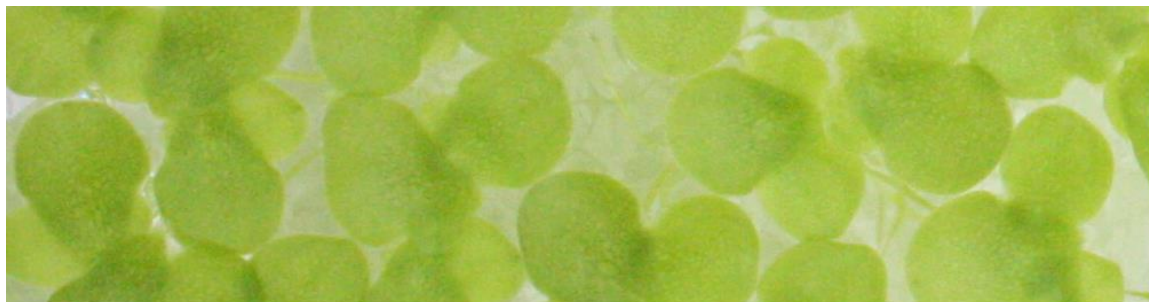




ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ & ΠΡΟΣΤΑΣΤΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη της συνδυαστικής δράσης ζιζανιοκτόνων σε φωτοσυνθέτοντες οργανισμούς μη στόχους με τη χρήση βιοδεικτών και βιοσημαντών»



ΑΚΡΙΒΗ-ΧΑΡΑ Γ. ΜΟΥΖΑΚΗ-ΠΑΞΙΝΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΑΡΑΠΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη της συνδυαστικής δράσης ζιζανιοκτόνων σε φωτοσυνθέτοντες οργανισμούς μη στόχους με τη χρήση βιοδεικτών και βιοσημαντών»

ΑΚΡΙΒΗ-ΧΑΡΑ Γ. ΜΟΥΖΑΚΗ-ΠΑΞΙΝΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΑΡΑΠΗΣ

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Γεράσιμος Αράπης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής ΓΠΑ (μέλος)

Κων/νος Σαϊτάνης, Επίκουρος καθηγητής ΓΠΑ (μέλος)

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Γεράσιμος Αράπης, Καθηγητής ΓΠΑ

Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Κων/νος Σαϊτάνης, Επίκουρος καθηγητής ΓΠΑ

Φωτεινή Φλουρή, Λέκτορας ΓΠΑ

Γεώργιος Λιακόπουλος, Επίκουρος καθηγητής ΓΠΑ

Νικόλαος Λάμπρου Αναπληρωτής καθηγητής ΓΠΑ

Ιωάννης Βόντας Αναπληρωτής καθηγητής ΓΠΑ



«Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου».

Η έγκριση της παρούσας διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν.5343-1982 άρθρο 202)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος του ΓΠΑ σε συνεργασία με άλλα εργαστήρια του ιδρύματος αλλά και του εξωτερικού. Πολλοί ήταν, λοιπόν, αυτοί που συνετέλεσαν στην ολοκλήρωσή της και τους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Γεράσιμο Αράπη για την ανάθεση του θέματος και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια καθώς και για την βοήθειά του στα ποικιλόμορφα προβλήματα καθ' όλη τη διάρκεια του διδακτορικού.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Κοσμήτορα Σπυρίδωνα Κίντζιο για την συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, για τις συμβουλές του, καθώς και για την δυνατότητα χρήσης του εξοπλισμού και γενικότερα των δυνατοτήτων του εργαστηρίου του, που έγινε με τα χρόνια το δεύτερο εργαστήριό μου. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον Επίκουρο καθηγητή Κωνσταντίνο Σαϊτάνη για την συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε στην εύρεση λύσεων σε θέματα στατιστικής επεξεργασίας, απεικόνισης αποτελεσμάτων, απόδοσης νοήματος αλλά και γενικότερα για τις πολύτιμες συμβουλές του σε όλα τα επίπεδα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής. Καταρχάς την Λέκτορα Φωτεινή Φλουρή για τις συμβουλές της και την καθοδήγησή της γύρω από τα θέματα της συνδυασμένης τοξικότητας, για τον χρόνο που αφιέρωσε στην συζήτηση των θεμάτων αυτών και για την συμμετοχή της στην επιτροπή. Ακόμα, τον επίκουρο καθηγητή Γεώργιο Λιακόπουλο για την βοήθειά και τις συμβουλές του στα θέματα του φθορισμού της χλωροφύλλης, για την ενασχόλησή του με την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, για την παροχή του απαραίτητου εξοπλισμού και για την συμμετοχή του στην επιτροπή. Επίσης, τον Αναπληρωτή καθηγητή Νικόλαο Λάμπρου και τον Αναπληρωτή καθηγητή Ιωάννη Βόντα για την πρόθυμη συμμετοχή τους στη επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης να αναφέρω τη σημαντική συμβολή του εκλιπόντος Επίκουρου Καθηγητή Αναστάσιου Μαρκόγλου στον σχεδιασμό της παρούσας διδακτορικής διατριβής και στην συγγραφή της πρότασης για χρηματοδότηση από τον Ηράκλειτο II. Ακόμα να ευχαριστήσω την Επίκουρη καθηγήτρια Αντωνία-Νέλλη Ρήγα-Καρανδεινού

για την συνεισφορά της στην συγγραφή της πρότασης για χρηματοδότηση από τον Ηράκλειτο II, χωρίς την οποία δεν θα είχε επιτευχθεί η λήψη της υποτροφίας.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Helmholtz Zentrum του Μονάχου Peter Schröder, καθώς και όλη την επιστημονική του ομάδα, για την επίβλεψη, την φιλοξενία και την άψογη συνεργασία στην πραγματοποίηση μέρους της διδακτορικής διατριβής στο τμήμα Research Unit for Microbe-Plant Interactions (AMP). Παράλληλα να ευχαριστήσω και όλους τους ερευνητές, που γνώρισα στο Ινστιτούτο αυτό, για την φιλία και την συμπαράστασή τους που έκανε την διαμονή μου στο Μόναχο μοναδική εμπειρία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα νυν και πρώην μέλη του εργαστηρίου Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος του ΓΠΑ για την συνεργασία και το φιλικό περιβάλλον. Ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα Μανούσο Φουντουλάκη για την άψογη συνεργασία και την πολύπλευρη βοήθειά του όλα αυτά τα χρόνια. Δεν θα μπορούσα κλείνοντας να παραλείψω να ευχαριστήσω τις φίλες μου και Διδάκτορες Κέλλυ Φλαμπούρη, Σοφία Μαυρίκου και Νάντια Μασέλου για την συνεργασία στην εύρεση λύσεων σε ποικίλα επιστημονικά προβλήματα αλλά πάνω από όλα για την φιλία τους που έκανε τόσο όμορφη την καθημερινότητα όλων αυτών των χρόνων. Τέλος, να ευχαριστήσω τα μέλη της οικογένειάς μου για την ηθική και οικονομική συμπαράστασή τους αλλά πάνω από όλα για το ότι μου έμαθαν να αγαπώ την γνώση και την μόρφωση.

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

- 1O₂**: (Singlet oxygen) Οξυγόνο διέγερσης απλότητας
- BSA**: (Bovine serum albumin) Αλβουμίνη ορού βοοειδών
- CA**: (concentration addition) προσθετική δράση
- CAT**: (Catalase) Καταλάση
- CDNB**: (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο
- EC₅₀**: (Effective Concentration 50%) Συγκέντρωση με 50% επίδραση
- EC_x**: (Effective Concentration x%) Συγκέντρωση με x% επίδραση
- EDTA**: (Ethylenediaminetetraacetic acid) Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
- ETR**: (electron transport rate) ρυθμός ροής ηλεκτρονίων στη φωτοχημική αλυσίδα
- F_v/F_m**: (maximum quantum yield of PSII) μέγιστη φωτοχημική απόδοση της φωτοχημείας του PSII
- GR**: (Glutathione reductase) Αναγωγή της γλουταθειόνης
- GSH**: (reduced form of glutathione) Ανηγμένη γλουταθειόνη
- GSSG**: (oxidized form of glutathione) Οξειδωμένη γλουταθειόνη
- GST**: (Glutathione-S-transferase) S-Μεταφοράση της γλουταθειόνης
- H₂O₂**: (Hydrogen peroxide) Υπεροξείδιο του υδρογόνου
- IA**: (independent action) ανεξάρτητη δράση
- LOD**: (Limit of detection) Όριο ανίχνευσης
- LOEC**: (Lowest Observed Effect Concentration) Χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία παρατηρήθηκε επίδραση
- NADPH**: Φωσφορικό νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
- NOEC**: (No Observed Effect Concentration) Συγκέντρωση που δεν παρατηρήθηκε επίδραση
- NPQ**: (non-photochemical quenching) ρυθμός μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού της χλωροφύλλης
- POX**: (Peroxidase) Υπεροξειδάση
- PSII**: (Photosystem II) Φωτοσύστημα II
- qP**: (photochemical quenching coefficient) συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού της χλωροφύλλης
- ROS**: (Reactive Oxygen Species) Δραστικές μορφές οξυγόνου
- O₂^{•-}**: (Superoxide radical) Ρίζα σουπεροξειδικού ανιόντος
- Φ_{PSII}**: (quantum yield of PSII) λειτουργική φωτοχημική απόδοση της φωτοχημείας του PSII
- Φ_{PSIIo}**: βλ. F_v/F_m
- ΦΠ**: (Plant Protection Product) Φυτοπροστατευτικό προϊόν

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
Οικοτοξικολογία, βασικές έννοιες και ορισμοί.....	7
Οι βιοδείκτες <i>Lemna spp.</i>	10
Φωτοσύνθεση.....	14
Γενικά	14
Φωτοσυνθετικές χρωστικές και απορρόφηση φωτός.....	15
Χλωροπλάστες.....	15
Φωτεινές αντιδράσεις	16
Σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης	20
Ζιζανιοκτόνα	21
Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος II	22
Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλλικού	27
Σκοπός της διατριβής	30
ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	32
Καλλιέργεια <i>Lemna minor L.</i>	32
Προσδιορισμός της μεταβολής των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων τεσσάρων ζιζανιοκτόνων με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC	34
Εκχύλιση στερεάς φάσης.....	34
Μέθοδος HPLC	35
Αποτελέσματα HPLC	37
1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	40
1.1 Εισαγωγή.....	40
1.1.1 Ευρωπαϊκή νομοθεσία σχετικά με την τοξικότητα μεμονωμένων χημικών ουσιών και μιγμάτων	40
1.1.2 Σχέση δόσης – απόκρισης.....	42
1.1.3 Παράμετροι ανάπτυξης της <i>Lemna minor</i>	44
1.1.4 Τοξικότητα μιγμάτων.....	46
1.2 Σκοπός του κεφαλαίου	52
1.3 Υλικά και μέθοδοι για τις δοκιμές τοξικότητας στη <i>Lemna minor</i> των ζιζανιοκτόνων.....	53
1.3.1 Χημικά που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματισμό	53

1.3.2	Παρασκευή stock διαλυμάτων ζιζανιοκτόνων για τις δοκιμές τοξικότητας .	54
1.3.3	Διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων των ζιζανιοκτόνων και πρωτόκολλο πειραματισμού	54
1.3.4	Στατιστική επεξεργασία και λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε	58
1.4	Αποτελέσματα δοκιμών δόσης-απόκρισης	60
1.4.1	Αποτελέσματα μεμονωμένων ζιζανιοκτόνων	60
1.4.2	Αποτελέσματα συνδυασμένης τοξικότητας ζιζανιοκτόνων	67
1.5	Συζήτηση	75
2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	81
2.1	Εισαγωγή	81
2.1.1	Παράμετροι και κινητική φθορισμού χλωροφύλλης	83
2.1.2	Μηχανισμός δράσης των ζιζανιοκτόνων και φθορισμός	87
2.2	Σκοπός του κεφαλαίου	88
2.3	Υλικά και μέθοδοι για την φθορισμομετρία χλωροφύλλης	88
2.3.1	Μέτρηση της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης του PSII (Φ_{PSII})	88
2.3.2	Μέτρηση των παραμέτρων της καμπύλης βραδείας κινητικής επαγωγής της φωτοσύνθεσης	90
2.3.3	Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	91
2.4	Αποτελέσματα φθορισμομετρίας χλωροφύλλης	91
2.4.1	Tritosulfuron-Tribenuron methyl	92
2.4.2	Metribuzin-Tritosulfuron	96
2.4.3	Terbuthylazine-Tritosulfuron	100
2.4.4	Terbuthylazine-Metribuzin	104
2.5	Συζήτηση	109
3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	117
3.1	Εισαγωγή	117
3.1.1	Οξειδωτική καταπόνηση και ζιζανιοκτόνα	117
3.1.2	Μεταβολισμός ζιζανιοκτόνων στα φυτικά κύτταρα	119
3.1.3	Ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των φυτών και στον μεταβολισμό των ζιζανιοκτόνων	120
3.2	Σκοπός του κεφαλαίου	123
3.3	Υλικά και μέθοδοι για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων	124
3.3.1	Σχεδιασμός του πειράματος	124
3.3.2	Χημικά που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματισμό	124

3.3.3	Εκχύλιση ενζύμων από τον φυτικό ιστό	125
3.3.4	Μέτρηση της ειδικής δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων	125
3.3.5	Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας πρωτεϊνών.....	129
3.4	Αποτελέσματα ειδικής δραστηριότητας ενζύμων	129
3.4.1	Ειδική δραστηριότητα ενζύμων μετά από έκθεση στο terbutylazine και το tritosulfuron	129
3.4.2	Ειδική δραστηριότητα ενζύμων μετά από έκθεση στο συνδυασμό terbutylazine-tritosulfuron	134
3.5	Συζήτηση.....	137
4	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	143
4.1	Εισαγωγή.....	143
4.1.1	Ορισμός βιοαισθητήρα.....	143
4.1.2	Ιστορία βιοαισθητήρων.....	143
4.1.3	Το πρόβλημα με τα φυτοφάρμακα-ζιζανιοκτόνα	144
4.1.4	Τμήματα βιοαισθητήρα.....	144
4.1.5	Κατηγορίες βιοαισθητήρων με βάση το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης 145	
4.1.6	Κατηγορίες βιοαισθητήρων με βάση το είδος του μεταλλάκτη	145
4.1.7	Αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες.....	146
4.1.8	Φωτοσυνθετικοί βιοαισθητήρες.....	147
4.2	Σκοπός του κεφαλαίου	151
4.3	Υλικά και Μέθοδοι για τη δημιουργία φωτοσυνθετικού αισθητήρα.....	152
4.3.1	Απομόνωση θυλακοειδών.....	152
4.3.2	Ακινητοποίηση θυλακοειδών σε ηλεκτρόδια χρυσού.....	152
4.3.3	Συνδεσμολογία αισθητήρα και μέτρηση.....	154
4.3.4	Διαλύματα ζιζανιοκτόνων.....	157
4.4	Αποτελέσματα ανίχνευσης ζιζανιοκτόνων με τον φωτοσυνθετικό βιοαισθητήρα.....	157
4.5	Συζήτηση.....	161
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	166
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	181

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κλάδος της οικοτοξικολογίας έχει αναπτυχθεί ταχύτατα τα τελευταία χρόνια καθώς τα προβλήματα στα οικοσυστήματα από την χρήση ξενοβιοτικών έχουν αυξηθεί εκθετικά. Ανάμεσα στα ξενοβιοτικά εξέχουσα θέση έχουν τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, από τα οποία το μεγαλύτερο ποσοστό της παγκόσμιας αγοράς αποτελούν τα ζιζανιοκτόνα. Καθώς τα ζιζανιοκτόνα καταλήγουν στα υδάτινα οικοσυστήματα μπορούν να είναι ιδιαίτερος τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς, οι οποίοι εκτίθενται τελικά κυρίως σε μίγματα ζιζανιοκτόνων. Υπάρχει συνεπώς ανάγκη για μελέτη της τοξικότητας των ζιζανιοκτόνων σε υδρόβιους οργανισμούς, τόσο όσο αφορά στη δράση τόσο κάθε ενός μεμονωμένα όσο και των μιγμάτων τους.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε στόχο την μελέτη της τοξικότητας των ζιζανιοκτόνων terbutylazine, metribuzin (παρεμποδιστές του PSII), tritosulfuron και tribenuron methyl (παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλλικού οξέος), τόσο ως μεμονωμένων όσο και των διαφόρων συνδυασμών τους, στον βιοδείκτη *Lemna minor* L. Για τον λόγο αυτό μετρήθηκε η ανάπτυξη, η φωτοσύνθεση (μέσω του φθορισμού της χλωροφύλλης) και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Δευτερευόντως, στόχος ήταν η δημιουργία ενός φωτοσυνθετικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση ζιζανιοκτόνων που παρεμποδίζουν το PSII.

Για την εκτίμηση των καμπυλών δόσης-απόκρισης για τα τέσσερα ζιζανιοκτόνα, μετά από τοξικολογικές δοκιμές 7 ημερών, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά κριτήρια αξιολόγησης της ανάπτυξης (αριθμός φυλλιδίων, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αριθμού φυλλιδίων, επιφάνεια φυλλιδίων, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας φυλλιδίων). Για τις καμπύλες αυτές υπολογίστηκαν τα EC₅₀, NOEC και LOEC. Ενδεικτικά, τα EC₅₀ για τον μέσο ειδικό ρυθμό αύξησης αριθμού φυλλιδίων ήταν: terbutylazine 188,8 μg/l, metribuzin 70,33 μg/l, tritosulfuron 145 μg/l, και tribenuron methyl 7,57 μg/l. Η σειρά τοξικότητας σύμφωνα με την ανάπτυξη ήταν: tribenuron methyl > metribuzin > tritosulfuron > terbutylazine.

Για την μελέτη της συνδυασμένης τοξικότητας έγιναν τοξικολογικές δοκιμές με μίγματα των εκάστοτε δύο δραστικών ουσιών στις ακόλουθες πέντε αναλογίες: 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 και 100:0. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με την βοήθεια του Mixtox model και για κάθε μίγμα σχεδιάστηκαν τα αντίστοιχα ισοβολογραφήματα. Το μοντέλο της προσθετικής δράσης (CA) προέβλεψε με ακρίβεια τα αποτελέσματα του

μίγματος terbuthylazine και metribuzin, στο μίγμα του tritosulfuron και του tribenuron methyl βρέθηκε συνεργισμός και τα μίγματα των terbuthylazine με το tritosulfuron και του metribuzin με το tritosulfuron είχαν κυρίως ανταγωνιστική δράση. Για όλους τους συνδυασμούς η προσθετική δράση (CA) προέβλεψε την τοξικότητα των μιγμάτων καλύτερα από την ανεξάρτητη δράση (IA).

Η επίδραση των ζιζανιοκτόνων του PSII στους παραμέτρους του φθορισμού της χλωροφύλλης ήταν, όπως αναμενόταν, πολύ μεγαλύτερη από αυτή των ζιζανιοκτόνων που παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση αμινοξέων. Ήταν, συνεπώς, δυνατό να γίνει εκτίμηση της καμπύλης δόσης-απόκρισης για τα ζιζανιοκτόνα του PSII και, σύμφωνα με αυτές, η ευαισθησία των παραμέτρων του φθορισμού είχε ως εξής: λειτουργική φωτοχημική απόδοση της φωτοχημείας του PSII (Φ_{PSII}) = ρυθμός ροής ηλεκτρονίων στη φωτοχημική αλυσίδα (ETR) > φωτοχημική απόσβεση (qP) > μέγιστη φωτοχημική απόδοση της φωτοχημείας του PSII (Φ_{PSIIo}). Οι παράμετροι αυτές, με εξαίρεση την Φ_{PSIIo} , ήταν πιο ευαίσθητες, όσο αφορά στην τοξικότητα των ζιζανιοκτόνων του PSII, από τις παραμέτρους της ανάπτυξης. Επιπρόσθετα, η τοξικότητα από την χρήση τους μπορούσε να διαπιστωθεί μέσα σε λίγες ώρες από την έκθεση. Όσο αφορά στα ζιζανιοκτόνα που παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλλικού οξέος, η Φ_{PSII} μαζί με την μη φωτοχημική απόσβεση-NPQ, ήταν οι πιο ευαίσθητες παράμετροι. Από τα αποτελέσματα εξήχθει το συμπέρασμα ότι η Φ_{PSII} ήταν συνολικά η καλύτερη παράμετρος για την εκτίμηση της τοξικότητας των υπό μελέτη ζιζανιοκτόνων. Για την παράμετρο αυτή η συνδυασμένη τοξικότητα είχε προσθετική δράση σε όλα τα μελετημένα μίγματα.

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, συγκεκριμένα η υπεροξειδάση (POX), η καταλάση (CAT), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) και οι S-μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs) (με τρία διαφορετικά υποστρώματα) μετρήθηκαν μετά από έκθεση για 48 ώρες στα terbuthylazine, tritosulfuron και στα μίγματά τους. Η δραστηριότητα των POX, GR και GST's αυξήθηκε σημαντικά στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των terbuthylazine και tritosulfuron, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη οξειδωτικής καταπόνησης. Από την άλλη μεριά η CAT μειώθηκε στα φυτά που εκτέθηκαν στο terbuthylazine και δεν είχε διαφορά από τον μάρτυρα στα φυτά που εκτέθηκαν στο tritosulfuron. Επιπρόσθετα, η συνδυασμένη τοξικότητα είχε κυρίως προσθετική δράση στα αντιοξειδωτικά ένζυμα.

Τέλος, για την ανίχνευση ζιζανιοκτόνων του PSII κατασκευάστηκε βιοαισθητήρας με ακινητοποίηση θυλακοειδών της *L.minor*. Αυτός είναι ο πρώτος φωτοσυνθετικός

αισθητήρας με θυλακοειδή από *L.minor*. Το φωτοσυνθετικό υλικό απομονώθηκε από τα φυτά και ακινητοποιήθηκε στην επιφάνεια ηλεκτρόδιων μεταξοτυπίας χρυσού με διαμοριακή σύνδεση γλουταραλδεϋδης-αλβουμίνης βόειου ορού, ενώ το DCPIP χρησιμοποιήθηκε ως τεχνητός ηλεκτρονιοδέκτης. Η ανίχνευση του ηλεκτρικού σήματος, που προέκυπτε από τα θυλακοειδή μετά τον φωτισμό τους, γινόταν αμπερομετρικά. Η αναλογία του σήματος κατά την παρουσία και την απουσία ζιζανιοκτόνων μετρήθηκε για διαφορετικές συγκεντρώσεις. Δημιουργήθηκαν καμπύλες βαθμονόμησης για το terbuthylazine και το metribuzin και υπολογίστηκαν το EC₅₀ και τα όρια ανίχνευσης (LOD). Το LOD του terbuthylazine ήταν $9,884 \cdot 10^{-9}$ M (2,27 μg/l), λίγο χαμηλότερο δηλαδή από αυτό που αναφέρεται στη βιβλιογραφία ($2,52 \cdot 10^{-8}$ M). Ο βιοαισθητήρας αυτός θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για μια πρώτη διαλογή δειγμάτων πριν την εφαρμογή, στις περιπτώσεις που είναι απαραίτητο, των ακριβών και πολύπλοκων κλασικών αναλυτικών τεχνικών (π.χ. χρωματογραφία).

Λέξεις κλειδιά: ζιζανιοκτόνα, συνδυασμένη τοξικότητα, μίγματα, φθορισμός χλωροφύλλης a, φωτοσυνθετικός βιοαισθητήρας, *Lemna minor*, αντιοξειδωτικά ένζυμα

ABSTRACT

Ecotoxicology has developed rapidly in the last few years, since the use of xenobiotics has raised concerns about the health of ecosystems. Plant protection products have an exceptional position among xenobiotics. The largest percentage of plant protection products in the global market is that of herbicides. Since herbicides end up in the aquatic ecosystems, they can be very toxic to aquatic organisms, which are mainly exposed to herbicide mixtures. Thus, there is a need for studying the toxicity of herbicides in aquatic organisms, both alone and in mixtures.

The current doctoral thesis aimed, first of all, to study the toxicity of the herbicides terbuthylazine, metribuzin (PSII inhibitors), tritosulfuron and tribenuron methyl (branched chain amino acid inhibitors), alone and in mixtures, to the biomonitor *Lemna minor* L. This was done by measuring growth, photosynthesis (via chlorophyll fluorescence) and activity of antioxidant enzymes. Secondly, it aimed at the development of a photosynthetic biosensor for the detection of PSII inhibitor herbicides.

Four different growth endpoints (frond number yield, average specific growth rate of fronds, frond area yield, average specific growth rate of total frond area) were used for the estimation of the dose-response curves of the four herbicides after 7-day toxicity tests. EC₅₀, NOEC and LOEC were calculated. The EC₅₀ values of average specific growth rate of fronds were, indicatively: terbuthylazine 188.8 µg/l, metribuzin 70.33 µg/l, tritosulfuron 145 µg/l, και tribenuron methyl 7.57 µg/l. The magnitude of toxicity according to growth endpoints was: tribenuron methyl > metribuzin > tritosulfuron > terbuthylazine.

For the study of joint toxicity, tests were conducted with the following five mixture ratios of the two active substances: 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 και 100:0. The results were analysed with the help of the Mixtox model and the isoboles for each mixture were plotted. The concentration addition-CA model accurately predicted the results of joint toxicity of the terbuthylazine and metribuzin mixture; synergism was found in the mixture of tritosulfuron and tribenuron methyl and the mixtures of terbuthylazine with tritosulfuron and metribuzin with tritosulfuron were mainly antagonistic. For all data sets concentration addition (CA) predicted mixture toxicity better than independent action (IA).

The effect of PSII herbicides in chlorophyll fluorescence parameters was, as expected, much greater than that of the branched chain amino acid inhibitors. Thus, it was possible to estimate the dose-response curves for the PSII herbicides and, according to them, the sensitivity of the parameters was as follows: effective quantum yield of PSII photochemistry (Φ_{PSII}) = electron transport rate (ETR) > photochemical quenching (qP) > maximum quantum yield of PSII photochemistry (Φ_{PSIIo}). These parameters, with the exception of Φ_{PSIIo} , were more sensitive than growth end points considering the toxicity of the PSII herbicides and with their use, effects could be detected within a few hours of exposure. As far as branched chain amino acid inhibitors are concerned, effective quantum yield of PSII photochemistry (Φ_{PSII}) was the most sensitive parameter, together with non-photochemical quenching (NPQ). It was concluded that Φ_{PSII} was the best chlorophyll fluorescence parameter for the toxicity estimation of these herbicides. For this parameter, joint toxicity had an additive effect for all mixtures tested.

Antioxidant enzymes, namely peroxidase (POX), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferases (GSTs) (with three different substrates), were measured after 48 hours of exposure to terbuthylazine, tritosulfuron and their mixtures. The activity of POX, GR and GST's was significantly increased in the highest concentrations of terbuthylazine and tritosulfuron, verifying oxidative stress existence. CAT, on the other hand, decreased in plants treated with terbuthylazine and had no difference from the control in plants treated with tritosulfuron. In addition, joint toxicity had a mainly additive effect on antioxidant enzymes.

Lastly, a biosensor for the detection of PSII herbicides with immobilized thylakoides of *L.minor* was constructed. This was the first photosynthetic biosensor with thylakoides from *L.minor*. Photosynthetic material was isolated from plants and was immobilized on the surface of gold screen-printed electrodes with cross-linking into the BSA–glutaraldehyde matrix, and DCPIP was used as the artificial electron acceptor. Amperometric detection of the electric current generated by the thylakoid membranes was measured after illumination. The ratio of the signals in the presence and absence of herbicides was measured in different concentrations. Calibration curves were constructed for terbuthylazine and metribuzin and EC_{50} as well as LOD were calculated. LOD of terbuthylazine was $9,884 \cdot 10^{-9}$ M (2,27 $\mu\text{g/l}$), slightly lower than in other studies in the literature ($2,52 \cdot 10^{-8}$ M). This biosensor could be used for screening of samples

before the application, when necessary, of more expensive and complicated analytical techniques (e.g. chromatography).

Keywords: herbicides, joint toxicity, mixtures, chlorophyll a fluorescence, photosynthetic biosensor, *Lemna minor*, antioxidant enzymes

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οικοτοξικολογία, βασικές έννοιες και ορισμοί

Η ανάπτυξη της οικοτοξικολογίας, που ονομάζεται και περιβαλλοντική τοξικολογία, ξεκίνησε την δεκαετία του '60. Η πρώτος ορισμός έγινε από τον Truhaut (1977), και ακολούθησε μέχρι σήμερα πληθώρα άλλων ορισμών (Newman, 2015), με τον τελευταίο από αυτούς να ορίζει την οικοτοξικολογία ως την μελέτη των επιβλαβών επιπτώσεων των χημικών/ξеноβιοτικών στα οικοσυστήματα, περιλαμβάνοντας και τις επιπτώσεις στα άτομα και τις απορρέουσες επιπτώσεις σε επίπεδο πληθυσμού και πάνω (Walker et al., 2012). Ο κλάδος της οικοτοξικολογίας έχει αναπτυχθεί ταχύτατα τα τελευταία χρόνια καθώς τα προβλήματα στα οικοσυστήματα από την χρήση ξеноβιοτικών έχουν αυξηθεί εκθετικά (Relyea & Hoverman, 2006, Valavanidis & Vlachogianni, 2011).

