



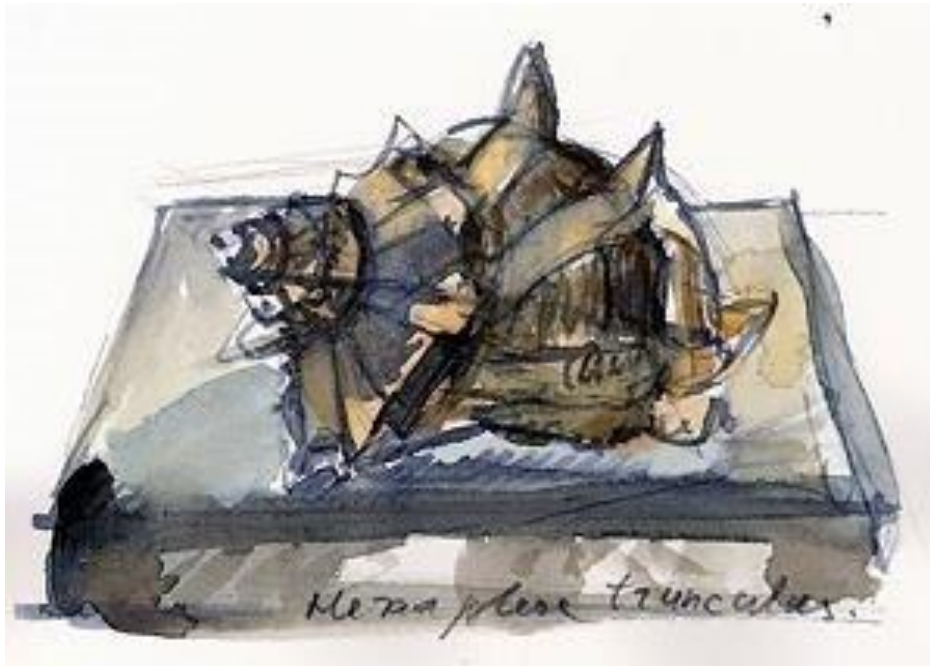
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΠΜΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

**ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΟΥ ΙΜΡΟSΕΧ ΚΑΙ Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗΝ
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΟΚΑΣΣΙΤΕΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΘΑΛΑΣΣΙΑ
ΓΑΣΤΕΡΟΠΟΔΑ *HEXAPLEX TRUNCULUS* ΚΑΙ *NASSARIUS NITIDUS***



Αναστασίου Θεοκλητεία

Εξεταστική επιτροπή: Δρ. Χρήστος Αρβανιτίδης (Ερευνητής Β')
Δρ. Ιωάννης Καρακάσης (Καθηγητής)
Δρ. Γεώργιος Κωτούλας (Ερευνητής Α')

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015



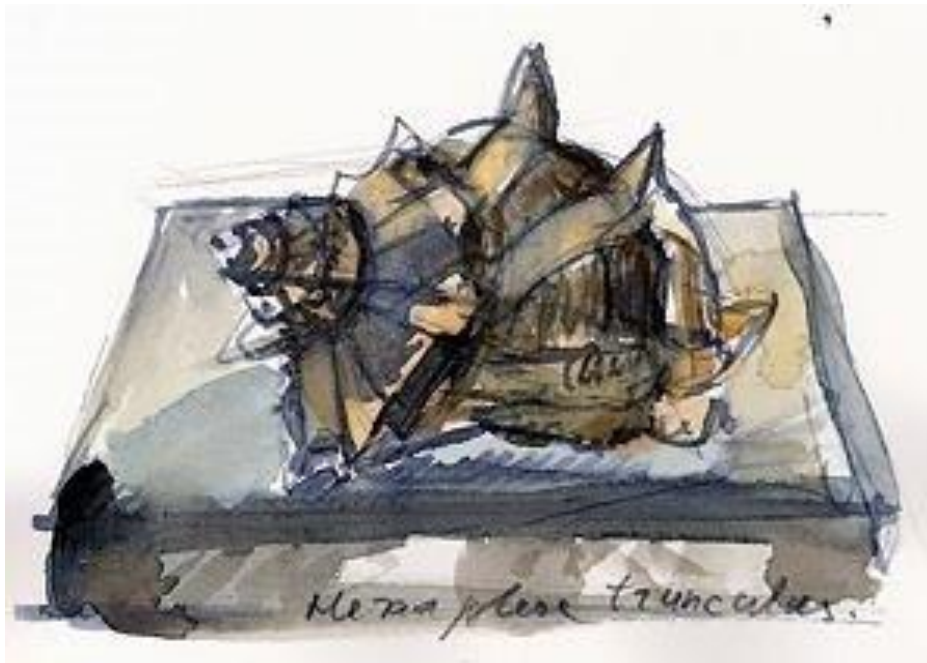
UNIVERSITY OF CRETE
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY

HELLENIC CENTRE FOR MARINE RESEARCH
INSTITUTE OF MARINE BIOLOGY, BIOTECHNOLOGY AND AQUACULTURE
JPP ENVIRONMENTAL BIOLOGY-MANAGEMENT OF TERRESTRIAL AND MARINE
RESOURCES

MASTER OF SCIENCE THESIS:

IMPOSEX AND ORGANOTIN COMPOUNDS IN MARINE GASTROPODS

HEXAPLEX TRUNCULUS AND NASSARIUS NITIDUS



Anastasiou Theoklitaia

Board of examination: Dr. Christos Arvanitidis (Senior Researcher)
Dr. Ioannis Karakassis (Professor)
Dr. Georgios Kotoulas (Research Director)

HERAKLION, 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας υλοποιήθηκε με την υποστήριξη ενός αριθμού ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου. Πρώτα από όλους θα ήθελα ευχαριστήσω τον Δρ. Χρήστο Αρβανιτίδη που με δέχτηκε στο εργαστήριο του, με στήριξε από το ξεκίνημα της εκπόνησης της διπλωματικής μου διατριβής και με στηρίζει μέχρι και σήμερα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Ιωάννη Καρακάση και Δρ. Γεώργιο Κωτούλα που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής και που, καθένας με τον τρόπο του, είτε υλικά είτε ηθικά, βοήθησε στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Η εργασία αυτή δε θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς τη βοήθεια της Δρ. Εύας Χατζηνικολάου και του Δρ. Μανώλη Μανδαλάκη. Τους ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε, καθώς ήταν πάντα πρόθυμοι να ασχοληθούν με κάθε απορία μου, εντός και εκτός των πλαισίων της παρούσας εργασίας. Είναι υπέροχοι άνθρωποι και ερευνητές και θα ήθελα να τους ευχαριστήσω που με στήριξαν, με εκπαίδευσαν και με καθοδήγησαν σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κατερίνα Βασιλειάδου και τη Χριστίνα Παυλούδη για τη συλλογή των δειγμάτων και μαζί τους ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Wanda Πλαϊτή, τη Νίκη Κεκλίκογλου, την Εμμανουέλα Παντερή και τη Βούλα Πολυμενάκου για τις συμβουλές και τη στήριξή τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που γνώρισα εδώ στην Κρήτη και που ήταν δίπλα μου στο νέο αυτό ξεκίνημα, για την στήριξη, την υπομονή και την κατανόηση που έδειξαν σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών: την Ματίνα Μαρνέρη, την Μαρία Μαϊδανού, τον Γιάννη Κυπριωτάκη και τον Μπάμπη Μπαλασάκη.

Ένα ευχαριστώ είναι λίγο προς την οικογένεια μου, που με στηρίζει σε κάθε απόφασή μου και μου δίνει δύναμη να συνεχίσω. Χωρίς τους ανθρώπους αυτούς δε θα τα είχα καταφέρει. Για τον λόγο αυτό, αφιερώνω την παρούσα εργασία στους γονείς μου Γιάννη και Ελένη, στον αδερφό μου Τριαντάφυλλο και στην Αφροδίτη, στη γιαγιά Θέκλα και στον παππού που έφυγε νωρίς, και τους υπόσχομαι ότι θα συνεχίσω να τους κάνω περήφανους...

Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ιστορικά στοιχεία.....	10
1.2 Imrosex.....	13
1.3 <i>Hexarplex trunculus</i> (Linnaeus, 1758).....	14
1.4 <i>Nassarius nitidus</i> (Jeffreys, 1867).....	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1 Μορφολογικές αναλύσεις.....	19
2.2 Χημικές αναλύσεις.....	23
2.3 Στατιστικές αναλύσεις.....	26
2.3.1 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων.....	26
2.3.2 Συγκρίσεις μεταξύ των δειγμάτων.....	26
2.3.3 Συσχέτιση μεταξύ μορφολογικών χαρακτηριστικών και χημικών ενώσεων.....	27
2.3.4 Λογισμικό.....	28
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	29
3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	29
3.3 Εξέλιξη του imrosex.....	35
3.4 Παραμορφώσεις.....	35
3.5 Χημικές αναλύσεις.....	36
3.5.1 Ιστοί.....	37
3.5.1.1 Συγκρίσεις μεταξύ θηλυκών ατόμων σε διαφορετικά στάδια imrosex.....	37
3.5.1.2 Συγκρίσεις μεταξύ ατόμων από διαφορετικές περιοχές.....	40
3.5.1.3 Συγκρίσεις μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων.....	42

3.5.1.4 Συσχέτιση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του imposex με τις συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών	43
3.5.2 Ιζήματα.....	45
3.6 Σύγκριση μεταξύ διαφορετικών ειδών γαστεροπόδων	47
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
4.1 Έκταση του imposex και συσσώρευση οργανοκασσιτερικών ενώσεων.....	52
4.2 Επίδραση του TPhT στην εμφάνιση imposex.....	58
4.3 Παραμονή στα ιζήματα και αποικοδόμηση του TBT	59
4.4 Εξέλιξη του imposex και των μορφολογικών παραμορφώσεων	60
4.5 Ευαισθησία διαφορετικών ειδών στην εμφάνιση imposex.....	62
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

TBT = tributyltin, τριβουτυλοκασσίτερος

DBT = dibutyltin, διβουτυλοκασσίτερος

MBT = monobutyltin, μονοβουτυλοκασσίτερος

TPhT = triphenyltin, τριφαινυλοκασσίτερος

DPhT = diphenyltin, διφαινυλοκασσίτερος

MPhT = monophenyltin, μονοφαινυλοκασσίτερος

OT(s) = organotins, οργανοκασσιτερικές ενώσεις

SL = shell length, μήκους οστράκου

PL = penis length, μήκος πέους

VD = Vas Deferens, σπερματικός αγωγός

VDSI = Vas Deferens Sequence Index, Δείκτης Vas Deferens Sequence

RPLI = Relative Penis Length Index, Δείκτης Σχετικού Μήκους του Πέους

RPSI = Relative Penis Size Index, Δείκτης Σχετικού μεγέθους του Πέους

BDI = Butyltin Degradation Index, Δείκτης Αποικοδόμησης Βουτυλοκασσίτερου

d.w. = dry weight, ξηρό βάρος

β.ό. = βάρος κατά όγκο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις είναι τοξικές ουσίες που διοχετεύονται στο υδάτινο περιβάλλον με τη χρήση των υφαλοχρωμάτων και αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για τους θαλάσσιους οργανισμούς. Μετά την πάροδο 62 ετών από την πρώτη εφαρμογή τους, οι αρνητικές επιπτώσεις που προκάλεσαν στα μαλάκια εξακολουθούν να εμφανίζονται, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το φαινόμενο imposex στα γαστερόποδα. Το imposex, δηλαδή η εμφάνιση αρσενικών αναπαραγωγικών χαρακτήρων σε θηλυκά άτομα, χρησιμοποιείται ευρέως ως βιοδείκτης της ρύπανσης από τον τριβουτυλοκασσίτερο (TBT). Τα είδη *Hexaplex trunculus* και *Nassarius nitidus* εμφανίζουν ευαισθησία στην έκθεση στο TBT και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται για την βιοπαρακολούθηση της ρύπανσης των υδάτων. Στην παρούσα έρευνα, χρησιμοποιήθηκαν ιζήματα και δείγματα *H. trunculus* που είχαν συλλεχθεί από περιοχές της Σαρδηνίας, Τυνησίας και Πορτογαλίας με σκοπό την εκτίμηση της επιβάρυνσης των συγκεκριμένων περιοχών από το TBT. Παράλληλα, μελετήθηκαν δείγματα *N. nitidus* από την Πορτογαλία προκειμένου να επιλεχθεί το πιο ευαίσθητο είδος-βιοδείκτης της ρύπανσης από το TBT. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρά την απόφαση κατάργησής του, ο τριβουτυλοκασσίτερος εξακολουθεί να επιβαρύνει το υδάτινο περιβάλλον, προκαλώντας imposex, η έκταση του οποίου είναι ανάλογη με τις δραστηριότητες ναυσιπλοΐας. Επιπλέον, παρέχονται ενδείξεις συνεργιστικής επίδρασης του TPHT στην εξέλιξη του φαινομένου. Στο *H. trunculus* το imposex ξεκινά με την εμφάνιση είτε πέους είτε σπερματικού αγωγού σε θηλυκά άτομα και μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε στειρότητα, ενώ, παράλληλα, προκαλούνται παραμορφώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα σε θηλυκά και αρσενικά άτομα. Η συσχέτιση του μήκους του πέους με τη συγκέντρωση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων στους ιστούς των γαστερόποδων είναι σημαντική και παρέχει τη δυνατότητα γρήγορης εκτίμησης της συσσώρευσής τους στον οργανισμό. Ωστόσο, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να εξακριβωθεί ο πιο ευαίσθητος βιοδείκτης ως προς την έκθεση στο TBT ανάμεσα στα δύο είδη.

ABSTRACT

Organotin compounds are toxic substances released into the marine environment through antifouling paints. Sixty two years following their first application, the negative impacts caused on molluscs are still evident, as illustrated by imposex, which is the masculinization of female prosobranch gastropods. This phenomenon is widely used as a biomarker of tributyltin (TBT) pollution. *Hexaplex trunculus* and *Nassarius nitidus* are gastropods that show significant sensitivity against organotin pollution and are, therefore, used as bioindicators for monitoring TBT pollution in coastal waters. In the present study sediment samples and specimens of *H. trunculus* collected from Sardinia, Tunisia and Portugal were used for the assessment of the intensity of imposex and the organotin contamination of these areas. At the same time, individuals of the species *N. nitidus* from Portugal were studied, in order to determine which one is the most sensitive gastropod featuring imposex as a response to TBT contamination. Morphological and chemical analyses revealed that, despite its complete ban, TBT continues to be present in the marine environment and to cause imposex. Its intensity is related to the degree of shipping activities. Moreover, the results suggested a possible synergistic effect of TPhT in the development of imposex. In *H. trunculus* the first sign of imposex is the appearance of a penis or a penis duct in females and may lead to sterility in the final stage. Furthermore, genital track malformations can be developed in both sexes. The positive correlation of penis length with the organotin compounds concentration in gastropods' tissues enables a rapid assessment of their accumulation in the tissues of organisms. However, more detailed studies are necessary in order to determine which one of the two species would be the most sensitive bioindicator to TBT exposure.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση βιολογικών σηματοδοτών (biomarkers) και βιολογικών δεικτών (biological indicators) έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στον τομέα της περιβαλλοντικής διαχείρισης. Τα συγκεκριμένα εργαλεία επιτρέπουν την βιοπαρακολούθηση (biomonitoring) διάφορων αρνητικών παραγόντων καθώς και την έμμεση εκτίμηση της ποιότητας του περιβάλλοντος. Επιπλέον, σε συνδυασμό με τις φυσικοχημικές μεθόδους αποτίμησης της ρύπανσης, οι τεχνικές βιοπαρακολούθησης μπορούν να αποφέρουν συμπληρωματικά στοιχεία σχετικά με τις πραγματικές επιπτώσεις της ρύπανσης στους οργανισμούς και να βοηθήσουν τους υπεύθυνους φορείς στην καλύτερη λήψη αποφάσεων και στην βελτίωση των στρατηγικών προστασίας του περιβάλλοντος.

Η παγκόσμια ανησυχία για τις περιβαλλοντικές συνέπειες των οργανοκασσιτερικών ενώσεων στα παράκτια οικοσυστήματα εντάθηκε ως αποτέλεσμα των πρώτων καταγραφών αρνητικών επιπτώσεων. Από τότε, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας οδήγησε σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών και στη συλλογή σημαντικής ποσότητας πληροφοριών σχετικά με τα περιβαλλοντικά επίπεδα των συγκεκριμένων ρύπων, καθώς και τις βιολογικές επιπτώσεις τους, με ιδιαίτερη αναφορά στα μαλάκια. Από τα συγκεκριμένα βιοκτόνα, ο τριβουτυλοκασσίτερος (tributyltin, TBT) έχει αναφερθεί ως η πιο τοξική ουσία που έχει ποτέ εισαχθεί σκόπιμα στο θαλάσσιο περιβάλλον (Mee & Fowler, 1991).

Παρά τις νομοθετικές αποφάσεις για την κατάργηση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων και τον περιορισμό των εφαρμογών τους, το ενδιαφέρον για την παρουσία και τις επιπτώσεις τους στο θαλάσσιο περιβάλλον παραμένει αμείωτο. Στις ημέρες μας, το φαινόμενο “improsex” νεογαστερόποδα χρησιμοποιείται ευρέως ως βιοδείκτης για την εκτίμηση της ρύπανσης από τριβουτυλοκασσίτερο (TBT) και αποτελεί ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα βιοπαρακολούθησης.

1.1 Ιστορικά στοιχεία

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις (organotins) αποτελούν μια τυπική κατηγορία οργανομεταλλικών ενώσεων, δηλαδή ενώσεων που περιλαμβάνουν τουλάχιστον έναν ομοιοπολικό δεσμό μετάλλου-άνθρακα. Λόγω τους sp^3 υβριδισμού του, ο κασσίτερος μπορεί να σχηματίζει μέχρι τέσσερις ομοιοπολικούς δεσμούς με διάφορες οργανικές ομάδες (οργανικοί υποκαταστάτες) ή άτομα υδρογόνου. Από τη δεκαετία του 1940, οι ενώσεις αυτές άρχισαν να αποκτούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και κατέληξαν να αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα προϊόντα της χημικής βιομηχανίας. Πλέον, οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις θεωρούνται ότι υπήρξαν μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες κατηγορίες οργανομεταλλικών ενώσεων με ετήσια παγκόσμια παραγωγή που έφτανε τους 50000 τόνους (Ko *et al.*, 1995) και με ποικίλες εφαρμογές στη βιομηχανία και τη γεωργία. Οι δι- και μονο-υποκατεστημένες (di-, mono-substituted) ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά ως σταθεροποιητές στην παραγωγή πλαστικών πολυβινυλοχλωριδίου (PVC) και ως καταλύτες για αφρούς πολυουρεθάνης (polyurethane foams) και σιλικόνης. Στη δεκαετία του 1950, οι βιοκτόνες ιδιότητες των τρι-υποκατεστημένων (tri-substituted) ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν σε συντηρητικά ξύλου, φυτοφάρμακα και υφαλοχρώματα (antifouling paints) προκειμένου να αποφευχθεί η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη θαλάσσιων οργανισμών (π.χ. βακτήρια, φύκη, εδραίοι πολύχαιτοι [tubeworms] και πεταλίδες) στα ύφαλα των πλοίων και των λιμενικών εγκαταστάσεων (Hoch, 2001). Αξίζει να σημειωθεί ότι η συσσώρευση θαλάσσιων οργανισμών στα ύφαλα των πλοίων αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η Παγκόσμια Ναυτιλία. Έχει υπολογιστεί ότι οι εναποθέσεις οργανισμών μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της αντίστασης τριβής του πλοίου μέχρι και 60%. Αυτή η επιπλέον αντίσταση συνεπάγεται μείωση της ταχύτητας μέχρι και 10%, η οποία για να εξισορροπηθεί απαιτεί μέχρι και 40% αύξηση στην κατανάλωση καυσίμων (IMO, 2002; Champ, 2000; Omae, 2003). Η εφαρμογή υφαλοχρωμάτων με αντιρρυπαντικές ιδιότητες (antifouling paints) θεωρείται πλέον απαραίτητη, λαμβάνοντας υπόψη ότι αυτό οδηγεί στην εξοικονόμηση περίπου 2-3 δις ευρώ ανά έτος από τις ναυτιλιακές εταιρίες (Champ, 2000; Omae, 2003). Ωστόσο, η προσθήκη οργανοκασσιτερικών ενώσεων στα υφαλοχρώματα για την αποφυγή βιοεναποθέσεων (fouling) στα ύφαλα των πλοίων οδήγησε σε αυξημένα

επίπεδα ρύπανσης από τις συγκεκριμένες ενώσεις σε παράκτια συστήματα όπως λιμάνια, μαρίνες και περιοχές κοντά σε ναυπηγεία και επισκευαστήρια πλοίων (Gabrielides *et al.*, 1990).

Μεταξύ των διάφορων οργανοκασσιτερικών ενώσεων, ο τριβουτυλοκασσίτερος (TBT) έτυχε ιδιαίτερης προσοχής, λόγω των τοξικών επιδράσεών του σε μη στοχευόμενους υδρόβιους οργανισμούς, όπως μύδια, στρείδια, ψάρια, φώκες, δελφίνια και φάλαινες (Fent, 2006; Kannan *et al.*, 1996; Strand & Jacobsen, 2005; Girperth, 2009). Η οικολογική επίπτωση της ρύπανσης με TBT έγινε εμφανής στα τέλη της δεκαετίας του 1970, όταν αναφέρθηκαν για πρώτη φορά παραμορφώσεις στο όστρακο και αναπαραγωγική αποτυχία σε πληθυσμούς στρειδιών της περιοχής Arcachon στη Γαλλία (Alzieu, 1991). Το γεγονός ότι οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις μπορούσαν να επηρεάσουν και θαλάσσιους οργανισμούς που δεν αποτελούσαν στόχους, όπως οι αχιβάδες, τα μύδια και τα στρείδια, προκαλώντας αλλαγές στη δομή του οστράκου, στην ανάπτυξη των προνυμφών και στη σωματική αύξησή τους καταγράφηκε στις μελέτες των Alzieu *et al.* (1986), Alzieu (2000) και Axiak & Sammut (1995). Πιο πρόσφατα αναφέρθηκε ότι το TBT μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA των κυττάρων (γενοτοξικό) (Micael *et al.*, 2007), καθώς και ότι μπορεί να λειτουργεί ως παράγοντας ενδοκρινικής διαταραχής σε ψάρια (McAllister & Kime, 2003; Shimasaki *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2006).

Ο τριφαινυλοκασσίτερος (TPHT) είναι τοξική τρι-υποκατεστημένη οργανοκασσιτερική ένωση, η οποία χρησιμοποιείται ως παρασιτοκτόνο, κυρίως στα φυτοφάρμακα στη γεωργία (Stäb *et al.*, 1994; Fent, 2006) και σε μικρότερο βαθμό ως βοηθητική ουσία στα υφαλοχρώματα (Pellizzato *et al.*, 2004). Τόσο το TBT όσο και το TPHT συμπεριλαμβάνονται στον κατάλογο του Οργανισμού Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency (EPA), US) με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές (endocrine disrupters), καθώς και στους καταλόγους με τους ρύπους υψηλής προτεραιότητας της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ, Οδηγία 76/464) (Díez *et al.*, 2002). Έχουν αναφερθεί επιβλαβείς επιδράσεις του TPHT σε διάφορα είδη μαλακίων (Schulte-Oehlmann *et al.*, 2000; Horiguchi *et al.*, 2002; Duft *et al.*, 2003), στα οποία παρατηρήθηκε μείωση των γεννητικών οργάνων και δυσλειτουργία στη σπερματογένεση και ωογένεση.

Ωστόσο, η επίδραση της συγκεκριμένης ένωσης στα διαφορετικά είδη γαστερόποδων ως προς την εμφάνιση του *improsex* δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί.

Η αποικοδόμηση των βουτυλοκασιτεριικών ενώσεων, δηλαδή η σταδιακή αφαίρεση οργανικών ομάδων από το κατιόν κασσίτερου (Sn), μπορεί να προκληθεί από διάφορες διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων της φωτόλυσης και της χημικής και βιολογικής διάσπασης. Στην θάλασσα, ο τριβουτυλοκασσίτερος (TBT) και ο τριφαινυλοκασσίτερος (TPHT) τείνουν να προσροφούνται στα αιωρούμενα οργανικά σωματίδια εξαιτίας του υδρόφοβου χαρακτήρα τους, και να συσσωρεύονται στα ιζήματα. Εκεί αποικοδομούνται με ρυθμό που εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες της περιοχής, όπως η τιμή του pH, ο συνολικός οργανικός άνθρακας (TOC), η αλατότητα, η θερμοκρασία, το μέγεθος κόκκων και το διαλυμένο οξυγόνο (Filipkowska *et al.*, 2014). Επιπρόσθετα, οι οργανοκασιτερικές ενώσεις που εναποτίθενται στα ιζήματα μπορούν να υποστούν διάφορες διεργασίες, όπως επαναιώρηση, διάχυση στη στήλη του ύδατος ή βιοτικό και αβιοτικό μετασχηματισμό (Díez *et al.*, 2002, Fent, 2006). Ανεξάρτητα από τον ακριβή μηχανισμό αποδόμησης, οι συγκεκριμένες ενώσεις έχουν σχετικά μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής (half life) στα ιζήματα (0.9-5.2 έτη, Dowson *et al.*, 1993) και μπορούν να συνεχίζουν να αποτελούν σοβαρή απειλή για τους υδρόβιους οργανισμούς αρκετά χρόνο μετά την εναπόθεσή τους.

Σήμερα, η χρήση του τριβουτυλοκασσίτερου (TBT) στα υφαλοχρώματα έχει περιοριστεί σε πολλές χώρες, καθώς ο κανονισμός 782/2003 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και Συμβουλίου της 14ης Απριλίου 2003 απαγόρευσε τη χρήση υφαλοχρωμάτων που περιέχουν TBT ως δραστικό παράγοντα σε όλα τα σκάφη από την 1η Ιουλίου 2003 και επέβαλε την πλήρη απομάκρυνσή του από τα ύφαλα των πλοίων από την 1η Ιανουαρίου 2008 (MEPC, 2001). Ωστόσο, ακόμα και μετά την πλήρη κατάργηση των υφαλοχρωμάτων που περιέχουν TBT, η ρύπανση από την ένωση αυτή αναμένεται να συνεχιστεί για πολλά χρόνια, λόγω του χαμηλού ρυθμού αποικοδόμησής της στα θαλάσσια ιζήματα και ιδιαίτερα σε εκείνα που υφίστανται υπό ανοξικές συνθήκες (Fent, 2006; Santos *et al.*, 2004).

