε microplate reader (Digiscan reader 340, Assys), όπως περιγράφουν οι Bocquené et al (1993). Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης εφαρμόστηκε η μέθοδος του Ellman *et al* (1961). Η μέθοδος βασίζεται στην αύξηση της απορρόφησης του κίτρινου χρώματος του αντιδραστηρίου του Ellman (DTNB = 5,5 dithiobis 2 nitrobenzoic acid) στα 412 nm όταν αυτό αντιδρά με τη θειοχολίνη. Η θειοχολίνη παράγεται με την επίδραση της ακετυλοχολινεστεράσης στην ακετυλοθειοχολίνη.

Σε κάθε πηγάδι του φωτόμετρου τοποθετήθηκαν: 60μl δείγματος από το υπερκείμενο, 240μl Tris – HCl 0.1M και 20μl DTNB 0.01 M. Το DTNB προετοιμάζεται την ίδια μέρα που θα χρησιμοποιηθεί σε 0.1M TRIS/HCL pH 8. Το DTNB αντιδρά με την θειοχολίνη (προϊόν υδρόλυσης της ακετυλοθειοχολίνης από την ακετυλοχολινεστεράση) και παράγει το κίτρινο χρώμα. Η δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης υπολογίζεται από το ρυθμό αύξησης του κίτρινου χρώματος στα 412 nm.



Εικόνα 9: Microplate reader

(<http://www.pegasusscientific.com/detail.cfm?autonumber=80721>).

Προσθέτονται 10μl υποστρώματος ακετυλοθιοχολίνης 0.1M (παρασκευάζεται ημερησίως σε αποσταγμένο νερό) ώστε να αρχίσει η αντίδραση. Η απορρόφηση καταγράφεται κάθε 15sec για 2 λεπτά στα 414nm. Τα δείγματα μετριοούνται σε τρεις επαναλήψεις.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μέτρηση της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης

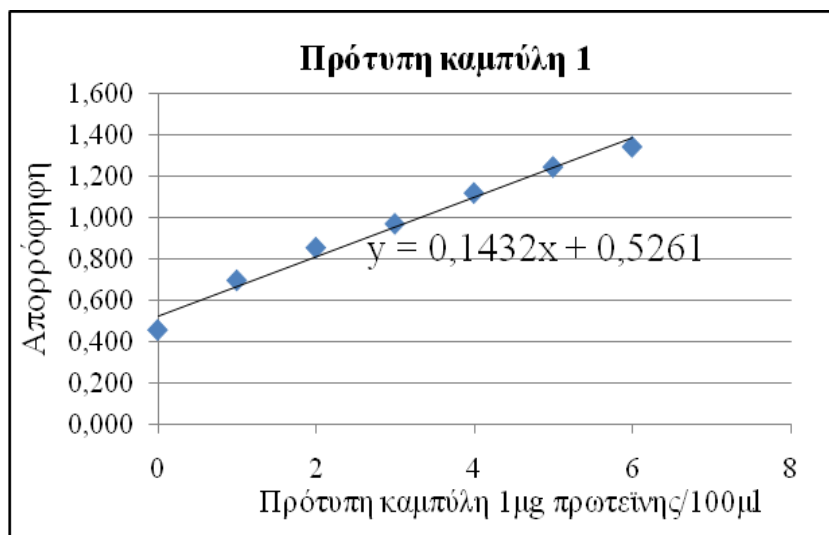
Η ολική πρωτεΐνη προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με τη μέθοδο Bradford (1976) η οποία βασίζεται στην αύξηση της απορρόφησης του μπλε χρώματος του αντιδραστηρίου Coomassie Brilliant Blue G-250, ως αποτέλεσμα δημιουργίας συμπλόκου με πρωτεΐνες. Η μέτρηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης έγινε με βάση πρότυπης καμπύλης.

Ως πρότυπη πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε BSA (Bovine Serum Albumin: Αλβουμίνη του ορού του βοός). Το διάλυμα BSA 0.1mg/ml φτιάχνεται σε αποσταγμένο νερό.