Ξеноβιοτικό/ξеноβιοτική ουσία, είναι μια χημική ένωση που δεν συναντάται φυσιολογικά στο οικοσύστημα διότι παράγεται μόνο από ανθρωπογενείς δραστηριότητες και η οποία είναι ξένη προς τις βιοχημικές διεργασίες του οικοσυστήματος επειδή εξελικτικά ο μεταβολισμός των οργανισμών δεν έχει εξοικειωθεί με αυτή. Στα βασικά ξеноβιοτικά περιλαμβάνονται πολλά φάρμακα και πολλές καρκινογόνες ουσίες καθώς και διάφορες ενώσεις, ενώ όλα τα ξеноβιοτικά έχουν εισέλθει στο περιβάλλον με τεχνητά μέσα (IUPAC).

Μεταξύ των ξеноβιοτικών παραγόντων οι οποίοι εξετάζονται για πιθανή οικοτοξικολογική δράση είναι και τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (φ.π.). Φυτοπροστατευτικά προϊόντα φ.π. (ή φυτοφάρμακα), ονομάζονται, σύμφωνα με την οδηγία 414/91 της Ε.Ε, οι δραστικές ουσίες και τα σκευάσματα τα οποία περιέχουν μια ή περισσότερες δραστικές ουσίες και προορίζονται για:

- να προστατεύουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδους επιβλαβείς οργανισμούς ή να προλαμβάνουν τη δράση τους
- να επηρεάζουν τις βιολογικές διεργασίες των φυτών, (εκτός αν πρόκειται για θρεπτικές ουσίες)
- να διατηρούν τα φυτικά προϊόντα (εκτός και αν πρόκειται για ουσίες που κατατάσσονται στα συντηρητικά)
- να καταστρέφουν τα ανεπιθύμητα φυτά

- να καταστρέφουν μέρη των φυτών, ή να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξή τους.

Οι βασικότερες από αυτές είναι τα: ζιζανιοκτόνα, μηκυτοκτόνα, βακτηριοκτόνα, εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα, νηματοδοκτόνα και τρωκτικοκτόνα.

Τα φ.π. ενώ εφαρμόζονται σε συγκεκριμένες καλλιέργειες, επιδρούν πολύ συχνά και σε οικοσυστήματα πέραν του γεωργικού. Η τύχη και η συμπεριφορά των φ.π. στο περιβάλλον είναι συνάρτηση ποικίλων αβιοτικών και βιοτικών παραμέτρων. Ανεξάρτητα του τρόπου εφαρμογής, τα φ.π. υπαισέρχονται σε διάφορες διαδικασίες συγκράτησης, μεταφοράς, απομάκρυνσης, μετασχηματισμού και αποδόμησής τους στο περιβάλλον. Τα φ.π. μπορεί να εκπλυθούν προς βαθύτερα εδαφικά στρώματα και να ρυπάνουν υπόγειους υδροφόρους ορίζοντες ή να μεταφερθούν με το ψεκαστικό νέφος, την έκπλυση και την απορροή στα επιφανειακά ύδατα (ποτάμια, λίμνες, θάλασσες) και να επηρεάσουν υδρόβιους οργανισμούς. Για τη μελέτη των πιθανών κινδύνων από τις εφαρμογές των φ.π. στους οργανισμούς μη στόχους και γενικότερα στο περιβάλλον, αλλά και για την έγκριση κυκλοφορίας ενός νέου φ.π. απαιτούνται πειράματα τοξικότητας καθώς και μελέτες για την τύχη και τη συμπεριφορά των φ.π. στο περιβάλλον (συγκεκριμένες οδηγίες της Ε.Ε., μεταξύ των οποίων και η 91/414/EC για τα φ.π., καθώς και διεθνών οργανισμών-WHO και FAO). Στόχος αυτών των μελετών είναι, μεταξύ άλλων, η απόκτηση δεδομένων για την τοξικολογία στον άνθρωπο και για τις επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους και στο περιβάλλον (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Τόσο λοιπόν λόγω των φ.π. όσο και γενικότερα λόγω των ξενοβιοτικών, είναι απαραίτητη η παρακολούθηση της ποιότητας του περιβάλλοντος (environmental monitoring) και η διενέργεια οικοτοξικολογικών μελετών ώστε να μπορούν να προβλεφθούν κρίσιμες τοξικολογικές καταστάσεις. Πιο συγκεκριμένα, η πρακτική αυτή απαιτείται για τρεις βασικούς λόγους: (α) για να ληφθούν πληροφορίες για την αξιολόγηση του κινδύνου και την περιβαλλοντική διαχείριση, (β) για να καλυφθούν οι νομικές απαιτήσεις για την ανάπτυξη και την απελευθέρωση των χημικών ουσιών στο περιβάλλον, και (γ) για να αναπτυχθούν οι εμπειρικές ή οι θεωρητικές αρχές ώστε να βελτιωθεί η γνώση όσο αφορά την συμπεριφορά και τις επιπτώσεις των ξενοβιοτικών παραγόντων στους ζωντανούς οργανισμούς. Τα παραπάνω έχουν συμβάλει σημαντικά στην αύξηση του ενδιαφέροντος για τις δοκιμές τοξικότητας (Mkandawire et al., 2014). Έχει δημιουργηθεί, για το λόγω αυτό, μεγάλος αριθμός από πρωτόκολλα

τοξικολογικών δοκιμών τόσο στην Ευρώπη (European Chemicals Bureau) όσο και στην Αμερική (American Society for Testing and Materials). Στόχος είναι να αναγνωριστούν και να εκτιμηθούν οι όποιες αρνητικές επιπτώσεις των ξενοβιοτικών και να εκτιμηθούν οι σχέσεις μεταξύ έκθεσης και δριμύτητας των επιπτώσεων. Ο Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης-Ο.Ο.Σ.Α. (Organisation for Economic Co-operation and Development-OECD), έχει δημιουργήσει πληθώρα από πρωτόκολλα τα οποία στοχεύουν, μεταξύ άλλων, στον καθορισμό των επιπτώσεων της τοξικότητας φ.π. σε βιοτικά συστήματα. Αυτά, είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα τόσο από δημόσιους φορείς, όσο και από την βιομηχανία ή από ανεξάρτητα εργαστήρια (<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>).

Οι δοκιμές τοξικότητας περιλαμβάνουν την έκθεση ενός συγκεκριμένου οργανισμού σε μια σειρά διαφορετικών συγκεντρώσεων του εξεταζόμενου τοξικού παράγοντα (Caims & Niederlehner, 1992). Σε αυτές χρησιμοποιούνται, μεταξύ άλλων οργανισμών, τα υδροχαρή φυτά-βιοδείκτες¹ του γένους *Lemna* (duckweeds) (Mkandawire et al., 2014). Πρόκειται για φυτά που επιπλέουν στο νερό, ανήκουν στα μακρόφυτα, είναι διαδεδομένα στο υδρόβιο περιβάλλον και καλλιεργούνται εύκολα υπό εργαστηριακές συνθήκες. Το μέγεθος των φυτών είναι μικρό διευκολύνοντας τον πειραματισμό κάτω από περιορισμένο χώρο, αλλά αρκετά μεγάλο ώστε να είναι δυνατές οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις. Η μορφολογία, ο τρόπος ανάπτυξης και η ευαισθησία των ειδών του γένους *Lemna* σε ένα μεγάλο εύρος ξενοβιοτικών είναι χαρακτηριστικά που κάνουν τα είδη αυτά πολύτιμα για βιοδοκιμές. (Fenske et al., 2006, Vervliet-Scheebaum et al., 2006).

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, η γεωργία, σε συνδυασμό με άλλα περιβαλλοντικά προβλήματα, οδηγούν σε υποβάθμιση των υδρόβιων οικοσυστημάτων. Τις τελευταίες δεκαετίες η χρήση φ.π. αποτελεί την βασική μέθοδο ελέγχου των ζιζανίων και των ασθενειών στις καλλιέργειες. Καθώς αυτά καταλήγουν στα υδάτινα οικοσυστήματα μπορούν να είναι ιδιαίτερος τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς μη στόχους, γεγονός έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη δοκιμών τοξικότητας με την χρήση υδροχαρών φυτών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Eullaffroy et al., 2009). Ενώ πληθώρα ερευνών

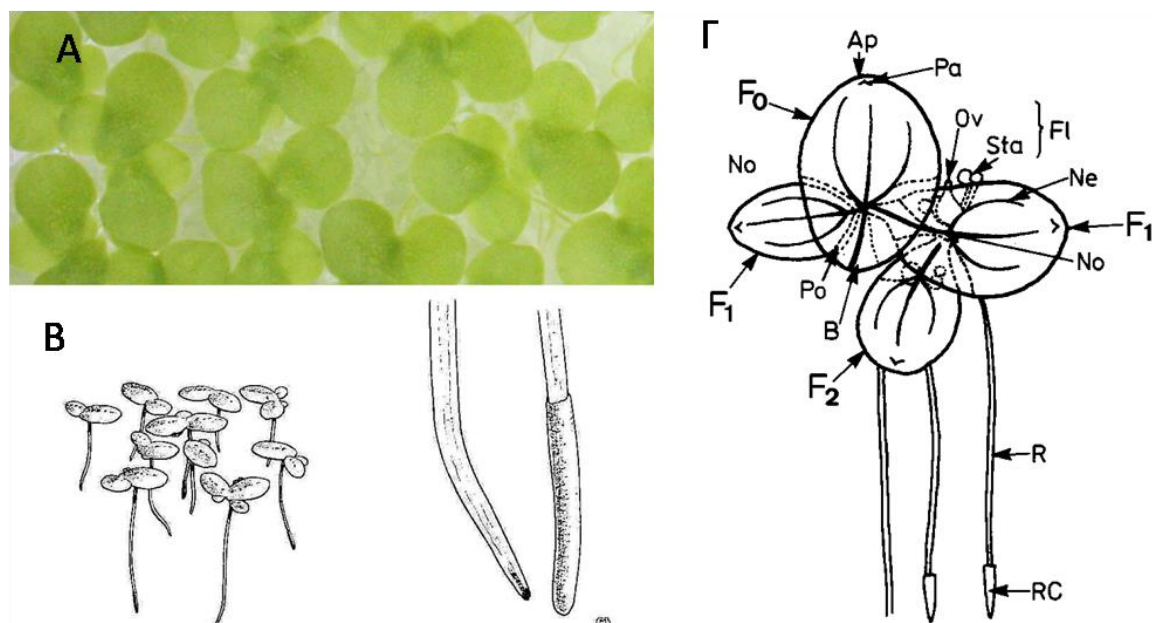
¹Βιοδείκτης είναι ένας οργανισμός (ή μέρος του οργανισμού ή κοινότητα οργανισμών), που παρέχει πληροφορίες για την ποιότητα του περιβάλλοντος (ή για μέρος του περιβάλλοντος) (Markert al. et, 2003).

αφορά τις επιπτώσεις μεμονωμένων φ.π. στους υδρόβιους οργανισμούς, τα υδάτινα οικοσυστήματα, άρα και οι οργανισμοί, σπανίως, τελικά, εκτίθενται σε ένα φ.π αλλά επιβαρύνονται με πολλά και διαφορετικά φ.π., τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους τόσο τοξικολογικά όσο και δομικά (Deneer 2000, Relyea 2009). Παρ'όλ'αυτά οι διαδικασίες εκτίμησης κινδύνων από φ.π., βασίζονται συνήθως, σε εκτιμήσεις που προέρχονται από δοκιμές τοξικότητας μεμονωμένων φ.π. (Altenburger et al., 2004). Υπάρχει συνεπώς ανάγκη για μελέτη των επιπτώσεων των μιγμάτων και των συνεργιστικών αλληλεπιδράσεων των φ.π., αλλά και των ξενοβιοτικών γενικά, τα οποία απασχολούν ιδιαίτερα τις δημόσιες αρχές. Ο βασικός προβληματισμός δε, βρίσκεται στο κατά πόσον ορισμένα από αυτά μπορούν να ενισχύσουν τις επιπτώσεις άλλων, έτσι ώστε συνδυαστικά η επίπτωση να είναι μεγαλύτερη από την προβλεπόμενη, φαινόμενο που ονομάζεται συνεργισμός (Cedergreen, 2014).

Οι βιοδείκτες *Lemna spp.*

Το γένος *Lemna* ανήκει στην τάξη Arales, στην οικογένεια Lemnaceae και στην υποοικογένεια *Lemnoideae* (Les et al., 2002). Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, είναι υδροχαρή αγγειόσπερμα φυτά που επιπλέουν στο νερό, ενώ απαντώνται σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα (Hao, 1996). Μερικά από τα πιο χαρακτηριστικά είδη του γένους είναι τα: *Lemna minor*, *L. gibba* και *L. turionifera*, *L. aequinoctialis*. Από τα είδη αυτά τα δύο πρώτα είναι τα πλέον χρησιμοποιούμενα σε βιοδοκιμές και αυτά για τα οποία έχουν δημιουργηθεί συγκεκριμένα πρωτόκολλα (OECD 221, 2006, Environment Canada, 2007).

Τα είδη της οικογένειας Lemnaceae απαντώνται σε όλη σχεδόν την υδρόγειο με εξαιρέσεις τον αρκτικό κύκλο και τις ερήμους. Έχουν μικρό μέγεθος (0,5-18mm) και αποτελούνται από ένα μέχρι πολλά ενωμένα φυλλίδια (fronds). Για τα φυλλίδια έχουν δοθεί τρεις μορφολογικές ερμηνείες. Σύμφωνα με την επικρατέστερη η βάση του φυλλιδίου αποτελεί τον βλαστό και το απομακρυσμένο μέρος αποτελεί το φύλλο. Τα φυλλίδια είναι επίπεδα, έχουν σχήμα ωοειδές, σε σπάνιες περιπτώσεις είναι κυρτά και γενικά είναι συμμετρικά με λεία άνω επιφάνεια (Εικόνα 0.1) (Landolt, 1998).



Εικόνα 0.1: Α) Φυτά *Lemna minor* (εργ. Οικολογίας κ Προστασίας Περιβάλλοντος) Β) *L.minor* και ριζικό σύστημα (Mason, 1957). Γ) *L. aequinoctialis* και τα μέρη του φυτού: F0 μητρικό φυλλίδιο, F1 θυγατρικό φυλλίδιο 1ης γενεάς, F2 θυγατρικό φυλλίδιο 2ης γενεάς, R ρίζα, RC καλύπτρα, Ne νεύρα, Ap κορυφή, B βάση, F1 άνθος, No κόμβος, Ov ωοθήκη, Pa βλατίδα, Po θυλάκιο Sta στήμονας (Landolt, 1986).

Τα Lemnaceae πολλαπλασιάζονται κατά κύριο λόγο αγενώς και δευτερευόντως εγγενώς (Philbrick & Les, 1996). Κατά τον αγενή πολλαπλασιασμό καθώς κάθε νέο φυλλίδιο ωριμάζει, ενεργοποιεί και την δημιουργία νέων φυλλιδίων. Κάθε θυγατρικό φυλλίδιο αρχίζει σαν οφθαλμός στη μεριστωματική ζώνη κατά μήκος του κεντρικού άξονα του μητρικού φυλλιδίου, και στη συνέχεια «αναδύεται» από το θυλάκιο στο πλαϊνό μέρος του μητρικού φυλλιδίου απ' το οποίο ξεκίνησε. Κάθε νέο φυλλίδιο συνδέεται με το μητρικό με ένα πολύ λεπτό μίσχο, ο οποίος επιμηκύνεται καθώς το φυλλίδιο ωριμάζει. Όταν το θυγατρικό φυλλίδιο φτάσει σε πλήρη ωριμότητα, ο μίσχος αποκόπτεται απελευθερώνοντας μια καινούργια αποικία φυλλιδίων. Μέχρι να συμβεί αυτό, σε γρήγορα αναπτυσσόμενα φυτά, το φυλλίδιο που μόλις απελευθερώθηκε έχει ήδη δημιουργήσει θυγατρικά φυλλίδια, και με τον τρόπο αυτό συνεχίζεται η αναπαραγωγή. Επίσης ανθοφόροι οφθαλμοί παράγονται στο μερίστωμα του φυλλιδίου, αλλά ο σχηματισμός τους δεν είναι απαραίτητος για την αγενή αναπαραγωγή. Κάθε φυλλίδιο μπορεί να παράξει έναν πεπερασμένο αριθμό θυγατρικών φυλλιδίων μέχρι να γεράσει. Τα γηρασμένα φυλλίδια αφού σταματήσουν να αναπτύσσονται γίνονται κίτρινα (Landolt, 1986).

Τα είδη του γένους *Lemna* έχουν φυλλίδια με 1-5 νεύρα. Τα φυλλιδιά τους αποτελούνται από ένα έως περισσότερα επίπεδα αερεγχύματος, και κάθε φυλλίδιο έχει στο

κάτω μέρος του μία ρίζα. Η ρίζα δεν παρουσιάζει διακλάδωση, δεν περιλαμβάνει ριζικά τριγύδια, ενώ στην άκρη της έχει καλύπτρα (Εικόνα 0.1). Σημαντικός ρόλος που διαδραματίζει η ρίζα είναι αυτός της σταθεροποίησης του υδροχαρούς φυτού (Landolt, 1998).

Η ανάπτυξη των φυτών του γένους *Lemna*, όπως κατά κανόνα όλοι οι οργανισμοί που αναπτύσσονται υπό συνθήκες περιορισμένων πόρων, περιγράφεται από το λογιστικό υπόδειγμα της Εξίσωση 0.1 (Γράφημα 0.1).

Εξίσωση 0.1:

$$N_t = \frac{K}{1 + \left(\frac{K - N_0}{N_0}\right)e^{-rt}}$$

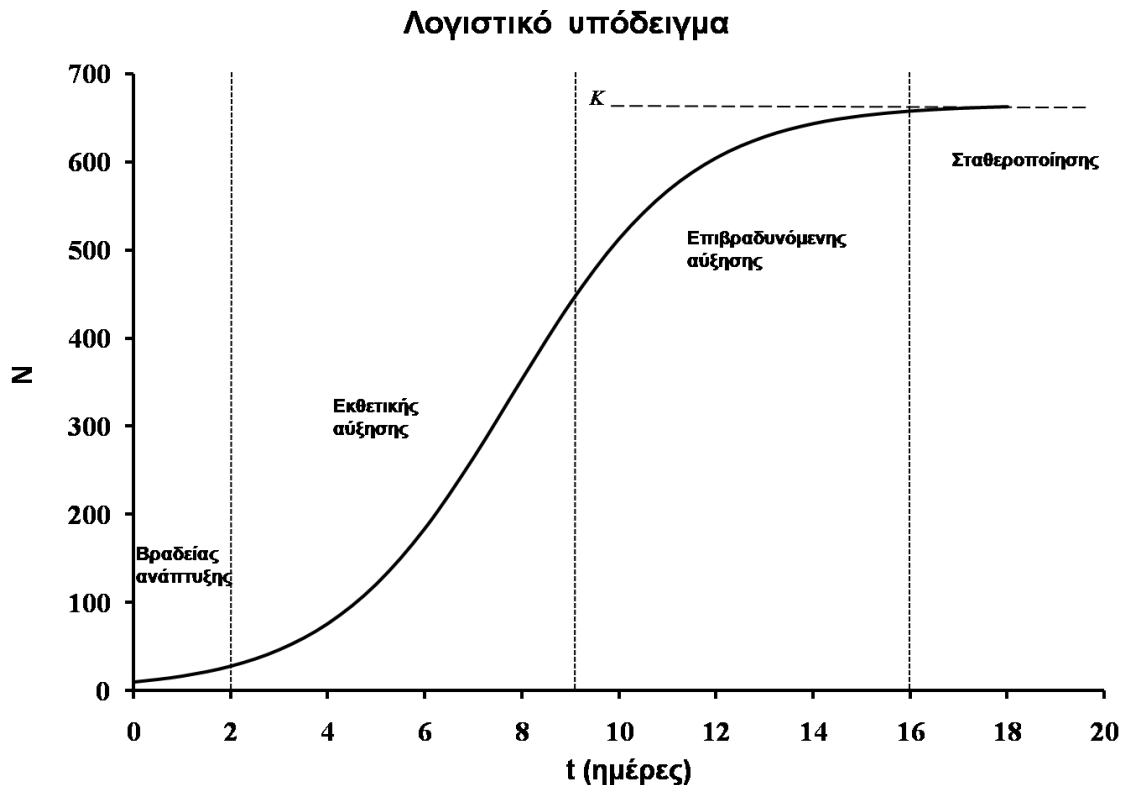
όπου N_t το μέγεθος του πληθυσμού την χρονική στιγμή t , K η μέγιστη βιοχωρητικότητα ή φέρουσα ικανότητα (μέγιστος δυνατός πληθυσμός που μπορεί να υποστηρίξει ο πόρος), N_0 το μέγεθος του αρχικού πληθυσμού και r ο ενδογενής ρυθμός αύξησης (Σαϊτάνης & Καρανδεινός, 2010).

Σύμφωνα με το παραπάνω υπόδειγμα η ανάπτυξη του πληθυσμού της λέμνα χωρίζεται σε τέσσερις φάσεις, όπως διακρίνονται στο Γράφημα 0.1. Η πρώτη είναι η φάση βραδείας ανάπτυξης, η οποία, στις πειραματικές δοκιμές περιγράφει το πρώτο διάστημα της μεταφοράς των αρχικών ατόμων-φυτών στο θρεπτικό διάλυμα. Στη συνέχεια ακολουθεί η φάση εκθετικής αύξησης, κατά την οποία τα φυτά πολλαπλασιάζονται ραγδαίως, και ακολουθεί η φάση επιβραδυνόμενης αύξησης, κατά την οποία ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού των φυτών μειώνεται σταδιακά. Τέλος, υπάρχει η φάση σταθεροποίησης όπου ο πληθυσμός διατηρείται σχετικά σταθερός καθώς ο ρυθμός παραγωγής νέων φυτών εξισορροπείται με τον ρυθμό θανάτου των γηρασμένων (Lüönd, 1980).

Τα είδη του γένους *Lemna* έχουν κάποια χαρακτηριστικά τα οποία αποτελούν πλεονεκτήματα όσο αφορά την χρήση τους σε δοκιμές τοξικότητας σε εργαστήρια.

Αυτά είναι:

- το μικρό τους μέγεθος
- η σχετικά απλή δομή τους
- η πολύ γρήγορη ανάπτυξή τους



Γράφημα 0.1: Απεικόνιση των φάσεων της ανάπτυξης φυτών σύμφωνα με το λογιστικό μοντέλο. (τροποποίηση από Σαϊτάνης & Καρανδεινός, 2010)

- ο τρόπος αναπαραγωγής τους και οι γενετικά ομοιογενής πληθυσμοί που επιτρέπουν σε αποικίες κλώνων να χρησιμοποιηθούν στον πειραματισμό εξαλείφοντας την διαφοροποίηση στα αποτελέσματα λόγω γενετικής παραλλακτικότητας
- ότι μπορούν να απολυμανθούν και να αναπτυχθούν σε υγρό θρεπτικό διάλυμα καθώς επίσης και σε άγαρ, αυτοτροφικά.
- ότι τα φυτά που καλλιεργούνται στο εργαστήριο μπορούν να αναπτύσσονται επ'άπειρον
- ότι έχουν μεγάλη αναλογία επιφάνειας όγκου, και πολύ μικρή έως και καθόλου παρουσία επιδερμίδας στην κάτω επιφάνεια των φυλλιδίων που έρχεται σε επαφή με το υδατικό διάλυμα
- ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε επιφανειοδραστικές ουσίες, σε υδρόφοβες ενώσεις και παρόμοιες ουσίες που συγκεντρώνονται στην διεπιφάνεια αέρα-νερού όπως είναι συχνά τα ξενοβιοτικά
- ότι σε αντίθεση με τις δοκιμές τοξικότητας των φυκών, τα διαλύματα του πειραματισμού μπορούν να ανανεωθούν, ενώ μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν

στις δοκιμές χρωματισμένα ή θολά λύματα και δείγματα νερού (Environment Canada, 2007)

Η εκτίμηση της τοξικότητας στις βιοδοκιμές με τα είδη *Lemna spp.*, εξαρτάται από το κριτήριο αξιολόγησης που χρησιμοποιείται. Κριτήριο αξιολόγησης (endpoint), είναι ένα χαρακτηριστικό του οργανισμού όπου παρατηρείται μια ευδιάκριτη αντίδρασή του, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν κριτήριο στην εκτίμηση της τοξικότητας. Μερικά από τα κριτήρια αξιολόγησης στις βιοδοκιμές της λέμνας είναι ο ρυθμός αύξησης, η απόδοση σε φυλλίδια (αριθμός φυλλιδίων), ο φθορισμός της χλωροφύλλης a, η δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων κ.α. (Mkandawire et al., 2014).

Φωτοσύνθεση

Γενικά

Η φωτοσύνθεση είναι μια διεργασία που είναι άμεσα ή έμμεσα ουσιαστική για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Περιλαμβάνει πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις (Taiz & Zeiger, 2006) ενώ σύμφωνα με την συνεπτυγμένη αντίδρασή της (Αντίδραση 0.1), όταν αυτή λαμβάνει χώρα σε φυτά, φύκη και κυανοβακτήρια, από την οξείδωση (φωτόλυση) νερού απελευθερώνεται μοριακό οξυγόνο και από την αναγωγή του ατμοσφαιρικού διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) σχηματίζονται υδατάνθρακες.

Αντίδραση 0.1: $CO_2 + H_2O \rightarrow [CH_2O] + O_2$ όπου [CH₂O]: υδατανθρακική μονάδα

Με την βοήθεια της ηλιακής ακτινοβολίας, τα φτωχά σε ενέργεια CO₂ και H₂O μετατρέπονται στους πλούσιους σε ενέργεια υδατάνθρακες ενώ ως παραπροϊόν απελευθερώνεται μοριακό O₂. Οι υδατάνθρακες περιέχουν υψηλότερα ποσά ενέργειας από ότι το CO₂ και το H₂O από τα οποία προέρχονται. Η διαφορά ενέργειας προέρχεται από τη δέσμευση της ηλιακής ακτινοβολίας. Συνεπώς, η φωτοσύνθεση είναι μια διαδικασία μετατροπής της δεσμευόμενης φωτεινής ενέργειας σε χημική. Η παραγόμενη ενέργεια δεν χρησιμοποιείται μόνο από τους αυτότροφους οργανισμούς που παράγουν τους υδατάνθρακες, δηλαδή τους παραγωγούς, αλλά και από όλους τους υπόλοιπους (ετερότροφους) οργανισμούς μέσω της τροφικής αλυσίδας. Τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν με δύο τρόπους. Αφενός ως δομικές μονάδες σε διάφορες αντιδράσεις σύνθεσης, αφετέρου απελευθερώνοντας την περιεχόμενη ενέργειά τους μέσω της αναπνευστικής λειτουργίας, ώστε να καλυφθούν οι ανάγκες των αναβολικών αντιδράσεων και το ενεργειακό κόστος συντήρησης των

κυττάρων. Προϊόντα, δε, της αναπνευστικής λειτουργίας αποτελούν το CO₂ και το H₂O, δηλαδή τα αρχικά υποστρώματα της φωτοσύνθεσης (Hall & Rao, 1999).

Η παραπάνω συνοπτική αντίδραση (Αντίδραση 0.1) στην πραγματικότητα αποτελεί την αρχή και το τέλος μιας σειράς αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διεξαγωγή της φωτοσύνθεσης. Οι αντιδράσεις αυτές χωρίζονται σε δύο ομάδες, στις φωτεινές και τις σκοτεινές αντιδράσεις. Οι πρώτες απαιτούν άμεσα την παροχή φωτεινής ενέργειας, ενώ οι δεύτερες που αποτελούν το βιοχημικό τμήμα της διαδικασίας, αφορούν την μετατροπή του CO₂ σε οργανικές ενώσεις και δεν εξαρτώνται άμεσα από την παρουσία φωτός (Raven et al., 2013).

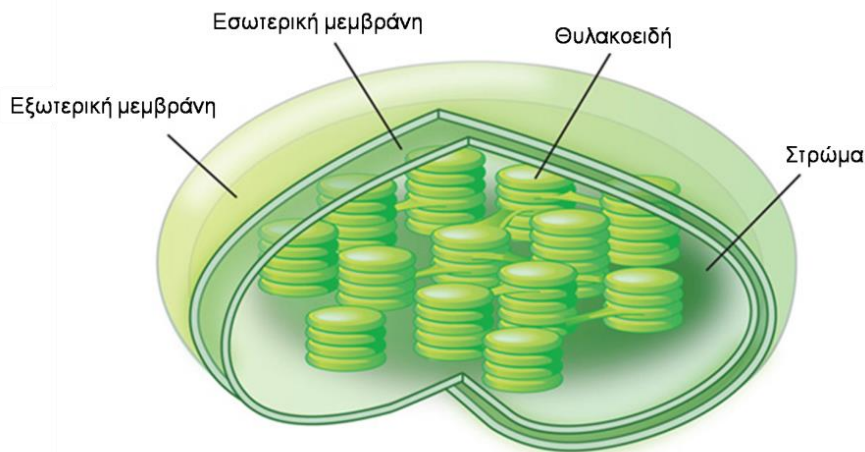
Φωτοσυνθετικές χρωστικές και απορρόφηση φωτός

Η φωτεινή ενέργεια, προκειμένου να αξιοποιηθεί από τους οργανισμούς πρέπει πρώτα να απορροφηθεί. Στους φωτοσυνθέτοντες οργανισμούς ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται μέσω των χρωστικών. Αυτές, είναι έγχρωμες ενώσεις που απορροφούν στο ορατό φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (400-700 nm). Όταν οι χρωστικές συνεισφέρουν στην φωτοσύνθεση ονομάζονται φωτοσυνθετικές χρωστικές. Υπάρχουν δε, δύο κατηγορίες τέτοιων χρωστικών, οι βοηθητικές και οι κύριες. Οι βοηθητικές περιλαμβάνουν τις χλωροφύλλες a (Chl a) και b (Chl b) και τα καροτενοειδή ενώ οι κύριες περιλαμβάνουν μόνο τα μόρια της χλωροφύλλης a και της βακτιριοφύλλης που δομούν τα κέντρα αντίδρασης των δύο φωτοσυστημάτων (PSI και PSII) και διεγείρονται όταν καταλήγει σε αυτά η ενέργεια της φωτεινής ακτινοβολίας. Η χλωροφύλλη, δίνει στα φύλλα το πράσινο χρώμα τους διότι απορροφά κυρίως στην ιώδη-κυανή και ερυθρή φασματική περιοχή και . Η φασματική περιοχή στην οποία απορροφούν τα καροτενοειδή περιλαμβάνει μεγαλύτερα μήκη κύματος από αυτά της χλωροφύλλης a, διευρύνοντας με τον τρόπο αυτό το ηλιακό φάσμα που αξιοποιείται στη φωτοσύνθεση (Raven et al., 2013, Αϊβαλάκης κ.α., 2005, Nelson and Yocum, 2006).