1.2 Imposex

Το imposex (Smith, 1971), ή αλλιώς ψευδοερμαφροδιτισμός (Jenner, 1979), είναι ένα παράδειγμα εκτεταμένης ενδοκρινικής διαταραχής εξαιτίας του TBT. Χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία αρσενικών αναπαραγωγικών οργάνων σε θηλυκά προσωβράγχια γαστερόποδα, όπως το πέος ή/και ο σπερματικός αγωγός (vas deferens, VD). Αυτή η ανωμαλία/δυσμορφία αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Blaber (1970) σε βρετανικούς πληθυσμούς του γαστερόποδου *Nucella lapillus* (Linnaeus, 1758). Το 1971, ο Smith (1971) βρήκε παρόμοιες ανωμαλίες στο γαστερόποδο *Ilyanassa obsoleta* (Say, 1822) στις αμερικάνικες ακτές. Σε ακραίες περιπτώσεις, το imposex μπορεί να προκαλέσει την εξαφάνιση ολόκληρων πληθυσμών γαστερόποδων λόγω της στειρότητας των θηλυκών ατόμων, η οποία οφείλεται στη φραγή του κοιλιακού ανοίγματος (vaginal opening) ή στην καταστροφή του αδένου παραγωγής των κάψουλων αυγών (egg capsule gland) (Bryan *et al.*, 1986; Schulte-Oehlmann *et al.*, 1997; Trigui El Menif *et al.*, 2006).

Αυτή η αρρενοποίηση των θηλυκών ατόμων έχει καταγραφεί παγκοσμίως σε περίπου 260 είδη γαστερόποδων (Sternberg *et al.*, 2010; Titley-O'Neal *et al.*, 2011), τα οποία κατανέμονται σε 28 οικογένειες. Ανάμεσα σε αυτές, η οικογένεια Muricidae κυριαρχεί ως προς τον αριθμό των ειδών που έχουν εντοπιστεί με εμφανείς δομικές ανωμαλίες (76 είδη) (Shi *et al.*, 2005). Αξίζει να αναφερθεί ότι η εν λόγω διαταραχή των γεννητικών οργάνων εμφανίζεται σε θηλυκά άτομα που υποβάλλονται σε μία συγκέντρωση λίγων μόνο νανογραμμαρίων Sn ανά λίτρο θαλασσινού νερού (Gibbs & Bryan, 1986; Bryan & Gibbs, 1991; Santos *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2007; Abidli *et al.*, 2009, 2012b; Lima *et al.*, 2011).

Έχει παρατηρηθεί μεγάλη διακύμανση στην έκφραση του imposex στα διάφορα είδη γαστερόποδων, καθένα από τα οποία εμφανίζει διαφορετική ευαισθησία απέναντι στην έκθεση στο TBT (Huet *et al.*, 1995; Lemghich & Benajiba, 2007). Σε γενικές γραμμές, τα θηλυκά άτομα θα αρχίσουν να αναπτύσσουν ένα πέος και έναν σπερματικό αγωγό σε παρόμοια θέση και με παρόμοια μορφολογία με εκείνα ενός αρσενικού. Με βάση τα δύο αυτά χαρακτηριστικά, οι Gibbs *et al.* (1987) ανέπτυξαν αρχικά ένα σύστημα για την περιγραφή των σταδίων εμφάνισης του imposex στο είδος *Nucella lapillus*, το οποίο αργότερα τροποποιήθηκε ώστε να είναι δυνατή η περιγραφή του φαινομένου και σε άλλα είδη (Oehlmann *et al.*, 1991;

Stroben *et al.*, 1992; Axiak *et al.*, 1995). Η προσπάθεια να συμπεριληφθούν όσο το δυνατόν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα εκάστοτε στάδια του imposex συνεχίζεται, με πιο πρόσφατες τις μελέτες των Shi *et al.* (2005) και Lahbib *et al.* (2008a).

Για τον προσδιορισμό της έκτασης του φαινομένου imposex έχουν αναπτυχθεί ορισμένοι δείκτες, από τους οποίους οι πλέον διαδεδομένοι είναι ο δείκτης Vas Deferens Sequence (VDSI), ο δείκτης Σχετικού Μήκους του Πέους (Relative Penis Length Index, RPLI) και ο δείκτης Σχετικού Μεγέθους του Πέους (Relative Penis Size Index, RPSI) (Gibbs *et al.*, 1987). Ο VDSI δίνει μια ένδειξη της αναπαραγωγικής ικανότητας του πληθυσμού, ενώ τόσο ο RPLI όσο και ο RPSI εκφράζουν την ανάπτυξη του πέους στα θηλυκά άτομα σε σχέση με αυτό των αρσενικών, όσον αφορά το μήκος ή τον όγκο αντίστοιχα. Πρόσφατα, η χρήση του RPSI αμφισβητήθηκε, επειδή βρέθηκε να ποικίλει ανάλογα με την αναπαραγωγική δραστηριότητα και το μέγεθος ορισμένων ειδών γαστεροπόδων (Oliveira *et al.*, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2010).

Επειδή το imposex είναι ένας ευαίσθητος βιοδείκτης της έκθεσης σε TBT που μπορεί εύκολα να ποσοτικοποιηθεί, υιοθετήθηκε ευρέως για την παρακολούθηση της ρύπανσης των υδάτων από την συγκεκριμένη ένωση και την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των μέτρων ελέγχου της σε πολλά παράκτια περιβάλλοντα (Evans *et al.*, 1994; Gibson & Wilson, 2003; Terlizzi *et al.*, 2004; Garaventa *et al.*, 2006). Στη Μεσόγειο, το είδος *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως βιολογικός δείκτης της ρύπανσης από TBT από τους Axiak *et al.* (1995) σε δείγματα που συλλέχθηκαν από τη Μάλτα. Στη συνέχεια, οι Terlizzi *et al.* (1998) επέκτειναν τη μελέτη αυτή κατά μήκος των ιταλικών ακτών, ακολουθούμενοι αργότερα από τους Garaventa *et al.* (2006) και Maran *et al.* (2006). Στις μελέτες αυτές προστέθηκαν και έρευνες από τις πορτογαλικές (Vasconcelos *et al.*, 2006) και τυνησιακές ακτές (Trigui El-Menif *et al.*, 2006; Lahbib *et al.*, 2008a,b, 2009a,b, 2012; Abidli *et al.*, 2009), το Μαρόκο (Lemghich & Benajiba, 2007) και την Κροατία (Garaventa *et al.*, 2007; Prime *et al.*, 2006).

1.3 *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758)

Το είδος *H. trunculus* (Neogastropoda: Muricidae) είναι ένα από τα πιο κοινά γαστερόποδα της Μεσογείου· συναντάται επίσης στα Κανάρια Νησιά και κατά

μήκος των πορτογαλικών ακτών στον Ατλαντικό ωκεανό. Εντοπίζεται σε λασπώδη, αμμώδη-λασπώδη και σκληρά υποστρώματα σε βάθη μεταξύ 1 και 100 μ. Είναι γονοχωριστικό είδος και αρκετά μεγάλο ώστε να επιτρέπει εύκολα χημικές και βιολογικές αναλύσεις. Επιπλέον, έχει εμπορικό ενδιαφέρον, καθώς σε χώρες όπως η Πορτογαλία και η Ιταλία (Σαρδηνία) αλιεύεται με σκοπό την κατανάλωση από τον άνθρωπο, ενώ στην αρχαιότητα το χρησιμοποιούσαν για την παραγωγή πορφύρας (Fretter & Graham, 1962).

Πρόκειται για ένα είδος με ευρύτερες διατροφικές συνήθειες, αφού συμπεριφέρεται είτε ως θηρευτής διηθηματοφάγων οργανισμών (π.χ. δίθυρα), είτε ως πτωματοφάγος (π.χ. νεκρά ψάρια), γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά επίπεδα έκθεσης στο TBT και, ως εκ τούτου, σε διαφορετικό βαθμό έκφρασης του imposex (Terlizzi *et al.*, 1999). Συγκριτικές μελέτες έχουν δείξει ότι το *H. trunculus* είναι πιο ευαίσθητο στην έκθεση στο TBT από ό,τι άλλα είδη γαστερόποδων, πιθανόν λόγω του τρόπου ζωής του, καθώς ως πτωματοφάγος τρυπώνει στο λασπώδη πυθμένα όπου συναντώνται υψηλότερες συγκεντρώσεις TBT (Coelho *et al.*, 1998; El Hamdani *et al.*, 1998). Επιπλέον, είναι ένα είδος που αναπτύσσεται άμεσα (στερείται πλαγκτονικής προνύμφης) και ως εκ τούτου είναι εξαιρετικά περιορισμένο σε ό,τι αφορά την κίνηση και την ικανότητά του να αποικίζει απομακρυσμένες περιοχές, κάτι που εξηγεί την αξιοσημείωτη ικανότητά του να λειτουργεί ως βιοδείκτης ανίχνευσης σημειακών πηγών ρύπανσης TBT και την αποτύπωση τους με υψηλή χωρική ανάλυση (Axiak *et al.*, 2003).

Οι Axiak *et al.* (1995) και Terlizzi *et al.* (1999) ήταν οι πρώτοι που κατέδειξαν την υψηλή ευαισθησία αυτού του είδους στην έκθεση σε TBT και το ανέδειξαν ως καλό δείκτη της ρύπανσης από τη συγκεκριμένη ένωση. Ως πρώτη ένδειξη της εμφάνισης imposex στα θηλυκά άτομα του *H. trunculus* θεωρήθηκε η ανάπτυξη ενός μικρού πέους πίσω από τη δεξιά οφθαλμική κεραία, με τον σπερματικό αγωγό να εμφανίζεται αργότερα και σταδιακά να διευρύνεται από τη βάση του πέους προς το άνοιγμα του κόλπου. Ωστόσο, η σειρά εμφάνισης των αρσενικών χαρακτηριστικών φύλου αναθεωρήθηκε σε μεταγενέστερη μελέτη από τους Lahbib *et al.* (2008a).

Οι πιθανές επιδράσεις του imposex στο *H. trunculus* είναι κυρίως η σωματική αύξηση στα θηλυκά άτομα (Axiak *et al.*, 1995; Rilov *et al.*, 2000), η μείωση

της γονιμότητας (Trigui El Menif *et al.*, 2006; Lahbib *et al.*, 2009a) και η στειρότητα που έχει καταγραφεί σε ορισμένες περιοχές στη Μάλτα, την Ιταλία και την Τυνησία (Axiak *et al.*, 1995; Terlizzi *et al.*, 1999; Trigui El Menif *et al.*, 2006; Lahbib *et al.*, 2008).

1.4 *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867)

Το γαστερόποδο *Nassarius nitidus* ανήκει στην οικογένεια Nassariidae (Prosobranchia: Neogastropoda). Έχει ευρεία εξάπλωση και εντοπίζεται στην Μεσόγειο καθώς και στις ευρωπαϊκές και βορειοαφρικανικές ακτές του Ατλαντικού Ωκεανού (Rolán & Luque, 1995; Sanjuan *et al.*, 1997). Το *N. nitidus* εκτίθεται στο TBT λόγω της διατροφικής συμπεριφοράς του ως πτωματοφάγος. Πρόκειται για ένα δραστήριο και ευκίνητο ζώο, το οποίο μπορεί να συρθεί γρήγορα, προκειμένου να εντοπίσει κάποιο πτώμα ή να αποφύγει θηρευτές. Εμφανίζει ανθεκτικότητα σε ένα μεγάλο εύρος αλατότητας (9-45‰) και θερμοκρασίας (0-33°C) και είναι καλά προσαρμοσμένο στην κατώτερη υποπαλιρροιακή και διαπαλιρροιακή ζώνη (έως 15 m βάθος). Εντοπίζεται γύρω από βραχώδεις ακτές και τμήματα (patches) άμμου με λεπτό χαλίκι, σε περιοχές με *Zostera* και συναθροίσεις μυδιών *Mytilus*, καθώς και όπου υπάρχουν εκχύσεις γλυκού νερού τα οποία πέφτουν στην θάλασσα.

Το είδος μελετήθηκε για πρώτη φορά από τους Magnusson *et al.* (2005) στην Σουηδία και στη συνέχεια στην Ιταλία και την Ισπανία (Pavoni *et al.*, 2007; Berto *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009), όπου προτάθηκε ως ένα κατάλληλο είδος για την παρακολούθηση της ρύπανσης από το TBT, κυρίως στις λιμνοθάλασσες. Με βάση αυτές τις εργασίες, θεωρείται λιγότερο ευαίσθητο από το *H. trunculus* (Pavoni *et al.*, 2007; Lahbib *et al.*, 2011), ενώ φαίνεται ότι επιδεικνύει παρόμοια απόκριση στο TBT με το συμπάτριο είδος *Nassarius reticulatus* (Rodriquez *et al.*, 2009).

Στόχος

Η παρούσα μελέτη έχει ως κύριους στόχους:

α) τη διερεύνηση της τρέχουσας έκτασης του φαινομένου *improsex* σε γαστερόποδα *Hexarplex trunculus* από περιοχές στη Μεσόγειο και τον Ατλαντικό, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη συνολική δραστηριότητα ναυσιπλοΐας,

β) τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των οργανοκασσιτερικών ενώσεων στους ιστούς των γαστερόποδων *Hexarplex trunculus* και *Nassarius nitidus*, καθώς και στα ιζήματα από τις περιοχές μελέτης και

γ) την σύγκριση μεταξύ διαφορετικών ειδών γαστερόποδων με σκοπό την ανάδειξη του πιο ευαίσθητου βιοδείκτη ως προς την έκθεση σε TBT.

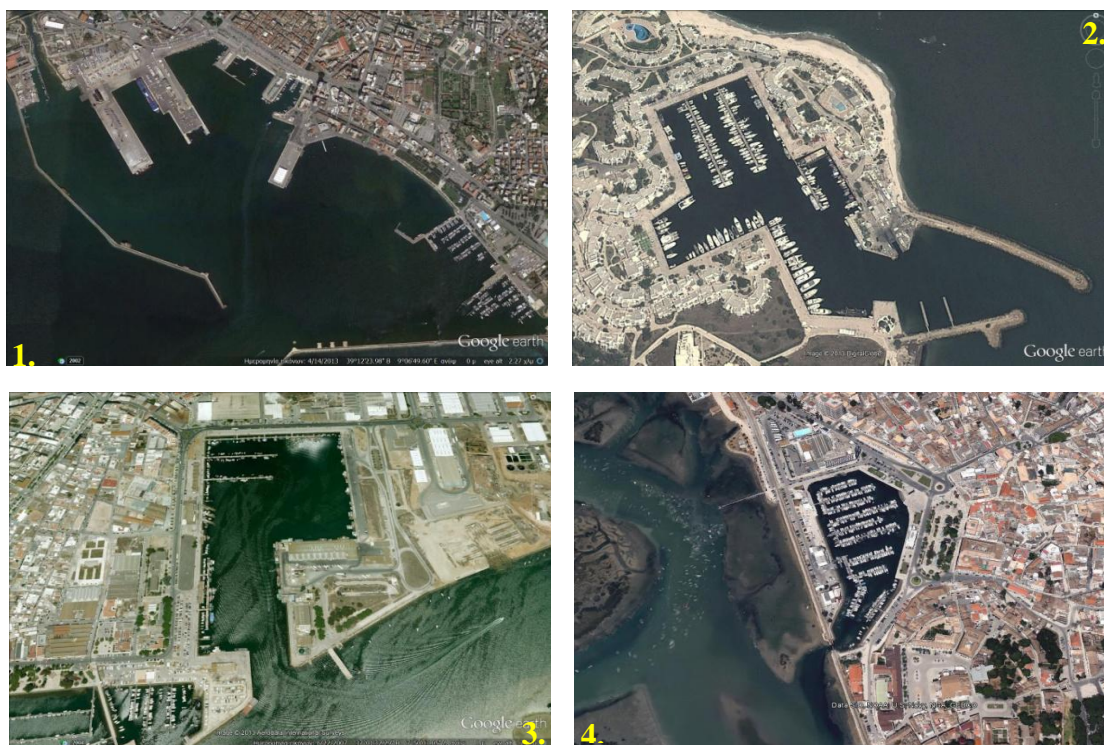
Η αξιολόγηση της συχνότητας εμφάνισης και του βαθμού *improsex*, τα οποία συσχετίζονται με τα επίπεδα της ρύπανσης, δίνει τη δυνατότητα της εκτίμησης της επιβάρυνσης των συγκεκριμένων περιοχών από TBT, ενώ παράλληλα, παρέχει πρόσθετα στοιχεία που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βάση για μελλοντικά προγράμματα παρακολούθησης και επιτήρησης της χρονικής εξέλιξης της ρύπανσης στις υπό μελέτη περιοχές.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 202 δείγματα *Hexarlex trunculus* τα οποία συλλέχθηκαν από τις περιοχές Cagliari (Σαρδηνία), El Kantaoui (Τυνησία) και Ria Formosa (Οlhão, Πορτογαλία) και 46 δείγματα *Nassarius nitidus* τα οποία συλλέχθηκαν από την Ria Formosa (Faro, Πορτογαλία). Οι τέσσερις περιοχές διαφέρουν ως προς τον βαθμό παρουσίας και κίνησης πλοίων και σκαφών (Εικ. 1,2, Πίν. 1).



Εικόνα 1. Περιοχές δειγματοληψίας.



Εικόνα 2. Περιοχές δειγματοληψίας: 1. Cagliari (Σαρδηνία), 2. El Kantaoui (Τυνησία) 3. Olhão (Ria Formosa, Πορτογαλία), 4. Faro (Ria Formosa, Πορτογαλία).

Πίνακας 1. Σύνομη περιγραφή των περιοχών δειγματοληψίας.

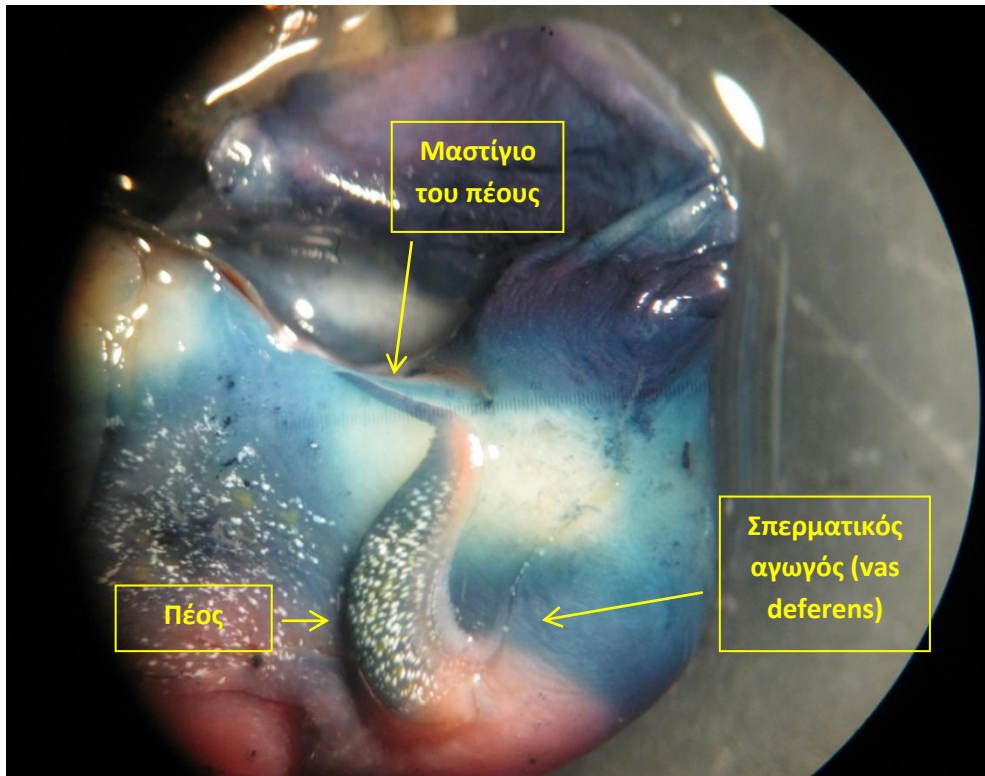
Περιοχή δειγματοληψίας	Είδος	Δραστηριότητα ναυσιπλοΐας	Σχετικά χαρακτηριστικά	Αριθμός εξετασθέντων ατόμων
Cagliari (Σαρδηνία)	<i>Hexaplex trunculus</i>	πολύ υψηλή	μεγάλο απάνεμο λιμάνι, επιβατικά & εμπορικά πλοία, αλιευτικά πλοία, τουριστικά σκάφη, κρουαζιερόπλοια	60
El Kantaoui (Τυνησία)	<i>Hexaplex trunculus</i>	μέτρια	τεχνητό λιμάνι, αλιευτικά σκάφη, σκάφη πολυτελείας, σκάφη για αθλητικές δραστηριότητες	59
Olhão (Ria Formosa, Πορτογαλία)	<i>Hexaplex trunculus</i>	μέτρια - υψηλή	λιμάνι με εμπορικά αλιευτικά σκάφη & σκάφη αναψυχής	83
Faro (Ria Formosa, Πορτογαλία)	<i>Nassarius nitidus</i>	μέτρια - υψηλή	λιμάνι με εμπορικά αλιευτικά σκάφη & σκάφη αναψυχής	46

Τα δείγματα *H. trunculus* συλλέχθηκαν το Μάιο του 2012 με ελεύθερη κατάδυση (snorkelling), ενώ τα δείγματα *N. nitidus* με τη χρήση δολώματος κατά την χρονική περίοδο της άμπωτης. Το σύνολο των ατόμων διατηρήθηκε στην κατάψυξη στους -20°C μέχρι την πραγματοποίηση των μορφολογικών και χημικών αναλύσεων.

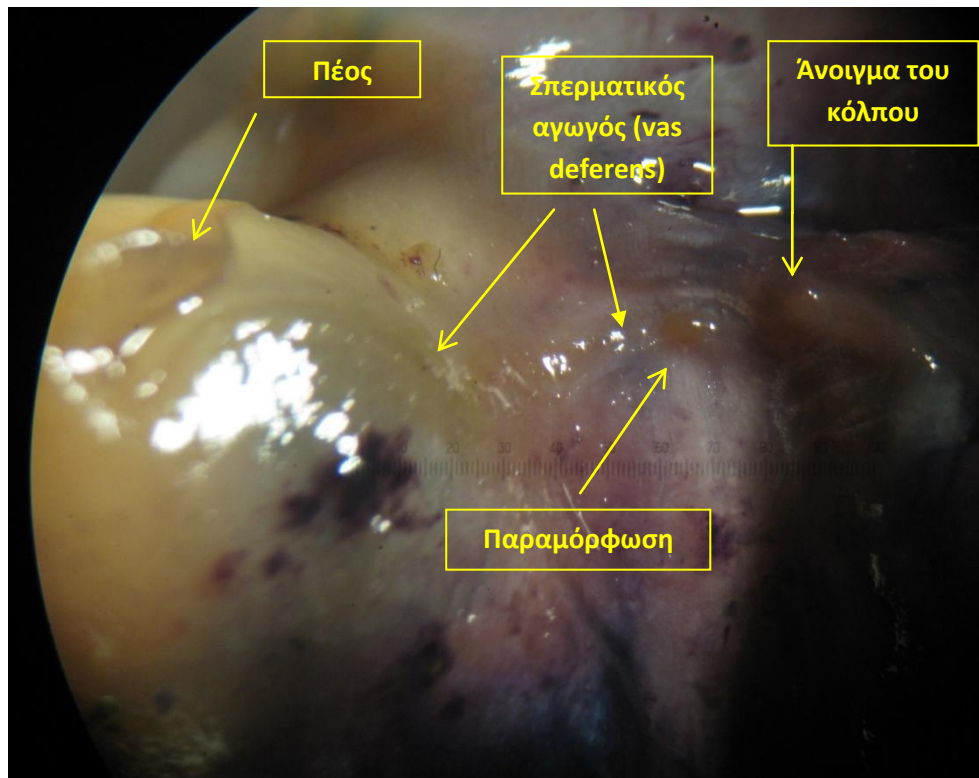
2.1 Μορφολογικές αναλύσεις

Τα δείγματα *Hexaplex trunculus* αποψύχθηκαν και το μήκος του οστράκου μετρήθηκε στο πλησιέστερο 0,1 χιλιοστό με τη βοήθεια ενός ψηφιακού παχύμετρου. Στη συνέχεια, με μια μέγγενη πάγκου θρυμματίστηκε το όστρακο και το μαλακό τμήμα του οργανισμού αφαιρέθηκε προσεχτικά. Η μανδουακή κοιλότητα ανοίχθηκε κάτω από το στερεοσκόπιο με κατά μήκος τομή του υποβραγχιακού αδένου προκειμένου να αποκαλυφθεί ο αγωγός. Εξαιτίας της συχνής εμφάνισης αρσενικών σεξουαλικών χαρακτηριστικών στα θηλυκά άτομα που συλλέγονται από περιοχές με υψηλά επίπεδα ρύπανσης, η παρουσία/απουσία του πέους δεν ήταν επαρκής για την διάκριση μεταξύ των δύο φύλων (Εικ. 3,4). Συνεπώς, τα θηλυκά άτομα αναγνωρίστηκαν με βάση την ύπαρξη του ανοίγματος του κόλπου και του αδένου παραγωγής των κάψουλων αυγών (egg capsule gland, Εικ. 4), χαρακτηριστικά που εμφανίζονται τόσο στα φυσιολογικά θηλυκά όσο και στα θηλυκά άτομα με imrosex. Το μήκος του σπερματικού αγωγού (vas deferens) και το συνολικό μήκος του πέους (από τη βάση του πέους μέχρι την άκρη του μαστιγίου του πέους, Εικ. 3)

μετρήθηκαν κάτω από το στερεοσκόπιο είτε με τη χρήση μικρο-βαθμολογημένης κλίμακας (στα πολύ μικρά μεγέθη), είτε με ψηφιακό παχύμετρο (στα μεγαλύτερα). Παράλληλα, καταγράφηκαν οποιεσδήποτε παραμορφώσεις παρουσιάστηκαν στα χαρακτηριστικά φύλου, τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά άτομα (Εικ. 4).



Εικόνα 3. Αρσενικό άτομο *H. trunculus* από το λιμάνι Cagliari της Σαρδηνίας.



Εικόνα 4. Θηλυκό άτομο *H. trunculus* με imrosex και παραμόρφωση από το λιμάνι Cagliari της Σαρδηνίας.

