

## Likenlerde Ağır Metal Birikiminin DNA Üzerindeki Etkileri

Taylan BEYAZTAŞ<sup>1</sup>,

Sümer ARAS<sup>1\*</sup>,

Demet Cansaran DUMAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Tandogan, Ankara, Türkiye.

<sup>2</sup> Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Sıhhiye, Ankara, Türkiye.

Sorumlu Yazar:

e-posta: aras@science.ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: 10 Mayıs 2008

Kabul Tarihi: 15 Temmuz 2008

### Özet

Günümüzde hızlı sanayileşme, yoğun endüstriyel faaliyetler, çeşitli fosil kaynakların enerji elde edilmesi için çokça kullanılması, madenlerin hızla tasfiye edilmesi ve otomobil kullanımının artmasıyla beraber metallerin çevreye yayılması da artmıştır. Metallerin, özellikle ağır metallerin canlılar üzerinde uzun süreli ve yıkıcı etki yapmasından dolayı çevre kirlenmesinde önemli bir yeri vardır. Atmosferik kirliliğin belirlenmesinde enstrümantal yöntemlerin yanı sıra biyolojik sistemler, özellikle bitkiler ve likenler etkili ve başarılı olarak kullanılmaktadır. Likenlerin çevre kirliliği ile ilgili çalışmalarına moleküler biyoloji teknikleri ilave edilerek daha detaylı incelendiğinde hem bölgedeki kirlilik seviyeleri hakkında bilgi sahibi olunur, hem de kirliliğin boyutlarının canlılar üzerinde meydana getirebileceği etkiler direkt olarak genetik yapı üzerinden tespit edilmiş olur.

**Anahtar Kelimeler:** Likenler, Ağır metal kirliliği, DNA.

### Abstract

Today emission of heavy metals to the environment has increased by rapid industrialization, intensive industrial activities, extensive usage of fossil fuels to obtain energy, rapid discharge of mines and increased automobile usage. Metals, particularly heavy metals have a great impact on environmental pollution because of their long term and destructive effects on organisms. Biological systems, especially plants and lichens are also used effectively and successfully to detect the atmospheric pollution in beside instrumental methods. In depth analysis by addition of molecular biological techniques to environmental pollution studies with lichen, provide not only information about the degree of pollution in the subject area but also provide the identification of the extent of pollution levels directly from the genetic structure of living organisms .

**Key Words:** Lichens, heavy metal pollution, DNA.

### GİRİŞ

Likenler farklı alemlerden canlıların oluşturduğu bir hayat formu olmanın yanı sıra çok geniş ve farklı coğrafik yayılımları, çok çeşitli ve renkli morfolojik yapıları sahip olmaları, radikal çevre koşullarına dayanıklı olmaları ve çok uzun süre yaşamaları gibi özellikleri sayesinde de dikkat çekerler.

Likenler çoğunlukla karasal olmalarına rağmen birkaç tanesi tatlı su akıntılarında bulunurlar. Ekvatorlardan kutuplara ve alt kutup bölgelere kadar, dağlık veya kıyı bölgelerden, güney yarımkürenin ılıman yağmur ormanları ve kuzey yarımkürenin orman ekosistemlerine ya da çöllere kadar tüm karasal ekosistemlerde bulunurlar [1].

Birbirine çok da benzemeyen çevre şartlarda ve geniş bir coğrafik yayılım çerçevesinde uzun yıllar

ayakta kalabilmeleri likenlerin radikal çevre koşullarına karşı dayanıklı olmalarıyla ilişkilendirilebilir. Kavurucu sıcaklığa, dondurucu soğuğa ve uzun süre kuraklığa rağmen hayatta kalabilirler, su potansiyelleri çevre koşullarla pasif olarak farklılaşır, ayrıca bazı türler çeşitli atmosferik kirliliklerine karşı oldukça toleranslıdır [1].