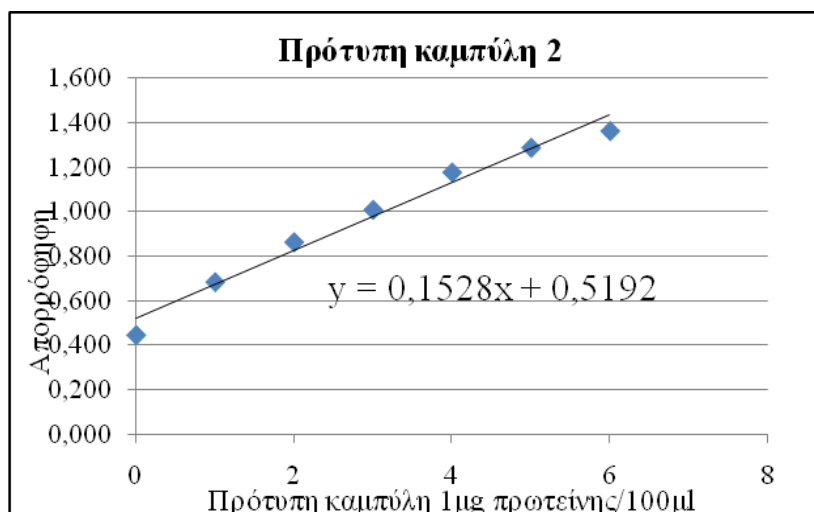
Για τον προσδιορισμό της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0-6μg BSA σε 100μl αποσταγμένου νερού, σε διπλότυπο. Το ενζυμικό απόσταγμα διαλύεται σε αποσταγμένο νερό 1/200. Σε κάθε πηγάδι του φωτόμετρου προστίθενται 100μl του δείγματος και 280μl αντιδραστήριο του Bradford (αντιδραστήριο Bio-Rad Bradford σε νερό 1/5 (v:v)). Η απορροφησή μετριέται στους 595nm. Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα εκφράζεται σε U/min/mg πρωτεΐνης ή nmol υδρολυμένου υποστρώματος/min/mg πρωτεΐνης.

Υπολογισμός της ολικής πρωτεΐνης

Για την πρωτεΐνη σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη (standards) και χρησιμοποιείται η εξίσωση (παλινδρόμηση) για να υπολογιστεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε mg/ml στα δείγματα. Ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιείται στην ανάλυση είναι 100μl, δηλαδή από την πρότυπη καμπύλη θα βρίσκουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε μg ανά 100μl, η οποία στη συνέχεια ανάγεται σε mg/ml. Επίσης υπολογίζεται και η αραίωση (Διάγραμμα 3). Στο πείραμα πραγματοποιήθηκαν δυο πρότυπες καμπύλες, μία για τους σταθμούς «Νάξος», «Λάρυμνα», «Μηλίνα» και «Νέστος» και μία για το σταθμό «Αξιός».



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη για τους σταθμούς Νάξος, Λάρυμνα, Μηλίνα και Νέστος.



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη για τον σταθμό Αξιός.

Υπολογισμός της δραστηριότητας ακετυλοχολινεστεράσης

Η δραστηριότητα ACHE προσδιορίζεται σε nmoles υποστρώματος (ACTC) που υδρολύθηκαν ανά λεπτό ανά mg πρωτεΐνης βάσει του τύπου:

$$\text{Δραστηριότητα ACHE} = \text{DA}/\text{min}/[\text{πρωτεΐνη}]$$

Όπου η [πρωτεΐνη] είναι η πρωτεΐνη στην ποσότητα (όγκος) του δείγματος που χρησιμοποιήσαμε στον προσδιορισμό της ACHE δραστηριότητας (60μ).

Για τη μετατροπή της ACHE σε nmoles ACTC που υδρολύθηκαν ανά λεπτό ανά mg πρωτεΐνη, ισχύει ότι 1DA/min/[πρωτεΐνη] αντιστοιχεί στην υδρόλυση 75 nmoles ACTC. Για τη μετατροπή της ACHE σε Units/min/mg protein, ισχύει ότι 1Unit = 0.001 DA. Τα αποτελέσματα βρίσκονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 1.