Η συχνότητα και τα επίπεδα του imrosex ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τους παρακάτω δείκτες:

- Συχνότητα εμφάνισης imrosex (I (%)= αριθμός των θηλυκών με imrosex / συνολικός αριθμός θηλυκών * 100).
- Δείκτης Σχετικού Μήκους του Πέους (Relative penis length index, RPLI = μέσο μήκος του πέους των θηλυκών / μέσο μήκος του πέους των αρσενικών * 100)
- Δείκτης Σχετικού Μεγέθους του Πέους (Relative penis size index, RPSI = ([μέσο μήκος του πέους των θηλυκών]³ / [μέσο μήκος του πέους των αρσενικών]³ * 100)
- Δείκτης Vas Deferens Sequence (VDSI = άθροισμα των τιμών των σταδίων imrosex των θηλυκών / συνολικό αριθμό θηλυκών με imrosex)

Ο προσδιορισμός των σταδίων imrosex (στάδια 1-5) στα θηλυκά άτομα έγινε με βάση τις εργασίες των Terlizzi *et al.* (1999) και Lahbib *et al.* (2008a). Τα δύο συστήματα εξέλιξης του imrosex χρησιμοποιήθηκαν συμπληρωματικά, καθώς οι προαναφερθείσες εργασίες διέφεραν ως προς τη σειρά εμφάνισης και το μέγεθος

του πέους και του σπερματικού αγωγού. Εν συντομία, τα στάδια που καταγράφηκαν ήταν τα εξής:

Στάδιο 0: φυσιολογικό θηλυκό

Στάδιο 1: παρουσία αρχόμενου πολύ μικρού πέους πίσω από τη δεξιά οφθαλμική κεραία, απουσία σπερματικού αγωγού

Στάδιο 1d: απουσία πέους, παρουσία τμήματος σπερματικού αγωγού, η δημιουργία του οποίου ξεκινά στο μέσον της απόστασης μεταξύ της δυνητικής θέσης του πέους και του κολπικού ανοίγματος

Στάδιο 2: παρουσία ανεπτυγμένου πέους πίσω από τη δεξιά οφθαλμική κεραία, απουσία σπερματικού αγωγού

Στάδιο 2d: απουσία πέους, παρουσία σπερματικού αγωγού στο μέσον της απόστασης μεταξύ της δυνητικής θέσης του πέους και του κολπικού ανοίγματος που αναπτύσσεται και προς τις δυο κατευθύνσεις

Στάδιο 2d': παρουσία αρχόμενου πολύ μικρού πέους πίσω από τη δεξιά οφθαλμική κεραία, παρουσία σπερματικού αγωγού που συνεχίζει να αναπτύσσεται από το μέσον και προς τις δυο κατευθύνσεις

Στάδιο 3d: παρουσία πολύ μικρού πέους, ο σπερματικός αγωγός αναπτύσσεται ξεκινώντας από το πέος αλλά δεν έχει φτάσει ακόμα στο κολπικό άνοιγμα

Στάδιο 3: παρουσία ανεπτυγμένου πέους, ο σπερματικός αγωγός ξεκινά να αναπτύσσεται από το πέος αλλά δεν έχει φτάσει ακόμα στο κολπικό άνοιγμα

Στάδιο 4d: παρουσία μικρού πέους χωρίς μαστίγιο, ο σπερματικός αγωγός είναι πλήρης από το πέος μέχρι το άνοιγμα του κόλπου

Στάδιο 4: παρουσία ανεπτυγμένου πέους, ο σπερματικός αγωγός είναι πλήρης από το πέος μέχρι το άνοιγμα του κόλπου

Στάδιο 4.3: παρουσία πέους, ο σπερματικός αγωγός φτάνει και περνάει το άνοιγμα του κόλπου

Στάδιο 4.7: παρουσία πέους, ο σπερματικός αγωγός περνάει το άνοιγμα του κόλπου και διασχίζει έως και το 30% του αγωγού παραγωγής των κάψουλων αυγών (capsule gland)

Στάδιο 5: παρουσία πέους, ο σπερματικός αγωγός έχει διαπεράσει και πιθανόν σκίσει τον αγωγό παραγωγής των κάψουλων αυγών, το κολπικό άνοιγμα απουσιάζει

Για τον αριθμητικό υπολογισμό του δείκτη VDS και με κριτήριο το μήκος του σπερματικού αγωγού, τα στάδια 1d και 2d' θωρήθηκαν ότι ανήκουν στο στάδιο 1, τα στάδια 2d και 3d στο στάδιο 3, ενώ το στάδιο 4d στο στάδιο 4.

2.2 Χημικές αναλύσεις

Τα ιζήματα και οι ιστοί από τα δείγματα *Hexaplex trunculus* από την Σαρδηνία (Cagliari), την Τυνησία (El Kantaoui) και την Πορτογαλία (Ria Formosa, Olhão), καθώς και ιζήματα και ιστοί από θηλυκά άτομα του είδους *Nassarius nitidus* από το Faro (Ria Formosa) της Πορτογαλίας, αναλύθηκαν, με στόχο να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις του τριβουτυλοκασιτέρου (TBT), διβουτυλοκασιτέρου (DBT), μονοβουτυλοκασιτέρου (MBT) και τριφαιτυλοκασιτέρου (TPHT). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ενώσεων ήταν το ίδιο για τους ιστούς και τα ιζήματα.

Πιο συγκεκριμένα, 0,1 g λυοφιλοποιημένου, ομογενοποιημένου ιστού (ή ιζήματος αντίστοιχα) ζυγίστηκαν σε πλαστικό σωλήνα χωρητικότητας 15 mL και προστέθηκαν 50 μL διαλύματος τριπροτυλοκασιτέρου (TPrT) $4.0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (συνολικά 198 ng) ως πρότυπο ανάκτησης (surrogate standard, Sur. S.). Στη συνέχεια προστέθηκαν 11 mL μεθανολικού διαλύματος τροπολόνης (0.03% κ.β.) και 1 mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος (37% κ.ό.) και ακολούθησε εκχύλιση των οργανοκασιτερικών ενώσεων από το στερεό δείγμα με τη χρήση λουτρού υπερήχων (30 λεπτά, 50°C). Μετά από την εκχύλιση, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 9.000 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5810 R, F-34-6-38) και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη. Η διαδικασία εκχύλισης επαναλήφθηκε άλλη μια φορά και τα δύο υγρά εκχυλίσματα ενοποιήθηκαν στη διαχωριστική χοάνη. Σε αυτά προστέθηκαν 15 mL διχλωρομεθάνιου και 100 mL υδατικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου 5% β.ό. και εφαρμόστηκε η μέθοδος της υγρής-υγρής εκχύλισης (liquid-liquid extraction) για την μεταφορά των οργανοκασιτερικών ενώσεων από την υδατική/μεθανολική φάση στην οργανική φάση (διχλωρομεθάνιο). Για την επίτευξη της υγρής-υγρής εκχύλισης πραγματοποιήθηκε έντονη ανακίνηση για 20 δευτερόλεπτα και έπειτα το δείγμα αφέθηκε σε ηρεμία για περίπου 40 λεπτά μέχρι τον διαχωρισμό των φάσεων. Ακολούθως, η οργανική φάση

(κάτω στιβάδα) απομακρύνθηκε από τη διαχωριστική χοάνη και εκλούστηκε μέσα από μια υάλινη στήλη πακεταρισμένη με θειικό νάτριο (1.5 g) για να επιτευχθεί πλήρης αφυδάτωση από τυχόν υπολείμματα νερού. Το αφυδατωμένο εκχύλισμα συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και μετά την προσθήκη 4 mL ισοοκτανίου εξατμίστηκε μέχρι τα 1.5 mL με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα. Στη συνέχεια, το δείγμα μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωλήνα και ο όγκος του μειώθηκε περαιτέρω στο 1.0 mL με εξάτμιση υπό ήπιο ρεύμα αζώτου. Στο δείγμα προστέθηκαν 0.5 mL διαλύματος βρωμιούχου πεντυλμαγνησίου (2M) σε διαιθυλαιθέρα, προκειμένου να επιτευχθεί η παραγοντοποίηση (derivatization) των οργανοκασσιτερικών ενώσεων (pentylation) μέσω της αντίδρασης Grignard (40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου). Μετά την προσθήκη 4 mL εξανίου, η περίσσεια του αντιδραστήριου Grignard καταστράφηκε με την προσθήκη 5 mL θειικού οξέος (1M). Η οργανική φάση (πάνω στιβάδα) μεταφέρθηκε σε απιοειδή φιάλη και εξατμίστηκε μέχρι το 1 mL με την χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα. Για τον καθαρισμό του δείγματος χρησιμοποιήθηκε γυάλινη στήλη πακεταρισμένη με 1 g florisil (Sigma Aldrich, 60-100 mesh, ενεργοποιημένη στους 300 °C για 3 ώρες). Το συμπυκνωμένο εκχύλισμα τοποθετήθηκε στην στήλη και ακολούθησε έκλυση των πεντυλιωμένων (pentylated) οργανοκασσιτερικών ενώσεων χρησιμοποιώντας 4 mL διαλύματος εξάνιο-διχλωρομεθάνιο (4:1). Τέλος, στο κλάσμα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων προστέθηκαν 50 μL διαλύματος τετραβουτυλοκασσίτερου (TeBT) $3.8 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (συνολικά 191 ng) ως εσωτερικό πρότυπο (internal standard, I.S.), ακολούθησε εξάτμιση στα 200 μL υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και το δείγμα αναλύθηκε σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρία μάζας (GC-MS).

Η εισαγωγή (injection) του δείγματος στη χρωματογραφική στήλη έγινε με τη χρήση μικροσύριγγας χωρητικότητας 10 μL . Μικρός όγκος δείγματος (1 μL) εγχύθηκε στον αέριο χρωματογράφο (Hewlett-Packard 6890 Series GC) ο οποίος ήταν συνδεδεμένος με έναν φασματογράφο μάζας (Hewlett-Packard 5972A MS). Οι αναλυόμενες ουσίες διαχωρίστηκαν σε τριχοειδή στήλη OPTIMA 5-MS Accent (Macherey-Nagel, χαρακτηριστικά: 30 m μήκος, 0.25 mm εσωτερική διάμετρο και 0.25 μm πάχος υμενίου) χρησιμοποιώντας ήλιο ως φέρον αέριο (σταθερή γραμμική ταχύτητα 38 cm s^{-1}). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης ξεκινούσε από τους 50 °C (1.4 λεπτά ισοθερμική αναμονή) και αυξάνονταν στους 110 °C, με ρυθμό 110

$^{\circ}\text{C min}^{-1}$, και έπειτα στους 290°C με ρυθμό $4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (10 λεπτά αναμονή). Η θερμοκρασία του εισαγωγέα είχε ρυθμιστεί στους 240°C και η εισαγωγή του δείγματος έγινε χωρίς διαμοιρασμό ροής (splitless mode) για χρονικό διάστημα 1.4 min (splitless time). Η θερμοκρασία στη γραμμή διασύνδεσης του αέριου χρωματογράφου με το φασματογράφο μάζας (transferline) είχε ρυθμιστεί στους 290°C , ενώ η θερμοκρασία λειτουργίας στην πηγή ιονισμού ήταν 180°C . Η ενέργεια της δέσμης ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκε για την θραυσματοποίηση των ενώσεων στην πηγή ιόντων είχε ρυθμιστεί στα 70 eV. Η λειτουργία του φασματογράφου μάζας είχε τεθεί σε κατάσταση επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring; SIM mode). Οι ενώσεις που μελετήθηκαν και τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά τους (χρόνοι έκλουσης, χαρακτηριστικά ιόντα) δίνονται στον Πίνακα 2.

Για τον έλεγχο και τη διασφάλιση της ποιότητας των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του ποσοστού ανάκτησης του τριπροπυλοκασιτέρου (TPrT, πρότυπο ανάκτησης) σε όλα τα δείγματα ιστών και ιζημάτων που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία. Ο μέσος όρος ανάκτησης του TPrT ήταν $112\pm 9\%$, υποδεικνύοντας ότι οι απώλειες των οργανοκασιτερικών ενώσεων κατά την κατεργασία των δειγμάτων ήταν μηδαμινές. Επίσης, παρασκευάστηκαν τυφλά δείγματα (blanks) που περιελάμβαναν όλα τα αντιδραστήρια αλλά χωρίς την προσθήκη ποσότητας ιστού ή ιζήματος και τα οποία αναλύθηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως τα πραγματικά δείγματα. Σε κανένα από τα τυφλά δείγματα δεν ανιχνεύτηκαν οργανοκασιτερικές ενώσεις υποδεικνύοντας ότι η επιμόλυνση των δειγμάτων κατά την διάρκεια των εργαστηριακών διαδικασιών ήταν αμελητέα. Επιπρόσθετα, αναλύθηκε πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (ERM-CE477, ιστός από μύδι) προκειμένου να εκτιμηθεί η ακρίβεια της αναλυτικής μεθόδου. Η πραγματοποίηση τριών επαναληπτικών μετρήσεων του υλικού αναφοράς είχε ως αποτέλεσμα τις ακόλουθες συγκεντρώσεις (σε $\mu\text{g g}^{-1}$ ξηρού βάρους): 1.7 ± 0.5 για το MBT, 1.6 ± 0.3 για το DBT και 2.2 ± 0.1 για το TBT. Οι συγκεκριμένες τιμές αυτές ήταν σε πλήρη ταύτιση με τις πιστοποιημένες τιμές (1.5 ± 0.3 , 1.5 ± 0.1 και $2.2\pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ για το MBT, DBT και TBT, αντίστοιχα) και κατέδειξαν ότι η αναλυτική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν ικανοποιητικής ακρίβειας και επαναληψιμότητας.

Τέλος, για τα ιζήματα υπολογίστηκε ο δείκτης βιοαποικοδόμησης βουτυλοκασσίτερου (Butyltin Degradation Index, BDI), με στόχο να ελεγχθεί η ύπαρξη ενδεχόμενης πρόσφατης εισροής στις περιοχές δειγματοληψίας. Ο δείκτης BDI υπολογίστηκε με βάση την γραμμομοριακή αναλογία των προϊόντων αποικοδόμησης (DBT + MBT) προς την κύρια ένωση, τον τριβουτυλοκασσίτερο (TBT). Για τιμές του δείκτη μικρότερες της μονάδας θεωρείται ότι η διαδικασία αποικοδόμησης είναι πολύ χαμηλή και ότι υπήρξε σχετικά πρόσφατη εισροή βουτυλοκασσιτερικών ενώσεων στην περιοχή μελέτης (Diez *et al.*, 2002).

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά και χρόνοι κατακράτησης των παρατηρούμενων ενώσεων.

No	Οργανοκασσιτερική ένωση	Μοριακό βάρος	Χρόνος κατακράτησης	Ιόν ποσοτικοποίησης (m/z)	Ιόν προσδιορισμού (m/z)
1	Tripropyltin (Sur.S.)	319.11	20.31	275±3	205±3
2	Tetrabutyltin (I.S.)	347.17	24.29	289±3	177±3
3	Tributyltin	361.19	26.61	303±3	177±3
4	Dibutyltin	375.22	28.82	317±3	191±3
5	Butyltin	389.25	30.91	317±3	191±3
6	Tripentyltin	403.27	32.91	331±3	191±3
7	Phenyltin	409.24	36.65	197±3	338±2
8	Diphenyltin	415.20	40.08	343±3	273±3
9	Triphenyltin	421.16	43.43	349±3	195±3

2.3 Στατιστικές αναλύσεις

2.3.1 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων

Πριν την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, οι μη ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις του τριφαινυλοκασσίτερου (TPHT) αντικαταστάθηκαν με 1 ng g^{-1} που ήταν το ήμισυ του ορίου ανίχνευσης (2 ng g^{-1}). Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν πίνακες με το σύνολο των μετρήσεων των μορφολογικών χαρακτηριστικών και των χημικών αναλύσεων.

2.3.2 Συγκρίσεις μεταξύ των δειγμάτων

Για τον έλεγχο της κανονικότητας των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Anderson-Darling, ενώ για τον έλεγχο των ίσων διακυμάνσεων

χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Bartlett, F (F-test) ή Levene (ανάλογα με την κανονικότητα ή μη των δεδομένων).

Για τον έλεγχο στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των μορφολογικών χαρακτηριστικών ή/και των συγκεντρώσεων των οργανοκασσιτερικών ενώσεων ανάμεσα στα θηλυκά άτομα και τα ιζήματα από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκε ανάλυση ANOVA, με την προϋπόθεση ότι τα δεδομένα ακολουθούσαν κανονική κατανομή και οι διακυμάνσεις τους ήταν ίσες. Στις περιπτώσεις που οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$), πραγματοποιήθηκε Post-Hoc έλεγχος με πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων ανά ζεύγη με το κριτήριο Tukey (Tukey's pairwise comparisons). Για τις συγκρίσεις των δειγμάτων ανά δύο σε επίπεδο είδους και σε επίπεδο φύλου (αρσενικά, θηλυκά) στις διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος 2 δειγμάτων (2-samples t-test). Στις περιπτώσεις όπου η μία ή και οι δύο προαναφερθείσες προϋποθέσεις δεν πληρούνταν, χρησιμοποιήθηκαν οι μη-παραμετρικοί έλεγχοι Mann-Whitney (2 δείγματα), Kruskal-Wallis (για 3 ή περισσότερα δείγματα) και Mood's Median. Στις περιπτώσεις που οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων μετά τον μη-παραμετρικό έλεγχο Kruskal-Wallis ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$), πραγματοποιήθηκε Post-Hoc έλεγχος Mann-Whitney ανά δύο δείγματα με διόρθωση κατά Bonferroni (Bonferroni correction) και προσαρμοσμένο επίπεδο σημαντικότητας ίσο με α/s , όπου α = ο αριθμός των συγκρίσεων. Η κανονικοποίηση των δεδομένων επιτεύχθηκε σε ορισμένες περιπτώσεις με τον μετασχηματισμό τους σε δεκαδικό λογάριθμο ή τετραγωνική ρίζα, όπου αυτό ήταν απαραίτητο. Σε όλους τους ελέγχους η απόρριψη των μηδενικών υποθέσεων H_0 έγινε σε στατιστικό επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0.05$.

2.3.3 Συσχέτιση μεταξύ μορφολογικών χαρακτηριστικών και χημικών ενώσεων

Για την εύρεση της συσχέτισης μεταξύ των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στους ιστούς των γαστερόποδων και των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ζώων χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (Pearson's r). Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης κάθε ένωσης στους ιστούς με τα αντίστοιχα μορφολογικά χαρακτηριστικά διερευνήθηκε ξεχωριστά για τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα

(λογαριθμισμένα δεδομένα) και εκτιμήθηκε με απλή γραμμική παλινδρόμηση (simple linear regression analysis, SLR) της μορφής:

$$\log C = \alpha \log A + I$$

όπου C είναι η συγκέντρωση κάθε οργανοκασσιτερικής ένωσης, A είναι το εκάστοτε μορφολογικό χαρακτηριστικό του γαστερόποδου (μήκος οστράκου, μήκος πέους, μήκος σπερματαγωγού), I η σταθερά (intercept) και α ο συντελεστής παλινδρόμησης για το κάθε χαρακτηριστικό. Οι συντελεστές παλινδρόμησης που προέκυψαν από την ανάλυση SLR θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικοί σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

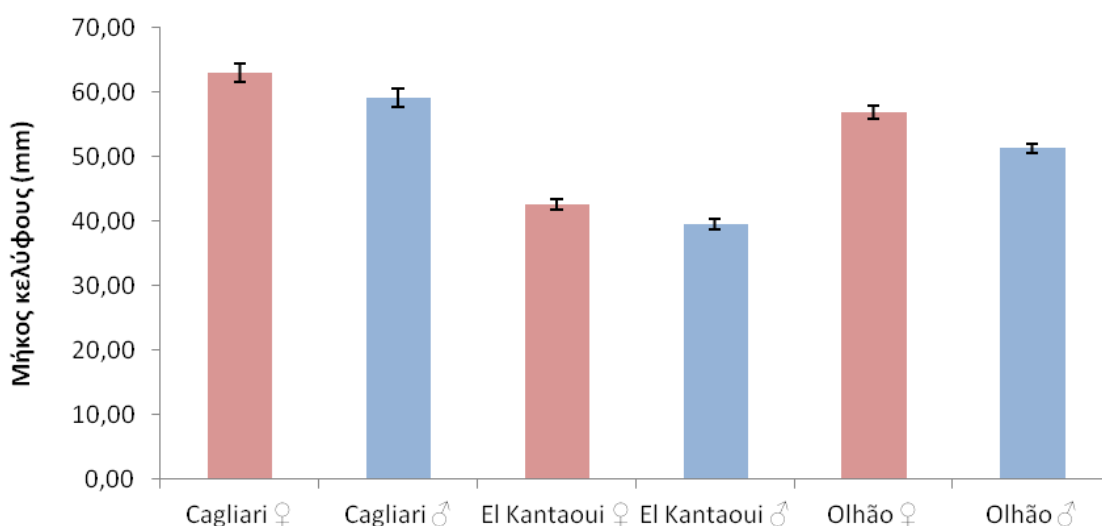
2.3.4 Λογισμικό

Η κατασκευή γραφημάτων και πινάκων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Microsoft Office Excel, ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τα στατιστικά πακέτα Minitab 13 (Ryan *et al.*, 1972, Pennsylvania State University) και Statistica 8.0 (StatSoft, Inc. (2007)).

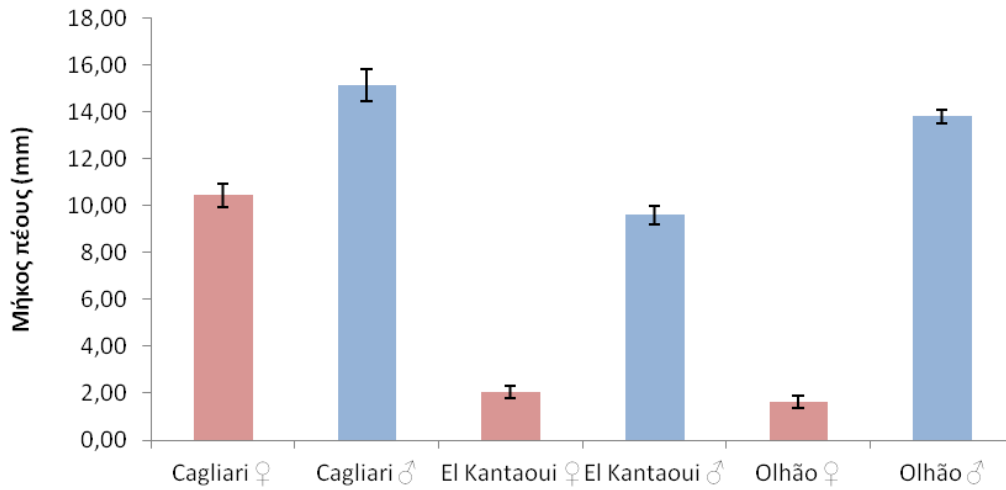
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

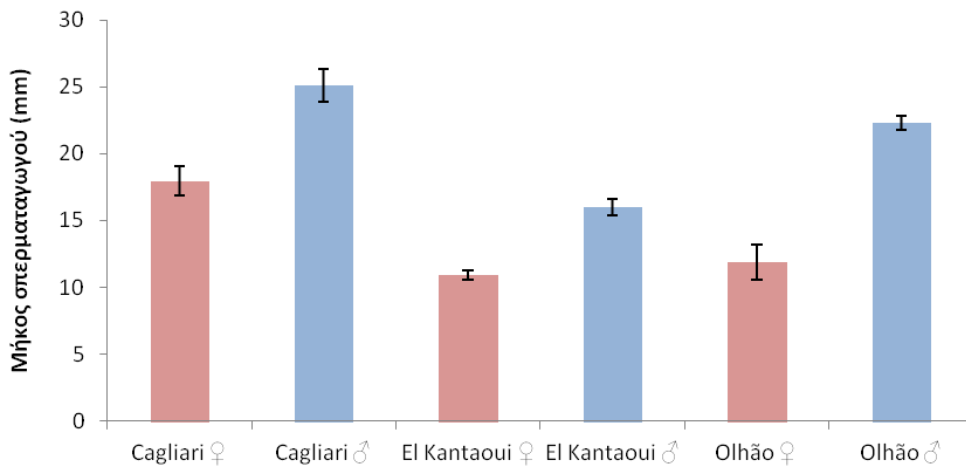
Ο Πίνακας 3 συνοψίζει τα βιομετρικά δεδομένα των πληθυσμών *Hexaplex trunculus* που μελετήθηκαν από τις τρεις διαφορετικές περιοχές, καθώς και τους διάφορους δείκτες *improsex* που υπολογίστηκαν. Στην Εικόνα 5 απεικονίζεται το μήκος του οστράκου στα θηλυκά και αρσενικά άτομα από τις τρεις περιοχές μελέτης. Παρατηρείται ότι τα θηλυκά άτομα από το El Kantaoui (Τυνησία) και το Olhão (Πορτογαλία), τόσο τα φυσιολογικά όσο και εκείνα με *improsex*, είχαν μεγαλύτερο όστρακο συγκριτικά με τα αρσενικά άτομα (El Kantaoui: 2-sample $T=4.51$, $p<0.001$, Olhão: 2-sample $T=2.82$, $p=0.007$), ενώ οι διαφορές στο μήκος του οστράκου μεταξύ των ατόμων διαφορετικού φύλου στο Cagliari (Σαρδηνία) ήταν οριακά μη στατιστικά σημαντικές (2-sample $T=1.99$, $p=0.052$). Αντίθετα, σε όλες τις περιοχές μελέτης τα αρσενικά άτομα εμφάνιζαν μεγαλύτερα μεγέθη πέους και σπερματικού αγωγού (VD) σε σχέση με τα θηλυκά άτομα (Εικ. 6,7) (Cagliari: 2-sample $T=-5.80$, $p<0.001$ [μήκος πέους], 2-sample $T=-4.44$, $p<0.001$ [μήκος VD], El Kantaoui: 2-sample $T=-16.83$, $p<0.001$ [μήκος πέους], 2-sample $T=-7.15$, $p<0.001$ [μήκος VD], Olhão: 2-sample $T=-23.60$, $p<0.001$ [μήκος πέους], 2-sample $T=-8.97$, $p<0.001$ [μήκος VD]).



Εικόνα 5. Μέση τιμή του μήκους οστράκου (mm) με τυπικό σφάλμα ($\pm SE$) για τα αρσενικά και θηλυκά άτομα ανά περιοχή δειγματοληψίας.



Εικόνα 6. Μέση τιμή του μήκους πέους (mm) με τυπικό σφάλμα (\pm SE) για τα αρσενικά και θηλυκά άτομα ανά περιοχή δειγματοληψίας.



Εικόνα 7. Μέση τιμή του μήκους σπερματαγωγού (VD) (mm) με τυπικό σφάλμα (\pm SE) για τα αρσενικά και θηλυκά άτομα ανά περιοχή δειγματοληψίας.

Συγκρίσεις μεταξύ των θηλυκών ατόμων από διαφορετικές περιοχές έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο ως προς το μήκος του οστράκου, όσο και ως προς το μήκος του πέους και του σπερματικού αγωγού. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα από το λιμάνι Cagliari της Σαρδηνίας παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές και στα τρία μορφολογικά χαρακτηριστικά (μήκος οστράκου: One-way ANOVA $F=93.31$, $p<0.001$, Tukey's pairwise comparisons, μήκος πέους: One-way ANOVA $F=182.80$, $p<0.001$, Tukey's pairwise comparisons, μήκος σπερματικού αγωγού: Kruskal-Wallis $H=35.44$, $p<0.001$, Mann-Whitney με διόρθωση κατά Bonferroni) (Εικ. 5-7). Από την ανάλυση ANOVA και τον Post-Hoc έλεγχο, παρατηρήθηκε ότι τα θηλυκά άτομα από το Olhão είχαν μεγαλύτερο όστρακο από τα αντίστοιχα από το El

Kantaoui, ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μήκος του πέους και του σπερματικού αγωγού μεταξύ των δύο αυτών περιοχών (μήκος VD: 2-sample $T=-0.69$, $p=0.503$). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μέγεθος του οστράκου ανάμεσα σε φυσιολογικά θηλυκά και θηλυκά άτομα με imposex από το Olhão (2-sample $T=1.02$, $p=0.316$), όπου ήταν η μοναδική περιοχή που βρέθηκαν φυσιολογικά άτομα.

