



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων



Πανεπιστήμιο
ΕΚΠΑ



Πανεπιστήμιο
ΑΠΘ



Πανεπιστήμιο
Πατρών



Πανεπιστήμιο
Κρήτης



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ
ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΙΖΗΜΑΤΩΝ
ΤΗΣ ΛΙΜΝΗΣ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑΣ ΜΕ IN VIVO
ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

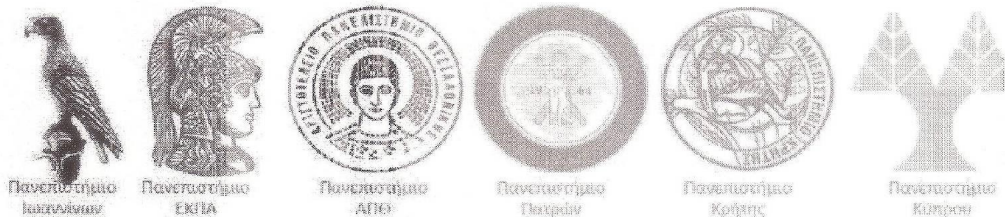
ΔΗΜΗΤΡΑ ΚΟΥΜΑΣΗ

A.M. 2

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2019



ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Δρ. Σ. Κ. Χατζηκακού
Καθηγήτριας
Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, Τμήμα Χημείας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
45110 Ιωάννινα
Τηλ. 26510 08374
Tel. X30-26510-08374, X30-26510-08362
e-mail: shadjika@uoi.gr
website: http://users.uoi.gr/shadjika/Hadjikakou_1/Hadjikakou_01.htm

ΠΡΟΣ

Δι-ιδρυματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ.) «Ανόργανη Βιολογική Χημεία

ΘΕΜΑ: Πρακτικό Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την Απονομή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Χημεία στην κ Δήμητρα Κουμάση.

Ιωάννινα 21/05/2019

Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε από την ΕΔΕ του Δ.Π.Μ.Σ. «Ανόργανη Βιολογική Χημεία στη συνεδρίαση της αριθμ 9/4-4-2019, για την κρίση της Διατριβής Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης της κ. Δήμητρας Κουμάση, συνήλθε σε συνεδρίαση, στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, στις 21 Μαΐου 2019 όπου και παρακολούθησε την δημόσια υποστήριξη της εργασίας με τίτλο:

«Μελέτη τοξικότητας των ιζημάτων της λίμνης Παμβώτιδας με *in vivo* τεχνικές»

Η επιτροπή ενημερώθηκε από τον κ Χατζηκακού ότι η διατριβή αυτή επιβλέφθηκε επιστημονικά από το Δρ Ιωάννη Σαΐνη ΕΔΙΠ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η Επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η εργασία είναι πρωτότυπη και συμβάλει στη πρόοδο της Επιστήμης. Κατόπιν αυτού η Επιτροπή αποφάσισε να απονείμει το Δίπλωμα Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης στην κ Δήμητρα Κουμάση με βαθμό «Άριστα Δέκα (10)».

Τα Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Χριστιάννα Μητσοπούλου
Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
Μέλος της Εξεταστικής
Επιτροπής

Σωτήρη Κ. Χατζηκακού
Καθηγητής
Συνεπιβλέπων Καθηγητής
της Διατριβής

Νικόλαος Κουρκουμέλης
Επίκ. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Παν Ιωαννίνων
Μέλος της Εξεταστικής
Επιτροπής

Αφιερώνεται στην οικογένεια μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Δ.Π.Μ.Σ. «Ανόργανη Βιολογική Χημεία» και πολλοί άνθρωποι συνεισέφεραν για την ολοκλήρωση της. Για την πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, αρχικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή Δρ. κ. Ιωάννη Σαΐνη για την πολύτιμη καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την υποστήριξη που μου πρόσφερε σε κάθε φάση της πορείας μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Χριστίνα Μπαντή για τις σημαντικές συμβουλές της και τη βοήθεια της καθώς και τη συνεχή υποστήριξη της για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Δρ. Αναστασία Τούκα για τη βοήθεια της στην πραγματοποίηση του Thamnotoxkit και τη συνεχή συμπαράσταση της, καθώς και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Δέσποινα Βόγγολη για τη συμπαράσταση της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της Βιοτράπεζας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας του ίδιου πανεπιστημίου. Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στους καθηγητές Σωτήριο Χατζηκακού, Νικόλαο Κουρκουμέλη και Χριστιάνα Μητσοπούλου που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Σταύρο και Σοφία, την αδερφή μου Ελένη και όλους τους δικούς μου ανθρώπους για την ενθάρρυνση τους και την απαραίτητη ηθική και όχι μόνο συμπαράσταση που μου πρόσφεραν για την ολοκλήρωση της εργασίας μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ιζήματα των υδάτινων οικοσυστημάτων είναι θέσεις απόθεσης όλων των ρυπογόνων παραγόντων που εισέρχονται σε αυτά. Ένας από τους πιο κοινούς περιβαλλοντικούς ρύπους είναι τα βαρέα μέταλλα, τα οποία υπάρχουν φυσικά στο φλοιό της γης αλλά σημαντικές συγκεντρώσεις τους απελευθερώνονται στο περιβάλλον από ανθρωπογενείς δραστηριότητες, καθιστώντας τα δυνητικά τοξικά για το περιβάλλον και τους οργανισμούς. Οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στα ιζήματα υδάτινων οικοσυστημάτων είναι 3 – 5 τάξεις μεγέθους υψηλότερες σε σχέση με την υδάτινη στήλη. Τα βαρέα μέταλλα βρίσκονται στα ιζήματα κυρίως προσροφημένα σε οξειδία Fe και Mn, σε επιφάνειες αργιλικών ορυκτών και σε οργανικό υλικό. Στα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας, η οποία εμπλουτίζεται με αστικές και γεωργικές απορροές, αλλά και με τα όμβρια ύδατα της παρακείμενης πόλης των Ιωαννίνων, έχουν βρεθεί αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων. Κάποια από αυτά, τα Ni, Hg, Cr και Cu, ξεπερνούν τα επιτρεπτά όρια που έχουν θεσπιστεί για τα ιζήματα σύμφωνα με διεθνείς οδηγίες. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η διερεύνηση της πιθανής τοξικότητας των ιζημάτων της Παμβώτιδας, με χρήση δύο in vivo πειραματικών μοντέλων. Το *Thamnotoxkit* χρησιμοποιήθηκε για ανίχνευση οξείας τοξικότητας, αλλά δεν προέκυψαν αξιολογήσιμα αποτελέσματα. Το *Allium cepa* Test χρησιμοποιήθηκε για αξιολόγηση πιθανής χρόνιας τοξικότητας. Στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε ότι κάποιες χρωμοσωμικές και πυρηνικές ανωμαλίες στα δείγματα ιλύος της λίμνης εμφανίστηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία των παραπάνω μετάλλων. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν μια σημαντική ένδειξη ότι τα ιζήματα της Παμβώτιδας είναι σοβαρά ρυπασμένα και χρειάζεται να τεθούν υπό

συνεχή παρακολούθηση για να αποφευχθούν δυσμενείς επιπτώσεις στο οικοσύστημα και τους οργανισμούς που αλληλεπιδρούν με αυτό.

ABSTRACT

Sediments of aquatic ecosystems are the deposition place for all polluting agents. The most common environmental pollutants are heavy metals, mainly due to anthropogenic activities. High concentrations of heavy metals are potentially toxic. The concentrations of heavy metals in sediments are 3 – 5 orders of magnitude higher than in the water column. Heavy metals are mainly absorbed on Fe and Mn oxides, on clay minerals and on organic material. In the sediments of Lake Pamvotis, which is enriched with urban, rainwater and agricultural run-offs, have been found high concentrations of heavy metals. Ni, Hg, Cr and Cu concentration exceed the established limits for sediments quality according to “Sediments Quality Guidelines”. The aim of this study was to investigate the potential toxicity of sediments of Lake Pamvotis by using two different experimental models. Thamnotoxkit was used to detect acute toxicity, with no significant results. *Allium cepa* Test was used to evaluate possible chronic toxicity. Chromosomal aberrations, nuclear abnormalities and occurrence of micronuclei are observed at higher frequencies in the sediment compared to controls. These results provide an important indication that Lake’s Pamvotis sediments are seriously polluted and continuous monitoring is necessary in order to avoid adverse impacts on the ecosystem and the interacting organisms.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
1.1. ΙΖΗΜΑΤΑ	15
1.2. ΒΑΡΕΑΜΕΤΑΛΛΑ.....	17
1.2.1. Πηγές Εισόδου Βαρέων Μετάλλων στα Οικοσυστήματα - Ιζήματα	18
1.2.2. Ιζηματοποίηση Βαρέων Μετάλλων.....	21
1.2.3. Βιοχημικός Ρόλος των Βαρέων Μετάλλων	23
1.2.4. Οικο-τοξικολογική Εκτίμηση Συγκεντρώσεων Βαρέων Μετάλλων στα Ιζήματα	25
1.3. Η ΛΙΜΝΗ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑ	28
1.3.1. Το Ίζημα της Παμβώτιδας	31
1.3.2. Βαρέα Μέταλλα στα Ιζήματα της Παμβώτιδας	31
1.4. ΝΙΚΕΛΙΟ	33
1.5. ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΣ	36
1.6. ΧΡΩΜΙΟ	39
1.7. ΧΑΛΚΟΣ	42
1.8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ IN VIVO MONTELLA.....	45
1.8.1. Ο Κυτταρικός Κύκλος	48
1.9. ΤΟΧΚΙΤΣ	51
1.9.1. Thamnotoxkit F	52
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	55
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	57
3.1. Δειγματοληψία.....	57
3.2. Εκτίμηση Τοξικότητας Ιζημάτων με το In Vivo Test Thamnotoxkit F TM	58
3.3. Εκτίμηση Τοξικότητας Ιζημάτων με το In Vivo <i>Allium cepa</i> Test	60
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
4.1. Εκτίμηση Τοξικότητας με το Thamnotoxkit F TM	63
4.2. Εκτίμηση Τοξικότητας με το <i>Allium cepa</i> Toxicity Test.....	64
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	75
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	89
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	97

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΙΖΗΜΑΤΑ

Κάθε υδάτινο περιβάλλον διαχωρίζεται σε τρία κύρια τμήματα: το υδατικό (υδάτινη στήλη), τον πυθμένα (ιζήματα) και τους οργανισμούς που ζουν στα δύο προηγούμενα. Τα τμήματα αυτά βρίσκονται σε άμεση εξάρτηση το ένα από το άλλο.

Με τον όρο ιζήματα περιγράφονται μίγματα κόκκων διαφορετικής προέλευσης, χημικής σύστασης ή μεγέθους, τα οποία καλύπτουν τον πυθμένα των υδάτινων οικοσυστημάτων και σχηματίζονται από την καθίζηση των κόκκων διαμέσου της υδάτινης στήλης. Πρόκειται για οργανικούς και ανόργανους κόκκους, τα μεγέθη των οποίων ποικίλουν ανάλογα με το μέγεθος, το βάρος αλλά και το είδος τους. Η συνεχής εναπόθεση ιζημάτων κατά την πάροδο του γεωλογικού χρόνου, δημιουργεί ένα κάλυμμα, τον πυθμένα (Ντούλα Μ., 2004).

Τα ιζήματα κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος των κόκκων, τη σύσταση και το περιβάλλον απόθεσης τους. Οι τρεις αυτοί παράγοντες πρέπει πάντα να αξιολογούνται στις μελέτες ρύπανσης των υδάτινων οικοσυστημάτων, καθώς από αυτούς εξαρτάται, σε διαφορετικό ποσοστό, ο βαθμός διασποράς των ρύπων, η τύχη τους και η επίδραση τους στο οικοσύστημα σε τοπικό επίπεδο ή διευρυμένο επίπεδο. Για το λόγο αυτό πρέπει να εξετάζεται κάθε φορά ο βαθμός που οι μεταβολές στο οικοσύστημα επηρεάζουν ή καθορίζουν μεταβολές στα αλληλεπιδρώντα τμήματα του υδάτινου περιβάλλοντος (Ζαχαρίας Ι. κ.α., 2004).

Η κατάταξη των ιζημάτων με βάση το μέγεθος των κόκκων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Ζαχαρίας Ι. κ.α., 2004):

Πίνακας 1. Κατάταξη ιζημάτων βάσει του μεγέθους των κόκκων.

ΚΟΚΚΟΜΕΤΡΙΚΗ ΤΑΞΗ	ΚΟΚΚΟΜΕΤΡΙΚΗ ΚΛΑΣΗ	ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΚΟΚΚΩΝ (mm)
Ογκόλιθοι (boulders)	Ψηφίτες (gravel)	256 – 1,024
Κροκάλες (cobbles)		64 – 256
Βότσαλα (pebbles)		4 – 64
Ψηφίδες (granules)		2 – 4
Άμμος (sand)	Άμμος (sand)	0,062 – 2
Πηλός (silt)	Ϊλύς (mud)	0,004 – 0,062
Άργιλος (clay)		< 0,004

Από όλα τα παραπάνω, αυτά που συναντώνται συχνότερα είναι η άμμος, η ιλύς και ο άργιλος. Το μέγεθος των κόκκων παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την καταγωγή του ιζήματος και τον τρόπο μεταφοράς του στη θέση που απαντάται. Άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά του ιζήματος είναι η πυκνότητα των κόκκων, το σχήμα τους, το χρώμα και το πάχος τους. Τα ιζήματα που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία είναι πυριτικά, ανθρακικά, οξειδία και υδροξείδια, φωσφορικά και θειικά.

Η σύσταση των ιζημάτων σχετίζεται σε μεγάλο ποσοστό με την πηγή προέλευσης τους. Τέτοιες πηγές είναι:

1. Η αποσάθρωση και διάβρωση χερσαίων πετρωμάτων (συνήθως ανήκουν στην κλάση της ιλύος)
2. Η δραστηριότητα των οργανισμών του υδάτινου οικοσυστήματος (βιογενή)
3. Οι χημικές διεργασίες που διεξάγονται στο υδάτινο οικοσύστημα
4. Οι ηφαιστειακές εκρήξεις
5. Το διάστημα

Τα ιζήματα συχνά επιβαρύνονται με ρύπους, καθώς φυσική ή ανθρωπογενής δραστηριότητα έχει σαν αποτέλεσμα την εισαγωγή στο οικοσύστημα χημικών ή

άλλων παραγόντων. Ουσιαστικά, το ιζημα λειτουργεί σαν αποθήκη για χημικές ουσίες, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και τα βαρέα μέταλλα, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις τους σε αυτό να είναι κατά πολύ μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις τους στην υδάτινη στήλη κατά περίπου τρεις με πέντε τάξεις μεγέθους (Bryan GW. & Langston WJ., 1992).

Τα βαρέα μέταλλα, αν και είναι φυσικά συστατικά του φλοιού της γης, συνιστούν μαζί με τα ραδιενεργά και τα συνθετικά οργανικά, μία από τις κυριότερες ομάδες ρύπων στο περιβάλλον. Η βιοδιαθεσιμότητα τους στα ιζήματα μπορεί να φτάσει σε αρκετά επικίνδυνες συγκεντρώσεις για την επιβίωση των οργανισμών. Η ρύπανση των υδάτινων οικοσυστημάτων από βαρέα μέταλλα αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά ζητήματα οικολογικού προβληματισμού.

1.2. ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Αν και δεν υπάρχει συγκεκριμένος ορισμός, ο όρος βαρέα μέταλλα συμπεριλαμβάνει τα χημικά ανόργανα σταθερά στοιχεία που έχουν Σχετική Ατομική Μάζα μεγαλύτερη από αυτή του σιδήρου. Για τον ορισμό των βαρέων μετάλλων χρησιμοποιούνται σαν κριτήρια η πυκνότητα, το ατομικό βάρος, ο ατομικός αριθμός ή η θέση του στοιχείου στον Περιοδικό Πίνακα. Γενικά στα βαρέα μέταλλα ανήκουν τα χημικά στοιχεία του Περιοδικού Πίνακα που ανήκουν στις ομάδες 3 – 16 και τις περιόδους 4^η και πάνω. (Hübner R. et al. 2010). Ως επί το πλείστο στα βαρέα μέταλλα συμπεριλαμβάνονται μέταλλα και μεταλλοειδή με ειδικό βάρος μεγαλύτερο από 5 και σχετικά μεγάλο ατομικό βάρος.

Τα βαρέα μέταλλα επιδρούν με διάφορους τρόπους στα έμβια όντα είτε θετικά είτε αρνητικά. Σε κατάλληλες συγκεντρώσεις κάποια από αυτά είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της ζωής, καθώς επηρεάζουν τη φυσιολογία των οργανισμών, οι οποίοι χρειάζονται ιχνοστοιχεία για την εξασφάλιση καθημερινών λειτουργιών τους όπως είναι η πέψη, η αναπνοή, ο μεταβολισμός και η αποκατάσταση βλαβών και μεταλλάξεων. Εάν λείπουν αυτά τα στοιχεία προκαλούνται διαταραχές στη φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών καθώς δεν είναι εφικτό να πραγματοποιηθούν ορισμένες βιοχημικές διεργασίες. Άλλωστε, 17 μέταλλα και 4 μεταλλοειδή ανήκουν στα 30 βασικότερα στοιχεία για τη ζωή (Förstner U. & Wittmann GTW., 1983). Όταν τα βαρέα μέταλλα υπάρχουν στο περιβάλλον σε συγκεντρώσεις και διάρκεια ικανά να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, τους ζωντανούς οργανισμούς και τα οικοσυστήματα ή υλικές ζημιές με αποτέλεσμα το περιβάλλον να κρίνεται ακατάλληλο για τις επιθυμητές του χρήσεις θεωρούνται ρύποι (Μαλλιαρός Θ., 2000).

1.2.1. Πηγές Εισόδου Βαρέων Μετάλλων στα Οικοσυστήματα – Ιζήματα

Όπως συμβαίνει με τους περισσότερους ρύπους, τα ιζήματα των υδάτινων οικοσυστημάτων αποτελούν τον τελικό αποδέκτη των βαρέων μετάλλων. Η προέλευση τους μπορεί να είναι φυσική ή ανθρωπογενής. Φυσικές διεργασίες όπως η διάβρωση των παρακείμενων περιοχών του υδάτινου οικοσυστήματος, η μεταφορά μέσω των εισροών από τη λεκάνη απορροής, η ηφαιστειακή δράση και η ατμοσφαιρική κατακρήμνιση έχουν ως άμεση συνέπεια τη μεταφορά βαρέων μετάλλων στο οικοσύστημα. Επιπλέον, η σκόνη που μεταφέρεται μέσω του ανέμου από τις ακτές μπορεί να περιέχει βαρέα μέταλλα, τα οποία μεταφέρονται σε σωματιδιακή μορφή.

Τα βαρέα μέταλλα ανήκουν σε μια κατηγορία ρύπων που ονομάζονται συντηρητικοί (conservative). Αυτό σημαίνει ότι δεν αποσυντίθενται από τη δράση των βακτηρίων και βρίσκονται σε σωματιδιακή ή διαλυτή μορφή (Φερεντίνος Γ. κ.α., 1996). Η ρύπανση του περιβάλλοντος από βαρέα μέταλλα οφείλεται κυρίως στις ανθρωπογενείς πηγές, οι οποίες ουσιαστικά εμπλουτίζουν τα οικοσυστήματα με επιπλέον ποσότητες. Οι ανθρωπογενείς πηγές εμφανίζουν μεγαλύτερη ποικιλότητα σε σχέση τις φυσικές και ταξινομούνται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Ανάλογα με τη γεωμετρία σε:

- i. Σημειακές Πηγές, όπως ΧΥΤΑ, χωματερές, υπόγειες δεξαμενές και αγωγοί
- ii. Μη Σημειακές Πηγές ή Γραμμικές Πηγές, όπως οι δρόμοι και οι αγροτικές περιοχές και
- iii. Διάχυτες, όπως η όξινη βροχή

2. Ανάλογα με το ρυθμό εκπομπής σε:

- i. Συνεχούς εκπομπής και
- ii. Στιγμαίας εκπομπής

Τέτοιες πηγές είναι:

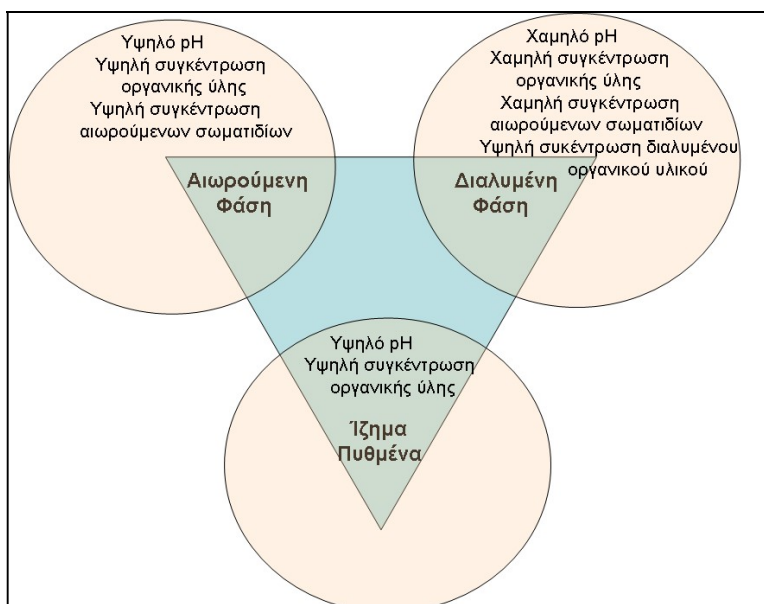
- Η εξόρυξη και η κατεργασία των ορυκτών προς παραλαβή των περιεχόμενων μετάλλων. Τόσο τα απόβλητα όσο και η ίδια η αποσάθρωση των ορυκτών αποτελούν σημαντικές πηγές βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον.
- Η βιομηχανική επεξεργασία και η μορφοποίηση των μετάλλων, όπως η χαλυβουργία.
- Η καύση ορυκτών καυσίμων κατά την οποία τα βαρέα μέταλλα απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα ή συσσωρεύονται στην τέφρα.

- Οι γεωκτηνοτροφικές δραστηριότητες και η χρήση αγροχημικών προϊόντων. Βαρέα μέταλλα περιέχονται σε λιπάσματα, φυτοφάρμακα, αποξηραντικές ουσίες, συντηρητικά ξύλου, απόβλητα μονάδων χοιροτροφίας και πτηνοτροφίας, κομποστοποιημένα υλικά και κοπριές και σε ιλύς καθαρισμού λυμάτων.
- Η κατασκευή ηλεκτρονικών και ηλεκτρικών εξαρτημάτων, όπως είναι οι ημιαγωγοί.
- Η παραγωγή διάφορων υλικών όπως μπαταρίες, χρωστικές ουσίες και βαφές, καταλύτες, πολυμερή, οδοντιατρικά κράματα, φάρμακα και φαρμακευτικά προϊόντα, καύσιμα, λιπαντικά και υφαλοχρώματα.
- Η έκπλυση χώρων υγειονομικής ταφής και η διαδικασία αποτέφρωσης βιομηχανικών αποβλήτων (Alloway BJ. & Ayres DC., 1997).
- Οι διεργασίες άντλησης και επεξεργασίες πετρελαίου και τα πετρελαϊκά ατυχήματα.
- Τα απόβλητα των εργοστασίων παραγωγής λιπασμάτων.
- Τα αστικά απόβλητα κοντά στα μεγάλα αστικά κέντρα. Βαρέα μέταλλα βρίσκονται στα απορρυπαντικά, στις εκπλύσεις των όμβριων υδάτων, στα απόβλητα της κυκλοφοριακής πυκνότητας και στις ναυπηγικές δραστηριότητες (Baudo R. & Muntau H., 1990).

Η μαζική συσσώρευση των βαρέων μετάλλων στα ιζήματα τα κατατάσσει σε σημαντικές μη σημειακές πηγές ρύπανσης των υπερκείμενων υδάτων και των ζωντανών οργανισμών που ζουν τόσο στα ιζήματα όσο και στην υδάτινη στήλη.

1.2.2. Ιζηματοποίηση Βαρέων Μετάλλων

Τα μέταλλα όταν εισέρχονται στο νερό μπορεί να προσροφηθούν σε οργανικά ή άλλα αιωρούμενα σωματίδια και να καθιζάνουν εμπλουτίζοντας τα ιζήματα. Σε περίπτωση αλλαγής των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ιζημάτων μπορεί να καταστεί δυνατή η επαναιώρηση τους στο νερό και η εκ νέου εισαγωγή τους στην τροφική αλυσίδα. Αύξηση της αλατότητας έχει σαν αποτέλεσμα την επαναδιαλυτοποίηση βαρέων μετάλλων καθώς τα κύρια ιόντα του νερού ανταγωνίζονται και τείνουν να πάρουν τη θέση των μετάλλων. Ακόμη, μείωση στο pH, που μπορεί να προέρχεται από την όξινη βροχή ή από βιομηχανικά απόβλητα, οδηγεί στη διάλυση των ανθρακικών και των υδροξειδίων αλλά και εκρόφηση των μεταλλικών κατιόντων λόγω αυξημένου ανταγωνισμού από τα H^+ . Τέλος, οι συνθήκες υποξίας ευνοούν τη διαλυτοποίηση των οξειδίων Fe και Mn απελευθερώνοντας τα ενσωματωμένα ή προσροφημένα μέταλλα (Fu F. & Wang Qi, 2011).



Εικόνα 1. Συνθήκες από τις οποίες εξαρτάται η εναλλαγή φάσεων των μετάλλων στα υδάτινα οικοσυστήματα.

Ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης τους, τα βαρέα μέταλλα κατανέμονται στη διαλυτή και τη σωματιδιακή φάση της υδάτινης στήλης (Ζαχαρίας Ι. κ.α., 2004). Η τελική κατάληξη όλων των αιρούμενων σωματιδίων είναι η καταβύθιση τους στα ιζήματα του πυθμένα, όπου αλληλεπιδρούν με τα συστατικά των ιζημάτων με αποτέλεσμα τη συγκράτηση των βαρέων μετάλλων στα ιζήματα. Τα μέταλλα στα ιζήματα συνδέονται με διάφορους τρόπους με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται σε διαφορετικές μορφές:

- Διαλυτά στο νερό των πόρων.
- Ανταλλάξιμα με ιοντοανταλλαγή ή με προσρόφηση. Η προσρόφηση είναι η κυρίαρχη διεργασία στα ιζήματα, βασίζεται σε ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις και εξαρτάται από το επιφανειακό φορτίο των σωματιδίων, το οποίο επηρεάζεται από το pH (Δαμικούκα Ι., 2011).
- Ενωμένα με ανθρακικά. Τα μέταλλα κατακρημνίζονται ως αδιάλυτα ανθρακικά άλατα.
- Προσροφημένα σε οξείδια ή υδροξείδια του σιδήρου και του μαγγανίου. Οι οξειδοαναγωγικοί κύκλοι αυτών των δύο στοιχείων είναι σημαντικοί για τη δέσμευση και την ανακύκλωση των μετάλλων μεταξύ υγρής και στερεής φάσης.
- Ενωμένα με θειικά ή οξείδια.
- Προσροφημένα στην επιφάνεια αργιλικών ορυκτών.
- Ενωμένα ή προσροφημένα σε οργανικό υλικό ή συνδεδεμένα με οργανομεταλλικές ενώσεις πορφυρινικής φύσης.
- Ενωμένα με σουλφίδια.
- Ενσωματωμένα στο πλέγμα ορυκτών όπως τα αργιλικά και πυριτικά άλατα.

Η σχετική ικανότητα κατακράτησης μετάλλων σε συστατικά του ιζήματος ακολουθεί την εξής σειρά: οξείδια του Mn > οργανική ύλη > οξείδια του Fe > αργιλικά ορυκτά. Τα βαρέα μέταλλα δεν κατανέμονται ομοιόμορφα σε όλες τις τάξεις μεγέθους κόκκων του ιζήματος, με το μεγαλύτερο ποσοστό τους να συγκεντρώνεται στο λεπτόκοκκο υλικό (<63mm), το οποίο αποτελείται από αργιλικά ορυκτά. Με το μέγεθος των κόκκων των ιζημάτων μεταβάλλεται και το περιεχόμενο τους σε φορείς βαρέων μετάλλων.

Τα ιζήματα γενικά αποτελούν ένα πολύ καλό δείκτη της ρύπανσης μιας περιοχής και της εξέλιξης της στο χρόνο (National Geographic, 2013).

1.2.3. Βιοχημικός Ρόλος των Βαρέων Μετάλλων

Τα βαρέα μέταλλα έχουν πολύ μεγάλη σημασία για τη ζωή των οργανισμών και διακρίνονται σε απαραίτητα και μη απαραίτητα. Ένα στοιχείο θεωρείται απαραίτητο για έναν οργανισμό όταν μείωση της έκθεσης του κάτω από ένα συγκεκριμένο όριο έχει σαν αποτέλεσμα σταθερά μείωση σε μία φυσιολογική ή σημαντική λειτουργία ή όταν το στοιχείο αυτό είναι αναπόσπαστο μέρος μιας οργανικής δομής που εκτελεί μια ζωτική λειτουργία στον οργανισμό. Μη απαραίτητα θεωρούνται αυτά που μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποια θετική επίδραση στη ζωή. Ωστόσο, η τοξικότητα ενός μετάλλου είναι ανεξάρτητη από το βιοχημικό του ρόλο (WHO, 1996).

Η τοξικότητα μιας ουσίας, όπως τα βαρέα μέταλλα, αφορά την ικανότητα της να επηρεάζει τις ζωτικές λειτουργίες ενός βιολογικού συστήματος ή ενός ζωντανού οργανισμού. Η τοξικότητα των μετάλλων στα υδάτινα οικοσυστήματα εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους. Σημαντικός παράγοντας είναι η μορφή και το σθένος στα οποία βρίσκεται το μέταλλο, καθώς οι διαλυτές οργανικές μορφές μπορεί να εισχωρήσουν στους οργανισμούς. Εξίσου σημαντική είναι και η φύση του μεταλλικού

ιόντος και οι τάσεις ανταγωνισμού ή συνεργασίας μεταξύ μετάλλων για συμπλοκοποίηση. Φυσικοχημικοί παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία, το φως και το pH μπορούν να επηρεάσουν τις φωτοχημικές μορφές των μετάλλων και κατ' επέκταση τον τρόπο αλληλεπίδρασης τους με τους οργανισμούς. Παράλληλα, η τοξικότητα ενός μετάλλου εξαρτάται και από την ευαισθησία των οργανισμών που καθορίζεται από την ηλικία, το φύλο και τη διατροφή. Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωσή τους στο οικοσύστημα και τη συνεργιστική δράση με άλλα μέταλλα.

Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων εξαρτάται από την ικανότητά τους για βιοσυγκέντρωση, βιοσυσσώρευση και βιομεγέθυνση (IUPAC, 2002). Οι τοξικές τους επιδράσεις μπορεί να εκφραστούν ως νευροφυσιολογικές διαταραχές, γενετικές αλλοιώσεις των κυττάρων (μεταλλάξεις), επιδράσεις στην ενζυμική και ορμονική δραστηριότητα, στις βασικές λειτουργίες του οργανισμού, στην αναπαραγωγή, στην τερατογένεση και στην καρκινογένεση (Kabata-Pendias A. & Pendias H., 2007).

Ο κυριότερος μηχανισμός με τον οποίο ασκείται η τοξική δράση των βαρέων μετάλλων είναι η ενζυμική αναστολή με το σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ μεταλλοϊόντων και των ενεργών ομάδων ποικίλων ενζύμων. Τοξικά στοιχεία που εμφανίζονται με τη μορφή ανιόντων, όπως τα αρσενικά, αντιμονιακά, σεληνιακά ή βορικά ιόντα, έχουν την ικανότητα να δράσουν σαν αντιμεταβολίτες αντικαθιστώντας φωσφορικά ή νιτρικά ιόντα. Επίσης, τα παραπάνω ιόντα μπορούν να σχηματίσουν σταθερά ιζήματα ή σύμπλοκα με τα κύρια προϊόντα του μεταβολισμού των έμβιων όντων. Τέλος, κάποια βαρέα μέταλλα όπως το κάδμιο και ο χαλκός, αντιδρούν με τις μεμβράνες των κυττάρων περιορίζοντας τη διαπερατότητά τους, με αποτέλεσμα την περιορισμένη ή ελλιπή μεταφορά ιόντων και οργανικών μορίων (Γκέκας Β. κ.α., 2002).

Υπάρχουν οργανισμοί που έχουν αναπτύξει μηχανισμούς προσαρμογής, ανθεκτικότητας και απομάκρυνσης των βαρέων μετάλλων για την επιβίωση τους σε τοξικά περιβάλλοντα. Στους μηχανισμούς αυτούς ανήκουν:

- αντιδράσεις οξειδοαναγωγής ή υδρόλυσης
- ενσωμάτωση των βαρέων μεταλλικών ιόντων σε μη τοξικές ενώσεις, όπως η δέσμευση του καδμίου στη μεταλλοθειονίνη
- απομόνωση τους σε υποκυτταρικές δομές, όπως τα λυσοσώματα
- σύνδεση των βαρέων μετάλλων με χηλικούς υποκαταστάτες που ευνοούν την απέκκριση (Luoma SN. & Carter JL., 1991). Συνήθως, υπάρχει μια δυναμική ισορροπία μεταξύ της ποσότητας μετάλλων που προσλαμβάνεται από τους οργανισμούς και αυτή που αποβάλλεται.

Λόγω της τοξικής επίδρασης των βαρέων μετάλλων στα υδάτινα οικοσυστήματα έχουν θεσπιστεί νομοθετικά πλαίσια για τις επιτρεπτές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στα ιζήματα τους.

1.2.4. Οικο-τοξικολογική Εκτίμηση Συγκεντρώσεων Βαρέων Μετάλλων στα Ιζήματα

Χωρίς καμία αμφιβολία, τα ιζήματα είναι ζωτικής σημασίας τμήμα για τη λειτουργία των υδάτινων οικοσυστημάτων. Είναι εξαιρετικά σημαντικά για την τροφική αλυσίδα καθώς χρησιμεύουν ως δεξαμενή, όπου οι ρύποι βιοσυσσωρεύονται και εισέρχονται σε αυτή. Κάθε στοιχείο του οικοσυστήματος (αέρας, ίζημα, επιφανειακά και υπόγεια ύδατα, βιοτικό περιβάλλον) είναι σε συνεχή αλληλεπίδραση με τα υπόλοιπα, για αυτό υψηλή συγκέντρωση ρύπων σε ένα μόνο από αυτά μπορεί να οδηγήσει σε συνολική υποβάθμιση ολόκληρου του οικοσυστήματος. Η μελέτη των συνολικών συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων στα ιζήματα αποτελεί δείκτη του βαθμού

επιβάρυνσης του οικοσυστήματος. Ωστόσο, μέχρι τη δεκαετία του 1980 τα επίπεδα ρύπανσης των ιζημάτων προσδιορίζονταν συγκριτικά με τη συγκέντρωση μιας ουσίας σε δείγματα – ιζήματα αναφοράς (Burton Allen G., 2002).

Σήμερα, η οικο – τοξικολογική εκτίμηση βασίζεται στα Sediment Quality Guidelines (SQGs). Τα συμπεράσματα για τις συγκεντρώσεις των ρυπογόνων, που υπολογίζονται εμπειρικά, προέρχονται από περιοχές με μείγματα τοξικών ρυπαντικών ουσιών. Οι συγκεντρώσεις των ρυπογόνων, χωρίς να λαμβάνεται υπόψη το βιοαποδομήσιμο κλάσμα, αναφέρονται σε ξηρό βάρος ιζήματος. Οι οδηγίες αυτές χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των ιζημάτων που έχουν υψηλές, μεσαίες ή χαμηλές πιθανότητες να συσχετιστούν με δυσμενείς επιπτώσεις στους υδάτινους οργανισμούς. Οι οδηγίες αυτές έχουν ευρεία χρήση: συμβάλλουν στην ερμηνεία δεδομένων χημείας ιζημάτων, στο σχεδιασμό προγραμμάτων, στην αξιολόγηση κινδύνου ρυπασμένων περιοχών και στην ανάπτυξη προσεγγίσεων για την αποκατάστασή τους (Burton Allen G., 2002).

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η προσέγγιση του Wisconsin Department of Natural Resource. Σύμφωνα με αυτή αξιολογούνται οι ακόλουθοι δείκτες:

- TEC – Threshold Effect Concentration: Ο δείκτης αυτός αναφέρεται στις συγκεντρώσεις των ρυπογόνων ουσιών κάτω από τις οποίες δεν αναμένονται βιολογικές επιδράσεις στους οργανισμούς των ιζημάτων.
- PEC – Probable Effect Concentration: Ο δείκτης αυτός ορίζει τις συγκεντρώσεις των ρυπογόνων ουσιών πάνω από τις οποίες αναμένονται αρνητικές επιδράσεις στους οργανισμούς των ιζημάτων.

Όταν μία ρυπογόνος ουσία ξεπερνά το PEC όριο σε ένα δείγμα ιζήματος τότε θεωρείται τοξική. Ανάμεσα στα όρια που θεσπίζουν οι δύο παραπάνω δείκτες είναι

πιθανό να υπάρχουν δυσμενείς επιπτώσεις, ωστόσο αυτό αποδεικνύεται κάθε φορά από ερευνητικά και πειραματικά δεδομένα. Οι SQGs παρέχουν τη βάση για την ερμηνεία των σχέσεων μεταξύ της χημείας των ιζημάτων και των βιολογικών επιπτώσεων. Ουσίες που δεν υπερβαίνουν το PEC είναι λιγότερο πιθανό να συμμετέχουν σε παρατηρούμενη τοξικότητα (MacDonald DD. et al., 2000). Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι συγκεντρώσεις TEC και PEC σε mg/kg για τα βαρέα μέταλλα που βρίσκονται ευρέως στα ιζήματα υδάτινων οικοσυστημάτων (MacDonald DD. et al., 2000).

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις TEC και PEC για τα πιο διαδεδομένα στα ιζήματα βαρέα μέταλλα.

Heavy Metals	TEC (mg/kg)	PEC (mg/kg)
Αρσενικό	9,79	33
Κάδμιο	0,99	4,98
Χρώμιο	43,4	111
Χαλκός	31,6	149
Μόλυβδος	35,8	128
Υδράργυρος	0,18	1,06
Νικέλιο	22,7	48,6
Ψευδάργυρος	121	459

Εκτός από τους παραπάνω, υπάρχουν και άλλοι δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Κάποιοι από αυτούς είναι οι:

- Lowest Effect Level – LEL: επίπεδο κάτω από το οποίο το ίζημα θεωρείται μη ρυπασμένο έως οριακά ρυπασμένο.
- Toxic Effect Threshold – TET: επίπεδο πάνω από το οποίο το ίζημα θεωρείται έντονα ρυπασμένο.
- Severe Effect Threshold – SEL: επίπεδο πάνω από το οποίο αναμένονται έντονες αρνητικές επιδράσεις στους υδρόβιους βενθικούς οργανισμούς.

- Effect Range Low – ERL: επίπεδο ρύπανσης κάτω από το οποίο αρνητικές επιπτώσεις στους υδρόβιους οργανισμούς είναι εξαιρετικά σπάνιες.
- Effect Range Median – ERM: επίπεδο ρύπανσης πάνω από το οποίο οι αρνητικές επιπτώσεις στους υδρόβιους οργανισμούς είναι πιθανές (MacDonald DD. et al., 2000).

1.3. Η ΛΙΜΝΗ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑ

Η Λίμνη Παμβώτιδα (39°40'N, 20°53'E) βρίσκεται σε υψόμετρο 470 m στο λεκανοπέδιο των Ιωαννίνων. Η δημιουργία της χρονολογείται στην Πλειο-Πλειστόκαινο εποχή (περίπου 2.588.000 – 11.700 χρόνια πριν) από συνδυασμό διαβρωτικών και τεκτονικών φαινομένων. Το μέσο βάθος της λίμνης είναι 4,3 m, το μέγιστο 9 m και η επιφάνεια της 23 km². Το μέγιστο μήκος είναι περίπου 8 km και το μέγιστο πλάτος περίπου 5 km. Παλαιότερα, η λίμνη ήταν μεγαλύτερη αλλά στο τέλος του 19^{ου} αιώνα το βορειοδυτικό τμήμα της αποξηράνθηκε τεχνητά για γεωργικούς σκοπούς. Η λίμνη θεωρείται ευτροφική, πολυμεικτική με pH περίπου 7,6. Λόγω των ανέμων παρουσιάζει φαινόμενα ανάδευσης ιζημάτων και αλγών, με αποτέλεσμα να υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των ιζημάτων με τον όγκο του νερού (Τουκα Α. et al., 2018).

Η λίμνη Παμβώτιδα έχει αναγνωριστεί παγκόσμια ως πολύ σημαντική για τη βιοποικιλότητα της και προστατεύεται από το δίκτυο Natura 2000 για τη διαχείριση των φυσικών οικοτόπων άγριας πανίδας και χλωρίδας (European Commission, 1992). Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες η λίμνη δέχεται συνεχή μόλυνση από πολλές πηγές λόγω της αστικής, της γεωργικής και της βιομηχανικής ανάπτυξης της περιοχής.

Παρόλο που είναι ιδιαίτερα μελετημένη για φυσικοχημικούς και βιολογικούς παράγοντες, όπως η περιεκτικότητα των θρεπτικών συστατικών στα ιζήματα, τα επίπεδα μετάλλων στο νερό, οι συγκεντρώσεις των αλειφατικών και των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και οι αφθονίες φυτοπλαγκτού, ζωοπλαγκτού, βενθικών οργανισμών και ψαριών, υπάρχει σημαντική έλλειψη δεδομένων σχετικά με τις συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στα ιζήματα της λίμνης. Τέτοια δεδομένα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση του οικολογικού κινδύνου της λίμνης ώστε να επιλεγούν κατάλληλες μέθοδοι αποκατάστασης της. Άλλωστε, η Παμβώτιδα είναι μια αστική λίμνη που δέχεται συνεχείς εισροές από διάφορες ρυπαντικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων και των βαρέων μετάλλων, από την πόλη των Ιωαννίνων και τα προάστια της (Ioannides K. et al., 2015).