### LİKENLERİN ATMOSFERİK KİRLİLİK İLE İLİŞKİLİ KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ

Makro ve mikro besinlerin biriktirilmesi ve işlenmesi canlılığın fizyolojik fonksiyonları için esas olduğundan, herhangi bir organizma gibi likenler için de bu durum büyüme ve gelişme için kritiktir. Likenler vaskular bitkiler gibi köklere sahip değildirler, bundan

dolayı daha zengin besin kaynağı olan toprak yerine atmosferik besin kaynağını kullanmak ve biriktirmek üzere sistemler geliştirmişlerdir [2]. Atmosferik tortu likenlerin üzerine kuru ya da nemli fazlar şeklinde çöker, likenler bu çöküntüyü, sıvı içinde çözülmüş maddeler, gazlar ya da katı partiküller halinde alır, besin havuzu olarak kullanırlar [3].

Vaskular bir kök sistemine sahip olmamanın yanı sıra, likenler yapraklar gibi bir kutikül tabakası ve stomalara da sahip değildirlir [1]. Bunun sonucu olarak madde alış verışı tüm liken yüzeyi ile yapılır [1] ve genel olarak likenlerde yüzey hacim oranı yüksektir [4]. Bu özellikler sayesinde likenler atmosferik tortuya ya da depozisyona yoğun olarak maruz kalırlar.

Likenler aerosol depozisyonu besin kaynağı olarak kullanabilmenin yanında, ihtiyaçlarından fazla mineral element biriktirebilirler [4]. Biriktirilen bu elementlerin içinde metaller ve ağır metaller önemli bir yer tutar. Bu metaller liken tallusu tarafından çözünür veya parçacık halde yakalanır [4]. Liken tallusu üzerindeki çeşitli girinti ve çıkıntılar, sil benzeri yapılar partikül yakalamada yardımcı yapılar olarak çalışır [5].

Metaller organik bileşiklerdeki karboksil, hidroksil, sülfhidril, fosforil, aldehit ve amin gruplarına bağlanırlar [6]. Metal katyonları hücre duvarındaki iyon değişim bölgelerinden hücreye geçerler, bu süreçte iyonların karşılıklı değişimi söz konusudur. Hücre içine alımda bazı metaller için, örneğin kadmiyum, kolaylaştırılmış aktif taşıma işleminin gerçekleştiği düşünülmektedir [2].

## ÇEVRE KİRLİLİĞİ VE AĞIR METALLER

Hızlı sanayileşme, yoğun endüstriyel faaliyetler, çeşitli fosil kaynakların enerji elde edilmesi için çokça kullanılması, madenlerin hızla tasfiye edilmesi ve otomobil kullanımının artmasıyla beraber metallerin çevreye yayılması da artmıştır. Metallerin, özellikle ağır metallerin canlılar üzerinde uzun süreli ve yıkıcı etki yapmasından dolayı çevre kirlenmesinde önemli bir yeri vardır.

Ağır metallerin büyük çoğunluğu canlıları için esansiyel değildir ve düşük konsantrasyonlarda kısa süreli etkileri bile zarar verici olabilir. Terim olarak ağır metal göreceli bir kavram olarak kabul edilir ve yoğunluğu yaklaşık 5 gr/cm<sup>3</sup> den büyük olan metalleri kapsar [4]. Fakat yaygın kullanımda toksik etkisi göz önüne alınarak bazen yoğunluğu düşük olan metaller de ağır metal olarak adlandırılabilir. Farklı olarak metaller sülfür, oksijen ve azot afinitelerine göre A, B ve geçiş grubu olarak sınıflandırılmışlardır [7]. Genellikle Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, V ve Zn yapılan çalışmalarda kullanılan ve ağır metal olarak belirtilen ortak elementlerdir [4].