Χλωροπλάστες

Οι χλωροπλάστες είναι τα πλαστίδια στα οποία λαμβάνει χώρα η φωτοσύνθεση. Το σχήμα τους και το μέγεθός τους μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος των φυτών στα οποία ανήκουν (Kirk & Tilney-Bassett, 1978). Οι χλωροπλάστες περιβάλλονται από μια διπλή μεμβράνη, η οποία ονομάζεται πλαστιδιακός φάκελος και περικλείει όλα τα επιμέρους διαμερίσματα στα οποία συντελείται η φωτοσύνθεση. Ο φάκελος περικλείει

ένα άμορφο ζελατινώδες υλικό, το στρώμα, το οποίο αποτελείται από ένα μίγμα νερού και ενζύμων, απαραίτητων για τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης, ενώ περιέχει επίσης και ριβοσώματα, DNA και RNA. Στο στρώμα βρίσκεται επίσης ένα δίκτυο αναδιπλούμενων μεμβρανών, τα θυλακοειδή, στα οποία πραγματοποιούνται οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Αυτά, χωρίζονται στα θυλακοειδή των grana, όταν σχηματίζουν σωρούς, και στα θυλακοειδή του στρώματος όταν είναι μονήρη. Οι μεμβράνες των θυλακοειδών αποτελούν το σημείο επιτέλεσης των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης και σε αυτές βρίσκονται υπερσύμπλοκα πρωτεϊνών-φωτοσυνθετικών χρωστικών (τα σύμπλοκα φωτοσυλλογής και τα φωτοσυστήματα), πρωτεΐνες ή σύμπλοκα πρωτεϊνών μεταφοράς ηλεκτρονίων (το σύμπλοκο κυτοχρωμάτων b₆f και η πλαστοκυανίνη) καθώς και μόρια (κινόνες) που συμμετέχουν στα οξειδοαναγωγικά ζεύγη μεταφοράς ηλεκτρονίων (Soll & Schleiff, 2004).



Εικόνα 0.2: Η δομή του χλωροπλάστη (τροποποίηση από nature.com)

Φωτεινές αντιδράσεις

Οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης αφορούν στις φωτοχημικές αντιδράσεις που ξεκινούν με την απορρόφηση της φωτεινής ενέργειας και τη διέγερση του κέντρου αντίδρασης του PSII και καταλήγουν στην παράγωγή ενέργειας με την μορφή NADPH και ATP. Όπως αναφέρθηκε ήδη, αυτές λαμβάνουν χώρα στα θυλακοειδή των χλωροπλαστών. Τα μόρια των χρωστικών είναι ενσωματωμένα σε πρωτεϊνικά υπερσύμπλοκα που εδράζουν στις μεμβράνες των θυλακοειδών ως διακριτές λειτουργικές μονάδες, τα φωτοσυστήματα (PSs) και τα σχετιζόμενα με αυτά φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα (LHCs). Τα φωτοσυστήματα περιλαμβάνουν 250-400 μόρια χρωστικών καθώς και το κέντρο αντίδρασης (reaction center). Το κέντρο αντίδρασης αποτελείται από ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών και μορίων χλωροφύλλης, ενώ στην καρδιά

του κέντρου αντίδρασης βρίσκεται ένα μόριο χλωροφύλλης a (P₇₀₀ στο PSI και P₆₈₀ στο PSII) το οποίο μετατρέπει την φωτεινή ενέργεια σε χημική. Κάθε φωτοσύστημα συνδυάζεται με ένα φωτοσυλλεκτικό σύμπλοκο-αντένα φωτοσυλλογής (light harvesting complex, LHC) που απαρτίζεται από μόρια χλωροφυλλών καροτενοειδών και πρωτεΐνες. Το μόρια των χρωστικών του φωτοσυλλεκτικού μηχανισμού απορροφούν ενέργεια και την μεταφέρουν στα κέντρα αντίδρασης (Raven et al., 2013).

Όταν ένα μόριο χρωστικής απορροφήσει ένα φωτόνιο με κατάλληλο ενεργειακό περιεχόμενο διεγείρεται. Στη διεγερμένη κατάσταση το μόριο έχει την τάση να αποβάλει την επιπλέον ενέργεια ώστε να επιστρέψει στην θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση. Αυτό μπορεί να συμβεί με τρεις δύο τρόπους: με την μορφή θερμότητας με την μορφή ακτινοβολίας και τέλος με τη μεταφορά της διέγερσης σε κατάλληλα γειτονικά μόρια. Στις περιπτώσεις αυτές δεν παράγεται φωτοχημικό έργο, και η φωτεινή ενέργεια χάνεται είτε μεταβιβάζεται (Αϊβαλάκης κ.α., 2005). Στην τελευταία περίπτωση ένα μέρος της ενέργειας χάνεται υπό μορφή θερμότητας. Η παραγωγή φωτοχημικού έργου συμβαίνει όταν το διεγερμένο μόριο υπόκειται σε συγκεκριμένο χημικό μετασχηματισμό ως αποτέλεσμα της διέγερσής του. Ο τυπικός χημικός μετασχηματισμός της χλωροφύλλης του κέντρου αντίδρασης των φωτοσυστημάτων οδηγεί σε μετατροπή της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια και ονομάζεται διαχωρισμός φορτίου διότι το μόριο της χλωροφύλλης χάνει ένα ηλεκτρόνιο και οξειδώνεται.

Ροή ηλεκτρονίων και παραγωγή ενέργειας στις φωτεινές αντιδράσεις

Ο διαχωρισμός φορτίου του P₆₈₀ (PSII) είναι το πρώτο συμβάν της αλυσίδας ροής ηλεκτρονίων των φωτεινών αντιδράσεων (Raven et al., 2013). Το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στο μόριο της φαιοφυτίνης (pheophytin, Phe), που είναι συνδεδεμένη στην D1 πρωτεΐνη του PSII (Εικόνα 0.3) (Barr and Crane, 2005, LeBaron et al., 2008). Το ηλεκτρόνιο που χάνεται από το μόριο της χλωροφύλλης αναπληρώνεται μετά από τέσσερεις κύκλους οξείδωσης μέσω της φωτόλυσης δύο μορίων νερού όπου απελευθερώνονται τέσσερα πρωτόνια, τέσσερα ηλεκτρόνια και ένα μόριο οξυγόνου. Τα πρωτόνια απελευθερώνονται στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης των θυλακοειδών που ονομάζεται μικροχώρος (lumen). Αυτό οδηγεί στη δημιουργία διαβάθμισης της συγκέντρωσης πρωτονίων στις δύο πλευρές της μεμβράνης του θυλακοειδούς, η οποία αποτελεί την κινητήρια δύναμη για την αποθήκευση της

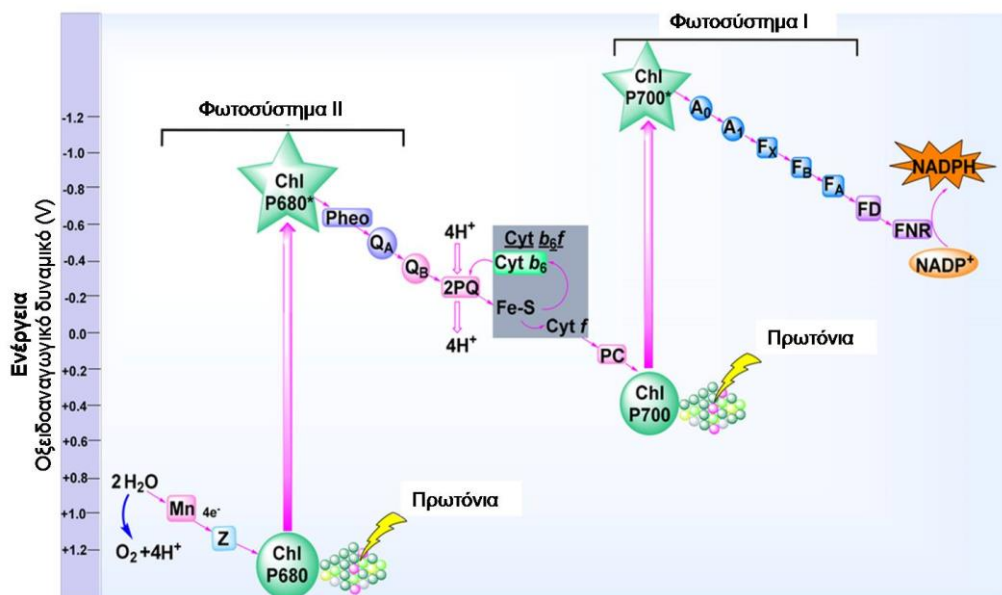
χημικής ενέργειας μέσω της φωσφορυλίωσης του ADP προς ATP (Εικόνα 0.4) (Senge et al., 2014).

Από την φαιοφυτίνη, το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στην πλαστοκινόνη A (plastoquinone PQ_A/Q_A), η οποία είναι συνδεδεμένη στην D2 πρωτεΐνη του PSII (Εικόνα 0.3). Μετά η PQ_A , δίνει δύο ηλεκτρόνια στην πλαστοκινόνη B (PQ_B/Q_B), η οποία είναι συνδεδεμένη στην D1 πρωτεΐνη του PSII και που δεσμεύει ταυτόχρονα δύο πρωτόνια από το στρώμα, οπότε και ανάγεται προς πλαστοκινόλη PQ_BH_2 . Η πλαστοκινόλη μεταβιβάζει δύο ηλεκτρόνια και δύο πρωτόνια (H^+) στο σύμπλοκο του κυτοχρώματος b_6f , επιστρέφοντας στην οξειδωμένη της μορφή PQ_B . Το ανηγμένο κυτόχρωμα b_6f μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στην πλαστοκυανίνη (plastocyanin PC) και αυτή με τη σειρά της μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο κάθε φορά στο κέντρο αντίδρασης P_{700} του PSI. Στο PSI η διαδικασία επαναλαμβάνεται καθώς το κέντρο αντίδρασης P_{700} διεγείρεται μέσω της απορρόφησης ακτινοβολίας και το διεγερμένο ηλεκτρόνιο του μεταφέρεται τελικά στην φερρεδοξίνη (ferredoxin, Fd). Από αυτήν μεταφέρονται στο $NADP^+$, μεταφορά που καταλύεται από την αναγωγή της φερρεδοξίνης- $NADP^+$ (ferredoxin- $NADP^+$ reductase, FNR). Έτσι τελικά ανάγεται το $NADP^+$ προς $NADPH$, ενώ παράλληλα οξειδώνεται το μόριο P_{700} . (Barr and Crane, 2005, LeBaron et al., 2008) Επειδή το ενεργειακό διάγραμμα οξειδοαναγωγικού δυναμικού της ροής ηλεκτρονίων έχει την μορφή του γράμματος Z, ονομάζεται και «σχήμα Z» της φωτοσύνθεσης (z-scheme of photosynthesis) (Εικόνα 0.3).

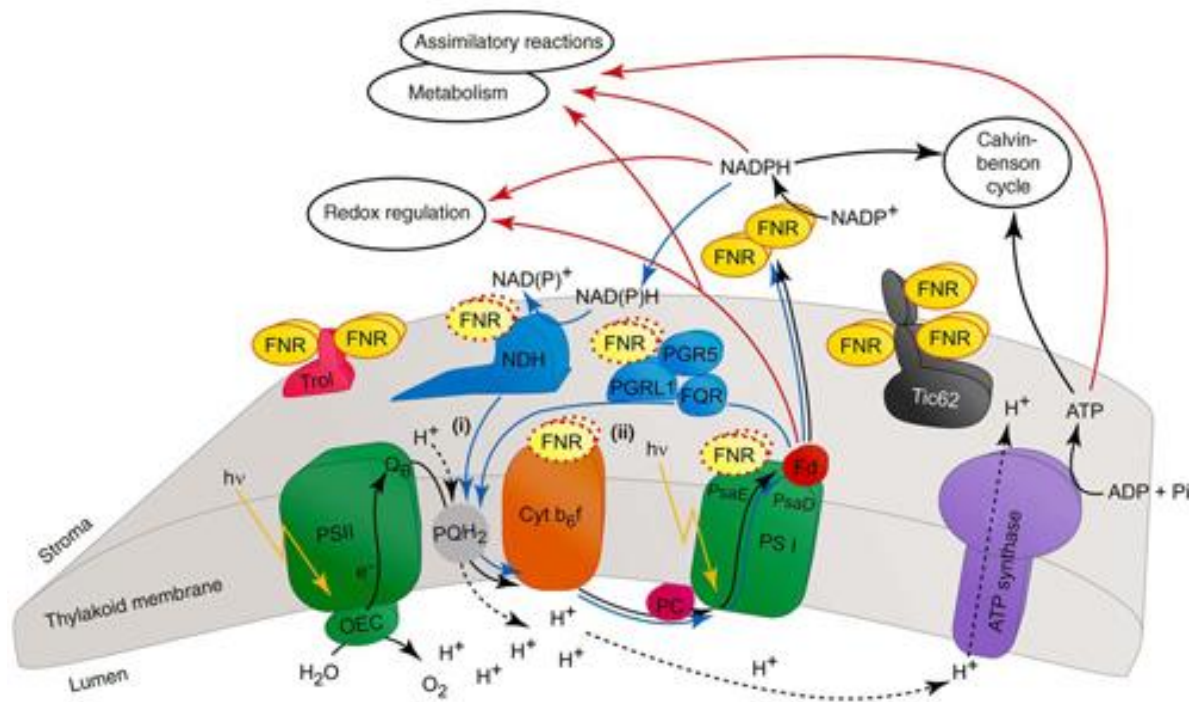
Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, λόγω της φωτόλυσης του νερού δημιουργείται μια διαβάθμιση της συγκέντρωσης πρωτονίων στις δύο πλευρές της μεμβράνης του θυλακοειδούς. Το ενζυμικό σύμπλοκο της ATP συνθετάσης (ATP synthase complex), το οποίο είναι ενσωματωμένο στις μεμβράνες των θυλακοειδών, αποτελεί τον δίαυλο ροής πρωτονίων προς το στρώμα. Κατά την διέλευση των πρωτονίων, η δυναμική ενέργεια που απελευθερώνεται λόγω απόσβεσης της διαβάθμισης πρωτονίων τροφοδοτεί την σύνθεση ATP από ADP και P_i . Η διαδικασία αυτή ονομάζεται φωτοφωσφορυλίωση (Εικόνα 0.4) (Raven et al., 2013).

Συνοψίζοντας, στο φως τα ηλεκτρόνια ρέουν συνεχώς από το νερό δια μέσου των φωτοσυστημάτων II και I προς το $NADP^+$, με αποτέλεσμα την οξείδωση του νερού H_2O προς οξυγόνο O_2 και την αναγωγή του $NADP^+$ σε $NADPH$ (Εικόνα 0.4). Αυτή η μονόδρομη ροή ηλεκτρονίων από το νερό προς το $NADP^+$ ονομάζεται μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων ενώ η παραγωγή ATP που λαμβάνει χώρα ονομάζεται μη κυκλική

φωτοφωσφορυλίωση. Υπάρχει, όμως, και η κυκλική φωτοφωσφορυλίωση η οποία λαμβάνει χώρα όταν το φωτοσύστημα I λειτουργεί εν μέρει ανεξάρτητα από το φωτοσύστημα II. Κατά την κυκλική αυτή ροή ηλεκτρονίων, ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το P₇₀₀ στο A₀, αλλά αντί να οδηγηθούν προς το NADP⁺ εκτρέπονται προς τις κινόνες που λειτουργούν ως δέκτες ηλεκτρονίων ανάμεσα στα δύο φωτοσυστήματα. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια προχωρούν καθοδικά στην αλυσίδα επιστρέφοντας στο κέντρο αντίδρασης του PSI προκαλώντας τη μεταφορά πρωτονίων στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης των θυλακοειδών (lumen), διαμέσου της μεμβράνης των θυλακοειδών και παρέχοντας έτσι πλεόνασμα ενέργειας για την παραγωγή ATP. Συνεπώς, το μόνο προϊόν της κυκλικής φωτοφωσφορυλίωσης είναι το ATP αφού δεν παράγεται NADPH. Η κυκλική φωτοφωσφορυλίωση είναι απαραίτητη καθώς στις σκοτεινές αντιδράσεις οι ενεργειακές ανάγκες είναι τέτοιες που απαιτείται περισσότερο ATP από ότι NADPH (Raven et al., 2013).



Εικόνα 0.3: Το «σχήμα Z» της φωτοσύνθεσης (τροποποίηση από Senge et al., 2014)



Εικόνα 0.4: Σχηματική απεικόνιση της φωτοσύνθεσης (Benz et al., 2010)

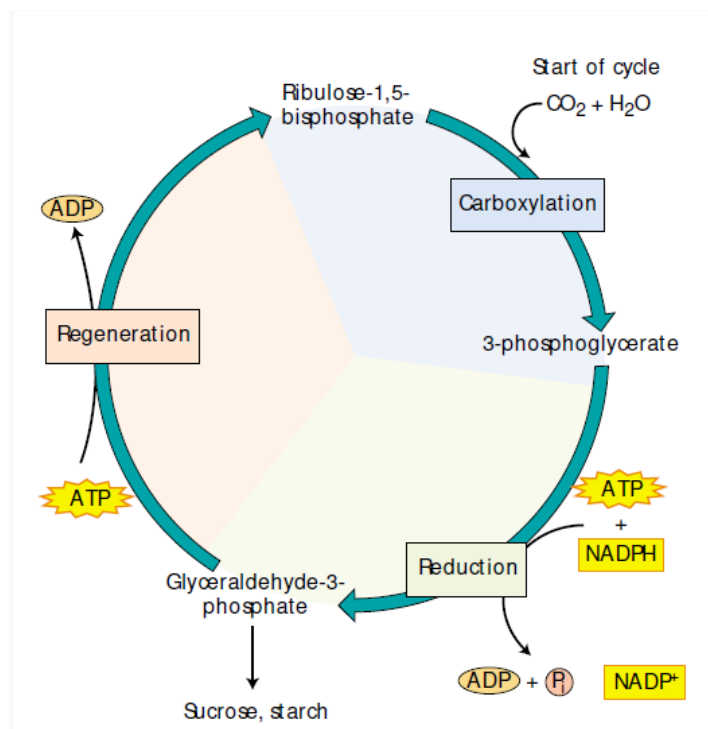
Σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης

Κύκλος του Calvin

Οι σκοτεινές αντιδράσεις αφορούν το βιοχημικό κομμάτι της φωτοσύνθεσης κατά το οποίο το CO_2 μετατρέπεται σε οργανικές ενώσεις χρησιμοποιώντας τη μεταβολική ενέργεια των NADPH και ATP, προϊόντων των φωτεινών αντιδράσεων. Η αναγωγή του CO_2 είναι κυκλική και ονομάζεται κύκλος του Calvin ή αλλιώς κύκλος C_3 , καθώς το πρώτο προϊόν που σχηματίζεται μετά την αφομοίωση του CO_2 φέρει τρία άτομα άνθρακα. Ο κύκλος του Calvin περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια: την καρβοξυλίωση, την αναγωγή και την αναγέννηση του μορίου δέκτη του CO_2 . Στο τέλος του κάθε κύκλου αναγεννάται το μόριο δέκτης του CO_2 , ένα σάκχαρο με πέντε άτομα άνθρακα και δύο φωσφορικές ομάδες, η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη (RuBP) (Taiz & Zeiger, 2006).

Στον στάδιο της καρβοξυλίωσης του κύκλου του Calvin (Εικόνα 0.5), ένα μόριο CO_2 ενώνεται με την 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη (RuBP) και σχηματίζονται δύο μόρια 3-φωσφορογλυκερικού οξέος (PGA). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυλάση-οξυγονάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης, την επονομαζόμενη RubisCO. Στη συνέχεια, στο στάδιο της αναγωγής το PGA ανάγεται προς 3-φωσφορική

γλυκεριναλδεύδη (τριόζη) με κατανάλωση ATP και NADPH. Τέλος, στο στάδιο της αναγέννησης επιτελούνται μια σειρά από αντιδράσεις που οδηγούν στην αναγέννηση της 1,5-διφωφορικής ριβουλόζης. Κατά το στάδιο αυτό γίνεται κατανάλωση ATP (Αϊβαλάκης κ.α., 2005).



Εικόνα 0.5: Ο κύκλος του Calvin ή κύκλος C₃ (Taiz & Zeiger, 2006)

Όσο αφορά στο ενεργειακό κέρδος του κύκλου του Calvin, πρέπει να σημειωθεί ότι τα 5/6 των μορίων της τριόζης που παράγονται κατά τον κύκλο του Calvin χρησιμοποιούνται για την αναγέννηση της 1,5-διφωφορικής ριβουλόζης. Το υπόλοιπο 1/6 διατίθεται για τη βιοσύνθεση υδατανθράκων (Raven et al., 2013). Τελικά για την δημιουργία ενός μορίου εξόζης δεσμεύονται 6 μόρια CO₂ με κατανάλωση 18 ATP και 12 NADPH. Με άλλα λόγια ο κύκλος του Calvin καταναλώνει 2 μόρια NADPH και τρία μόρια ATP για κάθε μόριο CO₂ που δεσμεύεται υπό μορφή υδατανθράκων (Taiz & Zeiger, 2006).

Ζιζανιοκτόνα

Η βιομηχανία των χημικώς συντιθέμενων ζιζανιοκτόνων ξεκίνησε στη Γαλλία το 1932 καθώς άρχισε να χρησιμοποιείται μια φαινολική ένωση, το DNOC (2-μεθυλο-4,5-δινιτροφαινόλη) για την εκλεκτική αντιμετώπιση ζιζανίων στα σιτηρά. Από τότε μέχρι σήμερα η χρήση τους έχει εξαπλωθεί πολύ (Cobb & Reade, 2010). Τα ζιζανιοκτόνα καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό (45,8%) της παγκόσμιας αγοράς φ.π., και

ακολουθούνται από τα εντομοκτόνα (26,3%), τα μυκητοκτόνα (23%) και τέλος όλα τα υπόλοιπα φ.π. (4,9%). Όσο αφορά στην αξία της παγκόσμιας αγοράς ζιζανιοκτόνων το 2006 ήταν 15,4 δις δολάρια (Agrow, 2006).

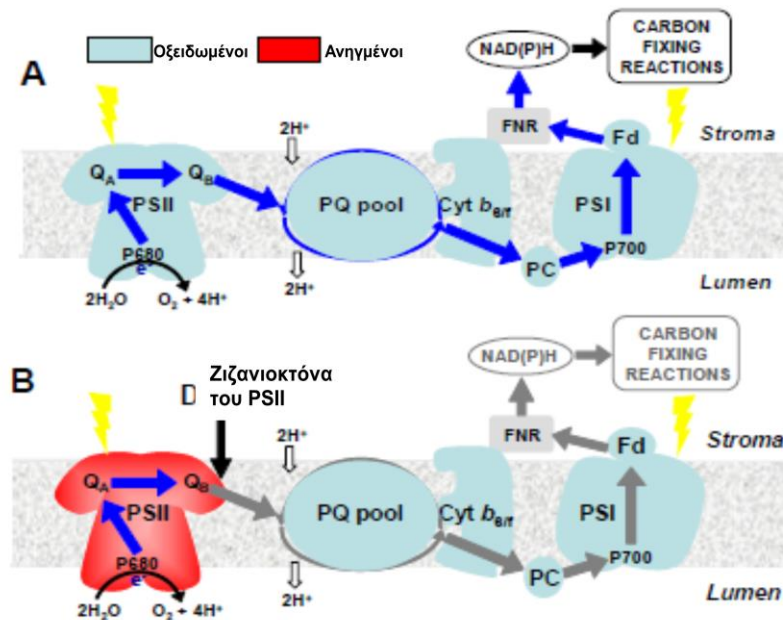
Τα ζιζανιοκτόνα χωρίζονται σε κατηγορίες με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Ένας από αυτούς αφορά στον μηχανισμό δράσης τους. Ως μηχανισμός δράσης ορίζεται η αρχική εξειδικευμένη επίδρασή τους σε βιοχημικές (δράση ενζύμων απαραίτητων κατά τη βιοσύνθεση αμινοξέων και λιπαρών οξέων) ή φυσιολογικές (φωτοσύνθεση, διαίρεση και αύξηση κυττάρων) διεργασίες του φυτού οι οποίες καθώς παρεμποδίζονται οδηγούν στη νέκρωσή του (Ashton & Crafts, 1981). Ανάλογα με το είδος των διεργασιών τα οποία επηρεάζουν, τα ζιζανιοκτόνα κατατάσσονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, οι οποίες στη συνέχεια κατατάσσονται σε πολλές μικρότερες. Πιο συγκεκριμένα, χωρίζονται στα ζιζανιοκτόνα που αναστέλλουν α) τη φωτοσύνθεση ή τη βιοσύνθεση χρωστικών απαραίτητων για τη φωτοσύνθεση, β) το μεταβολισμό του κυττάρου και γ) τη διαίρεση ή την αύξηση του κυττάρου (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Στην παρούσα εργασία θα γίνει εκτενής αναφορά σε δύο υποκατηγορίες ζιζανιοκτόνων. Η πρώτη είναι μια μεγάλη υποκατηγορία αυτών που αναστέλλουν την φωτοσύνθεση, τους παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος II (PSII). Η δεύτερη, είναι μια επίσης μεγάλη υποκατηγορία αυτών που αναστέλλουν τον μεταβολισμό του κυττάρου, και είναι οι παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού οξέος.

Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος II

Στα ζιζανιοκτόνα που παρεμποδίζουν το φωτοσύστημα II ανήκουν ζιζανιοκτόνα πολλών χημικών ομάδων όπως οι τριαζίνες και οι τριαζινόνες. Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης τους, όπως ήδη αναφέρθηκε, αναστέλλει την φωτοσυνθετική λειτουργία. Κατά την φωτοσύνθεση, το μόριο της χλωροφύλλης του κέντρου αντίδρασης P680 απορροφά ενέργεια και ένα από τα ηλεκτρόνιά του ωθείται σε υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο, ενώ το μόριο της χλωροφύλλης θεωρείται ότι βρίσκεται σε απλή διεγερμένη κατάσταση-single state ($^1\text{Chl}^*$) (βλ. υποκεφ. Ροή ηλεκτρονίων και παραγωγή ενέργειας στις φωτεινές αντιδράσεις) Το ηλεκτρόνιο αυτό μεταφέρεται σε μια σειρά από αποδέκτες ηλεκτρονίων και καταλήγει στη πλαστοκινόνη B (Q_B), η οποία είναι συνδεδεμένη στην πρωτεΐνη D1 του PSII. Οι παρεμποδιστές του PSII εμποδίζουν την παραπάνω ροή ηλεκτρονίων καθώς ανταγωνίζονται με την πλαστοκινόνη B για την θέση πρόσθεσης στην D1 πρωτεΐνη. Καθώς η πλαστοκινόνη B δεν είναι σταθερά

δεσμευμένη στη D1 πρωτεΐνη τα ζιζανιοκτόνα καταλαμβάνουν εύκολα την θέση της. Αυτό οδηγεί στην αδυναμία οξείδωσης του PSII παρ' όλο που η υπόλοιπη αλυσίδα ηλεκτρονίων μέχρι το PSI παραμένει οξειδωμένη (Εικόνα 0.6) (Hess, 2000, Trebst, 2008, Ελευθεροχωρινός, 2008, Cobb & Reade, 2010).