Αναλυτικότερα δεδομένα για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της λίμνης Παμβώτιδας παρέχονται από τη μελέτη των Touka A. et al. (2018). Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε εκτίμηση τόσο των φυσικοχημικών παραμέτρων, όσο και των ιόντων και των βαρέων μετάλλων στα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας σε δύο σταθμούς δειγματοληψίας, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν και για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας. Συμφώνα με αυτούς, επιβεβαιώνεται η ευτροφική κατάσταση της λίμνης λόγω των αυξημένων συγκεντρώσεων των τιμών των Ολικός Άνθρακας (TC), Ολικός Οργανικός άνθρακας (TOC), Ολικό Άζωτο (TKN) και Ολικός Φώσφορος (TP). Οι δυο σταθμοί φαίνεται πως διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους σε διάφορους παράγοντες όπως είναι ο TC και ο TOC, τα ιόντα Ca^{2+} , Cl^{-} , και τα μέταλλα Αρσενικό (As) και Νικέλιο (Ni). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3. Φυσικοχημικές παράμετροι των ιζημάτων της λίμνης Παμβώτιδας σε δύο σταθμούς δειγματοληψίας (SS1 και SS2). (a) κύρια χαρακτηριστικά των σταθμών δειγματοληψίας και περιεκτικότητες σε Ανθρακικά, Νιτρικά και Φωσφορικά, (b) Συγκεντρώσεις σε κύρια ιόντα, (c) Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων. Με έντονα γράμματα αναφέρονται τα βαρέα μέταλλα που ξεπερνούν τις συγκεντρώσεις PEC ή TEC (PEC Ni: 48,6 mg/kg, PEC Hg: 1,06 mg/kg, TEC Hg: 0,18 mg/kg, TEC Cr: 43,3 mg/kg, TEC Cu: 31,6 mg/kg) (Touka A. et al., 2018).

	Depth (m)	T °C	pH	TC (mg/g)	TOC (mg/g)	TP (mg/g)	TN (mg/g)
Spring, SS1	8.40 ± 0.20	20 ± 0.50	6.96 ± 0.02	67.54 ± 7.26	60.69 ± 3.13	3.02 ± 0.02	2.94 ± 0.01
Spring, SS2	9.30 ± 0.30	19 ± 0.40	6.30 ± 0.01	99.79 ± 3.53	87.31 ± 3.99	4.05 ± 0.02	5.03 ± 0.11
Summer, SS1	7.30 ± 0.15	26 ± 0.70	7.07 ± 0.01	68.58 ± 2.31	65.00 ± 2.01	4.83 ± 0.05	3.91 ± 0.03
Summer, SS2	8.20 ± 0.18	24 ± 0.50	6.31 ± 0.01	99.53 ± 2.07	93.70 ± 4.09	4.13 ± 0.02	3.33 ± 0.02
Autumn, SS1	8.10 ± 0.25	11 ± 0.50	7.08 ± 0.01	67.39 ± 2.42	63.54 ± 2.56	10.01 ± 0.09	3.99 ± 0.03
Autumn, SS2	9.00 ± 0.20	12 ± 0.50	6.23 ± 0.02	65.60 ± 1.01	61.30 ± 1.96	9.69 ± 0.08	5.01 ± 0.05
Winter, SS1	8.40 ± 0.10	6 ± 0.10	7.18 ± 0.20	59.73 ± 3.60	58.19 ± 2.12	10.75 ± 0.42	3.94 ± 0.03
Winter, SS2	9.30 ± 0.40	6 ± 0.20	6.45 ± 0.02	79.80 ± 11.14	79.60 ± 1.02	8.78 ± 0.05	5.80 ± 0.01

(a)

	Na ⁺ (mg/kg)	K ⁺ (mg/kg)	Ca ²⁺ (mg/kg)	Mg ²⁺ (mg/kg)	Cl ⁻ (mg/kg)	SO ₄ ²⁻ (mg/kg)
Spring, SS1	4.96 ± 0.01	4.17 ± 0.01	37.69 ± 0.02	13.06 ± 0.04	64.34 ± 0.02	296.62 ± 0.04
Spring, SS2	6.09 ± 0.01	5.41 ± 0.01	72.15 ± 0.26	17.83 ± 0.01	117.82 ± 0.70	537.42 ± 0.10
Summer, SS1	4.87 ± 0.01	4.34 ± 0.01	50.04 ± 0.02	14.48 ± 0.03	64.66 ± 0.02	554.17 ± 0.03
Summer, SS2	5.54 ± 0.01	5.98 ± 0.01	76.34 ± 0.79	19.41 ± 0.04	103.95 ± 0.18	386.02 ± 0.12
Autumn, SS1	4.91 ± 0.01	5.57 ± 0.03	49.19 ± 0.12	18.73 ± 0.02	70.17 ± 0.01	431.68 ± 0.02
Autumn, SS2	6.33 ± 0.01	5.86 ± 0.01	70.98 ± 0.02	18.95 ± 0.03	109.87 ± 0.09	589.16 ± 0.03
Winter, SS1	3.39 ± 0.01	5.56 ± 0.01	57.28 ± 0.02	16.33 ± 0.02	35.35 ± 0.02	450.01 ± 0.03
Winter, SS2	3.62 ± 0.02	5.02 ± 0.02	51.26 ± 0.73	16.32 ± 0.02	51.16 ± 0.04	428.55 ± 0.07

(b)

	Sb (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Hg (mg/kg)	Se (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Mn (mg/kg)
Spring, SS1	5.10 ± 0.08	132.00 ± 0.25	1.13 ± 0.01	<6.00	<4.00	1090.00 ± 22.00
Spring, SS2	2.43 ± 0.02	98.00 ± 1.75	1.59 ± 0.01	<6.00	<4.00	959.00 ± 10.00
Summer, SS1	2.85 ± 0.02	126.00 ± 0.20	0.16 ± 0.01	<6.00	<4.00	1130.00 ± 35.00
Summer, SS2	2.78 ± 0.01	97.10 ± 1.53	0.84 ± 0.02	<6.00	<4.00	843.00 ± 21.00
Autumn, SS1	2.89 ± 0.01	123.00 ± 0.17	0.44 ± 0.01	<6.00	<4.00	1330.00 ± 76.00
Autumn, SS2	2.72 ± 0.02	96.50 ± 1.20	0.95 ± 0.01	<6.00	<4.00	923.00 ± 15.00
Winter, SS1	3.32 ± 0.02	135.00 ± 0.22	0.18 ± 0.01	<6.00	<4.00	950.00 ± 15.00
Winter, SS2	3.52 ± 0.02	88.50 ± 2.70	<0.10	<6.00	<4.00	999.00 ± 32.00

(c)

	Pb (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Zn (mg/kg)	As (mg/kg)
Spring, SS1	<30.0	25200.00 ± 58.00	31.40 ± 1.10	83.10 ± 2.87	81.30 ± 1.99	2.76 ± 0.01
Spring, SS2	<30.0	25500.00 ± 61.00	31.80 ± 0.90	59.40 ± 2.12	89.90 ± 3.22	4.58 ± 0.02
Summer, SS1	<30.0	27600.00 ± 32.00	32.10 ± 0.70	83.60 ± 2.66	93.00 ± 1.42	1.88 ± 0.01
Summer, SS2	<30.0	26400.00 ± 59.00	32.10 ± 1.20	66.00 ± 1.89	91.50 ± 2.89	4.44 ± 0.03
Autumn, SS1	<30.0	28100.00 ± 45.00	30.60 ± 0.50	81.70 ± 1.57	90.10 ± 1.08	2.40 ± 0.02
Autumn, SS2	<30.0	23600.00 ± 52.00	31.00 ± 0.20	63.60 ± 1.75	97.00 ± 3.55	4.37 ± 0.01
Winter, SS1	<30.0	28200.00 ± 42.00	34.00 ± 0.90	79.20 ± 1.28	97.00 ± 2.80	2.14 ± 0.01
Winter, SS2	<30.0	21000.00 ± 20.00	37.00 ± 0.40	58.40 ± 1.97	78.70 ± 1.43	4.80 ± 0.02

1.3.1. Το Ίζημα της Παμβώτιδας

Σχετικά πρόσφατα έχει γίνει πλήρης χαρακτηρισμός των ιζημάτων της Παμβώτιδας.

Σύμφωνα με αυτόν το ίζημα σε βάθος μέχρι 30 cm έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Περιεκτικότητα σε υγρασία 20 – 40%, με το pH του νερού να κυμαίνεται μεταξύ 8,8 και 9,6.
- Περιεκτικότητα σε οργανική ύλη 3,9 – 6,7%.
- Το κλάσμα της άμμου (>63μm) βρίσκεται σε ποσοστό 20%, το κλάσμα του πηλού (4–63μm) βρίσκεται σε ποσοστό 68–75%, ενώ αυτό της αργίλου(<4μm) βρίσκεται σε ποσοστό 5–12%.

Το μεγαλύτερο μέρος του πυθμένα της λίμνης καλύπτεται από πηλό και άργιλο, ενώ τα ιζήματα αποτελούνται κυρίως από χαλαζία, αδρανή αργιλώδη ορυκτά και ανθρακικά άλατα, κυρίως ασβεστίτη, όπως αποκαλύφθηκε με περίθλαση ακτινών X. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων στο ίζημα εντοπίζονται στα πρώτα 4 cm της ύψους, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εισροή μετάλλων στη λίμνη είναι σχετικά πρόσφατη διεργασία ή ότι υπάρχει συνεχής αλληλεπίδραση στη διεπαφή ύδατος – ιζήματος (Ioannides K. et al., 2015).

1.3.2. Βαρέα Μέταλλα στα Ιζήματα της Παμβώτιδας

Στα ιζήματα της Παμβώτιδας, όπως και στα ιζήματα πολλών υδάτινων οικοσυστημάτων, έχουν βρεθεί αρκετά βαρέα μέταλλα. Αυτά είναι το τιτάνιο (Ti), το χρώμιο (Cr), το μαγγάνιο (Mn), ο σίδηρος (Fe), το νικέλιο (Ni), ο χαλκός (Cu), ο ψευδάργυρος (Zn), το ζιρκόνιο (Zr), ο μόλυβδος (Pb), το αρσενικό (As) και ο υδράργυρος (Hg). Αυτό συμβαίνει γιατί η λίμνη δέχεται σημαντικό εμπλουτισμό σε βαρέα μέταλλα από διάφορες πηγές. Η λίμνη βρίσκεται σε ένα μεγάλο αστικό κέντρο

που οι απορροές του καταλήγουν ως επί το πλείστο σε αυτή, ξεπλένοντας τόσο τα όμβρια όσο και τα αστικά ύδατα, τα οποία είναι εμπλουτισμένα με απόβλητα του κυκλοφοριακού. Σημαντική είναι η συμβολή των εργασιών συντήρησης της ναυτιλίας της λίμνης. Επίσης, οι επιφανειακές απορροές γεωργικών και κτηνοτροφικών εγκαταστάσεων σε συνδυασμό με τα οικιστικά και τα δημοτικά λύματα αποτελούν εστίες εμπλουτισμού της λίμνης με διάφορα βαρέα μέταλλα. Μικρότερη είναι η συμβολή της βιομηχανικής δραστηριότητας της περιοχής, καθώς η πόλη των Ιωαννίνων δε διαθέτει βαριά βιομηχανία, αλλά μικρές μονάδες παραγωγής και επεξεργασίας (Ioannides K. et al., 2015).

Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στα βαρέα μέταλλα που ξεπερνούν τις συγκεντρώσεις TEC και PEC που θεσπίζονται σύμφωνα με τις SQG. Σύμφωνα με τους Touka A. et al. (2018), αυτά είναι:

- Το Ni, οι συγκεντρώσεις του οποίου βρέθηκαν πάνω από το όριο PEC όλες τις εποχές του χρόνου στους δύο σταθμούς δειγματοληψίας.
- Ο Hg, οι συγκεντρώσεις του οποίου ξεπερνούν το όριο PEC στους δύο σταθμούς την εαρινή περίοδο, το όριο TEC το φθινόπωρο και στους δύο σταθμούς και το όριο TEC το καλοκαίρι μόνο στο δεύτερο σταθμό δειγματοληψίας.
- Το Cr, οι συγκεντρώσεις του οποίου ξεπερνούν το όριο TEC όλες τις εποχές του χρόνου στους δύο σταθμούς δειγματοληψίας.
- Ο Cu, οι συγκεντρώσεις του οποίου ξεπερνούν το όριο TEC το καλοκαίρι και το χειμώνα στο σταθμό 1 και όλες τις εποχές πλην του φθινοπώρου στο σταθμό 2.

Οι συγκεντρώσεις όλων των βαρέων μετάλλων που μετρήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 3.

1.4. ΝΙΚΕΛΙΟ

Το νικέλιο (Ni) είναι το^{7ο} σε αφθονία μέταλλο του φλοιού της γης και, αν και αποτελεί ένα απαραίτητο στοιχείο για τη ζωή φυτών και θηλαστικών, τις τελευταίες δεκαετίες αποτελεί σοβαρό πρόβλημα λόγω της υψηλής του συγκέντρωσης στα ιζήματα και στα εδάφη. Σε περιοχές επιβαρυνμένες με Ni η συγκέντρωση του είναι περίπου 20 – 30 φορές μεγαλύτερη από ότι σε μη επιβαρυνμένες περιοχές. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του Ni στα ιζήματα το κατατάσσουν σαν δυνητικά τοξικό στοιχείο, καθώς επιφέρει επιπτώσεις τόσο στη λειτουργία του εδάφους όσο και στο οικοσύστημα λόγω της ικανότητας μεταφοράς του από το ίζημα στα φυτά και κατά συνέπεια στην τροφική αλυσίδα (Kabata-Pendias A., 2011).

Το Ni στα ιζήματα μπορεί να προέρχεται τόσο από φυσικές διεργασίες όσο και από ανθρωπογενείς παρεμβάσεις, καθώς χρησιμοποιείται με άλλα μέταλλα, όπως ο σίδηρος, ο χαλκός, το χρώμιο και ο ψευδάργυρος για την παραγωγή χάλυβα και κραμάτων. Πρόκειται για καλό αγωγό της θερμότητας και του ηλεκτρισμού. Σχηματίζει ενώσεις με στοιχεία όπως διάφορα οξείδια και μέταλλα (Vymazal J., 2010). Η εισροή νικελίου από ανθρωπογενή πηγή αφορά κυρίως τα βιομηχανικά απόβλητα. Επίσης, βρίσκεται προσκολλημένο σε μικρά σωματίδια σκόνης που προέρχονται από τις καμινάδες εγκαταστάσεων παραγωγής ενέργειας, τα οποία μεταφέρονται στον αέρα και κατακρημνίζονται στο έδαφος, από όπου καταλήγουν στα υπόγεια νερά και από εκεί στα ιζήματα (Tzefaris GP., 2012). Έχει αποδειχθεί ότι το νικέλιο φυσικής προέλευσης έχει χαμηλή κινητικότητα άρα χαμηλό

περιβαλλοντικό κίνδυνο, ενώ το ανθρωπογενούς προέλευσης νικέλιο έχει αυξημένη κινητικότητα με αποτέλεσμα να είναι δυνητικά τοξικό για τους οργανισμούς (Farkas A. et al., 2007).

Σημαντικό ρόλο στη δυνητικά τοξική του φύση παίζουν οι οξειδοαναγωγικές συνθήκες του ιζήματος. Το Ni μπορεί να βρεθεί στις οξειδωτικές καταστάσεις 1, 2, 3 και 4, αλλά μόνο η κατάσταση Ni^{2+} είναι σταθερή στις συνθήκες pH και οξειδοαναγωγής που επικρατούν στα περισσότερα ιζήματα (Ma Y. & Hooda PS., 2010). Το νικέλιο υπάρχει σε διάφορα κλάσματα που μπορεί να είναι διαλυτά, ανταλλάξιμα, συνδεδεμένα με ανθρακικά άλατα, με οξείδια Fe ή Mn και σε μορφή καταλοίπων (Shaheen SM. & Rinklebe J., 2014).

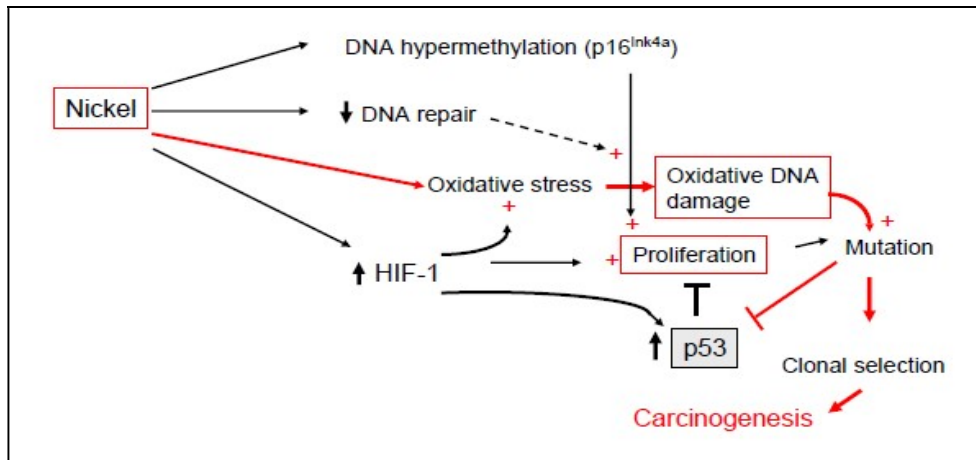
Η συγκέντρωση του Ni στα ιζήματα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αρχική τους σύσταση. Χαμηλό pH του ιζήματος ευνοεί το σχηματισμό διαλυτών ενώσεων Ni, ενώ σε οξειδωμένα ή μη όξινα συστήματα τείνουν να επικρατούν ελαφρώς διαλυτές ή αδιάλυτες μορφές του. Αύξηση του pH κάτω από οξειδωτικές συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν αύξηση των επιφανειακών αρνητικών φορτίων δημιουργώντας ευνοϊκές συνθήκες για την προσρόφιση Ni στα συστατικά του ιζήματος (Shaheen SM. & Rinklebe J., 2017).

Οι πιο σημαντικοί παράγοντες δέσμευσης του Ni είναι τα οξείδια σιδήρου και μαγγανίου. Η δέσμευση του στα παραπάνω οδηγεί σε συγκαθίζηση τους. Επίσης, η ποσότητα των Fe^{2+} και Mn^{2+} είναι καθοριστική για την απομάκρυνση του Ni από τις περιοχές ανταλλαγής με την υδάτινη φάση. Τα παραπάνω ενισχύονται από το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των διαλυμένων Fe, Ni και Mn είναι σημαντικά υψηλότερες σε αναγωγικές από ότι σε οξειδωτικές συνθήκες. Για το λόγο αυτό όταν το ίζημα έχει χαμηλό pH και περιέχει υδροξείδια του σιδήρου μπορεί να περιοριστεί η

απελευθέρωση του Νί στην υδάτινη φάση του οικοσυστήματος. Άλλα στοιχεία που εμπλέκονται στη διαθεσιμότητα του Νί στα ιζήματα είναι το S και το Mg (Shaheen SM. & Rinklebe J., 2017).

Υψηλές συγκεντρώσεις νικελίου σε ιζήματα και εδάφη μπορούν να είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς για τα φυτά και τους υδρόβιους οργανισμούς, γι' αυτό περιλαμβάνεται στον κατάλογο των ουσιών προτεραιότητας στα πλαίσια του Framework Directive της Ευρωπαϊκής Ένωσης (2000/60/EC) (Ernest M., 1984). Το νικέλιο συσσωρεύεται στα φυτά και μέσω τις τροφικής αλυσίδας στα ψάρια και από εκεί μπορεί να καταναλωθεί από τον άνθρωπο. Στην περίπτωση που η πρόσληψη του ξεπεράσει τη μέγιστη ανεκτή ποσότητα προκαλεί τις τοξικές του επιδράσεις και μπορεί να είναι επικίνδυνο. Το νικέλιο στα θηλαστικά συμμετέχει σε ένα μόνο ένζυμο, την ουρεάση, η οποία καταλύει την αποσύνθεση της ουρίας σε αμμωνία, ενώ στα βακτήρια συμμετέχει σε αρκετά περισσότερα (Keyuna S. et al., 2011).

Το Νί είναι αρκετά τοξικό. Μπορεί να προκαλέσει δερματίτιδα και πολλοί αποκτούν ευαισθησία μετά από παρατεταμένη έκθεση σε αυτό, κυρίως λόγω της χρήσης του σε κοσμήματα. Το Νί έχει την ικανότητα να προκαλέσει παραγωγή ελευθέρων ριζών στα κύτταρα των οργανισμών, οι οποίες προκαλούν βλάβες στο DNA και αναστολή των επιδιορθωτικών τους μηχανισμών. Η έκθεση σε σκόνη με Νί αποτελεί πιθανή αιτία καρκίνου του πνεύμονα. (Attig H. et al., 2014).



Εικόνα 2. Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας του Ni.

1.5. ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΣ

Ο υδράργυρος (Hg) είναι το μοναδικό μέταλλο που σε θερμοκρασία περιβάλλοντος βρίσκεται σε υγρή μορφή και είναι ιδιαίτερα πτητικός. Είναι καλός αγωγός της θερμότητας και αρκετά καλός αγωγός του ηλεκτρισμού. Η συγκέντρωση του υδραργύρου στο περιβάλλον είναι αυξημένη κυρίως λόγω των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων που παράγουν περίπου 2600 τόνους υδραργύρου το χρόνο, αλλά και λόγω φυσικών αιτιών. Ο στοιχειώδης υδράργυρος (Hg^0), που περιλαμβάνει το 95–99% του υδραργύρου στην ατμόσφαιρα μπορεί να κυκλοφορήσει στον αέρα μέχρι και ένα έτος πριν από την απόθεση του στο έδαφος ή στο νερό και να μεταφερθεί σε μεγάλες αποστάσεις από την πηγή εκπομπής του. Στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας οξειδώνεται προς τα κατιόντα Hg^+ ή Hg^{2+} και αποτίθεται στο έδαφος με τη βροχή (Rice K. et al., 2014).

Οι φυσικές πηγές απελευθέρωσης υδραργύρου στην ατμόσφαιρα είναι τα ηφαίστεια, οι δασικές πυρκαγιές και η διάβρωση των ορυκτών. Σημαντικότερες ανθρωπογενείς πηγές απελευθέρωσης Hg είναι η κινητοποίηση των προσμίξεων υδραργύρου κατά την καύση του άνθρακα, την παραγωγή τσιμέντου και τις εξορύξεις μετάλλων, οι

εκπομπές από την άμεση εξόρυξη υδραργύρου και η χρήση του σε προϊόντα ευρέως χρησιμοποιούμενα, όπως τα οδοντικά αμαλλάματα και οι απελευθερώσεις από την επεξεργασία αποβλήτων (Pirrone N. et al., 2010).

Οι μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες του Hg τον καθιστούν εύκολα ανταλλάξιμο ανάμεσα στα περιβαλλοντικά μέσα. Μετά την απελευθέρωση του στο περιβάλλον, ο υδράργυρος εισέρχεται σε ένα βιοχημικό κύκλο που παραμένει χημικά, βιολογικά και περιβαλλοντικά ενεργός για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι τρεις φάσεις του κύκλου αυτού είναι: 1) η απελευθέρωση του υδραργύρου στην ατμόσφαιρα, 2) η μεταφορά και η απόθεση του και 3) η βιολογική μετατροπή και απορρόφηση του από διάφορους οργανισμούς και η προσρόφηση του στα ιζήματα, που θεωρούνται ο τελικός του αποδέκτης (Selin N., 2009).

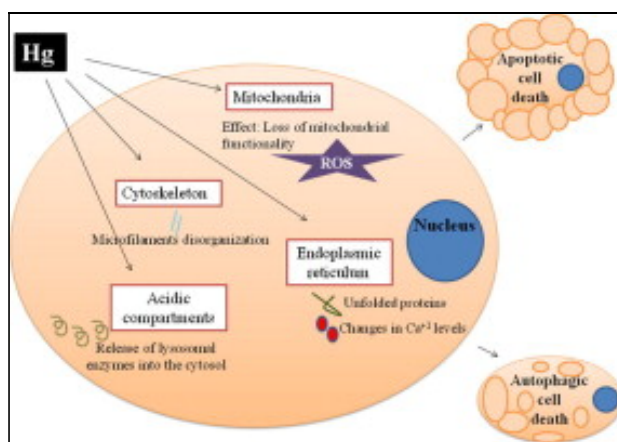
Η κινητικότητα και η βιοδιαθεσιμότητα του υδραργύρου στα ιζήματα εξαρτάται από τα συστατικά του ιζήματος και την οξειδωτική κατάσταση του ίδιου του μετάλλου. Συγκεκριμένα, για τον Hg σημαντικό ρόλο παίζει η θερμοδυναμική διαλυτότητα των ενώσεων του. Μόλις ο ατμοσφαιρικός Hg εισαχθεί στην υδρόσφαιρα δεσμεύεται σε αιωρούμενα σωματίδια, καταβυθισμένη ύλη, φυσική οργανική ύλη και άλλα υποστρώματα και ενσωματώνεται στα ιζήματα. Ο δισθενής Hg είναι η πιο σταθερή οξειδωτική κατάσταση στα υδάτινα οικοσυστήματα. Ο Hg^{2+} έχει την τάση να δημιουργεί ανόργανες ενώσεις, τα άλατα υδραργύρου, με στοιχεία όπως το χλώριο, το θείο και το οξυγόνο. Οι ενώσεις αυτές είναι γενικά πιο τοξικές από τον στοιχειακό υδράργυρο και έχουν χρόνο ημιζωής περίπου 40 ημέρες. (Randal MP. & Chattopadhyay S., 2013).

Ο υδράργυρος είναι ένα φυσικά εμφανιζόμενο στοιχείο που όταν κινητοποιηθεί στο έδαφος μπορεί να εισαχθεί και να συσσωρευτεί στην τροφική αλυσίδα. Μόλις φτάσει

στο ιζήμα μετατρέπεται συνήθως σε μεθυλικό υδράργυρο (MeHg, CH₃Hg⁺), μια ουσία που μπορεί να απορροφηθεί γρήγορα από τους περισσότερους οργανισμούς και να επιφέρει τοξικές επιδράσεις. Αυτή η μορφή του υδραργύρου είναι αυτή που συσσωρεύεται στην τροφική αλυσίδα, αντίθετα με τον ανόργανο που δεν έχει αυτή τη ικανότητα (Pirrone N. et al., 2010). Ο μεθυλικός υδράργυρος έχει την τάση να βιομεγενθύνεται και σχηματίζεται όταν αυτός έρχεται σε επαφή με τον άνθρακα. Οι διαδικασίες μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης του υδραργύρου πραγματοποιούνται στα ιζήματα. Οι οργανικές ενώσεις του υδραργύρου είναι δυνητικά πιο τοξικές από τις ανόργανες, με το MeHg να καταλαμβάνει περίπου το 90% των οργανικών ενώσεων στα ιζήματα (Franklin et al., 2012). Αυτή η μορφή του υδραργύρου μπορεί να εισαχθεί στην τροφική αλυσίδα και να προκαλέσει βλάβες σε ανώτερους οργανισμούς. Η ένωση αυτή είναι λιποδιαλυτή και έχει την ικανότητα να διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες και να συσσωρεύεται στα κύτταρα συμπλεκόμενη με πρωτεΐνες, ένζυμα και νουκλεϊκά οξέα. Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τη μεθυλίωση, όπως η διαθεσιμότητα ανόργανου υδραργύρου, η συγκέντρωση του οξυγόνου, το pH, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, η παρουσία θειικών και θειούχων αλάτων, η αλκαλικότητα και η οργανική ύλη. Η Αμερικανική Κυβέρνηση κατατάσσει τον υδράργυρο στην τρίτη θέση των πλέον τοξικών στοιχείων ή ενώσεων με τοξικές επιδράσεις και πρόκλησης ασθενειών (Rice K. et al., 2014).

Οι συγκεντρώσεις του Hg στα υδάτινα οικοσυστήματα συνήθως δε δημιουργούν κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία (WHO, 2016). Η κύρια πηγή δηλητηρίασης του ανθρώπου από Hg είναι η κατανάλωση ψαριών από υδάτινα περιβάλλοντα εμπλουτισμένα από αυτόν. Η δηλητηρίαση από τον υδράργυρο μπορεί να προκαλέσει θάνατο, ψυχική επιβράδυνση, δυσαρθρία, τύφλωση, νευρολογικά ελλείμματα, απώλεια ακοής και αναπτυξιακά ελαττώματα. Αναφορικά με τις επιδράσεις του στα

κύτταρα, η έκθεση σε Hg συνδέεται με αλλοιώσεις της διαπερατότητας και της μακρομοριακής δομής των μεμβρανών και βλάβες στο DNA. Επιπλέον, ο Hg προκαλεί οξειδωτικό στρες στα κύτταρα και διαταραχές της μιτοχονδριακής λειτουργίας, που οδηγούν σε μεταβολές της ομοιόστασης του Ca. Τέλος, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα οξυγόνου καθώς δρα ως καταλύτης στις αντιδράσεις Fenton (Rice K. et al., 2014). Η ικανότητα του Hg να επηρεάζει πολλαπλά κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, ο κυτταροσκελετός και το ενδοπλασματικό δίκτυο μπορεί να οδηγήσει επίσης και σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης.



Εικόνα 3. Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας του Hg.

1.6. ΧΡΩΜΙΟ

Το χρώμιο (Cr) είναι το 22^ο σε αφθονία χημικό στοιχείο στο φλοιό της γης. Αποτελεί το μόνο στερεό στοιχείο που όταν βρίσκεται στη φύση ελεύθερο δεν έλκεται μαγνητικά σε θερμοκρασία δωματίου. Το Cr χρησιμοποιείται κυρίως στη χημική βιομηχανία, στη μεταλλουργία και στην παραγωγή πυρίμαχων υλικών (Kotas J. & Stasicka Z., 2000).

Ενώσεις του Cr βρίσκονται στο περιβάλλον από διάβρωση χρωμιούχων πετρωμάτων, ηφαιστειακές εκρήξεις, δασικές πυρκαγιές και άλλες διεργασίες. Μεγαλύτερη

ανησυχία προκαλούν οι ανθρωπογενείς εκπομπές χρωμίου, καθώς σε αυτές οφείλεται σε μεγάλο βαθμό η παρουσία του εξασθενούς χρωμίου στο περιβάλλον. Δραστηριότητες όπως η καύση ανθράκων ή πετρελαίου, η παραγωγή χάλυβα, η βυρσοδεψεία, η επεξεργασία ξυλείας και η παραγωγή τσιμέντου αποτελούν σημαντικές πηγές χρωμίου για το περιβάλλον (Allen D., 2003).

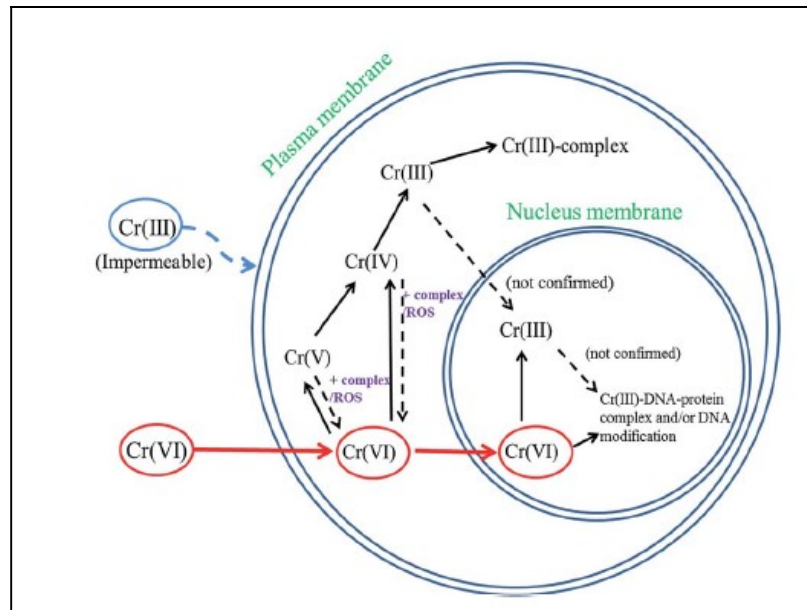
Οι οξειδωτικές καταστάσεις του Cr κυμαίνονται από Cr(II) έως Cr(VI). Το Cr στο περιβάλλον απαντάται κυρίως σε δύο οξειδωτικές καταστάσεις, την τρισθενή (Cr^{3+}) και την εξασθενή (Cr^{6+}). Το εξασθενές Cr είναι πολύ ασταθές και ιδιαίτερα τοξικό, ενώ το τρισθενές μπορεί να ακινητοποιηθεί σε εδάφη και ιζήματα. Σε αυτή τη μορφή το χρώμιο έχει υψηλή συγγένεια με τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα και τα κolloειδή των ιζημάτων και δίνει ελάχιστα διαλυτές ενώσεις όπως το $\text{Cr}(\text{OH})_3$. Η συμπεριφορά του χρωμίου στα ιζήματα εξαρτάται από τη χημική του μορφή. Υδρογονωμένα ιόντα χρωμίου (HCrO_4^-) κυριαρχούν σε pH χαμηλότερο του 6,5, ιόντα χρωμίου (CrO_4^{2-}) κυριαρχούν σε pH ίσο με 6,5 και διχρωμικά ιόντα ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε pH 2 – 6. Εξαιτίας της ανιονικής φύσης του εξασθενούς χρωμίου είναι περιορισμένη η προσρόφηση του στα ιζήματα, κυρίως λόγω της κυριαρχίας των αρνητικά φορτισμένων περιοχών ανταλλαγής, όπου το τρισθενές χρώμιο προσροφάται με μεγάλη ευκολία. Μόλις το Cr(III) συμπλοκοποιηθεί με υδατοδιαλυτούς οργανικούς υποκαταστάτες παραμένει ακινητοποιημένο στο ίζημα. Η χημική συσχέτιση (chemical speciation) του Cr είναι σημαντική πτυχή της χημείας του ως ρύπος, τόσο σε σχέση με το περιβάλλον όσο και για την ικανότητα πρόσληψης του από τα φυτά (Rosales RM. et al., 2017). Γενικά, το χρώμιο στα ιζήματα απαντάται κυρίως με την τρισθενή του μορφή σε μικτά οξείδια χρωμίου και σιδήρου. Το εξασθενές Cr δημιουργεί ανιόντα τα οποία είτε παραμένουν διαλυμένα στο νερό ή διαιρούνται (partition) σε στερεά όπως τα οξείδια του σιδήρου

και του αλουμινίου στην υδάτινη στήλη. Το Cr(VI) μπορεί να απορροφηθεί σε οξείδια των μετάλλων, αλλά η διαίρεση του εξαρτάται από τις συνθήκες pH και τις συγκεντρώσεις των στερεών. Σε ανοξικές συνθήκες, το εξασθενές Cr ανάγεται εύκολα σε τρισθενές. Η αντίθετη διαδικασία, δηλαδή οξείδωση του Cr(III) σε Cr(VI) δεν πραγματοποιείται εύκολα, καθώς στα περισσότερα ιζήματα επικρατούν ανοξικές συνθήκες (Rifkin E. et al., 2004).

Η περιεκτικότητα των ιζημάτων σε Cr αποτελεί ένα μόνιμο περιβαλλοντικό ζήτημα, καθώς το Cr μπορεί να επαναδιαλυθεί στην υδάτινη στήλη. Η ασταθής εξασθενής μορφή κινητοποιείται εύκολα σε όξινα και αλκαλικά εδάφη και μπορεί να γίνει ιδιαίτερα τοξική για φυτά και ζώα (Allen D., 2003). Το εξασθενές Cr είναι περίπου 100 φορές πιο τοξικό από το τρισθενές τόσο σε οξεία όσο και σε χρόνια έκθεση. Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer – IARC) κατατάσσει το Cr(IV) στο Group 1, δηλαδή καρκινογόνο για τον άνθρωπο, και το μεταλλικό και τρισθενές Cr στο Group 3, δηλαδή στις ενώσεις που μέχρι στιγμής δεν έχουν ταυτοποιηθεί σαν καρκινογόνες (IARC, 1980).

Οι περισσότεροι άνθρωποι εκτίθενται μόνο στο τρισθενές χρώμιο, το οποίο είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο και βοηθά τον οργανισμό να χρησιμοποιήσει τα σάκχαρα, τις πρωτεΐνες και τα λιπαρά, αλλά πρέπει να αποφεύγεται σε υπερβολικές δόσεις. Αντίθετα, το εξασθενές χρώμιο μπορεί να προκαλέσει από απλούς ερεθισμούς του δέρματος μέχρι και θάνατο (Allen D., 2003). Το Cr(VI) μπορεί εύκολα να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες και έπειτα να αναχθεί σε Cr(III) με το σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Το ίδιο το χρώμιο σε συνδυασμό με τις ROS μεταβάλλουν το οξειδωτικό δυναμικό των κυττάρων και ασκούν επιβλαβείς επιδράσεις στα κύτταρα με την αναστολή διάφορων μεταλλοενζύμων.

Βραχυπρόθεσμη έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις Cr(IV) μπορεί να προκαλέσει αλλεργίες, δερματικά εξανθήματα και προβλήματα στο στομάχι. Μακροπρόθεσμη έκθεση σε αυτό μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο ήπαρ, στα νεφρά και το νευρικό ιστό και σε μεγάλες δόσεις να οδηγήσει σε θάνατο (Wei Jin & Kai Yan, 2015).



Εικόνα 4. Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας του Cr.

1.7. ΧΑΛΚΟΣ

Ο χαλκός (Cu) είναι ένα μέταλλο με χαρακτηριστικό χρώμα που βρίσκεται αυτοφυής σε φυσικά κοιτάσματα, συνήθως ως θειούχο ορυκτό. Πρόκειται για έναν πολύ καλό αγωγό της θερμότητας και του ηλεκτρισμού (US Department of Health and Human Services, 2004).

Ο χαλκός εισάγεται φυσικά στα υδάτινα οικοσυστήματα μέσω απόπλυσης εδαφών και κατακρημνίσεων. Οι ανθρωπογενείς πηγές προέλευσης αφορούν διάφορες επιμεταλλώσεις, γαλβανοποιήσεις, τα απόβλητα δυλιστηρίων πετρελαίου αλλά και την ίδια τη διαδικασία εξόρυξης του. Επιπλέον, χαλκός χρησιμοποιείται σε

παρασιτοκτόνα και φυτοφάρμακα και εκπλένεται άμεσα από τις καλλιέργειες στο νερό (Beghelli FGS. et al., 2016).

Ο χαλκός στο περιβάλλον βρίσκεται σε στοιχειακή μορφή, ως ελεύθερο μέταλλο, αλλά και δεσμευμένος σε χημικές ενώσεις. Οι περισσότερες ενώσεις του Cu εμφανίζονται με σθένος +1 και +2. Στα υδάτινα οικοσυστήματα απαντώνται κυρίως ενώσεις του δισθενούς χαλκού, καθώς το μονοσθενές ιόν σε υδατικό περιβάλλον μετατρέπεται ταχύτατα σε δισθενές ή στοιχειακό χαλκό, με εξαίρεση την ένωση $CuCl$, η οποία μπορεί να παραμείνει σταθερή και αδιάλυτη για πολλές ώρες. Όταν διαλυτές ενώσεις του χαλκού εισέρχονται στο υδάτινο οικοσύστημα, προσκολλάται ισχυρά σε σωματίδια μέσα στο νερό, τα οποία σε κατάλληλες συνθήκες καθιζάνουν με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαθεσιμότητα και η κινητικότητα του. Οι ενώσεις του χαλκού που κυριαρχούν στο νερό είναι οι $Cu(OH)Cl$, $Cu(OH)_2$ και $CuCO_3$. (Agency for Toxic substances and Decrease Registry, 2004). Ο χαλκός προσροφάται στα ιζήματα μέσω 1) συμπλοκοποίησης με την οργανική ύλη, 2) ειδικής προσρόφησης και 3) ανταλλαγής ιόντων.. Στα ιζήματα ο χαλκός δεσμεύεται από τα οξείδια του σιδήρου και του μαγγανίου στην άργιλο και κυρίως στα χουμικά οξέα στο οργανικό υλικό. Το μεγαλύτερο ποσοστό του, ωστόσο, είναι ενωμένο με οργανικούς υποκαταστάτες και σουλφίδια. Η δέσμευση του χαλκού στο οργανικό υλικό των ιζημάτων εξαρτάται από το pH, τη μείωση ικανότητας οξειδωσης στο συγκεκριμένο περιβάλλον και την παρουσία ανταγωνιστικών μεταλλικών κατιόντων και ανόργανων ουσιών (Agency for Toxic substances and Decrease Registry, 2004).

Είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα, καθώς ενσωματώνεται σε ποικίλα ένζυμα, με κοινό λειτουργικό χαρακτηριστικό τους την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Ο χαλκός τους παρέχει αυτή τη δυνατότητα καθώς μπορεί να κάνει κύκλο μεταξύ της οξειδωμένης και της αναγωγικής του κατάστασης.

Παραδείγματα τέτοιων ενζύμων είναι η υπεροξειδάση του κυτοχρώματος C και η υπεροξειδισμουτάση. Επίσης, ορισμένα μαλάκια και αρθρόποδα έχουν ως μεταφορική ουσία των αναπνευστικών αερίων αιμοκυανίνη, η οποία περιέχει χαλκό. (Tchounwou BP. et al., 2008).

Παρόλο που ο χαλκός είναι αναγκαίος σε ιχνοποσότητες, ακόμα και μικρές συγκεντρώσεις του μπορούν να αποτελέσουν παράγοντα κινδύνου για ένα υδάτινο οικοσύστημα. Το κατιόν Cu^{2+} είναι η πιο σημαντική οξειδωτική του κατάσταση και στα ιζήματα είναι το περισσότερο διαθέσιμο και τοξικό από τις υπόλοιπες ανόργανες ενώσεις του. Η βιοδιαθεσιμότητα του χαλκού σχετίζεται άμεσα με τις μορφές που παίρνει στο ίζημα. Οι τοξικές του επιπτώσεις μπορεί να υφίστανται και στους οργανισμούς που ζουν σε επαφή με τα ιζήματα επηρεάζοντας την κατανομή και τη σύσταση των κοινοτήτων τους (Beghelli FGS. et al., 2016). Απορροφάται πιο εύκολα από τα φυτά όταν τα επίπεδα οργανικών είναι αυξημένα, καθώς η οργανική ύλη λειτουργεί σαν μεταφορέας κατιόντων διευκολύνοντας τη διάχυση του προς το εσωτερικό των ριζών (Mc Bride, 1994).

Η ικανότητα μετάβασης του χαλκού ανάμεσα στις δύο οξειδωτικές του καταστάσεις είναι αυτή που τον κατατάσσει σαν δυνητικά τοξικό. Η τοξικότητα του οφείλεται στην επίδραση του σε ένζυμα απαραίτητα για την πρόσληψη και αφομοίωση άλλων ιχνοστοιχείων όπως ο Zn και το Mn, καθώς συνδέεται σε άμινο-, ίμινο- και σουλφυδριλικές ομάδες του ενεργού κέντρου τους. Μπορεί επίσης να επηρεάσει τις κυτταρικές μεμβράνες μειώνοντας τη διαπερατότητα τους. Ο απορροφούμενος χαλκός μεταφέρεται από το αίμα στο ήπαρ και άλλα όργανα, όπως η καρδιά, ο εγκέφαλος, οι νεφροί και οι μύες. Για το λόγο αυτό, η χρόνια έκθεση στο Cu συνδέεται με διάφορες αναπνευστικές, αιματολογικές, γαστρεντερικές, νευρολογικές και δερματολογικές διαταραχές. Ωστόσο ο IARC δεν τον κατατάσσει ως καρκινογόνο

για τον άνθρωπο, καθώς για να εμφανίσει τοξικότητα θα πρέπει η παρουσία του να συνδυάζεται με διαταραχές στους ομοιοστατικούς μηχανισμούς απομάκρυνσης του (Li Y. et al., 1994).