**Çizelge 1.** Bazı ağır metallerin toksisitesi ve emisyon kaynakları [3].

Element	Toksisite	Kaynak
Cd	Bitkilerde fotosentez ve element alımı ve taşınmasıyla rekabete girer. Karsinojenik. İtai-itai hastalığına sebep olur.	Metalleri fabrikaları, atık tesisleri, mineral gübreler, kömür tüketimi, akümülatörler.
Cr	Karsinojenik. Hexavalent iyonları hücre zarlarını geçebilir ve bitkiler, hayvanlar ve insanlar için toksiktir.	Metalleri fabrikaları, boya imalatı, deri sanayi, katalizörler.
Hg	Bitkiler için oldukça toksiktir, metilenmiş cıva besin zincirinde birikir. Minimata hastalığına sebep olur.	Klor-alkali fabrikaları, kömür tüketimi, maden ocakları, bazı pestisit tipleri.
Pb	Kümülatif zehir etkisi vardır. Karsinojenik ve teratojenik. Çocukların entelektüel zeka gelişimini engelleyebilir.	Otomobil egzostları, metalurji fabrikaları, akümülatörler, kablo imalatı, demir-çelik imalatı.
V	Karsinojenik. Fitotoksik. Solunum sistemi yoluyla girdiğinde insanlar ve hayvanlar için toksik olabilir.	Maden ocakları, çelik üretimi, kömür ve yağ yakan fabrikalar.

Ağır metallerin çevreye yayılmasında termik enerji santralleri, petrokimya fabrikaları, çimento fabrikaları, klor-alkali fabrikaları yada maden ocakları gibi işletmelerin önemli etkisi vardır [3]. Bu işletmelere yakın bölgelerdeki kirlenme seviyeleri oldukça yüksek olabilir. Ayrıca büyük kentler ve otoyol yakınları da ağır metal kirliliğinin yüksek olabileceği bölgelerdir. Birçok ağır metalin canlılar üzerine önemli zararlı etkileri vardır (Çizelge 1).

## ATMOSFERİK AĞIR METAL KİRLİLİĞİNİN LİKENLERLE BELİRLENMESİ

Atmosferik kirliliğin belirlenmesinde enstrümantal yöntemlerin yanı sıra biyolojik sistemler, özellikle bitkiler ve likenler etkili ve başarılı olarak kullanılmaktadır. Canlıların pahalı ekipmanlar yerine belirleyici yada görüntüleyici olarak kullanılmasının, canlılıklar içinde bitkilerin ve likenlerin tercih edilmesinin çeşitli avantajları ve dezavantajları vardır. Bu avantajların başında düşük maliyet, inceleme öncesi kirlilik verilerini de içerebiliyor olması, insan sağlığı açısından biyolojik karşılaştırma yapılabilmesi gibi seçenekler yer alır (Çizelge 2) [8].

Kirlilik araştırmalarında likenler sıklıkla bitkilerle yapılan çalışmalara dahil edilir. Bu çalışmalarda biyoindikatör, biyomonitör

ve biyoakümülatör terimleri organizmalar için tanımlayıcı olarak kullanılır. Kısaca biyoindikatör; çevresi hakkında kalitatif bilgi verebilen organizmalar için, biyomonitör; belirli bir araştırma sürecinde çerçevesinde bulunduğu ortam hakkında bilgi veren organizmalar için ve biyo-akümülatör; belirli veya bazı elementleri çevre ortamına göre daha yüksek konsantrasyonlarda biriktirebilen organizmalar için kullanılır [8]. Bu açılardan likenler hava kirliliği çalışmalarında hem biyoindikatör hem biyomonitör hem de biyoakümülatör olarak değerlendirilir. Yapılan bu kirlilik çalışmalarında incelenen kirleticiler sadece ağır metaller değil sülfürdioksit, organik kirleticiler yada radyonüklidler de olabilir [2]. Likenlerin atmosferik ağır metal kirliliği çalışmalarında kullanılmasında önemli avantajlarının yanı sıra çeşitli dezavantajları da bulunur. Bu avantaj ve dezavantajlar başlıca [8];

- Likenler ihtiyaçlarından fazla mineral element biriktirirler,
- Geniş coğrafik dağılıma sahiptirler,
- Morfolojileri mevsimsel değişiklikler göstermez,
- Çok yavaş büyürler,
- Çok sayıda çalışma mevcuttur.

**Çizelge 2.** Enstrümantal ve biyolojik sistemlerin biyogörüntüleme çalışmalarında kullanımının avantajları bakımından karşılaştırılması [8].