Στατιστική Ανάλυση

Στη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιείται ANOVA (Analysis of Variance) γιατί προσφέρει τη δυνατότητα σύγκρισης της μέσης τιμής περισσότερων από δυο ανεξάρτητων συνόλων δεδομένων. Η ανάλυση ANOVA πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Statgraphics. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και η ανάλυση Fisher LSD (Least Significance Difference) για να εντοπιστούν οι διαφορές μεταξύ των σταθμών.

Πίνακας 1: Υπολογισμοί της πρωτεΐνης, της δραστικότητας ακετυλοχολινεστεράσης και της δραστικότητας ακετυλοχολινεστεράσης σε Units.

Δείγματα	protein (mg/ml or mg/μl undiluted sample)	protein(mg/ml)	nm ACTC/min/mg protein	Units/min/mg protein
Νέστος 1	5,697	341,816	17,626	235,019
Νέστος 2	3,972	238,324	28,323	377,637
Νέστος 3	5,529	331,760	23,511	313,480
Νέστος 4	3,616	216,955	20,672	275,633
Νέστος 5	5,034	302,011	28,993	386,575
Αξιός 1	7,268	436,099	16,132	215,089
Αξιός 2	6,509	390,550	15,411	205,480
Αξιός 3	7,157	429,424	7,918	105,568
Αξιός 4	7,039	422,356	14,916	198,884
Αξιός 5	5,410	324,581	16,252	216,690
Μηλίνα 1	3,846	230,782	7,908	105,439
Μηλίνα 2	4,733	283,994	10,740	143,195
Μηλίνα 3	5,110	306,620	19,161	255,474
Μηλίνα 4	4,782	286,927	12,982	173,098
Μηλίνα 5	3,811	228,687	14,365	191,528
Λάρυμνα 1	4,063	243,771	17,229	229,724
Λάρυμνα 2	4,035	242,095	21,479	286,389
Λάρυμνα 3	5,334	320,028	16,874	224,980
Λάρυμνα 4	4,503	270,168	16,101	214,682
Λάρυμνα 5	5,229	313,743	11,474	152,991
Νάξος 1	5,103	306,201	31,760	423,469
Νάξος 2	4,635	278,128	18,966	252,881
Νάξος 3	5,089	305,363	21,450	285,998
Νάξος4	5,487	329,246	17,198	229,312

Τα αποτελέσματα λογαριθμήθηκαν πριν την ανάλυση ANOVA. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όταν το $P \leq 0,05$ (πρωτεΐνη ισούται με $P=0,0016$ και δραστηριότητα ακετυλοχολινεστεράσης ισούται με $P= 0,0087$).

Πίνακας 2: Στατιστική ανάλυση της πρωτεΐνης.

Περιοχή	Ελάχιστη	Μέγιστη	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση	Διακύμανση
Νάξος	0,666	0,739	0,698	$\pm 0,030$	0,001
Λάρυμνα	0,606	0,727	0,663	$\pm 0,058$	0,003
Μηλίνα	0,581	0,708	0,646	$\pm 0,059$	0,004
Αξιός	0,733	0,861	0,822	$\pm 0,053$	0,003
Νέστος	0,558	0,756	0,672	$\pm 0,088$	0,008

Πίνακας 3: Συγκριση περιοχών ως προς την πρωτεΐνη (το * υποδηλώνει ότι μεταξύ αυτών των περιοχών υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά)

Σύγκριση Περιοχών	Διαφορά
Νάξος - Λάρυμνα	0,036
Νάξος - Μηλίνα	0,052
Νάξος - Αξιός	*-0,12
Νάξος - Νέστος	0,028
Λάρυμνα - Μηλίνα	0,016
Λάρυμνα - Αξιός	*-0,156
Λάρυμνα - Νέστος	-0,008
Μηλίνα - Αξιός	*-1,172
Μηλίνα - Νέστος	-0,024
Αξιός - Νέστος	*0,148

Πίνακας 4: Στατιστική ανάλυση της Ακετυλοχολινεστεράσης σε nmoles/min/mg protein .