1.8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ IN VIVO ΜΟΝΤΕΛΑ

Είναι απαραίτητο να υπάρχουν πειραματικές διαδικασίες με τις οποίες θα προβλέπονται οι τυχόν αρνητικές επιδράσεις των διάφορων ρυπαντικών ουσιών σε ζωντανούς οργανισμούς. Σε τέτοιες περιπτώσεις πολλές φορές χρησιμοποιούνται φυτά, τα οποία έχουν αποτελούν εξαιρετικά γενετικά μοντέλα για την παρακολούθηση περιβαλλοντικών ρύπων (Hilada N. et al., 2013). Τα φυτά έχουν συνήθως μικρό αριθμό και μεγάλου μεγέθους χρωμοσώματα, τα οποία ανταποκρίνονται με παρόμοιο τρόπο με τα κύτταρα των θηλαστικών στους περιβαλλοντικούς μεταλλαξιγόνους παράγοντες. Επιπλέον, τα φυτικά κύτταρα περιέχουν το ένζυμο οξειδάση που είναι απαραίτητο για αξιολογήσεις μεταλλαξιγόνων, σε σχέση με άλλες δοκιμασίες στις οποίες απαιτείται εξωγενής προσθήκη μεταβολικών συστημάτων. Ωστόσο, υπάρχουν και κάποιοι περιορισμοί όπως ο μεγαλύτερος κύκλος ζωής των περισσότερων φυτών από αυτόν των βακτηρίων, των ζυμών ή της *Drosophila*, οργανισμών που χρησιμοποιούνται κατά κόρον σε in vivo δοκιμασίες. Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικές βιοχημικές και δομικές διαφορές μεταξύ των φυτικών κυττάρων και των κυττάρων των θηλαστικών (Hilada N. et al., 2013).

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτά για την αξιολόγηση των περιβαλλοντικών ρύπων είναι τα *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Trandescantia*, *Nicotiana tobacum*, *Crepis capillaries* και *Hondeum vulgare*. Ανάμεσα τους, το *Allium cepa*

αποτελεί το πιο ευνοϊκό για την ανίχνευση χρωμοσωμικών βλαβών και διαταραχών του μιτωτικού κύκλου, καθώς έχει σχετικά μικρό αριθμό χρωμοσωμάτων ($2n = 16$) με μεγάλο μέγεθος (Fiskesjö G., 1985). Οι αναπτυσσόμενες ρίζες του κρεμμυδιού παρέχουν μια πηγή μελέτης των επιπτώσεων των χημικών ουσιών στα χρωμοσώματα (Hilada N. et al., 2013).

Το πρωτόκολλο *Allium cepa* Test χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1938, για την παρακολούθηση περιβαλλοντικών ρύπων με πιθανή μεταλλαξιγόνο ή καρκινογόνο δράση, το οποίο τροποποιήθηκε κατάλληλα από τον Fiskesjö G. το 1985 με σκοπό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο παρακολούθησης περιβαλλοντικών ρύπων (Hilada N. et al., 2013). Το *Allium cepa* test είναι ένα εξαιρετικό in vivo μοντέλο, καθώς οι ρίζες των κρεμμυδιών είναι οι πρώτες που εκτίθενται στο τοξικό υλικό και συνεχίζουν να μεγαλώνουν σε άμεση επαφή με την εκάστοτε υπό μελέτη ουσία. Μπορούν να παρατηρηθούν τόσο δομικές όσο και αριθμητικές βλάβες στο DNA και τους πυρήνες των κυττάρων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή τη δοκιμασία χρησιμοποιούνται σαν συναγερός για περαιτέρω μελέτες με άλλους βιοδείκτες (Leme DM. & Marin-Morales MA., 2009).

Οι πιο σημαντικοί γενετικοί δείκτες που αξιολογούνται από το πρωτόκολλο είναι:

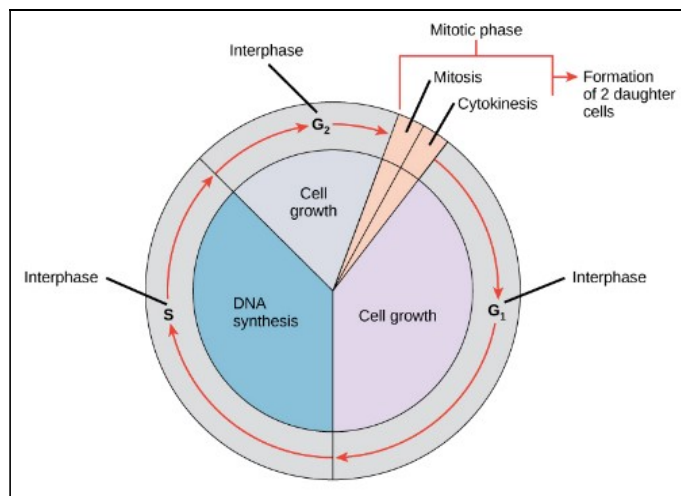
1. Mitotic Index (MI): Αφορά το συνολικό αριθμό κυττάρων που βρίσκονται σε μιτωτική διαίρεση, σε οποιαδήποτε φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα επίπεδα της κυτταροτοξικότητας ανιχνεύονται με την αύξηση ή τη μείωση του MI. Μειωμένο MI υποδεικνύει χημική επίδραση της ουσίας στον οργανισμό, ενώ αυξημένο σημαίνει διαταραγμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση.

2. Χρωμοσωμικές Ανωμαλίες – Chromosome Aberrations (CA): Αναφέρονται σε αλλαγές στη δομή ή το συνολικό αριθμό των χρωμοσωμάτων, οι οποίες προκαλούνται είτε αυθόρμητα, είτε μέσω επίδρασης χημικών ουσιών. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι εμφανείς στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Ανωμαλίες όπως οι χρωμοσωμικές γέφυρες και οι θραύσεις είναι δείκτες παρουσίας κλαστογόνων (clastogenic) παραγόντων, ενώ ανωμαλίες όπως καθυστερήσεις, προσκολλημένα χρωμοσώματα, πολυπολικότητα και C–μεταφάσεις αποτελούν δείκτη ανευγενών (aneugenic) επιδράσεων, που σαν αποτέλεσμα έχουν θυγατρικά κύτταρα με μη φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων.
3. Πυρηνικές Ανωμαλίες – Nuclear Abnormalities (NA): Αφορούν μορφολογικές μεταβολές των μεσοφασικών πυρήνων. Τέτοιες μεταβολές είναι οι πυρήνες με λοβούς, οι πυρήνες με εκβλαστήματα, οι κατακερματισμένοι πυρήνες και τα πολυπύρηνα ή μικρού μεγέθους κύτταρα. Κάποιες από τις παραπάνω μεταβολές ενδέχεται να υποδεικνύουν κυτταρικό θάνατο, καθώς δεν παρατηρούνται υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης.
4. Μικροπυρήνες – Micronucleus (MN): Προέρχονται από αδυναμία των επιδιορθωτικών μηχανισμών των πατρικών κυττάρων και είναι ιδιαίτερα ευκρινείς στα θυγατρικά. Οι MN προκύπτουν είτε από θραύσεις χρωμοσωμάτων, είτε από πολυπλοειδίες σε μια προσπάθεια του κυττάρου να διατηρήσει το φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων. Το μέγεθος του MN λειτουργεί επίσης και σαν παράμετρος για την εκτίμηση κλαστογόνων ή ανευγενών επιδράσεων: μεγάλο μέγεθος υποδεικνύει ανευγενή επίδραση και μπορεί να είναι αποτέλεσμα απώλειας χρωμοσώματος, ενώ μικρό μέγεθος

υποδεικνύει κλαστογόνο επίδραση που μπορεί να οφείλεται σε χρωμοσωμική θραύση (Leme DM. & Marin-Morales MA., 2009).

1.8.1. Ο Κυτταρικός Κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή που ένα κύτταρο διαιρείται σε δύο θυγατρικά έως τη στιγμή που αυτά θα διαιρεθούν δίνοντας το καθένα τους απογόνους του. Ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε δύο φάσεις: Τη μεσόφαση, η οποία καταλαμβάνει το 90 – 95 % της διάρκειας της ζωής του κυττάρου και υποδιαιρείται στις G₁, S και G₂ φάσεις, και τη μίτωση ή μιτωτική διαίρεση οπότε λαμβάνουν χώρα η διαίρεση του πυρήνα και η διαίρεση του κυττάρου (κυτταροκίνηση) (Cooper GM., 2000). Οι διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου είναι συντονισμένες να συμβαίνουν με μια προσδιορισμένη σειρά και έναν ακριβή χρονικό προσδιορισμό για αυτό και υπάρχουν πολλά ρυθμιστικά σημεία ελέγχου.



Εικόνα 5. Τυπική αλληλουχία γεγονότων κυτταρικού κύκλου.

Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης το κύτταρο μεγαλώνει σε μέγεθος και διπλασιάζει το DNA του. Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στα διάφορα στάδια της μεσόφασης αναλύονται παρακάτω:

- **Φάση G1:** Τα κύτταρα αποφασίζουν ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχονται αν θα βγουν από τον κυτταρικό κύκλο προς τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα ή εάν θα συνεχίσουν να διαιρούνται. Τα τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα θεωρούνται ότι βρίσκονται στη φάση G0. Στη G1 φάση τα κύτταρα συνθέτουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για τη δημιουργία των θυγατρικών κυττάρων, για αυτό αυξάνεται το μέγεθος του κυττάρου.
- **Φάση S:** Είναι η φάση στην οποία πραγματοποιείται ο διπλασιασμός του DNA, η σύνθεση των ιστονών και η συγκρότηση των νουκλεοσωμάτων και της νέας χρωματίνης.
- **Φάση G2:** Κατά τη διάρκεια της τα κύτταρα ελέγχουν και επιδιορθώνουν τη δομή του DNA και επιτελούν τις απαραίτητες προετοιμασίες για τη μίτωση (Μαρμαράς Β. & Λαμπροπούλου Μαρμαρά Μ., 2005).

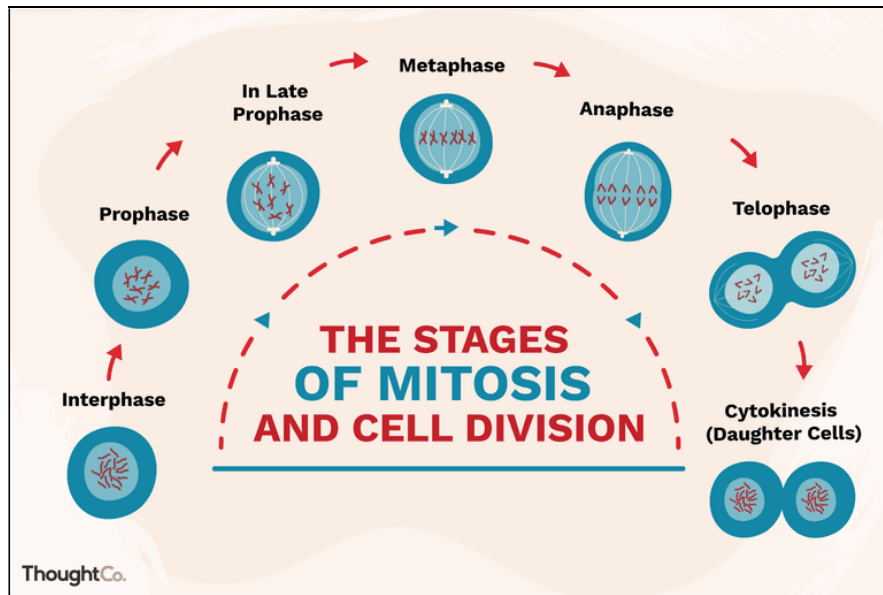
Μόλις ολοκληρωθεί ο έλεγχος στη φάση G2 το κύτταρο εισέρχεται στη φάση της Μίτωσης, η οποία ακολουθείται από την φάση της κυτταροκίνησης. Στη διάρκεια αυτών των φάσεων τα χρωμοσώματα και το κυτταρόπλασμα κατανέμονται σε δύο θυγατρικά κύτταρα. Η μίτωση διακρίνεται συνήθως σε τέσσερις φάσεις, τις πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση. Τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση M μπορούν να διακριθούν με παρατήρηση σε φωτονικό μικροσκόπιο (Μαρμαράς Β. & Λαμπροπούλου Μαρμαρά Μ., 2005). Τα βασικά χαρακτηριστικά κάθε φάσης της μίτωσης αναλύονται παρακάτω:

- **Πρόφαση:** Χαρακτηρίζεται από τη συμπύκνωση των διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων σε σχηματισμούς ορατούς στο φωτονικό μικροσκόπιο, την προετοιμασία για τον αποχωρισμό τους και τη συγκρότηση της μιτωτικής ατράκτου. Κατά τη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου οι μικροσωληνίσκοι

διατάσσονται παράλληλα μεταξύ τους κατά μήκος του κυττάρου και δημιουργούνται οι δύο πόλοι του κυττάρου.

- **Μετάφαση:** Η μιτωτική άτρακτος μετακινείται στην περιοχή που υπήρχε ο πυρήνας. Τα χρωμοσώματα δεσμεύονται στα ινίδια της ατράκτου, ευθυγραμμίζονται στον ισημερινό του κυττάρου και περιμένουν σήμα για την έναρξη της κίνησης τους προς τους πόλους.
- **Ανάφαση:** Διαρκεί μόνο λίγα λεπτά. Χαρακτηριστικό της είναι η κίνηση των αδελφών χρωματίδων προς τους αντίθετους πόλους του κυττάρου. Ο διαχωρισμός των χρωματίδων δε σχετίζεται με τη μιτωτική άτρακτο. Ταυτόχρονα με το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων οι πόλοι της ατράκτου απομακρύνονται ο ένας από τον άλλο.
- **Τελόφαση:** Αρχίζει όταν τα χρωμοσώματα φτάνουν στους πόλους του κυττάρου, οπότε αποσυσπειρώνονται και αποκτούν τη μορφολογία που έχουν κατά τη μεσόφαση. Ταυτόχρονα, δημιουργείται η πυρηνική μεμβράνη από κυστίδια που αρχικά δεσμεύονται στα χρωμοσώματα και μετά συντήκονται σε ενιαίο σχηματισμό και εξαφανίζεται το μεγαλύτερο τμήμα της ατράκτου.

Το τελευταίο στάδιο της μίτωσης αποτελεί η κυτταροπλασματική διαίρεση ή κυτταροκίνηση. Ουσιαστικά πρόκειται για μια διαδικασία που αρχίζει ήδη από την ανάφαση και ολοκληρώνεται στην τελόφαση. Υπάρχει διαφορά στο μηχανισμό της κυτταροκίνησης στα ζωικά και τα φυτικά κύτταρα, λόγω της ύπαρξης στα δεύτερα κυτταρικού τοιχώματος. Στα ζωικά κύτταρα η διαδικασία ονομάζεται περίσφιγξη. Στα φυτικά κύτταρα η διαίρεση του κυτταροπλάσματος γίνεται με συγκρότηση νέου κυτταρικού τοιχώματος στον ισημερινό της ατράκτου με το σύστημα φραγμοπλάστη – κυτταρικής πλάκας (Μαρμαράς Β. & Λαμπροπούλου Μαρμαρά Μ., 2005).



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση των φάσεων της μιτωτικής διαίρεσης.

Το γεγονός ότι τα χρωμοσώματα είναι ορατά στο μικροσκόπιο κατά τη φάση της μίτωσης σε συνδυασμό με το μεγάλο μέγεθος των χρωμοσωμάτων του *Allium cepa*, αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την επιτυχία της δοκιμασίας. Κατά την πρόφαση τα χρωμοσώματα είναι ορατά και μπερδεμένα. Κατά τη μετάφαση τα χρωμοσώματα είναι διατεταγμένα στην ισημερινή πλάκα του κυττάρου. Στην ανάφαση φαίνεται η μετακίνηση των αδερφών χρωματίδων προς τους πόλους των κυττάρων, ενώ στην τελόφαση τα χρωμοσώματα οργανώνονται στους πόλους περιμένοντας την κυτταροκίνηση (Mangalampalli B. et al., 2018).

1.9. TOXKITS

Ένας άλλος τρόπος για τη μελέτη οξείας τοξικότητας των περιβαλλοντικών ρύπων είναι οι δοκιμές με Toxkits. Αυτές οι δοκιμές αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του '90 με σκοπό να παρέχουν όλα τα απαραίτητα υλικά για την πραγματοποίηση οικοτοξικολογικών αναλύσεων, οι οποίες γίνονται εύκολα, ταχεία, με ελάχιστο

κόστος και υψηλή επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιούν ακινητοποιημένα ή αδρανή στελέχη διάφορων φυλογενετικών ομάδων, όπως μικροφύκη, πρωτόζωα, τροχόζωα και καρκινοειδή, τα οποία είτε αφήνονται ελεύθερα ή εκκολάπτονται κατά την απαίτηση του ερευνητή παρέχοντας το ζωντανό βιολογικό υλικό που απαιτείται για την πραγματοποίηση της μεθόδου, εξαλείφοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάγκη για συνεχή διατήρηση ζωντανής καλλιέργειας πρότυπων μικροοργανισμών (Andrea T., 2004). Μερικά από τα πλεονεκτήματα των Toxkits είναι:

- Είναι εύχρηστα και δεν απαιτούν εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό.
- Έχουν σχετικά μικρό κόστος.
- Ακολουθούν οδηγίες διεθνών οργανισμών, όπως ο ISO.
- Έχουν υψηλή ευαισθησία.

Τα μειονεκτήματα τους είναι ότι τα περισσότερα δεδομένα της βιβλιογραφίας δεν αναφέρονται σε αυτά, αλλά σε κλασικές δοκιμές και σε κάποιες περιπτώσεις οι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται δεν προέρχονται από το φυσικό περιβάλλον. Επίσης, σε ορισμένες χώρες τα αποτελέσματα από τέτοιου είδους δοκιμές δε θεωρούνται αξιόπιστα (Κούγκολος ΓΑ., 2007). Υπάρχουν διάφοροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται σε διάφορα toxkits, όπως το καρκινοειδές *Daphnia magna* (Daphtoxkit F), το τροχόζωο *Brachionus calyciflorus* (Rottoxkit F) ή το μικροφύκος *Pseudokirchneriella subcapitata* (Algaltoxkit F).

1.9.1. Thamnotoxkit F

Η συγκεκριμένη δοκιμασία πρόκειται για μια μικρής κλίμακας δοκιμή οξείας τοξικότητας που αναπτύχθηκε από το Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution του Πανεπιστημίου της Γάνδης για την εκτίμηση της επικινδυνότητας των περιβαλλοντικών χημικών.

Το Thamnotoxkit F περιέχει όλα τα υλικά για τη διεξαγωγή πλήρων δοκιμών οξείας τοξικότητας με κριτήριο τη θνησιμότητα του καρκινοειδούς *Thamnocephalus platyurus* (fairy shrimp). Αν και αυτό το είδος απαντάται σπάνια σε μόνιμα υδάτινα σώματα, θα μπορούσε να ευδοκιμήσει σε ένα μεγάλο εύρος ενδιαιτημάτων, από αρκτικό μέχρι υποτροπικό κλίμα. Στο toxkit παρέχεται με τη μορφή κυστών που εκκολάπτονται και το αποτέλεσμα προκύπτει υπολογίζοντας την LC_{50} . Το test έχει πιστοποιηθεί για τη μεγάλη του ακρίβεια. Η δοκιμή έχει εγκριθεί από το Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης ως ISO/14380 (Thamnotoxkit F, Standard Operational Procedure).



Εικόνα 7. Απεικονίσεις του *Thamnocephalus platyurus*.

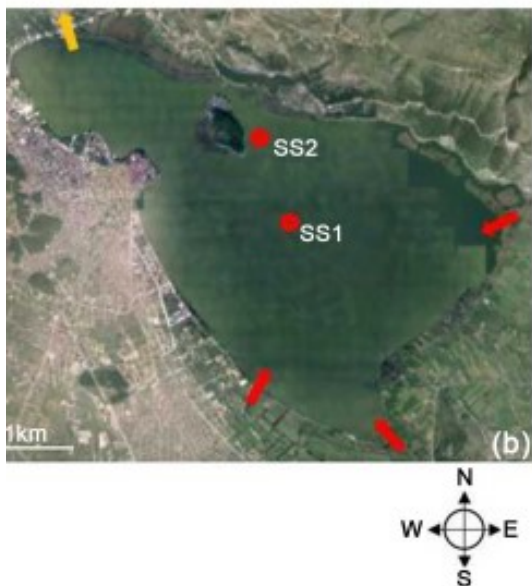
2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση της πιθανής τοξικότητας της ιλύος των ιζημάτων της λίμνης Παμβώτιδας. Οι μέθοδοι που ακολουθήσαμε αφορούσαν στη διερεύνηση τόσο της πιθανότητας οξείας τοξικότητας, όσο και στην πιθανότητα χρόνιας τοξικότητας. Η πιθανότητα οξείας τοξικότητας διερευνήθηκε με το *Thamnotoxkit*, που στηρίζεται στην επιβίωση οργανισμών δεικτών, ενώ η πιθανότητα χρόνιας τοξικότητας μελετήθηκε με το *Allium cepa* Test, με το οποίο ελέγχεται το πρότυπο ανάπτυξης του πολυκύτταρου φυτικού οργανισμού *Allium cepa*.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Δειγματοληψία

Για τη λήψη δειγμάτων υλός επιλέχθηκαν δύο σταθμοί από τη λίμνη Παμβώτιδα, οι οποίοι φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (Touka A. et al., 2018).



Ο πρώτος σταθμός (Sample Station 1 – SS1) βρίσκεται στο κέντρο της λίμνης, οι συντεταγμένες του είναι $39^{\circ}39'39.4''\text{N}$ $20^{\circ}53'03.5''\text{E}$ και το βάθος του περίπου 7,5 μέτρα, το οποίο μεταβάλλεται ανάλογα με την εποχή. Ο σταθμός 2 (Sample Station 2 – SS2) βρίσκεται στο βαθύτερο σημείο της λίμνης, οι συντεταγμένες του είναι $39^{\circ}40'41.5''\text{N}$ $20^{\circ}52'50.1''\text{E}$ και το βάθος του είναι περίπου 9,5 μέτρα και μεταβάλλεται επίσης ανάλογα με την εποχή. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε το καλοκαίρι του 2017.

Επιφανειακή υλός (5 – 10 εκ.) συλλέχθηκε από τον πυθμένα των δύο σταθμών με συσκευή τύπου grabber. Τα δείγματα υλός τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκάλια, μοιράστηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια και διατηρήθηκαν σε φορητό

ψυγείο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο, για χρονικό διάστημα μικρότερο της μίας ώρας.

3.2 Εκτίμηση Τοξικότητας Ιζημάτων με το In Vivo Test Thamnotoxkit F™

Για την εκτίμηση της τοξικότητας με το Thamnotoxkit F χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενο νερό (pore water) από 25ml από τα δείγματα της ύλης που συλλέχθηκαν. Το πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το Standard Operational Procedure (MicroBio Tests Inc., Belgium). Τα στάδια του πειράματος είναι τα ακόλουθα:

1. Προετοιμασία του Standard Freshwater

Σε μια ογκομετρική φιάλη προστέθηκαν 800ml απεσταγμένο νερό. Σε αυτό προστέθηκαν διαλύματα αλάτων που παρέχονται με την ακόλουθη σειρά: NaHCO₃, CaSO₄, MgSO₄, KCl. Συμπληρώθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1L. Το διάλυμα ομογενοποιήθηκε και αποθηκεύτηκε στους 4°C/σκοτάδι.

2. Εκκόλαψη κύστεων

Η εκκόλαψη των κύστεων πραγματοποιήθηκε 24h πριν από τη διεξαγωγή του πειράματος. Αρχικά αραιώνεται το Standard Freshwater με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:8, με τελικό όγκο τα 20ml και πραγματοποιείται οξυγόνωση του αραιωμένου διαλύματος (diluted Standard Freshwater). Ακολουθεί ενυδάτωση των κύστεων με προσθήκη 1ml διαλύματος εκκόλαψης στο σωληνάριο με τις κύστες και ήπια ανάδευση για 30 min. Στο τρυβλίο εκκόλαψης προστίθενται 10ml diluted Standard Freshwater, όπου μεταφέρονται οι ενυδατωμένες κύστες. Το τρυβλίο ανακινήθηκε ήπια και

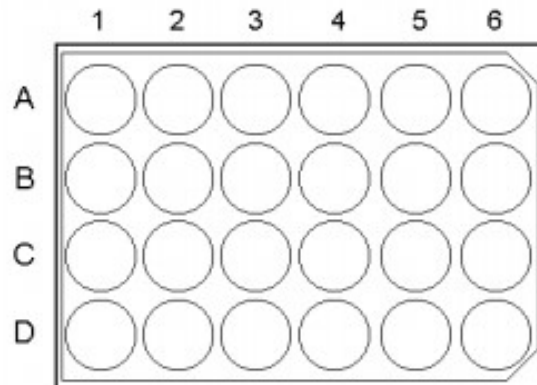
τοποθετήθηκε για επώαση στους 25° C υπό συνεχή φωτισμό 3000 – 4000 lux για 20 ώρες.

3. Προετοιμασία του δείγματος

Ιλύς από τους σταθμούς Σ1Κ και Σ2Κ φυγοκεντρήθηκε και για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο νερό (pore water). Παρασκευάστηκαν πέντε συγκεντρώσεις των δειγμάτων Σ1Κ και Σ2Κ (C1, C2, C3, C4, C5), με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Η αραιώση C1 αντιστοιχεί σε 100% effluent sample, η C2 σε 50% effluent sample, η C3 σε 25% effluent sample, η C4 σε 12,5% effluent sample και η C5 σε 6,25% effluent sample.

6. Συμπλήρωση του test plate

Το test plate αποτελείται από 24 wells (6 στήλες και 4 σειρές).



Στα wells της 1^{ης} στήλης προστέθηκε 1ml Standard Freshwater, το οποίο χρησιμοποιείται σαν control. Στα wells της 2^{ης} στήλης μεταφέρθηκε 1 ml της αραιώσης C5 και σε κάθε μία από τις επόμενες στήλες μεταφέρθηκε από 1ml των επόμενων αραιώσεων, ώστε η συγκέντρωση των διαλυμάτων να αυξάνεται προς τη στήλη 6.

5. Μεταφορά λαρβών στο test plate

Με τη χρήση μικροπιπέττας μεταφέρθηκαν 50 λάρβες από το τρυβλίο εκκόλαψης στο κελί D1 υπό το στερεοσκόπιο. Από αυτές 10 λάρβες μεταφέρθηκαν στο κελί A1, 10 στο B1 και 10 στο C1. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλα τα κελιά μέχρι να συμπληρωθεί το test plate με 10 λάρβες/well. Το test plate καλύφθηκε με parafilm και με καπάκι και επώαστηκε στους 25° C, στο σκοτάδι για 24 h.

6. Αξιολόγηση

Στο στερεοσκόπιο μετρήθηκαν και καταγράφηκαν τα νεκρά ή ζωντανά άτομα σε κάθε well. Νεκρά θεωρήθηκαν τα άτομα στα οποία δεν παρατηρήθηκε καμία κίνηση για 10 sec. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η % θνησιμότητα (M) και το LC₅₀, το οποίο αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που είναι ικανή να θανατώσει το 50% του πληθυσμού των ατόμων. Εάν η θνησιμότητα στα controls υπερβαίνει το 10% το test δε θεωρείται έγκυρο.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για το Σ2Κ, μετά από αερισμό του pore water ώστε να διαπιστωθεί η φύση των ουσιών που προκαλούν τις τοξικές επιδράσεις στα άτομα του *T. platyurus*.

3.3. Εκτίμηση Τοξικότητας Ιζημάτων με το In Vivo *Allium cepa* Test

Το πρωτόκολλο *Allium cepa* πραγματοποιήθηκε για την εκτίμηση της γενOTOξικότητας της ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας (Bandi CN. & Hadjikakou SK., 2019). Το πρωτόκολλο *Allium cepa* Test πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Urgut OS. et al. (2016). Για την πραγματοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν υγιείς

βολβοί του κοινού είδους κρεμμυδιού *Allium cepa* ($2n = 16$), ίδιου μεγέθους για κάθε δείγμα. Η προετοιμασία για τη διεξαγωγή του πειράματος είναι εξής:

- Σε όλους τους βολβούς αφαιρέθηκαν οι ξερές στρώσεις γύρω από το βολβό.
- Οι βολβοί τοποθετήθηκαν σε υπερχειλισμένους με δις απεσταγμένο νερό δοκιμαστικούς σωλήνες και επώαστηκαν για 24h σε θερμοκρασία 4° C στο σκοτάδι ώστε να συγχρονιστούν οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου και να αποφευχθεί το πρήξιμο των κυττάρων της μεριστωματικής άκρης.
- Οι βολβοί μεταφέρθηκαν σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες υπερχειλισμένους με δις απεσταγμένο νερό και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 25° C για 6h, ώστε να ξεκινήσει η ανάπτυξη των ριζών και να φτάσουν σε μήκος περίπου τα 2mm.
- Η μεταφορά των βολβών σε δείγματα έγινε ως εξής:
 - 4 βολβοί μεταφέρθηκαν σε περίπου 35gr ενυδατωμένης ιλύος από τους δύο σταθμούς δειγματοληψίας. Η ιλύς ήταν τοποθετημένη σε πλαστικά δοχεία χωρητικότητας 60ml.
 - 4 βολβοί μεταφέρθηκαν στο αργιλώδες ορυκτό βερμικουλίτης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν control καθώς βρίσκεται ευρεία εφαρμογή στη βιολογική γεωργία. Ο βερμικουλίτης ήταν επίσης τοποθετημένος σε πλαστικά δοχεία χωρητικότητας 60ml.
 - 4 βολβοί για καθένα από τα δύο δείγματα μεταφέρθηκαν σε πλαστικά δοχεία με βερμικουλίτη και μετά από 24h μεταφέρθηκαν σε πλαστικά δοχεία με περίπου 35gr δείγματος ιλύος.
 - 4 βολβοί μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες υπερχειλισμένους με δις απεσταγμένο νερό και χρησιμοποιήθηκαν σαν control.

- Όλα τα παραπάνω δείγματα επώαστηκαν στους 25° C σε θάλαμο που προσομοιάζει τις συνθήκες φωτός ημέρας και νύχτας. Ο χρόνος επώασης διέφερε για κάθε δείγμα καθώς αξιολογήθηκε σαν πρώτος παράγοντας το μήκος της ρίζας το οποίο έπρεπε να είναι περίπου 1 – 1,5 cm.
- Μόλις οι ρίζες των βολβών έφτασαν στο επιθυμητό μήκος, οι βολβοί αφαιρέθηκαν από τα δείγματα και οι ρίζες μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα μεθανόλης/οξικού οξέος σε αναλογία 3:1. Οι βολβοί επώαστηκαν στους 4° C για 24h.
- Η τελική αποθήκευση των δειγμάτων έγινε σε 70% αιθανόλη.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των ριζών για μικροσκοπική παρατήρηση. Έγινε υδρόλυση των ριζών με 6N HCl στους 37° C για 5min στις ρίζες των control και για 20min, μετά από μία πλύση με HCl, για τις ρίζες των δειγμάτων ιλύος. Ακολούθησε χρώση των ριζών με Schiff's reagent για 40min στους 37° C. Έπειτα, 1mm από τη μεριστωματική άκρη αποκόπτονταν από την υπόλοιπη ρίζα σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα, καλυπτόταν με μία σταγόνα 45% οξικού οξέος και ασκήθηκε πίεση με τη γόμα ενός μολυβιού.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Εκτίμηση Τοξικότητας με το Thamnotoxkit FTM

Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των νεκρών ατόμων *T. platyurus* στο pore water από το σταθμό 1 φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4. Προσδιορισμός νεκρών ατόμων *T. platyurus* του Σ1Κ (M: θνησιμότητα, το C5 είναι το πιο αραιό διάλυμα και το C1 είναι 100% pore water).

	Control	C5	C4	C3	C2	C1
A	0	0	1	0	1	1
B	1	0	0	2	1	4
C	1	2	1	1	2	1
Total	2/30	2/30	2/30	3/30	4/30	6/30
M	6,6%	6,6%	6,6%	10%	13,3%	20%

Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα για το σταθμό 2 είναι:

Πίνακας 5. Προσδιορισμός νεκρών ατόμων *T. platyurus* του Σ2Κ (M: θνησιμότητα, το C5 είναι το πιο αραιό διάλυμα και το C1 είναι 100% pore water).

	Control	C5	C4	C3	C2	C1
A	0	0	0	0	1	5
B	0	0	0	1	1	7
C	0	0	0	0	3	6
Total	0/30	0/30	0/30	1/30	5/30	18/30
M	0%	0%	0%	3,3%	15%	60%

Επιπλέον, για να διαπιστωθεί η φύση του μορίου που προκαλεί τη θνησιμότητα, η διαδικασία επαναλήφθηκε σε δείγμα pore water στο οποίο προηγήθηκε αερισμός πριν από τη διενέργεια του πειράματος και τα αποτελέσματα είναι:

Πίνακας 6. Προσδιορισμός νεκρών ατόμων *T. platyurus* του Σ2Κ μετά από αερισμό του pore water (M: θνησιμότητα, το C5 είναι το πιο αραιό διάλυμα και το C1 είναι 100% pore water).

	Control	C5	C4	C3	C2	C1
A	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
Total	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
M	0%	0%	0%	0%	0%	0%

4.2. Εκτίμηση Τοξικότητας με το *Allium cepa* Toxicity Test

Οι βολβοί αφέθηκαν να αναπτυχθούν μέχρι το μήκος των ριζών να φτάσει περίπου το 1 – 1,5cm. Οι χρόνοι ανάπτυξης των ριζών ήταν διαφορετικοί για κάθε δείγμα, αλλά και ο αριθμός των ριζών που αναπτύχθηκαν δεν ήταν ίδιος για τα controls και τα δείγματα. Τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των βολβών συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά ανάπτυξης των ριζών των βολβών για τα controls και τα δείγματα υλός των σταθμών δειγματοληψίας.

Δείγμα	Χρόνος Ανάπτυξης Ριζών	Μέσος Αριθμός Ριζών	Μέσο μήκος ριζών
H ₂ O	24h	39	1,9cm
Vermiculite	48h	43	1,7 cm
Σ1Κ	10 days	7,75	0,8 cm
Σ2Κ	10 days	6,5	0,6 cm
Ver – Σ1Κ	5 days	11,5	0,9 cm
Ver – Σ2Κ	5days	5,75	2,1 cm

Εκτός του χρόνου ανάπτυξης αρκετές ήταν οι μακροσκοπικές διαφορές των ριζών στα controls και τα δείγματα. Ανατομικά χαρακτηριστικά και διάφορες

παραμορφώσεις των ριζών κατά την ανάπτυξη αξιολογούνται συνδυαστικά με μικροσκοπικές παραμέτρους. Πιο συγκεκριμένα, οι ρίζες των βολβών που αναπτύχθηκαν στα δείγματα ιλύος, είτε άμεσα είτε μετά από μεταφορά τους από το βερμικουλίτη, ήταν παχύτερες, τραχύτερες και με ελαφρώς κίτρινο ή καφέ χρώμα.



Εικόνα 8. Ρίζες βολβών που αναπτύχθηκαν στο βερμικουλίτη.



Εικόνα 9. Ρίζες βολβών που αναπτύχθηκαν στην ιλύ του Σ1Κ (αριστερά) και στην ιλύ του Σ2Κ (δεξιά).



Εικόνα 10. Ρίζες βολβών που αναπτύχθηκαν αρχικά σε βερμικουλίτη και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ιλύ του Σ1Κ (αριστερά) και σε ιλύ του Σ2Κ (δεξιά)

Η ικανότητα των κυττάρων για διαίρεση (Mitotic Index – MI) ήταν η πρώτη παράμετρος που αξιολογήθηκε για την κυτταροτοξικότητα των ιζημάτων της Λίμνης Παμβώτιδας. Τα επίπεδα της τοξικότητας μπορούν να καθοριστούν από τη μείωση του Mitotic Index. Στον Πίνακα 8 φαίνονται οι τιμές για το MI των control και των δειγμάτων από τα ιζήματα της Παμβώτιδας. Είναι εμφανές ότι το MI μειώθηκε ραγδαία στα δείγματα συγκριτικά με τα control. Το MI φαίνεται ότι σχετίζεται και με τις μακροσκοπικές αλλαγές των ριζών στα δείγματα σε σχέση με τα control. Η σημαντική μείωση του ρυθμού διαίρεσης των κυττάρων υποδεικνύει τις κυτταροτοξικές επιδράσεις των βαρέων μετάλλων που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα ιλύος της Λίμνης Παμβώτιδας.

Πίνακας 8. Επίδραση των συστατικών των ιζημάτων της Λίμνης Παμβώτιδας στον αριθμό των συνολικών και διαιρούμενων κυττάρων και στο ποσοστό του Mitotic Index των ριζών του *Allium cepa*.

Δείγμα	Συνολικός Αριθμός Κυττάρων	Κύτταρα στη Μίτωση	Mitotic Index (%)
H ₂ O	1181	200	16,864 ± 2,123
Vermiculite	1187	197	16,785 ± 1,274
Σ1Κ	791	23	2,203 ± 2,813
Σ2Κ	770	33	4,511 ± 3,086
Ver– Σ1Κ	750	29	5,042 ± 4,557
Ver – Σ2Κ	874	26	2,964 ± 2,658

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζεται το ποσοστό των κυττάρων που εμφανίζουν ανωμαλίες κατά την κυτταρική διαίρεση. Στα μεριστωματικά κύτταρα του *Allium cepa* δε φαίνεται εμφανής διαφορά στα ποσοστά των χρωμοσωμικών ανωμαλιών ανάμεσα στα δείγματα και τα controls. Ωστόσο, σημαντική είναι η διαφορά που παρατηρείται στις πυρηνικές ανωμαλίες, καθώς η συχνότητα εμφάνισης τους είναι πολύ μεγαλύτερη στα δείγματα της Παμβώτιδας συγκριτικά με τα controls. Η απουσία

χρωμοσωμικών μεταλλαγών στα δείγματα συσχετίζεται με τη μεγάλη μείωση του ΜΙ, καθώς ο πολύ μικρός αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων δεν επιτρέπει την ανίχνευση τους κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση. Επιπλέον, σε κάποια από τα δείγματα παρατηρήθηκε αύξηση στη συχνότητα σχηματισμού μικροπυρήνων, σε σχέση με τα ποσοστά που ανιχνεύονται στα controls.

Επίσης, ανιχνεύτηκαν και κάποια νεκρωτικά ή αποπτωτικά κύτταρα στα δείγματα της Παμβώτιδας σε σχέση με την ύπαρξη τους στα controls.

Πίνακας 9. Συχνότητα εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών, πυρηνικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων στα μεριστωματικά κύτταρα των ριζών των *Allium cepa* που αναπτύχθηκαν στα controls και τα δείγματα υλός.

	Chromosomal Abberations (%)	Nuclear Abnormalities (%)	Micronucleus (%)
H ₂ O	1,324 ± 0,421	0,178 ± 0,172	0,024± 0,047
Vermiculite	0,587± 0,209	0,159± 0,245	0,013± 0,039
Σ1K	0,115± 0,256	1,263± 1,790	0,016± 0,038
Σ2K	0,139± 0,272	1,363± 1,333	0,092± 0,098
Ver- Σ1K	0,332 ± 0,603	0,851 ± 0,613	0,071± 0,111
Ver - Σ2K	0,150 ± 0,315	1,018± 0,673	0,080± 0,150

Τα ποσοστά των παραπάνω ανωμαλιών υπολογίστηκαν στη συνέχεια μόνο στον πληθυσμό των κυττάρων που βρίσκονται στη διαδικασία της μίτωσης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 10. Συχνότητα εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα κύτταρα των ριζών που βρίσκονται στη διαδικασία της μιτωτικής διαίρεσης.

	Chromosomal Abberations (%)
H ₂ O	7,5
Vermiculite	3,55
Σ1K	7,23
Σ2K	4,11
Ver- Σ1K	5,84
Ver - Σ2K	6,22

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρατηρούνται σε διάφορα στάδια της μιτωτικής διαίρεσης. Για το λόγο αυτό στον ακόλουθο πίνακα καταγράφηκε ο αριθμός και το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε μία από τις τέσσερις φάσεις της μίτωσης.

Πίνακας 11. Αριθμός κυττάρων που διαιρούνται και αριθμός και ποσοστό κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση της Μιτωτικής διαίρεσης.