3.2 Κατανομή του imposex

Στοιχεία imposex καταγράφηκαν σε όλες τις περιοχές μελέτης, ωστόσο ο βαθμός και η έκταση του φαινομένου διαφοροποιούνταν ανάλογα με τον αριθμό και την δραστηριότητα των σκαφών σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας (Πίν. 1, Εικ. 8). Τα στάδια imposex που καταγράφηκαν με βάση τον δείκτη VDSI κυμαίνονταν από 0 (φυσιολογικά θηλυκά) έως 5. Θηλυκά άτομα που βρίσκονταν στο τελικό στάδιο (στ. 5) παρατηρήθηκαν μόνο στο Cagliari (23%, 7 άτομα). Από αυτά το 20% (6 άτομα) θεωρήθηκαν στείρα, δηλαδή το κοιλικό τους άνοιγμα ήταν κλειστό και ο αδένας παραγωγής των κάψουλων αυγών (egg capsule gland) είχε μετατραπεί σε μία άμορφη κολλώδη μάζα (Πίν. 3).

Το σύνολο των θηλυκών ατόμων που συλλέχθηκαν από το Cagliari και το El Kantaoui εμφάνισαν imposex ($I=100\%$), με τους πληθυσμούς αυτούς να παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές του δείκτη VDSI (4.5 και 4.0 αντίστοιχα). Αντίθετα, στο Olhão παρατηρήθηκαν 12 φυσιολογικά άτομα, με την συχνότητα των θηλυκών ατόμων που εμφανίζουν imposex να φτάνει το 60% και τον δείκτη VDSI να παίρνει την χαμηλότερη τιμή (2.8). Επιπλέον, τα θηλυκά άτομα από το Cagliari εμφάνισαν πολύ υψηλότερες τιμές στους δείκτες RPLI (71.5) και RPSI (36.6), συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων από το El Kantaoui (21.2 και 1.0, αντίστοιχα) και το Olhão (11.8 και 0.2, αντίστοιχα) (Πίν. 3).

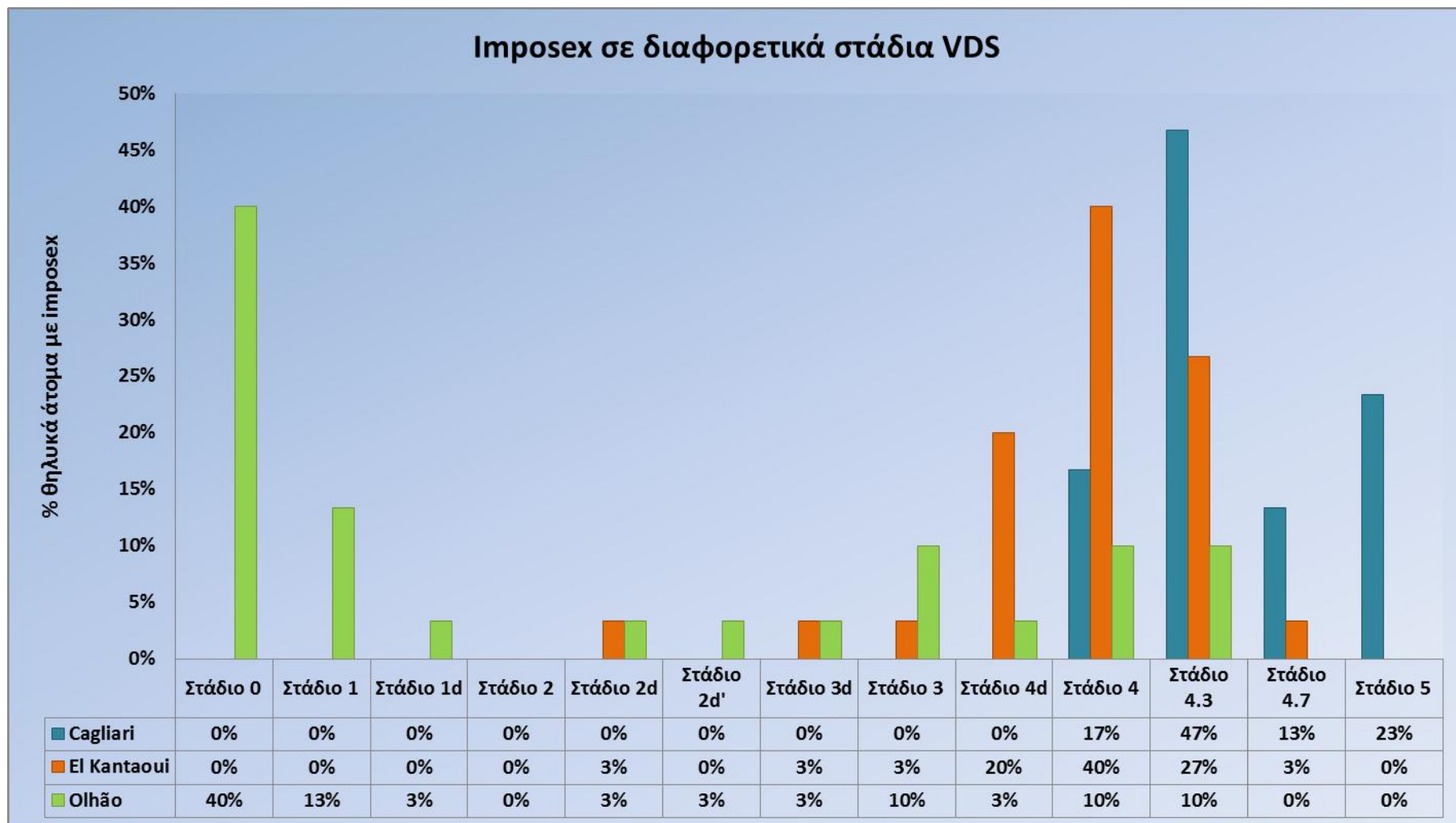
Η συγκεντρωτική κατανομή (%) των θηλυκών ατόμων με imposex σε διαφορετικά στάδια με βάση τον δείκτη VDSI ανά περιοχή δειγματοληψίας δίνεται στην Εικόνα 8. Στο δείγμα από το Cagliari της Σαρδηνίας το 100% των θηλυκών ατόμων εμφάνισε imposex στα τελικά στάδια (στάδια VDS 4-5), ενώ στα δείγματα από το El Kantaoui της Τυνησίας τα άτομα που ανήκαν στα στάδια 4-4.7 καταγράφηκαν σε ποσοστά 90%. Αντίθετα, το μεγαλύτερο ποσοστό των θηλυκών

ατόμων με imrosex από το δείγμα του Oihão (61%) ανήκε σε αρχικά στάδια (στάδια 1-3). Τα δείγματα από το El Kantaoui εμφάνισαν αυξημένα ποσοστά imrosex στο στάδιο 4.3, φτάνοντας το 40%, ενώ το τελικό στάδιο του imrosex (στ. 5) καταγράφηκε μόνο σε θηλυκά άτομα από το δείγμα της Σαρδηνίας σε ποσοστό 23%.

Πίνακας 3. Σύνοψη των βιομετρικών στοιχείων και των δεικτών imposex στους πληθυσμούς *Hexaplex trunculus* από τις περιοχές δειγματοληψίας. (I = συχνότητα εμφάνισης imposex, RPLI = δείκτης σχετικού μήκους του πέους (relative penis length index), RPSI = δείκτης σχετικού μεγέθους του πέους (relative penis size index), VDSI =δείκτης Vas Deferens Sequence)

Περιοχή	Φύλο	Αριθ. ατόμων	Μήκος οστράκου (mm±SE)	Μήκος πέους (mm±SE)	Μήκος VD (mm±SE)	I (%)	Στείρα θηλυκά	RPLI (%)	RPSI (%)	VDSI (%)	Εύρος VDS
<i>Σαρδηνία (Cagliari)</i>	A	30	59.16±1.4	15.13±0.7	25.11±1.2						
	Θ	30	63.00±1.4	10.45±0.5	17.96±1.1	100	6	71.5	36.6	4.5	4-5
<i>Τυνησία (El Kantoui)</i>	A	29	39.49±0.8	9.60±0.4	16.01±0.6						
	Θ	30	42.59±0.8	2.04±0.3	10.92±0.4	100	0	21.2	1.0	4.0	2-4.7*
<i>Πορτογαλία (Olhão)</i>	A	53	51.33±0.7	13.81±0.3	22.31±0.5						
	Θ	30	56.98±1.0	1.62±0.3	11.87±1.3	60	0	11.8	0.2	2.8	1-4.3*

*συμπεριλαμβάνονται τα στάδια 1d, 2d, 2d', 3d, 4d



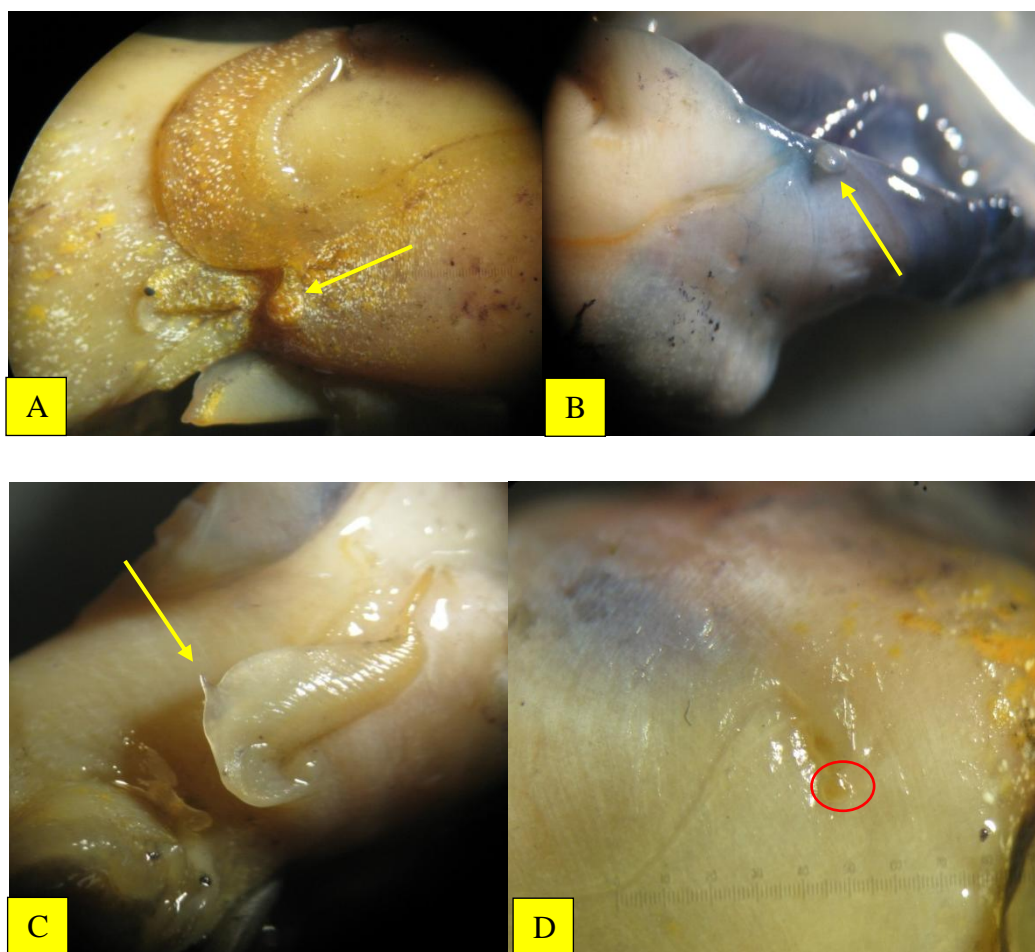
Εικόνα 8. Κατανομή (%) των θηλυκών ατόμων με imposex σε διαφορετικά στάδια με βάση τον δείκτη VDSI ανά περιοχή δειγματοληψίας. Στο στάδιο 0 ανήκουν τα φυσιολογικά θηλυκά άτομα.

3.3 Εξέλιξη του imrosex

Άτομα σε αρχικά στάδια imrosex παρατηρήθηκαν μόνο σε δείγματα *Hexaplex trunculus* από το El Kantaoui και το OIhão (στ. 1-2), ενώ όλα τα δείγματα από το Cagliari βρίσκονταν σε προχωρημένα στάδια imrosex (στ. 4-5). Ως επί το πλείστον, το πρώτο χαρακτηριστικό εμφάνισης imrosex είναι η παρουσία ενός μικρού εξογκώματος πίσω από τη δεξιά οφθαλμική κεραία που στη συνέχεια εξελίσσεται σε πέος. Ωστόσο, αυτός δεν ήταν ο κανόνας για όλα τα θηλυκά άτομα που μελετήθηκαν, καθώς σε τρία άτομα από το OIhão και σε ένα από το El Kantaoui το πρώτο χαρακτηριστικό της εμφάνισης imrosex ήταν η ανάπτυξη ενός μικρού τμήματος σπερματικού αγωγού στην περιοχή ανάμεσα στη θέση του πέους και του κόλπου (στ. 1d, 2d, 2d'). Τα συνολικά άτομα, για τα οποία τα στάδια imrosex (στ. 1d-4d) προσδιορίστηκαν με βάση την εργασία των Lahbib *et al.* (2008a), ήταν κατά πολύ λιγότερα σε αριθμό (13/90) συγκριτικά με εκείνα (77/90) στα οποία ο βαθμός του imrosex προσδιορίστηκε με βάση την πρωταρχική εμφάνιση πέους (Achiak *et al.*, 1995; Terlizzi *et al.*, 1999).

3.4 Παραμορφώσεις

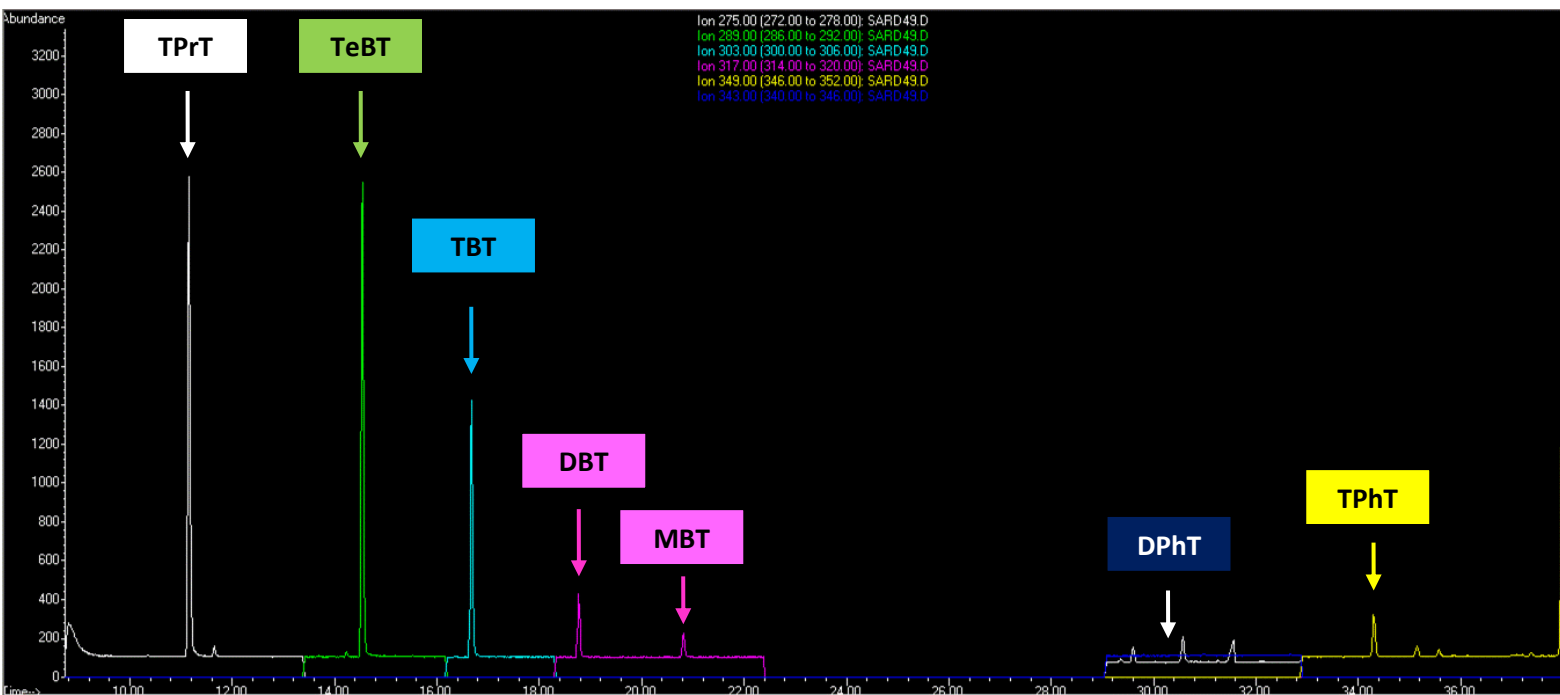
Παραμορφώσεις στο πέος και τον σπερματικό αγωγό παρατηρήθηκαν σε δείγματα και από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας, τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά άτομα με imrosex. Στα αρσενικά άτομα οι παραμορφώσεις αυτές αφορούσαν μικρά εξογκώματα στη μέση ή/και στη βάση του πέους, καθώς και κατά μήκος του σπερματικού αγωγού (Εικ. 9). Οι συγκεκριμένες παραμορφώσεις καταγράφηκαν σε ποσοστό 8% του συνολικού αριθμού αρσενικών ατόμων που μελετήθηκαν από όλες τις περιοχές. Αντίστοιχα, στο 4.4% των θηλυκών ατόμων με imrosex το πέος ήταν δίλοβο στη βάση του ή έφερε μικρό εξογκωμα στη μέση του ή, ακόμα, κατέληγε σε μαστίγιο με στρογγυλοποιημένο άκρο, ενώ καταγράφηκαν και ορισμένα εξογκώματα κατά μήκος του σπερματικού αγωγού (Εικ. 9). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα θηλυκά άτομα που παρουσίασαν τα στοιχεία αυτά ανήκαν σε προχωρημένο στάδιο imrosex (στ. 4-5), με τις περισσότερες παραμορφώσεις να καταγράφονται στο Cagliari, τόσο για τα θηλυκά όσο και για τα αρσενικά άτομα.



Εικόνα 9. Α. Αρσενικό άτομο από το Cagliari με εξόγκωμα στην βάση του πέους, Β. Αρσενικό άτομο από το Cagliari με εξόγκωμα στη μέση του σπερματικού αγωγού, C. Θηλυκό άτομο από το Cagliari με εξόγκωμα στη μέση του πέους, D. Θηλυκό άτομο από το El Kantaoui, όπου το πέος καταλήγει σε στρογγυλοποιημένο άκρο.

3.5 Χημικές αναλύσεις

Οι κατηγορίες των οργανοκασσιτερικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν, τόσο στους ιστούς όσο και στα ιζήματα, ήταν ο τριβουτυλοκασσίτερος (TBT) και τα προϊόντα αποικοδόμησής του, δηλαδή ο διβουτυλοκασσίτερος (DBT) και ο μονοβουτυλοκασσίτερος (MBT, Εικ. 10). Επιπλέον, ανιχνεύτηκαν ποσότητες τριφαινυλοκασσίτερου (TPHT), όχι όμως τα προϊόντα διάσπασής του, δηλαδή ο διφαινυλοκασσίτερος (DPHT) και ο μονοφαινυλοκασσίτερος (MPHT), των οποίων οι ποσοτικός προσδιορισμός δεν ήταν δυνατός λόγω των πολύ χαμηλών ή μηδενικών συγκεντρώσεών τους (όριο ανίχνευσης: 2 ng g^{-1}).



Εικόνα 10. Χρωματογράφημα των οργανοκασσιτεριικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν (κατά σειρά έκλουσης) σε στείρο θηλυκό άτομο με imrosex από το Cagliari.

3.5.1 Ιστοί

3.5.1.1 Συγκρίσεις μεταξύ θηλυκών ατόμων σε διαφορετικά στάδια imrosex

Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων έδειξαν ότι τόσο τα θηλυκά άτομα με imrosex (VDS στάδια 1-5), όσο και τα φυσιολογικά θηλυκά (VDS στάδιο 0) είχαν συσσωρεύσει οργανοκασσιτεριικές ενώσεις (Πίν. 4, Εικ. 11), αλλά σε διαφορετικές ποσότητες. Συνολικά, και οι τέσσερις οργανοκασσιτεριικές ενώσεις παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις τους στα θηλυκά άτομα από το Cagliari, με το TBT να φτάνει τα $525 \pm 52.5 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$, το DBT τα $1465 \pm 304,0 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$, το MBT τα $271 \pm 31,7 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ και το TPhT τα $79 \pm 7,6 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ κατά μέσο όρο, γεγονός που συνάδει με τα μορφολογικά δεδομένα του imrosex. Αντίθετα, οι μικρότερες (ανιχνεύσιμες) μέσες τιμές συγκεντρώσεων των ενώσεων παρατηρήθηκαν σε θηλυκά άτομα από το Oihão, όπου το TBT προσδιορίστηκε στα $39 \pm 7.5 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$, το DBT στα $36 \pm 2.9 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$, το MBT στα $21 \pm 1.6 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ και το TPhT μόλις στα $3 \pm 0.7 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ (Πίν. 4).

Τα θηλυκά άτομα από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες: φυσιολογικά θηλυκά, θηλυκά άτομα σε αρχικά στάδια imrosex

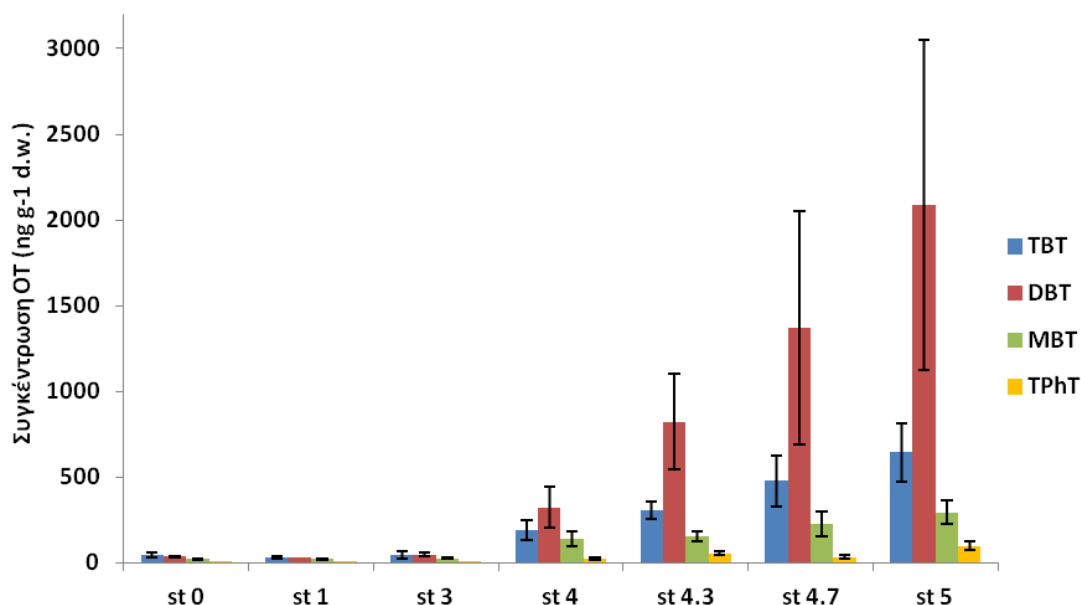
(στ. 1-3) και θηλυκά άτομα σε προχωρημένα στάδια imrosex (στ. 4-5). Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση TBT, DBT και MBT μεταξύ των θηλυκών ατόμων με imrosex σε προχωρημένα στάδια (στ. 4-5) σε σχέση με τα φυσιολογικά θηλυκά, καθώς και με τα θηλυκά που βρίσκονταν σε αρχικά στάδια (στ. 1-3) (TBT: Mood's Median chi-square=22.51, $p < 0.001$, DBT: Mood's Median chi-square=27.65, $p < 0.001$, MBT: Kruskal Wallis $H=37.09$, $p < 0.001$ Mann-Whitney με διόρθωση κατά Bonferroni). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των τριών ενώσεων μεταξύ των φυσιολογικών θηλυκών και των θηλυκών που βρίσκονταν σε αρχικά στάδια VDS (στ. 1-3) (TBT: 2-sample $T=-0.40$, $p=0.691$, DBT: Mann-Whitney $W=128.0$, $p=0.829$, MBT: 2-sample $T=1.11$, $p=0.279$). Η σύγκριση ως προς την συσσώρευση TPHT ήταν δυνατή μόνο μεταξύ των θηλυκών ατόμων με imrosex, καθώς σε κανένα από τα φυσιολογικά θηλυκά δεν ανιχνεύτηκε η συγκεκριμένη ένωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση τριφαινυλοκασσίτερου, όπου τα θηλυκά που εμφάνισαν imrosex σε προχωρημένα στάδια (στ. 4-5) είχαν συσσωρεύσει μεγαλύτερη ποσότητα της ένωσης (Mood's Median chi-square=13.87, $p < 0.001$).

Πίνακας 4. Μέση τιμή των συγκεντρώσεων των οργανοκασιτερικών ενώσεων ($\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$) με τυπικό σφάλμα ($\pm \text{SE}$) σε θηλυκά άτομα με imrosex από όλα τα στάδια VDS, σε φυσιολογικά θηλυκά και σε αρσενικά άτομα από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας. (TBT = τριβουτυλοκασσίτερος, DBT = διβουτυλοκασσίτερος, MBT = μονοβουτυλοκασσίτερος, TPHT = τριφαινυλοκασσίτερος).