Περιοχή	Ελάχιστη	Μέγιστη	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση	Διακύμανση
Νάξος	1,185	1,502	1,306	$\pm 0,122$	0,015
Λάρυμνα	1,060	1,332	1,212	$\pm 0,098$	0,010
Μηλίνα	0,898	1,282	1,096	$\pm 0,143$	0,020
Αξιός	0,899	1,211	1,136	$\pm 0,133$	0,018
Νέστος	1,246	1,462	1,370	$\pm 0,092$	0,008

Πίνακας 5: Σύγκριση περιοχών ως προς την ακετολοχολινεστεράση σε nmoles/min/mg protein (το * υποδηλώνει ότι μεταξύ αυτών των περιοχών υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά)

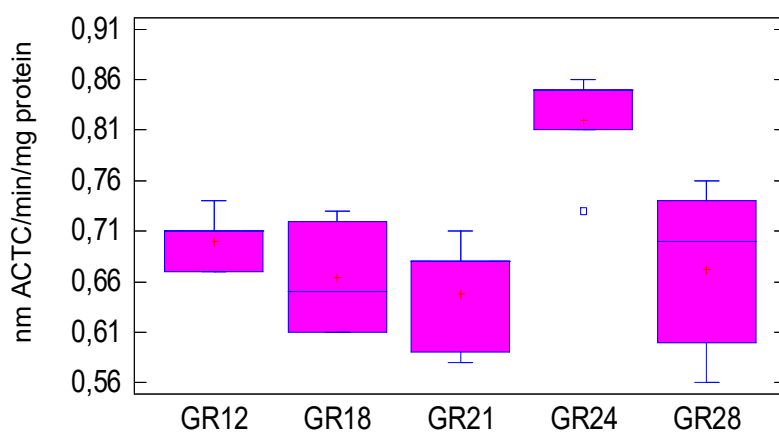
Σύγκριση Περιοχών	Διαφορά
Νάξος - Λάρυμνα	0,092
Νάξος - Μηλίνα	*0,21
Νάξος - Αξιός	*0,17
Νάξος - Νέστος	-0,064
Λάρυμνα - Μηλίνα	0,118
Λάρυμνα - Αξιός	0,078
Λάρυμνα - Νέστος	-0,156
Μηλίνα - Αξιός	-0,04
Μηλίνα - Νέστος	*-0,274
Αξιός - Νέστος	*-0,234

Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης στη περιοχή του Αξιού διαφέρει από όλες της περιοχές. Η περιοχή του Αξιού είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ οι υπόλοιπες περιοχές παρουσίασαν παρόμοιες τιμές (Διάγραμμα 3).

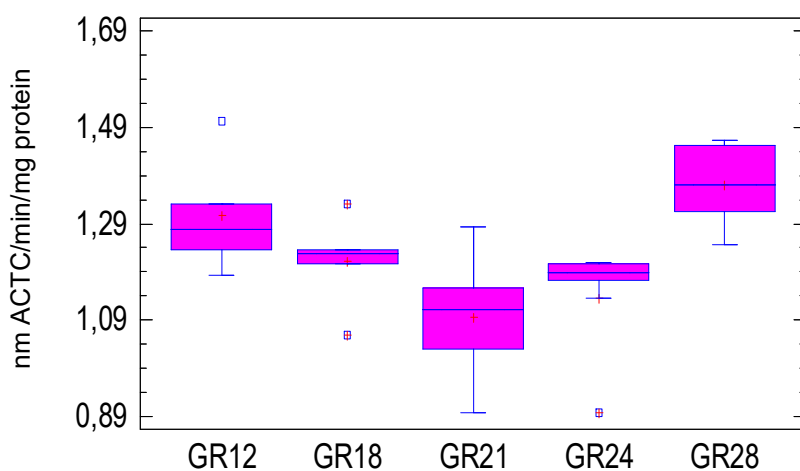
Η δραστικότητα της ακετυλοχολινεστεράση στη περιοχή της Νάξου και του Νέστου ποταμού διαφέρουν σημαντικά με τη Μηλίνα και τον Αξιό ποταμό. Με υψηλότερη στο Νέστο ποταμό και ακολουθεί η Νάξος. Η μικρότερη παρουσιάστηκε στη περιοχή της Μηλίνας στο Παγασητικό κόλπο και η μικρότερη στην περιοχή της Νάξου όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 4.