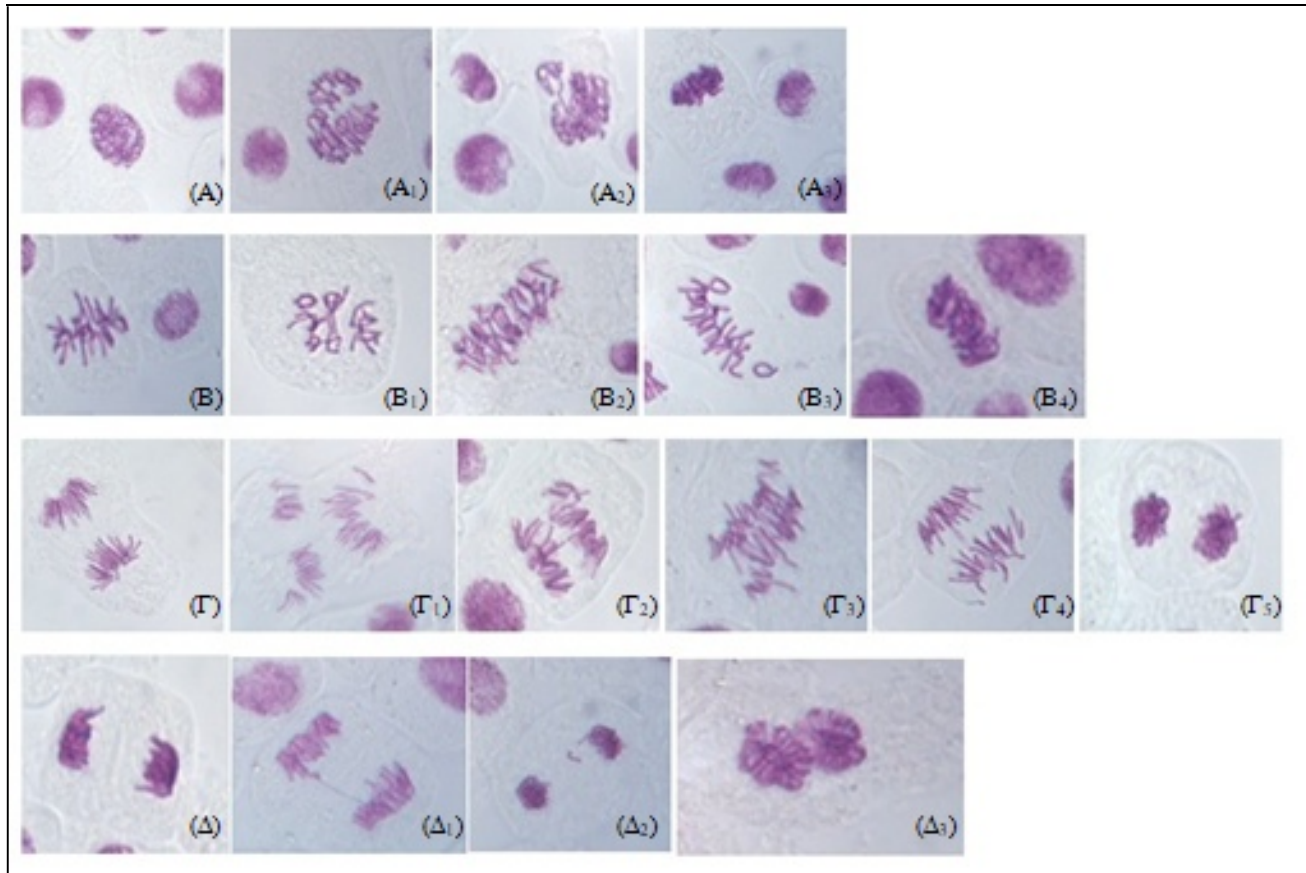
	Κύτταρα που διαιρούνται	Κύτταρα στην Πρόφαση		Κύτταρα στη Μετάφαση		Κύτταρα στην Ανάφαση		Κύτταρα στην Τελόφαση	
		Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό
H ₂ O	2404	1149	47,795%	426	17,720%	197	8,195%	632	26,289%
Vermiculite	1774	897	50,564%	252	14,205%	155	8,737%	470	26,494%
Σ1K	249	186	73,896%	20	8,032%	16	6,426%	27	10,843%
Σ2K	365	274	75,068%	28	7,671%	19	5,205%	44	12,055%
Ver- Σ1K	342	250	73,099%	30	8,772%	19	5,556%	43	12,573%
Ver - Σ2K	434	434	72,811%	57	13,134%	28	6,452%	33	7,604%

Παρά το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των διαιρούμενων κυττάρων προσδιορίστηκε ότι βρίσκονται στην πρόφαση, το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων που παρατηρήθηκαν βρίσκεται στη μετάφαση και την ανάφαση. Στον

παρακάτω πίνακα υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων μεταλλάξεων στις διαφορετικές φάσεις της μιτωτικής διαίρεσης. Στην Εικόνα 11 φαίνονται φυσιολογικά κύτταρα σε όλες τις φάσεις της μίτωσης και οι μεταλλαγές που έχουν παρατηρηθεί σε κάθε μία από τις φάσεις.

Πίνακας 12. Αριθμός και ποσοστό κυττάρων με χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε κάθε φάση της μιτωτικής διαίρεσης στα δείγματα ιλύος της Παμβώτιδας και τις ομάδες ελέγχου.

	ΠΡΟΦΑΣΕΙΣ				ΜΕΤΑΦΑΣΕΙΣ					ΑΝΑΦΑΣΕΙΣ						ΤΕΛΟΦΑΣΕΙΣ			
	Σύνολο	Missegregation	Lobulated	Sticky	Σύνολο	Sticky	C-Metaphase	ExtraChromos.	Breaks	Σύνολο	Multipolar	Bridges	Lagged	Breaks	Star	Σύνολο	Bridges	Breaks	Star
H ₂ O	1149	15 (1,31%)	4 (0,35%)	1 (0,09%)	426	13 (3,05%)	34 (7,98%)	2 (0,47%)	20 (4,70%)	197	9 (4,57%)	35 (17,77%)	37 (18,78%)	-	2 (1,02%)	632	10 (1,58%)	-	-
Ver	897	3 (0,33%)	1 (0,11%)	-	252	5 (1,98%)	10 (3,97%)	1 (0,40%)	-	155	2 (1,29%)	23 (14,39%)	17 (10,97%)	-	-	470	-	1 (0,21%)	-
Σ1Κ	186	2 (1,08%)	-	-	20	3 (15%)	2 (10%)	1 (5%)	1 (5%)	16	5 (31,25%)	-	3 (18,75%)	1 (6,25%)	-	27	-	-	-
Σ2Κ	274	1 (0,37%)	-	-	28	4 (14,29%)	1 (3,57%)	-	2 (7,14%)	19	3 (15,79%)	3 (15,79%)	-	-	1 (5,26%)	44	-	-	-
Ver – Σ1Κ	250	5 (2%)	-	-	30	1 (3,33%)	4 (13,33%)	-	-	19	4 (21,05%)	5 (26,32%)	1 (5,26%)	-	-	43	-	-	-
Ver – Σ2Κ	316	1 (0,32%)	-	-	57	2 (3,51%)	10 (17,54%)	-	2 (3,51%)	28	8 (28,57%)	2 (7,14%)	1 (3,57%)	-	-	33	-	-	1 (3,03%)

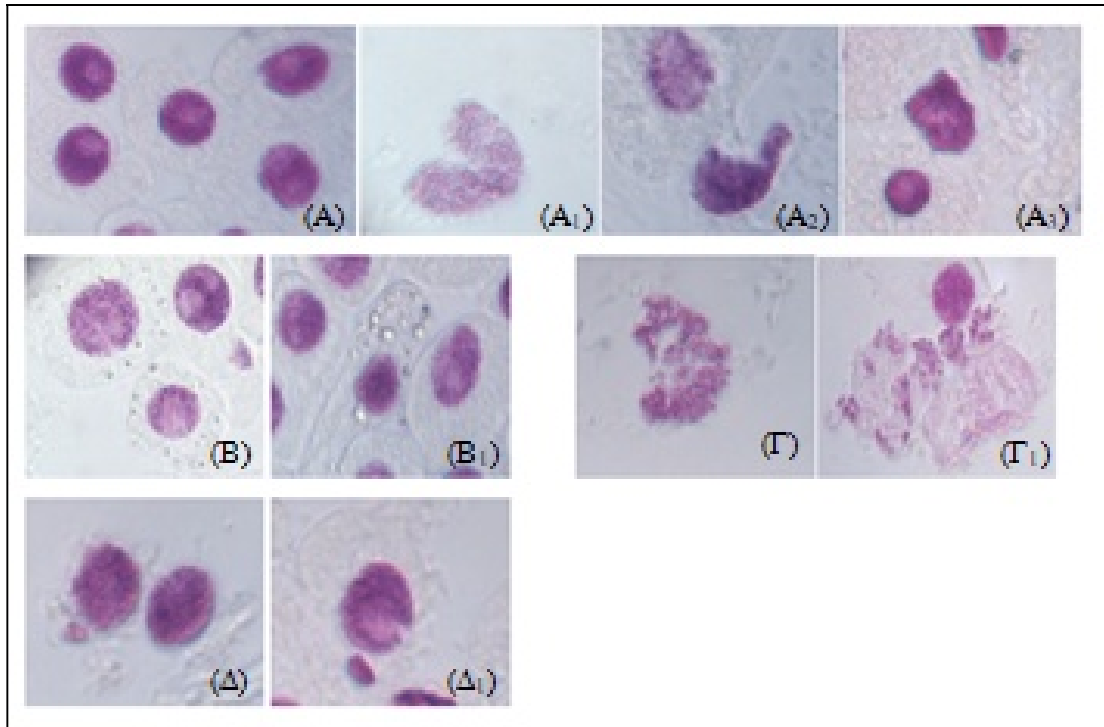


Εικόνα 11. Κοινές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν. (Α) Φυσιολογική πρόφαση, (Α₁) Πρόφαση με κενά, (Α₂) Πρόφαση με λοβό, (Α₃) Προσκολλημένη πρόφαση. (Β) Φυσιολογική μετάφαση, (Β₁) C-Μετάφαση, (Β₂) Μετάφαση με επιπλέον χρωμοσώματα, (Β₃) Μετάφαση με θραύση, (Β₄) Προσκολλημένη Μετάφαση. (Γ) Φυσιολογική ανάφαση, (Γ₁) Πολυπολική ανάφαση, (Γ₂) Ανάφαση με χρωμοσωμικές γέφυρες, (Γ₃) Ανάφαση με καθυστερημένα χρωμοσώματα, (Γ₄) Ανάφαση με θραύση, (Γ₅) Star ανάφαση. (Δ) Φυσιολογική τελόφαση, (Δ₁) Τελοφαση με χρωμοσωμική γέφυρα, (Δ₂) Τελοφαση με θραύση, (Δ₃) Star Τελοφαση.

Αντίστοιχα, υπολογίστηκε και η συχνότητα διαφορετικών πυρηνικών ανωμαλιών στα κύτταρα που βρίσκονται στη μεσόφαση για κάθε δείγμα ύλος που χρησιμοποιήθηκε και για τις ομάδες ελέγχου. Παράλληλα, μετρήθηκε και υπολογίστηκε ο αριθμός των μικροπυρήνων (MN) που υπήρχαν στα δείγματα και τα controls. Τέλος, υπολογίστηκε το ποσοστό εμφάνισης αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων σε κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις.

Πίνακας 13. Αριθμός και συχνότητα εμφάνισης πυρηνικών ανωμαλιών, μικροπυρήνων (MN), απόπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων στα δείγματα ύλος της Παμβώτιδας και τις ομάδες ελέγχου.

		ΠΥΡΗΝΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ			MN	ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ CELLS	NECROTIC CELLS
	Κύτταρα στη Μεσόφαση	Lobulated	Bud	Notched			
H ₂ O	11767	12 (0,102%)	6 (0,051%)	6 (0,051%)	4 (0,034%)	-	90 (0,765%)
Ver	8911	8 (0,090%)	1 (0,011%)	4 (0,045%)	1 (0,011%)	1 (0,011%)	-
Σ1K	8457	41 (0,485%)	8 (0,095%)	2 (0,024%)	2 (0,024%)	40 (0,473%)	-
Σ2K	8105	67 (0,827%)	10 (0,123%)	2 (0,025%)	8 (0,099%)	49 (0,605%)	7 (0,086%)
Ver – Σ1K	8653	81 (0,936%)	6 (0,069%)	11 (0,127%)	6 (0,069%)	83 (0,960%)	-
Ver – Σ2K	14424	104 (0,721%)	9 (0,062%)	11 (0,076%)	15 (0,104%)	58 (0,402%)	-



Εικόνα 12. (Α) Φυσιολογικοί πυρήνες μεριστωματικών κυττάρων, (Α₁) Πυρήνας με λοβούς, (Α₂) Πυρήνας με εκβλάστημα, (Α₃) Πυρήνας με ασυνέχειες στην πυρηνική μεμβράνη. (Β-Β₁) Κύτταρα σε Νέκρωση. (Γ-Γ₁) Κύτταρα σε Απόπτωση. (Δ-Δ₁) Κύτταρα με μικροπυρήνες (MN).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Λίμνη Παμβώτιδα είναι ένα οικοσύστημα άμεσα επηρεαζόμενο από το αστικό περιβάλλον, δίπλα στο οποίο βρίσκεται. Η αστική, η γεωργική και η βιομηχανική ανάπτυξη της πόλης των Ιωαννίνων αποτελούν εστίες ρύπανσης και μόλυνσης της λίμνης. Μεταξύ των ρυπογόνων παραγόντων σημαντική θέση καταλαμβάνουν τα βαρέα μέταλλα. Τα ιζήματα της λίμνης χαρακτηρίζονται ως μετρίως ή/και σοβαρά ρυπασμένα με βαρέα μέταλλα. Σημαντικότερες πηγές ρύπανσης είναι μικρής κλίμακας μονάδες που λειτουργούν γύρω από τη λίμνη. Σε αυτές ανήκουν μονάδες αργυροτεχνίας που λειτουργούν έως σήμερα και μονάδες βυρσοδεψίας και καπνοβιομηχανίας, οι οποίες λειτουργούσαν ήδη από το 17^ο αιώνα μέχρι περίπου τα μέσα του 20^{ου} (Ioannides K. et al., 2015).

Σχετικά με τις συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων, το Ni ξεπερνά κατά τη διάρκεια όλου του έτους τη συγκέντρωση PEC και ο Hg μόνο κατά την εαρινή περίοδο, αλλά ξεπερνά και το όριο TEC το φθινόπωρο και τα καλοκαίρι. Άλλα δύο βαρέα μέταλλα, το Cr και ο Cu, ξεπερνούν τη συγκέντρωση TEC κάποιες εποχές του χρόνου (Touka A. et al., 2018). Οι υψηλές συγκεντρώσεις των παραπάνω μετάλλων μπορούν να εξηγηθούν καθώς υπάρχουν αρκετές πιθανές εστίες εμπλουτισμού στην περιοχή γύρω από τη λίμνη. Συγκεκριμένα, τα όμβρια ύδατα είναι εμπλουτισμένα με ποικίλα βαρέα μέταλλα από το λεκανοπέδιο των Ιωαννίνων σε συνδυασμό με το έντονο κυκλοφοριακό της πόλης που επιβαρύνει τα απόβλητα με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των μετάλλων. Επίσης, τα αστικά και τα γεωργικά απόβλητα ήταν ή ακόμα είναι σημαντικές πηγές επιβάρυνσης (Ioannides K. et al., 2015).

Οι υψηλές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στα ιζήματα της λίμνης υποδεικνύουν μια διαδικασία που εξελίσσεται εδώ και πολλά χρόνια, αλλά το γεγονός

ότι βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα πρώτα εκατοστά του ιζήματος δείχνει ότι τα τελευταία χρόνια η ρύπανση της λίμνης με βαρέα μέταλλα έχει ενταθεί. Σε αυτό συμβάλλει η συνεχής ανάπτυξη της πόλης των Ιωαννίνων.

Τα βαρέα μέταλλα είναι κοινός ρύπος για τα υδάτινα οικοσυστήματα και ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στις τοξικές επιδράσεις τους στους ζωντανούς οργανισμούς που διαβιούν σε αυτά. Στα ιζήματα της Παμβώτιδας, τα βαρέα μέταλλα Ni, Hg, Cu και Cr ξεπερνούν τα ασφαλή όρια που έχουν καθιερωθεί από τη διεθνή κοινότητα, γεγονός που προκαλεί ανησυχία για το τι επιπτώσεις μπορούν να έχουν στους οργανισμούς. Για το λόγο αυτό στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να διαπιστωθεί εάν τα μέταλλα αυτά είναι ικανά να προκαλέσουν οξεία ή χρόνια τοξικότητα στους οργανισμούς.

Για την αξιολόγηση της οξείας τοξικότητας χρησιμοποιήθηκε το *Thamnotoxkit*, με το οποίο προσδιορίζεται ο αριθμός των νεκρών ατόμων του οργανισμού *Thamnocephalus platyurus*, τα οποία αναπτύσσονται σε pore water προερχόμενο από τα ιζήματα. Αυτό που παρατηρήσαμε είναι ότι στο δείγμα Σ1Κ δεν ανιχνεύτηκε οξεία τοξικότητα με το ποσοστό θνησιμότητας των ατόμων να φτάνει το 20% μόνο στην πιο υψηλή συγκέντρωση pore water, το οποίο δε διαφέρει σημαντικά από το ποσοστό θνησιμότητας του control που είναι 6,6%. Αντίθετα, στην πιο πυκνή συγκέντρωση του δείγματος Σ2Κ το ποσοστό θνησιμότητας ήταν πολύ υψηλό (60%) και δυσανάλογο σε σχέση με το control και τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις (0 – 15%). Ωστόσο, μετά από τον αερισμό του δείγματος η θνησιμότητα μειώθηκε στα επίπεδα του control. Συνεπώς, η θνησιμότητα των ατόμων πιθανόν να οφείλεται στην έλλειψη οξυγόνου στο δείγμα που λήφθηκε από το Σταθμό 2. Μια άλλη υπόθεση είναι ότι η θνησιμότητα των ατόμων σε μη αερισμένο δείγμα μπορεί να οφείλεται σε προϊόντα

του μεταβολισμού αναερόβιων βακτηρίων που διαβιούν στον πυθμένα, όπως είναι το μεθάνιο ή άλλες πτητικές ενώσεις που απομακρύνθηκαν με τον αερισμό.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού των πιθανών χρόνιων τοξικών επιδράσεων των ιζημάτων της λίμνης με τη χρήση του *Allium cepa* Test αξιολογώντας τόσο μακροσκοπικές όσο και μικροσκοπικές παραμέτρους.

Τα τοξικολογικά αποτελέσματα της εξέτασης ιλύος της Παμβώτιδας αποκάλυψαν αρχικά διαφορές στο πρότυπο ανάπτυξης των ριζών των *Allium cepa* που αναπτύχθηκαν στην ιλύ σε σχέση με τις ρίζες των *Allium cepa* στις ομάδες ελέγχου. Ο αριθμός των ριζών στους βολβούς που αναπτύχθηκαν στα δείγματα ιλύος είναι σαφώς μικρότερος σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου αν και αυτοί οι βολβοί αφέθηκαν παραπάνω χρόνο για ανάπτυξη. Αυτή η αναστολή στην ανάπτυξη των ριζών θεωρείται δείκτης τοξικότητας καθώς με βάση τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης (Çelik TA. & Aslantürk ÖS., 2009).

Επιπλέον, σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στο μήκος των ριζών των βολβών που αναπτύχθηκαν στα δείγματα ιλύος σε σχέση με τα controls. Το μικρό μήκος των ριζών υποδεικνύει ότι οι ουσίες που προκαλούν την τοξική επίδραση στα κύτταρα είναι υδατοδιαλυτής φύσης και απορροφώνται από τις ρίζες των φυτών προκαλώντας αναστολή της ανάπτυξης τους (Siqueira PB.et al., 2018).

Η μεταβολή του Mitotic Index φανερώνει διαφορετική συχνότητα κυτταρικής διαίρεσης και αποτελεί ένδειξη ότι επηρεάζεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Δεδομένου ότι στα δείγματα μας παρατηρείται μείωση του αριθμού των ριζών σε συνδυασμό με πολύ μεγάλη μείωση του MI (περίπου 17% στις ομάδες ελέγχου και 2 – 5% στα δείγματα ιλύος της Παμβώτιδας) γίνεται φανερό ότι οι ουσίες που περιέχονται στην ιλύ της Παμβώτιδας έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη

μιτωτική διαίρεση. Τέτοια επίδραση έχει παρατηρηθεί ότι έχουν διάφορες ουσίες όπως τα βαρέα μέταλλα, οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες, διάφορα φυτικά εκχυλίσματα, βιομηχανικά και οικιακά απόβλητα και φάρμακα (Çelik TA. & Aslantürk ÖS., 2009). Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με την υπόθεση μας ότι τα συσσωρευμένα βαρέα μέταλλα στα ιζήματα της Παμβώτιδας μπορεί να προκαλέσουν τοξικές επιδράσεις σε ζωντανούς οργανισμούς, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τα επιτρεπόμενα όρια.

Ο MI είναι ένας σημαντικός δείκτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αύξηση ή μείωση του μπορεί να υποδείξει το επίπεδο κυτταροτοξικότητας ενός παράγοντα. Η μείωση του MI μπορεί να σχετίζεται με κυτταρικό θάνατο ή διαταραγμένη κινητική στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πιθανοί μηχανισμοί μείωσης του MI είναι η αναστολή της σύνθεσης του DNA στη φάση G1, ο αποκλεισμός ή η διακοπή της εισόδου του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο ή το μπλοκάρισμα της εξόδου του κυττάρου από τη G0 φάση ώστε το κύτταρο να μην επιστρέφει ποτέ στη μιτωτική διαίρεση. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε οποιοδήποτε στάδιο δίνει στα κύτταρα την ευκαιρία να επιδιορθώσουν βλάβες στο γονιδίωμα, βλάβες που έχουν προκληθεί από τοξικούς παράγοντες. Επιπλέον, με αυτόν τον τρόπο μπορούν να ξεφύγουν από την απόπτωση και να εξασφαλίσουν την επιβίωση τους (Machado KC. et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη ο MI στα δείγματα είναι αρκετές φορές μικρότερος σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου, ενώ σε κάποιες ρίζες που προέρχονται από βολβούς που αναπτύχθηκαν σε ιλύ των δύο σταθμών της Παμβώτιδας δεν παρατηρήθηκαν καθόλου διαιρέσεις. Αυτό σημαίνει ότι οι ουσίες που περιέχονται στην ιλύ της Παμβώτιδας έχουν ισχυρή κυτταροτοξικότητα και για το λόγο αυτό τα κύτταρα είτε δεν προωθούνται σε μίτωση είτε παραμένουν ακινητοποιημένα σε πρώιμες φάσεις της Μίτωσης. Από την ανάλυση των ποσοστών των κυττάρων που

βρίσκονται στις διάφορες φάσεις της μίτωσης συμπεραίνουμε ότι ακόμα και τα κύτταρα που εισέρχονται στη μιτωτική διαίρεση, μάλλον σταματούν στη φάση της Πρόφασης, καθώς σε αυτή τη φάση βρίσκουμε κύτταρα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70%, ενώ στα controls το ποσοστό αυτό κυμαίνεται μεταξύ 47 – 50%. Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα η μείωση του MI κάτω από 50% συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου οδηγεί σε sublethal επιδράσεις, ενώ κάτω από 22% μπορεί να προκαλέσει θανατηφόρες επιδράσεις στους οργανισμούς (Mesi A. et al., 2012).

Σύμφωνα με τους Abubacker MN. & Sathya C. (2017), η έκθεση σε βαρέα μέταλλα εμποδίζει την είσοδο των κυττάρων στις φάσεις της κυτταρικής διαίρεσης και οδηγούν σε μείωση του MI με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους. Η κύρια επίδραση των βαρέων μετάλλων είναι στη μιτωτική άτρακτο και οδηγεί σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες που σχετίζονται με το σχηματισμό της. Μειωμένος MI παρουσία βαρέων μετάλλων οφείλεται σε διαταραχές του κυτταρικού κύκλου ή σε δυσλειτουργία της χρωματίνης που επάγεται από τις αλληλεπιδράσεις μετάλλου – DNA (Abubacker MN. & Sathya C., 2017).

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στις χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα δείγματα ιλύος και τις ομάδες ελέγχου, ενώ δεν πρέπει να προκαλεί εντύπωση το γεγονός ότι το ποσοστό είναι υψηλότερο στις ομάδες ελέγχου, ιδίως στην περίπτωση του H₂O, όταν εξετάζουμε τη συχνότητα εμφάνισης τους στο συνολικό πληθυσμό των μεριστωματικών κυττάρων. Αυτό συμβαίνει καθώς στο H₂O και στο Βερμικουλίτη είναι αυξημένος ο MI και σε κάποια από τα διαιρούμενα κύτταρα εμφανίζονται χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Παρόλο που είδαμε ότι τα περισσότερα διαιρούμενα κύτταρα βρίσκονται στην πρόφαση, μεγαλύτερα ποσοστά

χρωμοσωμικών ανωμαλιών υπολογίστηκαν στα κύτταρα που καταφέρνουν να συνεχίσουν τη διαίρεση τους και συγκεκριμένα στη μετάφαση και την ανάφαση.

Οι πιο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (CA) που συναντήσαμε στην παρούσα μελέτη είναι:

1. Προφάσεις με λοβούς, με κατακερματισμένα ή προσκολλημένα μεταξύ τους χρωμοσώματα, με τα ποσοστά τους να μη διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των δειγμάτων ύλους.
2. Μεταφάσεις με προσκολλημένα χρωμοσώματα, C-μεταφάσεις, μεταφάσεις με θραύσεις και μεταφάσεις με επιπλέον χρωμοσώματα. Πολύ υψηλά ποσοστά προσκολλημένων μεταφάσεων παρατηρήθηκαν στα κύτταρα των ριζών που αναπτύχθηκαν στην ύλη της Παμβώτιδας (περίπου 15% του συνόλου των μεταφάσεων των δειγμάτων, ενώ στις ομάδες ελέγχου δεν ξεπερνούν το 3%). Αντίστοιχα, πολύ υψηλά ποσοστά C-μεταφάσεων παρατηρήθηκαν στα κύτταρα των ριζών των βολβών που μεταφυτεύτηκαν από το βερμικουλίτη στα δείγματα ύλους.
3. Αναφάσεις με πολυπολικότητα, με γέφυρες, με καθυστερημένα χρωμοσώματα ή με τα χρωμοσώματα διατεταγμένα σε μορφή αστεριού. Η μετάλλαξη που εμφανίζεται με μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των δειγμάτων και των controls είναι οι πολυπολικές αναφάσεις, το ποσοστό των οποίων κυμαίνεται στα δείγματα από 16% έως 31% περίπου, ενώ στα controls το ποσοστό τους είναι περίπου 4,5% στο νερό και 1,2% στο βερμικουλίτη.
4. Τελοφάσεις με γέφυρες, θραύσεις ή με χρωμοσώματα σε μορφή αστεριού.

Κάθε μία από τις παραπάνω ανωμαλίες είναι αποτέλεσμα διαφορετικής επίδρασης από τις ουσίες που υπάρχουν στο περιβάλλον που αναπτύσσονται οι ρίζες.

Τα προσκολλημένα χρωμοσώματα είναι ένα πολύ κοινό σημάδι άμεσης τοξικής επίδρασης στο γενετικό υλικό και μπορεί να προκαλέσει μη αναστρέψιμες επιδράσεις στο κύτταρο και να το οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (Goujon E., 2015). Συνήθως, προκαλούνται λόγω επαγωγής διασταυρούμενων συνδέσεων (crosslinks) μεταξύ των χρωμοσωμάτων ή DNA – πρωτεϊνών (Çelik TA. & Aslantürk ÖS., 2009). Απόρροια των προσκολλημένων χρωμοσωμάτων είναι οι χρωμοσωμικές γέφυρες στην ανάφαση και την τελόφαση που συχνά οδηγούν σε χρωμοσωμικές θραύσεις. Η C-μετάφαση, δηλαδή ανοργάνωτα χρωμοσώματα χωρίς συγκεκριμένο προσανατολισμό στη μεταφασική πλάκα, αποτελεί ένδειξη ανευγενούς (aneugenic) δράσης των τοξικών παραγόντων καθώς οφείλονται σε πλήρη αδρανοποίηση της μιτωτικής ατράκτου, λόγω διαταραχής στο σχηματισμό και τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων. Η παρουσία αυτού του είδους μετάλλαξης μπορεί συχνά να οδηγήσει σε πολυπύρηννα κύτταρα ή να επάγει τη δημιουργία μικροπυρήνων (MN) (Leme DM. et al., 2008). Συνέπεια της μη σωστής λειτουργίας της μιτωτικής ατράκτου είναι και οι πολυπολικές αναφάσεις, η οποία οδηγεί σε μη ισορροπημένη κατανομή των χρωμοσωμάτων (Leme DM. et al., 2008).

Τα βαρέα μέταλλα που βρίσκονται στο ίζημα της Παμβώτιδας έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν τις παραπάνω χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Σύμφωνα με τους Abubacker MN. & Sathya C. (2017), παρουσία Cr στο περιβάλλον ανάπτυξης του *Allium cepa*, μπορεί να οδηγήσει σε προσκολλημένα χρωμοσώματα, χρωμοσωμικές γέφυρες και θραύσεις και πολυπολικές αναφάσεις. Η μείωση του MI παρουσία Cr μπορεί να εξηγηθεί καθώς το Cr οδηγεί σε κατάρρευση των ιστών με αποτέλεσμα την αδυναμία των ριζών να απορροφήσουν νερό και θρεπτικά συστατικά από το περιβάλλον (Oliveira H., 2012). Παράλληλα, το εξασθενές Cr έχει βρεθεί ότι επηρεάζει αρνητικά την οργάνωση των μικροσωληνίσκων κατά τη διάρκεια της

κυτταρικής διαίρεσης, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει τις CA που παρατηρούμε και σχετίζονται με δυσλειτουργία της μιτωτικής ατράκτου (Eleutheriou PE. et al., 2012). Γενικά, όταν στο περιβάλλον υπάρχουν ιόντα τρισθενούς ή εξασθενούς Cr φαίνεται πως διαταράσσεται η ωσμωτική ισορροπία των μεριστωματικών κυττάρων του *Allium cepa*, με αποτέλεσμα την περιορισμένη μεταφορά ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα γεγονός που τελικά οδηγεί στη μη σωστή λειτουργία ενζύμων υπεύθυνων για την προώθηση του κυττάρου σε μιτωτική διαίρεση (Donghua L. et al., 1992). Παρουσία Cu αναστέλλεται η ανάπτυξη της ρίζας των *Allium cepa*, καθώς φαίνεται πως έχει την τάση να συσσωρεύεται στα μεριστωματικά κύτταρα προκαλώντας σημαντική μείωση του MI (Qin R. et al., 2015). Η παρουσία χαλκού φαίνεται να προκαλεί χρωμοσωμικές θραύσεις και καθυστερήσεις, ενώ συχνή είναι η εμφάνιση πυρήνων με λοβούς όταν υπάρχει στο περιβάλλον, σαν αποτέλεσμα διαταραχών στο σχηματισμό των μικροσωληνίσκων και κατ' επέκταση της μιτωτικής ατράκτου (Abubacker MN. & Sathya C., 2017). Επιπλέον, κοινή είναι η εμφάνιση γεφυρών στα στάδια της ανάφασης και της τελόφασης, ενώ λιγότερο συχνή είναι η εμφάνιση πολυπλοειδών κυττάρων όταν στο περιβάλλον υπάρχουν αυξημένες συγκεντρώσεις Cu. Σε μελέτες που έχουν γίνει για τις επιδράσεις του Hg, φαίνεται ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί κυρίως προσκολλημένα χρωμοσώματα και θραύσεις (Banerjee D. et al., 2010). Το Ni, είναι κυρίως υπεύθυνο για την παρουσία χρωμοσωμικών θραύσεων και πυρηνικών ανωμαλιών (Donghua L. et al., 1994).

Αντίθετα με τις CA, παρατηρούμε σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης πυρηνικών ανωμαλιών σε όλα τα δείγματα υλός, αλλά και στη συχνότητα εμφάνισης μικροπυρήνων εκτός από την υλύ του ΣΙΚ. Τέτοιες ανωμαλίες είναι πυρήνες με λοβούς, πυρήνες με εκβλαστήσεις (buds) ή πυρήνες με ακανόνιστο σχήμα πυρηνικής

μεμβράνης (notched). Η πυρηνική ανωμαλία με τη μεγαλύτερη διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των δειγμάτων ιλύος της Παμβώτιδας και των controls είναι οι πυρήνες με λοβούς. Οι πυρηνικές ανωμαλίες ενδέχεται να εμφανίζονται λόγω διαταραχών στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων. Οι πυρήνες με λοβούς είναι αποτέλεσμα χρωμοσωμικών ανωμαλιών κατά τη μιτωτική διαίρεση, καθώς προκύπτουν από πολύ-πολικές αναφάσεις, οι οποίες μπορεί να συνδέονται ή όχι με χρωμοσωμική προσκόλληση, καθιστώντας τα κύτταρα μη βιώσιμα. Λόγω της πολυπολικότητας, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σωστά η αναδιοργάνωση της πυρηνικής μεμβράνης, γεγονός που οδηγεί σε άνιση κατανομή του γενετικού υλικού στο κύτταρο και δημιουργία λοβών. Οι πυρηνικές ανωμαλίες φαίνεται πως αποτελούν μια σειρά από αλληλένδετα γεγονότα που τελικά οδηγούν στη δημιουργία μικροπυρήνων (MN). Στις ρίζες που αναπτύχθηκαν είτε άμεσα στο Σ2Κ, είτε μετά από μεταφορά τους από το βερμικουλίτη στο Σ2Κ, προσδιορίστηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης MN. Κύτταρα με ακανόνιστο σχήμα πυρηνικής μεμβράνης (notched) τείνουν να οδηγούνται σε μια διαδικασία απελευθέρωσης του γενετικού τους υλικού (bud), γεγονός που συσχετίζεται με τη δημιουργία MN. Επίσης, MN μπορεί να προκύψουν από χρωμοσωμικές θραύσεις ή από ολόκληρα χρωμοσώματα που δεν ενσωματώθηκαν στον κύριο πυρήνα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Leme DM. et al., 2008). Όπως, αναφέρθηκε και παραπάνω, από τα βαρέα μέταλλα που έχουν βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στη λίμνη Παμβώτιδα το Ni και ο Cu μπορεί να οδηγήσουν σε εμφάνιση των παραπάνω ανωμαλιών. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση μας ότι μακροχρόνια έκθεση οργανισμών στην ιλύ της Παμβώτιδας μπορεί να έχει δυσμενείς τοξικολογικές επιδράσεις.

Τέλος, σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων. Ποσοστό της τάξης του 0,01% υπολογίστηκε στο Βερμικουλίτη, ενώ στα δείγματα υλύος το ποσοστό κυμαίνεται από περίπου 0,4 έως 0,96%.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με παρόμοια αποτελέσματα που αφορούν άλλους οργανισμούς εκτός του *Allium cepa*. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες των τοξικών επιδράσεων των βαρέων μετάλλων στον κυτταρικό κύκλο, τη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου και πυρηνικές ανωμαλίες σε ψάρια, θηλαστικά αλλά και ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

Εκτός του *Allium cepa* υπάρχουν αρκετά ακόμα φυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί σε ελέγχους τοξικότητας των Cu, Ni, Cr και Hg. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σχετικά με την επίδραση του Cu σε κύτταρα ριζών καλαμποκιού έδειξε σημαντική μείωση του ΜΙ λόγω αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης, όπως ακριβώς παρατηρήσαμε στην παρούσα μελέτη για τα μεριστωματικά κύτταρα του *Allium cepa*. Οι πιο κοινές ανωμαλίες στην περίπτωση του καλαμποκιού ήταν οι C-μεταφάσεις, οι προσκολλησεις και οι χρωμοσωμικές γέφυρες ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού παρατηρήθηκαν και άμορφοι πυρήνες. Οι Jiang W. et al. (2001), υποστηρίζουν ότι όλες οι παραπάνω ανωμαλίες οφείλονται στην αντικατάσταση των ιόντων Ca^{2+} με αυτά του χαλκού, όταν ο δεύτερος υπάρχει σε περίσσεια στο περιβάλλον (Jiang W. et al., 2001). Στην παρούσα μελέτη δεν μπορούμε να πούμε ότι ο Cu ασκεί την τοξική του επίδραση με αυτόν το μηχανισμό δράσης, καθώς στο ίζημα της Παμβώτιδας έχει προσδιοριστεί μεγάλη συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} όλη τη διάρκεια του έτους (Touka A. et al., 2018). Αντίστοιχα είναι τα αποτελέσματα για το *Helianthus annuus*, με τη μόνη διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση τα κύτταρα των ριζών ξεκινούν τη μιτωτική διαίρεση, αλλά δεν καταφέρνουν να την ολοκληρώσουν μένοντας ακινητοποιημένα στη μετάφαση της μίτωσης (Inceer H. et al., 2002). Μειωμένο ΜΙ παρατηρήθηκε και

στα κύτταρα ψυχανθών παρουσία Cr(VI), λόγω διαταραχών στο σχηματισμό των μικροσωληνίσκων κατά τη μίτωση. Επιπλέον, ο ελλειπής σχηματισμός μικροσωληνίσκων είναι υπεύθυνος και για αρκετές από τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στα φυτικά κύτταρα, αλλά και για την εμφάνιση μικροπυρήνων (Eleutheriou PE. et al., 2014). Αναφορικά με τις επιπτώσεις του Cr στα μεριστωματικά κύτταρα της ρίζας του *Amaranthus viridis* φάνηκε πως το Cr επιδρά με δοσοεξαρτώμενο τρόπο στην ανάπτυξη της ρίζας, με πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του να οδηγούν σε πλήρη αναστολή του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού. C-μεταφάσεις και χρωμοσωμικές γέφυρες ήταν ανάμεσα στις πιο κοινές CA που προσδιορίστηκαν λόγω της πρόσληψης του Cr από το ριζικό σύστημα του *Amaranthus viridis* (Zou JH. et al., 2006). Η Pavlova D. (2017) διαπίστωσε τις τοξικές επιδράσεις του Ni στη μιτωτική διαίρεση των μεριστωματικών κυττάρων του φυτού *Plantago lanceolata* (Πεντάνευρο το λογχοειδές). Οι διαταραχές περιλαμβάνουν διαταραχές στη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου και χρωμοσωμικές ανωμαλίες εξαρτώμενες από τη συγκέντρωση του Ni και το χρόνο έκθεσης του φυτού σε αυτό. Όπως και στη δική μας μελέτη, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις Ni, ο MI μειώθηκε σημαντικά, με ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των ανωμαλιών. Επίσης, βρέθηκε ότι το Ni επιδρά στους πυρήνες των φυτικών κυττάρων και δεν επιτρέπει το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων ώστε το κύτταρο να συνεχίσει σε μιτωτική διαίρεση. Η παρουσία του Ni συσχετίστηκε με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης προσκολλημένων χρωμοσωμάτων, C-μεταφάσεων και γεφυρών (Pavlova D., 2017).

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη για το *Allium cepa* έχουν βρεθεί και για διάφορα είδη ψαριών. Έκθεση ψαριών σε αυξημένες συγκεντρώσεις χαλκού προκαλεί σημαντική αύξηση στη συχνότητα

εμφάνισης πυρηνικών ανωμαλιών και μικροπυρήνων στα ερυθροκύτταρα ψαριών, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Οι πιο συχνές ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν είναι οι πυρήνες με ασυνέχειες στην πυρηνική μεμβράνη, οι πυρήνες με λοβούς και τα πολυπύρρηνα κύτταρα (Kousar S. & Javed M., 2015, Güner U. et al., 2011). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε ψάρια που προέρχονται από λιμνοθάλασσες με αυξημένες συγκεντρώσεις Ni, Cd και Pb στο νερό, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι πυρηνικές ανωμαλίες και μικροπυρήνες είναι αποτέλεσμα της παρουσίας βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον (Ergene S. et al., 2007). Σε επιθηλιακά κύτταρα των ψαριών τα ιόντα Cr φαίνεται πως οδηγούν σε πυρηνικές ανωμαλίες και εμφάνιση MN (Rocha CA. et al., 2011). Σε ερυθροκύτταρα του είδους *Carassius auratus gibelio* (Αγριοχρυσόψαρο), η παρουσία τρισθενούς ή εξασθενούς Cr στο περιβάλλον οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης MN (Al-Sabti K. et al., 1994). Πυρηνικές ανωμαλίες έχουν παρατηρηθεί επίσης και στα ερυθροκύτταρα του ψαριού *Colossoma macropomum* (Γκαμιτάνα), μετά από παρατεταμένη έκθεση του σε μεθυλ-υδράργυρο (Rocha CA. et al., 2011,a). Αυτό επιβεβαιώνεται και από τους Ayllon F. & Garcia – Vazquez E. (2000), οι οποίοι έδειξαν ότι ο Hg είναι γενετοξικός για τα ψάρια προκαλώντας MN και πυρηνικές ανωμαλίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις και πιο εκτεταμένες πυρηνικές βλάβες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα είδη *Phoxinus phoxinus* (Κοκκινόγαστρος) και *Poecilia latipinna* (Ποετσίλια η ιστοφόρος) (Ayllon F. & Garcia–Vazquez E., 2000).

Η έκθεση του ανθρώπου σε βαρέα μέταλλα μπορεί επίσης να έχει τοξικές επιδράσεις. Σύμφωνα με τους Qayyum S. et al. (2012) υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της διάρκειας έκθεσης του ανθρώπου σε περιβάλλον με ταυτόχρονη παρουσία Ni και Cr, η οποία καθορίζεται από την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης μικροπυρήνων και άλλων πυρηνικών ανωμαλιών. Οι συγκεντρώσεις των δύο μετάλλων υπολογίστηκαν στο

πλάσμα ατόμων που εκτέθηκαν ταυτόχρονα και στα δύο μέταλλα, τιμές αντιπροσωπευτικές για την ποσότητα των μετάλλων που διανέμονται στο σώμα. Σε άτομα που εκτέθηκαν για περισσότερο καιρό στα παραπάνω μέταλλα παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μικροπυρήνων στα στοματικά τους κύτταρα. Εκτός από τους MN, συχνή ήταν η εμφάνιση κυττάρων με κατακερματισμένους πυρήνες (Qayyum S. et al., 2012). Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα των Sudha S. et al. (2011), οι οποίοι βρήκαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης MN σε στοματικά κύτταρα ατόμων που εκτίθενται καθημερινά μόνο σε ενώσεις με Cr (Sudha S. et al., 2011). Οι τοξικές επιδράσεις του Cr έχουν μελετηθεί επιπλέον σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Καλλιέργεια αυτών παρουσία Cr(VI) προκάλεσε σημαντική μείωση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην επιβίωση των κυττάρων. Τα ίδια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, ινοβλάστες και μακροφάγα. Τα κύτταρα, αντί να διαιρούνται, οδηγούνται σε απόπτωση επαγόμενη από τα ιόντα χρωμίου που υπάρχουν στο περιβάλλον (Akbar M. et al., 2011). Μια μελέτη που έγινε σε ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα έδειξε η ότι έκθεση σε Ni προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις S και G2 φάσεις, αποκλείοντας την είσοδο τους σε κυτταρική διαίρεση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το γεγονός αυτό αποδείχθηκε ότι είναι αποτέλεσμα της επίδρασης του Ni στις κυκλίνες D1 και E (Ding J. et al., 2009). Σε περιπτώσεις παρατεταμένης έκθεσης σε μείγμα ιόντων Ni και Cu της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς THP – 1, βρέθηκε συνεργιστική δράση με αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αυξανόμενος χρόνος έκθεσης των κυττάρων στα παραπάνω μέταλλα έχει σαν αποτέλεσμα απόπτωση και κυτταρικό θάνατο (Wataha JC. et al., 2000). Στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά PtK₂, είχε παρατηρηθεί ήδη από το 1988 ότι επώαση με μεθυλ-υδράργυρο οδηγεί σε διαταραχές στον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων με αποτέλεσμα την αλλαγή στο σχήμα των

κυττάρων, αλλά και αλλαγές στη μορφολογία των πυρήνων του κυττάρου που δεν τους επέτρεπαν να συνεχίσουν σε μιτωτική διαίρεση (Sagger RP., 1988).