Kriter	Enstrümantal görüntüleme	Biyolojik görüntüleme
Partikül yakalayabilme		+
Geçmiş kapsama		+
Düşük ücret		+
Yüksek elde edilebilirlik		+
Bakım-onarım gerektirmeme		+
Güç kaynaklarından bağımsız oluş		+
Vandalizmden uzak olma		+
Biyolojik ilgi		+
Sinerjistik (antagonistik) etkileri içermeye		+
Zamana bağlı etki	+	
Diğer faktörlerden bağımsız cevap (iklim, diğer kirleticiler)	+	
Standardizasyon	+	
Tekrarlanabilirlik	+	
Kesin ölçümler	+	
Spesifik reaksiyon	+	
Havadan ve topraktan kökenlenen maddeleri ayırabilme	+	

Likenlerin kullanımında karşılaşılan dezavantajlar ise;

- Likenlerin laboratuvarlarda yetiştirilmesi çok güçtür,
- Kontrollü bir üreme sağlanması mümkün değildir,
- Liken fizyolojisi bir çok yayına rağmen hala tam açıklanabilmiş değildir,
- Kükürt dioksit duyarlılığı ağır metal kirliliği incelemelerinde engel oluşturur,
- Tallusun farklı parçalarının yaşlarını tahmin etmek imkansızdır.

Dezavantajlarına rağmen likenler atmosferik ağır metal kirliliği belirleme çalışmalarında kullanılan en iyi biyomonitör organizmalardan biridir. Ağır metal kirliliği çalışmaları yapılırken kirletici kaynaklara çeşitli uzaklıklardan ve uzak alanlardan kirlenmemiş liken örnekleri alınır. Bu örneklerin içerdikleri ağır metal konsantrasyonları enstrümantal analiz yöntemleri kullanılarak belirlenir ve kontroller dikkate alınarak karşılaştırma yapılır. Metal konsantrasyonu belirlemek için genellikle Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (AAS) kullanılır [9]. Farklı olarak kirletici kaynakların etrafından liken toplamak yerine, temiz ve uzak bölgelerden toplanan likenler kirliliğin yoğun olduğu kentsel bölgelere yerleştirilerek belirli sürelerde absorblanan metal miktarı ölçülür.

## **AĞIR METALLER VE DNA ETKİLEŞİMİ**

Metal iyonları canlılar için esansiyel olanlarda dahil olmak üzere belirli konsantrasyonlardan fazla bulduklarında organizmalar için toksiktir. Esansiyel olan metallerin belirli konsantrasyonlardan düşük ya da daha yüksek bulunmaları, normal biyokimyasal süreçlerde bozukluklara yol açar. Ağır metal olarak tanımlanan metallerin çoğunluğu canlılar için esansiyel değildir ve esansiyel olmayan metallerin düşük konsantrasyonları ya da çok düşük konsantrasyonlara uzun süre maruz kalınması biyolojik sistemlerde kısa süreli ve onarılabılır

yada kalıcı bozukluklara yol açabilir. Toksik metallere tolerans gösterebilen organizmalar olmasına rağmen, bu tolerans belirli bir eşik değerine kadar sürdürülebilir, tolerans seviyesini aşan miktarlar biyoakümülatör ya da hiperakümülatör organizmalar için de direk ya da dolaylı olarak fonksiyonel bozukluklara sebep olabilir.

Hüresel fonksiyonların genetik materyal tarafından kontrol edildiği dikkate alınır, nukleik asitlerin olağan yapılarının bozulması en etkili ve onarılmadığı sürece kalıcı bozukluktur. Günümüzde nukleik asit yapısını ya da fonksiyonunu bozan birçok mutajen yada potansiyel mutajen ajan tespit edilmiştir. Birçok ağır metal de bu mutajen ya da potansiyel mutajen ajanlar sınıfında yer alır, örneğin kadmiyum ve kadmiyum bileşikleri Uluslararası Kanser Araştırma Örgütü tarafından 1.grup karsinojen olarak tanımlanmıştır.