Box-and-Whisker Plot



Διάγραμμα 3: Θηκόγραμμα των δεδομένων της πρωτεΐνης στην ανάλυση ANOVA

Box-and-Whisker Plot



Διάγραμμα 4: Θηκόγραμμα των δεδομένων της ακετολοχολινεστεράσης στην ανάλυση ANOVA

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η δυνατότητα μετεγκατάστασης μυδιών από καθαρές περιοχές στις περιοχές μελέτης έχει αναδειχτεί ως χρήσιμη στρατηγική για την εκτίμηση της ρύπανσης σε παράκτια και υφάλμυρα περιβάλλοντα. Πολλές έρευνες βιοπαρακολούθησης με χρήση μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*) περιλαμβάνουν τη μέτρηση της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης. Η δραστηριότητα δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης των επιδράσεων των ρύπων στους οργανισμούς.

Στη περιοχή της Λάρυμνας η δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης δεν είναι σημαντικά χαμηλή σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές, παρόλο που η περιοχή αυτή είναι επιβαρυνόμενη από βαρέα μέταλλα. Η υψηλή περιεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα προκαλεί μείωση της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης όπως έχει αποδειχτεί από τους Gordi *et al.* (2004) οι οποίοι εντόπισαν μειωμένη δραστηριότητα σε περιοχές επιβαρυνόμενες από συγκεντρώσεις μετάλλων (κάδμιο, χαλκός, ψευδάργυρος και υδράργυρος) στη κεντρική Αδριατική και τους Romeo *et al.* (2003) που εντόπισαν χαμηλή δραστηριότητα στην περιοχή Nice σε σχέση με το Gulf of Cannes. Επίσης οι Damiens *et al.* (2007) παρουσιάζουν ότι στο Gulf of Cannes από το 2003 μέχρι το 2005 η δραστηριότητα έχει μειωθεί.

Οι Tsangaris *et al.* (2007) έκαναν σύγκριση γηγενών πληθυσμών και με πληθυσμούς που μετέφεραν για ένα και έξι μήνες και εντόπισαν μικρότερη δραστηριότητα ακετυλοχολινεστεράσης στους γηγενείς πληθυσμούς. Στο Θερμαϊκό και το Στρυμονικό κόλπο όμως εντοπίστηκε μειωμένη δραστηριότητα στην περιοχή του σωλήνα αποβλήτων, λόγω των ρύπων που εισερχόταν στο νερό (Dailianis *et al.*, 2003).

Η μειωμένη δραστηριότητα μπορεί επίσης να οφείλεται στην εποχή που πραγματοποιήθηκε η μελέτη, καθώς από τους Bodin *et al.* (2004) παρουσιάστηκε ότι σε δυο περιοχές της βορειοδυτικής Μεσογείου (La Fourcade, Carteau) η δραστηριότητα ήταν χαμηλή μόνο το μήνα Μάρτιο. Η χαμηλή δραστηριότητα οφείλονταν σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων που εντοπίστηκαν από χημικές αναλύσεις το συγκεκριμένο μήνα.

Η δραστικότητα επίσης μπορεί να οφείλεται και σε συνδυασμό ρύπων και όχι μόνο από βαρέα μέταλλα όπως στην περιοχή του Gulf Oristano της Σαρδηνίας. Η δραστικότητα της ακετυλοχολινεστεράσης εντοπίστηκε μειωμένη στην περιοχή του λιμανιού και οφειλόταν σε βαρέα μέταλλα αλλά και σε ξενοβιοτική ρύπανση που περιέχονται στα νερά του κόλπου (Magni *et al.*, 2006).