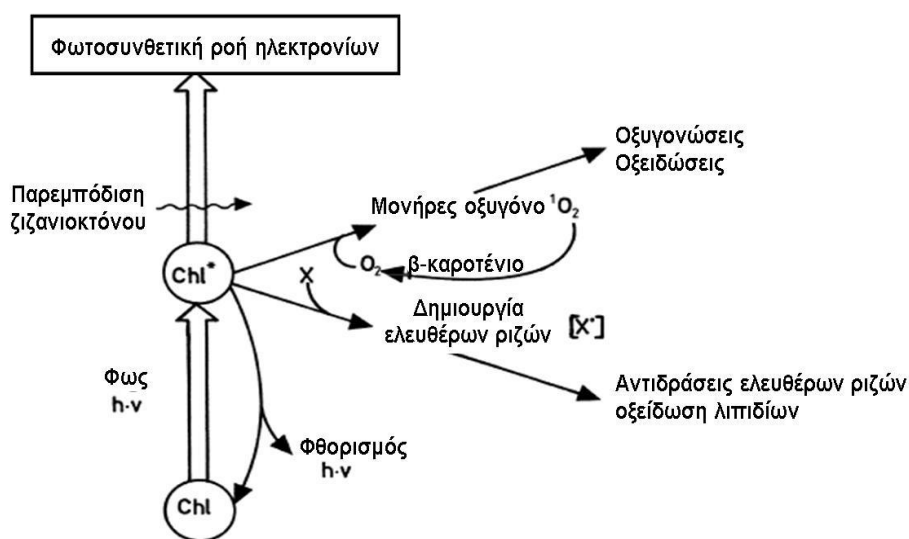


Εικόνα 0.6: Τρόπος δράσης των ζιζανιοκτόνων του PS II (τροποποίηση από Kurepin et al., 2013).

Η παρεμπόδιση της ροής ηλεκτρονίων από τα ζιζανιοκτόνα έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια της χλωροφύλλης να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στη διεγερμένη κατάσταση ($^1Chl^*$). Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο μικρός χρόνος που απαιτείται για το διαχωρισμό φορτίου και την εκκίνηση των φωτοχημικών αντιδράσεων έχει ως αποτέλεσμα την απόσβεση της πλειονότητας των διεγερμένων κέντρων αντίδρασης μέσω της φωτοχημικής οδού. Το υπόλοιπο ποσοστό των διεγερμένων κέντρων αποσβένεται υπό μορφή θερμότητας ή υπό μορφή φθορισμού. Μια παραλλαγή της οδού μη-φωτοχημικής απόσβεσης (απόσβεσης μέσω απωλειών θερμότητας) αποτελεί η απόσβεση μέσω της χλωροφύλλης διεγερσης τριπλότητας ($^3Chl^*$). Η $^3Chl^*$ προκύπτει σε μεγαλύτερη συχνότητα όταν τα διεγερμένα κέντρα δεν μπορούν να υποστούν διαχωρισμό φορτίου λόγω παρεμπόδισης της ροής ηλεκτρονίων. Καθώς η $^3Chl^*$ χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής συγκριτικά με την $^1Chl^*$, δεν μπορεί να επανέλθει πίσω στην κατάσταση $^1Chl^*$ ούτε να οδηγήσει σε διαχωρισμό φορτίου. Μόνη επιλογή για την αποδιέγερση της $^3Chl^*$ αποτελούν τα καροτενοειδή του φωτοσυστήματος τα οποία όμως επαρκούν για συγκεκριμένα ποσοστά των $^3Chl^*$ επί του συνόλου. Στην περίπτωση παρουσίας παρεμποδιστών του PSII ο αριθμός των $^3Chl^*$ αυξάνεται πάρα πολύ, καθώς η βασική

οδός απόσβεσης της ενέργειας διακόπτεται, και η απόσβεση με τη βοήθεια των καροτενοειδών δεν είναι επαρκής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταφοράς ενέργειας από την $^3\text{Chl}^*$ προς το O_2 και παραγωγή οξυγόνου διέγερσης απλότητας ($^1\text{O}_2$), μιας εξαιρετικά δραστικής ROS. Παράλληλα αυξάνονται η εκπομπή φθορισμού και η εκπομπή θερμότητας (Εικόνα 0.7) (Hess, 2000, Trebst, 2008, Ελευθεροχωρινός, 2008, Cobb&Reade, 2010).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα μόρια $^1\text{O}_2$ αδρανοποιούνται επίσης με τη βοήθεια καροτενοειδών. Συνεπώς, ο ρόλος των καροτενοειδών αποδεικνύεται πολύ σημαντικός, και συνίσταται στην προστασία της χλωροφύλλης από την φωτοοξειδωση και την αντιοξειδωτική προστασία της φωτοσυνθετικής συσκευής. Στην περίπτωση, όμως, παρουσίας παρεμποδιστών του PSII ο αριθμός των μορίων ενεργού μορφής οξυγόνου ($^1\text{O}_2^*$) αυξάνεται σε τέτοιο βαθμό που δεν είναι δυνατή η αδρανοποίηση όλων των μορίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα μόρια $^1\text{O}_2$ να προκαλούν αποδόμηση της D1 πρωτεΐνης, οξείδωση των λιπαρών οξέων αλλά και των νουκλεϊκών οξέων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων των μεμβρανών (Εικόνα 0.7) (Hess, 2000, Trebst, 2008, Ελευθεροχωρινός, 2008, Cobb & Reade, 2010)



Εικόνα 0.7: Αποδιέγερση της διεγερμένης χλωροφύλλης κατά την παρεμπόδιση από ζιζανιοκτόνα του PSII (Fedtke, 1982).

Η υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων προκαλεί απώλεια της εκλεκτικότητας της κυτταρικής μεμβράνης που με τη σειρά της οδηγεί σε απώλεια της διαμερισματοποίησης και της λειτουργικότητας των κυττάρων, σε εκροή των ενδοκυτταρικών συστατικών τους και τελικώς στη νέκρωση των φυτών. Οι συνολικές επιπτώσεις από τα ζιζανιοκτόνα του PSII περιλαμβάνουν την ανασχεση της λειτουργίας

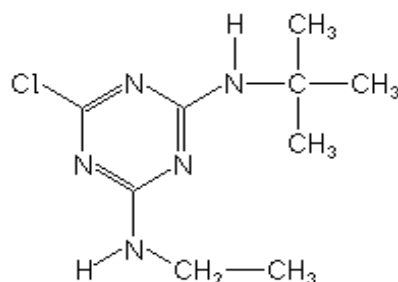
του κύκλου του Calvin άρα και της παραγωγής υδατανθράκων βλ. υποκεφ. Κύκλος του Calvin), την εμφάνιση χλώρωσης λόγω καταστροφής των χλωροφυλλών μέσω των αντιδράσεων φωτοοξειδωσης στους χλωροπλάστες, την αναστολή της ανάπτυξης και τελικά τη νέκρωση λόγω της καταστροφής των μεμβρανών από την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων (Hess, 2000, Ελευθεροχωρινός, 2008).

Τριαζίνες

Οι τριαζίνες ανήκουν στους παρεμποδιστές του PSII και ίσως αποτελούν την σημαντικότερη ομάδα φ.π. που αναπτύχθηκε ποτέ. Ανακαλύφθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 50 και είναι από τα πλέον μελετηθέντα ζιζανιοκτόνα, με χιλιάδες επιστημονικές έρευνες να αφορούν στην ασφάλειά τους στον άνθρωπο και το περιβάλλον. Χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση πολλών πλατύφυλλων και αγρωστωδών ζιζανίων σε πάνω από 50 καλλιέργειες, με κύρια τον αραβόσιτο (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007, LeBaron et al., 2008)

Terbutylazine

Το terbutylazine (Εικόνα 0.8) ανήκει στις τριαζίνες, και συγκεκριμένα στις χλωροτριαζίνες, και έχει τις εμπορικές ονομασίες Gardoprim, Folal, Topogard. Είναι ευρέως φάσματος προφυτρωτικό ή μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση κυρίως πλατύφυλλων ζιζανίων στον αραβόσιτο, στο σόργο, σε ψυχανθή, στο αμπέλι, σε οπωροφόρα δένδρα, σε εσπεριδοειδή, στην ελιά, στην πατάτα, στο ζαχαροκάλαμο, στο σπαράγγι και σε φυτώρια δασικών ειδών (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).



Εικόνα 0.8: Ο συντακτικός τύπος του terbutylazine

Το terbutylazine έγινε η βασική τριαζίνη που χρησιμοποιείται στην Ευρώπη καθώς η χρήση του atrazine διεκόπη καθώς η συγκέντρωσή του στα υπόγεια ύδατα ήταν υψηλότερη του ορίου (0,1 ppb) που υπάρχει για όλα τα φ.π. Ενώ στις ΗΠΑ το terbutylazine δεν χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες αραβόσιτου, στην Ευρώπη

εφαρμόζεται στο 60% περίπου των εκτάσεων του αραβοσίτου. Μια ακόμα χρήση του, η οποία έχει καταγραφεί στις ΗΠΑ, είναι αυτή για τον έλεγχο της ανάπτυξης φυκών (Simoneaux & Gould, 2008). Το terbutylazine αναμένεται να είναι φυτοτοξικό στα υδροχαρή φυτά καθώς καταλήγει στα επιφανειακά νερά και διαλύεται αργά στο περιβάλλον (EPA 1995).

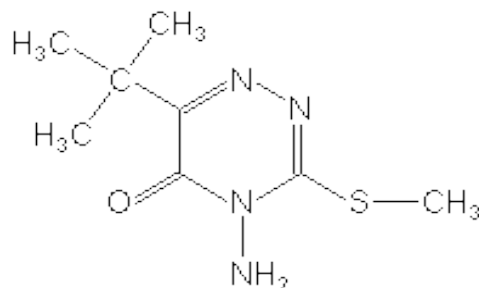
Ορισμένα από τα χαρακτηριστικά του terbutylazine, καθώς και των άλλων ζιζανιοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, παρουσιάζονται στον Πίνακα 0.1.

Τριαζιόνες

Οι τριαζιόνες ανήκουν και αυτές στους παρεμποδιστές του PSII. Οι ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι αζωτο-ετεροκυκλικές ενώσεις με εναλλασσόμενα (συμμετρικές τριαζιόνες) ή μη εναλλασσόμενα (ασύμμετρες τριαζιόνες) άτομα άνθρακα και αζώτου, ενώ χαρακτηρίζονται και από την ύπαρξη κετονομάδας (C=O) (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Metribuzin

Το metribuzin (Εικόνα 0.9, Πίνακας 0.1.) είναι μια ασύμμετρη τριαζιόνη και διατίθενται με τις εμπορικές ονομασίες Lexore, Sencor και Sencorex. Αναπτύχθηκε πρώτη φορά το 1968, είναι διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο φυλλώματος και εδάφους και χρησιμοποιείται προφυτρωτικά ή μεταφυτρωτικά για την καταπολέμηση πολλών αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων σε καλλιέργειες όπως η πατάτα, η ντομάτα, η σόγια, ο αραβόσιτος, το σπαράγγι, η μηδική, το τριφύλλι και το καρότο. Έχει περιορισμένη κινητικότητα στο φυτό και για τον λόγο αυτό συμπεριφέρεται ως ζιζανιοκτόνο επαφής (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007, Ελευθεροχωρινός, 2008).



Εικόνα 0.9: Ο συντακτικός τύπος του metribuzin.

Το metribuzin μπορεί να ρυπάνει τα επιφανειακά νερά είτε κατά την απευθείας εφαρμογή είτε λόγω απορροής, ενώ είναι πολύ τοξικό στα φυτά μη στόχους (EPA, 1998).

Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλλικού

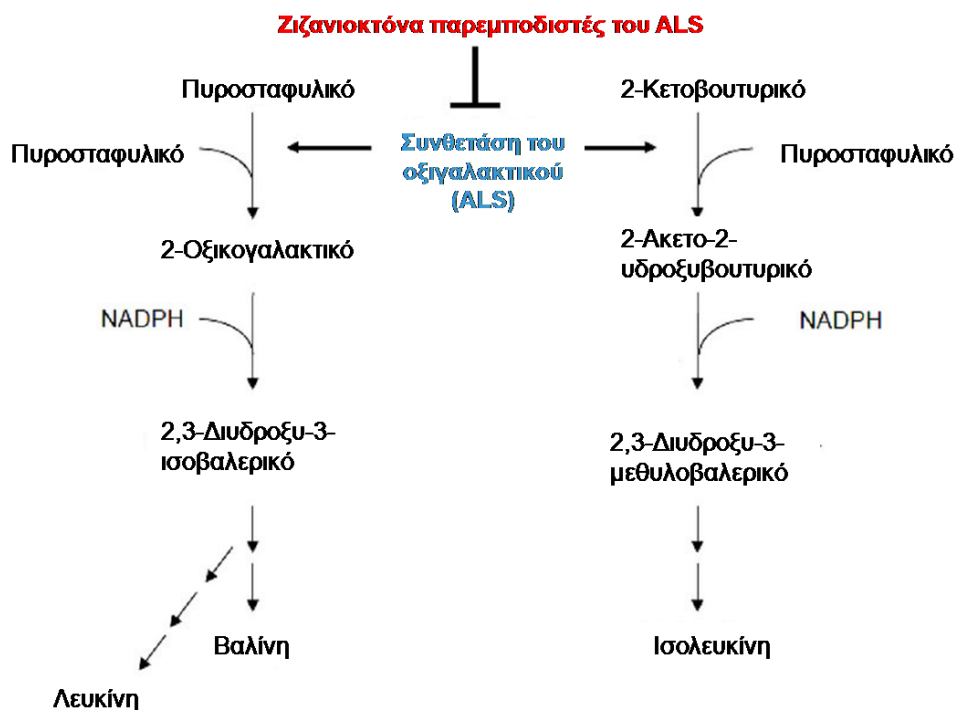
Τα ζιζανιοκτόνα της ομάδας αυτής παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση των αμινοξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα ατόμων άνθρακα (branched-chain amino acids), δηλαδή της βαλίνης, της λευκίνης και της ισολευκίνης. Αποτελούν μια από τις πλέον χρησιμοποιούμενες ομάδες ζιζανιοκτόνων από τη στιγμή που εισήχθησαν στην αγορά στις αρχές της δεκαετίας του '80 (Zhou et al., 2007).

Ο μηχανισμός δράσης τους σχετίζεται με την αναστολή της δράσης της συνθετάσης του οξυγαλακτικού (acetolactate synthase, ALS) ή αλλιώς συνθετάσης του ακετοϋδροξικού (acetohydroxyacid synthase, AHAS), που είναι ένα βασικό ένζυμο για την βιοσύνθεση βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης. Το ALS καταλύει την αντίδραση 2 μορίων πυροσταφυλλικού για την παραγωγή 2-οξικογαλακτικού καθώς και την αντίδραση του 2-κετοβουτυρικού με το πυροσταφυλλικό για την παραγωγή 2-ακετο-2-υδροξυβουτυρικού. Το 2-οξυκογαλακτικό και το 2-ακετο-2-υδροξυβουτυρικό αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για την παραγωγή βαλίνης/λευκίνης και ισολευκίνης αντίστοιχα (Εικόνα 0.10) (Jablonkai, 2011)

Η έκθεση των φυτών στους παρεμποδιστές του ALS οδηγεί σε μείωση των συγκεντρώσεων των αμινοξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα ατόμων άνθρακα, μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης, παρεμπόδιση της μίτωσης και της σύνθεσης DNA, μείωση του ρυθμού της κυτταροδιαίρεσης και παρεμπόδιση της ανάπτυξης. Σε όλα τα όργανα του φυτού η βιοσύνθεση των συγκεκριμένων αμινοξέων λαμβάνει χώρα κυρίως στους νεαρούς ιστούς οπότε και τα πρώτα συμπτώματα παρουσιάζονται στους μεριστωματικούς ιστούς. Αυτός είναι και ο λόγος που τα πρώτα συμπτώματα παρουσιάζονται στους μεριστωματικούς ιστούς. Οι ώριμοι ιστοί έχουν μεγαλύτερες αποθήκες αμινοξέων και αποθέματα πρωτεϊνών που μπορούν να καταβολιστούν για παραγωγή αμινοξέων, οπότε και απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να εμφανιστούν φυτοτοξικά συμπτώματα σε αυτούς τους ιστούς. Λόγω των ανωτέρω τα ζιζανιοκτόνα αυτά νεκρώνουν τα φυτά με αργό ρυθμό Όσο αφορά το είδος των συμπτωμάτων που προκαλούν, αρχικά παρατηρείται χλόρωση και νέκρωση στους

νεαρούς μεριστωματικούς ιστούς των βλαστών και των ριζών, ενώ τα νέα φύλλα μοιάζουν μαραμένα. Στη συνέχεια τα συμπτώματα επεκτείνονται και στο υπόλοιπο φυτό καταλήγοντας στη νέκρωσή του. Στα νεύρα των φύλλων αυξάνονται οι ανθοκυανίνες με αποτέλεσμα να κοκκινίζουν, ενώ συχνά τα φύλλα αποκόπτονται. Η νέκρωση των φυτών μπορεί να ακολουθήσει δέκα μέρες μετά την εφαρμογή, αλλά μπορεί να παρέλθουν μέχρι και δύο μήνες όταν η ανάπτυξη του ζιζανίου είναι αργή (Zhou et al., 2007, Cobb & Reade, 2010).

Έχει παρατηρηθεί, επίσης, αύξηση των ενεργών μορφών οξυγόνου μετά από χειρισμούς με παρεμποδιστές του ALS, πιθανώς λόγω μια αντίδρασης η οποία καταναλώνει οξυγόνο και που παρουσιάζεται όταν η βασική ενζυμική λειτουργία του ALS παρεμποδίζεται (Durner et al., 1994). Αυτός ο μηχανισμός, όμως, δεν είναι ο βασικός που οδηγεί σε νέκρωση από τα ζιζανιοκτόνα αυτά. Σε γενικές γραμμές δεν έχουν απαντηθεί ακόμα όλα τα ερωτήματα σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο αυτά τα ζιζανιοκτόνα οδηγούν στην νέκρωση των φυτών (Cobb & Reade, 2010).



Εικόνα 0.10: Μηχανισμός δράσης των ζιζανιοκτόνων που παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού παρεμποδίζοντας την δράση της συνθετάσης του γαλακτικού οξέος ALS (τροποποίηση από Endo et.al., 2013)

Σουλφονουλουρίες

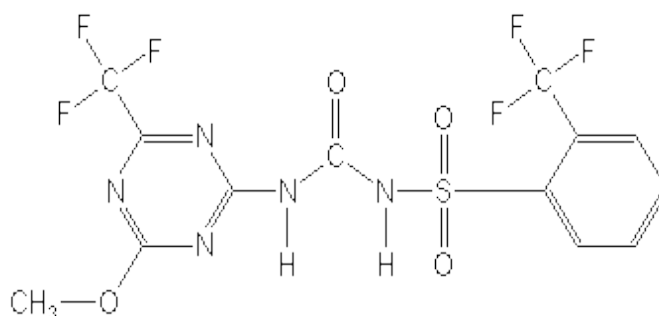
Οι σουλφονουλουρίες είναι ενώσεις που ανήκουν στους παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού. Άρχισαν να χρησιμοποιούνται στις αρχές

της δεκαετίας του '80 ως ζιζανιοκτόνα εδάφους και φυλλώματος. Καταπολεμούν ετήσια και πολυετή ζιζάνια σε διάφορες καλλιέργειες ενώ εφαρμόζονται προφυτρωτικά ή μεταφυτρωτικά και προσλαμβάνονται από τις ρίζες και τα φύλλα των φυτών ενώ μετακινούνται στους μεριστωματικούς ιστούς αποπλαστικά και συμπλαστικά (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Τα ζιζανιοκτόνα της ομάδας αυτής είναι δραστικά σε δόσεις 10-100 φορές μικτότερες από ότι εκείνες στα περισσότερα χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα. Μερικές από τις σουλφονουρίες (chlororsulfuron, metsulfuron, triasulfuron), έχουν χρόνο παραμονής στο έδαφος συχνά μεγαλύτερο από 12 μήνες, παρόλο που εφαρμόζονται σε πολύ χαμηλές δόσεις (1-2 g δ.ο./στρέμμα). Οι σουλφονουρίες απομακρύνονται από το έδαφος κυρίως με την χημική τους διάσπαση (υδρόλυση), ενώ ο βαθμός έκπλυσής τους είναι μεγάλος αφού η προσρόφησή τους στα κολλοειδή του εδάφους είναι μικρή (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Tritosulfuron

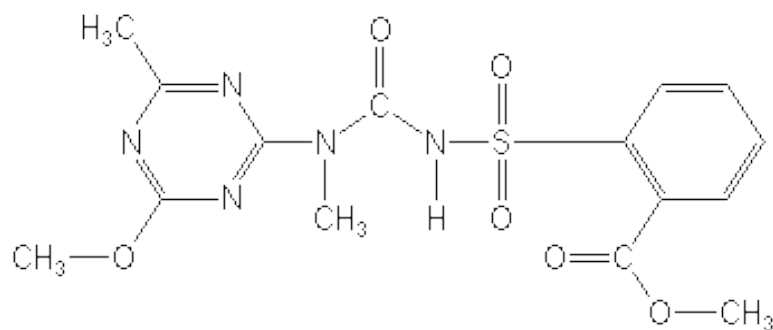
Το tritosulfuron (Εικόνα 0.11, Πίνακας 0.1) ανήκει στις σουλφονουρίες και έχει τις εμπορικές ονομασίες Biathion και Corto. Η εισαγωγή του στην αγορά έγινε το 2004 από την εταιρία Basf. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ζιζανίων στις καλλιέργειες σιτηρών (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).



Εικόνα 0.11: Ο συντακτικός τύπος του tritosulfuron.

Tribenuron methyl

Το tribenuron methyl (Εικόνα 0.12, Πίνακας 0.1) είναι ζιζανιοκτόνο φυλλώματος της ομάδας των σουλφονουριών. Άρχισε να εφαρμόζεται στα μέσα της δεκαετίας του '80 με την εμπορική ονομασία Express. Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση πλατύφυλλων ζιζανίων στα χειμερινά σιτηρά και εφαρμόζεται μεταφυτρωτικά (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007). Τα υδροχαρή φυτά θεωρούνται οι πιο ευαίσθητοι υδρόβιοι οργανισμοί όσο αφορά την τοξικότητα του tribenuron methyl (EFSA, 2004).



Εικόνα 0.12: Ο συντακτικός τύπος του Tribenuron methyl.

Πίνακας 0.1: Χαρακτηριστικά των τεσσάρων ζιζανιοκτόνων με τα οποία έγιναν οι δοκιμές τοξικότητας

Κοινή ονομασία	Terbuthylazine	Metribuzin	Tritosulfuron	Tribenuron methyl
Όνομα IUPAC	N ² -tert-butyl-6-chloro-N ⁴ -ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	4-amino-6-tert-butyl-3-methylthio-1,2,4-triazin-5(4H)-one	1-(4-methoxy-6-trifluoromethyl-1,3,5-triazin-2-yl)-3-(2-trifluoromethyl-benzenesulfonyl)urea	Methyl2-[4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl(methyl)carbamoylsulfamoyl]benzoate
Αρ. CAS	5915-41-3	244-209-7	142469-14-5	101200-48-0
Μοριακός τύπος	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	C ₁₃ H ₉ F ₆ N ₅ O ₄ S	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₆ S
Μοριακό βάρος (g/mol)	229,7	214,3	445,3	395,4
Σημείο τήξης (°C)	175,5	125	166,5 – 169,4	142±1,1
Σημείο ζέσεως (°C)	224	366	-	-
Μορφή	Λευκή κρυσταλλική σκόνη	Άχρωμοι κρύσταλλοι	Λευκή κρυσταλλική σκόνη	Άσπρη σκόνη
Τάση ατμών (Pa)	9.0 × 10 ⁻⁵ (25°C)	1,21×10 ⁻⁴ (20°C)	< 1.0 × 10 ⁻⁵ (20°C)	5.3×10 ⁻⁸ (25°C)
Σταθερά του νόμου Henry (Pa m ³ mol ⁻¹)	2.3 × 10 ⁻³	2,0×10 ⁻⁵	< 1 × 10 ⁻⁴	1,0×10 ⁻⁸
Διαλυτότητα στο νερό	9,0 mg/L (25 °C, pH 7,4)	1,05 g/L (20 °C pH 4 – 9)	38,6 mg/L (20 °C, pH 4,7)	2,04 g/L (20 °C, pH 7)
Log του συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού log Pow	3,4 στους 25 °C	1,6 στους 20 °C	2,93 στους 20 °	0,78 σε pH 7

Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της τοξικότητας δύο ζιζανιοκτόνων που παρεμποδίζουν το PSII (των metribuzin και terbuthylazine) καθώς και δύο ζιζανιοκτόνων που παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού (των tritosulfuron και tribenuron methyl) αλλά και ανά δύο συνδυασμών τους, στο φυτό βιοδείκτη *L.minor*. Στην επιστημονική βιβλιογραφία δεν

εντοπίστηκε καμία δημοσιευμένη εργασία που να πραγματεύεται την τοξικότητα του tritosulfuron σε κάποιο οργανισμό, αλλά και καμία που να πραγματεύεται την τοξικότητα του tribenuron methyl στη *L.minor*. Επιπρόσθετα, καμία ερευνητική εργασία δεν βρέθηκε που να μελετά τη συνδυασμένη τοξικότητα των παραπάνω δραστικών ουσιών.

Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκε καταρχάς η παρεμπόδιση της ανάπτυξης της *L.minor* από τα τέσσερα ζιζανιοκτόνα και σχηματίστηκαν οι καμπύλες δόσης απόκρισης, ενώ προσδιορίστηκαν επίσης και τα μαθηματικά μοντέλα που περιέγραψαν καλύτερα τα αποτελέσματα της συνδυασμένης τοξικότητας. Επίσης, εξετάστηκε η επίπτωση των ζιζανιοκτόνων και των συνδυασμών τους στο φθορισμό της χλωροφύλλης και εκτιμήθηκε η ευαισθησία των διαφορετικών παραμέτρων αυτής. Τέλος, αξιολογήθηκε η ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού της *L.minor* μέσω της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Παράλληλα, καθώς στην βιβλιογραφία δεν καταγράφονται φωτοσυνθετικοί βιοαισθητήρες που να χρησιμοποιούν θυλακοειδή από φυτά βιοδείκτες, επιχειρήθηκε η δημιουργία ενός αισθητήρα με ακινητοποιημένα θυλακοειδή του βιοδείκτη *L.minor*, με τον οποίο να μπορεί να γίνει ανίχνευση ζιζανιοκτόνων του φωτοσυστήματος II. Για επιβεβαίωση της λειτουργίας του βιοαισθητήρα έγινε με την ανίχνευση των terbuthylazine και metribuzin, ενώ το όριο ανίχνευσής τους συγκρίθηκε με αυτά της βιβλιογραφίας.

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Καλλιέργεια *Lemna minor* L.

Για τις δοκιμές τοξικότητας στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το φυτό βιοδείκτης *Lemna minor* L. Αρχικά, δημιουργήθηκε αξενική καλλιέργεια² των φυτών, οπότε και ακολουθήθηκαν οδηγίες από το OECD 221 -«Πρωτόκολλο οδηγιών για δοκιμές χημικών ουσιών-δοκιμή παρεμπόδισης της ανάπτυξης των ειδών *Lemna sp*» (2006). Πιο συγκεκριμένα, τα φυτά εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου NaClO 0,5% για 4 λεπτά και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια, κάθε φυτό μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο πλακίδιο κυτταροκαλλιέργειας 24 θέσεων, στο οποίο υπήρχε αποστειρωμένο θρεπτικό διάλυμα Steinberg. Τα φυτά που επιβίωσαν από την διαδικασία αυτή συνέχισαν να καλλιεργούνται στο εργαστήριο υπό ασηπτικές συνθήκες.

Το θρεπτικό διάλυμα στο οποίο διατηρούνταν η καλλιέργεια ήταν το Steinberg. Αυτό, επιλέχθηκε μετά από σύγκριση της ανάπτυξης της *L.minor* σε τρία διαφορετικά θρεπτικά υλικά, τα οποία προτείνονται στο πρωτόκολλο OECD 221. Συγκεκριμένα από τα Swedish Standard (SIS), 20X AAP και Steinberg, το τελευταίο έδειξε τα καλύτερα αποτελέσματα όσο αφορά την ταχύτητα ανάπτυξης της *L.minor*. Στον Πίνακα 0.2 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών συστατικών που περιέχονται στο θρεπτικό διάλυμα Steinberg, ενώ στον Πίνακα 0.3 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις που περιέχονται στα stock διαλύματα από τα οποία φτιάχνεται το τελικό διάλυμα.

Για την παρασκευή του Steinberg medium, αρχικά φτιάχνονταν τα οχτώ διαφορετικά διαλύματα που περιγράφονται στον Πίνακα 0.3. Στη συνέχεια τα διαλύματα αυτά αποστειρώνονταν σε κλίβανο (120 °C για 20 λεπτά) και διατηρούνταν στους 4 °C. Αποστειρώνονταν επίσης και όλος ο γυάλινος εξοπλισμός προς χρήση, καθώς και τα ρύγχη των μηχανικών πιπετών και το απεσταγμένο νερό. Κατόπιν, όλα τα απαραίτητα υλικά αποστειρώνονταν με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) σε θάλαμο ρεύματος αέρα στρωτής ροής (Laminar air flow cabinet), στον οποίο στη συνέχεια λάμβανε χώρα η διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού υλικού. Για της παρασκευή ενός λίτρου Steinberg αναμειγνύονταν 935 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό, 20 ml από τα

² Η ανάπτυξη οργανισμών ενός μόνο είδους με απουσία κυττάρων ή ζωντανών οργανισμών από οποιοδήποτε άλλο είδος (Nordberg et al., 2009).

stock διαλύματα I, II, III και 1ml από τα stock διαλύματα IV, V, VI, VII, VIII. Στη συνέχεια, το pH ρυθμίζονταν στο 6,8.

Πίνακας 0.2: Οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών στοιχείων του Steinberg medium.