Σταθμός	Φύλο	Αριθμός ατόμων	TBT	DBT	MBT	TPHT
Σαρδηνία (Cagliari)	A	15	289 \pm 48.0	457 \pm 31.7	229 \pm 30.2	29 \pm 3.8
	Θ	30	525 \pm 52.5	1465 \pm 304.0	271 \pm 31.7	79 \pm 7.6
Τυνησία (El Kantaoui)	A	-	-	-	-	-
	Θ	30	77 \pm 12.9	93 \pm 5.4	58 \pm 6.4	7 \pm 2.0
Πορτογαλία (Olhão)	A	20	33 \pm 5.3	43 \pm 1.7	29 \pm 2.6	3.2 \pm 0.4
	Θ	18	39 \pm 7.5	37 \pm 2.7	24 \pm 2.0	2.6 \pm 0.7
	Θ*	12	46 \pm 11.2	36 \pm 2.9	21 \pm 1.6	μη ανιχνεύσιμη ποσότητα

* φυσιολογικά θηλυκά άτομα (βρέθηκαν μόνο στο Olhão)

- απουσία μετρήσεων



Εικόνα 11. Μέση τιμή της συγκέντρωσης των τεσσάρων διαφορετικών οργανοχλωσιστεριικών ενώσεων ($\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$) με τυπικό σφάλμα ($\pm \text{SE}$) σε φυσιολογικά άτομα (st 0) και σε θηλυκά άτομα με improsex (VDS st 1-5). Οι μέσες τιμές προκύπτουν από όλες τις περιοχές δειγματοληψίας.

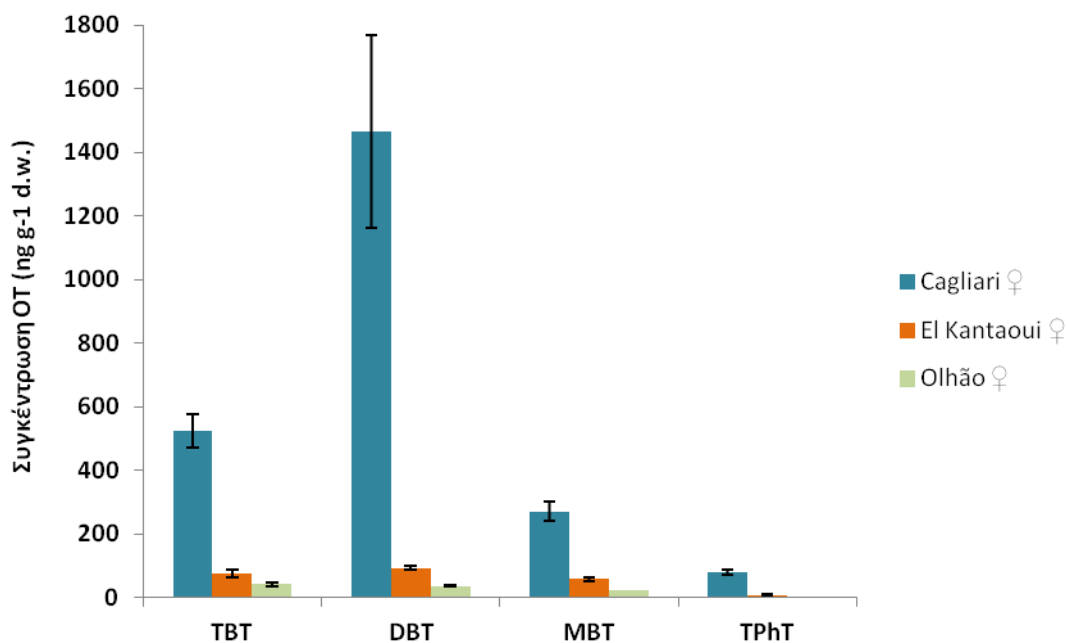
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11, η συγκέντρωση TBT αυξάνεται από το στάδιο 4 προς το στάδιο 5, εμφανίζοντας διαφορές μεταξύ των ενδιάμεσων σταδίων (Kruskal Wallis $H=12.34$, $p=0.006$), με εξαίρεση τα στάδια 4.3-4.7 και 4.7-5, στα οποία οι διαφορές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (στ. VDS 4.3-4.7: 2-sample $T=-1.34$, $p=0.193$, στ. VDS 4.7-5: 2-sample $T=-0.71$, $p=0.495$). Παρομοίως, το DBT αυξάνεται καθώς αυξάνεται το στάδιο VDS, με στατιστικά σημαντικές διαφορές να καταγράφονται μόνο μεταξύ των σταδίων 4-4.7 και 4-5 (στ. VDS 4-4.7: Mann-Whitney $W=200.0$, $p=0.009$, στ. VDS 4-5: Mann-Whitney $W=204.0$, $p=0.003$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση MBT μεταξύ των σταδίων 4-5 (One-way ANOVA $F=1.73$, $p=0.173$), ενώ η συγκέντρωση TPhT διέφερε μόνο μεταξύ των σταδίων 4-5 και 4.7-5 (Kruskal Wallis $H=9.09$, $p=0.028$, στ. VDS 4-5: 2-sample $T=-3.86$, $p=0.001$, στ. VDS 4.7-5: 2-sample $T=-2.43$, $p=0.038$).

Το Olhão ήταν η μοναδική περιοχή δειγματοληψίας στην οποία καταγράφηκαν και φυσιολογικά θηλυκά άτομα σε ποσοστό 40% (12 άτομα, Εικ. 8). Συγκρίνοντάς τα με τα θηλυκά άτομα με improsex της ίδιας περιοχής παρατηρήθηκε ότι τα θηλυκά με improsex εμφάνισαν μεγαλύτερες ποσότητες DBT, MBT και TPhT, ενώ τα φυσιολογικά θηλυκά μεγαλύτερες ποσότητες TBT. Ωστόσο, οι διαφορές

αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (TBT: 2-sample $T=-0,53$, $p=0.598$, DBT: 2-sample $T=0.18$, $p=0.316$, MBT: 2-sample $T=1.06$, $p=0.29$). Εξάιρεση αποτέλεσε ο τριφαινυλοκασσίτερος (TPHT), ένωση η οποία δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα φυσιολογικά θηλυκά άτομα της περιοχής.

3.5.1.2 Συγκρίσεις μεταξύ ατόμων από διαφορετικές περιοχές

Στην Εικόνα 12 δίνεται η μέση τιμή της συγκέντρωσης κάθε ένωσης ($\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$) στο σύνολο των θηλυκών ατόμων *Hexarlex trunculus* από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας. Κυρίαρχη ένωση στις δύο από τις τρεις περιοχές μελέτης ήταν ο διβουτυλοκασσίτερος (DBT), με τιμές που κυμαίνονταν από 412 (στ. 4.3) έως 7761 $\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$ (στ. 5) για το Cagliari (Kruskal-Wallis $H=45.29$, $p<0.001$) και από 61 (στ. 4.0) έως 128 $\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$ (στ. 4.7) για το El Kantaoui (Kruskal-Wallis $H=12.80$, $p=0.002$). Αντίθετα, στο Oihão, που ήταν η μοναδική περιοχή μελέτης με φυσιολογικά θηλυκά άτομα, ο τριβουτυλοκασσίτερος (TBT) ήταν η ένωση που κυριαρχούσε τόσο στα φυσιολογικά θηλυκά άτομα όσο και σε εκείνα που εμφάνιζαν imrosex, χωρίς όμως η συγκέντρωση του να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη του διβουτυλοκασσίτερου (DBT) (φυσιολογικά θηλυκά: 2-sample $T=-0.84$, $p=0.416$, θηλυκά με imrosex: 2-sample $T=-0.26$, $p=0.799$). Στα φυσιολογικά θηλυκά το TBT κυμάνθηκε από 15 έως 147 $\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$ και το DBT από 26 έως 52 $\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$, ενώ το αντίστοιχο εύρος για τα θηλυκά με imrosex ήταν 10-146 $\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$ (TBT, στ. 3) και 17-67 $\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$ (DBT, στ. 4).



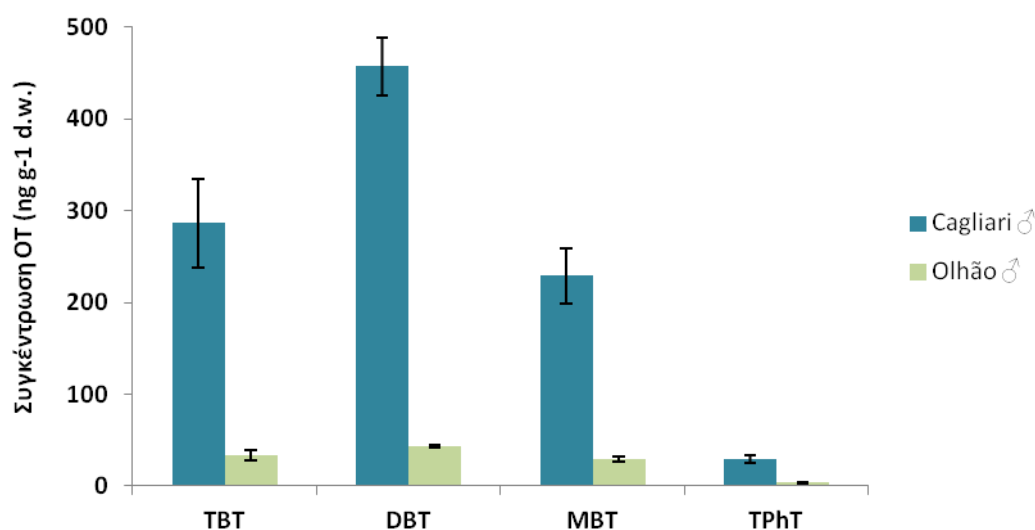
Εικόνα 12. Μέση τιμή της συγκέντρωσης των τεσσάρων διαφορετικών οργανοκασσιτεριικών ενώσεων ($\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$) με τυπικό σφάλμα ($\pm \text{SE}$) στο σύνολο των θηλυκών ατόμων από τις διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας. Οι μέσες τιμές προκύπτουν από θηλυκά με *improsex* σε όλα τα στάδια VDS και από φυσιολογικά θηλυκά.

Η συγκέντρωση TBT στους ιστούς του συνόλου των θηλυκών ατόμων (φυσιολογικά θηλυκά και θηλυκά άτομα με *improsex*) εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα από το Cagliari και τις άλλες δύο περιοχές μελέτης (One-way ANOVA $F=59.47$, $p<0.001$) (Εικ. 11). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συσσώρευση τόσο του TPhT, όσο και των προϊόντων αποικοδόμησης του TBT (DBT και MBT) μεταξύ των τριών περιοχών δειγματοληψίας, με τα δείγματα από το λιμάνι Cagliari της Σαρδηνίας να παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες ποσότητες από τις συγκεκριμένες ενώσεις (DBT: Mood's Median chi-square=59.06, $p<0.001$, MBT: Kruskal-Wallis $H=63.22$, $p<0.001$, TPhT: Mood's Median chi-square=52.02, $p<0.001$). Στη συνέχεια, συγκρίνοντας τους ιστούς από το El Kantaoui και το Olhão, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα από την Τυνησία περιείχαν μεγαλύτερες ποσότητες των ενώσεων TBT, DBT και MBT σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα της Πορτογαλίας (TBT: 2-sample $T=2.97$, $p=0.005$, DBT: 2-sample $T=11.57$, $p<0.001$, MBT: 2-sample $T=6.66$, $p<0.001$), γεγονός που συνάδει με τα μορφολογικά αποτελέσματα του *improsex* στις αντίστοιχες περιοχές. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε ό,τι αφορά την

παρουσία του TPhT ανάμεσα στα θηλυκά δείγματα των δύο περιοχών (Mann-Whitney $W=351.0$, $p=0.142$).

3.5.1.3 Συγκρίσεις μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων

Από τη χημική ανάλυση ιστών αρσενικών ατόμων, η οποία έγινε σε δείγματα από την Σαρδηνία και την Πορτογαλία, προέκυψε ότι, εκτός από τα θηλυκά άτομα, και τα αρσενικά συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες οργανοκασσιτερικών ενώσεων (Πίν. 4, Εικ. 13). Μάλιστα, και στην περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκε ότι τα αρσενικά άτομα από το Cagliari ήταν πιο επιβαρυνμένα ως προς τις τέσσερις οργανοκασσιτερικές ενώσεις σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα από το Olhão (TBT: Mann-Whitney $W=420.0$, $p<0.001$, DBT: 2-samples $T=15.15$, $p<0.001$, MBT: 2-samples $T=7.63$, $p<0.001$, TPhT: 2-samples $T=8.15$, $p<0.001$) (Εικ. 13).



Εικόνα 13. Μέση τιμή της συγκέντρωσης των τεσσάρων διαφορετικών οργανοκασσιτερικών ενώσεων ($\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$) με τυπικό σφάλμα ($\pm \text{SE}$) σε αρσενικά άτομα από τις περιοχές Cagliari και Olhão.

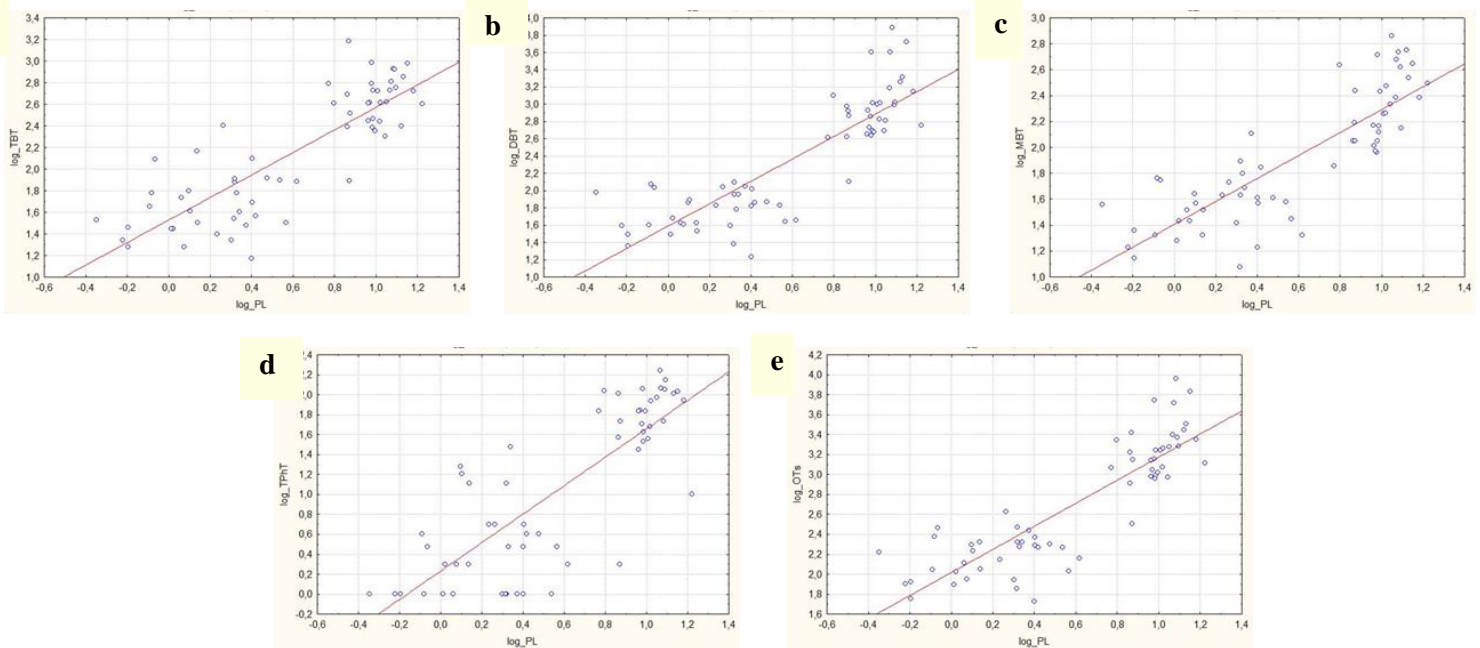
Συγκρίνοντας τα θηλυκά άτομα με imrosex (απουσία φυσιολογικών) με τα αρσενικά άτομα από το Cagliari της Σαρδηνίας παρατηρήθηκε ότι εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συσσώρευση TBT, DBT και TPhT, με τα θηλυκά να συγκεντρώνουν μεγαλύτερες ποσότητες των ενώσεων αυτών (TBT: 2-sample $T=2.92$, $p=0.006$, DBT: Mann-Whitney $W=860.5$, $p<0.001$, TPhT: 2-sample $T=4.46$, $p<0.001$). Σε ό,τι αφορά τις συγκεντρώσεις MBT, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές

διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα (2-sample T=0.84, p=0.403). Σε αντίθεση με την περιοχή του Cagliari, τα δείγματα από το Oihã της Πορτογαλίας, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των θηλυκών ατόμων με imrosex, των φυσιολογικών θηλυκών και των αρσενικών ατόμων όσον αφορά την συσσώρευση TBT, DBT και MBT, αν και η συσσώρευση των μεταβολικών προϊόντων DBT και MBT ήταν μεγαλύτερη στα αρσενικά άτομα (TBT: Kruskal-Wallis H=2.29, p=0.318, DBT: One-way Anova F=2.59, p=0.086, MBT: One-way Anova F=2.66, p=0.081). Η σύγκριση μεταξύ θηλυκών ατόμων με imrosex, φυσιολογικών θηλυκών και αρσενικών ατόμων από την Πορτογαλία ως προς την συσσώρευση TPhT δεν ήταν δυνατή, καθώς σε κανένα φυσιολογικό θηλυκό άτομο δεν ανιχνεύτηκε η συγκεκριμένη ένωση. Ωστόσο, τα αρσενικά άτομα είχαν μεγαλύτερη ποσότητα της συγκεκριμένης ουσίας σε σχέση με τα θηλυκά που εμφάνισαν imrosex (Mood's Median chi-square=3.98, p=0.046).

3.5.1.4 Συσχέτιση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του imrosex με τις συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των θηλυκών ατόμων (μήκος οστράκου, μήκος πέους και μήκος σπερματαγωγού) είχαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις και με τις τέσσερις οργανοκασσιτερικές ενώσεις (Pearson's p<0.05). Ειδικότερα, το μήκος του πέους εμφάνισε τις πιο ισχυρές συσχετίσεις με τις συγκέντρωση των ενώσεων TBT, DBT, MBT και TPhT, καθώς και με το σύνολο αυτών (TBT: Pearson's r=0.704, p<0.001, DBT: Pearson's r=0.580, p<0.001, MBT: Pearson's r=0.747, p<0.001, TPhT: Pearson's r=0.758, p<0.001, $\Sigma_{TBT,DBT,MBT,TPhT}$ Pearson's r=0.673, p<0.001) (Εικ. 14), με τα μετασηματισμένα δεδομένα (log) να ακολουθούν μοντέλο παλινδρόμησης της μορφής:

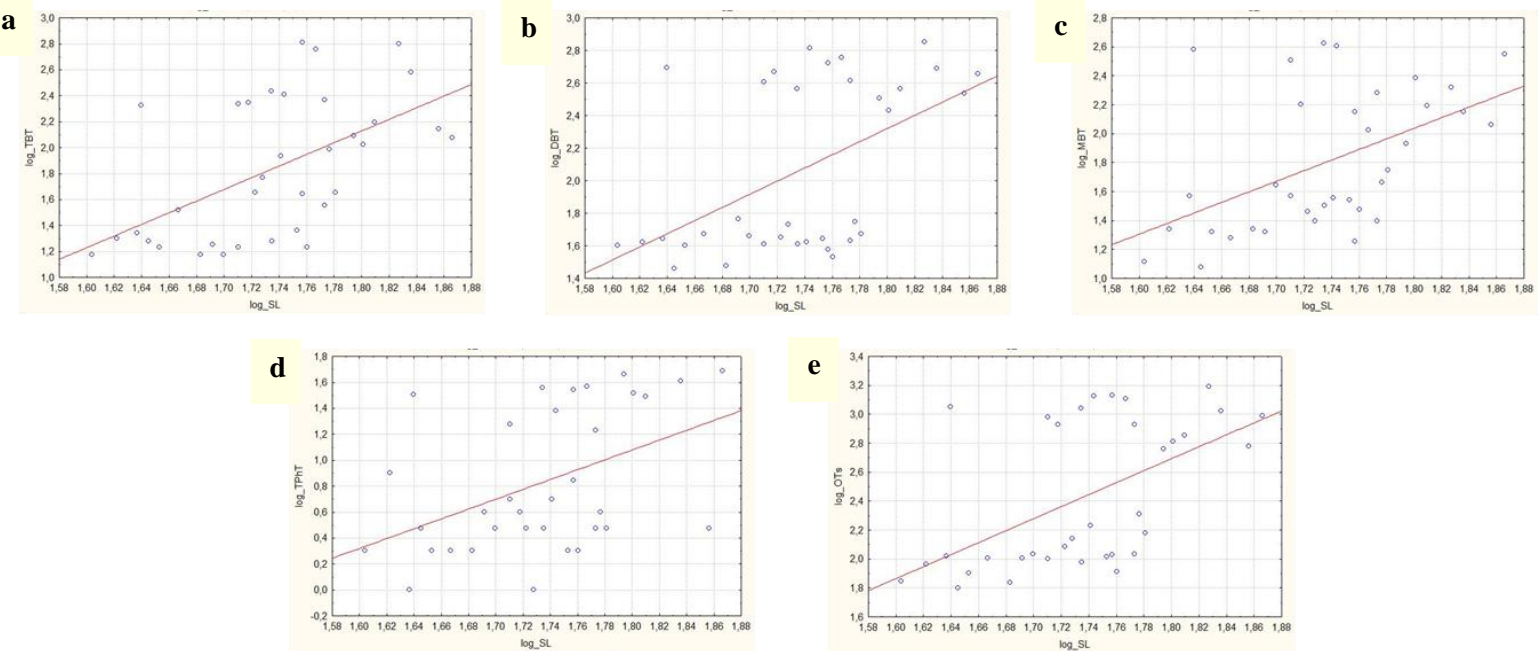
- $\log TBT = 1.53 + 1.04 \log PL$ ($R^2=70.5\%$, $F=146.09$, $p<0.001$),
- $\log DBT = 1.59 + 1.30 \log PL$ ($R^2=72.6\%$, $F=161.87$, $p<0.001$),
- $\log MBT = 1.41 + 0.886 \log PL$ ($R^2=70.0\%$, $F=142.43$, $p<0.001$),
- $\log TPhT = 0.232 + 1.44 \log PL$ ($R^2=66.3\%$, $F=118.18$, $p<0.001$) και
- $\log \Sigma_{TBT,DBT,MBT,TPhT} = 2.02 + 1.16 \log PL$ ($R^2=75.2\%$, $F=185.01$, $p<0.001$).



Εικόνα 14. Γραφήματα γραμμικής παλινδρόμησης που απεικονίζουν τη σχέση του μήκους πέους (PL) του συνόλου των θηλυκών ατόμων με imrosex και από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας συναρτήσει των ενώσεων TBT (a), DBT (b), MBT (c), TPhT (d) και του αθροίσματος αυτών $\Sigma_{TBT,DBT,MBT,TPhT}$ (OTs) (e) (δεδομένα μετασηματισμένα σε δεκαδικό λογάριθμο).

Τα παραπάνω μοντέλα συμπεριλαμβάνουν το σύνολο των θηλυκών ατόμων που αναλύθηκαν και από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας. Αντίθετα, η μελέτη των θηλυκών ατόμων από κάθε περιοχή ξεχωριστά δεν οδήγησε στην εξαγωγή ενός πρότυπου παλινδρόμησης που να εξηγεί ικανοποιητικό ποσοστό της μεταβλητότητας των δεδομένων.

Παράλληλα, εκτός από τα θηλυκά άτομα, και τα αρσενικά άτομα εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους (μήκος οστράκου και μήκος πέους) με τις οργανοκασσιτερικές ενώσεις (Pearson's $r < 0.05$). Πιο συγκεκριμένα, το μήκος του οστράκου φάνηκε να συσχετίζεται με τις ενώσεις TBT, DBT, MBT και TPhT, καθώς και με το σύνολο αυτών (TBT: Pearson's $r = 0.393$, $p = 0.020$, DBT: Pearson's $r = 0.477$, $p = 0.004$, MBT: Pearson's $r = 0.504$, $p = 0.002$, TPhT: Pearson's $r = 0.441$, $p = 0.008$, $\Sigma_{TBT,DBT,MBT,TPhT}$ Pearson's $r = 0.449$, $p = 0.007$) (Εικ. 15). Ωστόσο, η ανάλυση παλινδρόμησης τόσο για το σύνολο των αρσενικών ατόμων, όσο και για τα αρσενικά άτομα κάθε περιοχής ξεχωριστά, δεν οδήγησε σε κάποιο μοντέλο πρόβλεψης που να εξηγεί ικανοποιητικό ποσοστό της μεταβλητότητας.



Εικόνα 15. Γραφική απεικόνιση της συσχέτισης του μήκους οστράκου (SL) του συνόλου των αρσενικών ατόμων από το Cagliari και το Olhão με τις ενώσεις TBT (a), DBT (b), MBT (c), TPhT (d) και $\Sigma_{TBT,DBT,MBT,TPhT}$ (OTs) (e) (δεδομένα μετασχηματισμένα σε δεκαδικό λογάριθμο).

3.5.2 Ιζήματα

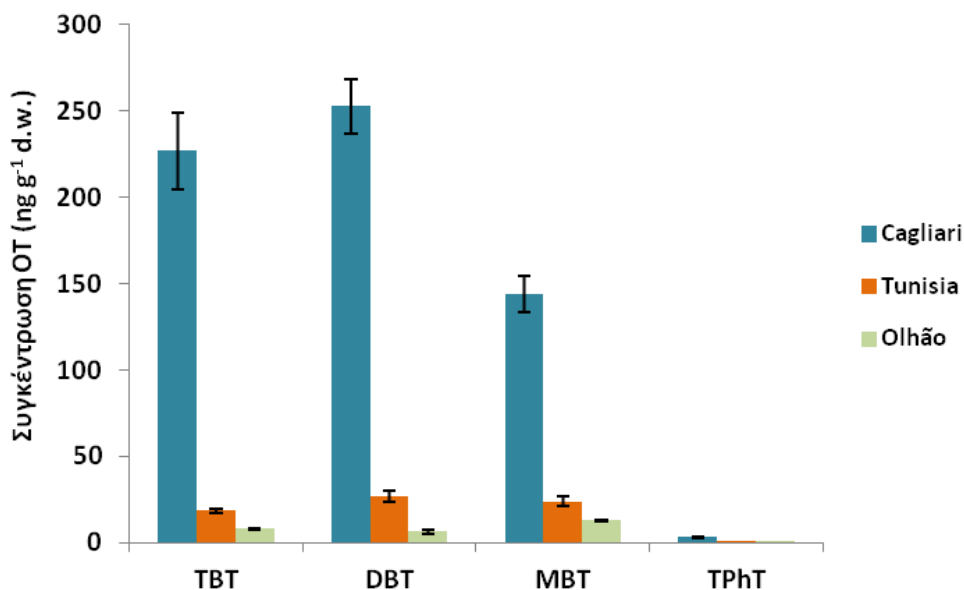
Η χημική ανάλυση των ιζημάτων από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας έδειξε ότι παρά την απαγόρευση της χρήσης οργανοκασσιτερικών ουσιών, οι περιοχές αυτές εξακολουθούσαν να είναι ρυπασμένες από το TBT και τα παράγωγά του, καθώς και από TPhT, αφού σε κάποια δείγματα ανιχνεύτηκαν σημαντικές ποσότητες των ενώσεων αυτών (Πίν. 5). Πιο συγκεκριμένα, η συνολική συγκέντρωση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων στο λιμάνι Cagliari της Σαρδηνίας ήταν 9 φορές μεγαλύτερη από ό,τι στο λιμάνι El Kantaoui της Τυνησίας και 22 φορές υψηλότερη από το Olhão της Πορτογαλίας. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν τα αποτελέσματα από τις χημικές αναλύσεις των ιστών, που υποδεικνύουν το Cagliari ως την πιο επιβαρυσμένη περιοχή όσον αφορά και τις τέσσερις κατηγορίες ενώσεων. Οι Dowson *et al.* (1993) στην εργασία τους κατηγοριοποίησαν τις περιοχές δειγματοληψίας ανάλογα με τις παρατηρούμενες συγκεντρώσεις TBT στα ιζήματα σε εξαιρετικά ρυπασμένες (όριο: $>500 \text{ ng g}^{-1}$), πολύ ρυπασμένες (όριο: $100-500 \text{ ng g}^{-1}$), μέτρια ρυπασμένες (όριο: $20-100 \text{ ng g}^{-1}$), ελαφρά ρυπασμένες (όριο: $3-20 \text{ ng g}^{-1}$).