Η ποικιλότητα των ανωμαλιών που παρατηρήσαμε με το *Allium cepa* Test μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ιλύς της Παμβώτιδας έχει τοξικές επιδράσεις στα κύτταρα με πολλαπλούς τρόπους. Αυτό ενδεχομένως σημαίνει ότι περισσότερες από μια ουσίες είναι υπεύθυνες για την τοξική δράση και κάθε μία από αυτές οδηγεί σε διαφορετικού τύπου ανωμαλία. Τα βαρέα μέταλλα που περιέχονται στα ιζήματα της Παμβώτιδας θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνα για κάποιες από τις παραπάνω μεταλλαγές και πυρηνικές ανωμαλίες καθώς επηρεάζουν το κύτταρο με πολλαπλούς τρόπους και εμπλέκονται σε διάφορα μονοπάτια κυτταροτοξικότητας. Καθένα μόνο του, αλλά και συνεργιστικά, μπορούν να προκαλέσουν την πληθώρα των μεταλλαγών που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Το γεγονός είναι ότι η Λίμνη Παμβώτιδα χρειάζεται συνεχή παρακολούθηση τόσο για τις συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων που εισέρχονται σε αυτή και συνεχίζουν να την επιβαρύνουν, όσο και για τις επιπτώσεις που μπορεί να έχουν στο οικοσύστημα και τους ανώτερους οργανισμούς.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abubacker M.N. & Sathya C. (2017). Genotoxic effect of Heavy Metals Cr, Cu, Pb and Zn using *Allium cepa* L. *Biosci. Biotech. Res. Asia*. **14(3)**: 1181 – 1186.
- Agency for Toxic substances and Decrease Registry (2004). Chemical and Physical Formation of Copper.
- Akbar M., Bewer M.J., Grant H.M. (2011). Effect of chromium and cobalt ions on primary human lymphocytes in vitro. *Journal of Immunotoxicology* **8(2)**: 140 – 149.
- Al – Sabti K. et al. (1994). Chromium – induced Micronuclei in Fish. *Journal of Applied Toxicology*. **13(5)**: 333 – 336.
- Allen D. (2003). Material flows and waste streams: Chromium, ESM 282. Industrial Ecology, The Bren School at UCSB, pp. 1-12.
- Alloway B.J. & Ayres D.C. (1997). Chemical Principles of Environmental Pollution, 2nd edition, Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman and Hall, pp. 17-64, 190-220.
- Andrea Törökné (2004). Sensitivity Evaluation of the Daphtokit and Thamnotoxkit Microbiotests on Blind Samples. *Journal of Applied Toxicology*. **24**: 323 – 326.
- Attig H., Kamel N., Sforzini S., Dagnino A., Jamel J., et al., (2014). Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarker responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam), *Marine Environmental Research*. **94**: 65-71.
- Ayllon F. & Garcia – Vazquez E. (2000). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research*. **467**: 177 – 186.
- Bandi CN. & Hadjikaku SK. (2019). Evaluation of genotoxicity by Micronucleus assay in vitro and by *Allium cepa* test in vivo. Accepted for publication to *Bioprotocol*.
- Banerjee D., Bandhyopadhyay P., Sarkar C. (2010). Cytogenetic effects of mercury chloride on the root tip cells of *Allium cepa* L. *Poll Res*. **29(1)**: 145 – 148.
- Baudo R. & Muntau H. (1990). Lesser known in-place pollutants and diffuse source problems, Chap 1 in sediments: Chemistry and Toxicity of In-place Pollutants, Publishers, Michigan.

Beghelli FGS, Pompêo MLM, Rosa AH and Moschini-Carlos V (2016). Effects of copper in sediments on benthic macroinvertebrate communities in tropical reservoirs. *Limnetica*. **35(1)**: 103-116.

Bryan GW. & Langston WJ. (1992). Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environmental Pollution*. **76**: 89 – 131.

Çelik T.A. & Aslantürk Ö.S. (2009). Investigation of cytotoxic and genotoxic effects of *Ecballium elaterium* juice based on *Allium test*. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. **3(9)**: 591 – 596.

Cooper GM (2000). Chapter 14: The Eukaryotic Cell Cycle. *The cell: a molecular approach* (2nd ed.). Washington, D.C: ASM Press.

Ding J., He G., Gong W., Wen W., et al. (2009). Effects of Nickel on Cyclin Expression, Cell Cycle Progression and Cell Proliferation in Human Pulmonary Cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **18(6)**: 1 – 19.

Donghua L., Wusheng J. & Maoxie L. (1992). Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas*. **117**: 23 – 29.

Donghua L., Wusheng J., Lin G., Yuqing H., Cheng L. & Fengmei Z. (1994). Effects of nickel sulfate on root growth and nucleoli in root tip cells of *Allium cepa*. *Israel Journal of Plant Sciences*. **42(2)**: 143 – 148.

Eleutheriou P.E. et al. (2012). Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L. *Protoplasma*. **249**: 401 – 416.

Eleutheriou P.E. et al. (2014). Aberration of mitosis by hexavalent chromium in some Fabaceae members is mediated by species-specific microtubule disruption. *Environ Sci Pollut Res Int*. **22(10)**: 7590 – 7599.

Ergene S. et al. (2007). Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*. **16**: 385 – 391.

Eric Goujon (2015). Etude de la toxicité de la sulcotrione et de ses produits de photodégradation. *Sciences agricoles*. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français.

- Ernest Merian (1984). Introduction on environmental chemistry and global cycles of chromium, nickel, cobalt beryllium, arsenic, cadmium and selenium, and their derivatives, *Toxicological and Environmental Chemistry*. **8(1)**: 9-38.
- European Commission. (1992). Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. *Official Journal of the European Communities*. **206**: 1–50.
- Farkas A., Erratico C., Vigano L., (2007). Assessment of the Environmental Significance of Heavy Metal Pollution in Surficial Sediments of the River Po, *Chemosphere*. **68**: 761–768.
- Fiskesjö G. (1985). The Allium test as a standard in environmental monitoring, *Hereditas*. **102**: 99–112.
- Förstner U., Wittmann GTW (1983). Metal Pollution in Aquatic Environment. New York: Springer-Verlag.
- Franklin et al. (2012). Organic and total mercury determination in sediments by cold vapor atomic absorption spectrometry: methodology validation and uncertainty measurements. *Quim. Nova*. **35(1)**: 45-50.
- Fu Fenglian & Wang Qi (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*. **92**: 407 – 418.
- G. Allen Burton (2002). Sediment quality criteria in use around the world. *Limnology*. **3**: 65 – 75.
- Güner U. & Muran F.D.G. (2011). Micronucleus Test, Nuclear Abnormalities and Accumulation of Cu and Cd on *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853). *Turk J. Fish Aquat. Sci*. **11**: 615 – 622.
- Hilada Nefic, Jasmin Musanovic, Azra Metovic, Kemajl Kurteshi (2013). Chromosomal and Nuclear Alterations in Root Tip Cells of *Allium Cepa* L. Induced by Alprazolam. *Med Arh. Dec*. **67(6)**: 388 – 392.
- Hübner R, Astin KB & Herbert RJH (2010). Heavy metal-time to move on from semantics to pragmatics?. *Journal of Environmental Monitoring*. **12**: 1511–1514.
- Inceer H. et al. (2002). Cytogenetic Effects of Copper Chloride on the Root Tip Cells of *Helianthus annuus* L. *Turk J Biol*. **27**: 43 – 46.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (1980). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 23 of Some Metals and Metallic Compounds, Lyon, France, 1980.

Ioannides K. et al. (2015). Distribution of heavy metals in sediment cores of Lake Pamvotis (Greece): a pollution and potential risk assessment. *Environ Monit Assess.* **187**: 4209.

IUPAC (2002). "Heavy Metals" – A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *PureAppl. Chem.* **74(5)**: 793 – 807.

Jiang W., Liu D., Liu X. (2001). Effects of copper on root growth, cell division and nucleolus of *Zea mays*. *BiologiaPlantarum.* **44(1)**: 105 – 109.

Kabata-Pendias A., Mukherjee A.B., (2007). Trace Elements from Soil to Human. *Springer*, pp 57-65.

Kabata-Pendias, A. (2011). Trace Elements in Soils and Plants, fourth ed. CRC Press, Boca Raton.

Keyuna S. Cameron, Virginia Buchner, and Paul B. Tchounwou, (2011). Exploring the Molecular Mechanisms of Nickel-Induced Genotoxicity and Carcinogenicity: A Literature Review. *Rev Environ Health.* **26(2)**: 81-92.

Kotaś J. & Stasicka Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution.* **107(3)**: 263–283.

Kousar S. & Javed M. (2015). Studies on Induction of Nuclear Abnormalities in Peripheral Blood Erythrocytes of Fish Exposed to Copper. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* **15**: 879 – 886.

Leme D.M. & Marin-Morales M.A. (2009). Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research.* **682**: 71 – 81.

Leme D.M., Angelis D.F., Marin-Morales M.A. (2008). Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquatic Toxicology.* **88(4)**: 214 – 219.

Li Yunbo, Trush Michael, Yager James (1994). DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis.* **15(7)**: 1421–1427.

Luoma SN. & Carter JL. (1991) Effects of trace metals on aquatic benthos, chap.10, in metal Ecotoxicology: concepts & applications, MC Newman and AW McIntosh Eds, Lewis Publishers Inc, Michigan.

Ma Y & Hooda PS. (2010). Chromium, nickel and cobalt. In: Hooda, P.S. (Ed.), Trace Elements in Soils, first ed. John Wiley & Sons Ltd, PO19 8SQ, UK, pp. 461e480.

MacDonald DD. et al, (2000). Development and evaluation of consensus-based sediment quality guideline for freshwater ecosystems. *Arch. Environ. Constam. Toxicol.* **39**: 20 – 31.

Machado K.C et al. (2018). Marinobufagin, a molecule from poisonous frogs, causes biochemical, morphological and cell cycle changes in human neoplasms and vegetal cells. *Toxicology Letters.* **285**: 121 – 131.

Mangalampalli Bhanuramya, Dumala Naresh, Grover Paramjit (2018). Allium cepa root tip assay in assessment of toxicity of magnesium oxide nanoparticles and microparticles. *Journal of Enviromental Sciences.* **66**: 125 – 137.

Mc Bride, 1994. Environmental Chemistry of Soils. Oxford University Press.

Mesi A., Koplaku D., Golemi S. (2012) The use of higher plants as bio-indicators of environmental pollution – A new approach for toxicity screening in Albania. *MJSS.* **3**: 237 – 248.

National Geographic (2013). Εγκυκλοπαίδεια του Περιβάλλοντος για νέους. Εκδόσεις Σελένα Α.Ε, Αθήνα.

Oliveira H. (2012). Chromium as an Environmental Pollutant: Insights on Induced Plant Toxicity. *Journal of Botany.* **2012**: 1 – 8.

Pavlova D. (2017). Nickel effect on root – meristem cell division in *Plantagolanceolata*(Plantaginaceae) seedlings. *Australian Journal of Botany.* **65(5)**: 446 – 452.

Pirrone N., Cinnirella S., Feng X Finkelman. R.B., Friedli H.R., Leaner J., Mason R., Mukherjee A.B., Stracher G.B., Streets D.G., and Telmer K., 2010. Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources, *Atmospheric chemistry and physics.* **10** 5951-5964.

- Qayyum S et al. (2012). Effect of nickel and chromium exposure on buccal cells of electroplaters. *Toxicology and Industrial Health*. **28(1)**: 74 – 82.
- Qin R. et al. (2015). Copper-induced root growth inhibition of *Allium cepa* var. agrogarum L. involves disturbances in cell division and DNA damage. *Environ Toxicol Chem*. **34(5)**: 1045 – 1055.
- Randal M.P., Chattopadhyay S. (2013). Mercury contaminated sediment sites-An evaluation of remedial options. *Environmental Research*. **125**: 131-149.
- Rice K.M., Walker J.E.M., Wu M., Gillette C., Blough E.R. (2014). Environmental mercury and its toxic effects. *J Prev Med Public Health*. **47**: 74-83.
- Rifkin E., Gwinn P., Bouwer E. (2004). Chromium and Sediment Toxicity. *Environ. Sci. Technol*. **38(14)**: 267A-271A.
- Rocha C.A., Cunha L.A. et al. (2011)a. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of *Colossoma macropomum* exposed to methylmercury. *Genetics and Molecular Biology*. **34(4)**: 694 – 697.
- Rocha C.A., Gomes C.D.F., et al. (2011). Detection of Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in *Oreochromis niloticus* Exposed to Potassium Dichromate. *Global Veterinaria*. **7(3)**: 301 – 304.
- Rosales RM, Faz A., et al., (2017). Geochemical speciation of chromium related to sediments properties in the riverbed contaminated by tannery effluents. *J Soil Sediments*. **17(5)**: 1437-1448.
- Selin N. (2009) Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. *Annu. Rev. Environ. Resour*. **34**: 43-63.
- Shaheen SM. & Rinklebe J. (2014). Geochemical fractions of chromium, copper, and zinc and their vertical distribution in floodplain soil profiles along the Central Elbe River, Germany. *Geoderma* 228e229, 142e159.
- Shaheen, S.M., Rinklebe, J. (2017). Redox chemistry of nickel in soils and sediments: A review. *Chemosphere*. **179**: 265 – 278.
- Siqueira P.B. et al (2018). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potentials of the solubilized extract of the coffee waste using *Allium cepa* as a test system. *Ciência e Natura* **40(77)**.

Sudha S., Kripa S.K., Shibily P., Shyn J. (2012). Elevated Frequencies of Micronuclei and other Nuclear Abnormalities of Chrome Plating Workers Occupationally Exposed to Hexavalent Chromium. *Iran J Cancer Prev.* **3**: 119 – 124.

Tchounwou BP., Newsome C., Williams J., Glass K. (2008). Copper-Induced Cytotoxicity and Transcriptional Activation of Stress Genes in Human Liver Carcinoma (HepG₂) Cells. *Met Ions Biol Med.* **10**: 285 – 290.

Thamnotox kit F, Crustacean Toxicity Screening Test for Freshwater, Standard Operational Procedure.

Touka A., Vareli K., Igglezou M., Monokrousos N., Alivertis D., Halley J.M., Hadjikakou S., Frillingos S. and Sainis I. (2018) Ancient European Lakes: Reservoirs of Hidden Microbial Diversity? The Case of Lake Pamvotis (NW Greece). *Open Journal of Ecology.* **8**: 537-578.

Tzeferis G.P. 2012. Review of mining/metallurgical industry in Greece, years 2010 – 2011.

Urgut OS, Ozturk II., Banti CN., Kourkoumelis N., Manoli M., Tasiopoulos AJ., Hadjikakou SK. (2016). New Antimony(III) Halide Complexes with Dithiocarbamate Ligands Derived from Thiuram Degradation: The Effect of the molecule's close contacts on *in vitro* cytotoxic activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* **58**: 396 – 408.

US Department of Health and Human Services (2004). Toxicological profile of cooper.

Vymazal J. (2010). Water and Nutrient Management in Natural and Constructed Wetlands. Springer Science + Business Media B.V.

Wataha J.C., Lockwood P.E., Schedle A. (2000). Effect of silver, copper, mercury, and nickel ions on cellular proliferation during extended, low-dose exposures. *Journal of Biomedical Materials Research.* **52(2)**: 360 – 364.

Wei Jin & Kai Yan (2015). Recent advances in electrochemical detection of toxic Cr(IV). *RSC Adv.* **5**: 37440-17450.

WHO (1996). Trace elements in human nutrition and health. ISBN: 92-4-156173-4

World Health Organization, (2016). Risks from mercury for human health and the environment.

Zou J.H. et al. (2006). Effects of hexavalent chromium (VI) on root growth and cell division in root tip cells of *Amaranthusviridis*L. *Pak. J. Bot.* **38(3)**: 673 – 681.

Γκέκας Β., Φραντζεσκάκη Ν., Κατσιβέλα Ε. (2002). Τεχνολογίες Επεξεργασίας Τοξικών –Επικίνδυνων Αποβλήτων, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.

Ζαχαρίας Ι., Κουτσικόπουλος Κ., Παπαθεοδώρου Γ., και Φερεντίνος Γ. (2004). Φυσικό Περιβάλλον και Ρύπανση – Το θαλάσσιο περιβάλλον ως αποδέκτης αποβλήτων. Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, Πάτρα.

Κούγκολος Γ.Α. (2007) Εισαγωγή στην Περιβαλλοντική Μηχανική, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.

Μαλλιάρος Θ. (2000) Περιβάλλον Ρύπανση Τεχνικές Αντιρρύπανσης Αέρια, Υγρά και στερεά απόβλητα, Εκδόσεις Μεταίχμιο, Αθήνα.

Μαρμαράς Βασίλης & Λαμπροπούλου Μαρμαρά Μαρία 2005. Βιολογία Κυττάρου Μοριακή Προσέγγιση 5^η Έκδοση: Σεπτέμβριος, Τυρογαμα, Πάτρα.

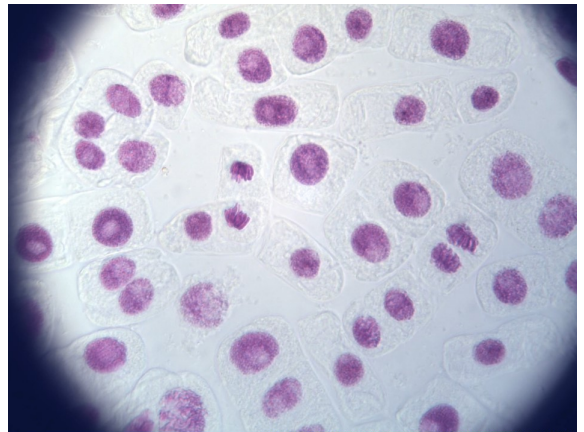
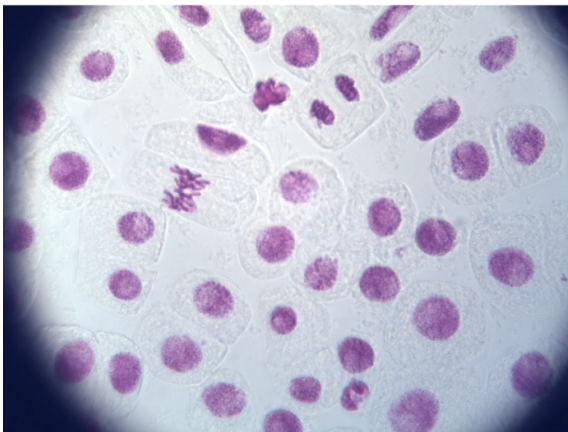
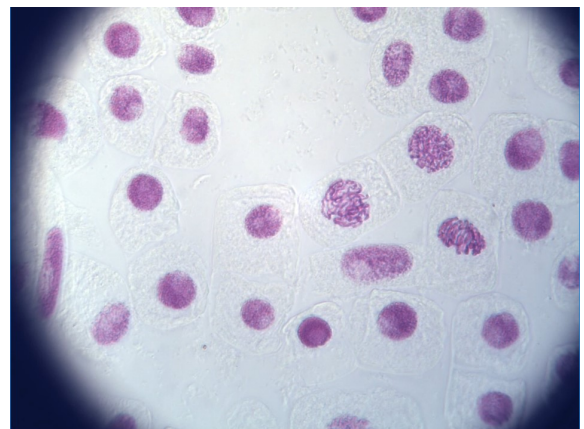
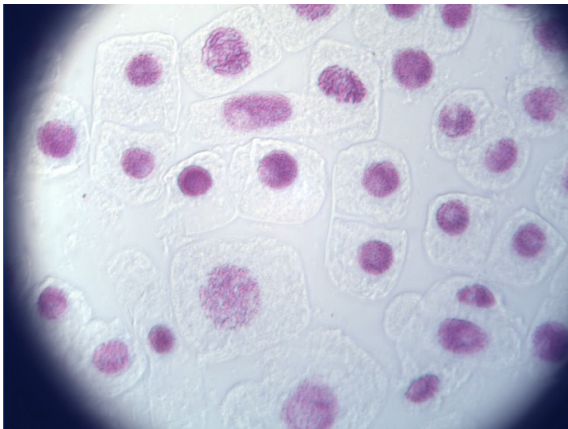
Ντούλα Μ. (2004). Μέταλλα στα θαλάσσια ιζήματα, Πηγές προέλευσης, διασπορά και τύχη των μετάλλων. Εκτίμηση βαθμού ρύπανσης, Ινστιτούτο εδαφολογίας Αθηνών, Αθήνα.

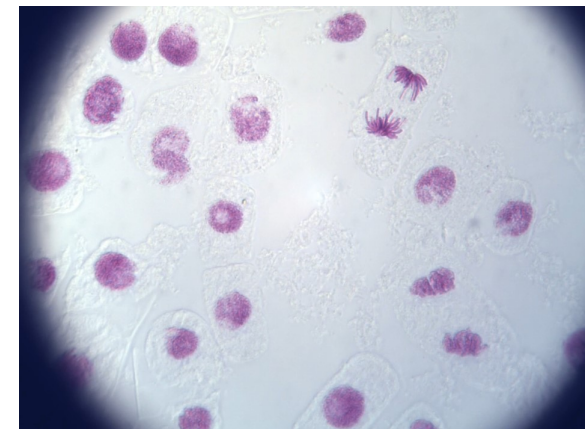
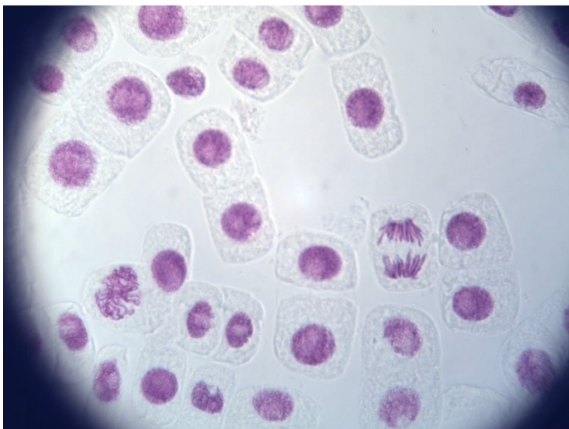
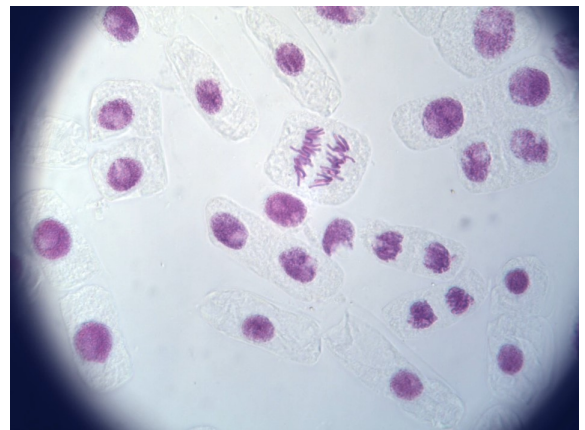
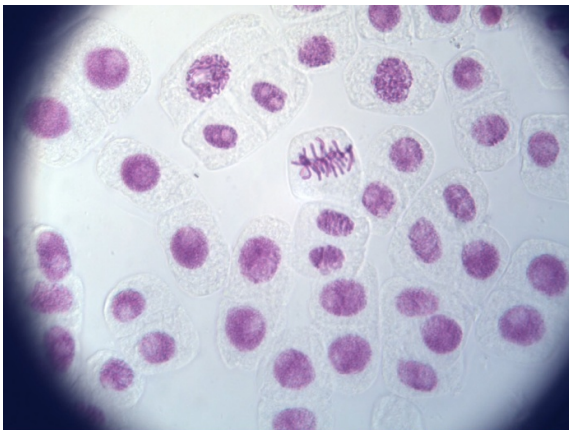
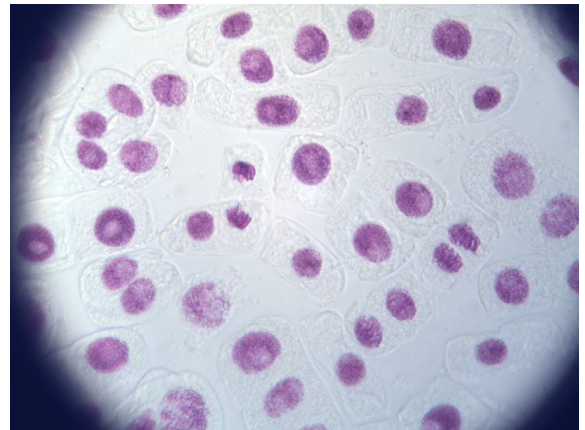
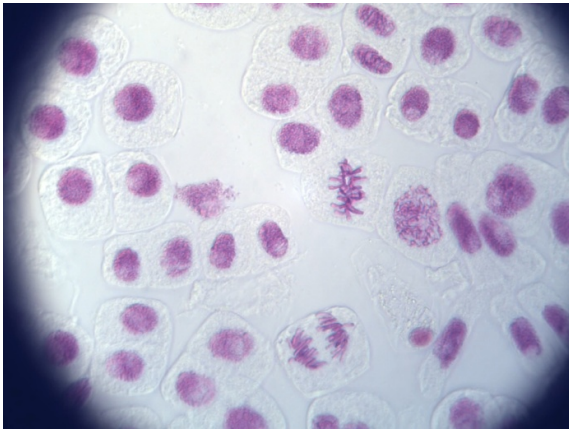
Φερεντίνος Γ., Παπαθεοδώρου Γ., Ζαχαρίας Ι., Γκιώνης Γ., (1996). Στατιστική και Ανάλυση Δεδομένων στις Γεωεπιστήμες, Μέρος Α' Περιγραφική Στατιστική Εκτιμήσεις Παραμέτρων, Στατιστικοί Έλεγχοι, Πάτρα.

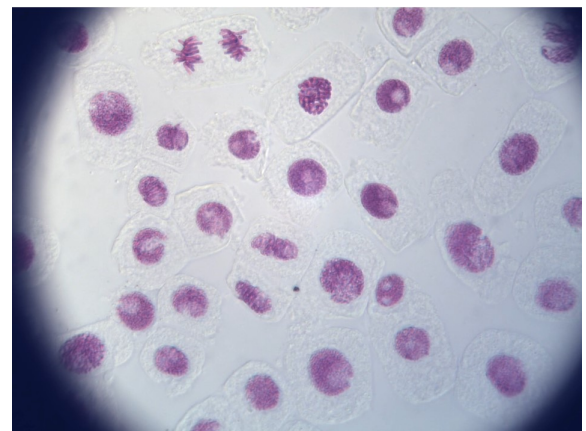
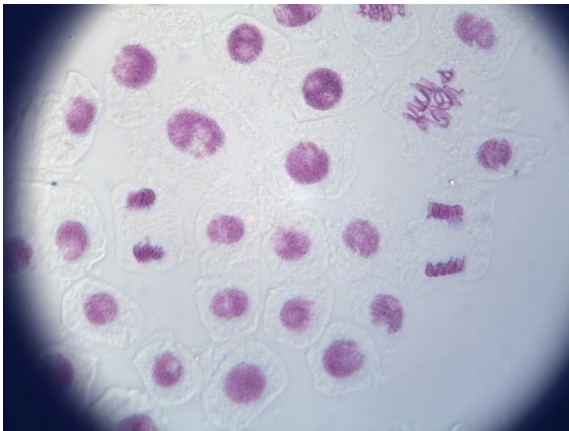
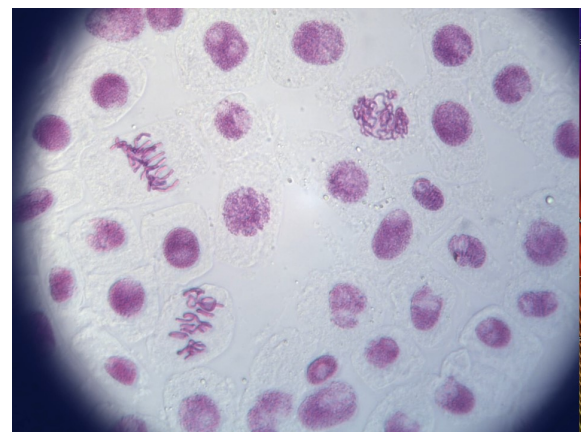
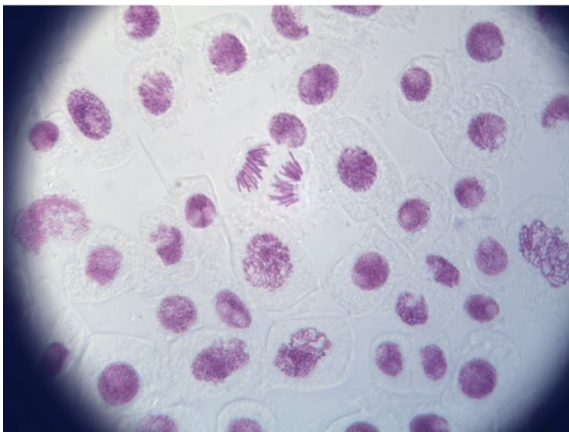
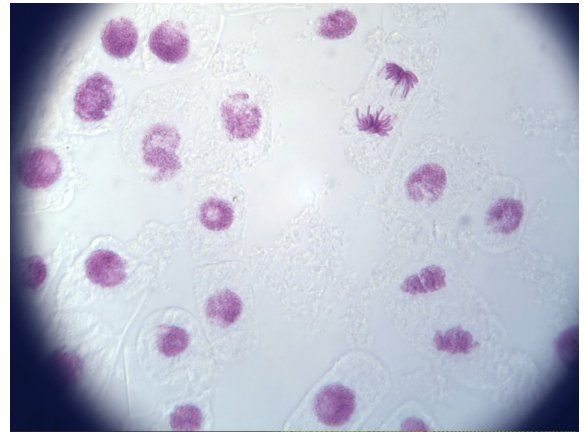
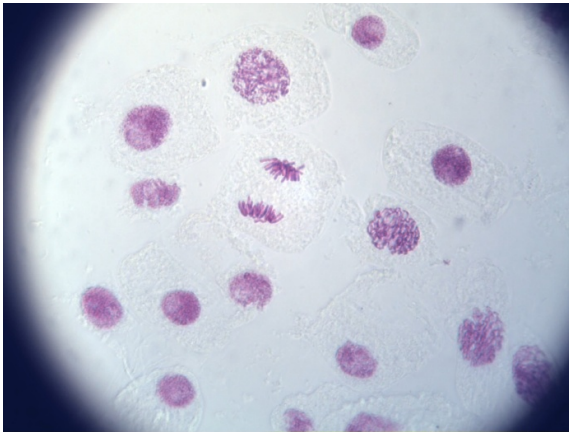
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

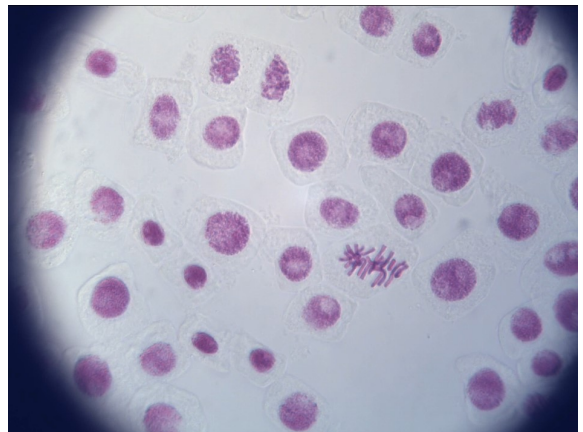
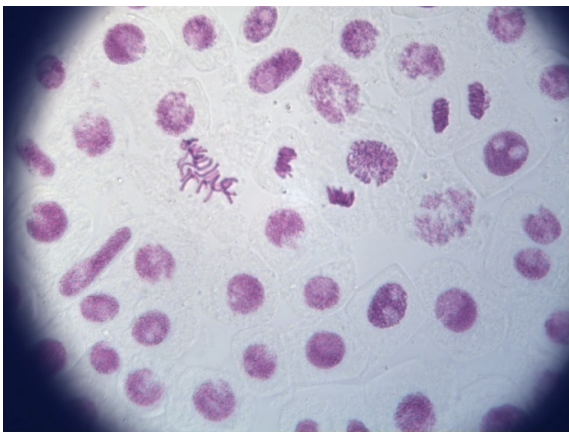
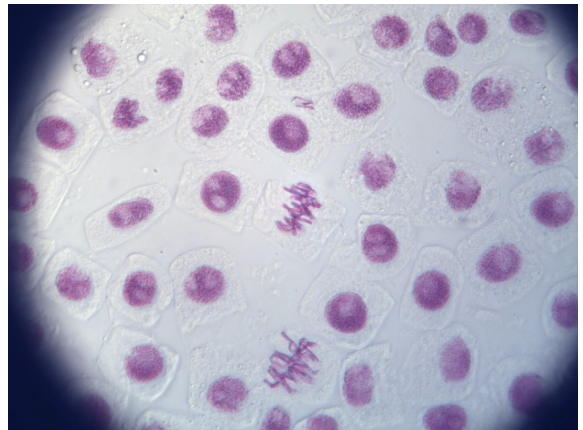
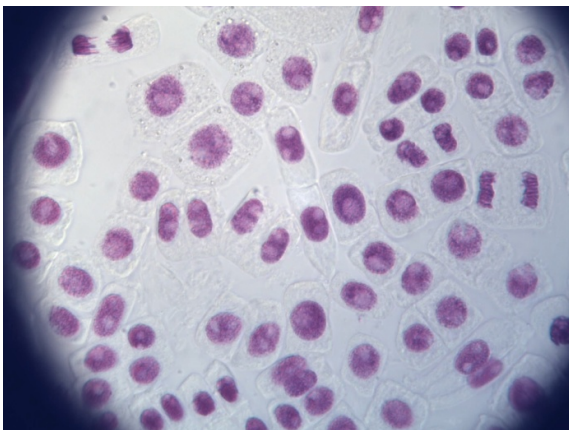
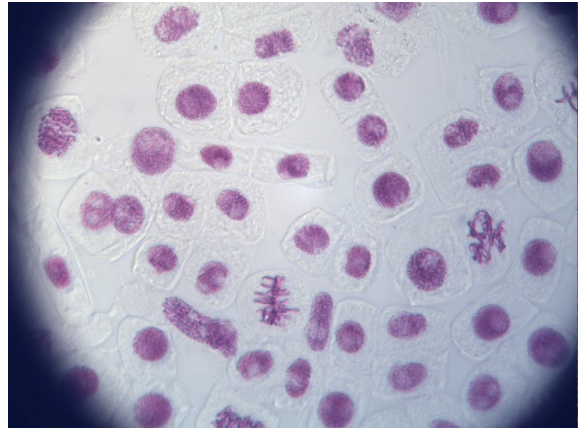
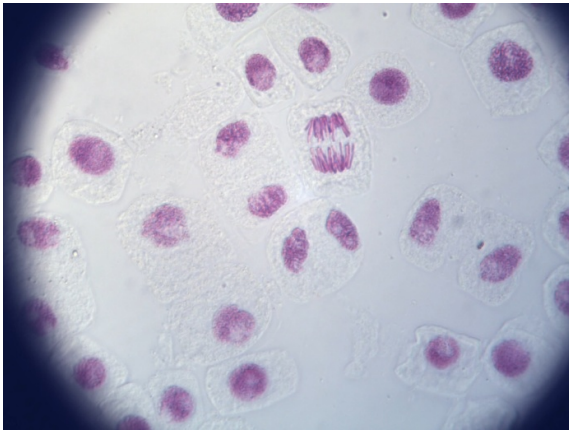
Ακολουθούν κάποιες εικόνες από το φωτονικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας.

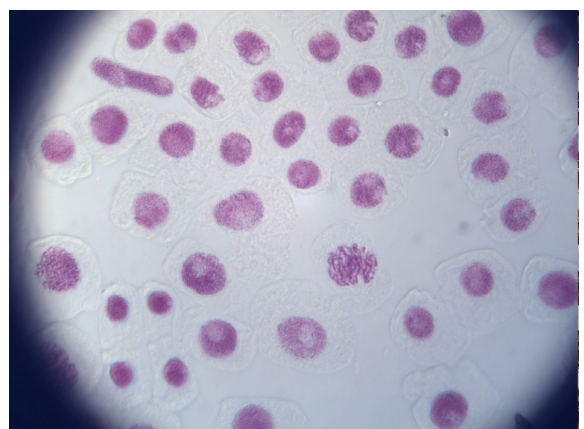
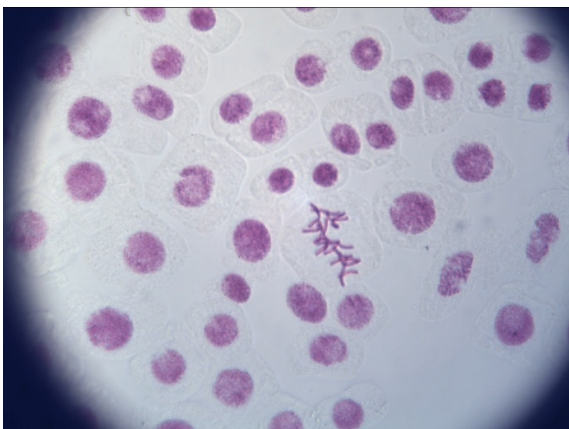
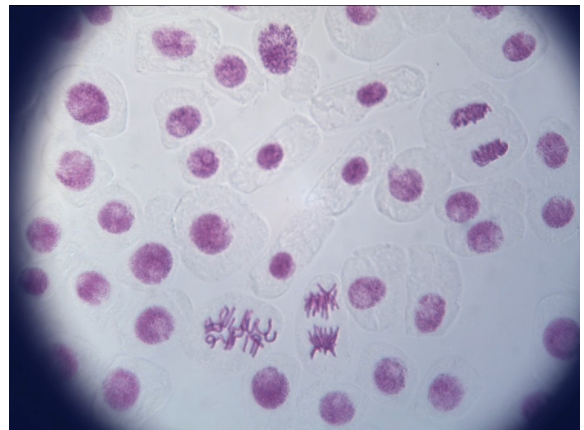
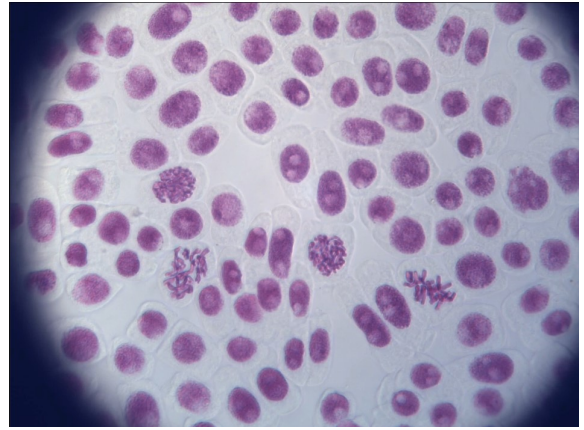
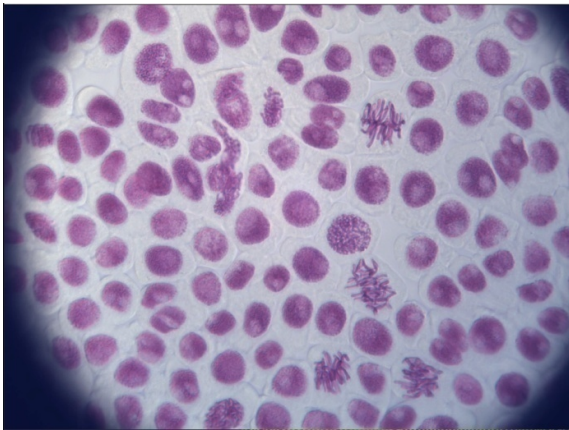
Οι παρακάτω εικόνες αποτελούν αντιπροσωπευτικό δείγμα από τις ρίζες των βολβών που αναπτύχθηκαν στο control (H₂O).