Μακροστοιχεία	mg/l	mmol/l
KNO ₃	350,0	3,46
KH ₂ PO ₄	90,0	0,66
K ₂ HPO ₄	12,6	0,072
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100,0	0,41
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	295,0	1,25
Μικροστοιχεία	μg/l	μmol/l
H ₃ BO ₃	120,00	1,94
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	44,00	0,18
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180,00	0,91
FeCl ₃ ·6H ₂ O	760,00	2,81
Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	1500,00	4,03

Πίνακας 0.3: Οι συγκεντρώσεις των stock διαλυμάτων από τα οποία φτιάχνεται το Steinberg medium.

Stock διαλύματα	Μακροστοιχεία	[g/l]
I	KNO ₃	17,50
	KH ₂ PO ₄	4,50
	K ₂ HPO ₄	0,63
II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,00
III	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	14,75
Stock διαλύματα	Μικροστοιχεία	[mg/l]
IV	H ₃ BO ₃	120,00
V	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1080,00
VI	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	44,00
VII	MnCl ₂ ·4H ₂ O	180,00
VIII	FeCl ₃ ·6H ₂ O	760,00
	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	1500,00

Η αξενική καλλιέργεια της *L.minor* διατηρούνταν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες χωρητικότητας 2L, που εμπεριέχουν αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό και κλείνονται με βαμβάκι. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνταν στον ειδικά διαμορφωμένο χώρο του εργαστηρίου Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος του ΓΠΑ, με 24h φως

(λάμπες φθορισμού) έντασης ~110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ και 24-25 °C (στις συνθήκες που έγινε όλος ο πειραματισμός). Η υποκαλλιέργεια γινόταν μια φορά την εβδομάδα, ενώ η μεταφορά των φυτών στις νέες (αποστειρωμένες) κωνικές φιάλες γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα στρωτής ροής, εξασφαλίζοντας ασηπτικές συνθήκες (Εικόνα 1.2).

Προσδιορισμός της μεταβολής των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων τεσσάρων ζιζανιοκτόνων με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC

Για τον πειραματισμό στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν τα ζιζανιοκτόνα terbutylazine, metribuzin, tritosulfuron και tribenuron methyl. Καθώς αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η τοξικότητά τους στον βιοδείκτη *L.minor*, δημιουργήθηκαν διαλύματα τους στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των φυτών. Για τον έλεγχο της συμπεριφοράς των δραστικών ουσιών στο υδατικό θρεπτικό διαλύματα αυτό χρησιμοποιήθηκε η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography- HPLC). Αναλυτικότερα, δημιουργήθηκαν τα διαλύματα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των τεσσάρων δραστικών ουσιών που εφαρμόστηκαν στον πειραματισμό και αυτές εκτέθηκαν στην ίδια συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας με αυτές του πειραματισμού υπό την παρουσία (3 επαναλήψεις) και χωρίς την παρουσία (3 επαναλήψεις) φυτών της *L.minor*. Την αρχική ημέρα (ημέρα 0) αλλά και μετά την πάροδο τριών ημερών (day 3) έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης των ζιζανιοκτόνων και σύγκριση μεταξύ αυτών ώστε να εντοπιστούν τυχόν διαφορές. Καθώς οι τοξικολογικές δοκιμές ήταν semi-static, δηλαδή τα θρεπτικά διαλύματα άλλαζαν τις μέρες 3 και 5 του πειραματισμού, δεν χρειάστηκε έλεγχος της συγκέντρωσης σε επιπλέον χρονική στιγμή.

Ο πειραματισμός που περιγράφεται στο παρόν υποκεφάλαιο πραγματοποιήθηκε στο Research Unit for Microbe-Plant Interactions (AMP) του Helmholtz Zentrum στο Μόναχο της Γερμανίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Peter Schröder.

Εκχύλιση στερεάς φάσης

Για την παραλαβή των δραστικών ουσιών από τα υδατικά θρεπτικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE, solid phase extraction). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες καθαρισμού εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) C18 της εταιρείας Waters (Sep-Pak) χωρητικότητας 3 ml (500 mg). Από αυτές αρχικά διέρχονταν 1ml ακετονιτρίλιο και αμέσως μετά 1 ml υπερκάθαρο νερό για

εξισορρόπηση, στη συνέχεια 5 ml από το εκάστοτε διάλυμα με τις δραστικές ουσίες (20 ml από το tribenuron methyl λόγω χαμηλής συγκέντρωσης), κατόπιν οι στήλες ξεπλένονταν με 1 ml υπερκάθαρο νερό και τέλος η έκλουση των δραστικών ουσιών από το υλικό πλήρωσης γίνονταν με 1 ml ακετονιτρίλιο. Σε όλη την διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ειδική συσκευή δημιουργίας κενού (Εικόνα 0.13).



Εικόνα 0.13: Οι στήλες καθαρισμού εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) στη συσκευή δημιουργίας κενού.

Μέθοδος HPLC

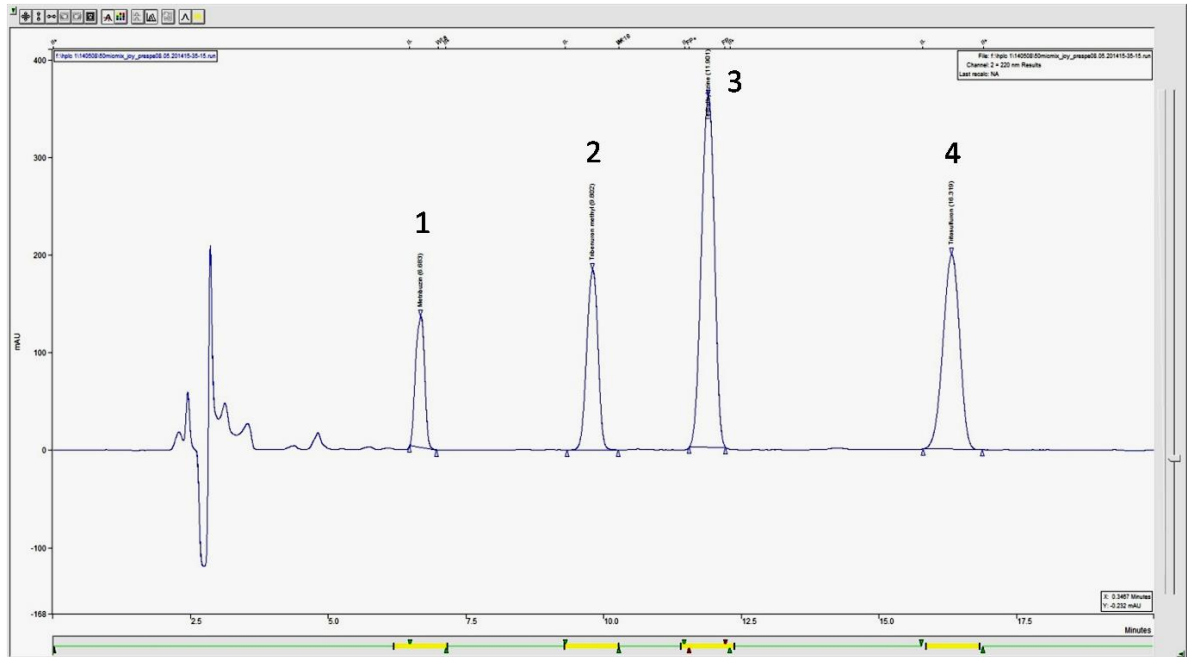
Για την ανίχνευση των ζιζανιοκτόνων χρησιμοποιήθηκε σύστημα Varian ProStar 215, με αυτόματο δειγματολήπτη 410 Varian, και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector) 335 της Varian (Εικόνα 0.14). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του προγράμματος MS Workstation 6.9.1 της Varian. Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ζιζανιοκτόνων χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής Diode Array με μήκος κύματος λ 220 nm (240 nm για το tribenuron methyl), και η στήλη Supelco Discovery C18 αντίστροφης φάσης, μήκους 250 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm και πορώδους υλικού πλήρωσης 5 μ m. Οι συνθήκες μέτρησης ήταν: κινητή φάση με ισοκρατικό σύστημα σύστασης ακετονιτρίλιο:νερό (50:50 v/v). Το νερό ήταν υπερκάθαρο (Milli-Q) και οξιτισμένο με προσθήκη τριφθοροξικού οξέος (Roth) (0,1 % v/v), ενώ και το ακετονιτρίλιο ήταν καθαρότητας 99,99% (Roth) και περιείχε τριφθοροξικό οξύ (Roth) (0,1 % v/v). Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στο 1

ml/min, ο όγκος εισαγωγής (injection volume) ήταν 100 μ l, και η θερμοκρασία της στήλης ήταν σταθερή στους 30 $^{\circ}$ C. Η διάρκεια της κάθε ανάλυσης ήταν 20 λεπτά. Η καταγραφή των εκλούμενων συστατικών, γίνονταν συνεχώς μέσω του φάσματος απορρόφησης από τον ανιχνευτή διάταξης διόδων (DAD) στα 220 και στα 240 nm.



Εικόνα 0.14: Το σύστημα HPLC της Varian (ProStar 215) που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των δραστικών ουσιών.

Τα εκχυλισμένα ζιζανιοκτόνα ήταν διαλυμένα σε ακετονιτρίλιο και πριν την ανίχνευση τους στη HPLC αραιώνονταν κατά 50% με απεσταγμένο νερό. Μετά το πέρας της διάρκειας ανάλυσης (20 λεπτά) λαμβάνονταν το χρωματογράφημα, που στη περίπτωση μίγματος των τεσσάρων δραστικών ουσιών ήταν της μορφής που παρουσιάζεται στην Εικόνα 0.15. Από το χρωματογράφημα και με την βοήθεια του προγράμματος MS Workstation 6.9.1 γινόταν η ποσοτική αποτίμηση των αποτελεσμάτων με βάση τη μέση τιμή του εμβαδού της κορυφής της προσδιοριζόμενης δραστικής ουσίας.



Εικόνα 0.15: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα μίγματος των τεσσάρων δραστικών ουσιών, όπου 1 το metribuzin (χρόνος έκλουσης RT = 6,7 min), 2 το tribenuron methyl (RT = 9,6 min), 3 το terbutylazine (RT = 11,8 min) και 4 το tritosulfuron (RT = 16,8 min).

Αποτελέσματα HPLC

Για τον έλεγχο της ανάκτησης των δραστικών ουσιών μετά την παραλαβή από τις στήλες καθαρισμού εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), ανιχνεύτηκε με την HPLC η συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος 50 μM όλων των δραστικών ουσιών πριν και μετά την εκχύλιση. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής παρουσιάζονται στον Πίνακα 0.4. Όπως γίνεται φανερό από τα αποτελέσματα αυτά, έγινε πλήρης ανάκτηση της συγκέντρωσης και των τεσσάρων δραστικών ουσιών μετά την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE).

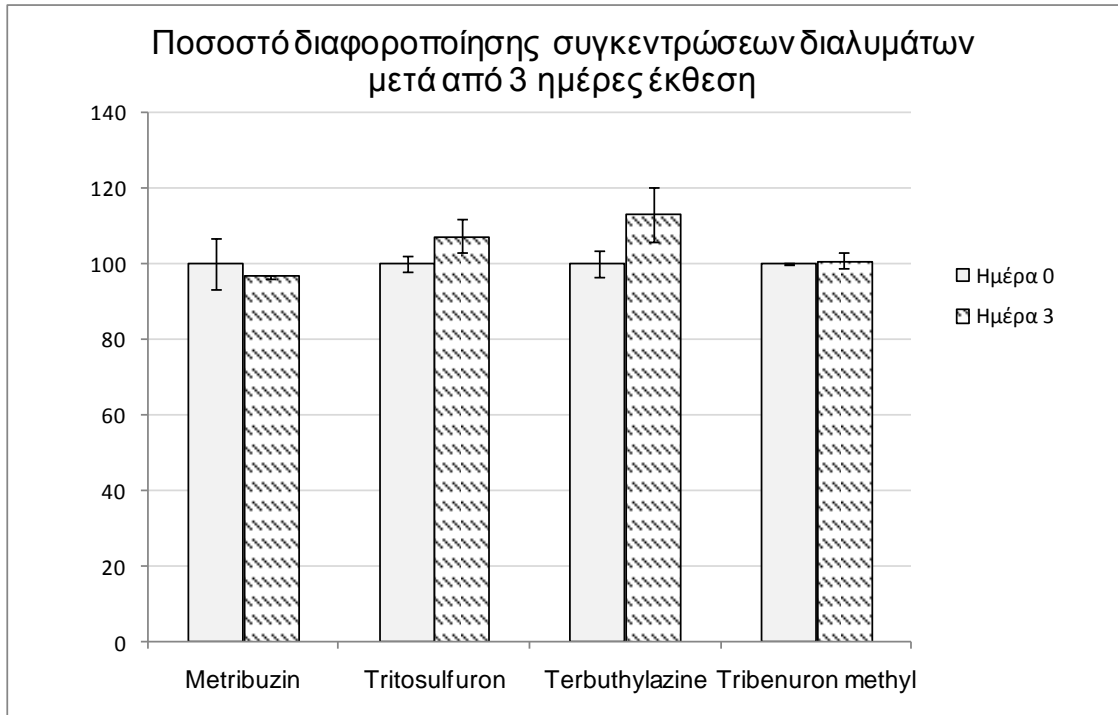
Στο Γράφημα 0.2 παρουσιάζεται το ποσοστό διαφοροποίησης των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων των τεσσάρων δραστικών ουσιών μετά από 3 ημέρες έκθεσης στις συνθήκες πειραματισμού (24h φως $\sim 110 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, $T = 24-25 \text{ }^\circ\text{C}$). Από το γράφημα αυτό διακρίνεται ότι οι συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών δεν άλλαξαν στα διαλύματα αυτά. Δεν υπήρξε δηλαδή υποβάθμιση των δραστικών ουσιών λόγω του φωτός (φωτόλυση) ή λόγω υδρόλυσης, που αποτελούν και τους βασικούς αβιοτικούς μηχανισμούς διάσπασης ουσιών σε υδάτινα διαλύματα (Farran & Ruiz, 2004). Κατά συνέπεια στον πειραματισμό για τον καθορισμό της τοξικότητας των ζιζανιοκτόνων στην *L.minor*, τα φυτά εκτίθενται στην προκαθορισμένη συγκέντρωση καθ' όλη την διάρκεια του πειραματισμού.

Πίνακας 0.4: Το ποσοστό ανάκτησης και η τυπική απόκλιση μετά από εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) διαλυμάτων 50 μM των τεσσάρων ζιζανιοκτόνων.

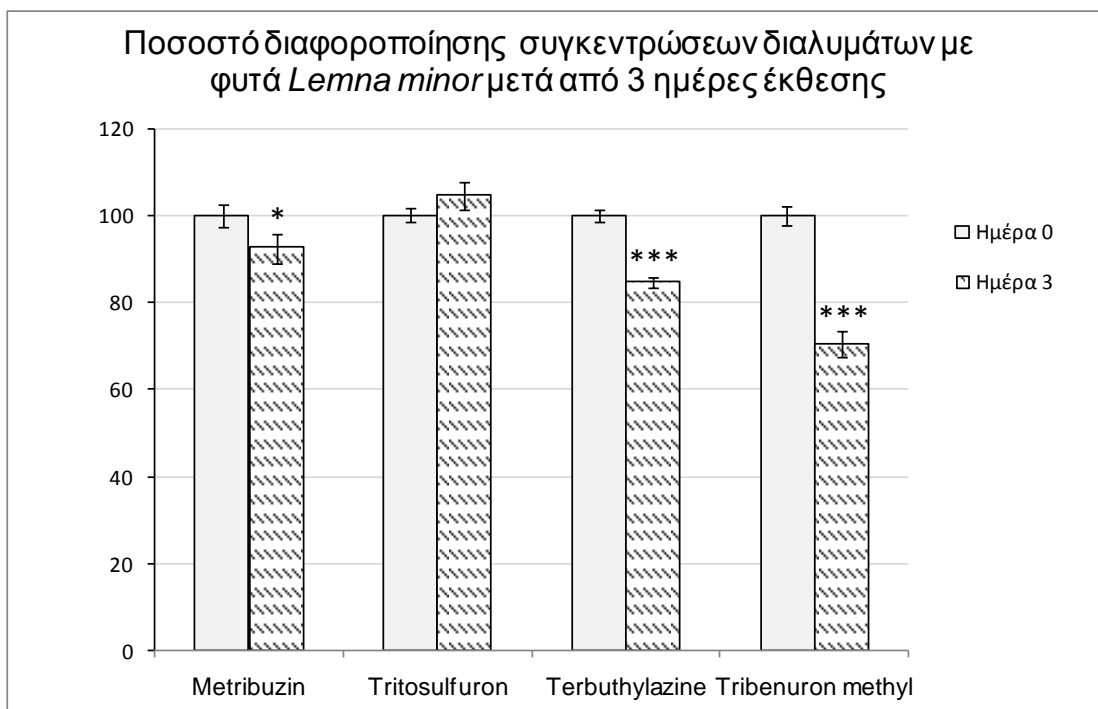
Δραστική ουσία	Ποσοστό ανάκτησης	Τυπική απόκλιση
Metribuzin	107,08	3,56
Terbutylazine	98,04	0,29
Tritosulfuron	111,52	0,05
Tribenuron methyl	99,99	1,83

Η παρουσία των φυτών της *L.minor* στα διαλύματα των δραστικών, όμως, μείωσε, στο διάστημα των τριών ημερών, στατιστικά σημαντικά τις συγκεντρώσεις των τριών από τα τέσσερα ζιζανιοκτόνα (Γράφημα 0.3). Συγκεκριμένα, το metribuzin ήταν μειωμένο την ημέρα 3 σε σχέση με την ημέρα 0 κατά 7,5% (t test $p = 0,0359$), το terbutylazine κατά 15,3% (t test $p = 0,0001$) και το tribenuron methyl κατά 29,6% (t test $p = 0,0002$), ενώ το tritosulfuron δεν παρουσίασε διαφορά μεταξύ των ημερών 0 και 3 (t test $p = 0,0936$).

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των Γραφημάτων 0.2 και 0.3 συμπεραίνεται ότι τα φυτά της *L.minor* συνετέλεσαν στην μείωση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων τριών δραστικών ουσιών στο χρονικό διάστημα τριών ημερών. Η ακριβής ποσότητα που προσλήφθηκε από τα φυτά δεν είναι γνωστή. Έγινε, όμως, προσπάθεια ανίχνευσης των ζιζανιοκτόνων και μέσα στον φυτικό ιστό αλλά δεν ήταν επιτυχής καθώς οι κορυφές που παρελήφθησαν ήταν στο επίπεδο του ορίου ανίχνευσης της HPLC. Κατά συνέπεια για την ανίχνευση αυτή απαιτείται υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (LC-MS) καθώς αυτή έχει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης από την HPLC με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector).



Γράφημα 0.2: Ποσοστό διαφοροποίησης των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων των 4^{ων} δραστικών ουσιών μετά από 3 ημέρες έκθεσης στις συνθήκες πειραματισμού (24h φως ~110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, T = 24-25 °C)



Γράφημα 0.3: Ποσοστό διαφοροποίησης των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων των 4^{ων} δραστικών ουσιών μετά από 3 ημέρες έκθεσης στις συνθήκες πειραματισμού (24h φως ~110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, T = 24-25 °C) υπό την παρουσία φυτών *L.minor*.

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Εισαγωγή

Η εκτεταμένη χρήση των φ.π. έχει δημιουργήσει την ανάγκη ελέγχου της τοξικότητας τους, τόσο όσο αφορά στη δράση τους όταν αυτά βρίσκονται μόνα τους όσο και στη δράση τους όταν βρίσκονται σε μίγματα με άλλα φ.π. Αυτό, έχει οδηγήσει στην δημιουργία Ευρωπαϊκού νομοθετικού πλαισίου για τις παραπάνω περιπτώσεις. Παράλληλα έχει δημιουργηθεί μεγάλος αριθμός από πρωτόκολλα τοξικολογικών δοκιμών, πλήθος από τα οποία συμπεριλαμβάνουν την χρήση του υδροχαρούς φυτού βιοδείκτη *L.minor*. (βλ. Εισαγωγή υποκεφ. Οικοτοξικολογία, βασικές έννοιες και ορισμοί υποκεφ. Οι βιοδείκτες *Lemna spp.*). Στο πλαίσιο αυτό έχουν δημιουργηθεί μαθηματικά μοντέλα για την περιγραφή της σχέσης δόσης–απόκρισης και της **τοξικότητας μιγμάτων/συνδυασμένης τοξικότητας**.

1.1.1 **Ευρωπαϊκή νομοθεσία σχετικά με την τοξικότητα μεμονωμένων χημικών ουσιών και μιγμάτων**

Η προστασία του ανθρώπου και του περιβάλλοντος από τις δυσμενείς επιπτώσεις των χημικών ενώσεων γενικότερα, αλλά και των φ.π. ειδικότερα, αποτελεί μέλημα της Ε.Ε. και πραγματοποιείται μέσω της ευρωπαϊκής νομοθεσίας. Στο πλαίσιο των κανονισμών και των οδηγιών της Ε.Ε. εξετάζονταν ενδελεχώς οι κίνδυνοι από την έκθεση σε μεμονωμένες χημικές ουσίες. Η τοξικότητα μιγμάτων όμως, δεν είχε αρχικά συμπεριληφθεί στο νομοθετικό ευρωπαϊκό πλαίσιο. Από το 2009, οπότε και εκφράστηκαν ανησυχίες για τις επιπτώσεις της, έχει γίνει προσπάθεια για να αρχίσει να τροποποιείται η ευρωπαϊκή νομοθεσία έτσι ώστε να λαμβάνονται υπόψη και οι κίνδυνοι από την έκθεση σε μίγματα χημικών ενώσεων (EC, 2009).

Σήμερα, πολλοί κανονισμοί της ευρωπαϊκής νομοθεσίας εντάσσουν την τοξικότητα από μεμονωμένες χημικές ενώσεις αλλά και μίγματα χημικών ενώσεων. Οι ενώσεις και τα μίγματα αυτά μπορούν να είναι είτε εσκεμμένα (EC, 2012) ή τυχαία (Kienzler et al., 2014). Όσο αφορά στη σύσταση εσκεμμένων μειγμάτων, αυτή είναι επακριβώς γνωστή και οι εκτιμήσεις της τοξικότητάς τους βασίζονται στις ιδιότητες των μεμονωμένων δραστικών ουσιών, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις διεξάγονται και δοκιμές για ολόκληρο το προϊόν (EC, 2012). Παράδειγματα νομοθεσίας τέτοιων εσκεμμένων μιγμάτων αποτελούν ο κανονισμός REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) και οι κανόνες έγκρισης φ.π. (κανονισμός ΕΚ αριθ.

1107/2009, 283/2013 και 284/2013), και βιοκτόνων (κανονισμός ΕΚ αριθ 528/2012) καθώς αυτά είναι μίγματα αποτελούμενα από μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες (Kienzler et al., 2014).

Αντίθετα, η εκτίμηση του κινδύνου από τα τυχαία μίγματα αποτελεί μεγαλύτερη πρόκληση γιατί έχουν ποικίλη και συχνά πολύπλοκη σύνθεση ενώ σε πολλές περιπτώσεις δεν υπάρχουν τοξικολογικά δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα όσο αφορά τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις στα υδάτινα οικοσυστήματα, η ευρωπαϊκή νομοθεσία για τα τυχαία μίγματα περιλαμβάνει την οδηγία πλαίσιο για τα νερά (2006/60/ΕΚ), και την σχετική επίσης οδηγία πλαίσιο για τα υπόγεια ύδατα (2006/118/ΕΚ). Και οι δύο όμως, εστιάζουν σε περιορισμένες εκτιμήσεις που αφορούν σε μεμονωμένες χημικές ενώσεις και δεν θέτουν το ζήτημα των μιγμάτων ή της συνολικής έκθεσης. Ωστόσο, γίνεται αναφορά στα πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος (ΠΠΠ/ΕQS) (οδηγία πλαίσιο 2013/39/ΕΚ) στα οποία τίθεται το θέμα της συνδυασμένης τοξικότητας. Ακόμα, η οδηγία πλαίσιο για τα πόσιμα νερά (98/83/ΕΚ) ορίζει τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα ρύπων σε αυτά και περιλαμβάνει λίστες με μεμονωμένες χημικές ενώσεις αλλά χωρίς να γίνεται αναφορά στο θέμα της συνδυασμένης τοξικότητας (Kienzler et al., 2014).

Καθώς οι προκλήσεις γύρω από την συνδυασμένη τοξικότητα είναι μεγάλες και η νομοθεσία δεν έχει ακόμα εναρμονιστεί πλήρως με αυτές, έχει προκύψει η ανάγκη για την συλλογή πληροφοριών σχετικά με το θέμα. Για το σκοπό αυτό η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει ζητήσει από φορείς και ειδικούς επιστήμονες την συμβολή τους με την διενέργεια σχετικών επιστημονικών μελετών. Δύο βασικές τέτοιες μελέτες είναι: α) των Kortenkamp et al. (2009) με τίτλο «State of the art report on mixture toxicity» και β) των επιτροπών SCHER, SCENIHR και SCCS (2012) με τίτλο «Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures». Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών χρησιμοποιούνται για την λήψη αποφάσεων σε επίπεδο νομοθεσίας αλλά και για την θέσπιση των νέων στόχων σχετικών με το θέμα. Εκτός όμως από την Ε.Ε. οι προκλήσεις αυτές αντιμετωπίζονται παγκοσμίως. Συγκεκριμένα οι ΗΠΑ έχουν πολύ μεγαλύτερη παράδοση σε επίπεδο νομοθεσίας και κανονισμών σχετικών με την αντιμετώπιση του κινδύνου των μιγμάτων. Η υπηρεσία προστασίας περιβάλλοντος των ΗΠΑ (USEPA) έχει δημιουργήσει πολλές οδηγίες στις οποίες περιγράφει μεθόδους εκτίμησης της τοξικότητας μιγμάτων (Syberg et al., 2009).

Η εκτίμηση της τοξικότητας μιγμάτων γίνεται είτε με τοξικολογικές δοκιμές του προϊόντος-μίγματος (εσκεμμένα μίγματα) ή με τοξικολογικές δοκιμές μεμονωμένων

χημικών ενώσεων σε συνδυασμό με μαθηματική μοντελοποίηση για την πρόβλεψη της συνδυασμένης τοξικότητας (βλ. υποκεφ. 1.1.4). Παρόλο λοιπόν που έχουν αναπτυχθεί μαθηματικά μοντέλα και προσεγγίσεις για την εκτίμηση της τοξικότητας των μιγμάτων, η εφαρμογή τους ως μέθοδοι ρουτίνας είναι περιορισμένη (Kienzler et al., 2014).

Γενικότερα, πολλοί κανονισμοί της Ευρωπαϊκής νομοθεσίας βοηθούν στην προστασία του ανθρώπου και του περιβάλλοντος από τις δυσμενείς επιπτώσεις των χημικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των φ.π., καθώς και μιγμάτων τους. Σε αρκετές περιπτώσεις, όμως, δεν είναι ακόμα σαφές πως θα μελετηθεί η τοξικότητα μιγμάτων και ποιοι κανόνες θα θεσπιστούν γύρω από αυτή, καθώς είναι λίγες οι περιπτώσεις που λαμβάνεται αναλυτικά υπόψη η έκθεση σε μίγματα. Ακόμα όμως και σε αυτές τις τελευταίες περιπτώσεις, η εκτίμηση πολύ συχνά περιορίζεται σε συγκεκριμένα γνωστά συστατικά (Kienzler et al., 2014). Για τον λόγο αυτό θα ήταν χρήσιμο να αξιοποιηθεί η εμπειρία από τους κανονισμούς των ΗΠΑ ώστε η προσέγγιση της ευρωπαϊκής νομοθεσίας στα θέματα της τοξικότητας μιγμάτων να γίνει πιο ολιστική (Syberg et al., 2009).

1.1.2 Σχέση δόσης – απόκρισης

Μία από τις πλέον τυποποιημένες βιοδοκιμές για την εκτίμηση της τοξικότητας ξενοβιοτικών παραγόντων είναι η βιοδοκιμή της *Lemna* ή αλλιώς βιοδοκιμή της «φακής του νερού» (Michel et al., 2004, Lewis, 1995, OECD, 2006, EPA, 2012). Στόχος των βιοδοκιμών αυτών είναι η μελέτη της σχέσης δόσης-απόκρισης (dose-response). Μελετάται δηλαδή η σχέση της ανάπτυξης ειδών *Lemna sp.* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ξενοβιοτικού παράγοντα.