και μη ρυπασμένες περιοχές (όριο: $<3 \text{ ng g}^{-1}$). Συνεπώς, σύμφωνα με τους Dowson *et al.* (1993) και με βάση τις ποσότητες TBT που ανιχνεύτηκαν, το λιμάνι Cagliari της Σαρδηνίας μπορεί να χαρακτηριστεί ως πολύ ρυπασμένο ($\text{TBT}_{\text{Cagliari}}=227\pm 22.2 \text{ ng g}^{-1}$), ενώ τα λιμάνια της Τυνησίας και της Πορτογαλίας ως ελαφρά ρυπασμένα από τριβουτυλοκασσίτερο ($\text{TBT}_{\text{ElKantaoui}}=19\pm 1.3 \text{ ng g}^{-1}$, $\text{TBT}_{\text{Olhão}}=8\pm 0.6 \text{ ng g}^{-1}$).

Όπως παρατηρήθηκε και στα δείγματα ιστών, ο διβουτυλοκασσίτερος (DBT) ήταν η οργανοκασσιτερική ένωση με την υψηλότερη συγκέντρωση στα ιζήματα των δύο από τις τρεις περιοχές μελέτης (Εικ. 16), φτάνοντας τα $253\pm 15.6 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ κατά μέσο όρο στο Cagliari και τα $26\pm 3.2 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ στο λιμάνι του El Kantaoui. Αντίθετα, τα ιζήματα του Olhão παρουσίασαν υψηλότερη ποσότητα μονοβουτυλοκασσίτερου (MBT) με μέση συγκέντρωση που έφθανε τα $13\pm 0.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$ (Πίν. 5). Επιπλέον, από την εκτίμηση του δείκτη αποικοδόμησης βουτυλοκασσίτερου (BDI) για κάθε περιοχή ξεχωριστά προκύπτει ότι οι εισροές στις περιοχές μελέτης δεν είναι πρόσφατες, αφού τα προϊόντα αποικοδόμησης του TBT εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ($\text{BDI}>1$, Πίν. 5). Στο λιμάνι Cagliari ο δείκτης BDI εμφάνισε την χαμηλότερη τιμή του (1.67), ενώ στο El Kantaoui και στο Olhão οι τιμές του ήταν μεγαλύτερες (2.56 και, 2.26, αντίστοιχα), με τις χαμηλότερες τιμές του δείκτη να υποδεικνύουν πιο πρόσφατες εισροές.

Πίνακας 5. Μέση τιμή και τυπικό σφάλμα ($\pm \text{SE}$) της συγκέντρωσης των TBT, DBT, MBT και TPhT ($\text{ng g}^{-1} \text{ d.w.}$) και ο δείκτης αποικοδόμησης βουτυλοκασσίτερου (BDI) σε δείγματα ιζήματος από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας.

Σταθμός	TBT	DBT	MBT	TPhT	BDI
<i>Σαρδηνία (Cagliari)</i>	227±22.2	253±15.6	144±10.5	3±0.3	1.67
<i>Τυνησία (El Kantaoui)</i>	19±1.3	26±3.2	24±2.9	1±0	2.56
<i>Πορτογαλία (Olhão)</i>	8±0.6	6±1.5	13±0.3	1±0.3	2.26



Εικόνα 16. Μέση τιμή της συγκέντρωσης των τεσσάρων οργανοχλωσιστερικών ενώσεων (ng g⁻¹ d.w.) με τυπικό σφάλμα (\pm SE) σε δείγματα ιζήματος από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας.

3.6 Σύγκριση μεταξύ διαφορετικών ειδών γαστεροπόδων

Τα θηλυκά άτομα του είδους *Hexarplex trunculus* από την Πορτογαλία (Ria Formosa) συγκρίθηκαν με θηλυκά άτομα του είδους *Nassarius nitidus* από την ίδια περιοχή όσον αφορά την συγκέντρωση των ενώσεων TBT, DBT, MBT και TPHT. Συνολικά αναλύθηκαν 30 θηλυκά άτομα *H. trunculus* από το Olhão (Ria Formosa), από τα οποία τα 18 εμφάνισαν imrosex, και 46 θηλυκά άτομα *N. nitidus* από το Faro (Ria Formosa) της Πορτογαλίας, από τα οποία τα 6 εμφάνισαν imrosex σε αρχικά στάδια (στ. 1a, Πίν. 6). Το σύνολο των δεικτών στα θηλυκά άτομα με imrosex του είδους *N. nitidus* είχε χαμηλότερη τιμή συγκριτικά με το *H. trunculus* (Πίν. 6).

Όπως και στο *H. trunculus*, έτσι και στο *N. nitidus* ανιχνεύθηκαν όλες οι οργανοχλωσιστερικές ενώσεις τόσο στα φυσιολογικά θηλυκά όσο και στα θηλυκά άτομα με imrosex (Πίν. 7). Ωστόσο, τα δύο είδη γαστεροπόδων εμφάνισαν ορισμένες διαφορές ως προς την συγκέντρωση των ενώσεων στους ιστούς τους. (Εικ. 17A,B). Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τα φυσιολογικά θηλυκά άτομα και από τα δύο είδη παρατηρήθηκε ότι τα άτομα του είδους *H. trunculus* είχαν μεγαλύτερη ποσότητα TBT στους ιστούς τους (2-sample T=-3.41, $p=0.002$), ενώ αντίθετα τα φυσιολογικά θηλυκά του είδους *N. nitidus* είχαν συγκεντρώσει

μεγαλύτερη ποσότητα TPhT, καθώς σε κανένα φυσιολογικό άτομο *H. trunculus* δεν ανιχνεύτηκε η εν λόγω ουσία (Εικ. 17A). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση των προϊόντων αποικοδόμησης DBT και MBT ανάμεσα στα δύο είδη (DBT: 2-sample $T=-1.86$, $p=0.072$, MBT: : 2-sample $T=1.87$, $p=0.071$). Από την σύγκριση των θηλυκών ατόμων με *improsex* προέκυψε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση TBT και MBT μεταξύ των δύο ειδών (TBT: 2-sample $T=-1.26$, $p=0.223$, MBT: 2-sample $T=0.14$, $p=0.896$), αν και η συγκέντρωση του TBT στο *H. trunculus* είναι μεγαλύτερη. Ωστόσο, τα *N. nitidus* με *improsex* είχαν σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα TPhT (Mann-Whitney $W=96.5$, $p=0.007$), ενώ τα άτομα *H. trunculus* μεγαλύτερη ποσότητα DBT (2-sample, $T=-2.88$, $p=0.009$) (Εικ. 17B).

Πίνακας 6. Σύνοψη των βιομετρικών στοιχείων και των δεικτών imposex στους πληθυσμούς *Hexarplex trunculus* και *Nassarius nitidus* από την περιοχή Ria Formosa της Πορτογαλίας. (I = συχνότητα εμφάνισης imposex, RPLI = δείκτης σχετικού μήκους του πέους (relative penis length index), RPSI = δείκτης σχετικού μεγέθους του πέους (relative penis size index), VDSI = δείκτης Vas Deferens Sequence)

Περιοχή	Είδος	Φύλο	Αριθ. ατόμων	Μήκος οστράκου (mm±SE)	Μήκος πέους (mm±SE)	Μήκος VD (mm±SE)	I (%)	Στείρα θηλυκά	RPLI (%)	RPSI (%)	VDSI (%)	Εύρος VDS
Πορτογαλία (Ria Formosa, Olhão)	<i>H. trunculus</i>	Θ	18	57.83±1.1	1.62±0.3	11.87±1.3	60	0	11.8	0.2	2.8	1-4.3**
		Θ*	12	55.70±1.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Πορτογαλία (Ria Formosa, Faro)	<i>N. nitidus</i>	Θ	6	23.27±0.7	0.40±0.1	απουσία VD	13	0	3.7	0.005	1.0	1a
		Θ*	40	22.58±0.3	-	-	-	-	-	-	-	-

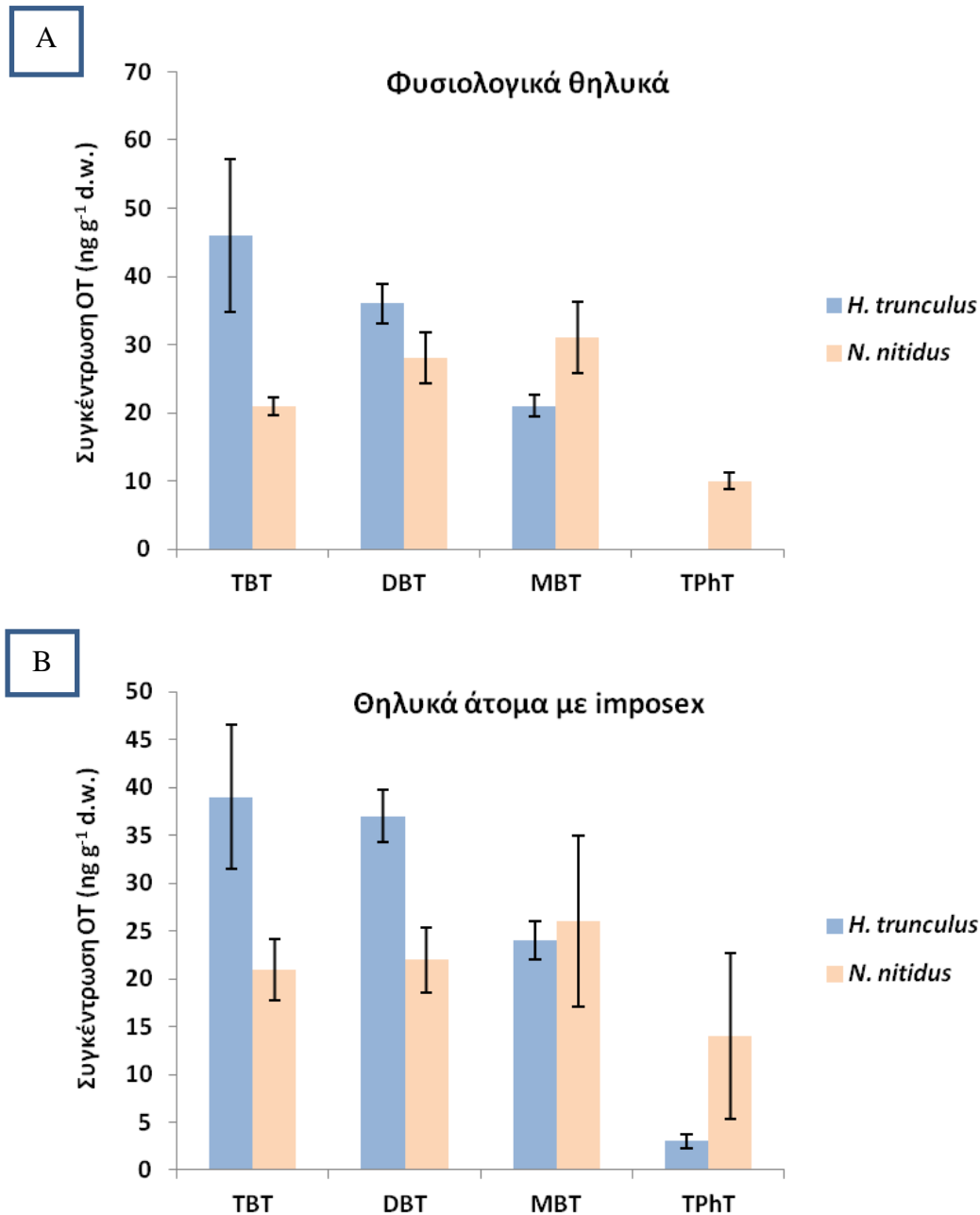
* φυσιολογικά θηλυκά άτομα

**συμπεριλαμβάνονται τα στάδια 1d, 2d, 2d', 3d, 4d

Πίνακας 7. Μέση τιμή των συγκεντρώσεων των οργανοκασσιτερικών ενώσεων ($\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$) με τυπικό σφάλμα ($\pm\text{SE}$) σε θηλυκά άτομα με imposex (από όλα τα στάδια VDS) και σε φυσιολογικά θηλυκά από τα είδη *H. trunculus* και *N. nitidus* στην περιοχή Ria Formosa της Πορτογαλίας. (TBT = τριβουτυλοκασσίτερος, DBT = διβουτυλοκασσίτερος, MBT = μονοβουτυλοκασσίτερος, TPhT = τριφαινυλοκασσίτερος).

Περιοχή	Είδος	Φύλο	Αριθμός ατόμων	TBT	DBT	MBT	TPhT
Πορτογαλία (Ria Formosa, Olhão)	<i>H. trunculus</i>	Θ	18	39±7.5	37±2.7	24±2.0	3±0.7
		Θ*	12	46±11.2	36±2.9	21±1.6	μη ανιχνεύσιμη ποσότητα
Πορτογαλία (Ria Formosa, Faro)	<i>N. nitidus</i>	Θ	6	21±3.2	22±3.4	26±8.9	14±8.7
		Θ*	40	21±1.3	28±3.7	31±5.2	10±1.2

* φυσιολογικά θηλυκά άτομα



Εικόνα 17. Μέση τιμή της συγκέντρωσης των τεσσάρων οργανοκασσιτερικών ενώσεων ($\text{ng g}^{-1} \text{d.w.}$) με τυπικό σφάλμα ($\pm \text{SE}$) σε φυσιολογικά θηλυκά άτομα (A) και σε θηλυκά άτομα με improsex (B) από τα είδη *Hexarplex trunculus* και *Nassarius nitidus* που έχουν συλλεχθεί από την περιοχή Ria Formosa (Πορτογαλία).

Η χημική ανάλυση των ιζημάτων από τις δύο περιοχές στην Ria Formosa (Πορτογαλία) από όπου συλλέχθηκαν τα δύο είδη γαστεροπόδων έδειξε ότι και το Οlhão (*H. trunculus*) και το Faro (*N. nitidus*) συγκεντρώνουν παρόμοιες ποσότητες οργανοκασσιτερικών ενώσεων σε χαμηλά επίπεδα (Πίν. 8). Επιπρόσθετα, ο δείκτης BDI ήταν χαμηλότερος στο Οlhão (2.26) συγκριτικά με εκείνον του Faro (3.19), υποδεικνύοντας πιο πρόσφατες εισροές.

Πίνακας 8. Μέση τιμή και τυπικό σφάλμα (\pm SE) της συγκέντρωσης του TBT, DBT, MBT και TPhT (ng g^{-1} d.w.) και ο δείκτης αποικοδόμησης βουτυλοκασιτέρου (BDI) σε δείγματα ιζήματος από την Πορτογαλία.

Σταθμός	TBT	DBT	MBT	TPhT	BDI
<i>Πορτογαλία (Ria Formosa, Olhão)</i>	8 \pm 0.6	6 \pm 1.5	13 \pm 0.3	1 \pm 0.3	2.26
<i>Πορτογαλία (Ria Formosa, Faro)</i>	6 \pm 0.3	8 \pm 1.2	11 \pm 0.9	1 \pm 0.3	3.19

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Έκταση του imposex και συσσώρευση οργανοκασσιτερικών ενώσεων

Το φαινόμενο του imposex σε διάφορα είδη γαστερόποδων έχει συνδεθεί εκτενώς με τα επίπεδα του TBT στο θαλάσσιο περιβάλλον τόσο στην πρόσφατη όσο και την παλαιότερη επιστημονική βιβλιογραφία (Stroben *et al.*, 1992; Axiak *et al.*, 1995; Oehlmann *et al.*, 1998; Terlizzi *et al.*, 1999; Pellizzato *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2006; Abidli *et al.*, 2009; Lahbib *et al.*, 2010; 2013). Παρά το γεγονός ότι η χρήση του τριβουτυλοκασσίτερου ως βιοκτόνο στα υφαλοχρώματα έχει απαγορευτεί από το 2003, τα επίπεδά του συνεχίζουν να παραμένουν υψηλά (Toste *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2012; Lahbib *et al.*, 2012).

Στην παρούσα μελέτη καταγράφηκαν υψηλά επίπεδα imposex στο γαστερόποδο *Hexarplex trunculus* (Linnaeus, 1758) στις δύο περιοχές δειγματοληψίας στη Μεσόγειο, ενώ στην περιοχή δειγματοληψίας του Ατλαντικού το φαινόμενο φάνηκε να είναι λιγότερο έντονο. Μάλιστα, ο βαθμός και η έκταση του φαινομένου έδειξε να διαφοροποιείται ανάλογα με τη δραστηριότητα ναυσιπλοΐας σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας, γεγονός που συμφωνεί με τα μέχρι τώρα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας (Axiak *et al.*, 1995, 2003; Terlizzi *et al.*, 1998; Pellizzato *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2006; Lahbib *et al.*, 2008a). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων στους ιστούς και τα ιζήματα από τις περιοχές μελέτης έδειξαν ότι και οι τρεις περιοχές δειγματοληψίας ήταν επιβαρυνμένες τόσο από τριβουτυλοκασσίτερο (TBT), όσο και από τα προϊόντα αποικοδόμησής του, δηλαδή από διβουτυλοκασσίτερο (DBT) και μονοβουτυλοκασσίτερο (MBT), ενώ παράλληλα ανιχνεύτηκε και τριφαινυλοκασσίτερος (TPHT) σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Το σύνολο των ενώσεων έδειξε να διαφοροποιείται μεταξύ των σταδίων imposex, με τα θηλυκά άτομα σε προχωρημένα στάδια imposex (στ. VDS 4-5) να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα οργανοκασσιτερικών ενώσεων συγκριτικά με τα αντίστοιχα στα αρχικά στάδια εμφάνισης του φαινομένου (στ. VDS 1-3).

Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη έκταση του φαινομένου imposex καταγράφηκε στα θηλυκά άτομα από το λιμάνι Cagliari της Σαρδηνίας, το οποίο ήταν το μεγαλύτερο λιμάνι που εξετάστηκε και αυτό με την πιο έντονη

δραστηριότητα ναυσιπλοΐας. Στα δείγματα αυτά, το σύνολο των θηλυκών ατόμων εμφάνισαν imposex σε προχωρημένα στάδια (στ. VDS 4-5) και οι τιμές των δεικτών VDSI, RPLI και RPSI ήταν υψηλές (4.5, 71.5 και 36.6 αντίστοιχα). Επιπλέον, έξι από τα συνολικά θηλυκά με imposex χαρακτηρίστηκαν στείρα (20%), καθώς σε αυτά το κοιλικό άνοιγμα ήταν κλειστό και τα αυγά που δεν απελευθερώθηκαν (aborted egg capsules) είχαν σχηματίσει μια σκούρα μάζα, χαρακτηριστικό το οποίο παρατηρείται σε στείρα θηλυκά του είδους (Terlizzi *et al.*, 1998, 1999; Lahbib *et al.*, 2008a). Όπως επισημαίνεται στη μελέτη των Terlizzi *et al.* (1999) και Shi *et al.* (2005), το κλείσιμο του ανοίγματος του κόλπου εμποδίζει το ζευγάρωμα, ενώ ο σχισμένος αδένας παραγωγής των κάψουλων αυγών δεν επιτρέπει τον σχηματισμό τους, με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η αναπαραγωγή.

Τα δεδομένα από τις μορφολογικές αναλύσεις ως προς την έκταση του φαινομένου imposex φάνηκαν να συνάδουν με τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων στην περιοχή. Ειδικότερα, στο Cagliari καταγράφηκαν οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και των τεσσάρων ενώσεων, τόσο στους ιστούς των θηλυκών και αρσενικών ατόμων, όσο και στα ιζήματα. Μάλιστα, η συγκέντρωση του TBT στους ιστούς των θηλυκών ατόμων από το Cagliari (Σαρδηνία) ήταν επτά φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση στα θηλυκά άτομα της περιοχής El Kantaoui (Τυνησία) και δεκατρείς φορές περισσότερη από την συγκέντρωση στα θηλυκά δείγματα από το Olhão (Ria Formosa, Πορτογαλία). Επιπλέον, τα θηλυκά άτομα φάνηκε να συσσωρεύουν μεγαλύτερες ποσότητες οργανοκασσιτερικών ενώσεων από τα αρσενικά, κάτι που είχε παρατηρηθεί στη μελέτη των Axiak *et al.* (1995) για τα θηλυκά του ίδιου είδους από την Μάλτα.

Ο δείκτης αποικοδόμησης βουτυλοκασσίτερου (BDI) που υπολογίστηκε για τα ιζήματα του Cagliari ήταν συγκριτικά μικρότερος από τις άλλες δύο περιοχές μελέτης, υποδηλώνοντας ότι η παρουσία TBT στη συγκεκριμένη περιοχή οφείλεται σε σχετικά πιο πρόσφατες εισροές. Η εισροή αυτή ενδεχομένως να είναι αποτέλεσμα επαναιώρησης του TBT από τα κατώτερα στρώματα του ιζήματος κατά τις διαδικασίες εκβάθυνσης του λιμανιού ή να έχει προέλθει από σκάφη χωρών που δεν έχουν υιοθετήσει τον κανονισμό 782/2003, καθώς το συγκεκριμένο λιμάνι επισκέπτεται μεγάλος αριθμός διαφορετικών ειδών πλοίων και σκαφών από διάφορες χώρες της Μεσογείου (Πίν. 1).

Η έκταση του φαινομένου imposex στο λιμάνι El Kantaoui της Τυνησίας ήταν επίσης αυξημένη. Το σύνολο των θηλυκών ατόμων στην περιοχή αυτή εμφάνιζε imposex, με το 90% αυτών να εντοπίζονται σε προχωρημένα στάδια (στ. VDS 4-4.7). Ωστόσο, δεν καταγράφηκαν στείρα άτομα, ενώ οι δείκτες VDSI, RPLI και RPSI είχαν χαμηλότερες τιμές από τους αντίστοιχους στο λιμάνι Cagliari (4.0, 21.2 και 1.0). Τόσο στους ιστούς των θηλυκών ατόμων όσο και στα ιζήματα ανιχνεύτηκαν ποσότητες οργανοκασσιτερικών ενώσεων, που ήταν σημαντικά διαφορετικές από τις αντίστοιχες στα δείγματα από τις άλλες δύο περιοχές μελέτης. Μάλιστα, τα αποτελέσματα από τις χημικές αναλύσεις φάνηκε να συμφωνούν με τα μορφολογικά αποτελέσματα της μελέτης του imposex, καθώς οι συγκεντρώσεις των ενώσεων ήταν μικρότερες από εκείνες στα δείγματα ιστών και ιζήματος από το Cagliari, αλλά μεγαλύτερες από τα αντίστοιχα δείγματα του OIHão.

Το El Kantaoui θεωρήθηκε ως ένα λιμάνι με μέτρια δραστηριότητα πλοίων και σκαφών, ενώ στο OIHão της Πορτογαλίας η δραστηριότητα χαρακτηρίστηκε ως μέτρια προς υψηλή (Πίν 1). Εντούτοις, το El Kantaoui φάνηκε να είναι περισσότερο επιβαρυμένο, έχοντας σχεδόν διπλάσια ποσότητα οργανοκασσιτερικών ενώσεων στους ιστούς των θηλυκών ατόμων και στο ιζήμα, σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα από το OIHão. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι η Τυνησία δεν ανήκει στις χώρες που έχουν υπογράψει την Σύμβαση AFS (Antifouling System Convention) και μέχρι στιγμής δεν έχει επιβληθεί καμία τοπική νομοθεσία που να περιορίζει την χρήση του TBT. Ωστόσο, τα σκάφη που κινούνται στο λιμάνι El Kantaoui, κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες, προέρχονται σε μεγάλο βαθμό από χώρες του εξωτερικού όπου έχει απαγορευτεί η χρήση του TBT και επιπλέον, τα τοπικά και εισαγόμενα αντιρρυπαντικά υφαλοχρώματα που διατίθενται στην Τυνησία δεν περιέχουν τριβουτυλοκασσίτερο (Lahbib *et al.*, 2009, 2011, 2012). Αν και η κατάσταση σχετικά με τις τωρινές εισροές οργανοκασσιτερικών ενώσεων στα παράκτια οικοσυστήματα της Τυνησίας δεν είναι ξεκάθαρη, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι η ρύπανση από το TBT οφείλεται σε παλαιότερες εισροές στο λιμάνι και ότι η διαθέσιμη ποσότητα TBT πιθανόν να προέρχεται από αποθέματα της ένωσης που βρίσκονται στα κατώτερα τμήματα του ιζήματος (Lahbib *et al.*, 2012). Αυτό υποστηρίζεται αφενός από την τιμή του δείκτη BDI (2.56), η οποία ήταν μεγαλύτερη από τη μονάδα, υποδεικνύοντας παλαιότερες εισροές στο λιμάνι El

Kantaoui, και αφετέρου στην αυξημένη ποσότητα του προϊόντος αποικοδόμησης του TBT (DBT) στους ιστούς και στα ιζήματα της περιοχής.

Αντίθετα με το Cagliari και το El Kantaoui, το λιμάνι OIhão στην περιοχή Ria Formosa της Πορτογαλίας, ήταν η μοναδική περιοχή μελέτης, στην οποία καταγράφηκαν φυσιολογικά θηλυκά άτομα σε ποσοστό 40%. Παράλληλα, τα θηλυκά άτομα με imrosex βρίσκονταν στην πλειονότητά τους (61%) σε αρχικά στάδια imrosex (στ. VDS 1-3) και κατ' επέκταση, οι δείκτες VDSI, RPLI και RPSI στην περιοχή αυτή είχαν τις μικρότερες τιμές σε σχέση με τις δύο άλλες περιοχές δειγματοληψίας (2.8, 11.8 και 0.2).