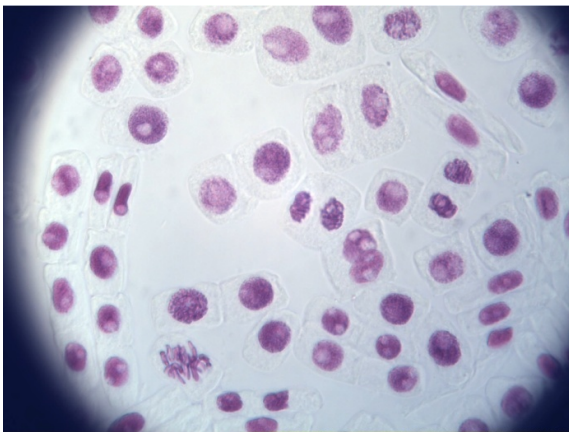
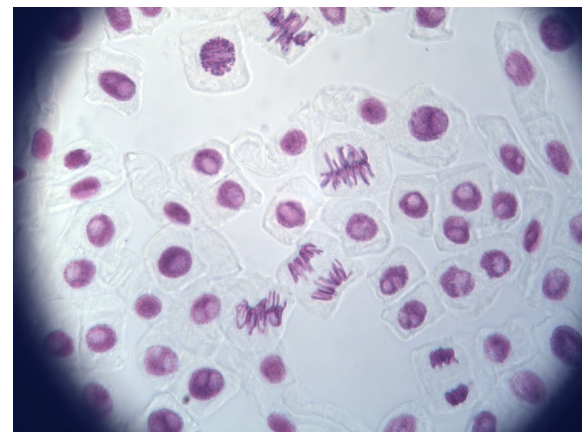
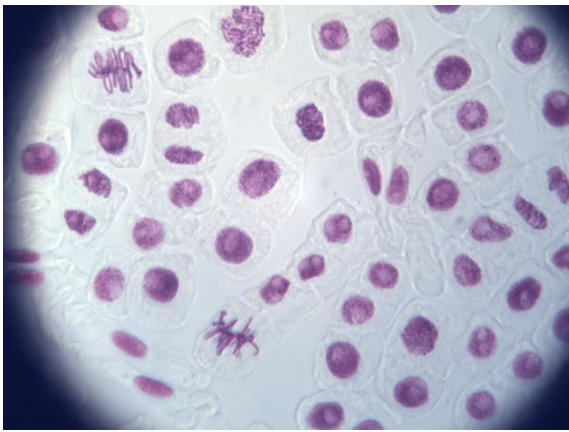
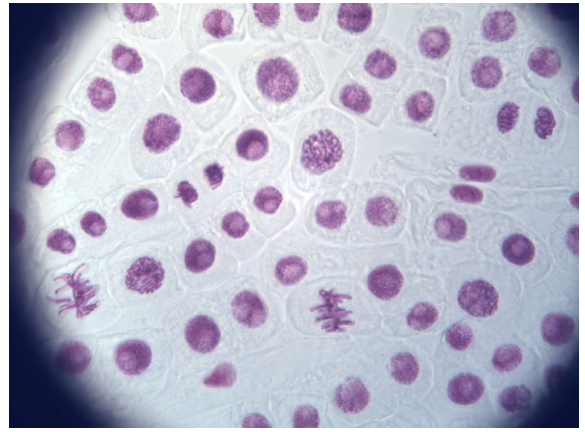
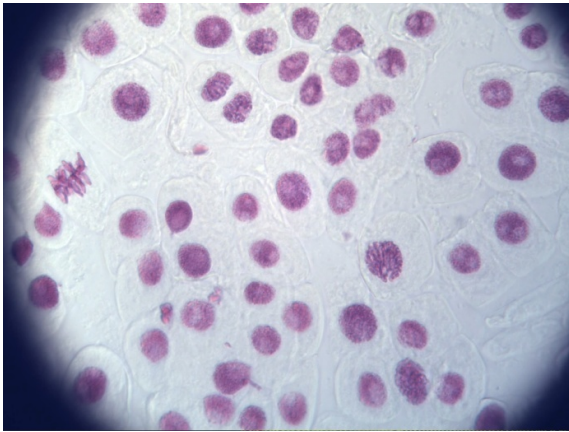


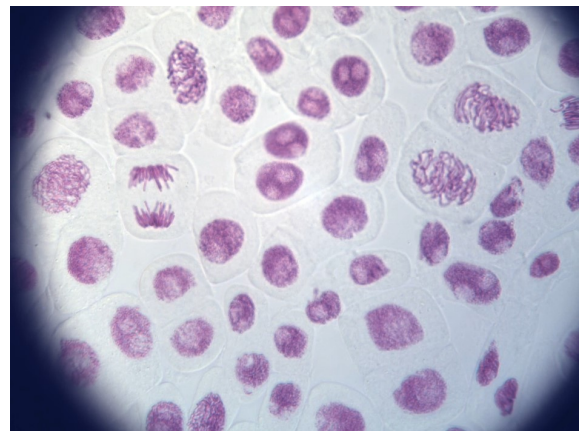
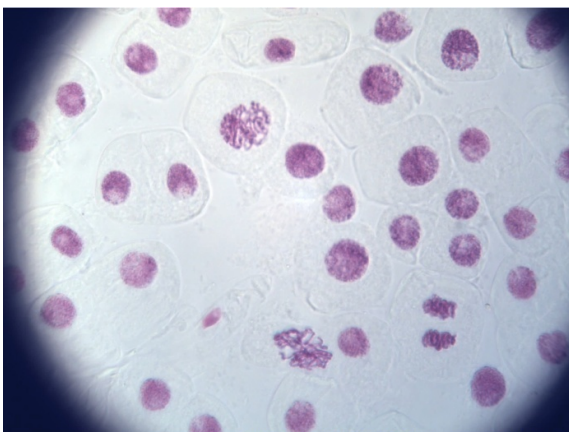
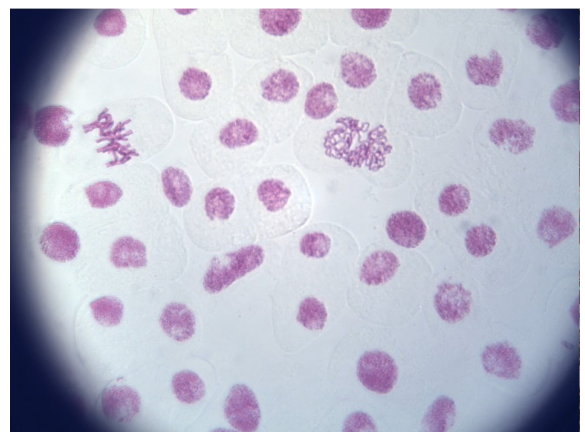
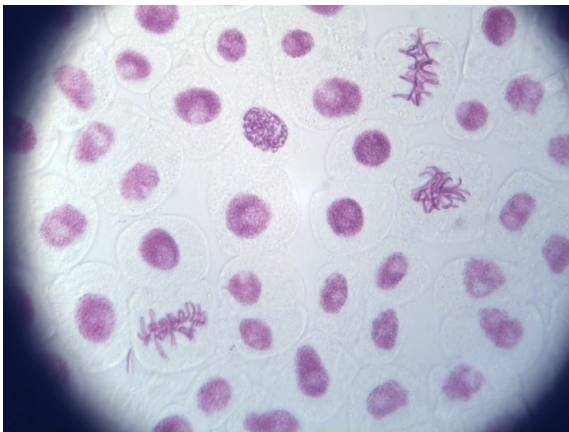
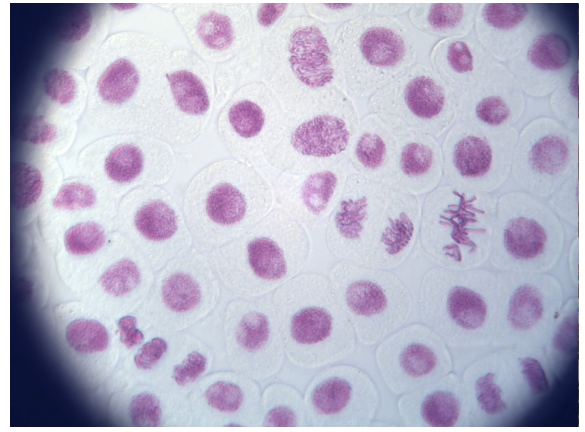
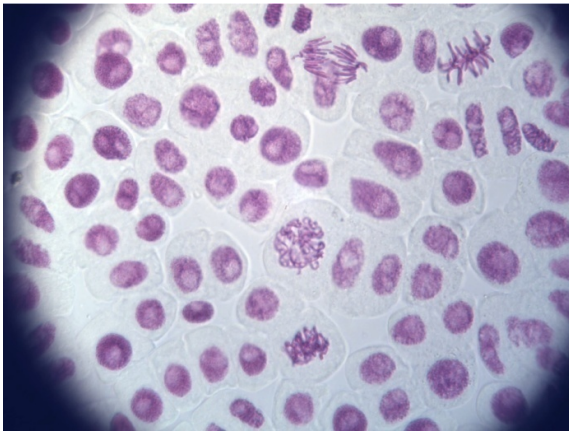




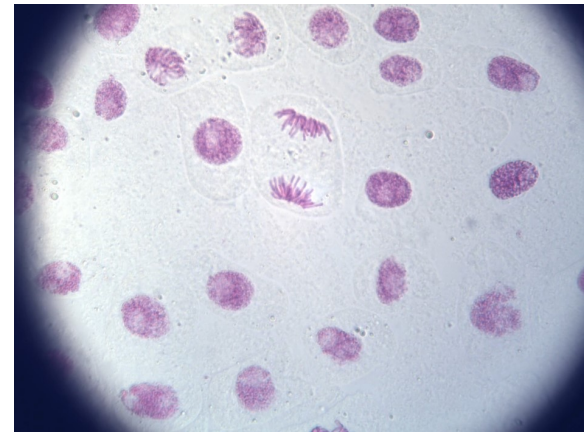
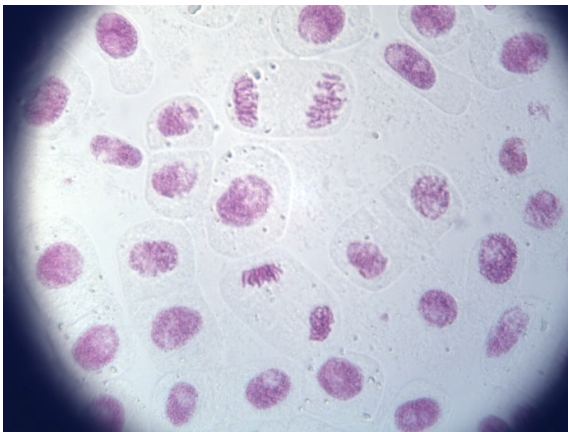
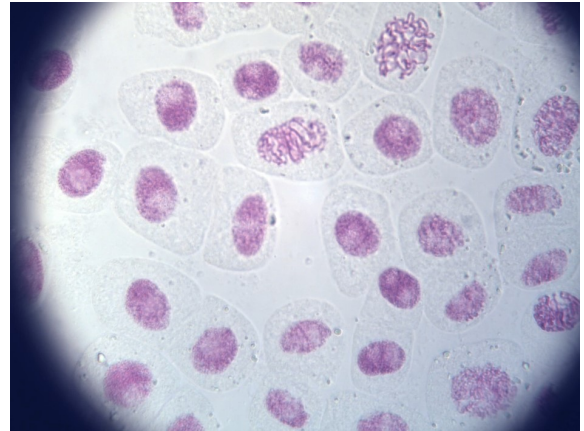
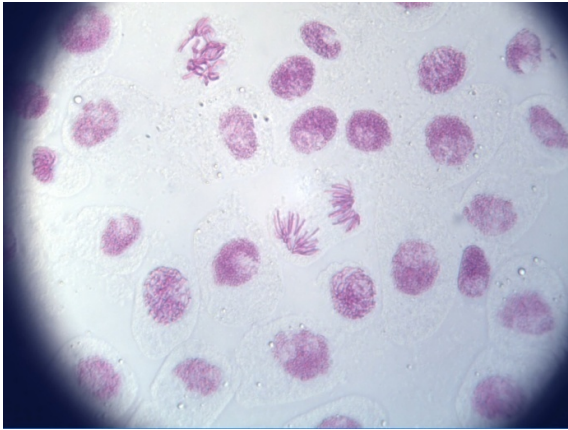


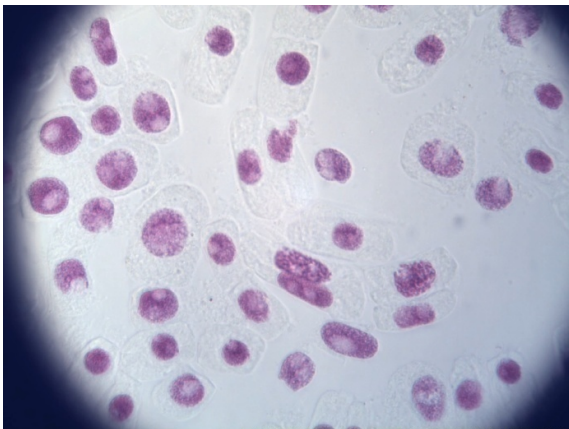
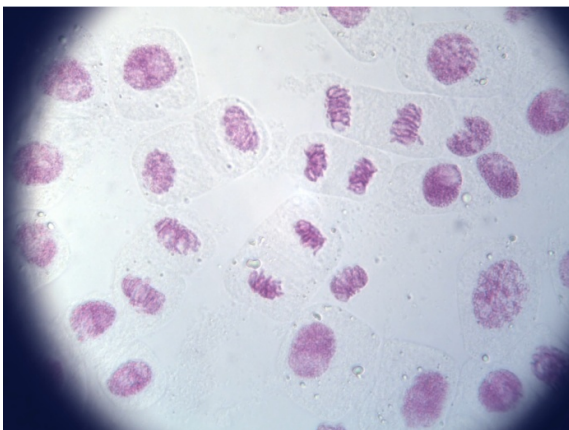
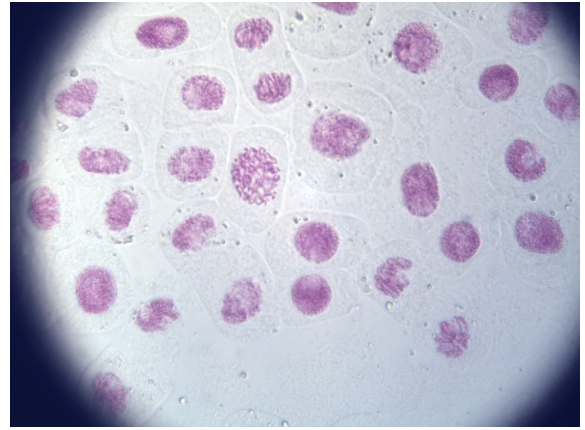
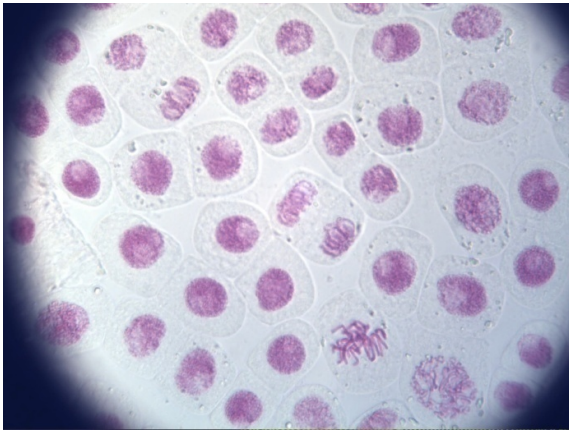


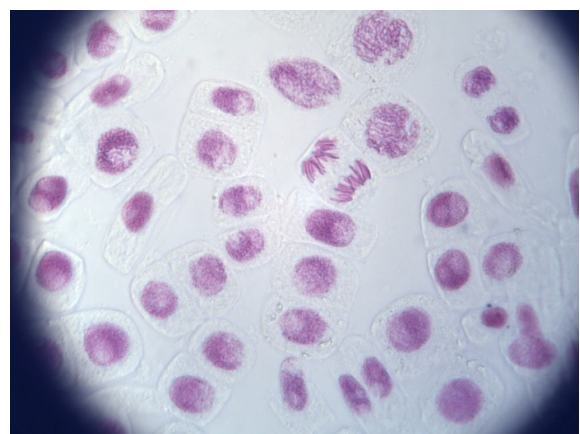
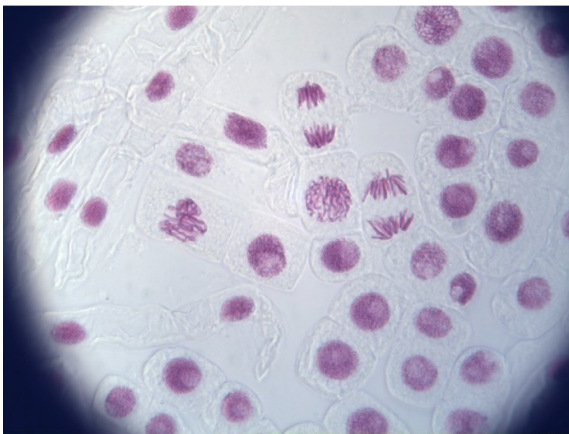
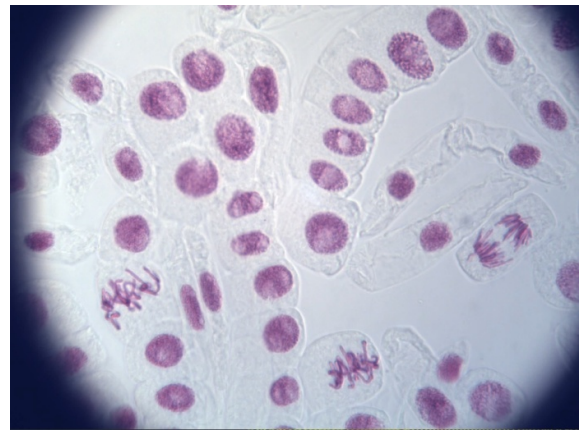
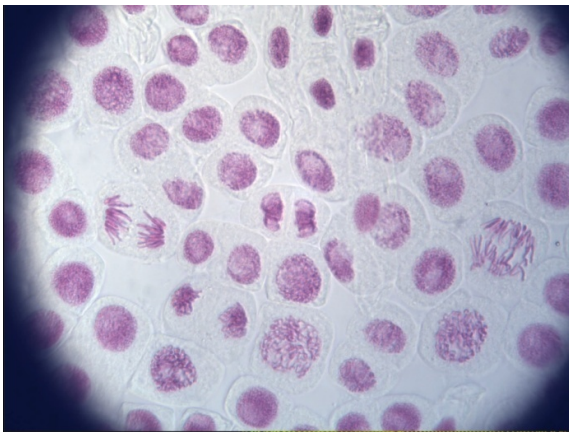
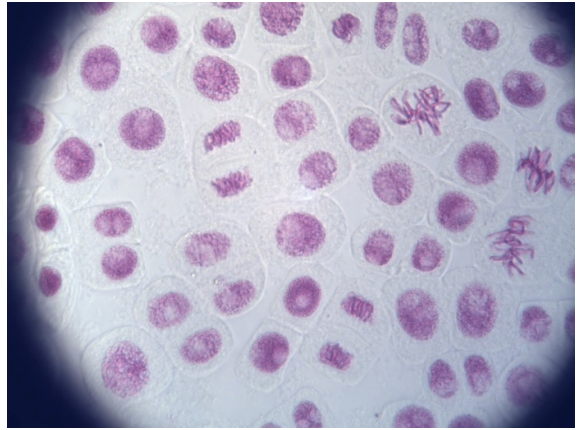
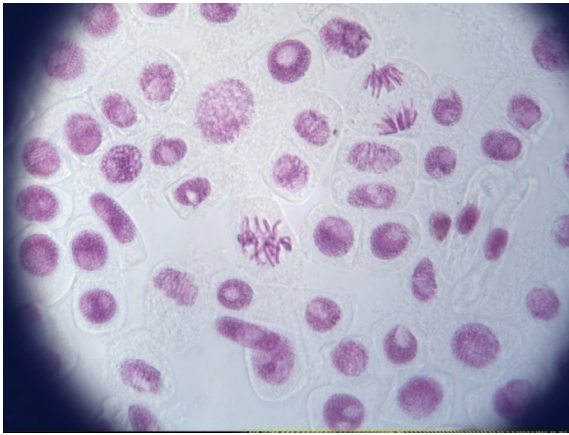


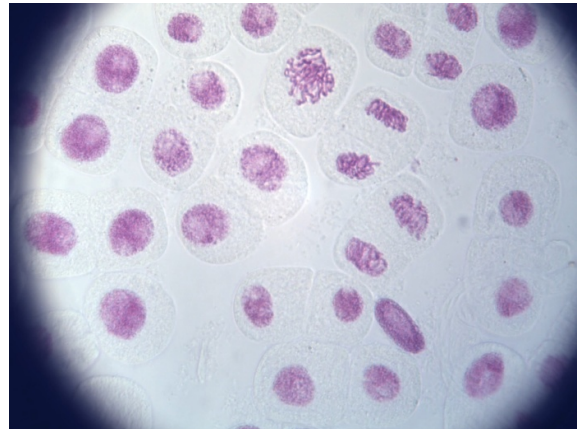
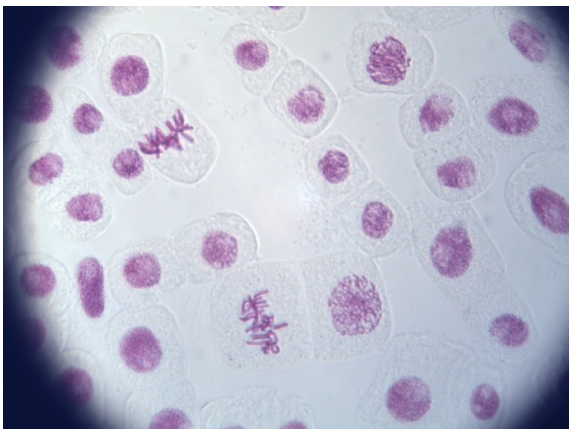
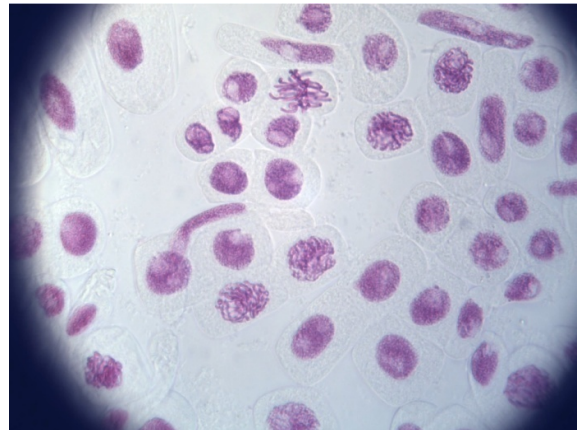
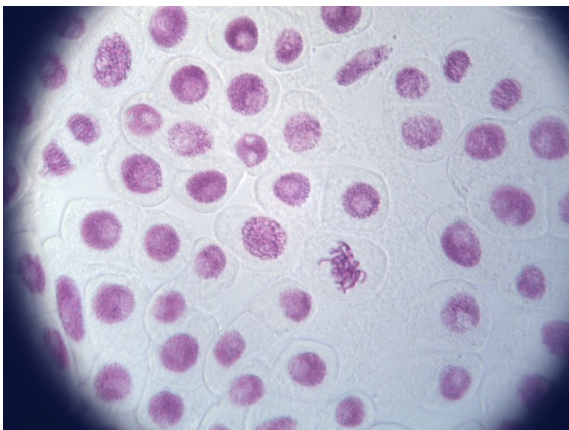
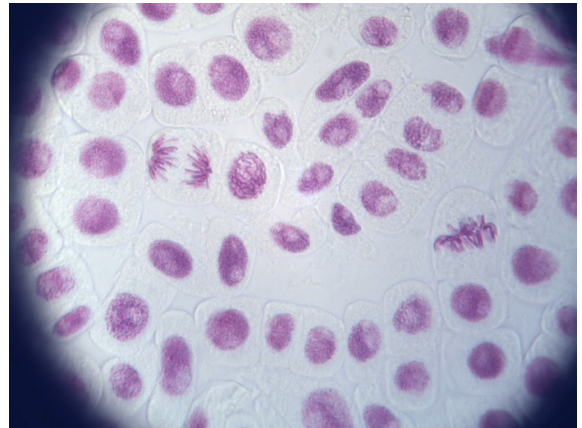
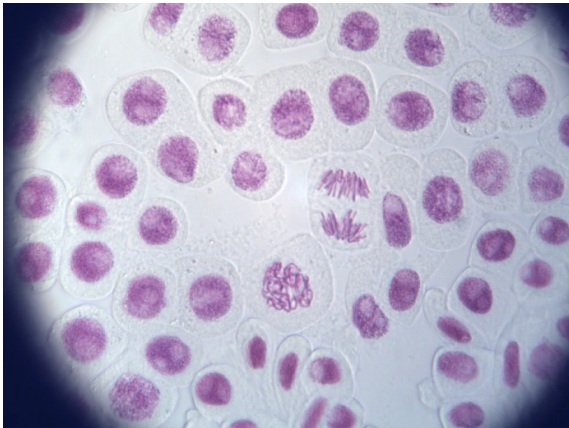


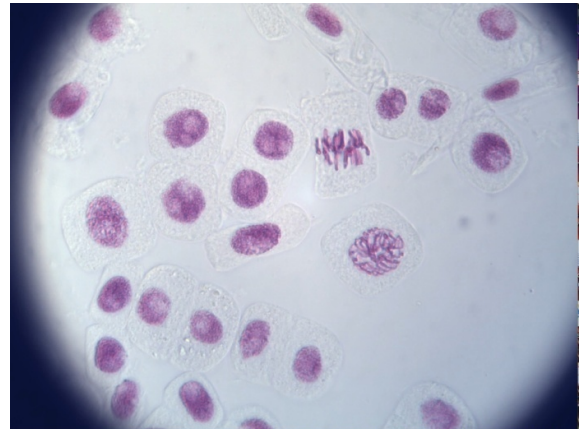
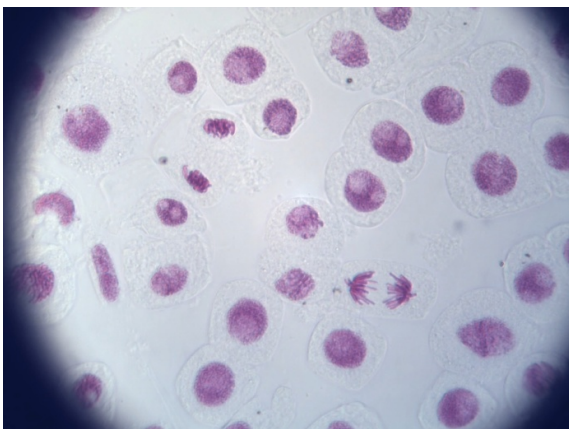
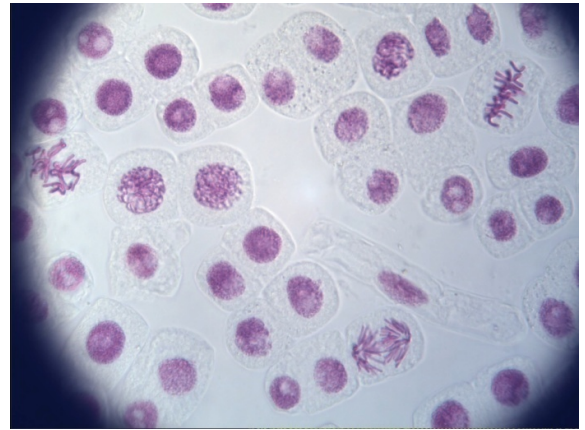
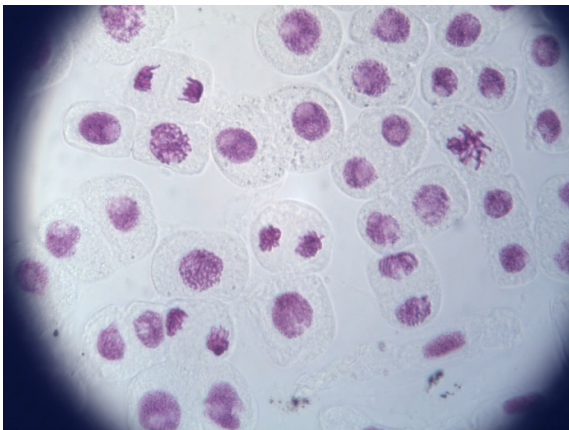
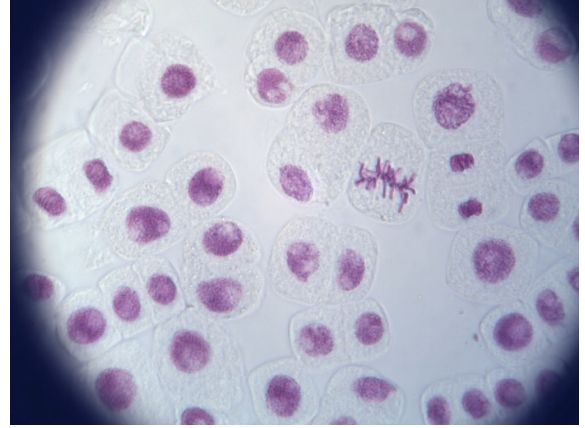
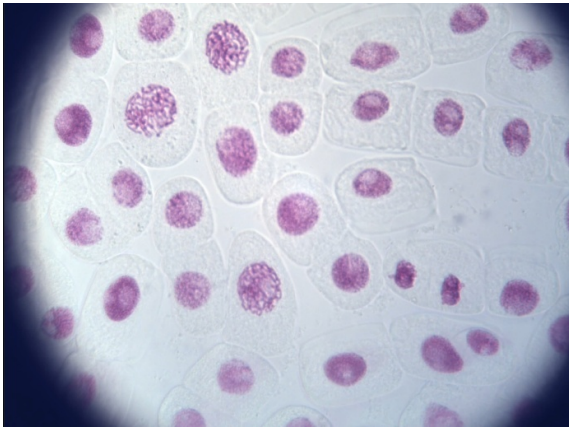
Οι παρακάτω εικόνες αποτελούν αντιπροσωπευτικό δείγμα από τις ρίζες των βολβών που αναπτύχθηκαν στο control (Βερμικουλίτης).

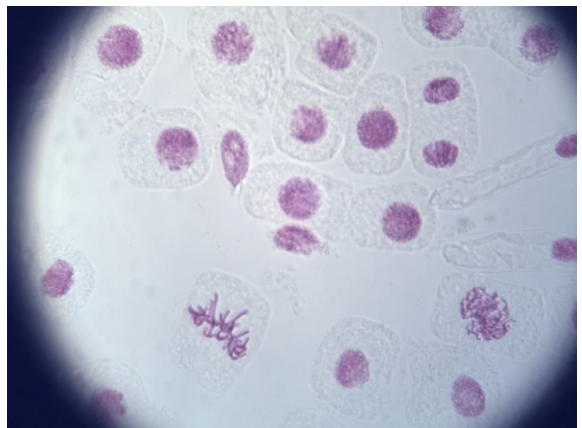
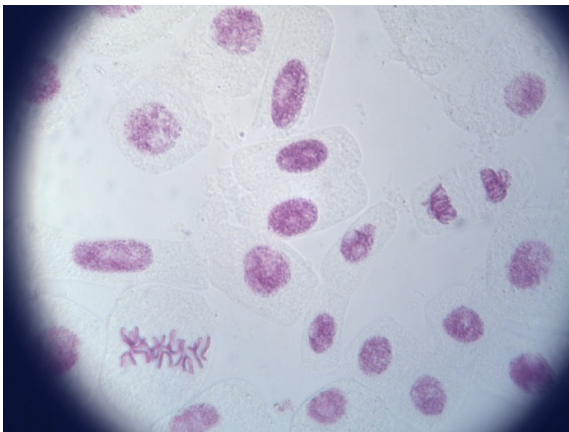
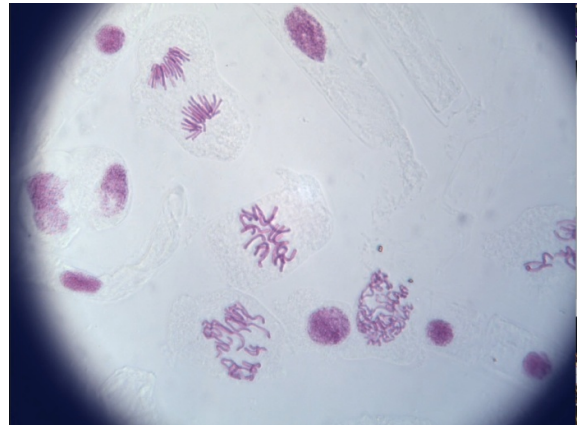
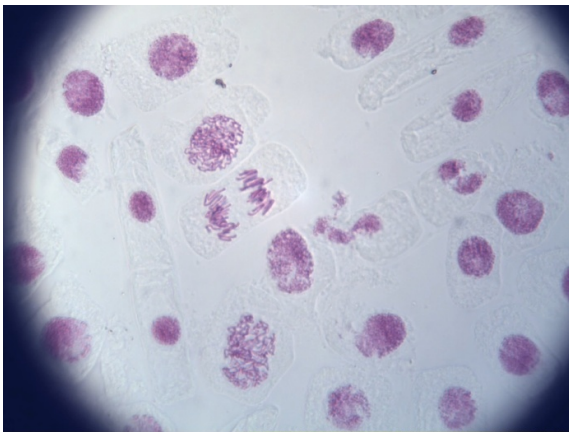
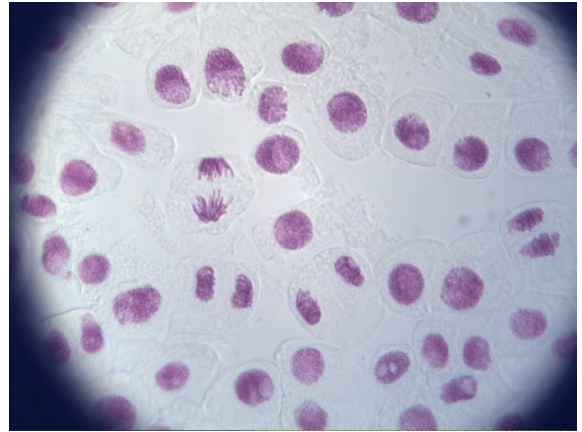
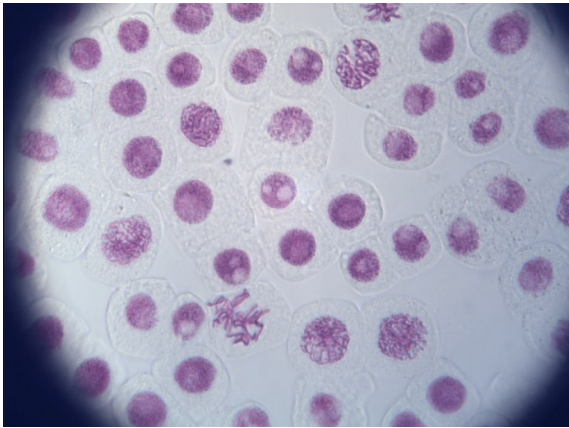


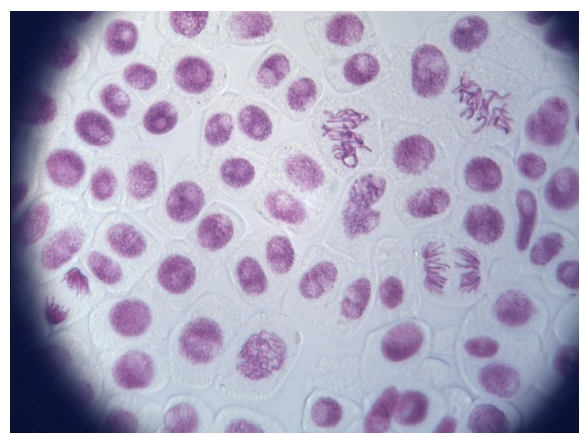
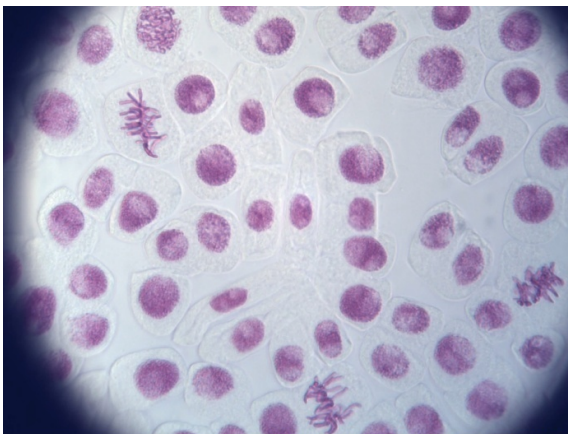
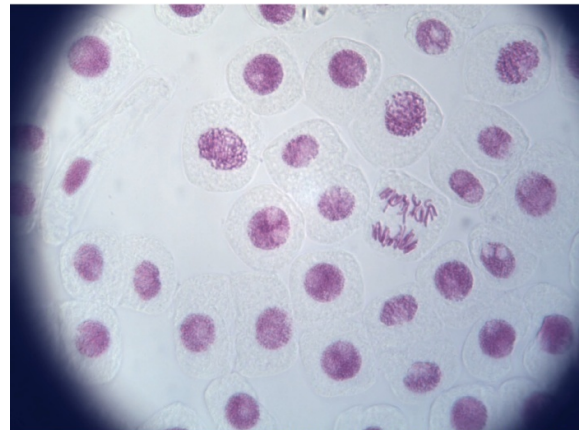
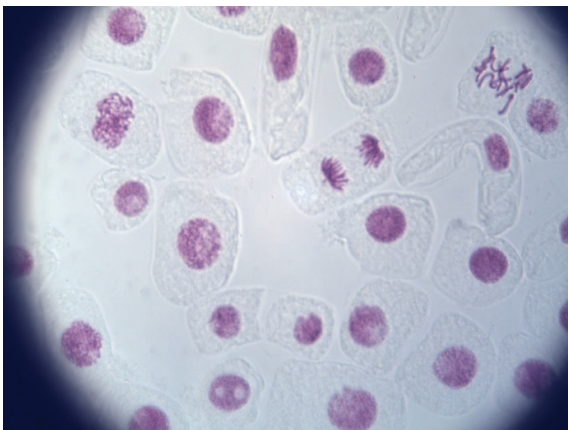
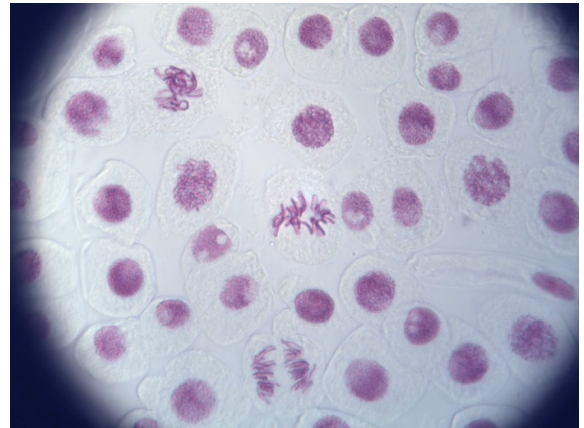
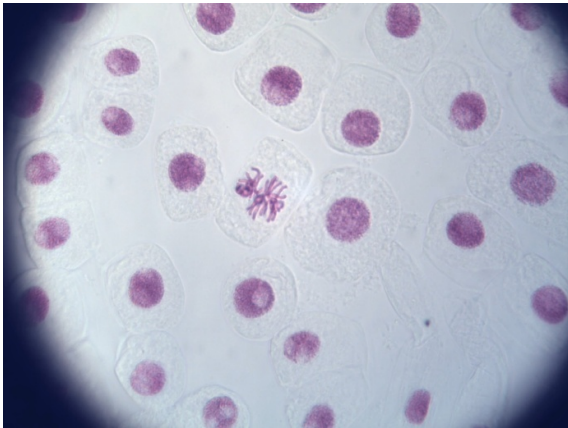




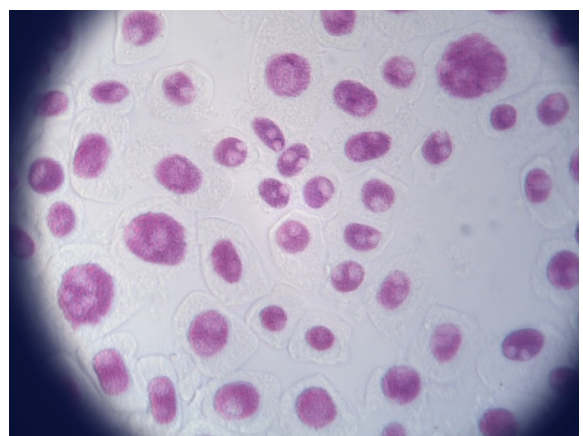
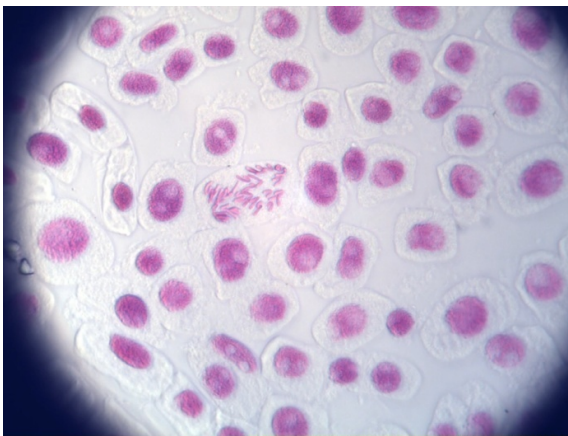
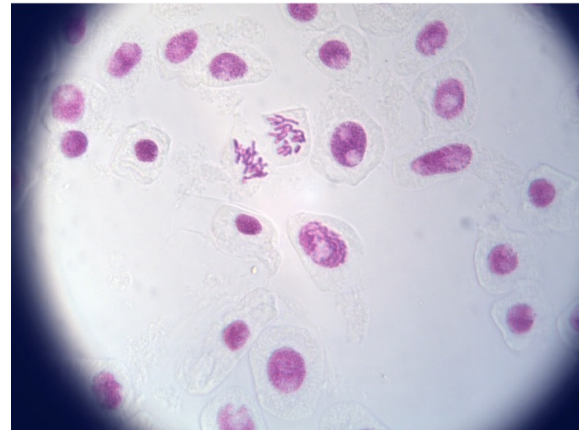
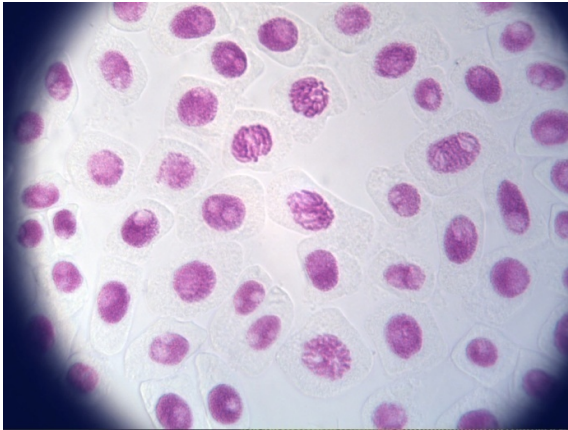


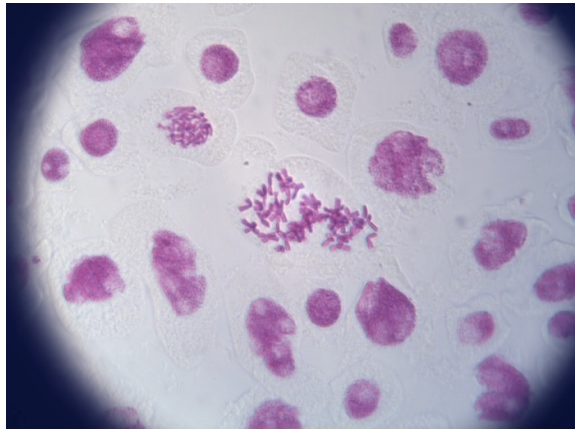
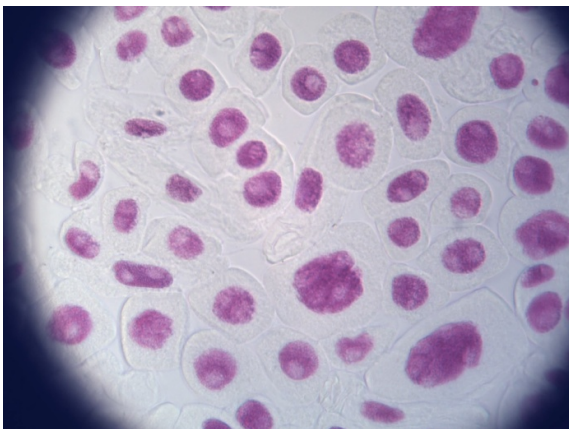
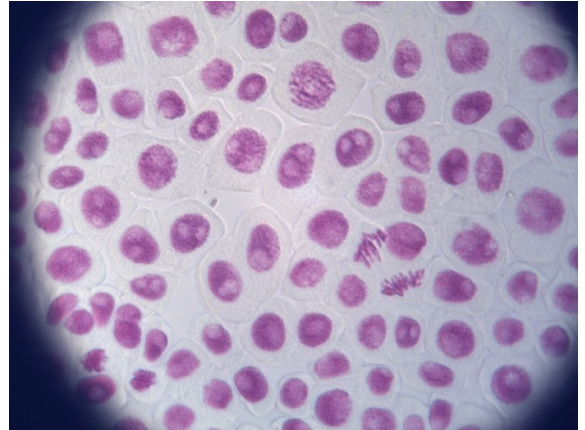
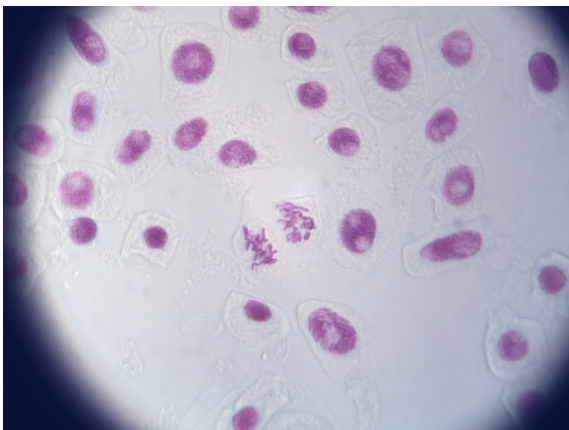
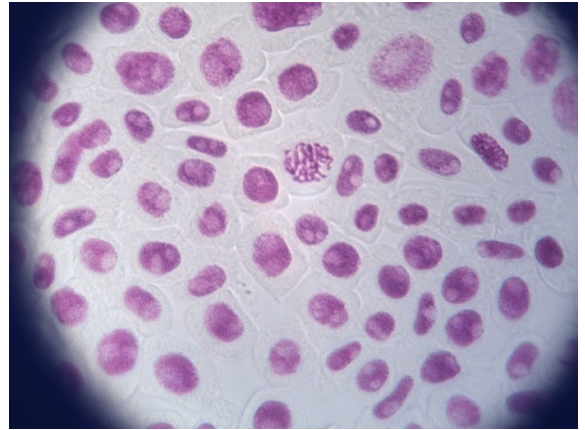
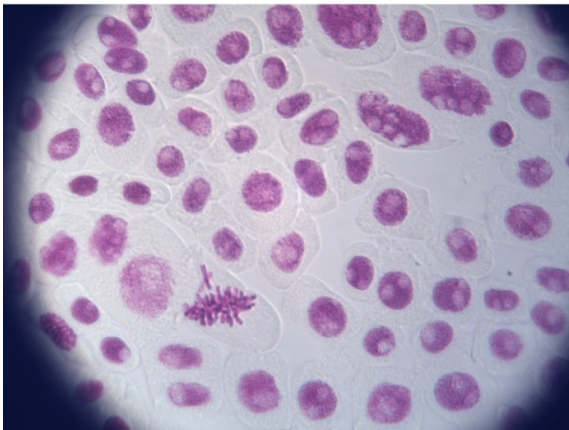