Metal iyonlarının nukleik asitlere bağlanması uzun zamandır araştırma konusudur, fakat bağlanma mekanizması nasıl gerçekleştiği henüz bilinmemektedir. Bununla beraber ağır metal iyonlarının zararlı etkisi, bunların DNA'nın özel bölgelerine bağlanmasıyla kısmi olarak ilgili olabilir. Pozitif yüklü metal iyonları direk ya da dolaylı olarak DNA'nın yüksek elektron yoğunluğu ya da negatif yüklü olarak karakterize edilen bölgeleriyle etkileşime girebilirler. DNA'nın bu gibi bölgeleri negatif yüklü fosfat grupları ve azot ve oksijen gibi bazların elektron vericisi olan atomları olabilir. Metal iyonlarının bağlanması tek zincirde ya da her iki zincirde kırılmalara yol açabilir [10].

Ekotoksikoloji çalışmalarında ağır metal olarak belirtilen elementlerin çoğunun dahil olduğu geçiş metalleri yada d-blok elementleri kısmi olarak dolu d orbitallerine sahiptir ve bu yüzden serbest radikaller olarak davranabilirler. Geçiş metalleri ikiden fazla farklı bölge ile etkileşime girerler ve bunların DNA ile etkileşimi alkali metallerin etkileşiminden daha karmaşıktır. Geçiş metalleri direk olarak bazlara ya da dolaylı olarak fosfat gruplarına bağlanırlar. Bu metallerin çoğu pürinlerin 7. azot atomu ve pirimidinlerin 3. azot atomuna

bağlanarak çift zincirli heliks yapıyı bozarlar [10].

Nükleik asitlerin yapılarının bozulması bağlanan metal iyonunu çeşidine bağlıdır ve genellikle bu etkileşim baz eşleşmesindeki hidrojen bağlarını bozar. Buna ek olarak, metal iyonlarının bağlanması baz dizisi ile ilişkilidir, DNA'nın küçük oluşuna bağlanan katyonlar genellikle Adenin-Timin bakımından zengin dizilere bağlanırlar, büyük oluşa bağlanan katyonlara Guanin-Sitozin bakımından zengin dizileri tercih ederler [10].

## EKOTOKSİKOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLER

80'li yılların başlarından itibaren, rekombinanat DNA teknolojisi, gen klonlanması, ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) teknolojisinin geliştirilmesine paralel olarak moleküler biyolojide çok hızlı ilerlemeler kaydedilmeye başlanmıştır. Özellikle Polimeraz Zincir Reaksiyonun makineler tarafından gerçekleştirilen basit ve otomatik bir süreç haline getirilmesi yeni birçok araştırma alanının ortaya çıkmasına ve hızla ilerlemesine olanak sağlamıştır.

PZR kullanım alanlarının arasına son yıllarda ekotoksikoloji disiplinleri de dahil olmuştur. Çevresel kirleticilerin organizmalar üzerindeki etkisi birkaç yoldan ve farklı seviyelerde gösterilebilir. Genotoksik maddelerin DNA üzerinde etkili olduğu durumlarda, mutasyon, büyük kromozomal anormallikleri, programsız DNA sentezleri, DNA eklenmeleri ve kırılmaları gibi genotipik değişiklikleri tespit edebilen biyomarkırlar kullanılabilir. Bu uygulamaların duyarlılığı ve spesifikliği değişkendir. Genotoksik etkenin etkisinin direk DNA üzerinde gösterilmesinin temel sebebi duyarlılığı ve kısa sürede cevap alınabilmesidir [11].

Filogenetik çalışmalarında çeşitliliği belirlemek için kullanılan polimorfizm analizlerinden anlam olarak çok küçük bir farkla ekotoksikoloji çalışmalarında,

toksik etkene maruz kalmış bireylerde ya da popülasyonlarda etkenden uzak olanlara göre bir fark aranır. Dolayısıyla bir örnek serisi içinde her örneğin farklı olması, yani çeşitlilik değil, kontrol olarak belirlenen örneğe göre diğerlerinin bir fark göstermesi anlamlıdır, fakat bu fark diğerlerine benzememesi yönüyle yine polimorfizm teriminin sınırları içindedir. Bu anlamda polimorfizm genetik markırlar sayesinde genotipik olarak belirlenebilir.