Η σχέση δόσης-απόκρισης είναι σιγμοειδούς μορφής και περιγράφεται από την λογιστική Εξίσωση 1.1:

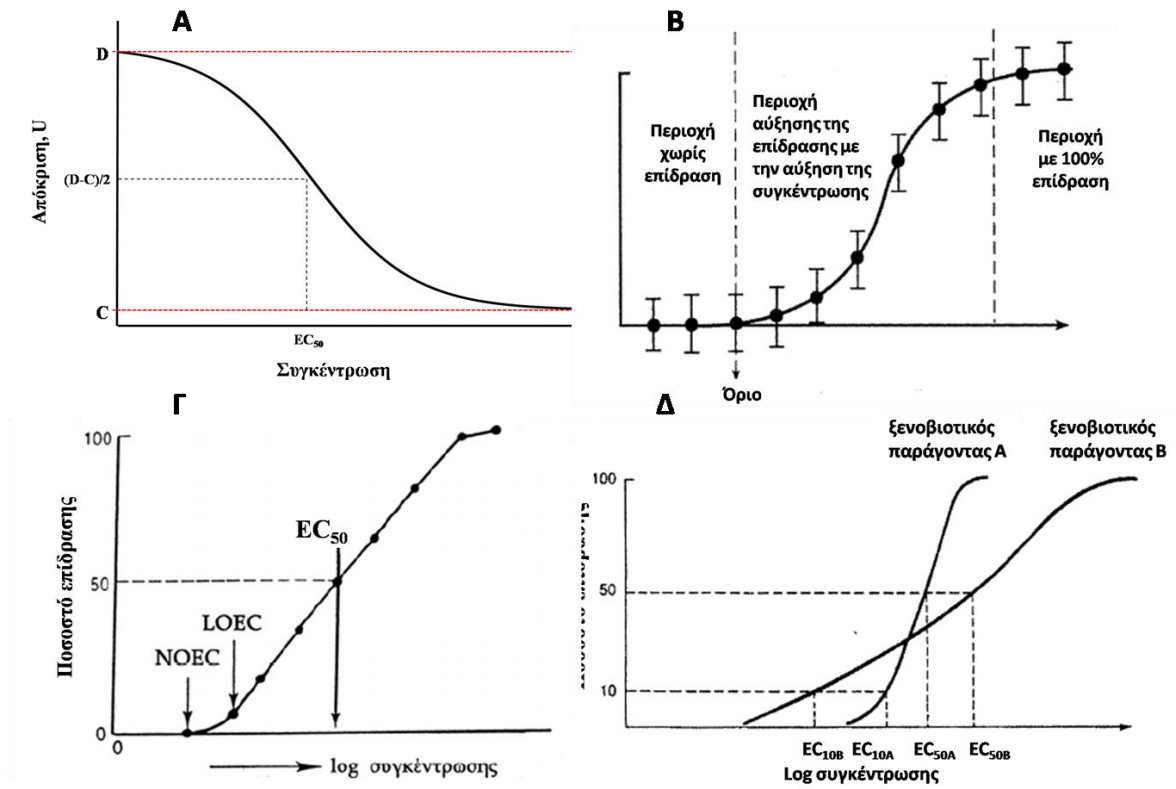
$$\text{Εξίσωση 1.1: } U = C + \frac{D-C}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^b} = C + \frac{D-C}{1 + \exp\{b[\ln(x) - \ln(EC_{50})]\}}$$

όπου U είναι η μετρούμενη απόκριση στην συγκέντρωση x , C είναι το κάτω όριο της απόκρισης στη μέγιστη δυνατή-«άπειρη» συγκέντρωση, D είναι το άνω όριο σε μηδενική συγκέντρωση, EC_{50} είναι η συγκέντρωση που δίνει απόκριση στη μέση της διαφοράς $D-C$, και το b καθορίζει την σχετική κλίση της καμπύλης κοντά στο EC_{50} (Γράφημα 1.1A) (Streibig 1988, Cedergreen 2008, Michel et al., 2004). Σε πολλές

περιπτώσεις απεικονίζεται γραφικά η παρεμπόδιση της απόκρισης (Γράφημα 1.1B, Γ, Δ) και όχι η απόκριση, οπότε και η καμπύλη είναι ανεστραμμένη.

Στην λογιστική καμπύλη δόσης-απόκρισης διακρίνονται τρεις περιοχές (Γράφημα 1.1A). Η πρώτη περιοχή απεικονίζει το εύρος των συγκεντρώσεων που δεν έχουν ουσιαστική επίδραση. Η έλλειψη επίδρασης οφείλεται σε έναν βιοχημικό ή φυσιολογικό μηχανισμό, όπως ο μεταβολισμός, που «αντιμετωπίζει» τον ξενοβιοτικό παράγοντα ώστε να μην υπάρχει επίδραση. Η δεύτερη περιοχή αρχίζει από ένα όριο συγκέντρωσης (NOEC), πάνω από το οποίο ο ξενοβιοτικός παράγοντας είναι περισσότερος από αυτόν που μπορεί να «αντιμετωπίσει» ο οργανισμός και έτσι αρχίζει να υπάρχει επίδραση. Η επίδραση αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης και η δεύτερη περιοχή τελειώνει εκεί όπου η συγκέντρωση προκαλεί τη μέγιστη επίδραση. Στην τρίτη περιοχή έχει επιτευχθεί η μέγιστη επίδραση και περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης δεν μπορεί να επιτύχει αύξηση στην επίδραση (Frank & Ottoboni, 2011, Williams et al., 2000).

Μετά το πέρας των βιοδοκιμών για την μελέτη δόσης-απόκρισης συντάσσονται εκθέσεις/αναφορές που εμπεριέχουν πλήθος πληροφοριών. Βασικές πληροφορίες που περιλαμβάνονται στις εκθέσεις αυτές αποτελούν τα NOEC, LOEC και EC₅₀ (Γράφημα 1.1Γ) του ξενοβιοτικού παράγοντα. NOEC (no-observed effect concentration) είναι η μεγαλύτερη συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση, LOEC (lowest observed effect concentration) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίδραση και EC₅₀ είναι η συγκέντρωση που προκαλεί 50% επίδραση. Τα NOEC και LOEC προσδιορίζονται συγκρίνοντας την απόκριση των μεταχειρίσεων που εκτίθενται στον ξενοβιοτικό παράγοντα με την απόκριση του μάρτυρα, έτσι ώστε να προσδιοριστούν οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μέσω του ελέγχου της στατιστικής υπόθεσης (hypothesis testing). Το EC₅₀ προσδιορίζεται με ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης (non linear regression analysis) και προσαρμογής καμπύλης (curve fitting, συγκεκριμένα στην περίπτωση που εξετάζεται της λογιστικής καμπύλης - Εξίσωση 1.1) (Hoffman et al., 2003).



Γράφημα 1.1: Α) Το άνω D και το κάτω C όριο της απόκρισης καθώς και η συγκέντρωση EC_{50} που προκαλεί απόκριση $(D-C)/2$, Β) Οι περιοχές της καμπύλης δόσης απόκρισης, Γ) Γραφική απεικόνιση των σημείων NOEC, LOEC, EC_{50} , Δ) Καμπύλες δόσης απόκρισης με διαφορετικά EC_{50} και διαφορετικά b (σχετική κλίση κοντά στο EC_{50}) (τροποποίηση από Williams et al., 2000, Βαλαβανίδης 2007)

Τα EC_{50} χρησιμοποιούνται πολλές φορές για σύγκριση της τοξικότητας μεταξύ ξενοβιοτικών παραγόντων. Όπως είναι φανερό και από το Γράφημα 1.1 Δ, η χρήση μόνο της τιμής EC_{50} μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα καθώς ενώ ο ξενοβιοτικός παράγοντας Α έχει μικρότερο EC_{50} από τον Β, και άρα θα συμπεράναμε ότι ο Α είναι πιο τοξικός, παρατηρούμε ότι στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν ισχύει αυτό το συμπέρασμα. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική σχετική κλίση (b) που έχουν οι δύο καμπύλες δόσης απόκρισης (Εξίσωση 1.1). Συμπεραίνουμε δηλαδή ότι μόνο το συνολικό σχήμα των καμπυλών δόσης-απόκρισης μπορεί να μας δώσει την πλήρη εικόνα της τοξικότητας των ξενοβιοτικών παραγόντων (Williams et al., 2000).

1.1.3 Παράμετροι ανάπτυξης της *Lemna minor*

Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα βιοδοκιμών που έχουν αναπτυχθεί για τον έλεγχο της τοξικότητας ξενοβιοτικών παραγόντων στόχος είναι, όπως ήδη αναφέρθηκε, η δημιουργία της καμπύλης δόσης-απόκρισης. Η απόκριση μπορεί να μελετηθεί με διάφορες παραμέτρους της ανάπτυξης, όπως π.χ. ο αριθμός ή η επιφάνεια των φυλλιδίων. Η ανάπτυξη στις διάφορες συγκεντρώσεις του ξενοβιοτικού παράγοντα

συγκρίνεται με αυτή του μάρτυρα και με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται το ποσοστό μείωσης της απόδοσης (yield) σε φυλλίδια από την συγκεκριμένη συγκέντρωση. Εκτός όμως από τον αριθμό των φυλλιδίων (και την επιφάνεια) προσδιορίζεται και ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης μ (average specific growth rate), και αντίστοιχα η παρεμπόδιση του (I_r) (OECD, 2006). Αυτός υπολογίζεται σύμφωνα με την Εξίσωση 1.2:

$$\text{Εξίσωση 1.2} \quad \mu_{ij} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

όπου μ_{ij} είναι ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης από την χρονική στιγμή i έως την χρονική στιγμή j , N_j είναι ο αριθμός των φυλλιδίων (ή η επιφάνεια των φυλλιδίων) την χρονική στιγμή j , N_i είναι ο αριθμός των φυλλιδίων (ή η επιφάνεια των φυλλιδίων) την χρονική στιγμή i , και t είναι η χρονική διάρκεια από την στιγμή i έως την j .

Το ποσοστό παρεμπόδισης (I_r) του μέσου ειδικού ρυθμού αύξησης μ , υπολογίζεται σύμφωνα με την Εξίσωση 1.3:

$$\text{Εξίσωση 1.3:} \quad \%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

όπου I_r είναι το ποσοστό παρεμπόδισης του μέσου ρυθμού αύξησης μ , μ_c είναι η μέση τιμή του μ του μάρτυρα και μ_T είναι η μέση τιμή του μ της κάθε μεταχείρισης.

Αντίστοιχα το ποσοστό μείωσης του αριθμού φυλλιδίων (ή της επιφάνειας των φυλλιδίων)/της απόδοσης (yield) σε φυλλίδια (ή επιφάνεια) (I_y) υπολογίζεται σύμφωνα με την Εξίσωση 1.4:

$$\text{Εξίσωση 1.4:} \quad \%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

όπου I_y είναι το ποσοστό μείωσης του αριθμού φυλλιδίων/της απόδοσης (yield), b_c είναι ο τελικός αριθμός φυλλιδίων (ή η τελική επιφάνεια) μείον τον αρχικό αριθμό φυλλιδίων (ή την αρχική επιφάνεια) του μάρτυρα, b_T είναι ο τελικός αριθμός φυλλιδίων (ή η τελική επιφάνεια) μείον τον αρχικό αριθμό φυλλιδίων (ή την αρχική επιφάνεια) της μεταχείρισης.

Στο τέλος των βιοδοκιμών γίνεται εκτίμηση της συγκέντρωσης EC_{50} του μέσου ειδικού ρυθμού αύξησης E_rC_{50} , και της απόδοσης (yield) E_yC_{50} , καθώς και των NOEC και LOEC αντίστοιχα, τόσο με βάση τον αριθμό φυλλιδίων όσο και με βάση την επιφάνεια. Τα E_rC_{50} και E_yC_{50} δεν είναι συγκρίσιμα ενώ τα πρώτα είναι γενικά είναι μεγαλύτερα από τα δεύτερα, λόγω του μαθηματικού τρόπου υπολογισμού τους. Το γεγονός αυτό δεν

πρέπει να εκληφθεί ως διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ του μέσου ειδικού ρυθμού αύξησης και της απόδοσης, αλλά ως μαθηματική διαφορά (OECD, 2006).

1.1.4 Τοξικότητα μιγμάτων

Τα ξενοβιοτικά, όπως ήδη αναφέρθηκε, σπανίως βρίσκονται μόνα τους στο περιβάλλον. Είναι παρόντα ως χημικά μίγματα, που εισέρχονται στο περιβάλλον είτε σκόπιμα, όπως, παραδείγματος χάριν, στην περίπτωση των φυτοφαρμάκων και των λιπασμάτων, είτε ακούσια, μέσω υγειονομικής ταφής, βιομηχανικών εκπομπών κλπ. Ο περιβαλλοντικός κίνδυνος από τις χημικές ουσίες, εντούτοις, αξιολογείται παραδοσιακά μόνο με τον καθορισμό της έκθεσης, της τύχης, και των επιπτώσεων των μεμονωμένων χημικών ουσιών. Τις τελευταίες δεκαετίες, όμως, όλο και περισσότερη προσοχή έχει δοθεί στην έρευνα για τη ρύπανση μιγμάτων, και υπάρχουν ολοένα και αυξανόμενες αποδείξεις για το ότι, στις περισσότερες περιπτώσεις, η συνδυασμένη τοξικότητα των μιγμάτων μπορεί να προβλεφθεί με δύο σχετικά απλές έννοιες, την **προσθετική δράση (Concentration Addition, CA)** και την **ανεξάρτητη δράση (Independent Action, IA)**, οι οποίες εκφράζονται με μαθηματικά μοντέλα (βλ. υποκεφ. 1.1.4.1, 1.1.4.2). Τόσο η CA όσο και η IA είναι βασισμένες στη γνώση της τοξικότητας των μεμονωμένων χημικών ενώσεων και την υπόθεση μη ύπαρξης αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις χημικές ενώσεις των μιγμάτων. Χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά ονόματα για να περιγράψουν τις έννοιες αυτές, στους διάφορους επιστημονικούς κλάδους στους οποίους χρησιμοποιούνται. Οι βασικές αρχές πίσω από τις έννοιες αυτές είναι, παρ' όλ' αυτά, οι ίδιες, ανεξάρτητα από εάν χρησιμοποιούνται για να προβλέψουν την συνδυαστική επίπτωση χημικών ουσιών που διαταράσσουν τις ενδοκρινικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, είτε την αποτελεσματικότητα των μιγμάτων φυτοφαρμάκων για την καταπολέμηση παρασίτων, ή τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις μιγμάτων ρύπων στον αέρα, στο χώμα, και στο νερό. (Cedergreen et al.,2013)

Η προσθετική δράση (CA) και η ανεξάρτητη δράση (IA) αναφέρονται πολύ συχνά και ως προσθετική του Loewe (Loewe additivity) ή ως ανεξαρτησία του Bliss (Bliss independence), καθώς ήταν αυτοί που εισήγαγαν τις έννοιες αυτές τις δεκαετίες του '20 και του '30 αντίστοιχα (Loewe & Muischnek, 1926, Bliss, 1939). Με τη βοήθεια των CA και IA, λοιπόν, γίνεται η πρόβλεψη της επίδρασης μιγμάτων χημικών ουσιών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει για τα μίγματα τα οποία δεν δρουν με τον τρόπο που έχει προβλεφθεί από τα παραπάνω μοντέλα. Όταν η επίδραση των μιγμάτων είναι σε όλους

τους συνδυασμούς μεγαλύτερη από την προβλεπόμενη έχουμε το φαινόμενο του συνεργισμού, ενώ όταν είναι σε όλους τους συνδυασμούς μικρότερη έχουμε αυτό του ανταγωνισμού (Greco et al., 1995). Επιπλέον υπάρχουν δύο ακόμα κατηγορίες απόκλισης, αυτή που ο συνεργισμός ή ο ανταγωνισμός εξαρτάται από αναλογία των δόσεων (concentration-ratio-dependent synergism or antagonism) και αυτή που ο συνεργισμός ή ο ανταγωνισμός εξαρτάται από το επίπεδο των δόσεων (concentration-ratio-dependent synergism or antagonism) (Jonker et al., 2011).

1.1.4.1 Προσθετική Δράση (Concentration Addition, CA)

Η έννοια της προσθετικής δράσης αναπτύχθηκε για την περιγραφή μιγμάτων των οποίων τα συστατικά έχουν το ίδιο ή παρόμοιο τρόπο δράσης, δρουν δηλαδή στο ίδιο βιολογικό μονοπάτι και «στοχεύουν» στο ίδιο μόριο, ενώ παράλληλα δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Οι χημικές ενώσεις που αποτελούν το μίγμα διαφέρουν μόνο ως προς την δραστηριότητά τους και για το λόγο αυτό μπορούν να θεωρηθούν το ένα ως αραίωση του άλλου. Για τον υπολογισμό της συνδυαστικής δράσης σύμφωνα με την προσθετική δράση, υπολογίζεται ο βαθμός της αραίωσης συσχετίζοντας την συγκέντρωση της κάθε χημικής ένωσης στο μίγμα με την τοξικότητα της μεμονωμένης ουσίας, προσθέτοντας τις συγκεντρώσεις και υπολογίζοντας την συνδυαστική δράση από τα χαρακτηριστικά της καμπύλης δόσης-απόκρισης. Για να μπορεί να χαρακτηριστεί προσθετική η δράση πρέπει να ισχύει η παρακάτω μαθηματική έκφραση (Εξίσωση 1.5):

Εξίσωση 1.5:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{x_i}} = 1$$

Όπου c_i είναι η συγκέντρωση του συστατικού i στο μίγμα με n συστατικά που προκαλεί $x\%$ επίδραση. EC_{x_i} είναι η αντίστοιχη συγκέντρωση του συστατικού i που αν ήταν μόνο του θα προκαλούσε την ίδια επίδραση $x\%$ που προκαλεί το μίγμα (πχ. EC_{50} , που προκαλεί 50% επίδραση). Ο λόγος c_i/EC_{x_i} ονομάζεται «τοξική μονάδα» (Toxic Unit, TU) (Cedergreen et al., 2008, Berenbaum, 1989, Faust et al., 2003).

1.1.4.2 Ανεξάρτητη δράση (Independent Action, IA)

Σε αντίθεση με την προσθετική δράση, η ανεξάρτητη δράση θεωρεί ότι τα συστατικά του μίγματος έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης αλλά προκαλούν ίδια επίδραση στον οργανισμό (πχ. θάνατο), ενώ και σε αυτή την περίπτωση υπάρχει η προϋπόθεση της

έλλειψης αλληλεπίδρασης μεταξύ των χημικών ενώσεων που αποτελούν τα συστατικά του μίγματος (Bliss, 1939). Η μαθηματική έκφραση της ανεξάρτητης δράσης δίνεται από την Εξίσωση 1.6:

Εξίσωση 1.6:

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_i))$$

όπου $E(c_{mix})$ είναι η αναμενόμενη επίδραση του μίγματος (σε κλίμακα 0-1/αναλογική επίδραση), n είναι ο αριθμός των συστατικών του μίγματος και $E(c_i)$ είναι η επίδραση που θα προκαλούσε το i συστατικό του μίγματος αν εφαρμόζονταν μόνο του σε συγκέντρωση c_i (σε κλίμακα 0-1/αναλογική επίδραση) (Backhaus et al., 2004).

Στην περίπτωση που υπάρχουν μόνο δύο συστατικά, από την Εξίσωση 1.6 προκύπτει η Εξίσωση 1.7.

Εξίσωση 1.7:
$$E_{c_{1,2}} = E_{c_1} + E_{c_2} - E_{c_1} * E_{c_2}$$

Όπου $E(c_{1,2})$ η επίδραση του μίγματος των συστατικών 1 και 2 (σε κλίμακα 0-1/αναλογική επίδραση), E_{c_1} η επίδραση που θα προκαλούσε το συστατικό 1 αν εφαρμόζονταν μόνο του σε συγκέντρωση c_1 (σε κλίμακα 0-1/αναλογική επίδραση), E_{c_2} η επίδραση που θα προκαλούσε το συστατικό 2 αν εφαρμόζονταν μόνο του σε συγκέντρωση c_2 (σε κλίμακα 0-1/αναλογική επίδραση).

1.1.4.3 Συνεργισμός ή Ανταγωνισμός (Synergism or Antagonism, S/A)

Όπως αναφέραμε ήδη, όταν η επίδραση των μιγμάτων αποκλίνει από την προβλεπόμενη (σύμφωνα με την CA και την IA που αποτελούν τα μοντέλα αναφοράς) και είναι σε όλους τους συνδυασμούς μεγαλύτερη από την προβλεπόμενη έχουμε το φαινόμενο του συνεργισμού, ενώ όταν είναι σε όλους τους συνδυασμούς μικρότερη έχουμε αυτό του ανταγωνισμού (Greco et al., 1995). Η μαθηματική έκφραση του συνεργισμού ή του ανταγωνισμού δίνεται από την Εξίσωση 1.8:

Εξίσωση 1.8:

$$G(z_1, \dots, z_n) = a \prod_{i=1}^n z_i$$

όπου a μια παράμετρος που όταν είναι θετική εκφράζει ανταγωνισμό και όταν είναι αρνητική εκφράζει συνεργισμό (Πίνακας 1.1) και z_i είναι το σχετικό ποσό των τοξικών

μονάδων της κάθε χημικής ένωσης στο μίγμα με n συστατικά, το οποίο υπολογίζεται από την Εξίσωση 1.9:

Εξίσωση 1.9:

$$z_i = \frac{TU_{x_i}}{\sum_{j=1}^n TU_{x_j}}$$

όπου $TU_{x_i} = c_i/EC_{x_i}$ (Jonker et al., 2005).

Στην περίπτωση των δύο συστατικών και για επίδραση 50% από την Εξίσωση 1.8 προκύπτει η Εξίσωση 1.10.

Εξίσωση

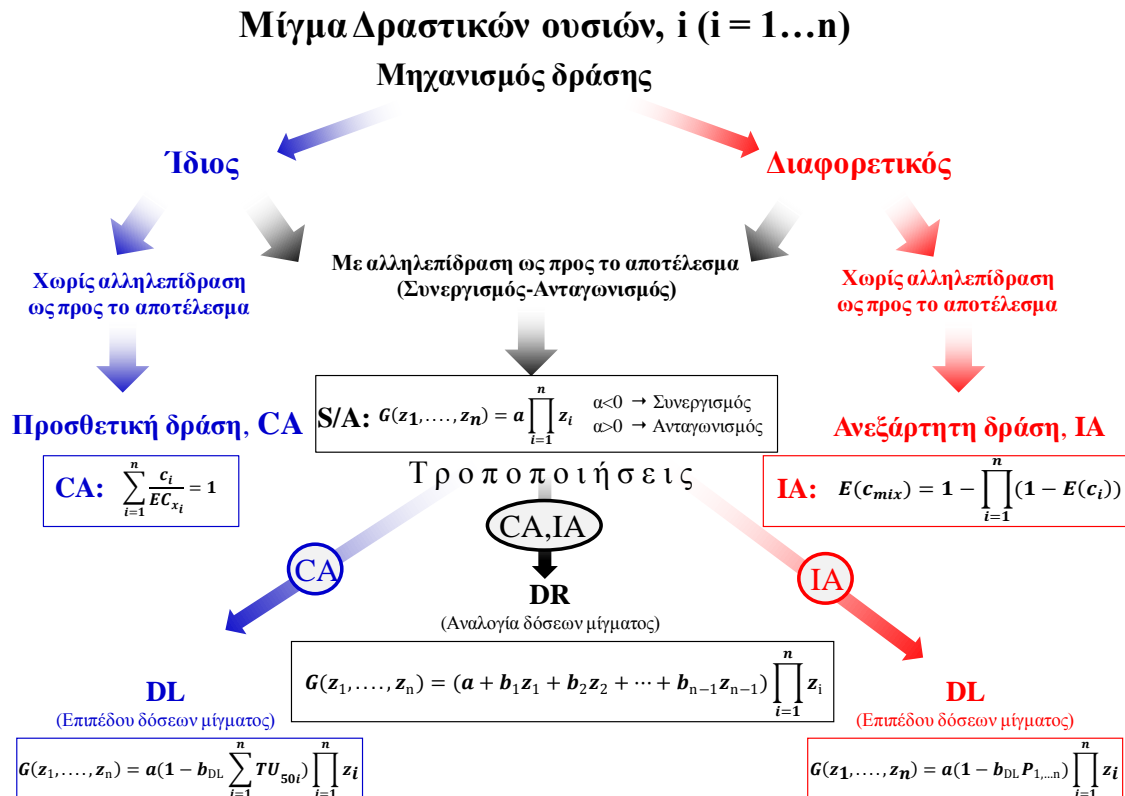
1.10:

$$G(z_1, z_2) = a * z_1 * z_2 = a * \frac{\frac{c_1}{EC_{50,1}} * \frac{c_2}{EC_{50,2}}}{\left(\frac{c_1}{EC_{50,1}} + \frac{c_2}{EC_{50,2}}\right)^2}$$

όπου z_1 το σχετικό ποσό των τοξικών μονάδων της χημικής ένωσης 1 στο μίγμα των ενώσεων 1 και 2, z_2 το σχετικό ποσό των τοξικών μονάδων της χημικής ένωσης 2 στο μίγμα των ενώσεων 1 και 2, c_1 η συγκέντρωση της χημικής ένωσης 1 στο μίγμα των ενώσεων 1 και 2, c_2 η συγκέντρωση της χημικής ένωσης 2 στο μίγμα των ενώσεων 1 και 2, $EC_{50,1}$ η συγκέντρωση της χημικής ένωσης 1 που προκαλεί 50% επίδραση όταν είναι μόνη της, $EC_{50,2}$ η συγκέντρωση της χημικής ένωσης 2 που προκαλεί 50% επίδραση όταν είναι μόνη της.

1.1.4.4 Απόκλιση από τον Συνεργισμό/Ανταγωνισμό S/A

Αν και το μοντέλο Συνεργισμού/Ανταγωνισμού (S/A) -είτε αυτό προέρχεται από CA είτε από IA- χρησιμοποιείται ευρέως σε πλήθος τοξικολογικών μελετών, δεν είναι δυνατόν να καλύψει ικανοποιητικά όλα τα δυνατά αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων των μιγμάτων ως προς το αποτέλεσμα. Για αυτό έχουν αναπτυχθεί τροποποιήσεις του παραπάνω μοντέλου οι οποίες λαμβάνουν υπόψη τις αποκλίσεις του πραγματικού αποτελέσματος των αλληλεπιδράσεων από τις προβλεπόμενες με βάση το μοντέλο (Εικόνα 1.1). Η απόκλιση αυτή μπορεί να καθορίζεται είτε α) από τη σχετική αναλογία των δόσεων των ουσιών στο μίγμα - περίπτωση που αναφέρεται ως απόκλιση εξαρτώμενη από την αναλογία δόσεων (Dose Ratio-dependent deviation), εφεξής μοντέλο DR, είτε β) από το επίπεδο των δόσεων του μίγματος, περίπτωση που αναφέρεται ως απόκλιση εξαρτώμενη από το επίπεδο των δόσεων (Dose Level-dependent deviation), εφεξής μοντέλο DL.



Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση των μαθηματικών μοντέλων που περιγράφουν όλες τις δυνατές επιδράσεις των μιγμάτων.

1.1.4.4.1 Απόκλιση εξαρτώμενη από την αναλογία δόσεων (Dose Ratio, DR)

Στην περίπτωση της απόκλισης που εξαρτάται από την αναλογία δόσεων (DR), ο συnergισμός ή ο ανταγωνισμός εξαρτάται από τη σύσταση του μίγματος. Συγκεκριμένα, για μίγμα δύο ουσιών πχ. ανταγωνισμός μπορεί να παρατηρείται όταν η τοξικότητα προκαλείται κυρίως από την ουσία 1 ενώ συnergισμός μπορεί να παρατηρείται όταν η τοξικότητα προκαλείται κυρίως από την ουσία 2. Η μαθηματική έκφραση της DR δίνεται από την Εξίσωση 1.11 (Εικόνα 1.1) (Jonker et al., 2005):

Εξίσωση 1.11:

$$G(z_1, \dots, z_n) = (a + b_1 z_1 + b_2 z_2 + \dots + b_{n-1} z_{n-1}) \prod_{i=1}^n z_i$$

όπου z_i είναι το σχετικό ποσό των τοξικών μονάδων της κάθε χημικής ένωσης στο μίγμα με n συστατικά (βλ. Εξίσωση 1.9) και a, b_i παράμετροι των οποίων η σημασία εξηγείται στον Πίνακα 1.1. Στην περίπτωση που υπάρχουν μόνο δύο συστατικά, από την Εξίσωση 1.11 προκύπτει η Εξίσωση 1.12:

Εξίσωση 1.12: $G(z_1, z_2) = (a + b_1 z_1) z_1 z_2$

όπου z_1, z_2 είναι το σχετικό ποσό των τοξικών μονάδων των χημικών ενώσεων 1 και 2 αντίστοιχα στο μίγμα τους (βλ. Εξίσωση 1.9) και a, b_1 παράμετροι των οποίων η σημασία εξηγείται στον Πίνακα 1.1.

1.1.4.4.2 Απόκλιση εξαρτώμενη από το επίπεδο των δόσεων (Dose Level, DL)

Στην περίπτωση της απόκλισης που εξαρτάται από το επίπεδο των δόσεων (DL), ο συνεργισμός ή ο ανταγωνισμός εξαρτάται από το επίπεδο (χαμηλό ή υψηλό) των δόσεων (συνολική δόση του μίγματος). Για παράδειγμα ανταγωνισμός μπορεί να παρατηρείται σε χαμηλές επίπεδα δόσεων και συνεργισμός σε υψηλά επίπεδα δόσεων. Η μαθηματική έκφραση της DL για την CA δίνεται από την Εξίσωση 1.13 (Εικόνα 1.1) (Jonker et al., 2005):

Εξίσωση 1.13:

$$G(z_1, \dots, z_n) = a(1 - b_{DL} \sum_{i=1}^n TU_{50i}) \prod_{i=1}^n z_i$$

ενώ για την IA δίνεται από την Εξίσωση 1.14:

Εξίσωση 1.14:

$$G(z_1, \dots, z_n) = a(1 - b_{DL} P_{1,\dots,n}) \prod_{i=1}^n z_i$$

όπου z_i είναι το σχετικό ποσό των τοξικών μονάδων της κάθε χημικής ένωσης στο μίγμα με n συστατικά (βλ. Εξίσωση 1.9), TU οι τοξικές μονάδες, $P_{1,\dots,n}$ η πιθανότητα της απόκρισης στο μίγμα των συστατικών 1 έως n και a, b_L παράμετροι των οποίων η σημασία εξηγείται στον Πίνακα 1.1. Αναλυτικές λεπτομέρειες για το πώς προκύπτουν οι παραπάνω εξισώσεις βρίσκονται στους Jonker et al. (2005).