Η δραστικότητα της ακετυλοχολινεστεράσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης ως δείκτης τοξικότητας. Στην προστατευόμενη περιοχή της βορειοδυτικής Μεσογείου διαπιστώθηκε πως οι ύφαλοι δεν συμβάλουν στην αύξηση της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων, καθώς δεν υπήρχαν διαφορές στην δραστικότητα της ακετυλοχολινεστεράσης (Risso-de Faverney *et al.*, 2010).

Στην περιοχή του Αξιού ποταμού η δραστικότητα είναι χαμηλή σε σχέση με την περιοχή του Νέστου ποταμού, παρόλο που και οι δυο περιοχές θεωρούνται επιβαρυμένες από τα φυτοφάρμακα, τα οποία αποτελούν περιοριστικό παράγοντα της δραστικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης. Όπως επιβεβαιώνεται από τους Stien *et al.* (1998) στις Κάννες, στην περιοχή του λιμανιού, η δραστικότητα ήταν χαμηλότερη από τις υπόλοιπες περιοχές καθώς στη περιοχή αυτή καταλήγουν δυο ποταμοί, οι οποίοι λόγω της γεωργίας είναι πλούσιοι σε οργανοφωσφορικά και καρμιδικά φυτοφάρμακα. Επίσης, στην περιοχή της λιμνοθάλασσας Bizerta στη Τυνησία παρατήρησαν μειωμένη δραστικότητα στην ανατολική περιοχή, καθώς υπάρχει ένα κανάλι που συνδέει τη λιμνοθάλασσα με την θάλασσα, μέσα από το οποίο εισέρχονται νερά με βοθρολύματα από την πόλη, τα οποία είναι πλούσια σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά (Dellali *et al.*, 2001).

Ένα άλλος περιοριστικός παράγοντας της δραστικότητας είναι τα μικροβιοκτόνα. Στη Ravenna της Ιταλίας πραγματοποιήθηκε βιοπαρακολούθηση και μετρήθηκε η δραστικότητα της ακετυλοχολινεστεράσης, ως βιοδείκτης μικροβιοκτόνου. Στα αποτελέσματα παρουσιάζεται ότι η δραστικότητα μειώνεται όταν τα άτομα εκτίθενται σε μικροβιοκτόνο (Donnini *et al.*, 2007).

Υπάρχουν και άλλες χημικές ενώσεις που συμβάλουν στη μείωση της δραστικότητας όπως έχει αποδειχτεί από εργαστηριακές έρευνες. Οι Raftorouloy *et al.* (2006) απέδειξαν ότι η δραστικότητα μειώνεται περισσότερο από την έκθεση των μυδιών σε

PAHs και σε λιντάνιο (εντομοκτόνο) σε σχέση με μύδια που εκτίθενται σε ακετόνη. Επίσης, οι Lopez-Galindo *et al.* (2010) παρατήρησαν ότι και η συγκέντρωση υποχλωριώδους άλατος και απολυμαντικού Mexel 432 αποτελεί περιοριστικό παράγοντα της δραστηριότητας στα βράγχια, καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση μειώνεται η δραστηριότητα, αντίστοιχα.

Η δραστηριότητα ακετυλοχολινεστεράσης στη Νάξο είναι υψηλή όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η Νάξος είναι μια περιοχή του Αιγαίου που δεν έχει επιβαρυνθεί από τη ρύπανση. Σε αντίθεση όμως με τη Μηλίνα η οποία παρουσιάζει χαμηλή δραστηριότητα σε σχέση με τη Νάξο και το Νέστο ποταμό, που πιθανόν να σχετίζεται με τις περιβαλλοντικές συνθήκες της περιοχής, καθώς η συγκεκριμένη περιοχή δεν είναι επιβαρυνμένη από ρύπους. Όπως έχει διατυπωθεί και από τους Devier *et al.* (2005) στο Coast of Sarason στη Γαλλία, η μείωση της δραστηριότητας το Μάιο και τον Ιούλιο, πιθανόν να οφείλεται στο φαινόμενο της άνθησης του φυτοπλαγκτού το οποίο παρατηρείται στην περιοχή του κόλπου τον Απρίλιο. Η δραστηριότητα επίσης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού και από την αλατότητα.