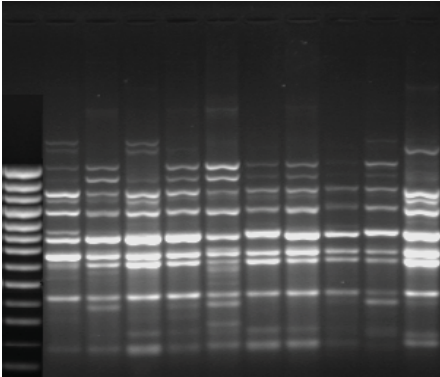
DNA parmak izi yöntemleri de bu işleve sahip genetik markırlardır. Genel olarak DNA parmak izi işlemleri; melezlemeye dayalı yöntemler (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) ve PZR tabanlı yöntemler (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA, AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism) olarak iki ana grupta toplamak mümkündür. DNA parmak izi yöntemlerinin temel prensibi, DNA dizisinde bireysel düzeyde bulunan farklılığın, DNA molekülünden farklı uzunlukta parçalar elde edip, PCR tabanlı işlemler için bu parçaların çoğaltılması ve elektroforez sistemlerinde karakteristik bantlar halinde belirlenmesine dayanır. Bu temele dayanan ve farklı süreçlerle gerçekleştirilen birçok teknik geliştirilmiştir, bunların arasında en yaygın kullanılanları PZR tabanlı RAPD, AFLP teknikleridir.

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda bitkilerde deneysel olarak oluşturulabilecek veya kirli çevre şartlarına maruz kaldığı için oluşabilecek olabilecek DNA hasarlarının ve mutasyonların tespit edilmesinde RAPD ve AFLP teknikleri başarı ile kullanılmaktadır [12-15]. Aras ve ark. tarafından yürütülmekte olan likenlerde ağır metal birikiminin DNA üzerine etkisini çalışmaları devam etmektedir. Bu çalışmalarda Yenice Ormanlarından Karabük Demir Çelik Fabrikası'na kadar olan bölgeden toplanan liken örneklerinin ağır metal içerikleri atomik absorpsiyon yöntemi ile DNA düzeyinde etkisi ise RAPD tekniği kullanılarak incelenmektedir. Şekil 1'de RAPD analizlerine ait bir sonuç görünmektedir. Şekil 1'de, 1 nolu kuyuda Yenice Ormanından 1750 m. yükseklikte toplanmış *Pseudevernia furfuraceae* (L.) Zopf. örneği bulunmaktadır. 2,4,5,6,7,8,9,10

nolu kuyularda ise temiz bölgeden fabrikaya doğru her 5 km aralıkla alınmış *Pseudevernia furfuraceae* (L.) Zopf. örneği yer almaktadır. 3 nolu kuyuda ise kontrol örneği yer almaktadır. RAPD analizi sonuçları, kontrol örneği ve 1 nolu kuyudaki Yenice ormanından toplanan örnek ile fabrika etrafından toplanan diğer örneklerle karşılaştırıldığında, gerek bant sayısı gerekse bant yoğunluğu bakımından farklılıklar olduğunu göstermiştir (Şekil 1). Aynı örneklerin ağır metal içeriklerinde ise fabrikaya doğru yaklaşıldıkça artış olduğu gözlenmiştir.

## SONUÇ

Atmosferik ağır metal kirliliğini belirleme çalışmalarında, birçok açıdan değerlendirme yapıldığında likenler en iyi organizmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Moleküler biyolojik teknikler ile birleştirilen çalışmalarda hem bölgedeki kirlilik seviyeleri hakkında bilgi edinilir, hem de kirliliğin boyutlarının canlılar üzerinde meydana getirebileceği etkiler direk olarak genetik yapı üzerinden tespit edilmiş olur. Fakat bu bilgiler genellemeler yapacak kadar yeterli değildir ve örneğin AFLP gibi diğer teknikler ile daha güvenli sonuçlar sağlanabilir.