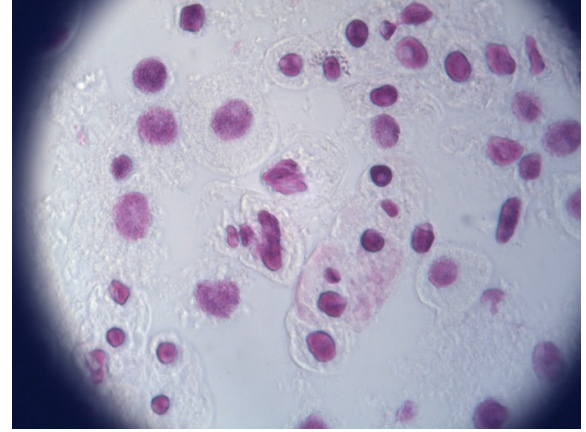
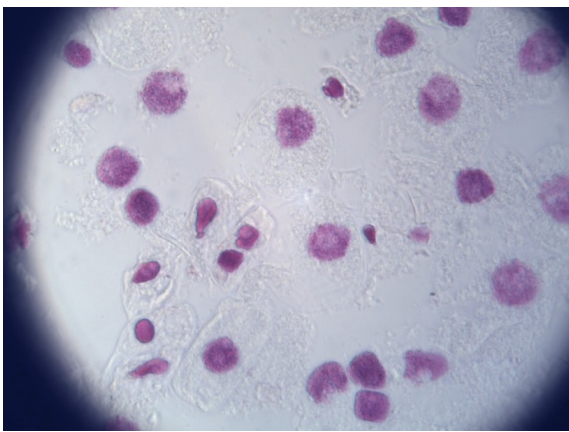
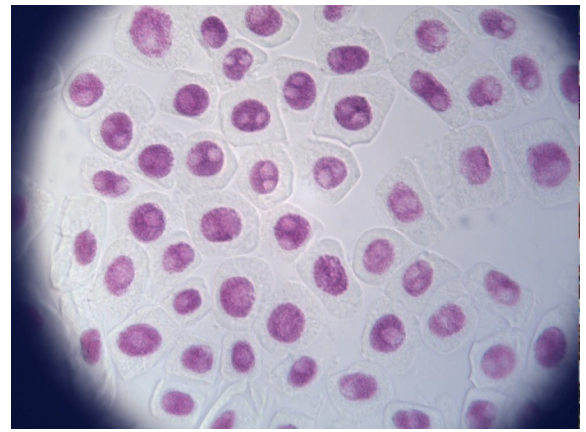
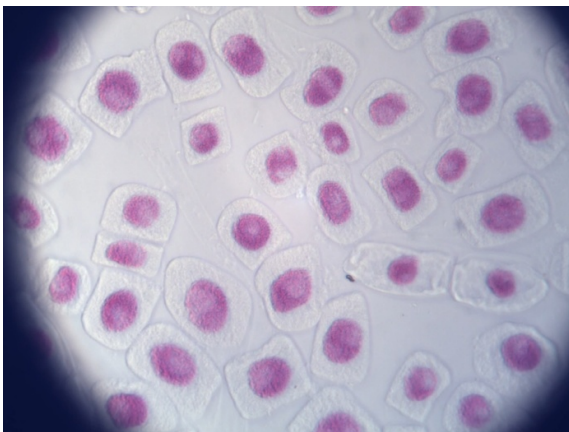
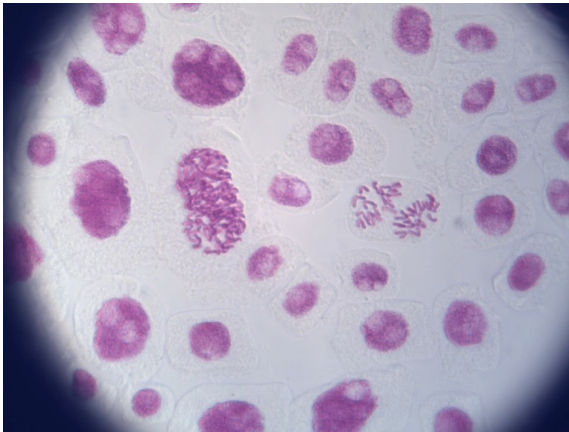


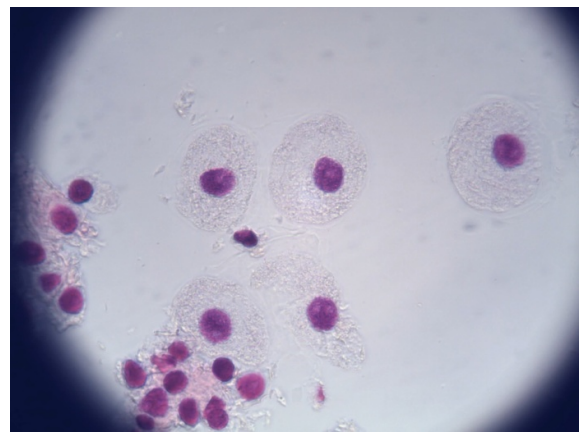
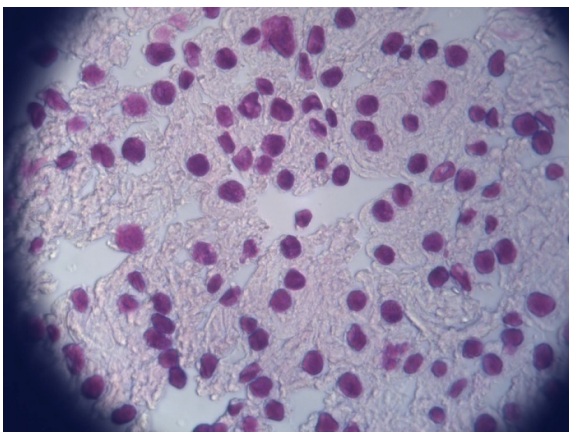
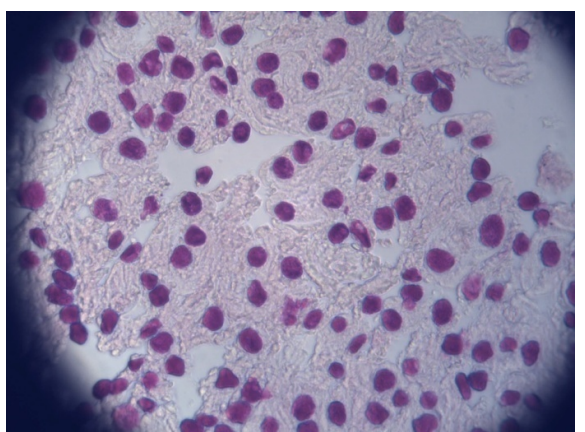
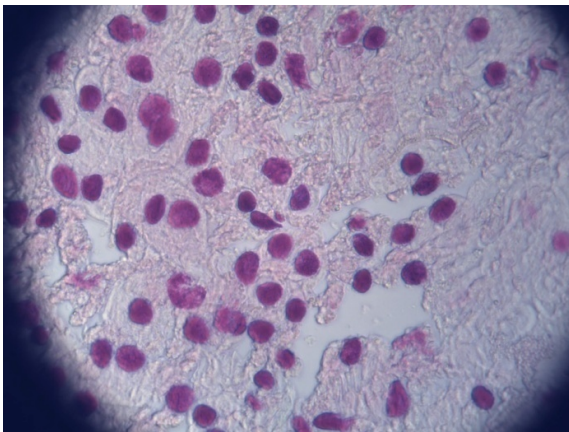
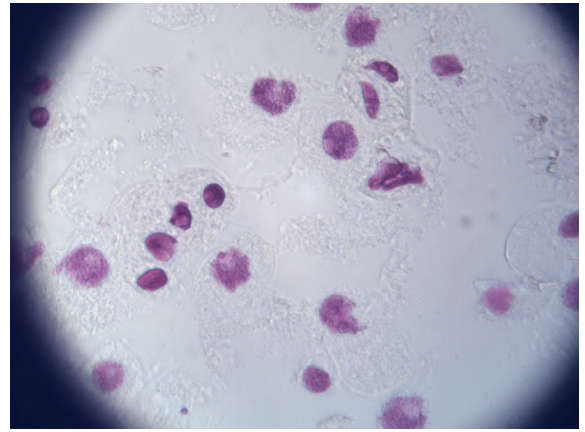
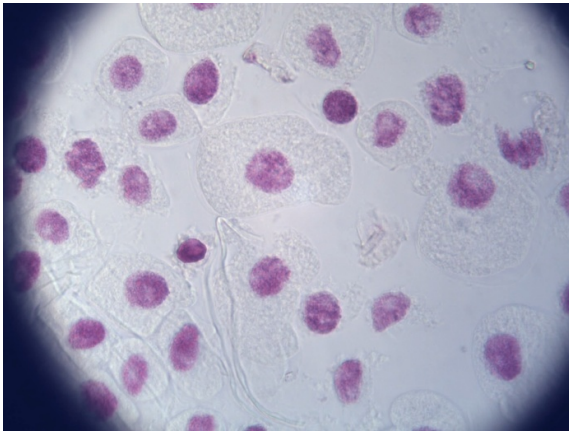


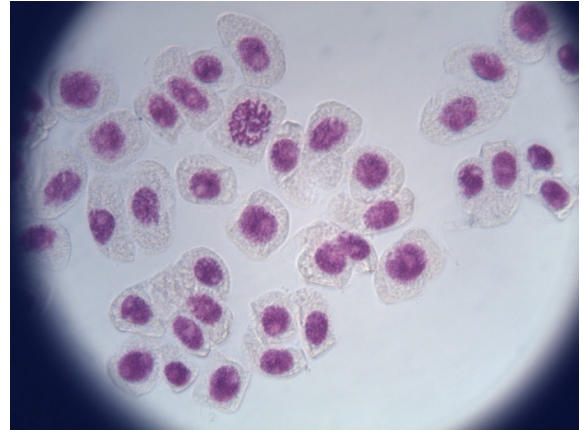
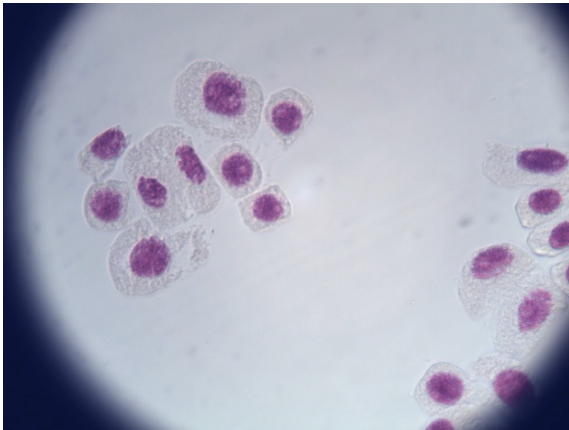
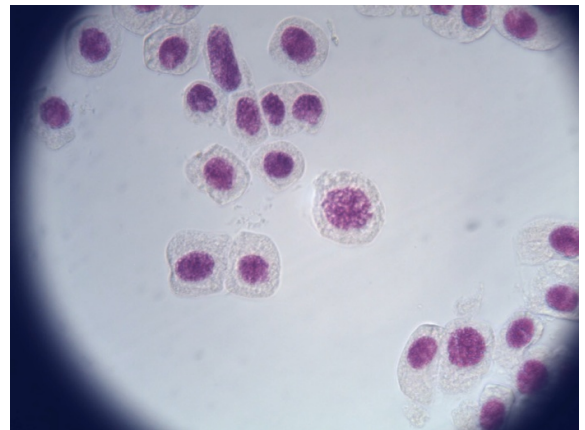
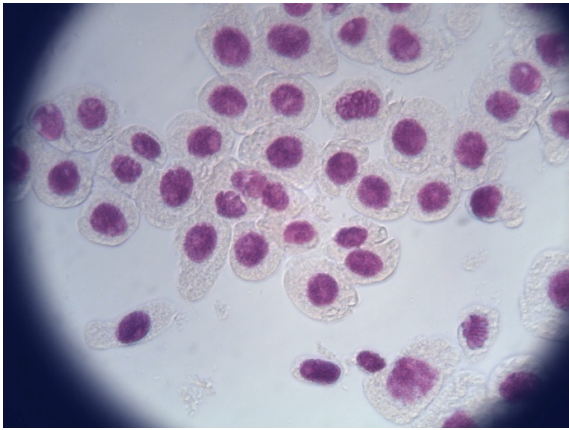
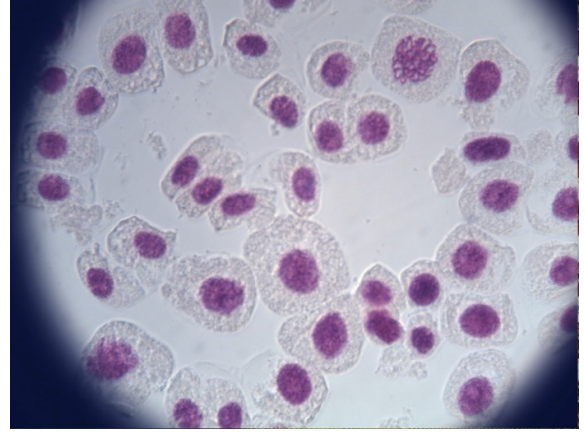
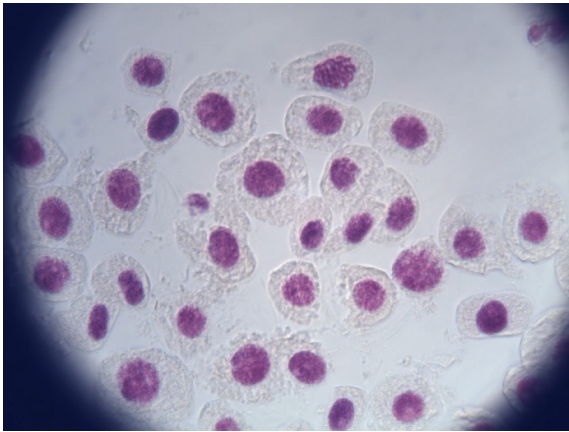
Οι παρακάτω εικόνες αποτελούν αντιπροσωπευτικό δείγμα από τις ρίζες των βολβών που αναπτύχθηκαν στο δείγμα ιλύος της Παμβώτιδας Σ1Κ.

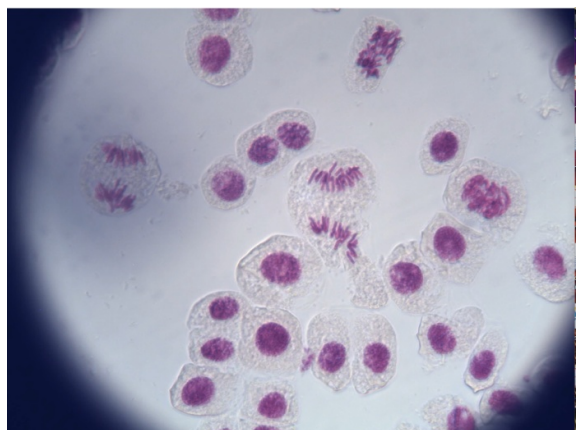
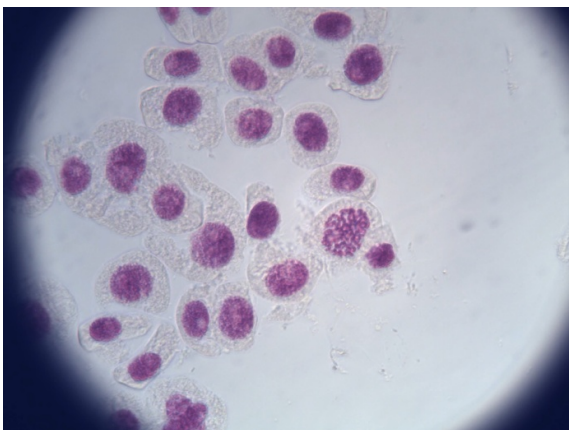
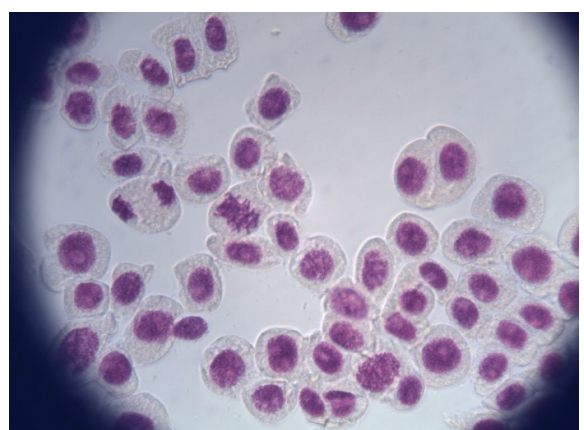
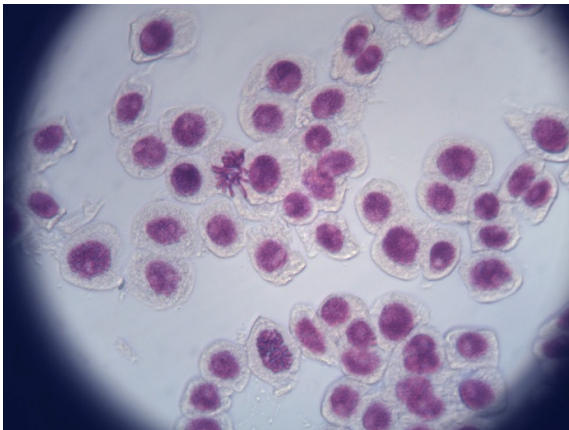
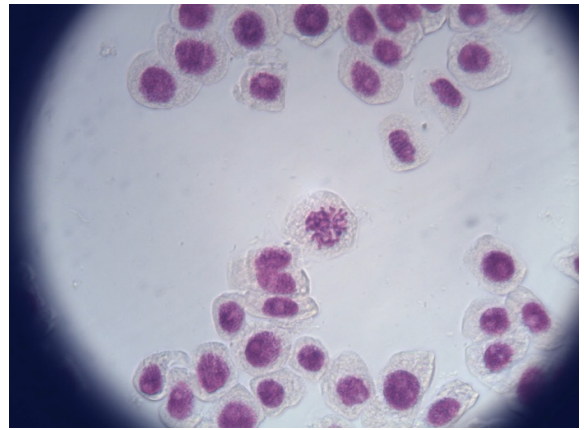
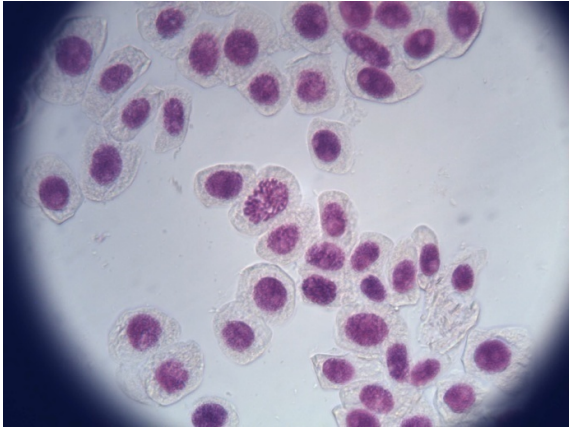


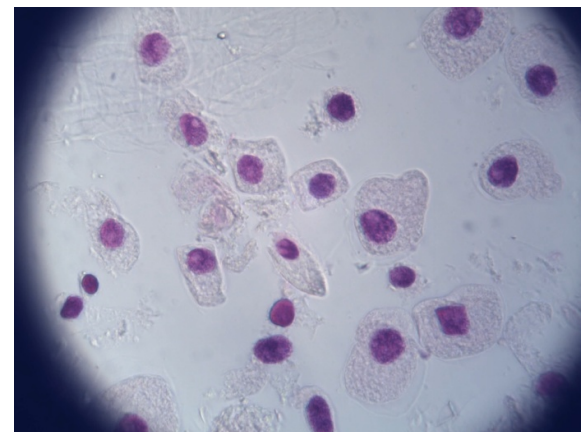
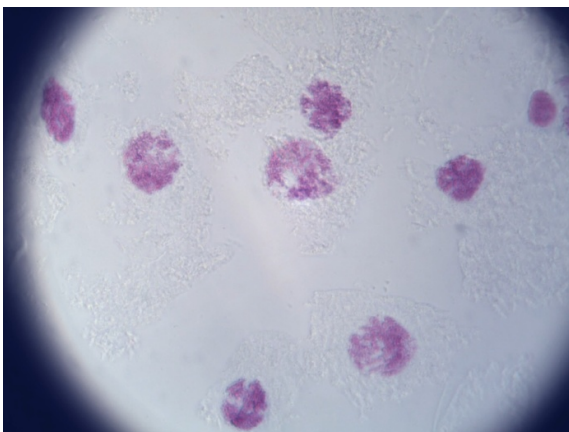
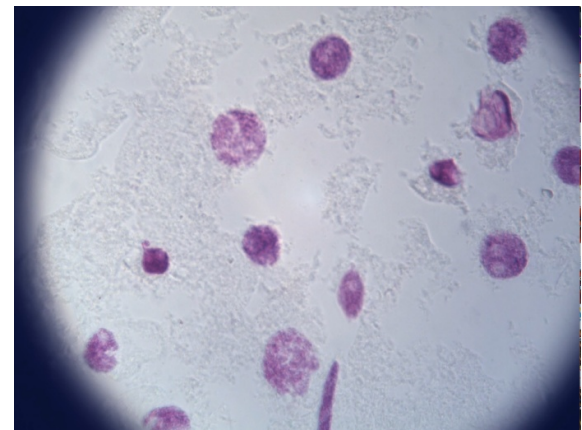
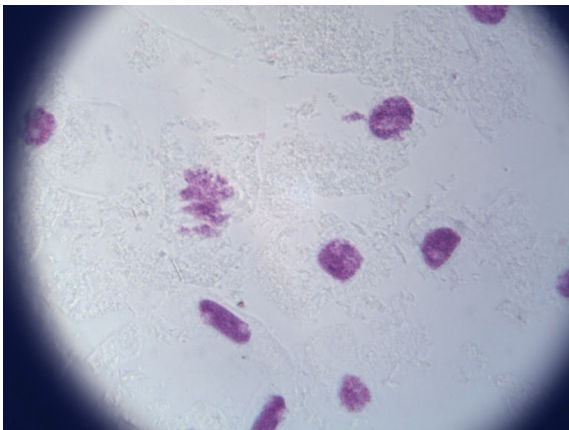
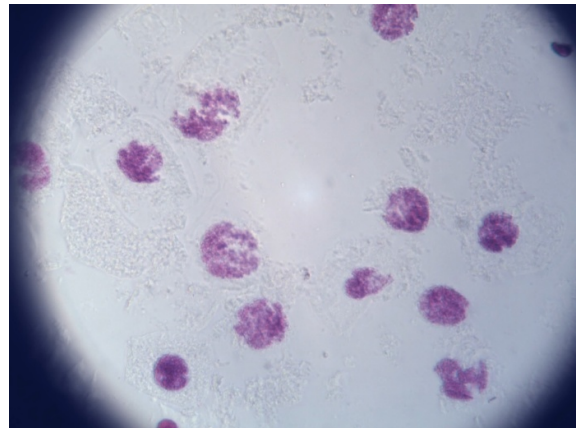
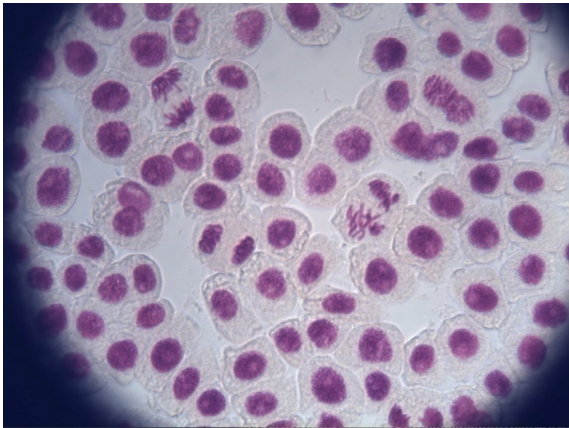




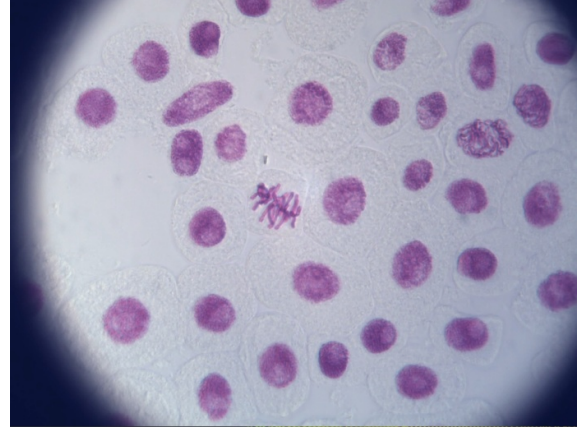
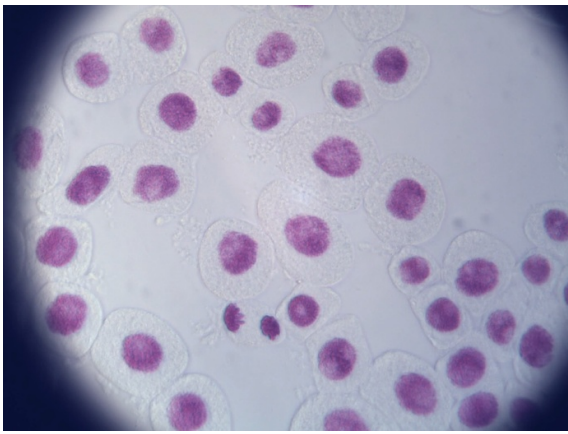
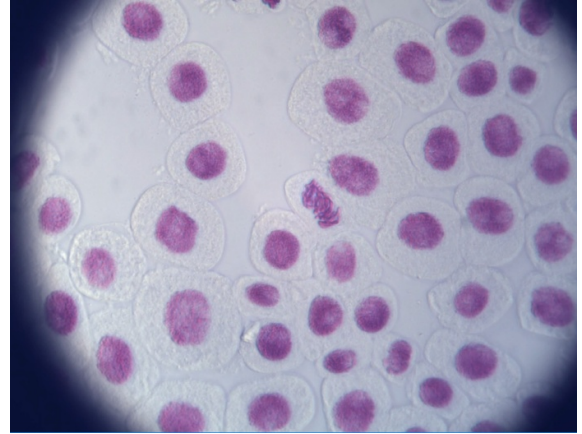
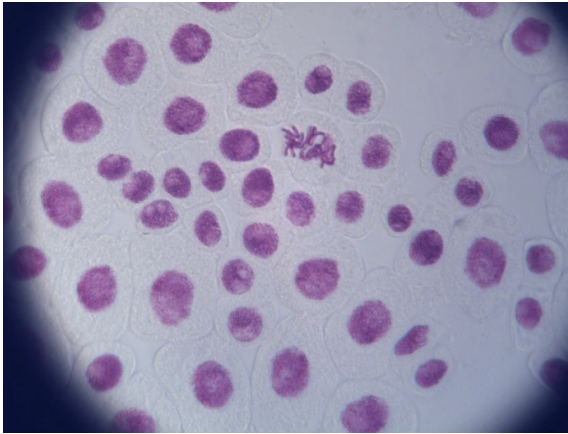


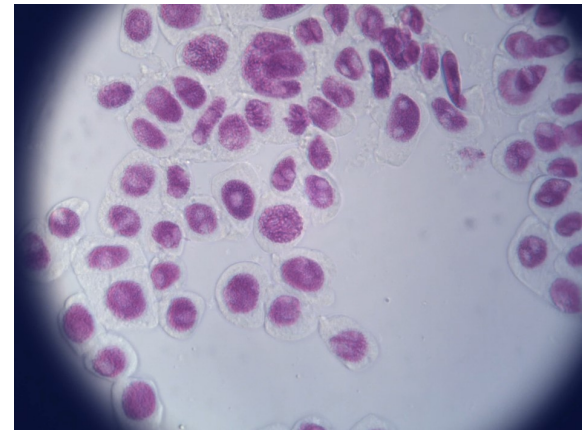
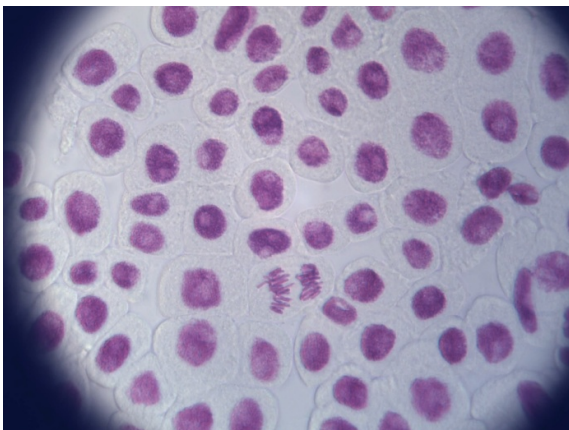
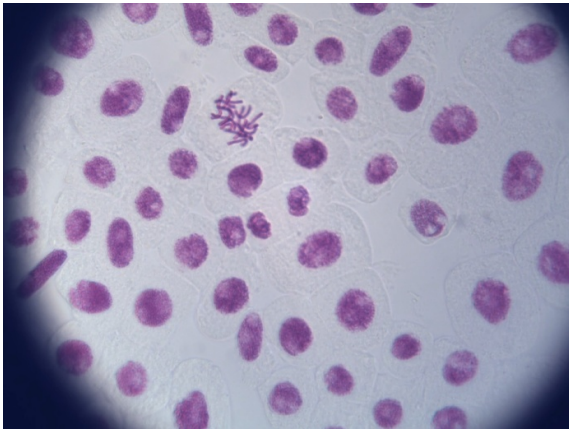
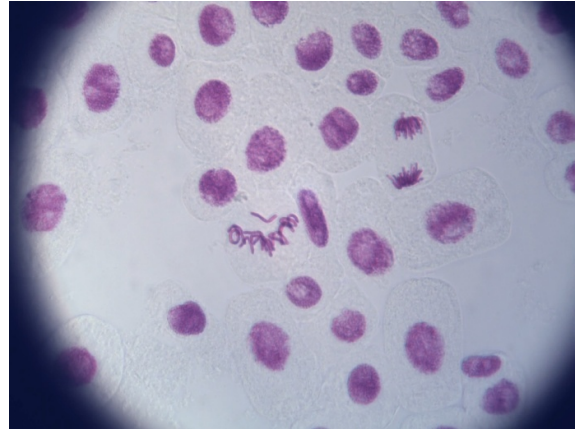
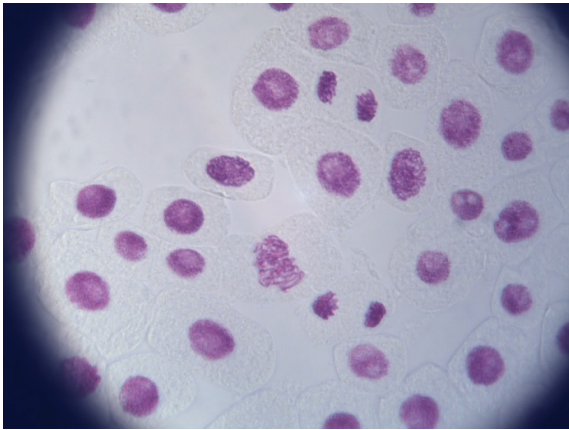


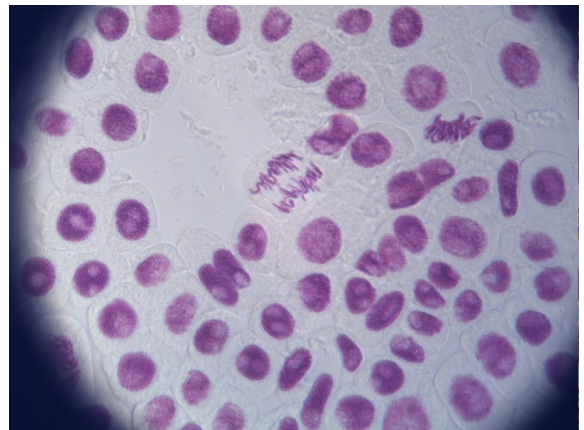
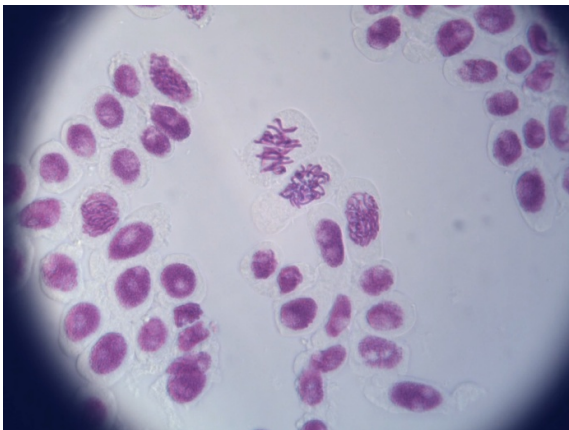
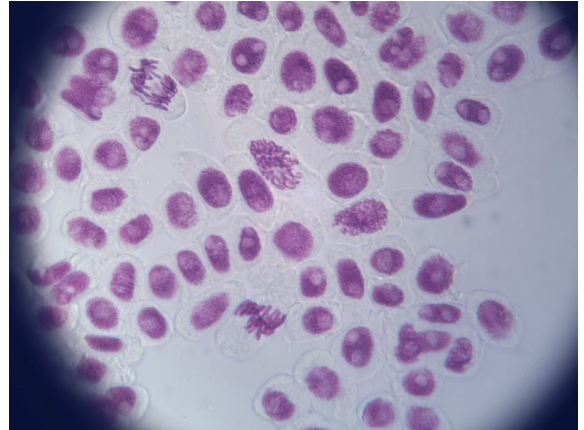
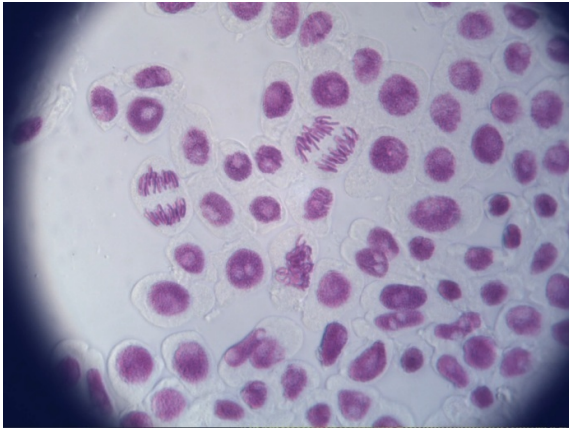
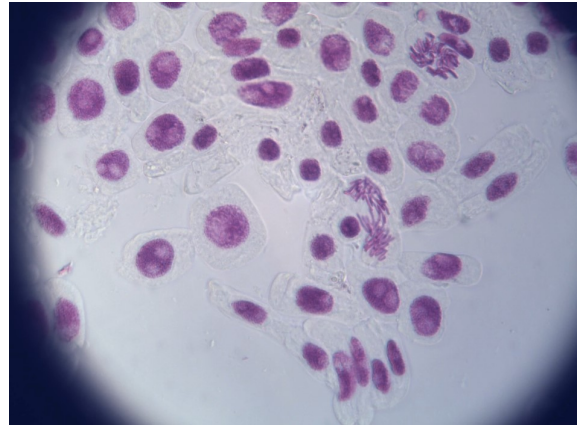
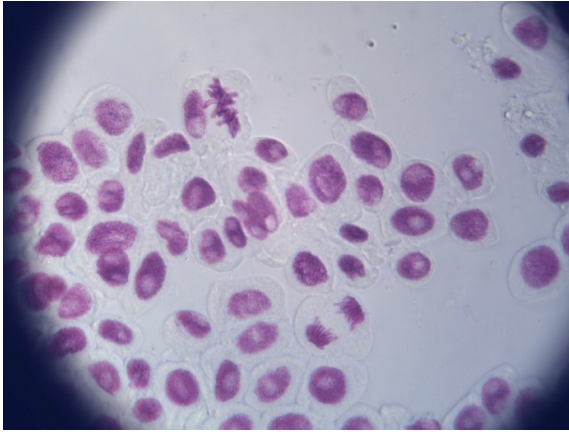


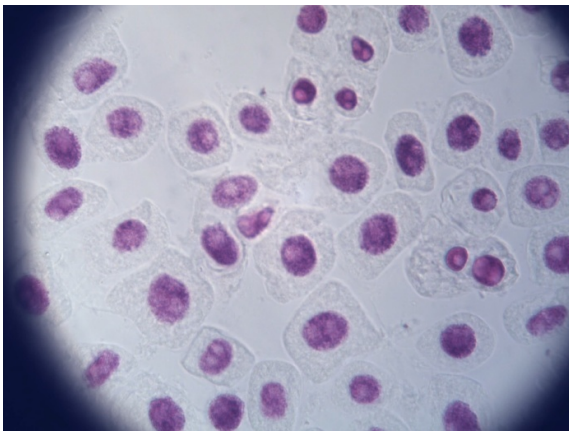
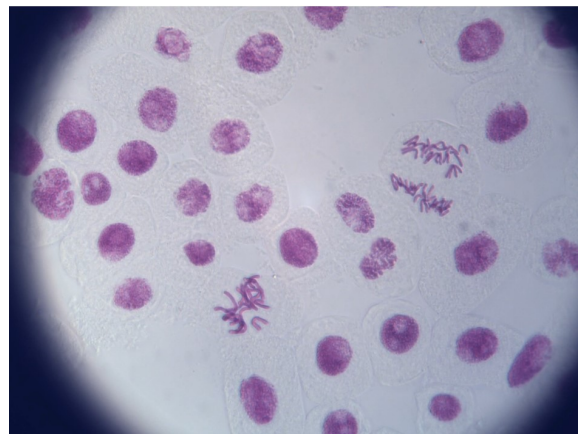
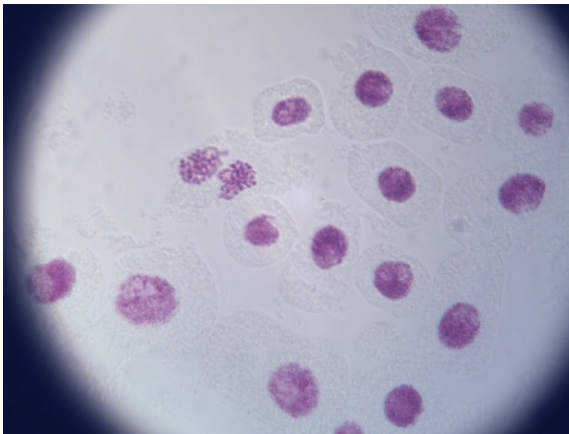
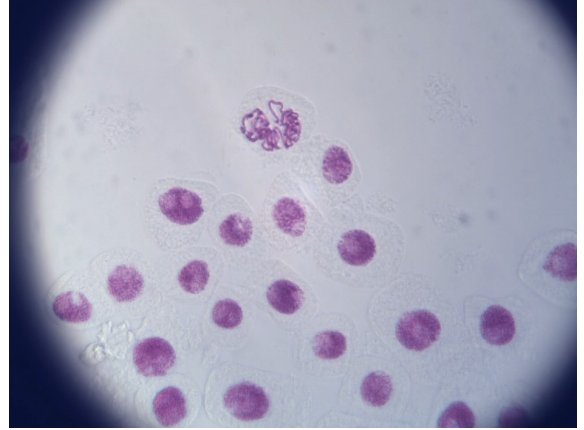
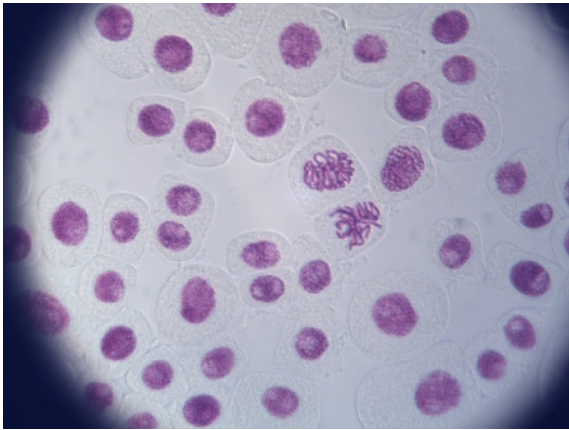


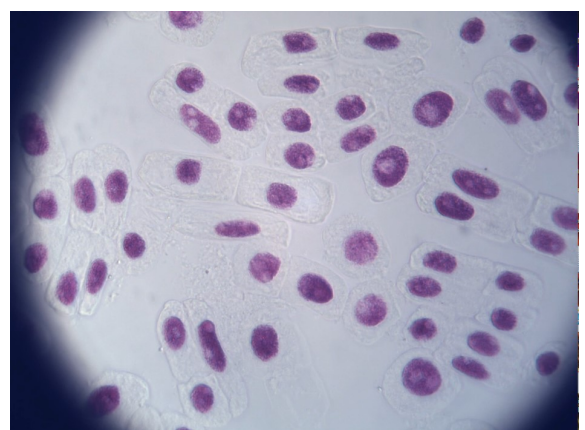
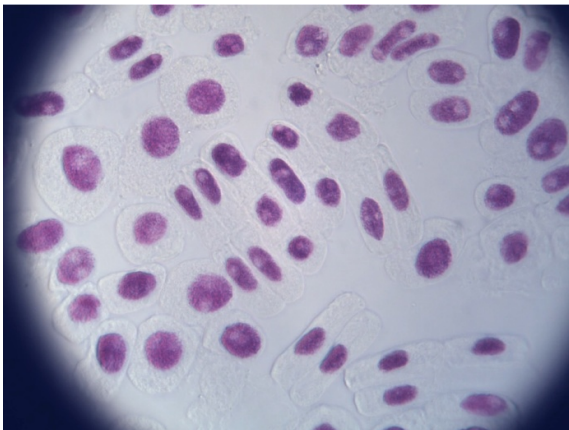
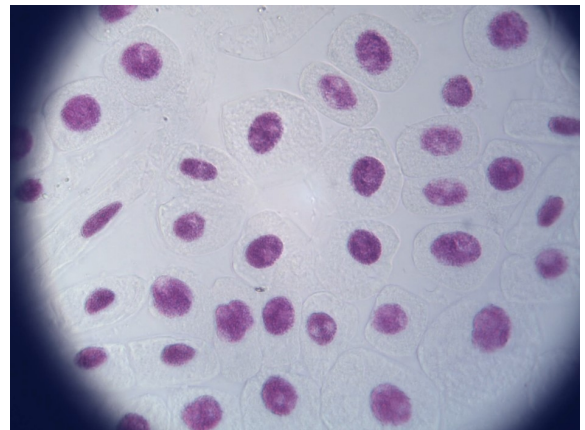
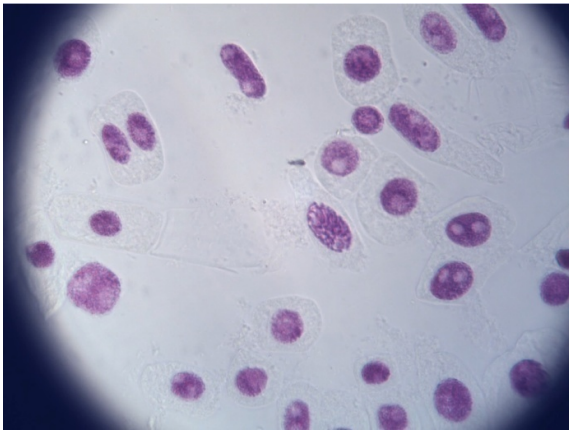
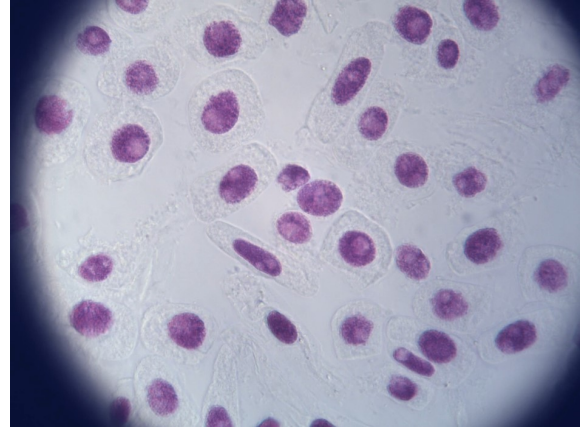
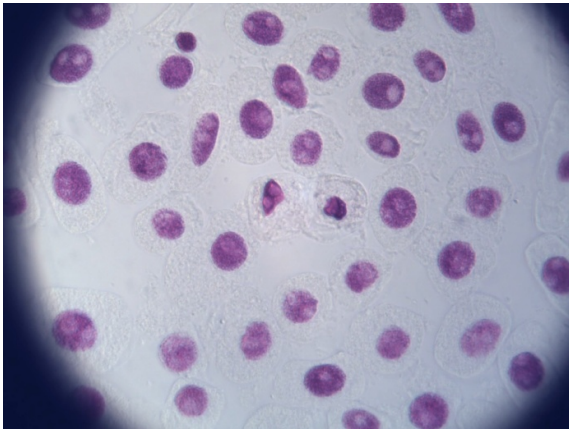
Οι παρακάτω εικόνες αποτελούν αντιπροσωπευτικό δείγμα από τις ρίζες των βολβών που αναπτύχθηκαν στο δείγμα ιλύος της Παμβώτιδας Σ2Κ.