Συμπερασματικά ανάμεσα στις περιοχές που εξετάστηκαν η Μηλίνα και ο Άξιος ποταμός είναι οι περιοχές με τη μικρότερη δραστηριότητα. Στη Μηλίνα πιθανώς οφείλεται στις περιβαλλοντικές συνθήκες είτε σε κάποια σημειακή πηγή ρύπανσης. Στον Άξιο ποταμό πιθανώς οφείλεται στις αυξημένες συγκεντρώσεις των φυτοφαρμάκων καθώς και εντομοκτόνων που καταλήγουν στον ποταμό και στη συνέχεια στη θάλασσα. Αντίθετα ο Νέστος ποταμός και η Νάξος είναι οι περιοχές που δεν είναι επιβαρυνμένες από ρύπους, αφού η δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης είναι πολύ υψηλή σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές. Ο Νέστος ποταμός παρόλο που είναι πολύ επιβαρυνμένος, προφανώς δεν επηρεάζει την περιοχή στην οποία πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Στην περιοχή της Λάρυμνας αναμέναμε η δραστηριότητα να είναι πιο χαμηλή λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε βαρέα μέταλλα. Οι ενδιάμεσες τιμές της δραστηριότητας στην Λάρυμνα πιθανώς οφείλονται στις περιβαλλοντικές συνθήκες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

Andral B., Stanisiere J.Y., Sauzade D., Damier E., Thebault H., Galgani F., Boissery P. (2004). Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin*. 49: 704–712.

Bodin N., Burgeot T., Stanisiere J.Y., Bocquene G., Menard D., Minier C., Boutet I., Amate A., Cherelf Y., Budzinskig H. (2004). Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*. 138:411–427.

Christoforidis A., Stamatis N., Schmieder K., Tsachalidis E. (2008). Organochlorine and mercury contamination in fish tissues from the River Nestos, Greece. *Chemosphere*. 70:694–702.

Dailianis S., Domouhtsidou G.P., Raftopoulou E., Kaloyianni M., Dimitriadis V.K. (2003). Evaluation of neutral red retention assay micronucleus test acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.) in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*. 56:443–470.

Damiens G., Gnassia-Barelli M., Loques L., Romeo M., Salbert V. (2007). Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*. 66:574–583.

Dellali M., Barelli M.G., Romeo M., Aissa P. (2001). The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*. 130:227-235.

Devier M., Augagneur S., Budzinski H., Menach K., Mora P., Narbonne J., Garrigues P. (2005). One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy

metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France. *Journal Environmental Monitoring*. 7:224–240.

Donnini F., Dinelli E., Sangiorgi F., Fabbri E. (2007). A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy). *Environment International*. 33:919–928.

Gorbi S., Lamberti C.V., Notti A., Benedetti M., Fattorini D., Moltedo G., Regoli F. (2008). An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*. 65:34–49.

Hickman C.P., Roberts L.S., Larson A. (2001). *Integrated Principles of Zoology*. 11th Edition. McGraw-Hill Higher Education. 1: 412-413.

Lopez-Galindo C., Vargas-Chacoff L., Nebot E., Casanueva J.F., Rubio D. (2010). Sublethal responses of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to sodium hypochlorite and Mexel 432 used as antifoulants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73:825–834.

Magni P., De Falco G., Falugi C., Franzoni M., Monteverde M., Perrone E., Sagro M., Bolognesi C. (2006). Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). *Environmental Pollution*. 142:65-72.

Moreira S.M., Guilhermino D.L. (2005). The use of *mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione s-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest portuguese coast. *Environmental Monitoring and Assessment*. 105: 309–325

Nikolaidis N.P, Karageorgis A.P, Kapsimalis B., Drakopoulou P., Skoulikidis N., Behrendt H., Levkov Z. (2009). Management of nutrient emissions of Axios River catchment: Their effect in the coastal zone of Thermaikos Gulf, Greece. *Ecological modeling*. 220:83–396.