**M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10**

Şekil 1. *Pseudevernia furfuraceae* (L.) Zopf ağır metal birikimini RAPD tekniği OPA18 primeri ile yapılan çalışmanın jel görüntüsü (M Marker, 1 Yenice Ormanından toplanan temiz örnek, 3 Kontrol örneği, 2,4,5,6,7 Fabrika etrafından değişik istasyonlardan alınan *Pseudevernia furfuraceae* (L.) Zopf.) örnekleri.

## TEŞEKKÜR

Bu makalede konu edilen çalışmaların gerçekleştirilmesinde destek sağlayan Ankara Üniversitesi BAP Müdürlüğüne, (Proje no: 2004 07 05 093) ve ayrıca sağladığı kısmi destekler için A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsüne (proje no:171), çalışmanın başlacısından sonuna desteğini ve yardımlarını bizden esirgemeyen sayın Prof. Dr. Orhan ATAKOL'a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- [1] Nash, TH. 1996a. Introduction. In: Lichen Biology (ed. Nash III, T.H.), pp. 1-7. Cambridge University Press, New York.
- [2] Nash, TH. 1996b. Nutrients, elemental accumulation and mineral cycling. In: Lichen Biology (ed. Nash III, T.H.), pp. 1-7. Cambridge University Press, New York.
- [3] Bargagli R, Mikhailova I. 2002. Accumulation of inorganic contaminant. In: Monitoring with Lichens Monitoring Lichens. (ed. Nimis, PL, Scheidegger C, Wolseley PA), pp 65-84. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- [4] Garty J. 2001. Biomonitoring Atmospheric Heavy Metals with Lichens: Theory and Application. Critical Reviews in Plant Sciences. 20(4): 309-371.
- [5] Puckett KJ, Finegan EJ. 1980. An analysis of the element content of lichens from the Northwest Territories, Canada. Canadian J. Botanic. 58: 2073-2089.
- [6] Sarret G, Manceau A, Spadini L, Roux J.C, Hazeman JL, Soldo Y, Eybert-Bérard L, Mentonnex JJ. 1998. Structural determination of Zn and Pb binding sites in *Penicillium chrysogenum* cell walls by EXAFS spectroscopy. Environ. Sci. Technol. 32: 1648-1655.

- [7] Nieboer E, Richardson DHS. The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. 1980. *Environ. Pollut. (Series B)*. 1: 3-26.
- [8] Wittig R. 1993. General aspects of biomonitoring, In: *Plants as Biomonitors*. (ed. Markert B.), pp. 1-27. Weinheim.
- [9] Garty J. 2002. Biomonitoring heavy metal pollution with lichens, In: *Protocols in Lichenology*. (ed. Kranner I, Beckett R, Varma A.), pp. 458-482. Springer-Verlag, Heidelberg.
- [10] Anastassopoulou J. 2003. Metal-DNA interactions. *Journal of Molecular Structure*. 651/653: 19-26.
- [11] Savva D. 1998. Use of DNA Fingerprinting to Detect Genotoxic Effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 41: 103-106.
- [12] Atienzar FA, Cordi B, Evenden AJ, Jha AN, Depledge MH. 1999. Qualitative assesment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2275-2282.
- [13] Camatini M, Bonfante P, Colombo A, Urani C. 1998. Molecular approaches to evaluate pollutants. *Chemosphere*. 37: 2717-2738.
- [14] Liu W, Li PJ, Qi XM, Zhou QX, Zheng L, Sun TH, Yang YS. 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*. 61: 158-167.
- [15] Piraino F, Aina R, Palin L, Prato N, Sgorbati S, Santagostino A, Citterio S. 2006. Air quality biomonitoring: Assessment of air pollution genotoxicity in the Province of Novara (North Italy) by using *Trifolium repens* L. and molecular markers. *Science of the Total Environment*. 372: 350-359.