Παρά την ύπαρξη φυσιολογικών θηλυκών σε ό,τι αφορά στο φαινόμενο imrosex, ανιχνεύτηκαν ποσότητες οργανοκασσιτερικών ενώσεων στους ιστούς όλων των θηλυκών και αρσενικών ατόμων και στο ίζημα της περιοχής, οι οποίες όμως ήταν σημαντικά χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στα δείγματα από τα λιμάνια Cagliari και El Kantaoui. Επιπρόσθετα, παρά το γεγονός ότι οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των ενώσεων TBT, DBT και MBT μεταξύ φυσιολογικών θηλυκών και θηλυκών ατόμων με imrosex δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p > 0.05$), παρατηρήθηκε ότι τα φυσιολογικά θηλυκά είχαν συσσωρεύσει μεγαλύτερη ποσότητα TBT στους ιστούς τους. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η απόκριση των γαστερόποδων στο TBT και συνεπώς η εμφάνιση imrosex δεν εξαρτάται μόνο από την συγκέντρωση του TBT στον οργανισμό και το ίζημα, αλλά και από το χρονικό διάστημα έκθεσης του ζώου στον συγκεκριμένο ρυπαντή (Terlizzi *et al.*, 1999; Axiak *et al.*, 2003; Abidli *et al.*, 2009). Επομένως, η σχετικά μεγαλύτερη συγκέντρωση TBT στους ιστούς των φυσιολογικών θηλυκών ατόμων μπορεί να οφείλεται στην πιθανότητα τα θηλυκά με imrosex να ήταν μεγαλύτερο διάστημα εκτεθειμένα στο TBT, με αποτέλεσμα να εμφανίσουν πιο σύντομα στοιχεία imrosex.

Παρά τις αμελητέες διαφορές στις συγκεντρώσεις του TBT, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ φυσιολογικών θηλυκών και θηλυκών με imrosex για τον τριφαινυλοκασσίτερο (TPhT) στα δείγματα από το OIhão. Πιο συγκεκριμένα, σε κανένα από τα φυσιολογικά θηλυκά δεν ανιχνεύτηκε TPhT, σε αντίθεση με τα θηλυκά άτομα με imrosex, στα οποία καταγράφηκε μικρή ποσότητα της συγκεκριμένης ένωσης. Αν και η συγκέντρωση του TPhT είναι αρκετά χαμηλότερη από εκείνη του TBT, δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση συνεργιστικής δράσης

της ένωσης με τις υπόλοιπες οργανοκασσιτερικές ενώσεις στην εμφάνιση του φαινομένου.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι και τα αρσενικά άτομα στην Πορτογαλία συσσωρεύουν οργανοκασσιτερικές ενώσεις σε παρόμοιες συγκεντρώσεις με τα θηλυκά άτομα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις παρατηρήσεις των *Axiak et al.* (1995) από την Μάλτα, όπου στις περιοχές με αυξημένη ρύπανση από TBT τα θηλυκά είχαν συσσωρεύσει μεγαλύτερη ποσότητα οργανοκασσιτερικών ενώσεων σε σχέση με τα αρσενικά. Αυτό φάνηκε και στην παρούσα μελέτη, με τα θηλυκά από το Cagliari να συσσωρεύουν περισσότερη ποσότητα από τα αρσενικά από την ίδια περιοχή, ενώ αντίθετα στο Oihão, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην συγκέντρωση των ενώσεων ανάμεσα στα δύο φύλα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην διαφορετική ικανότητα που έχουν τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα ως προς τον μεταβολισμό των ενώσεων. Έχει παρατηρηθεί πειραματικά ότι η μεταβολική ικανότητα του TBT στο γαστερόποδο *Thais clavigera* ενισχύεται σημαντικά όταν το είδος εκτεθεί σε υψηλή συγκέντρωση TBT, με τα αρσενικά άτομα να επιδεικνύουν αποτελεσματικότερους μηχανισμούς αποβολής της ένωσης, σε αντίθεση με τα θηλυκά, στα οποία το TBT φάνηκε να συσσωρεύεται και να κατακρατείται στα αναπαραγωγικά όργανα (*Wang et al.*, 2010).

Συνολικά, παρατηρήθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση των ενώσεων με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, κυρίως με το μήκος του πέους. Μάλιστα, το μοντέλο παλινδρόμησης που προέκυψε για κάθε ένωση ξεχωριστά έχει ευρεία εφαρμογή, καθώς συμπεριλάμβανε τα θηλυκά άτομα και από τις τρεις περιοχές δειγματοληψίας, και δίνει την δυνατότητα ικανοποιητικής εκτίμησης της συσσώρευσης οργανοκασσιτερικών ενώσεων στον οργανισμό του ζώου με βάση τις μετρήσεις που προκύπτουν από το μήκος του πέους, χωρίς να είναι απαραίτητη η θανάτωση του ζώου για την πραγματοποίηση των χημικών αναλύσεων. Άλλωστε προς την κατεύθυνση αυτή έχουν ήδη κινηθεί και άλλοι μελετητές, όπως οι *Vasconcelos et al.* (2006), οι οποίοι προτείνουν έναν εναλλακτικό τρόπο μελέτης της έκτασης του *imposex*, χρησιμοποιώντας ζωντανά άτομα *Hexaplex trunculus* από την περιοχή Ria Formosa της Πορτογαλίας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι η ρύπανση από τις οργανοκασσιτερικές ενώσεις εξακολουθεί να αποτελεί ένα σημαντικό

περιβαλλοντικό πρόβλημα στις περιοχές μελέτης. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από την πρόσφατη βιβλιογραφία σε άλλες περιοχές της Μεσογείου. Πιο συγκεκριμένα, ήδη από το 2008, οι Lahbib *et al.* και οι Abidli *et al.* παρατήρησαν την εμφάνιση imrosex και παραμορφώσεων σε δείγματα *H. trunculus* από πολλές περιοχές κατά μήκος της ακτογραμμής της Τυνησίας και επιβεβαίωσαν πειραματικά την εξέλιξη του φαινομένου λόγω του TBT. Η Μπιζέρτα στην Βόρεια Τυνησία έχει μελετηθεί εκτενώς και θεωρείται μία από τις πιο επιβαρυνμένες περιοχές, στις οποίες η συχνότητα του imrosex παραμένει στο 100%, η στειρότητα ανέρχεται στο 4.2% και οι δείκτες VDSI και RPLI εμφανίζουν μεγάλες τιμές (4.2 και 44.9 αντίστοιχα, Lahbib *et al.*, 2010). Οι μέσες συγκεντρώσεις των βουτυλοκασιτερικών ενώσεων της περιοχής φτάνουν τα 73 ng g⁻¹ για το TBT, 63 ng g⁻¹ για το DBT και 12 ng g⁻¹ για το MBT. Με βάση τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας μελέτης, η περιοχή El Kantaoui της Τυνησίας μπορεί να θεωρηθεί εξίσου επιβαρυνμένη περιοχή, καθώς το 100% των θηλυκών ατόμων εμφάνισαν imrosex και ο δείκτης VDSI είχε υψηλή τιμή (4.0). Επιπλέον, τα δείγματα των θηλυκών ατόμων είχαν παρόμοια συγκέντρωση TBT στους ιστούς τους (77 ng g⁻¹), αλλά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DBT και MBT (93 ng g⁻¹ και 58 ng g⁻¹ αντίστοιχα). Ωστόσο, είναι σημαντικό το γεγονός ότι στο El Kantaoui δεν καταγράφηκε κανένα στείρο θηλυκό άτομο.

Στο λιμάνι Cagliari της Σαρδηνίας, το πρόβλημα της ρύπανσης από το TBT φαίνεται να είναι μεγαλύτερο λόγω της ύπαρξης στείρων θηλυκών ατόμων (20%) και εξαιρετικά μεγάλων συγκεντρώσεων οργανοκασιτερικών ενώσεων στο ίζημα και τους ιστούς των ατόμων (Πίν. 3,4). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με παλαιότερες εργασίες των Axiak *et al.* (1995) από την Μάλτα, των Terlizzi *et al.* (1998, 2004) από τις ιταλικές ακτές και των Pellizzato *et al.* (2004) από την λιμνοθάλασσα της Βενετίας, όπου τόσο ο δείκτης VDSI όσο και ο δείκτης RPSI είχαν εξίσου υψηλές τιμές (VDSI>4, RPSI= 36.2–77.2). Μάλιστα, στα δείγματα από την λιμνοθάλασσα της Βενετίας είχε καταγραφεί μεγάλο ποσοστό στείρων θηλυκών ατόμων (77%) (Pellizzato *et al.*, 2004), σε αντίθεση με τις Θαλάσσιες Προστατευόμενες Περιοχές της Ιταλίας, στις οποίες δεν παρατηρήθηκε στειρότητα (Terlizzi *et al.*, 2004).

Σε αντίθεση με τις περιοχές Cagliari και El Kantaoui, οι οποίες δεν έχουν μελετηθεί ξανά ως προς την εμφάνιση imrosex σε γαστερόποδα, στα δείγματα από

την περιοχή Ria Formosa της Πορτογαλίας, παρατηρήθηκε βελτίωση, καθώς η συχνότητα εμφάνισης του imposex στο γαστερόποδο *H. trunculus* μειώθηκε από το 93.2% το 2006 (Vasconcelos *et al.*, 2006) στο 60% το 2012 (παρούσα μελέτη), ενώ και οι δείκτες RPLI και RPSI μειώθηκαν σημαντικά από 43.9 και 8.4 (2006) σε 11.8 και 0.2 (2012) αντίστοιχα.

Για την ορθότερη διαχείριση των αποτελεσμάτων από τις μορφολογικές και χημικές αναλύσεις γαστερόποδων από περιοχές εν δυνάμει ρυπασμένες από το TBT, θα πρέπει να πραγματοποιούνται προγράμματα βιοπαρακολούθησης για την εκάστοτε περιοχή. Τέτοια προγράμματα δίνουν την δυνατότητα αξιολόγησης του βαθμού επιβάρυνσης της περιοχής από τις οργανοκασσιτερικές ενώσεις, με το σύνολο των αναλύσεων να παρέχει τα απαραίτητα δεδομένα σχετικά με την ανάκαμψη ή μη των πληθυσμών γαστερόποδων μετά τον κανονισμό 782/2003.

4.2 Επίδραση του TPhT στην εμφάνιση imposex

Ο τριφαινυλοκασσίτερος (TPhT) και ο τριβουτυλοκασσίτερος (TBT) εμφανίζονται συνήθως μαζί στο θαλάσσιο περιβάλλον (Fent, 1996). Το TPhT ανιχνεύτηκε στα ιζήματα και στους ιστούς των ατόμων από όλες τις περιοχές μελέτης, αλλά οι συγκεντρώσεις του ήταν σημαντικά χαμηλότερες συγκριτικά με το TBT. Τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα από τη βιβλιογραφία σχετικά με την παρουσία TPhT στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι περιορισμένα. Ωστόσο, οι λίγες διαθέσιμες μελέτες που υπάρχουν, όπως αυτή των Díez *et al.* (2002) σε ιζήματα από την Ιβηρική Θάλασσα και των Pellizzato *et al.* (2004) σε δείγματα *H. trunculus* που συλλέχθηκαν από τη λιμνοθάλασσα της Βενετίας, δείχνουν επίσης ότι τα επίπεδα TPhT είναι χαμηλότερα από εκείνα του TBT. Επιπρόσθετα, τα προϊόντα αποικοδόμησης του TPhT (δηλαδή το DPhT και το MPhT) δεν ανιχνεύτηκαν ούτε στους ιστούς των γαστερόποδων, αλλά ούτε και στα ιζήματα των περιοχών, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στους χαμηλούς ρυθμούς βιομετασχηματισμού (biotransformation) και αποικοδόμησης του TPhT στους ιστούς και τα ιζήματα αντίστοιχα (Fent & Hunn, 1991; Yi *et al.*, 2012). Σύμφωνα με τους Pellizzato *et al.* (2004), η συγκέντρωση του TPhT στους ιστούς των γαστερόποδων ήταν μεγαλύτερη στις περιοχές με αυξημένη δραστηριότητα ναυσιπλοΐας, κάτι το οποίο παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, η συσσώρευση του

TPhT ήταν αυξημένη στην περιοχή Cagliari, τόσο στους ιστούς όσο και στα ιζήματα, ενώ παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της ένωσης με την μείωση της παρατηρούμενης έκτασης του imposex, από το El Kantaoui προς το Olhão, όσο δηλαδή οι αναλύσεις κατευθύνονταν σε πιο «καθαρές» περιοχές.

Τα αποτελέσματα αυτά δίνουν μία ένδειξη για πιθανή επίδραση του TPhT στην εμφάνιση του imposex, παρόλο που μέχρι σήμερα η συμβολή της συγκεκριμένης οργανοκασσιτερικής ένωσης στο φαινόμενο δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Οι Bryan *et al.* (1988) απέδειξαν πειραματικά ότι δεν προκαλείται εμφάνιση του imposex λόγω του TPhT στο είδος *Nucella lapillus* (Linnaeus, 1758), ενώ οι Mensink *et al.* (1997) παρατήρησαν το ίδιο αποτέλεσμα από χημικές αναλύσεις ιστών του είδους *Buccinum undatum* (Linnaeus, 1758). Αντίθετα, οι Horiguchi *et al.* (1995, 1997a,b) και Solé *et al.* (1998) βρήκαν θετική συσχέτιση της ένωσης με το imposex στα είδη *Reishia clavigera* (Küster, 1860) και *Bolinus brandaris* (Linnaeus, 1758). Μεταγενέστερες μελέτες των Schulte-Oehlmann *et al.* (2000) έδειξαν ότι το TPhT μπορεί να προκαλέσει imposex στα γαστερόποδα *Marisa cornuarietis* (Linnaeus, 1758), αλλά όχι στα *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758) και *N. lapillus*, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των Bryan *et al.* (1988), ενώ πρόσφατα οι Santos *et al.* (2006) απέδειξαν πειραματικά την συνεργιστική επίδραση του τριφαινυλοκασσιτέρου στην εμφάνιση του imposex στο είδος *Bolinus brandaris*. Κατά συνέπεια θεωρήθηκε ότι υπάρχουν διαφορές στην απόκριση των διαφορετικών ειδών γαστερόποδων κατά την έκθεσή τους στο TPhT.

4.3 Παραμονή στα ιζήματα και αποικοδόμηση του TBT

Ο μεταβολισμός των οργανοκασσιτερικών ενώσεων διαφέρει ανάμεσα στους διαφορετικούς θαλάσσιους οργανισμούς. Το ενζυμικό σύστημα P-450 στην σπλαχνική κοιλότητα του *H. trunculus* είναι η θέση μεταβολισμού των τοξικών ουσιών. Αποτελείται από την NADPH-ρεδουκτάση του κυτοχρώματος P-450 και το κυτόχρωμα P-450, ένζυμα τα οποία εντοπίζονται στο ήπαρ, με το κύριο προϊόν αποικοδόμησης (dealkylation) του TBT, τόσο στους ιστούς όσο και στο φυσικό περιβάλλον, να είναι το DBT (Pellizzato *et al.*, 2004). Ο χρόνος ημιζωής του TBT στα ιζήματα κυμαίνεται από 1 έως 5 χρόνια (De Mora & Pelletier, 1997; Sarradin, 1993; Waldock *et al.*, 1990, Dowson *et al.*, 1993), αλλά σε ανοξικά ιζήματα, όπως αυτά που

συναντώνται συνήθως στα λιμάνια, ο ρυθμός αποικοδόμησης του TBT είναι πολύ χαμηλός και μπορεί να φτάσει σε βάθος δεκαετίας (Dowson *et al.*, 1996; Gadd, 2000; Fent, 2006). Επιπλέον, ο ρυθμός αποικοδόμησης των οργανοκασιτερικών ενώσεων στα ιζήματα εξαρτάται και από τις συγκεντρώσεις τους, καθώς, λόγω της βιοκτόνου δράσης τους, οι διαδικασίες βιοαποικοδόμησης παρεμποδίζονται όταν συσσωρεύονται υψηλές συγκεντρώσεις TBT σε αυτά (Dowson *et al.* 1996; Hoch 2001; Stewart & De Mora, 1989).

Συνολικά, και στις τρεις περιοχές μελέτης, παρατηρήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις τριβουτυλοκασιτέρου (TBT) και διβουτυλοκασιτέρου (DBT) στα ιζήματα και στους ιστούς που αναλύθηκαν, σε σχέση με τις συγκεντρώσεις μονοβουτυλοκασιτέρου (MBT). Σύμφωνα με τους Pellizzato *et al.* (2004) και Lahbib *et al.* (2009b), οι χαμηλές συγκεντρώσεις MBT και η επικράτηση του DBT στην περιοχή μελέτης θα μπορούσε να υποδεικνύει μια σχετικά πρόσφατη πηγή ρύπανσης TBT στο λιμάνι. Επιπλέον, οι Chiavarini *et al.* (2003) στην εργασία τους προτείνουν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις TBT και η συσσώρευση DBT αντί του MBT στο γαστερόποδο *H. trunculus* υποδεικνύουν μια συνεχή, αν και όχι μαζική, εισροή TBT στην περιοχή. Οι τιμές του δείκτη BDI στα ιζήματα, οι οποίες ήταν μεγαλύτερες από τη μονάδα σε όλες τις περιοχές, υποδεικνύουν ότι οι εισροές TBT σε αυτές δεν ήταν πρόσφατες. Συνεπώς, θεωρείται ότι η παρουσία TBT στα επιφανειακά στρώματα του ιζήματος και κατ' επέκταση η έκθεση των γαστερόποδων σε αυτό, δεν οφείλεται σε εισροή της ένωσης εξαιτίας της δραστηριότητας των πλοίων, αλλά στο φαινόμενο επαναιώρησης του TBT λόγω διεργασιών, όπως η εκβάθυνση του λιμανιού (dredging operations), η οποία προκαλεί επαναδιάθεση των ενώσεων που είχαν συσσωρευτεί στο ιζημα από παλαιότερες εισροές (Vasconcelos *et al.*, 2006).

4.4 Εξέλιξη του imposex και των μορφολογικών παραμορφώσεων

Το πρώτο σημείο εμφάνισης του imposex σε *H. trunculus* που βρέθηκαν στην Μάλτα (Axiak *et al.*, 1995) και στην Ιταλία (Terlizzi *et al.*, 1999) ήταν η παρουσία ενός πολύ μικρού εξογκώματος, χωρίς την εμφάνιση αγωγού πέους, πίσω από τη δεξιά οφθαλμική κεραία. Το πέος και ο αγωγός του σχηματίζονται σε επόμενο στάδιο, ενώ ο σπερματικός αγωγός (VD) αναπτύσσεται σε ακόμα μεταγενέστερο στάδιο, ξεκινώντας από τη βάση του πέους και φτάνοντας μέχρι το άνοιγμα του κόλπου.

Αντίθετα, οι Lahbib *et al.* (2008a) κατέταξαν τα μορφολογικά στάδια του imposex σε πληθυσμούς *H. trunculus* από την Τυνησία με βάση ένα διαφορετικό σύστημα από αυτό που είχε προταθεί για το ίδιο είδος από προηγούμενους ερευνητές μέχρι τότε. Πιο συγκεκριμένα, οι Lahbib *et al.* (2008a) παρατήρησαν ότι το πρώτο σημείο εμφάνισης του imposex ήταν η ανάπτυξη ενός μικρού τμήματος του σπερματικού αγωγού (VD) στην περιοχή ανάμεσα στο πέος και στον κόλπο (στ. 1), με το πέος να αναπτύσσεται στα επόμενα στάδια και να είναι σημαντικά μικρότερο σε μέγεθος, σε σχέση με τα μεγέθη που αναφέρονται στις μελέτες των Achiak *et al.* (1995) και Terlizzi *et al.* (1999). Ως εκ τούτου, οι Lahbib *et al.* (2008a) παρέθεσαν στην εργασία τους ένα εναλλακτικό μονοπάτι σχηματισμού των αρσενικών αναπαραγωγικών χαρακτήρων σε θηλυκά άτομα με imposex. Στην παρούσα μελέτη, οι παρατηρήσεις των Lahbib *et al.* (2008a) καταγράφηκαν σε ορισμένα άτομα, τα οποία προέρχονταν από την Τυνησία και την Πορτογαλία.

Συνεπώς, θα ήταν χρήσιμο, για την πληρέστερη περιγραφή της έναρξης του φαινομένου imposex στο γαστερόποδο *H. trunculus*, να διαμορφωθεί στο μέλλον ένα ενιαίο, καινούριο σχήμα το οποίο να συμπεριλαμβάνει και τα δύο εναλλακτικά σενάρια: α) τον πρωταρχικό σχηματισμό πέους και β) τον πρωταρχικό σχηματισμό σπερματικού αγωγού (VD) στην περιοχή ανάμεσα στο πέος και τον κόλπο, λαμβάνοντας υπόψη τόσο το μήκος του πέους όσο και το μήκος του σπερματικού αγωγού. Τα δύο αυτά σενάρια που αφορούν τα αρχικά στάδια εμφάνισης του imposex έχουν ήδη αναφερθεί από τους Toste *et al.* (2013) για το είδος *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767).

Παραμορφώσεις των αναπαραγωγικών οργάνων, οι οποίες οφείλονται στο TBT και στα παράγωγά του, ανάλογες με αυτές που καταγράφηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν αναφερθεί και σε δείγματα από τις ιταλικές ακτές (Terlizzi *et al.*, 1998), την Πορτογαλία (Vasconcelos *et al.*, 2006) και τις τυνησιακές ακτές (Lahbib *et al.*, 2008b; Abidli *et al.*, 2009), τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά άτομα. Μάλιστα, έχει αναφερθεί ότι οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις μπορούν να δράσουν είτε ως νευροτοξικοί παράγοντες (Castro *et al.*, 2007), είτε ως καρκινογόνοι ρύποι (Schulte-Oehlmann *et al.*, 2000). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Abidli *et al.* (2009) ενδέχεται να εμπλέκονται στην εμφάνιση των ανωμαλιών αυτών και άλλες ενώσεις, εκτός από το TBT, που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές (endocrine disruptive

compounds - EDCs). Οι ενώσεις αυτές διοχετεύονται στο θαλάσσιο περιβάλλον κυρίως εξαιτίας ανθρώπινων δραστηριοτήτων και μπορούν να επιδράσουν σε εμβρυονικά, νεαρά ή ενήλικα στάδια (Abidli *et al*, 2009). Επομένως, χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για την διευκρίνιση του τρόπου ανάπτυξης των δυσπλασιών του πέους και του σπερματικού αγωγού, καθώς και της επίπτωσής τους στην αναπαραγωγική ικανότητα και κατ' επέκταση στη βιωσιμότητα του πληθυσμού. Η μελέτη πιθανής συνεργιστικής δράσης των οργανοκασσιτερικών ενώσεων με άλλες κατηγορίες ρυπαντών που βρίσκονται στο θαλάσσιο περιβάλλον θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πρώτο βήμα προς αυτή την κατεύθυνση.

4.5 Ευαισθησία διαφορετικών ειδών στην εμφάνιση imposex

Για την βιοπαρακολούθηση της ρύπανσης των υδάτων από το TBT έχουν χρησιμοποιηθεί, εκτός από το είδος *Hexarplex trunculus*, πολλά είδη γαστερόποδων, τα οποία διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους απέναντι στον συγκεκριμένο ρυπαντή. Μάλιστα, πρόσφατη μελέτη σε δείγματα από την Τυνησία έδειξε ότι το *H. trunculus* είναι λιγότερο ευαίσθητο συγκριτικά με το *Conus ventricosus* (Gmelin, 1791), αλλά καλύτερος βιοδείκτης σε σχέση με τα είδη *Cyclope neritea* (Linnaeus, 1758), *Nassarius mutabilis* (Linnaeus, 1758) και *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Lahbib *et al.*, 2010). Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκαν δείγματα από τα είδη *H. trunculus* και *Nassarius nitidus* από την περιοχή Ria Formosa της Πορτογαλίας, στην προσπάθεια να καταδειχθεί ο καλύτερος βιοδείκτης της ρύπανσης από το TBT. Για τον λόγο αυτό, τα θηλυκά άτομα των δύο ειδών μελετήθηκαν τόσο ως προς το imposex όσο και ως προς τη συγκέντρωση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων στους ιστούς τους.

Τα αποτελέσματα από τις μορφολογικές αναλύσεις των δειγμάτων έδειξαν ότι μόλις το 13% του συνόλου των θηλυκών ατόμων *N. nitidus* εμφάνισε imposex και μόνο στο πρώτο στάδιο (στ. VDS 1a), σε αντίθεση με τα *H. trunculus* τα οποία εμφάνισαν imposex σε ένα εύρος σταδίων (στ. VDS 1-4.3) σε ποσοστό 60%. Λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα δεδομένα που προκύπτουν από τη μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών, παρατηρήθηκε ότι το σύνολο των δεικτών (I, VDSI, RPLI, RPSI) είχε πολύ χαμηλότερες τιμές για το είδος *N. nitidus*, υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο το *H. trunculus* ως πιο ευαίσθητο είδος. Ωστόσο, η εξαγωγή

συμπεράσματος σχετικά με τον πιο κατάλληλο βιοδείκτη δε θα πρέπει να γίνεται αποκλειστικά με βάση τους μορφολογικούς δείκτες imposex, καθώς τα δύο είδη εμφανίζουν μεγάλες ανατομικές διαφορές ως προς το μήκος του οστράκου και το μήκος του πέους στα θηλυκά με imposex, χαρακτηριστικά τα οποία επηρεάζουν σημαντικά τις τιμές των δεικτών RPLI και RPSI. Επιπρόσθετα, για τον προσδιορισμό της έκτασης του φαινομένου (στάδια VDS) χρησιμοποιούνται διαφορετικά συστήματα εξέλιξης για τα δύο είδη, με αποτέλεσμα οι τιμές που προκύπτουν για τον δείκτη VDSI να μην είναι πρακτικά συγκρίσιμες.

Από τις χημικές αναλύσεις στους ιστούς των δειγμάτων παρατηρήθηκε ότι το είδος *N. nitidus* ήταν πιο ευαίσθητος βιοδείκτης, καθώς τα θηλυκά άτομα με imposex εμφάνισαν τα πρώτα σημάδια του φαινομένου (στ. VDS 1a) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις TBT ($10-28 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$), συγκριτικά με τα αντίστοιχα θηλυκά του *H. trunculus*, τα οποία εμφάνισαν τα πρώτα στάδια imposex (στ. VDS 1, 1d, 2d') σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ($19-67 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$). Η παρατηρούμενη διαφορά ανάμεσα στα δύο είδη σχετικά με την πρωταρχική εμφάνιση imposex μπορεί να οφείλεται στην παρουσία μεγαλύτερων ποσοτήτων TPHT στους ιστούς των θηλυκών ατόμων *N. nitidus*, ένωση η οποία έχει αποδειχθεί ότι δρα συνεργιστικά με το TBT ως προς την εμφάνιση imposex στο γαστερόποδο *Bolinus brandaris* (Santos *et al.*, 2006).

Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι το είδος *H. trunculus* εμφάνισε imposex σε προχωρημένα στάδια (στ. VDS 3-4.3) σε ένα εύρος συγκεντρώσεων TBT, μερικές από τις οποίες ήταν εξαιρετικά χαμηλές ($10-146 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$). Η γρήγορη απόκριση του *H. trunculus* στην έκθεση στο TBT έχει παρατηρηθεί και από τους Lahbib *et al.* (2011), όπου το είδος εμφάνισε ταχύτερη αύξηση των δεικτών I, VDSI και RPLI στις ίδιες συγκεντρώσεις TBT συγκριτικά με το *N. nitidus*, με αποτέλεσμα το *H. trunculus* να θεωρηθεί πιο ευαίσθητο. Αξίζει να αναφερθεί ωστόσο, ότι το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων TBT ($15-147 \text{ ng g}^{-1} \text{ d.w.}$) καταγράφηκε και στα φυσιολογικά άτομα *H. trunculus*, γεγονός που τελικά προκαλεί αμφιβολίες ως προς την ικανότητα του συγκριμένου είδους να εμφανίζει imposex σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και συνεπώς να θεωρείται πολύ ευαίσθητος βιοδείκτης στη ρύπανση από TBT.

Κατά συνέπεια, θα ήταν σημαντικό να ελεγχθούν πειραματικά οι διαφορές στην εμφάνιση του imposex ανάμεσα στα δύο είδη προκειμένου να αποσαφηνιστεί

η ευαισθησία του κάθε είδους στο TBT και κατ' επέκταση να αναδειχθεί ο πιο κατάλληλος βιοδείκτης της ρύπανσης των υδάτων από τον τριβουτυλοκασσίτερο.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η παρούσα μελέτη δίνει μια ευρεία αποτίμηση για την κατάσταση της ρύπανσης από οργανοκασσιτερικές ενώσεις σε λιμάνια της Μεσογείου και του Ατλαντικού εννιά χρόνια μετά την έκδοση του Ευρωπαϊκού Κανονισμού 782/2003 για την πλήρη απαγόρευση της χρήσης τους στα υφαλοχρώματα. Παρά την απόφαση αυτή, η επίδραση της ένωσης εξακολουθεί να είναι εμφανής στο γαστερόποδο *Hexarplex trunculus* σε λιμάνια και μαρίνες της Μεσογείου, προκαλώντας imrosex. Το φαινόμενο είναι ιδιαίτερα έντονο σε περιοχές με μεγάλο αριθμό και έντονη δραστηριότητα πλοίων και σκαφών.
- Η εξέλιξη του φαινομένου imrosex στο είδος *Hexarplex trunculus* ακολουθεί δύο διαφορετικά μονοπάτια, ανάλογα με τη σειρά εμφάνισης του πέους και του σπερματικού αγωγού. Για την πληρέστερη περιγραφή της έναρξης του φαινομένου προτείνεται η διαμόρφωση ενός ενιαίου σχήματος το οποίο θα περιλαμβάνει α) τον πρωταρχικό σχηματισμό του πέους και β) τον πρωταρχικό σχηματισμό σπερματικού αγωγού στην περιοχή ανάμεσα στο πέος και τον κόλπο.
- Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν την πιθανή συνεργιστική επίδραση του TRhT με το TBT στην εμφάνιση του imrosex στα γαστερόποδα *Hexarplex trunculus* και *Nassarius nitidus* και καταδεικνύουν την ανάγκη περαιτέρω έρευνας σχετικά με την επίδραση άλλων ρυπαντών που βρίσκονται στο θαλάσσιο περιβάλλον στην διαμόρφωση μορφολογικών παραμορφώσεων.
- Η μελέτη προτείνει το μοντέλο της γραμμικής παλινδρόμησης το οποίο περιγράφει τη σχέση της συγκέντρωσης κάθε οργανοκασσιτερικής ένωσης με το μήκος του πέους. Το μοντέλο αυτό ισχύει σε όλες τις περιοχές που μελετήθηκαν και επομένως μπορεί να αποτελέσει ένα απλό εργαλείο άμεσης εκτίμησης της ποσότητας των ενώσεων αυτών στις παράκτιες περιοχές της Μεσογείου.
- Τα γαστερόποδα *Hexarplex trunculus* και *Nassarius nitidus* αποκρίθηκαν διαφορετικά στην έκθεση στο TBT ως προς το φαινόμενο imrosex και τη

συσσώρευση οργανοκασσιτερικών ενώσεων στους ιστούς τους. Η ανάδειξη του πιο κατάλληλου βιοδείκτη για τη ρύπανση των υδάτων από το TBT χρειάζεται να ελεγχθεί πειραματικά, καθώς τα δύο είδη διαφέρουν ως προς την πρωταρχική εμφάνιση του improsex σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ παράλληλα συγκεντρώνουν διαφορετικές ποσότητες TRhT στους ιστούς τους, ένωση που ενδέχεται να συμβάλει στην εμφάνιση του φαινομένου.

Τα δείγματα Hexarlex trunculus από τη Σαρδηνία και την Τυνησία συλλέχθηκαν στα πλαίσια του προγράμματος MAPMED (ENPI CBCMED), ενώ τα δείγματα Hexarlex trunculus και Nassarius nitidus από την Πορτογαλία στα πλαίσια του προγράμματος STRESSLAG (ASSEMBLE 00394/2012).

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια Βιοποικιλότητας και Περιβαλλοντικής Χημείας και Βιοανάλυσης του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (Ι.ΘΑ.Β.Β.ΥΚ.) στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) Κρήτης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abidli, S., Lahbib, Y., Trigui-El Menif, N. (2009). Effects of TBT on the imposex development, reproduction and mortality in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89: 139–146.
- Abidli, S., Santos, M.M., Lahbib, Y., Castro, L.F.C., Reis-Henriques, M.A., Trigui El Menif, N. (2012b). Tributyltin (TBT) effects on *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae): imposex induction and sex hormone levels insights. *Ecological Indicators*, 13: 13–21.
- Alzieu, C., Sanjuan, J., Deltreil, J.P., Borel, M. (1986). Tin contamination in Arcachon bay: effects on oyster shell anomalies. *Marine Pollution Bulletin*, 17: 494–498.
- Alzieu, C. (1991). Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. *Marine Environmental Research*, 32: 7-18.
- Alzieu, C. (2000). Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology* 9: 71–76.
- Axiak, V., Sammut, M. (1995). Laboratory and field investigations on the effects of organotin (TBT) on the oyster *Ostrea edulis*. *Science of the Total Environment*, 171: 117–120.
- Axiak, V., Vella, A.J., Micallef, D., Chircop, P., Mintoff, B. (1995). Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Marine Biology* 121: 685–691.
- Axiak, V., Micallef, D., Muscata, J., Vella, A., Mintoff, B. (2003). Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. *Environment International* 28: 743–749.
- Berto, D., Giani, M., Boscolo, R., Covelli, S., Giovanardi, O., Massironi, M., Grassia, L. (2007). Organotins (TBT and DBT) in water, sediments, and gastropods of the southern Venice lagoon (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 55(10–12): 425–435.
- Blaber, S.J.M. (1970). The occurrence of penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus*. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 39: 231–233.
- Bryan, G.W., Gibbs, P.E., Hummerstone, L.G., Burt, G.R. (1986). The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around the south–west of England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66: 611–640.
- Bryan, G.W., Gibbs, P.E., Burt, G.R. (1988). A comparison of the effectiveness of tri-n-butyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dogwhelk, *Nucella lapillus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 68: 733–744.
- Bryan, G.W., Gibbs, P.E. (1991). Impact of low concentrations of tributyltin TBT on marine organisms: a review. In: Newmann, M.C., McIntosh, A.W. (Eds.), *Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications*. Lewis, Ann Arbor, pp. 323–361.
- Callow, J.A., Callow, M.E. (2011). Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings. *Nature Communications* 2: 244.

- Castro, L.F.C., Lima, D., Machado, A., Melo, C., Hiromori, Y., Nishikawa, J., Nakanishi, T., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M. (2007). Imposex induction in mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*. *Aquatic Toxicology*, 85: 57–66.
- Castro, Í. B., Arroyo, M. F., Costa, P. G., Fillmann, G. (2012). Butyltin compounds and imposex levels in Ecuador. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 68–77.
- Champ, M.A. (2000). A review of organotin regulatory strategies: Pending actions, related costs and benefits. *Science of the Total Environment*, 258 (1): 21–71.
- Chiavarini, S., Massanisso, P., Nicolai, P., Nobili, C., Morabito, R. (2003). Butyltin concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere*, 50: 311–319.
- Coelho, M.R., Bebianno, M.J., Gibbs, P.E. (1998). Imposex in neogastropod snails from southern Portugal. *Cuadernos de Investigación Biológica*, 20: 273.
- De Mora, S.J., Pelletier, E. (1997). Environmental tributyltin research: past, present, future. *Environmental Technology*, 18 (12): 1169-1177.
- Díez, S., Ábalos, M., Bayona, J.M. (2002). Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT. *Water Research*, 36: 905–918.
- Dowson, P.H., Bubb, J.M., Lester, and J.N. (1993). Temporal distribution of organotins in the aquatic environment: five years after 1987 UK retail ban on TBT based antifouling paints. *Marine Pollution Bulletin*, 26:487–494.
- Dowson, P.H., Bubb, J.M., Lester, J.N. (1993). Depositional profiles and relationships between organotin compounds in freshwater and estuarine sediment cores. *Environmental Monitoring and Assessment*, 28: 145-160.
- Dowson, P.H., Bubb, J.M., Lester, J.N. (1996). Persistence and degradation Pathways of tributyltin in freshwater and estuarine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 42: 551–562.
- Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B., Oehlmann, J. (2003). Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 145–152.
- El Hamdani, A., Ferrer, J.M., García Carrascosa, A.M. (1998). Imposex in prosobranch molluscs: an indicator of TBT pollution in the Valencian coast (Spain, Western Mediterranean). *Cuadernos de Investigación Biológica* 20: 275–278.
- Evans, S.M., Hawkins, S.T., Porter, J., Samosir, A.M. (1994). Recovery of dogwhelk populations on the Isle of Cumbrae, Scotland, following legislation limiting the use of TBT as an antifoulant. *Marine Pollution Bulletin*, 28: 15-17.
- Fent, K. (1996). Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 26: 1–117.

- Fent, K. (2006). Worldwide Occurrence of Organotins from Antifouling Paints and Effects in the Aquatic Environment. *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 5, Part O*: 71–100.
- Fent, K., Hunn, J. (1991). Phenyltins in water, sediment and biota of freshwater marinas. *Environmental Science and Technology*, 25: 956-963.
- Filipkowska, A., Kowalewska, G., Pavoni, B. (2014). Organotin compounds in surface sediments of the Southern Baltic coastal zone: a study on the main factors for their accumulation and degradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 21: 2077–2087.
- Fretter V., Graham A. (1962). *British Prosobranch Molluscs*. London, Royal Society.
- Gabrielides, G.L., Alzieu, C., Readman, J.W., Bacci, E., Aboul Dahab, O., Salihoglu, I. (1990). MEDPOL survey of organotins in the Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, 21: 233-237.
- Gadd, G.M. (2000). Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. *Science of the Total Environment*, 258: 119–127.
- Garaventa, F., Pellizzato, F., Faimali, M., Terlizzi, A., Medakovic, D., Geraci, S., Pavoni, B. (2006). Imposex in *Hexaplex trunculus* at some sites on the North Mediterranean Coast as a base-line for future evaluation of the effectiveness of the total ban on organotin based antifouling paints. *Hydrobiologia*, 555: 281-287.
- Garaventa, F., Centanni, E., Pellizzato, F., Faimali, M., Terlizzi, A., Pavoni, B. (2007). Imposex and accumulation of organotin compounds in populations of *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) from the Lagoon of Venice (Italy) and Istrian Coast (Croatia). *Marine Pollution Bulletin*, 54: 602–625.
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W. (1986). Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex undiced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66: 767–777.
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Pascoe, P.L., Burt, G.R. (1987). The use of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 67: 507– 23.
- Gibson, C.P., Wilson, S. P. (2003), Imposex still evident in eastern Australia 10 years after tributyltin restrictions. *Marine Environmental Research*, 55: 101-112.
- Gipperth, L. (2009). The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: Direct and indirect effects. *Journal of Environmental Management*, 90: S86–S95.
- Hoch, M. (2001). Organotin compounds in the environment; an overview. *Applied Geochemistry*, 16: 719–743.
- Horiguchi, T., Shiraishi, H., Shimizu, M., Yamazaki, S., Morita, M. (1995). Imposex in Japanese gastropods (Neogastropoda and Mesogastropoda): effects of tributyltin and triphenyltin from antifouling paints. *Marine Pollution Bulletin*, 31: 402–405.

- Horiguchi, T., Shiraishi, H., Shimizu, M., Morita, M. (1997a). Imposex in sea snails, caused by organotin (tributyltin and triphenyltin) pollution in Japan: a survey. *Applied Organometallic Chemistry*, 11: 451–455.
- Horiguchi, T., Shiraishi, H., Shimizu, M., Morita, M. (1997b). Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. *Environmental Pollution*, 195: 85–91.
- Horiguchi, T., Kojima, M., Kaya, M., Shiraishi, H., Morita, M. (2002). Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, *Haliotis gigant*. *Marine Environmental Research*, 54: 679–684.
- Huet, M., Fiorini, P., Oehlmann, J., Stroben, E. (1995). Comparison of imposex response in three prosobanch species. *Hydrobiologia*, 309: 29-35.
- IMO (2002). Focus on IMO - Anti-fouling systems. <http://www.imo.org>.
- Jenner, M.G. (1979). Pseudohermaphroditism in *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Neogastropoda). *Science*, 205: 1407–1409.
- Kannan, K., Senthilkumar, K., Loganathan, B.G., S. Takahashi, Odell, D.K., Tanabe, S. (1996). Elevated accumulation of tributyltin and its breakdown products in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) found stranded along the U S, Atlantic and Gulf Coasts. *Environmental Science and Technology*, 31: 296–301.
- Ko, M.C., Bradley, G.C., Neller, A.H., Broom, M.J. (1995). Tributyltin contamination of marine sediments in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 31: 249–53.
- Lahbib, Y., Boumaiza, M., Trigui El Menif, N. (2008a). Imposex expression in *Hexaplex trunculus* from the North Tunis Lake transplanted to Bizerta channel (Tunisia). *Ecological Indicators*, 8: 239–245.
- Lahbib, Y., Abidli, S., Trigui El Menif, N. (2008b). Imposex level and penis malformation in *Hexaplex trunculus* from the Tunisian coast. *American Malacological Bulletin*, 24: 79–89.
- Lahbib, Y., Abidli, S., El-Menif, N.T. (2009a). Relative growth and reproduction in Tunisian populations of *Hexaplex trunculus* with contrasting imposex levels. *Journal of Shellfish Research*, 28: 891-898.
- Lahbib, Y., Abidli, S., Chiffolleau, J.F., Averty, B., El Menif, N.T. (2009b). First record of butyltin body burden and imposex status in *Hexaplex trunculus* (L.) along the Tunisian coast. *Journal of Environment Monitoring*, 11: 1253-1258.
- Lahbib, Y., Abidli, S., Chiffolleau, J.F., Averty, B., El Menif, N.T. (2010). Imposex and butyltin concentrations in snails from the lagoon of Bizerta (Northern Tunisia). *Marine Biology Research*, 6 (6): 600-607.
- Lahbib, Y., Abidli, S., Rodríguez González, P., Gracia Alonso, J.I., Trigui-El Menif, N. (2011). Potential of *Nassarius nitidus* for monitoring organotin pollution in the lagoon of Bizerta (northern Tunisia). *Journal of Environmental Sciences*, 23 (9): 1551-1557.
- Lahbib, Y., Abidli, S., El Menif, N.T. (2012). TBT pollution in Tunisian coastal lagoons as indicated by imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae). *Transitional Waters Bulletin*, 6 (1): 34-41.

- Lahbib, Y., Abidli, S., Trigui El Menif, N. (2013). Description of imposex and butyltin burden in *Nassarius mutabilis* from the Lagoon of Bizerta (northern Tunisia). *Russian Journal of Marine Biology*, 39: 70–75.
- Lemghich, I., Benajiba, M. H. (2007). Survey of imposex in prosobranch mollusks along the northern Mediterranean coast of Morocco. *Ecological Indicators*, 7: 209–214.
- Lima, D., Reis-Henriques, M.A., Silva, R., Santos, A.I., Castro, L.F., Santos, M.M. (2011). Tributyltin-induced imposex in marine gastropods involves tissue-specific modulation of the Retinoid X Receptor. *Aquatic Toxicology*, 101: 221–227.
- Magnusson, M., Borgegren, A., Granmo, Å., Cato, I. (2005). Eventuellt samband mellan halten tennföreningar i vävnaden hos nätsnäckan *Nassarius nitidus* och halten tennföreningar i sedimentet. Rapport Göteborgs universitet, Naturvårdsverket och Sveriges geologiska undersökning, 21 pp.
- Maran, C., Centanni, E., Pellizzato, F., Pavoni, B. (2006). Organochlorine compounds (polychlorinated biphenyls and pesticides) and polycyclic aromatic hydrocarbons in populations of *Hexaplex trunculus* affected by imposex in the Lagoon of Venice, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 486–495.
- McAllister, B.G., Kime, D.E. (2003). Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinization and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 65: 309–316.
- Mee, L.D., Fowler S.W. (1991). Editorial. Organotins biocides in the marine environment: a managed transient? *Marine environmental Research*, 32: 89-111.
- Mensink, B.P., Boon, J.P., ten Hallers-Tjabbes, C.C., van Hattum, B., Koeman, J.H. (1997). Bioaccumulation of organotin compounds and imposex occurrence in a marine food chain (Eastern Scheldt, The Netherlands). *Environmental Technology*, 18: 1235–1244.
- MEPC, 2001. International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships, IMO, London, 5 October 2001. http://www.imo.org/conventions/mainframe.asp?topic_id=529.
- Micael, J., Reis-Henriques, M.A., Carvalho, A.P., Santos, M.M. (2007). Genotoxic effects of binary mixtures of xenoandrogens (tributyltin, triphenyltin) and a xenoestrogen (ethinylestradiol) in a partial life-cycle test with Zebrafish (*Danio rerio*). *Environment International*, 33: 1035–1039.
- Oehlmann, J., Stroben, E., Fioroni, P. (1991). The morphological expression of imposex in *Nucella lapillus* (Linnaeus) (Gastropoda: Muricidae). *Journal of Molluscan Studies*, 57: 375–390.
- Oehlmann, J., Stroben, E., Schulte-Oehlmann, E., Bauer, B. (1998). Imposex development in response to TBT pollution in *Hinia incassata* (Ström, 1768) (Prosobranchia, Stenoglossa). *Aquatic Toxicology*, 43: 239–260.
- Oliveira, S.G., Oliveira, I., Santos, J.A., Pereira, M.L., Pacheco, M.P., Barroso, C.M. (2010). Factors affecting RPSI in imposex monitoring studies using *Nucella lapillus* (L.) as bioindicator. *Journal of Environment Monitoring*, 12: 1055-1063.

- Omae, I. (2003). Organotin antifouling paints and their alternatives. *Applied Organometallic Chemistry*, 17 (2): 81-105.
- Pavoni, B., Centanni, E., Valcanover, S., Fasolato, M., Ceccato, S., Tagliapietra, D. (2007). Imposex levels and concentrations of organotin compounds (TBT and its metabolites) in *Nassarius nitidus* from the Lagoon of Venice. *Marine Pollution Bulletin*, 55: 505–511.
- Pellizzato, F., Centanni, E., Gabriella Marin, M., Moschino, V., Pavoni, B. (2004). Concentrations of organotin compounds and imposex in the gastropod *Hexaplex trunculus* from the Lagoon of Venice. *Science of the Total Environment* 332: 89–100.
- Prime, M., Peharda, M., Jelic', K., Mladineo, I., Richardson, C.A. (2006). The occurrence of imposex in *Hexaplex trunculus* from the Croatian Adriatic. *Marine Pollution Bulletin*, 52: 810–812.
- Rilov, G., Gasith, A., Evans, S.M., Benayahu, Y. (2000). Unregulated use of TBT-based antifouling paints in Israel: high contamination and imposex levels in two species of marine gastropods. *Marine Ecology Progress Series*, 192: 229-238.
- Rodríguez, J.G., Borja, Á., Franco, J., García Alonso, J.I., Garmendia, J.M., Muxika, I., Sariego, C., Valencia, V. (2009). Imposex and butyltin body burden in *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867), in coastal waters within the Basque Country (northern Spain). *Science of the Total Environment*, 407: 4333–4339.
- Rolán, E., Luque, A.A. (1995). *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758) y *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867) (Gastropoda, Nassariidae), dos especies válidas de los mares de Europa. *Iberus*, 12(2): 59–76.
- Sanjuan, A., Pérez-Losada, M., Rolán, E. (1997). Allozyme evidence for cryptic speciation in sympatric populations of *Nassarius spp.* (Mollusca: Gastropoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 77(3): 773–784.
- Santos, M.M., Vieira, N., Reis-Henriques, M.A., Santos, A.M., Gómez-Ariza, J.L., Giraldez, I., Ten Hallers-Tjabbes, C.C. (2004). Imposex and butyltin contamination off the Oporto coast (NW Portugal): a possible effect of discharge of harbour dredged material. *Environment International*, 30: 793–798.
- Santos, M.M., Filipe, L.C., Vieira, M.N., Micael, J., Morabito, R., Massanisso, P., Reis-Henriques, M.A. (2005). New insights into the mechanism of imposex induction in the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 141: 101–109.
- Santos, M.M., Reis-Henriques, M.A., Vieira, M.N., Solé, M. (2006). Triphenyltin and tributyltin, single and in combination, promote imposex in the gastropod *Bolinus brandaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 155–162.
- Santos, M.M., Micael, J., Carvalho, A.P., Morabito, R., Booy, P., Massanisso, P., Lamoree, M., Reis-Henriques, M.A. (2006). Estrogens counteract the masculinizing effect of tributyltin in zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 142: 151–155.
- Sarradin, P.M. (1993). Répartition et évolution du tributylétain dans les sédiments marins. PhD Thesis, Université de Pau, France.

- Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., Fioroni, P., Bauer, B. (1997). Imposex and reproductive failure in *Hydrobia ulvae* (Gastropoda: Prosobranchia). *Marine Biology*, 128: 257–266.
- Schulte-Oehlmann, U., B. Watermann, M. Tillmann, S. Scherf, B. Market, Oehlmann, J. (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part II. Triphenyltin as a xeno-androgen. *Ecotoxicology*. 9: 399–412.
- Smith, B.S. (1971). Sexuality in the American mud-snail, *Nassarius obsoletus* (Say). *Proceedings of the Malacological Society of London*, 39: 377–378.
- Shi, H.H., Huang, C.J., Zhu, S.X., Yu, X.J., Xie, W.Y. (2005). Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. *Marine Ecology Progress Series*, 304: 179–189.
- Shimasaki, Y., Kitano, T., Oshima, Y., Inoue, S., Imada, N., Honjo, T. (2003). Tributyltin causes masculinization in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 141–144.
- Solé, M., Morcillo, Y., Porte, C. (1998). Imposex in the snail *Bolinus brandaris* from the Northwestern Mediterranean. *Environmental Pollution*, 99: 241–246.
- Stäb, J.A., Cofino, W.P., van Hattum, B., Brinkman, U.A.Th. (1994). Assessment of transport routes of triphenyltin used in potato culture in the Netherlands. *Analytica Chimica Acta*, 286: 335–341.
- Sternberg, R.M., Gooding, M.P., Hotchkiss, A.K., LeBlanc, G.A. (2010). Environmental endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology*, 19: 4–23.
- Stewart, C.J. De Mora, S.J. (1989). A review of the degradation of tributyltin in the marine environment. *Environmental Technology*, 11: 565–570.
- Strand, J., Jacobsen, J.A. (2005). Accumulation and trophic transfer of organotins in a marine food web from the Danish coastal waters. *Science of the Total Environment*, 350: 72–85.
- Stroben, E., Oehlmann, J., Fioroni, P. (1992). The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. *Marine Biology*, 113: 625–36.
- Terlizzi, A., Geraci, S., Minganti, V. (1998). Tributyltin (TBT) pollution in the coastal waters of Italy as indicated by imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda Muricidae). *Marine Pollution Bulletin*, 36: 749–752.
- Terlizzi, A., Geraci, S., Gibbs, P.E. (1999). Tributyltin (TBT)-induced imposex in the Neogastropod *Hexaplex trunculus* in Italian coastal waters: morphological aspects and ecological implications. *Italian Journal of Zoology*, 66: 141–146.
- Terlizzi, A., Delos, A.L., Garaventa, F., Faimali, M., Geraci, S. (2004). Limited effectiveness of marine protected areas: imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) populations from Italian marine reserves. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 164–192
- Titley-O'Neal, C.P., Munkittrick, K.R., Macdonald, B.A. (2011). The effects of organotin on female gastropods. *Journal of Environmental Monitoring*, 13: 2360–2388.

- Toste, R., Fernandez, M.A., Pessoa, I.A., Parahyba, M.A., Dore, M.P. (2011). Organotin pollution at Arraial do Cabo, Rio de Janeiro State, Brazil: increasing levels after the TBT ban. *Brazilian Journal of Oceanography*, 59(1): 111–117.
- Toste, R., Pessoa, I.A., Dore, M.P., Parahyba, M.A., Fernandez, M.A. (2013). Is a phallic vas deferens development in females related to the distance from organotin sources? A study with *Stramonita haemastoma*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91: 162–170.
- Trigui El Menif, N., Lahbib, Y., Le Pennec, M., Flower, R., Boumaiza, M. (2006). Intensity of the imposex phenomenon – impact on growth and fecundity in *Hexaplex trunculus* (Mollusca: Gastropoda) collected in Bizerta lagoon and channel (Tunisia). *Cahiers De Biologie Marine*, 47: 1–11.
- Vasconcelos, P., Gaspar, M.B., Castro, M. (2006). Imposex in *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) from the Ria Formosa lagoon (Algarve coast—southern Portugal). *Marine Pollution Bulletin*, 52: 337–341.
- Vasconcelos, P., Moura, P., Gaspar, M.B. (2010). Size matters: importance of penis length variation on reproduction studies and imposex monitoring in *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae). *Hydrobiologia*, 661: 363-375.
- Waldock, M.J., Thain, J.E., Smith, D., Milton, S. (1990). The degradation of TBT in estuarine sediments. *Proceedings of the 3rd International Organotin Symposium, Monaco*, 46-49.
- Wang, X., Fang, C., Hong, H., Wang, W-X. (2010). Gender differences in TBT accumulation and transformation in *Thais clavigera* after aqueous and dietary exposure. *Aquatic Toxicology*, 99: 413–422.
- Yi, A.X., Leung, K.M., Lam, M.H., Lee, J-S., Giesy, J.P. (2012). Review of measured concentrations of triphenyltin compounds in marine ecosystems and meta-analysis of their risks to humans and the environment. *Chemosphere*, 89: 1015–1025.