Petihakis G., Triantafyllou G., Pollani A., Koliou A., Theodorou A. (2005). Field data analysis and application of a complex water column biogeochemical model in different areas of a semi-enclosed basin: towards the development of an ecosystem management tool. *Marine Environmental Research*. 59:493–518.

Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W.C., LaMantia A., McNamara J.O., White L.E. (2008). *Neuroscience*. 4th Edition. Sinauer Associates. 2: 121–2.

Raftopoulou E.K., Dailianis S., Dimitriadis V.K., Kaloyianni M. (2006). Introduction of cAMP and establishment of neutral lipids alterations as pollution biomarkers using the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Correlation with a battery of biomarker. *Science of the Total Environment*. 368:597–614.

Risso-de Favreney C., Guibbolini-Sabatier M.E., Francour P. (2010). An ecotoxicological approach with transplanted mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for assessing the impact of tyre reefs immersed along the NW Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research*. 70:87-94.

Romeo M., Hoarau P., Garello G., Gnassia-Barelli M., Girard J.P. (2003). Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution*. 122:369–378.

Schlenk D. (1999). Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological Risk Assessments. *Marine Pollution Bulletin*. 39:48-53.

Stien X., Percic P., Gnassia-Barelli M., Romeo M., Lafaurie M. (1998). Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea *Environmental Pollution*. 99:339-345

Tsangaris C., Kormas K., Strogyloudi E., Hatzianestis I., Neofitou C., Andral B., Galgani F. (2010). Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*. 151:369–378.

Tsangaris C., Papathanasiou E., Cotou E. (2007). Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferro-nickel smelting plant using biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66:232–243.

Variegno A., Canesi L. (1991). Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*. 94: 225-243.

Viarengo A., Lower, D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*. 146:281–300.

Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

1. <http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=W16510>
2. http://www.weichtiere.at/english/bivalvia/common_mussel.html
4. <http://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholinesterase>
5. http://wwz.ifremer.fr/envlit/region/provence_alpes_cote_d_azur/qualite/rinbio
6. <http://hellas.teipir.gr/prefectures/greek/Fthiotidas/Larimna.htm>
7. <http://el.wikipedia.org/wiki/Αξιός>
8. <http://el.wikipedia.org/wiki/Νέστος>
9. <http://www.e-pelion.gr/milina.php>
10. <http://el.wikipedia.org/wiki/Νάξος>
11. <http://www.pegasusscientific.com/detail.cfm?autonumber=80721>

6. ABSTRACT

A biomarkers indicative of neurotoxicity (acetylcholinesterase, AchE) was measured in caged mussels at areas impacted by different anthropogenic activities along the Greek coastline to find biological effects of environmental pollution. Mussels are commonly used as sentinel organisms in biomonitoring studies. Wild mussels and transplanted mussels originating from a clean site are employed in bio-monitoring.

Acetylcholinesterase (AchE) is an enzyme involved in nerve impulse transmission and its inhibition is an established biomarker of neurotoxicity caused by exposure to organophosphate and carbamate pesticides while recent studies suggest it may also indicate general stress. AchE activity proved to be the most responsive biomarker with decreased values at sites influenced by agricultural, urban and industrial activities. It is also used in caged mussels resulted useful in the assessment of the effects of environmental pollution.

Mussels were caged at coastal sites in the vicinity of major cities, in areas influenced by major industries, agricultural practices and in islands away from known sources of pollution. Biomonitoring was realised in interval of three months in each station. The stations of sampling are: «Milina», «Axios River», «Larymna», «Naxos» and «Nestos River».

The concentration of total protein in the region of Axios River differs from all regions. The region of Axios had the bigger concentration, while the rest of the investigated regions presented similar prices. The activity of achetylocholinesterase in the region of Naxos and Nestos River differ considerably with Milina and the Axios River. The higher activity was presented in the estuaries of Nestos River and the smallest in the region of Milina in the Pagasitikos Gulf.

Keywords: *Mytilus galloproncialis*, biomonitoring, biomarker, achetylocholinesterase (ACHE).