Πίνακας 1.1: Επεξήγηση των τιμών των παραμέτρων των μοντέλων που εξηγούν τη δράση των μίγματα των οποίων η επίδραση δεν είναι αυτή που έχει προβλεφθεί από τα μοντέλα της CA και IA (τροποποίηση από Jonker et al., 2005).

Παράμετρος	Τιμή		Επεξήγηση
	CA	IA	
Συνεργισμός/Ανταγωνισμός (S/A)			
α	>0	>0	Ανταγωνισμός
	<0	<0	Συνεργισμός
Απόκλιση εξαρτώμενη από την αναλογία δόσεων (DR)			
α	>0	>0	Ανταγωνισμός εκτός από εκείνες τις αναλογίες μιγμάτων όπου σημαντικά αρνητικές τιμές της παραμέτρου b_i δηλώνουν συνεργισμό
	<0	<0	Συνεργισμός εκτός από εκείνες τις αναλογίες μιγμάτων όπου σημαντικά θετικές τιμές της παραμέτρου b_i δηλώνουν ανταγωνισμό
b_i	>0	>0	Ανταγωνισμός όπου η τοξικότητα του μίγματος προκαλείται κυρίως από την τοξική ουσία i
	<0	<0	Συνεργισμός όπου η τοξικότητα του μίγματος προκαλείται κυρίως από την τοξική ουσία i
Απόκλιση εξαρτώμενη από το επίπεδο των δόσεων (DL)			
α	>0	>0	Ανταγωνισμός σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων και συνεργισμός σε υψηλά επίπεδα συγκεντρώσεων
	<0	<0	Συνεργισμός σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων και ανταγωνισμός σε υψηλά επίπεδα συγκεντρώσεων
b_{DL}	>1	>2	Αλλαγή σε επίπεδο χαμηλότερο του EC_{50}
	=1	=2	Αλλαγή στο επίπεδο του EC_{50}
	$0 < b_{DL} < 1$	$1 < b_{DL} < 2$	Αλλαγή σε επίπεδο υψηλότερο του EC_{50}
	<0	<1	Δεν υπάρχει αλλαγή αλλά το μέγεθος του S/A εξαρτάται από το επίπεδο της συγκέντρωσης (CA) ή από το επίπεδο της επίδρασης (IA)

1.2 Σκοπός του κεφαλαίου

Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου ήταν, καταρχήν, η τοξικολογική μελέτη των επιπτώσεων των ζιζανιοκτόνων *terbuthylazine*, *metribuzin*, *tritosulfuron* και *tribenuron methyl* στην ανάπτυξη του φυτού βιοδείκτη *L.minor*. Η διερεύνηση της τοξικότητας του *tritosulfuron*, δε, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς δεν εντοπίστηκε στην επιστημονική βιβλιογραφία καμία δημοσιευμένη εργασία που να πραγματεύεται την τοξικότητά του. Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων προσδιορίστηκαν οι καμπύλες

δόσης απόκρισης μετά από έκθεση στις ανωτέρω δραστικές ουσίες με βάση τα εξής τέσσερα κριτήρια αξιολόγησης-endpoints: αριθμός φυλλιδίων, επιφάνεια φυλλιδίων, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αριθμού φυλλιδίων, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας, ενώ έγινε και σύγκριση μεταξύ των καμπυλών αυτών. Παράλληλα, προσδιορίστηκαν τα NOEC και LOEC σε όλες τις προαναφερθείσες περιπτώσεις. Κατόπιν επιδιώχθηκε η μελέτη της συνδυασμένης τοξικότητας των ζιζανιοκτόνων αυτών ανά δύο καθώς στην διεθνή βιβλιογραφία δεν έχουν βρεθεί μελέτες των επιπτώσεων των συνδυασμών αυτών σε κάποιο οργανισμό. Για την επίτευξη του στόχου αυτού προσδιορίστηκαν τα μοντέλα που περιέγραψαν καλύτερα τα αποτελέσματα της συνδυασμένης τοξικότητας. Ταυτόχρονα, έγινε σύγκριση των δύο βασικών μοντέλων, δηλαδή της προσθετικής CA και της ανεξάρτητης δράσης, IA, όσο αφορά στην αποτελεσματικότητά τους στη πρόβλεψη της τοξικότητας των μιγμάτων.

1.3 Υλικά και μέθοδοι για τις δοκιμές τοξικότητας στη *Lemna minor* των ζιζανιοκτόνων

Οι πειραματικές δοκιμές τοξικότητας των τεσσάρων ζιζανιοκτόνων (terbuthylazine, metribuzin, tritosulfuron, tribenuron methyl), αλλά και των ανά δύο μιγμάτων τους (terbuthylazine και metribuzin, terbuthylazine και tritosulfuron, metribuzin και tritosulfuron, tritosulfuron και tribenuron methyl), στη *L. minor* έγιναν σύμφωνα με το OECD 221 «Πρωτόκολλο οδηγιών για δοκιμές χημικών ουσιών-δοκιμή παρεμπόδισης της ανάπτυξης των ειδών *Lemna sp*» (OECD 221 Guidelines for the testing of chemicals: *Lemna sp*. Growth inhibition test, 2006). Η διάρκεια των δοκιμών ήταν μία εβδομάδα, ενώ έγιναν υπό semi-static συνθήκες. Στις semi-static πειραματικές δοκιμές, το θρεπτικό διάλυμα όλων των συγκεντρώσεων ανανεώνεται τις μέρες 3 και 5 του πειραματισμού. Έτσι εξασφαλίζεται η διατήρηση των συγκεντρώσεων σε σταθερό επίπεδο αλλά και διασφαλίζεται η επάρκεια των θρεπτικών συστατικών. Οι πειραματικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο του εργαστηρίου Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος του ΓΠΑ, υπό συνθήκες συνεχούς φωτισμού (24h φως, λάμπες φθορισμού) έντασης ~110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ και 24-25 °C.

1.3.1 Χημικά που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματισμό

Τα ζιζανιοκτόνα terbuthylazine, metribuzin, tritosulfuron και tribenuron methyl προσφέρθηκαν από τις εταιρίες Sygenda, Bayer, Basf και Du Pont αντίστοιχα, ενώ το διμεθυλοφορμαμίδιο ήταν της εταιρίας Carlo Erba Reagents.

1.3.2 Παρασκευή stock διαλυμάτων ζιζανιοκτόνων για τις δοκιμές τοξικότητας

Σε κάθε νέα τοξικολογική δοκιμή πριν την παρασκευή της μεγαλύτερης χρησιμοποιούμενης συγκέντρωσης των ζιζανιοκτόνων στο θρεπτικό διάλυμα Steinberg, οι δραστικές ουσίες διαλύονταν στον οργανικό διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο (N,N - dimethyl-formamide). Επιλέχθηκε επειδή δεν είναι φυτοτοξικός και δεν ευνοεί την ανάπτυξη βακτηρίων, ενώ η συγκέντρωσή του στο θρεπτικό διάλυμα ήταν 100μl/L, στα επιτρεπτά δηλαδή επίπεδα (EPA 2012, OECD 2006). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση δραστικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκε στον πειραματισμό ήταν, για όλες τις δραστικές ουσίες, μικρότερη από το όριο διαλυτότητας στο νερό. Το ίδιο stock διάλυμα στον οργανικό διαλύτη χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή των συγκεντρώσεων ανανέωσης των διαλυμάτων κατά την διάρκεια του εβδομαδιαίου πειραματισμού, καθώς τα διαλύματα φτιάχνονταν τρεις φορές αφού οι δοκιμές ήταν semi-static.

1.3.3 Διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων των ζιζανιοκτόνων και πρωτόκολλο πειραματισμού

Στις δοκιμές τοξικότητας των τεσσάρων διαφορετικών δραστικών ουσιών χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η κάθε μία από τις έξι αυτές συγκεντρώσεις ήταν η μισή της προηγούμενης συγκέντρωσης, ενώ η επιλογή τους έγινε από προκαταρκτικά πειράματα έτσι ώστε να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη της *L.minor* από ~0% έως ~ 100%.

Σε κωνική φιάλη με 1 L Steinberg medium προστέθηκαν 100 μL από το stock διάλυμα της δραστικής σε διμεθυλοφορμαμίδιο. Η συγκέντρωση του stock είχε επιλεγεί έτσι ώστε τελικά με τη διάλυση 100 μL σε 1 L Steinberg medium να λαμβάνεται η επιθυμητή μεγαλύτερη συγκέντρωση (C1). Σε 5 ποτήρια ζέσεως προστέθηκαν από 40 ml Steinberg medium, και 40 ml από την C1 μεταφέρθηκαν στο ένα ποτήρι ζέσεως, δημιουργώντας την αμέσως μικρότερη συγκέντρωση C2. Από την C2 40 ml μεταφέρθηκαν στο επόμενο ποτήρι ζέσεως δημιουργώντας την C3 κοκ. Έτσι δημιουργήθηκαν 6 συγκεντρώσεις. Σε πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας με 6 βοθρία (6 well plates-Costar) μεταφέρθηκαν τρεις φορές από 10 ml της κάθε συγκέντρωσης, οπότε υπήρχαν 3 επαναλήψεις αυτών στον πειραματισμό (Εικόνα 1.2).

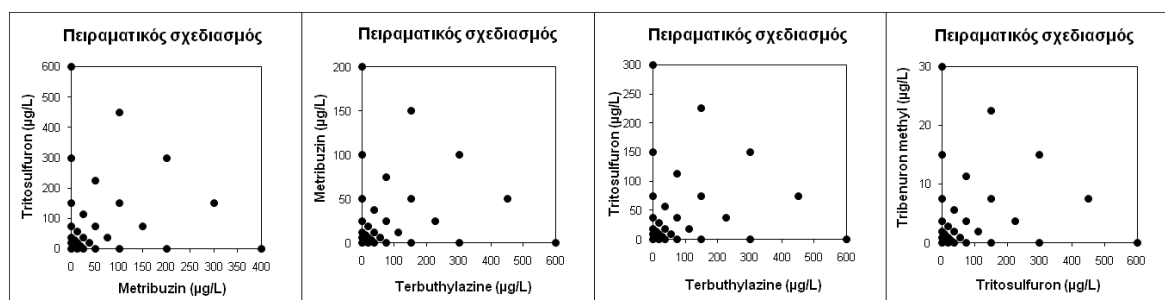
1.3.3.1 Παρασκευή μιγμάτων

Για την δημιουργία των διαλυμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις μιγμάτων των δύο δραστικών ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Στόχος, ήταν η μελέτη των εξής 5

μιγμάτων των εκάστοτε δύο δραστικών ουσιών: 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 και 100:0 (Sorensen et al., 2007). Το πρώτο και το τελευταίο μίγμα ήταν, ουσιαστικά, η κάθε μία από τις δύο δραστικές μόνη της, και η δημιουργία των 6 συγκεντρώσεων αυτών των δύο μιγμάτων περιγράφηκε παραπάνω. Για το μίγμα 25:75, 25 ml από την C1 της μιας δραστικής αναμίχθηκε με 75 ml από την C1 της άλλης δραστικής. Στο μίγμα αυτό έγιναν μετά 5 διαδοχικές αραιώσεις στο μισό όπως περιγράφηκε νωρίτερα. Για το μίγμα 50:50, 50 ml από την C1 της μιας δραστικής αναμίχθηκε με 50 ml από την C1 της άλλης δραστικής. Στο μίγμα αυτό έγιναν μετά 5 διαδοχικές αραιώσεις στο μισό. Για το μίγμα 75:25, 75 ml από την C1 της μιας δραστικής αναμίχθηκε με 25 ml από την C1 της άλλης δραστικής. Στο μίγμα αυτό έγιναν μετά 5 διαδοχικές αραιώσεις στο μισό.

1.3.3.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Στον πειραματισμό με τα 5 μίγματα (0:100, 25:75, 50:50, 75:25 και 100:0) των δύο δραστικών δοκιμάστηκαν τελικά 5 μίγματα*6 συγκεντρώσεις=30 διαφορετικές μεταχειρίσεις. Στις πειραματικές δοκιμές ο αριθμός των επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση ήταν 3 (3*30=90 παρατηρήσεις) και 12 για τους μάρτυρες αντίστοιχα, οπότε υπήρχαν συνολικά 102 παρατηρήσεις. Ο μεγάλος όγκος μεταχειρίσεων οδήγησε στην επιλογή των πλακιδίων κυτταροκαλλιέργειας με 6 βοθρία για την πραγματοποίηση των πειραματικών δοκιμών. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών κατά των πειραματισμό με μίγματα, και στο Γράφημα 1.2 αποτυπώνεται ο πειραματικός σχεδιασμός.



Γράφημα 1.2: Ο πειραματικός σχεδιασμός των τοξικολογικών δοκιμών των συνδυασμών metribuzin-tritosulfuron, terbutylazine- metribuzin, terbutylazine- tritosulfuron και tritosulfuron-tribenuron methyl. Στα γραφήματα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν τόσο στα μίγματα με μία μόνο δραστική (100:0,0:100), όσο και σε αυτά που περιλάμβαναν και τις 2 δραστικές (75:25, 50:50, 25:75). Πίνακας 1.2: Οι συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών (σε µg/l) που χρησιμοποιήθηκαν για τον πειραματισμό με μίγματα.

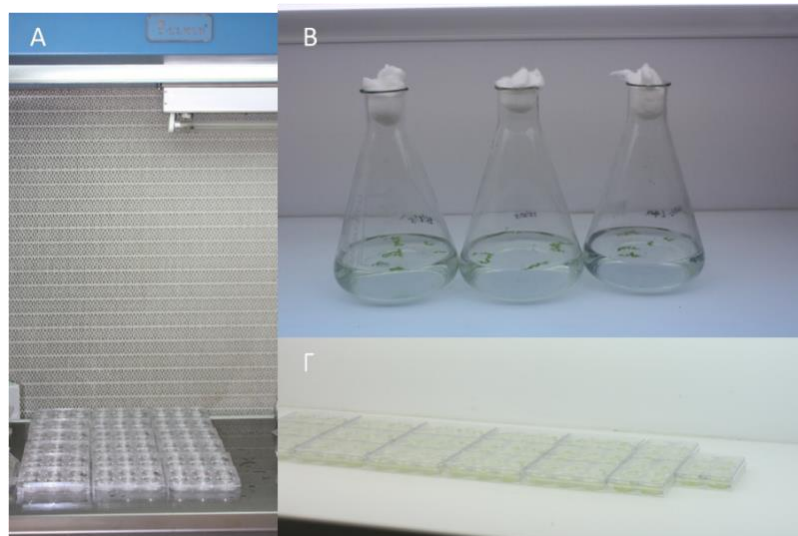
Μίγμα		Terbuthylazine+Metribuzin				
Αναλογία Μίγματος	100:0	0:100	75:25	50:50	25:75	
Συγκεντρώσεις σε μg/l	18,75	6,25	14,0625+1,5625	9,375+3,125	4,6875+4,6875	
	37,5	12,5	28,125+3,125	18,75+6,25	9,375+9,375	
	75	25	56,25+6,25	37,5+12,5	18,75+18,75	
	150	50	112,5+12,5	75+25	37,5+37,5	
	300	100	225+25	150+50	75+75	
	600	200	450+50	300+100	150+150	

Μίγμα		Tritosulfuron+Tribenuron methyl				
Αναλογία Μίγματος	100:0	0:100	75:25	50:50	25:75	
Συγκεντρώσεις σε μg/l	18,75	0,9375	14,0625+0,234375	9,375+ 0,46875	4,6875+0,70313	
	37,5	1,875	28,125+0,46875	18,75+0,9375	9,375+1,40625	
	75	3,75	56,25+0,9375	37,5+1,875	18,75+2,8125	
	150	7,5	112,5+1,875	75+3,75	37,5+5,625	
	300	15	225+3,75	150+7,5	75+11,25	
	600	30	450+7,5	300+15	150+22,5	

Μίγμα		Terbuthylazine+Tritosulfuron				
Αναλογία Μίγματος	100:0	0:100	75:25	50:50	25:75	
Συγκεντρώσεις σε μg/l	18,75	9,375	14,0625+2,34375	9,375+4,6875	4,6875+7,03125	
	37,5	18,75	28,125+4,6875	18,75+9,375	9,375+14,0625	
	75	37,5	56,25+9,375	37,5+18,75	18,75+28,125	
	150	75	112,5+18,75	75+37,5	37,5+56,75	
	300	150	225+37,5	150+75	75+112,5	
	600	300	450+75	300+150	150+225	

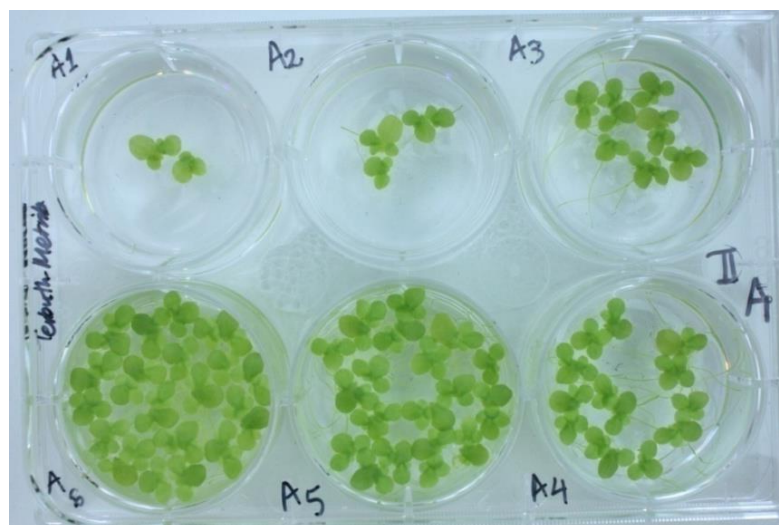
Μίγμα		Metribuzin+Tritosulfuron				
Αναλογία Μίγματος	100:0	0:100	75:25	50:50	25:75	
Συγκεντρώσεις σε μg/l	12,5	18,75	9,375+4,6875	6,25+9,375	3,125+14,0625	
	25	37,5	18,75+9,375	12,5+18,75	6,25+28,125	
	50	75	37,5+18,75	25+37,5	12,5+56,25	
	100	150	75+37,5	50+75	25+112,5	
	200	300	150+75	100+150	50+225	
	400	600	300+150	200+300	100+450	

Σε κάθε μεταχείριση (1 βοθρίο) την πρώτη μέρα της πειραματικής δοκιμής (day 0), μεταφέρονταν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο ρεύματος αέρα στρωτής ροής, ένα φυτό *L.minor* με 4 φυλλίδια από την καλλιέργεια. Στη συνέχεια όλα τα πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας τοποθετούνταν στον χώρο πειραματισμού. (Εικόνα 1.2)



Εικόνα 1.2 Α) Τα πλακίδια μέσα στον θάλαμο ρεύματος αέρα στρωτής ροής Β) Η καλλιέργεια της *Lemna minor*. Γ) Η πειραματική δοκιμή στον ειδικά διαμορφωμένο χώρο του εργαστηρίου.

Καθημερινά, από την day 0 μέχρι και την day 7 του πειράματος τα πλακίδια φωτογραφίζονταν (Εικόνα 1.3). Η ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Canon EOS 450D), τοποθετούνταν σε ειδική βάση η οποία επέτρεπε να γίνεται φωτογράφιση των πλακιδίων από συγκεκριμένη σταθερή απόσταση. Με την χρήση των φωτογραφιών υπολογίστηκαν οι παράμετροι ανάπτυξης. Η βασική παράμετρος που μετρήθηκε για τον υπολογισμό της ανάπτυξης των φυτών της *L.minor* ήταν ο αριθμός φυλλιδίων. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο πειραματισμού είναι απαραίτητη και η μέτρηση μιας δεύτερης παραμέτρου (πχ. ολική επιφάνεια φυλλιδίων, νωπό και ξηρό βάρος) καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις ορισμένες ουσίες ενδέχεται να παρεμποδίζουν κάποια άλλη παράμετρο ανάπτυξης και όχι τον αριθμό φυλλιδίων. Ως δεύτερη παράμετρος επιλέχθηκε η ολική επιφάνεια, διότι δεν καταστρέφει τα φυτά και μπορεί να μετράται καθημερινά.



Εικόνα 1.3: Πλακίδιο με 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις την τελευταία μέρα του πειραματισμού.

Σύμφωνα με το ακολουθούμενο πρωτόκολλο OECD 221 (2006), για να είναι έγκυρη η πειραματική δοκιμή θα πρέπει ο χρόνος διπλασιασμού (doubling time, T_d) του αριθμού φυλλιδίων του μάρτυρα να είναι μικρότερος από 2,5 μέρες. Ο χρόνος διπλασιασμού T_d υπολογίζεται σύμφωνα με την Εξίσωση 1.15:

$$\text{Εξίσωση 1.15:} \quad T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

όπου μ ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης του μάρτυρα.

1.3.4 Στατιστική επεξεργασία και λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε

Οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια των πακέτων λογισμικού ανάλυσης εικόνας Image-ProPlus (version 4.5.0.29) και ImageJ (1.46r). Με το πρώτο έγινε η μέτρηση του αριθμού φυλλιδίων και με το δεύτερο ο υπολογισμός της επιφάνειας (σε mm^2) των φυτών σε κάθε μεταχείριση.

Η λογιστική καμπύλη η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων, από τις δοκιμές με τις μεμονωμένες δραστικές ουσίες, είναι η πιο απλή μορφή της Εξίσωση 1.1, στην οποία δεν υπάρχει κάτω όριο (C), καθώς αυτό θεωρείται μηδέν. Συγκεκριμένα λοιπόν η λογιστική καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται από την Εξίσωση 1.16:

$$\text{Εξίσωση 1.16:} \quad U = \frac{\max}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^b} = \frac{\max}{1 + \exp\{b[\ln(x) - \ln(EC_{50})]\}}$$

όπου U είναι η μετρούμενη απόκριση στην συγκέντρωση x , \max είναι το άνω όριο σε μηδενική συγκέντρωση, EC_{50} είναι η συγκέντρωση που δίνει 50% απόκριση και b καθορίζει την σχετική κλίση της καμπύλης κοντά στο EC_{50} (Sorensen et al., 2007).

Ο υπολογισμός των EC_{50} έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού πρόγραμμα GraphPad prism 5 με ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης (non linear regression analysis) και προσαρμογή της λογιστικής καμπύλης (Εξίσωση 1.16) (curve fitting). Ο προσδιορισμός των NOEC και LOEC έγινε μετά από ανάλυση διασποράς (ANOVA) και εφαρμογή της post-hoc δοκιμασίας Dunnett, με το στατιστικό πρόγραμμα JMP version 10 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

Η ανάλυση των δεδομένων για τα μίγματα των ζιζανιοκτόνων σύμφωνα με τα προαναφερθέντα μοντέλα (CA, IA, S/A, DR, DL), έγινε σύμφωνα με την μέθοδο των Jonker et al. (2005), με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου Mixtox model που

παρείχαν οι συγγραφείς στην ιστοσελίδα <http://www.ceh.ac.uk/sections/er/csvendsen.html>. Πιο συγκεκριμένα, έγινε σύγκριση των πειραματικών δεδομένων με τα αναμενόμενα σύμφωνα με τα μοντέλα της προσθετικής δράσης (CA) όσο και της ανεξάρτητης δράσης (IA). Στη συνέχεια έγινε επέκταση των μοντέλων της CA και IA με τα προαναφερθέντα μοντέλα του συνεργισμού ή ανταγωνισμού (S/A), της απόκλισης που εξαρτάται από την αναλογία της δόσης (DR), και της απόκλισης που εξαρτάται από το επίπεδο της δόσης (DL). Η προσαρμογή των δεδομένων στα παραπάνω μοντέλα έγινε με ελαχιστοποίηση του αθροίσματος των τετραγώνων των αποκλίσεων (sum of squared residuals, SS).

Όσο αφορά την σύγκριση μεταξύ των μοντέλων, οι επιπλέον παράμετροι που απαιτούνται για τα τροποποιημένα μοντέλα δημιουργούν ένα ένθετο (nested) πλαίσιο. Καθώς τα μοντέλα είναι ένθετα (nested models), η προσαρμογή σε αυτά μπορεί να συγκριθεί στατιστικά με τη δοκιμασία λόγου πιθανοφάνειας (likelihood ratio test) (Neter et al, 1996). Η υπόθεση στις συγκρίσεις που έγιναν ήταν ότι το πιο πολύπλοκο μοντέλο (S/A, DR ή DL) θα μπορούσε να περιοριστεί σε ένα απλούστερο μοντέλο (DR και DL στο S/A ή στο CA/IA και το S/A ή στο CA/IA). Το επίπεδο σημαντικότητας ήταν το 0,05, οπότε σε περιπτώσεις που το $p > 0,05$ το πιο πολύπλοκο μοντέλο δεν περιέγραφε τα δεδομένα σημαντικά καλύτερα από το απλούστερο μοντέλο, οπότε και επιλέγονταν το απλούστερο μοντέλο.

Η σύγκριση μοντέλων που δεν ήταν ένθετα, όπως της CA και της IA ή DR και DL έγινε με το κριτήριο Akaike Information Criteria (AIC) (Motulsky & Christopoulos, 2004). Η τιμή του κριτηρίου AIC για το κάθε μοντέλο προέρχεται από την Εξίσωση 1.17:

$$\text{Εξίσωση 1.17: } AIC = N \cdot \ln\left(\frac{SS}{N}\right) + 2p$$

όπου N είναι ο αριθμός των παρατηρήσεων, SS είναι το άθροισμα τετραγώνων των αποκλίσεων του μοντέλου και p ο αριθμός των παραμέτρων του μοντέλου. Αν A είναι το απλούστερο μοντέλο και B είναι το πιο πολύπλοκο μοντέλο, η διαφορά στην τιμή AIC των δύο μοντέλων δίνεται από την Εξίσωση 1.18:

$$\text{Εξίσωση 1.18: } \Delta AIC = N \cdot \ln\left(\frac{SS_B}{SS_A}\right) + 2(p_B - p_A)$$

Αν η διαφορά ΔAIC είναι αρνητική τότε γίνεται αποδεκτό το πιο πολύπλοκο μοντέλο, ενώ αν η τιμή ΔAIC είναι θετική τότε γίνεται αποδεκτό το απλούστερο μοντέλο. Επιλέγουμε δηλαδή, το μοντέλο με την μικρότερη τιμή AIC. Στην περίπτωσης της

σύγκρισης των μοντέλων που αναφέραμε οι τιμές N και p είναι ίδιες, με αποτέλεσμα η τιμή AIC να εξαρτάται μόνο από το SS. Συνεπώς, το μοντέλο με την καλύτερη προσαρμογή είναι αυτό με το μικρότερο SS.

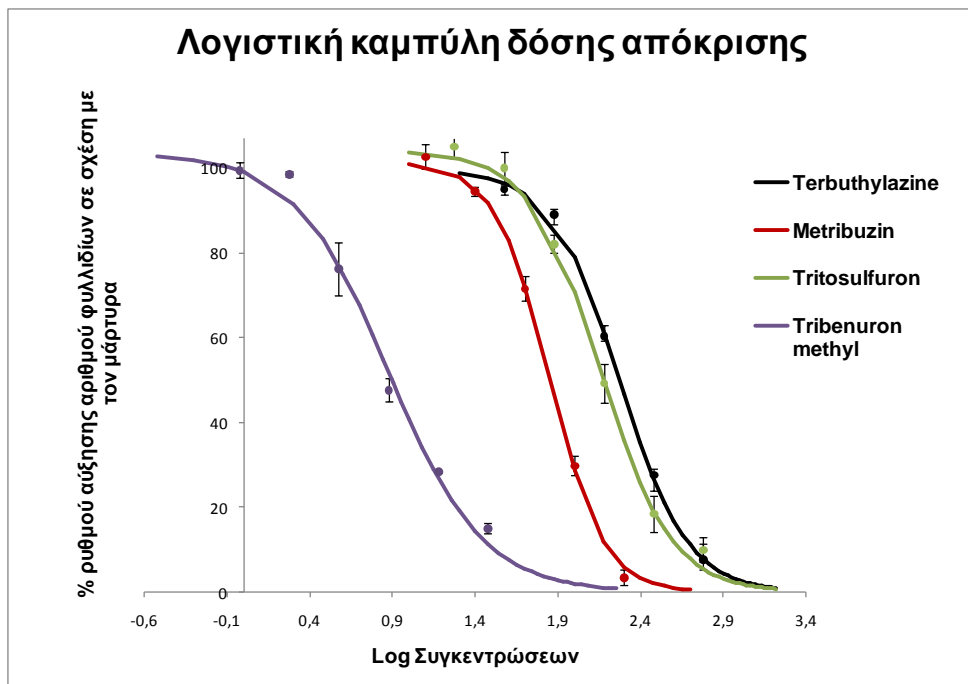
1.4 Αποτελέσματα δοκιμών δόσης-απόκρισης

Τα αποτελέσματα των τοξικολογικών δοκιμών των τεσσάρων ζιζανιοκτόνων στην ανάπτυξη της *L.minor*, διακρίνονται σε αυτά των μεμονωμένων δραστικών και σε αυτά που αφορούν τα μίγματα με δύο δραστικές.