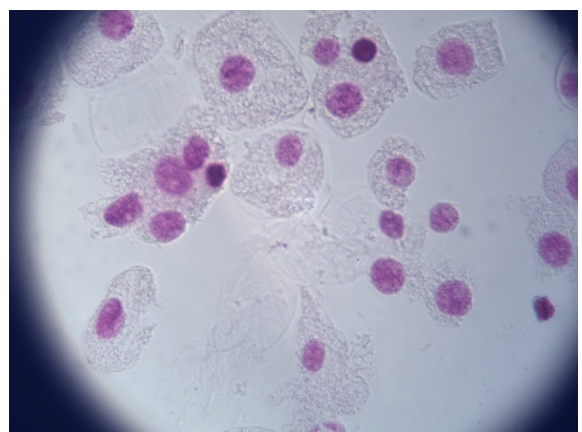
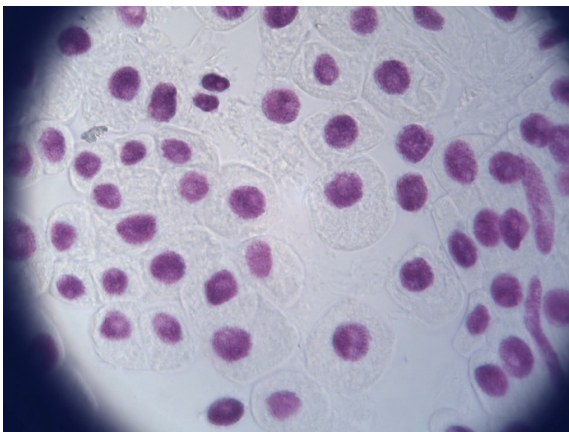
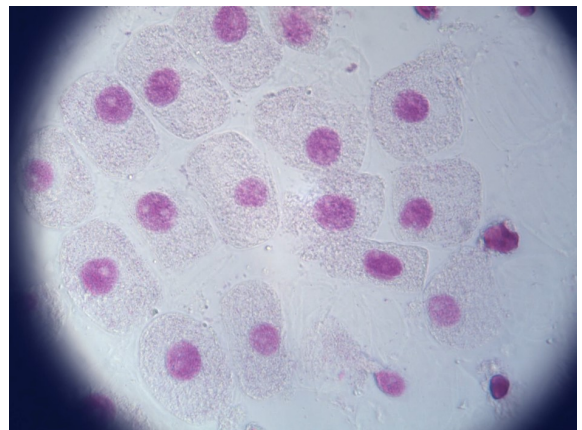
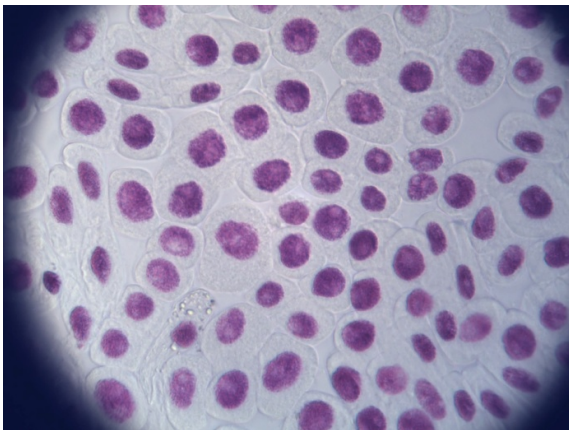
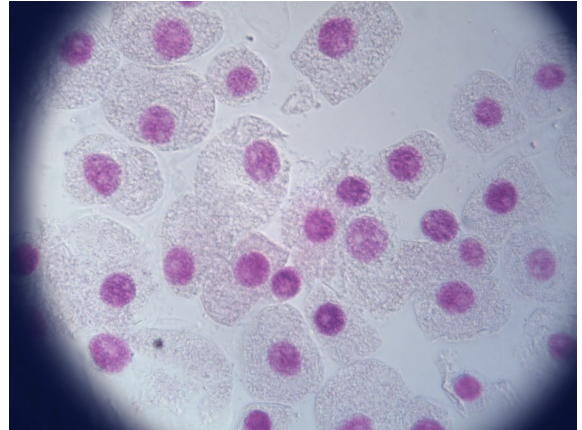
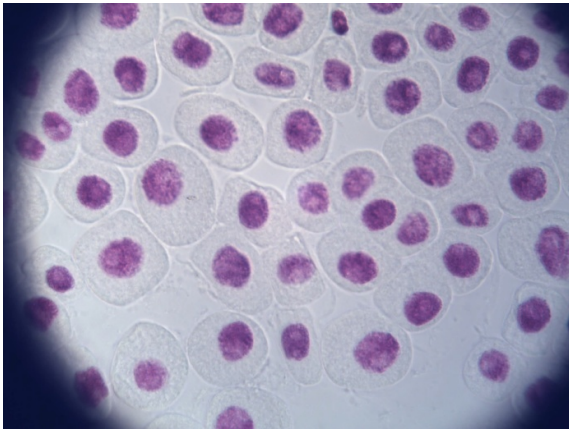


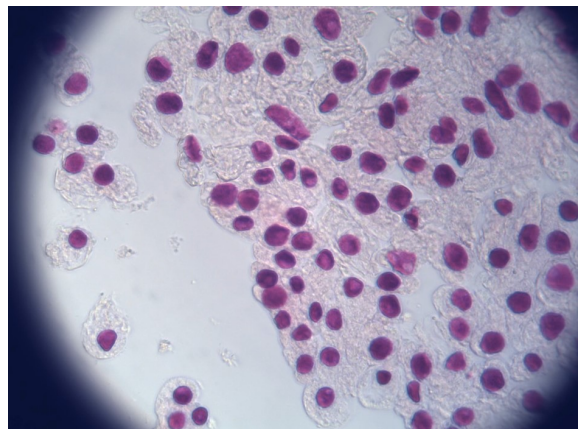
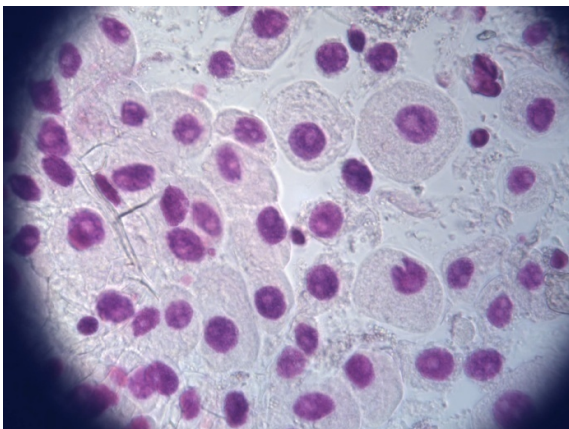
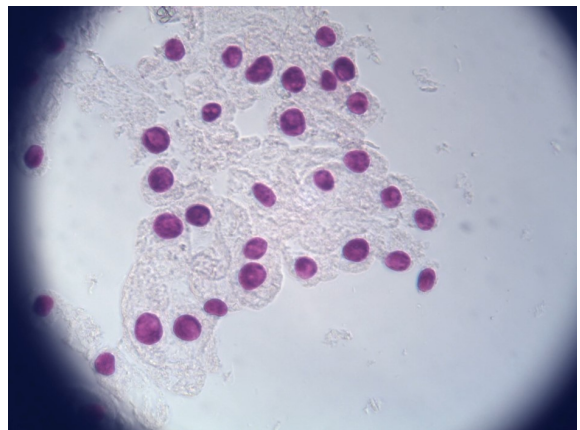
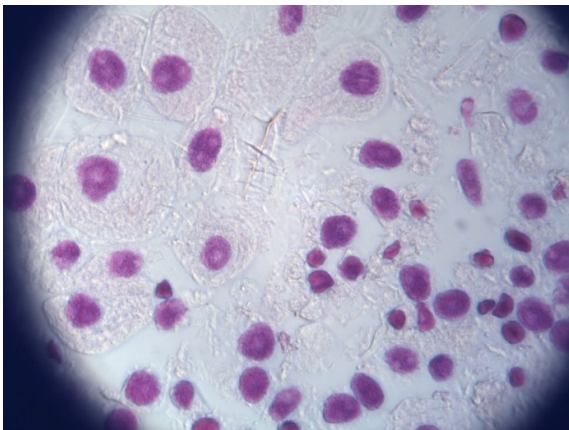
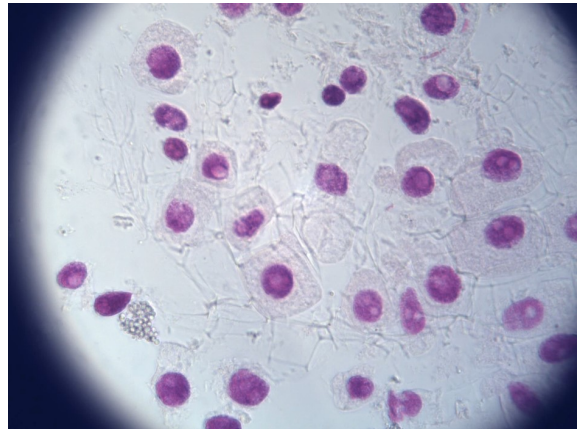
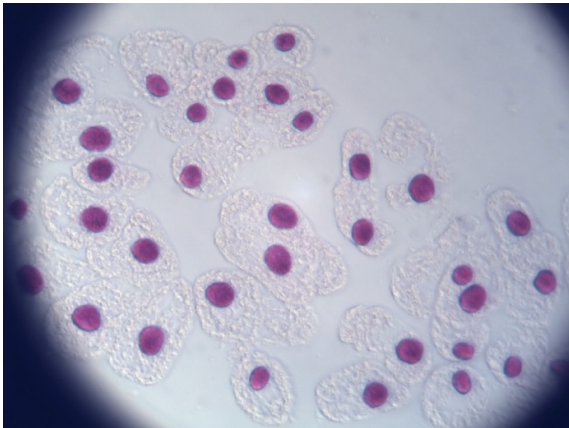




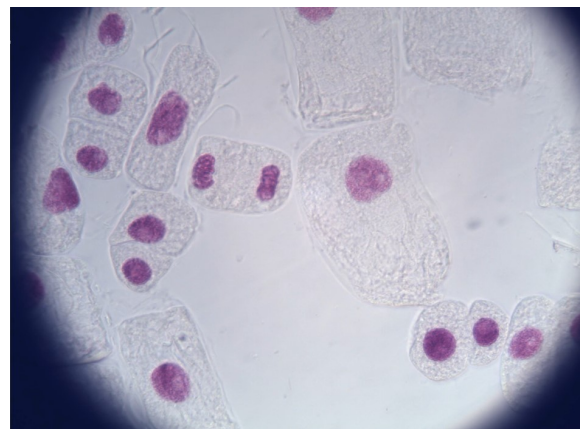
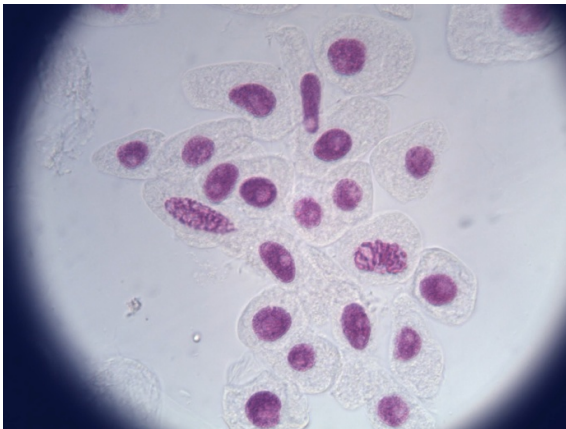
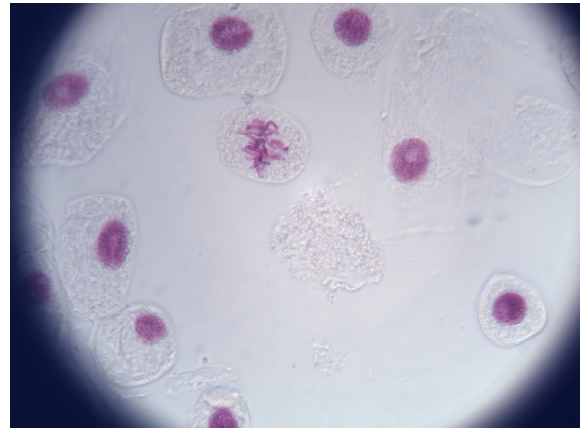
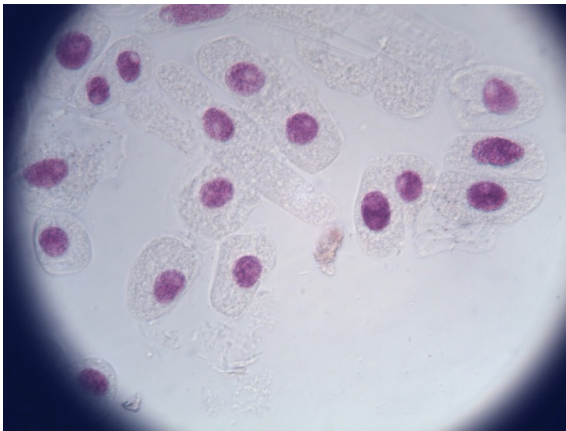


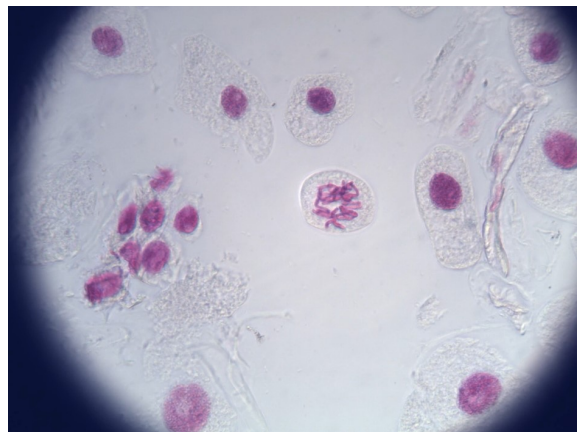
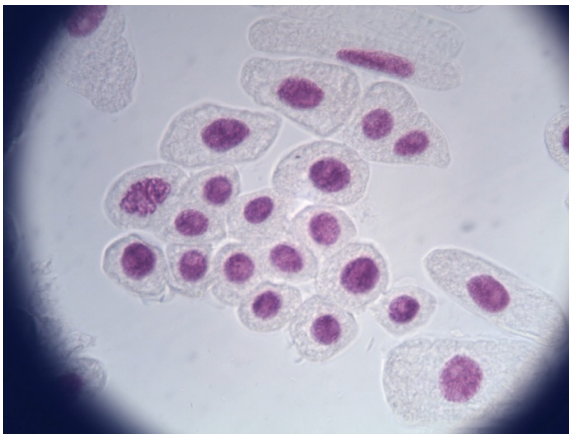
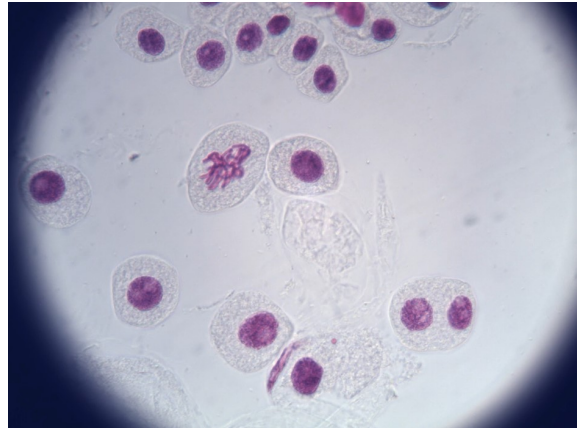
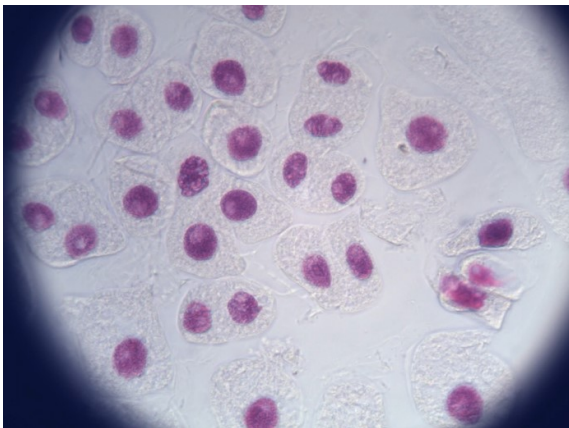
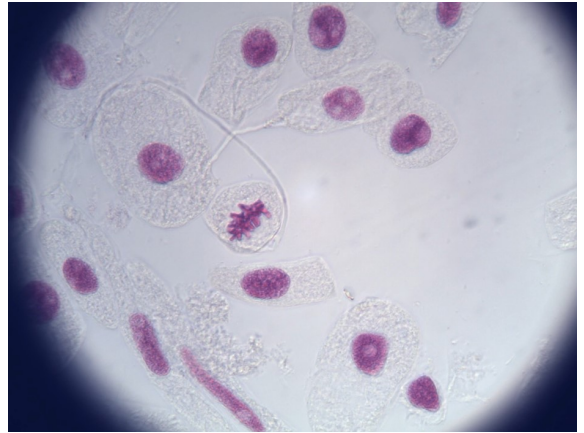


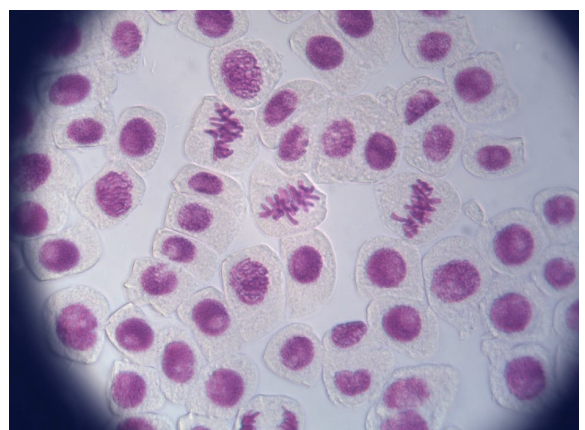
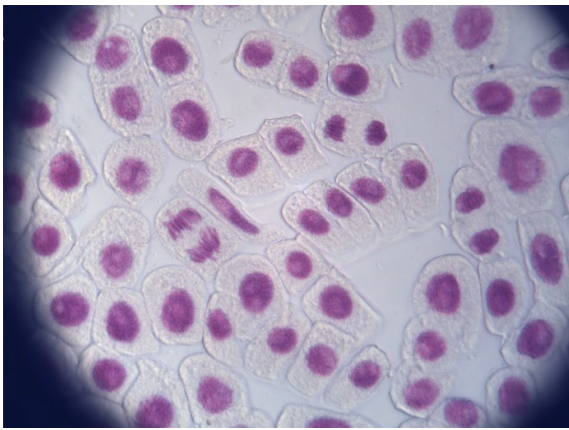
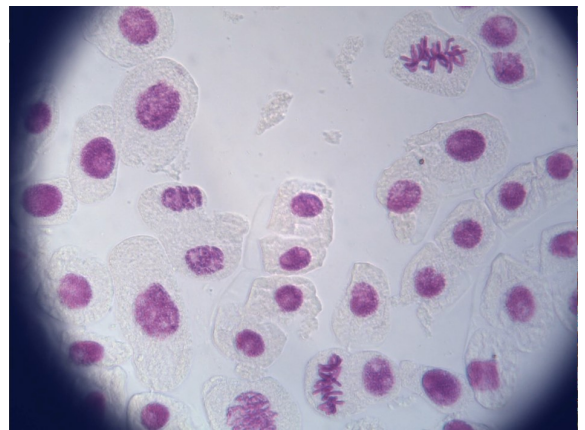
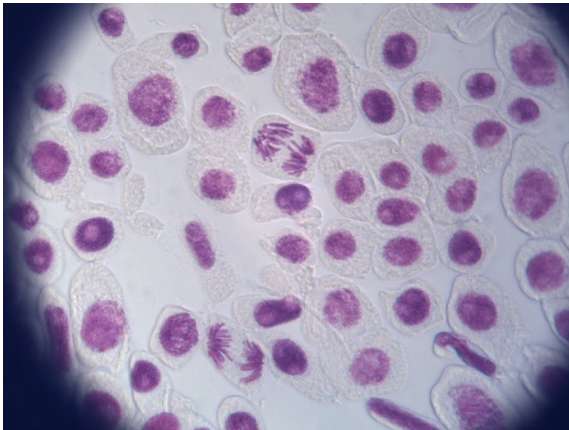
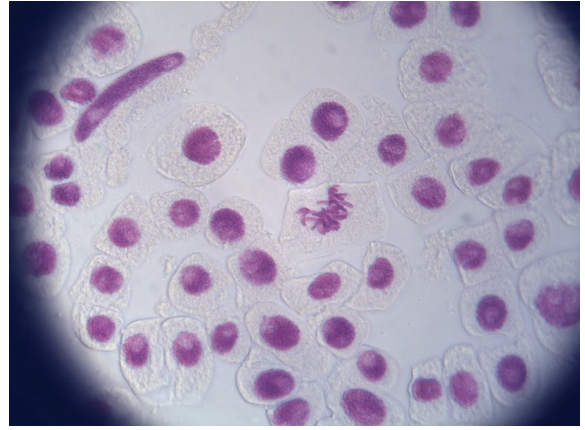
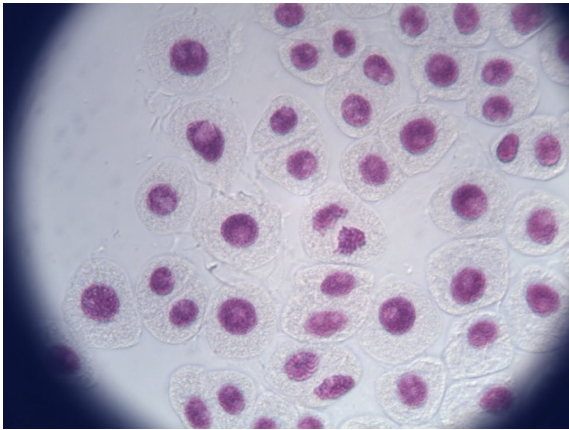


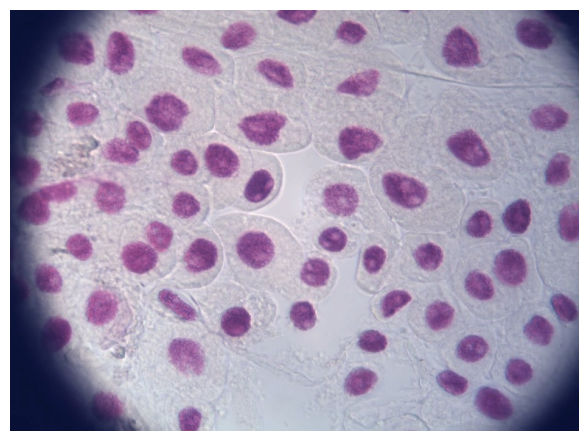
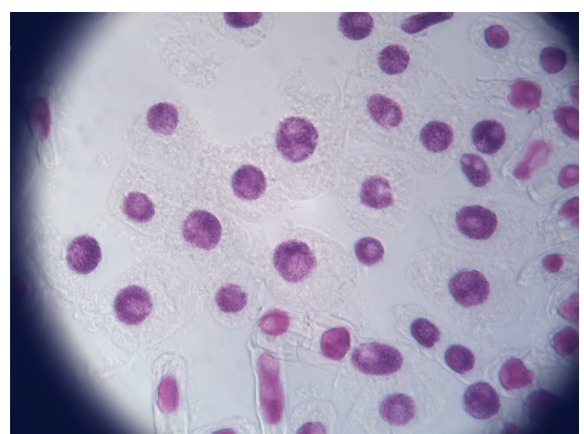
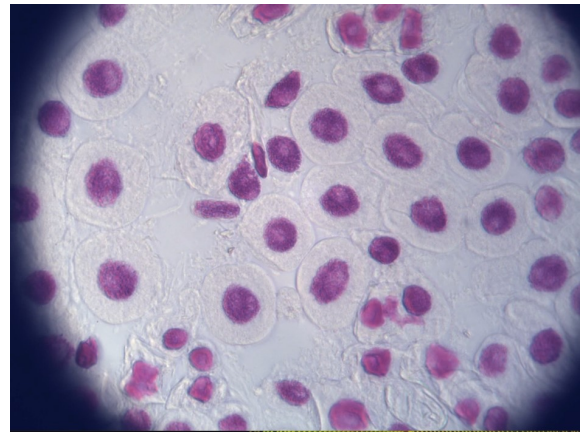


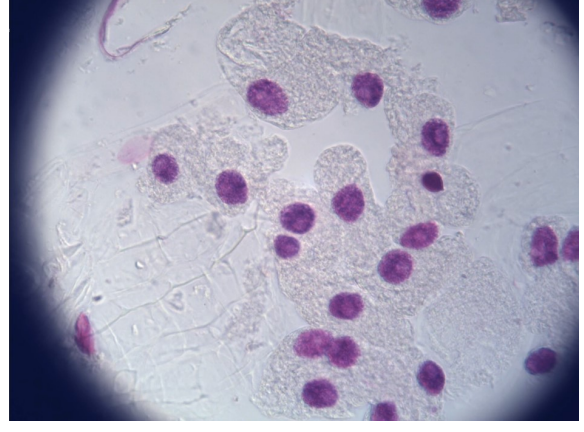
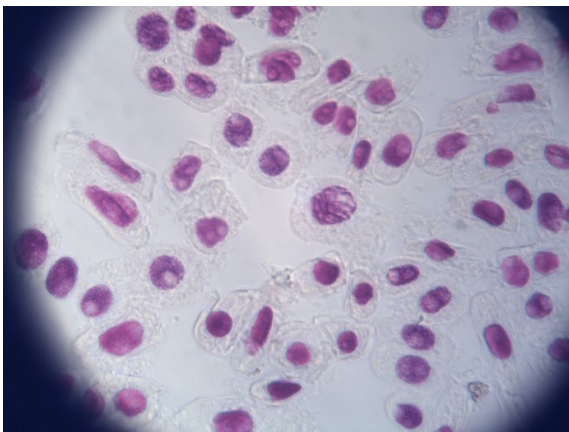
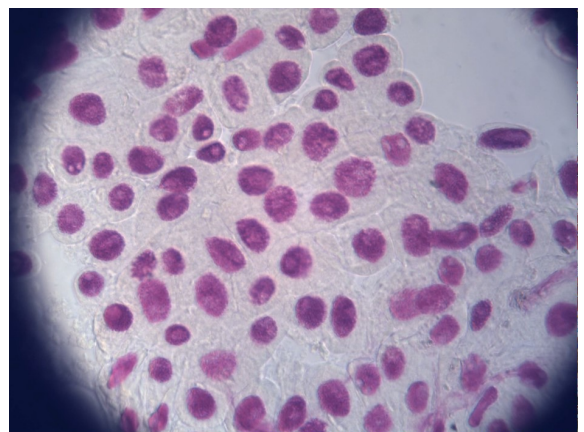
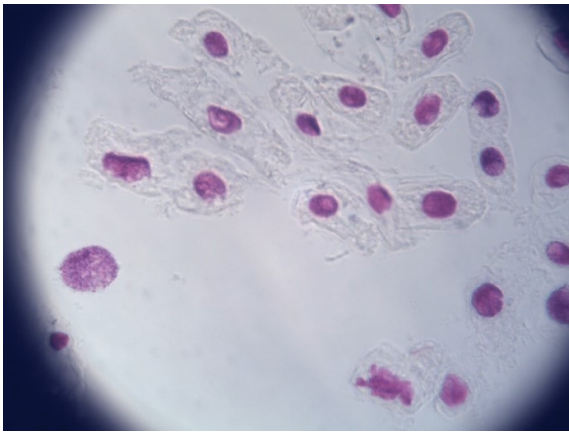
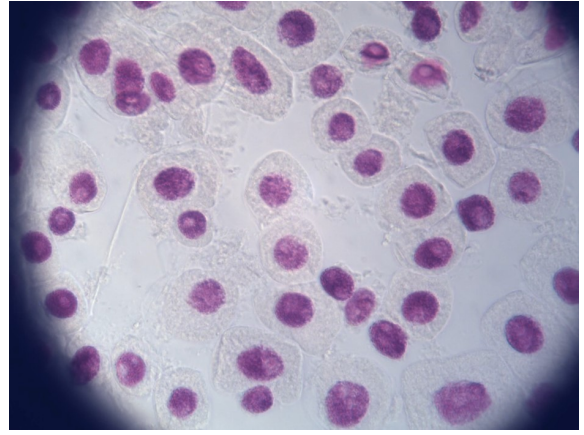
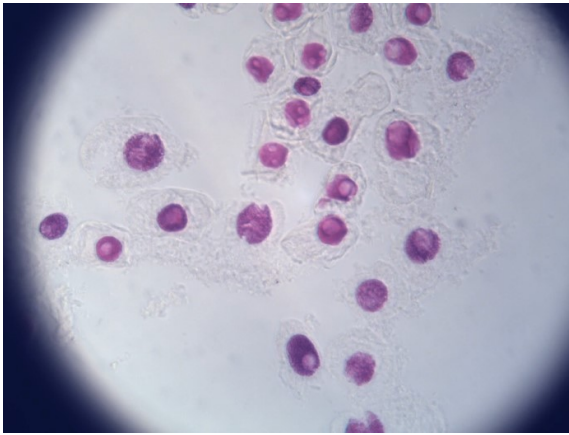
Οι παρακάτω εικόνες αποτελούν αντιπροσωπευτικό δείγμα από τις ρίζες των βολβών που μεταφυτεύτηκαν στο δείγμα ιλύος της Παμβώτιδας ΣΙΚ, μετά από ανάπτυξη τους στο βερμικουλίτη.

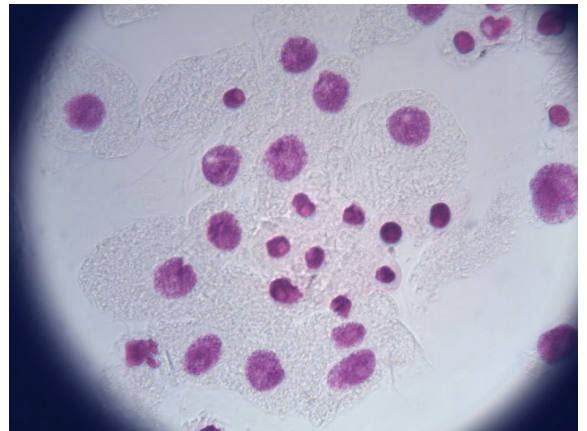
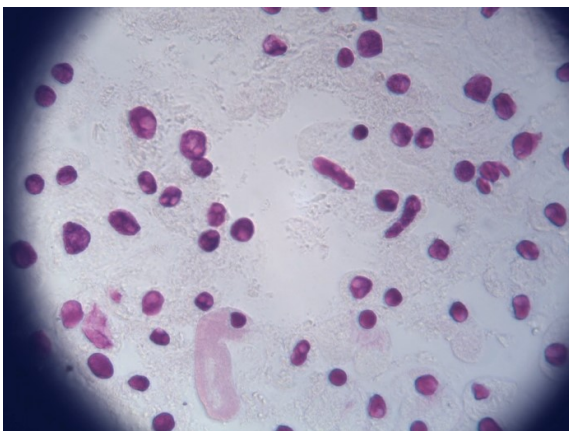
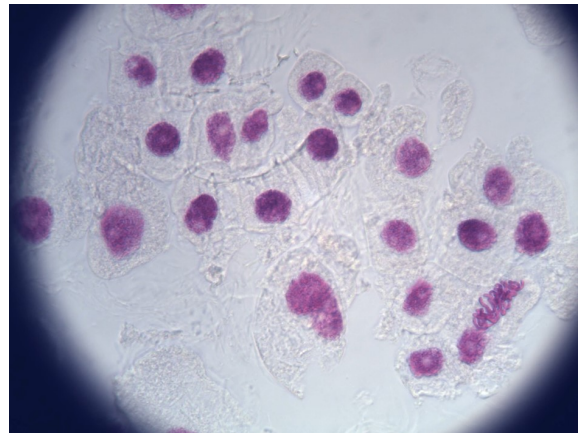
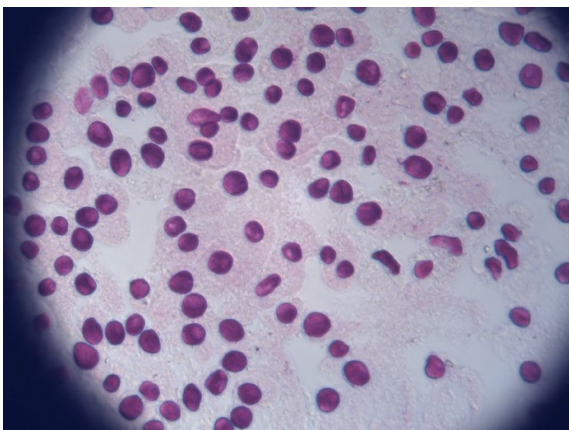
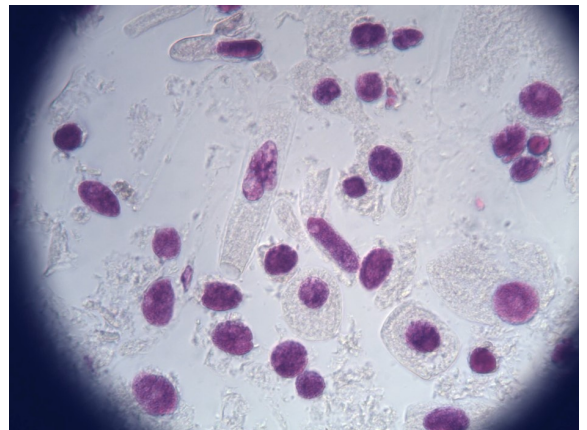
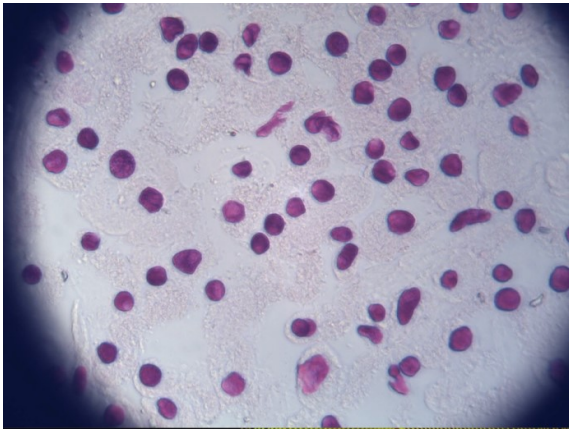


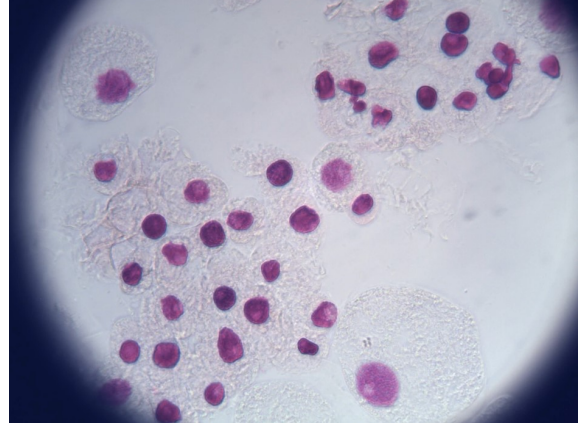
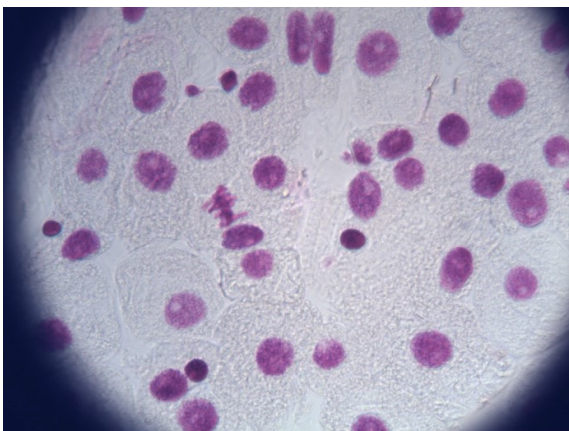
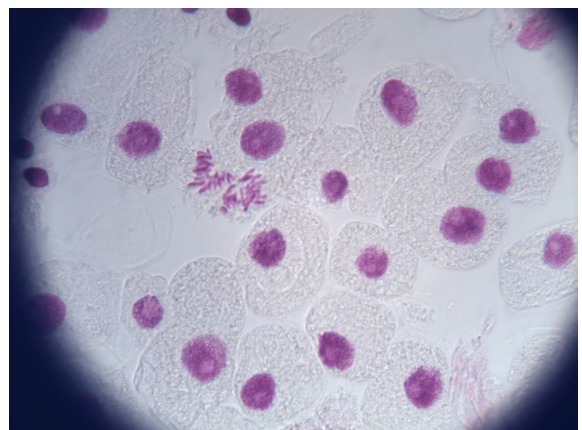
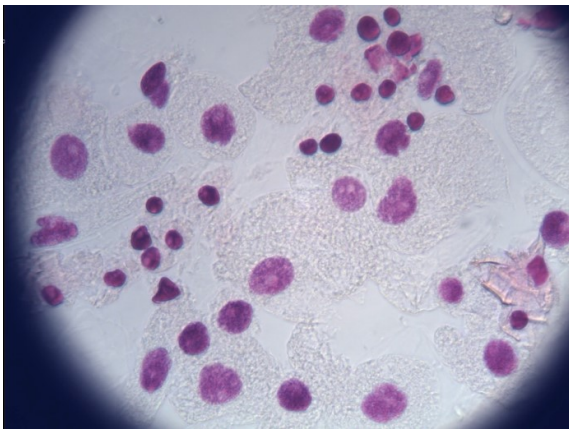
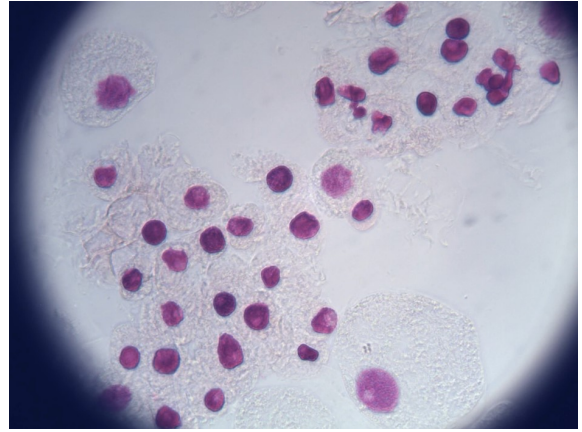
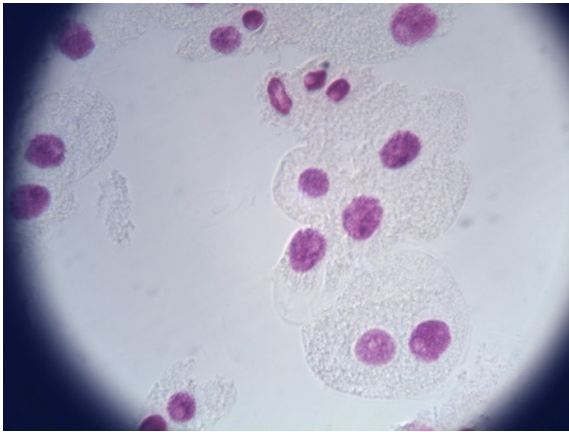












Οι παρακάτω εικόνες αποτελούν αντιπροσωπευτικό δείγμα από τις ρίζες των βολβών που μεταφυτεύτηκαν στο δείγμα ιλύος της Παμβώτιδας Σ2Κ, μετά από ανάπτυξη τους στο βερμικουλίτη.