Σημειώνεται, ότι όλες τις πειραματικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν εκπλήρωναν το κριτήριο του χρόνου διπλασιασμού (doubling time, Td) του αριθμού φυλλιδίων του μάρτυρα (OECD 221, 2006). Ο χρόνος διπλασιασμού ήταν σε όλες τις περιπτώσεις μικρότερος από 2,5 μέρες.

1.4.1 Αποτελέσματα μεμονωμένων ζιζανιοκτόνων

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τοξικολογικών δοκιμών για τις τέσσερις δραστικές ουσίες και για τα τέσσερα διαφορετικά κριτήρια αξιολόγησης (αριθμός φυλλιδίων, επιφάνεια φυλλιδίων, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αριθμού φυλλιδίων, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας). Αρχικά, μελετήθηκε η πορεία των κριτηρίων αξιολόγησης κατά την διάρκεια της πειραματικής δοκιμής. Στη συνέχεια έγινε, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης και προσαρμογή της λογιστικής καμπύλης (Εξίσωση 1.16), οπότε και υπολογίστηκαν οι παράμετροι max , b και EC_{50} . Η λογιστική καμπύλη που προέκυψε για όλες τις δραστικές ουσίες με κριτήριο αξιολόγησης τον μέσο ειδικό ρυθμό αύξησης παρουσιάζεται στο Γράφημα 1.3. Τέλος, έγινε προσδιορισμός των NOEC και LOEC μετά από ανάλυση διασποράς (ANOVA) και εφαρμογή της post-hoc δοκιμασίας Dunnett.



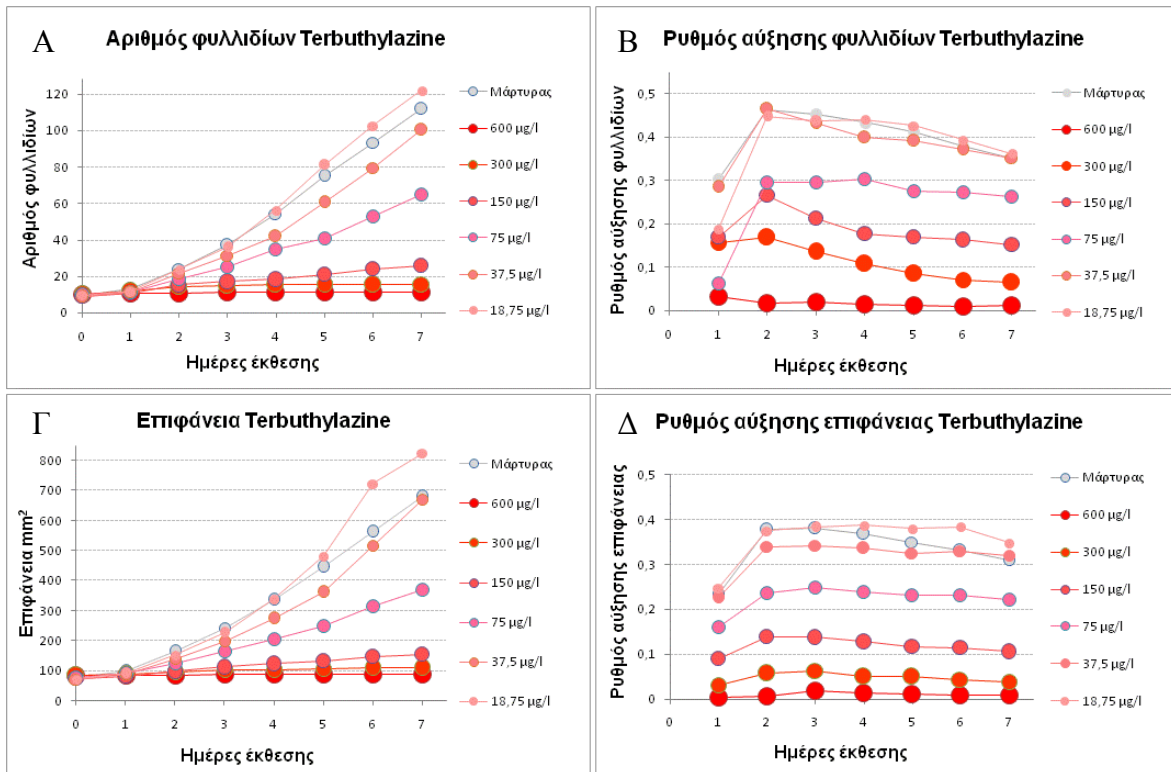
Γράφημα 1.3: Η λογιστική καμπύλη των τεσσάρων δραστικών ουσιών με κριτήριο αξιολόγησης τον μέσο ειδικό ρυθμό αύξησης φυλλιδίων. Παρουσιάζονται επίσης οι μέσοι όροι των μετρήσεων καθώς και το τυπικό τους σφάλμα.

1.4.1.1 Αποτελέσματα *terbutylazine*

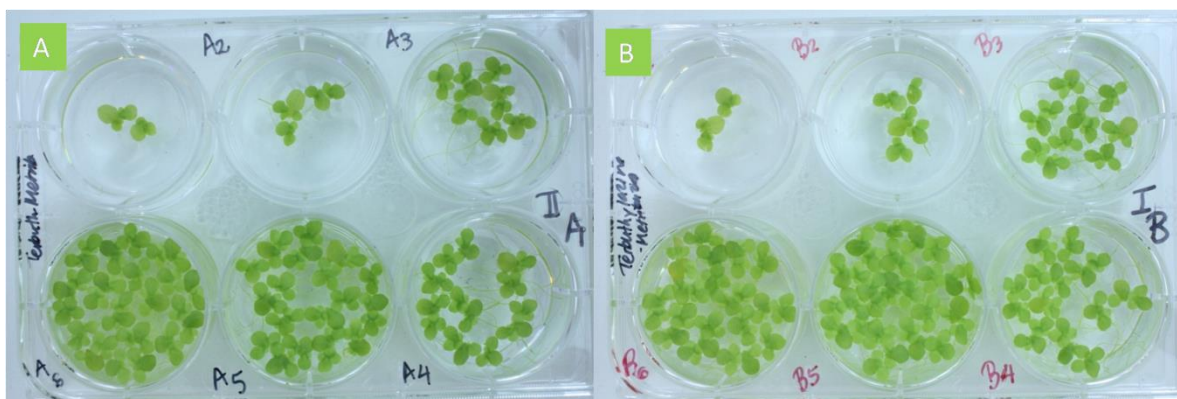
Η ανάπτυξη της *L.minor* καταγράφονταν καθημερινά κατά τη διάρκεια της τοξικολογικής δοκιμής του ζιζανιοκτόνου *terbutylazine*. Όπως φαίνεται στην γραφική απεικόνιση στο Γράφημα 1.4, καθ'όλη τη διάρκεια της έκθεσης στις τρεις μικρότερες συγκεντρώσεις του ζιζανιοκτόνου και στον μάρτυρα, παρατηρήθηκε εκθετική αύξηση τόσο του αριθμού (Γράφημα 1.4 Α) όσο και της επιφάνειας των φυλλιδίων (Γράφημα 1.4 Γ). Παράλληλα, ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης και των δύο κριτηρίων παρέμεινε σχετικά αμετάβλητος στη διάρκεια των ημερών, ιδιαίτερα από την δεύτερη μέρα έκθεσης και μετά (Γράφημα 1.4 Β,Δ).

Μετά το πέρας της τοξικολογικής δοκιμής τα φυτά στα πλακίδια με τις έξι συγκεντρώσεις του *terbutylazine* είχαν μια ευδιάκριτη δοσοεξαρτώμενη ανάπτυξη (Εικόνα 1.4), ενώ η μικρότερη συγκέντρωση αναπτύχθηκε περισσότερο από τον μάρτυρα (Γράφημα 1.4). Μετά την καταγραφή της ανάπτυξης αυτής, σύμφωνα και με τα τέσσερα κριτήρια αξιολόγησης, έγινε προσαρμογή των δεδομένων στη λογιστική καμπύλη. Τα αποτελέσματα αυτής καθώς και τα NOEC και LOEC παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3, όπου διακρίνεται ότι και για τα τέσσερα κριτήρια αξιολόγησης η προσαρμογή της λογιστικής καμπύλης ήταν καλή ($R^2 > 0,9721$). Το EC_{50} του *terbutylazine* κυμάνθηκε από 88,83 $\mu\text{g/l}$ έως 188,8 $\mu\text{g/l}$, με σειρά από το μικρότερο

EC₅₀ προς το μεγαλύτερο ως εξής: απόδοση της επιφάνειας, απόδοση σε φυλλίδια, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αριθμού φυλλιδίων. Τα NOEC και LOEC ήταν κοινά για όλα τα κριτήρια αξιολόγησης, και ήταν 37,5 και 75 µg/l αντίστοιχα.



Γράφημα 1.4: Α) Ο αριθμός φυλλιδίων, Β) ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης φυλλιδίων, Γ) η επιφάνεια των φυλλιδίων και Δ) ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης της επιφάνειας των φυλλιδίων για τις 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις του terbutylazine και για τον μάρτυρα, καθ' όλη την διάρκεια της τοξικολογικής δοκιμής.



Εικόνα 1.4: Τα πλακίδια της τοξικολογική δοκιμής του Α) terbutylazine και Β) metribuzin κατά τη τελευταία μέρα του πειραματισμού.

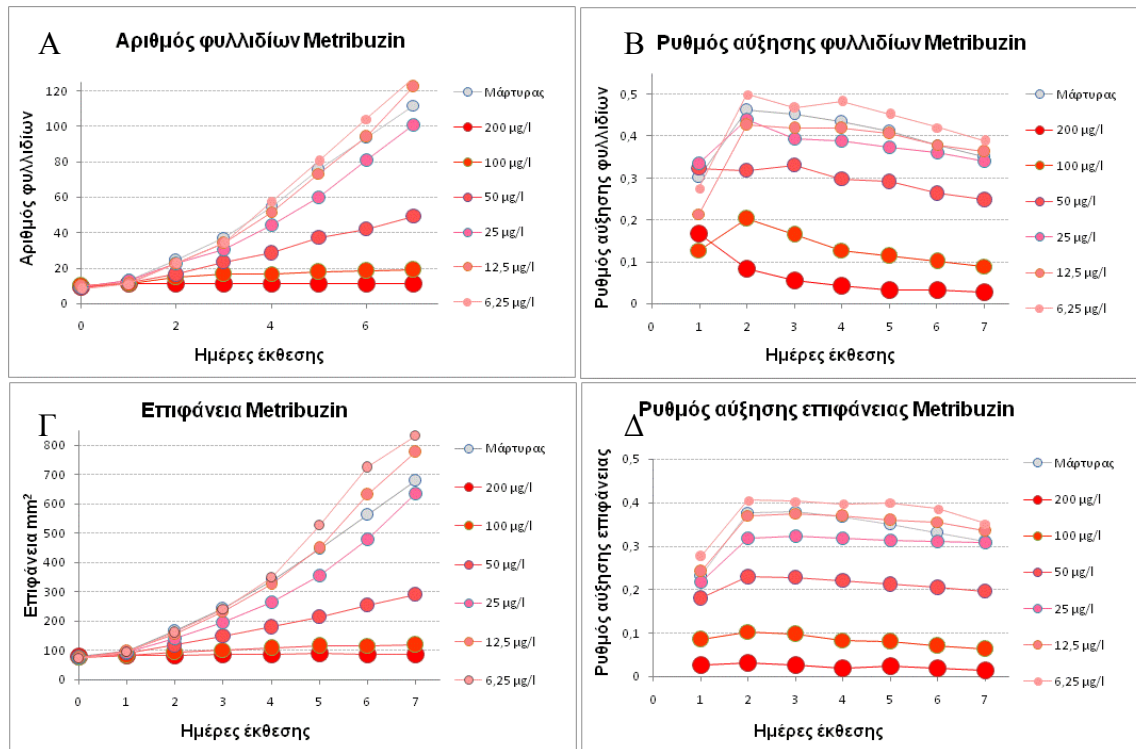
Πίνακας 1.3: Τα EC₅₀, NOEC, LOEC και η σχετική κλίση b της λογιστικής καμπύλης, της τοξικολογικής δοκιμής του terbutylazine ως προς την ανάπτυξη της *L.minor* (7^η μέρα) σύμφωνα με τα 4 κριτήρια αξιολόγησης.

Terbutylazine				
	Αριθμός φυλλιδίων	Μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αρ. φυλλιδίων	Επιφάνεια φυλλιδίων	Μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας
EC₅₀ (μg/l)	110,1	188,8	88,83	162,0
Τυπικό σφάλμα EC₅₀	7,692	7,144	6,379	4,316
95% CIEC₅₀	93,70 - 126,5	173,6 - 204,0	75,24 - 102,4	152,8 - 171,2
b	2,488	2,126	2,192	1,919
R²	0,9721	0,9908	0,9738	0,9961
NOEC (μg/l)			37,5	
LOEC (μg/l)			75	

1.4.1.2 Αποτελέσματα metribuzin

Ανάλογη συμπεριφορά με αυτή της έκθεσης στο terbutylazine έδειξε και το metribuzin, ήτοι στις τρεις μικρότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε εκθετική αύξηση του αριθμού και της επιφάνειας των φυλλιδίων, ενώ στις τρεις μεγαλύτερες η αύξηση ήταν γραμμική (Γράφημα 1.5 A, Γ). Επίσης, ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης παρέμεινε σταθερός, ιδίως από την δεύτερη μέρα έκθεσης και μέχρι το τέλος (Γράφημα 1.5 B, Δ).

Μετά το πέρας της τοξικολογικής δοκιμής, η αύξηση των φυτών στα πλακίδια με τις έξι συγκεντρώσεις του metribuzin ήταν μεγαλύτερη όσο μικρότερη ήταν η συγκέντρωση του ζιζανιοκτόνου (Εικόνα 1.4), με τις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις, όμως, να δείχνουν μεγαλύτερη ανάπτυξη από τον μάρτυρα (Γράφημα 1.5). Η προσαρμογή της λογιστικής καμπύλης ήταν και σε αυτή την περίπτωση καλή ($R^2 > 0,965$) και για τα τέσσερα διαφορετικά κριτήρια αξιολόγησης (Πίνακας 1.4). Το EC₅₀ του metribuzin κυμάνθηκε από 42,01 μg/l έως 70,33 μg/l, με την ίδια σειρά από μικρότερο EC₅₀ προς το μεγαλύτερο όπως και στο terbutylazine (δηλ. απόδοση της επιφάνειας, απόδοσης σε φυλλίδια, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αριθμού φυλλιδίων). Τα NOEC και LOEC ήταν κοινά για τα τρία από τα τέσσερα κριτήρια αξιολόγησης, και ήταν 25 και 50 μg/l αντίστοιχα. Μόνο ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης της επιφάνειας είχε διαφορετικά, χαμηλότερα, NOEC και LOEC, τα οποία ήταν 12,5 και 25 μg/l αντίστοιχα.



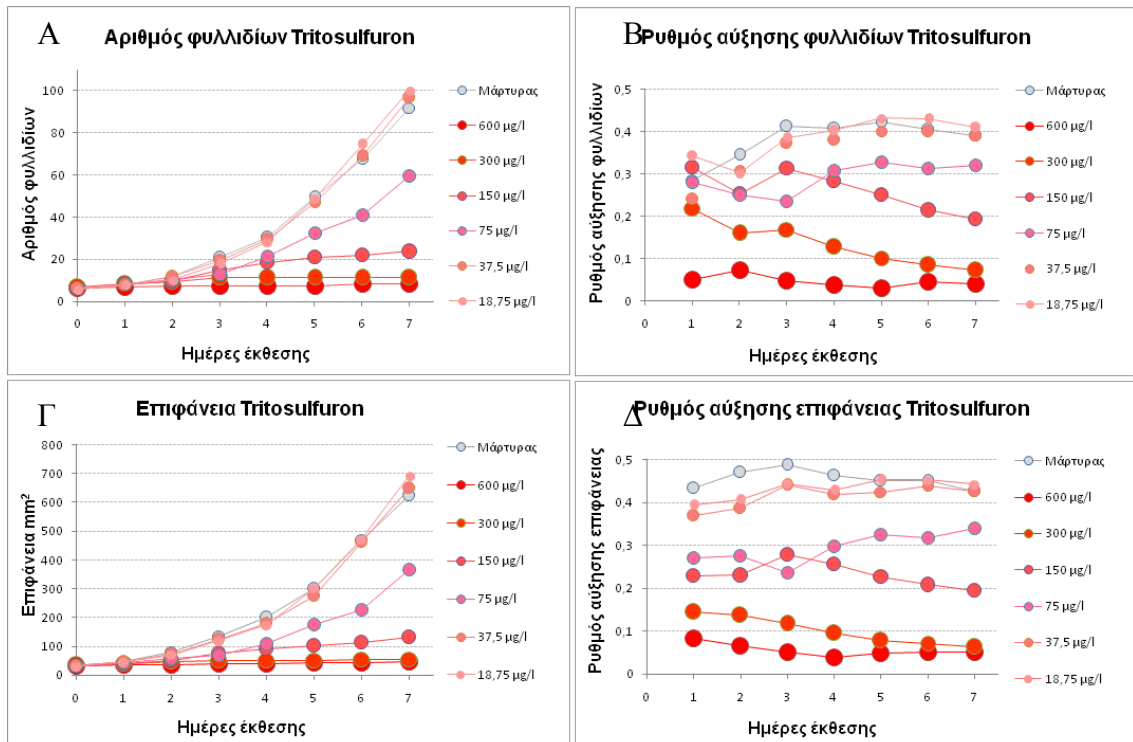
Γράφημα 1.5: Α) Ο αριθμός φυλλιδίων, Β) ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης φυλλιδίων, Γ) η επιφάνεια των φυλλιδίων και Δ) ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης της επιφάνειας των φυλλιδίων για τις 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις του metribuzin και για τον μάρτυρα, καθ' όλη την διάρκεια της τοξικολογικής δοκιμής.

Πίνακας 1.4: Τα EC_{50} , NOEC, LOEC και η σχετική κλίση b της λογιστικής καμπύλης, της τοξικολογικής δοκιμής του metribuzin ως προς την ανάπτυξη της *L.minor* (7^η μέρα) σύμφωνα με τα 4 κριτήρια αξιολόγησης.

Metribuzin				
	Αριθμός φυλλιδίων	Μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αρ. φυλλιδίων	Επιφάνεια φυλλιδίων	Μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας
EC_{50} (µg/l)	46,87	70,33	42,01	69,08
Τυπικό σφάλμα EC_{50}	2,226	2,201	3,062	1,230
95% CIEC ₅₀	42,13 - 51,62	65,64 - 75,02	35,48 - 48,54	66,46 - 71,70
b	3,070	2,660	2,783	2,382
R^2	0,9823	0,9920	0,9653	0,9976
NOEC (µg/l)		25		12,5
LOEC (µg/l)		50		25

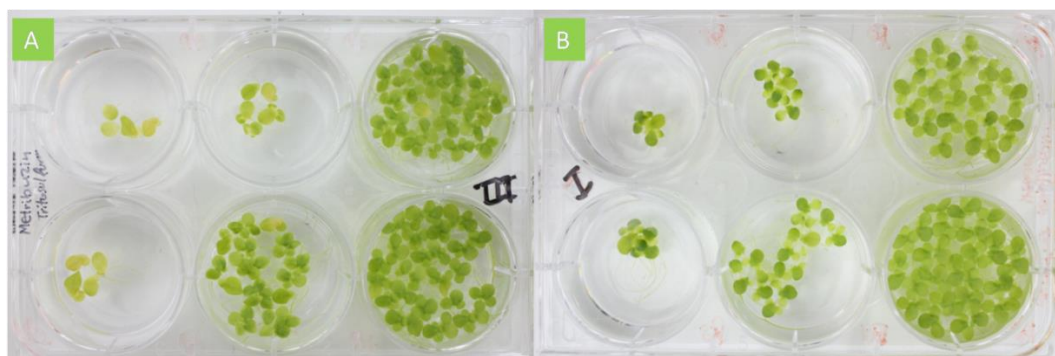
1.4.1.3 Αποτελέσματα tritosulfuron

Η ανάπτυξη των φυτών της *L.minor* στη διάρκεια της τοξικολογικής δοκιμής του tritosulfuron δεν παρουσίασε εκπλήξεις, καθώς είχε ίδια ακριβώς εικόνα με αυτή των δραστικών ουσιών του PSII, τόσο όσο αφορά την αύξηση (Γράφημα 1.6 Α, Γ) όσο και τον ρυθμό αύξησης (Γράφημα 1.6 Β, Δ) των φυλλιδίων και της επιφάνειας.



Γράφημα 1.6: Α) Ο αριθμός φυλλιδίων, Β) ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης φυλλιδίων, Γ) η επιφάνεια των φυλλιδίων και Δ) ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης της επιφάνειας των φυλλιδίων για τις 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις του tritosulfuron και για τον μάρτυρα, καθ' όλη την διάρκεια της τοξικολογικής δοκιμής.

Στην Εικόνα 1.5 διακρίνεται η σταδιακή μείωση της ανάπτυξης των φυτών με την αύξηση της συγκέντρωσης του tritosulfuron την τελευταία μέρα της τοξικολογικής δοκιμής, ενώ από το (Γράφημα 1.6) διαπιστώθηκε ότι η *L.minor* στις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις αναπτύχθηκε περισσότερο από τον μάρτυρα. Τα δεδομένα που προέκυψαν προσαρμόστηκαν στην λογιστική καμπύλη με πολύ καλά αποτελέσματα ($R^2 > 0,9776$) (Πίνακας 1.5). Το EC_{50} του tritosulfuron κυμάνθηκε από 80,24 µg/l έως 145 µg/l, με την ίδια σειρά από μικρότερο EC_{50} προς το μεγαλύτερο όπως και οι προηγούμενες δραστικές ουσίες (δηλ. απόδοση της επιφάνειας, απόδοσης σε φυλλίδια, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αριθμού φυλλιδίων). Τα NOEC και LOEC ήταν 37,5 και 75µg/l σε όλες τις περιπτώσεις.



Εικόνα 1.5: Τα πλακίδια της τοξικολογική δοκιμής του Α) tritosulfuron και Β) tribenuron methyl κατά την τελευταία μέρα του πειραματισμού.

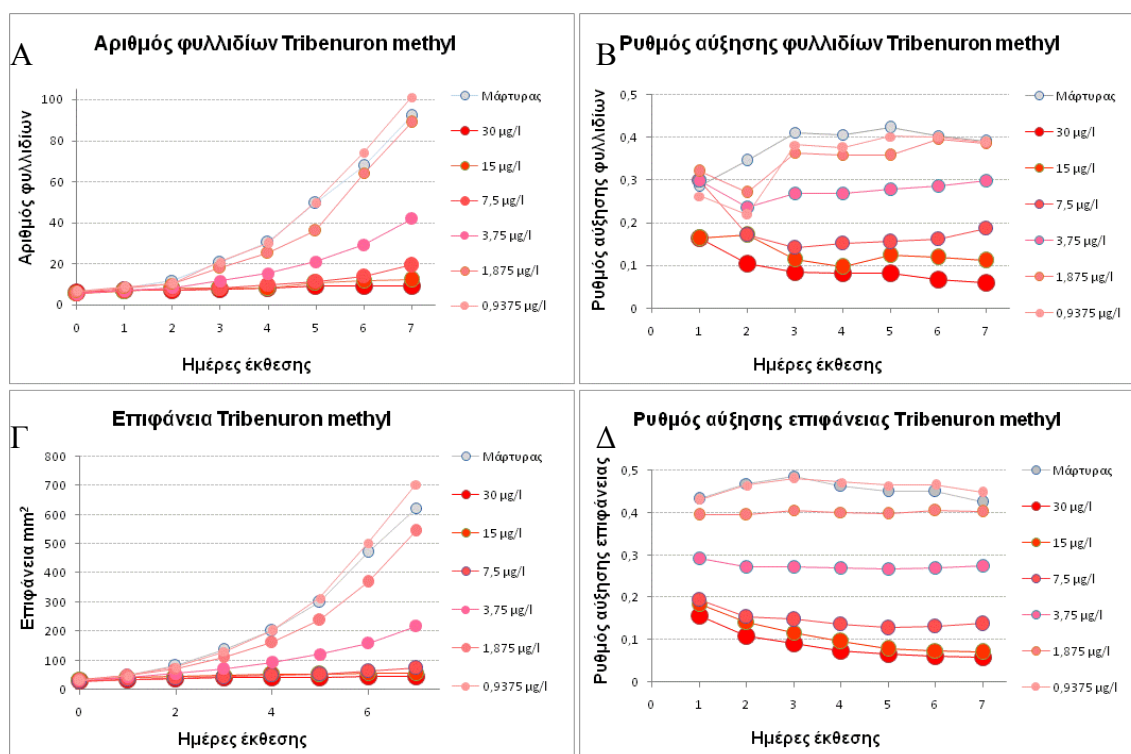
Πίνακας 1.5: Τα EC₅₀, NOEC, LOEC και η σχετική κλίση b της λογιστικής καμπύλης, της τοξικολογικής δοκιμής του tritosulfuron ως προς την ανάπτυξη της *L.minor* (7^η μέρα) σύμφωνα με τα 4 κριτήρια αξιολόγησης.

Tritosulfuron				
	Αριθμός φυλλιδίων	Μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αρ. φυλλιδίων	Επιφάνεια φυλλιδίων	Μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας
EC₅₀ (μg/l)	87,22	145,0	80,24	135,7
Τυπικό σφάλμα				
EC₅₀	4,298	8,297	4,078	6,870
95% CIEC₅₀	78,19 - 96,25	127,6 - 162,4	71,67 - 88,80	121,3 - 150,2
b	2,947	2,030	3,190	2,078
R²	0,9809	0,9792	0,9776	0,9835
NOEC (μg/l)		37,5		
LOEC (μg/l)		75		

1.4.1.4 *Αποτελέσματα tribenuron methyl*

Στην τοξικολογική δοκιμή του tribenuron methyl τόσο η αύξηση του αριθμού φυλλιδίων και της επιφάνειάς τους στο χρόνο, όσο και οι αντίστοιχοι ρυθμοί αύξησης τους κατά τη διάρκεια έκθεσης της *L.minor* στη σουλφονυλουρία, βρίσκονται σε αντιστοιχία με αυτά των προηγούμενων δραστικών ουσιών (Γράφημα 1.7).

Μετά το πέρας της τοξικολογικής δοκιμής τα φυτά στα πλακίδια με τις έξι συγκεντρώσεις του tribenuron methyl είχαν μια ευδιάκριτη δοσοεξαρτώμενη ανάπτυξη (Εικόνα 1.5), ενώ η μικρότερη συγκέντρωση αναπτύχθηκε περισσότερο από τον μάρτυρα (Γράφημα 1.7). Όπως και στα τρία προηγούμενα ζιζανιοκτόνα, η προσαρμογή της λογιστικής καμπύλης στα δεδομένα ήταν πολύ καλή ($R^2 > 0,965$) (Πίνακας 1.6). Το EC₅₀ του tribenuron methyl κυμάνθηκε από 2,916 μg/l έως 7,568 μg/l, με σειρά από μικρότερο EC₅₀ προς το μεγαλύτερο ως εξής: απόδοση της επιφάνειας, απόδοση σε φυλλίδια, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αριθμού φυλλιδίων, ίδια δηλαδή με τις άλλες τρεις δραστικές ουσίες. Τα NOEC και LOEC ήταν κοινά για τα τρία από τα τέσσερα κριτήρια αξιολόγησης, και ήταν 1,875 και 3,75 μg/l αντίστοιχα. Μόνο η απόδοση της επιφάνειας είχε διαφορετικά, χαμηλότερα, NOEC και LOEC, τα οποία ήταν 0,9375 και 1,875 μg/l αντίστοιχα.



Γράφημα 1.7: Α) Ο αριθμός φυλλιδίων, Β) ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης φυλλιδίων, Γ) η επιφάνεια των φυλλιδίων και Δ) ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης της επιφάνειας των φυλλιδίων για τις 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις του Tribenuron methyl και για τον μάρτυρα, καθ' όλη την διάρκεια της τοξικολογικής δοκιμής.

Πίνακας 1.6: Τα EC_{50} , $NOEC$, $LOEC$ και η σχετική κλίση b της λογιστικής καμπύλης, της τοξικολογικής δοκιμής του tribenuron methyl ως προς την ανάπτυξη της *L.minor* (7^η μέρα) σύμφωνα με τα 4 κριτήρια αξιολόγησης.

Tribenuron methyl				
	Αριθμός φυλλιδίων	Μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αρ. φυλλιδίων	Επιφάνεια φυλλιδίων	Μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας
EC_{50} (μg/l)	3,478	7,568	2,916	5,156
Τυπικό σφάλμα EC_{50}	0,1942	0,5336	0,1389	0,3385
95% $CIEC_{50}$	3,070 - 3,886	6,447 - 8,689	2,624 - 3,207	4,445 - 5,868
b	2,958	1,526	3,390	1,764
R^2	0,9759	0,9754	0,9825	0,9784
$NOEC$ (μg/l)		1,875	0,9375	1,875
$LOEC$ (μg/l)		3,75	1,875	3,75

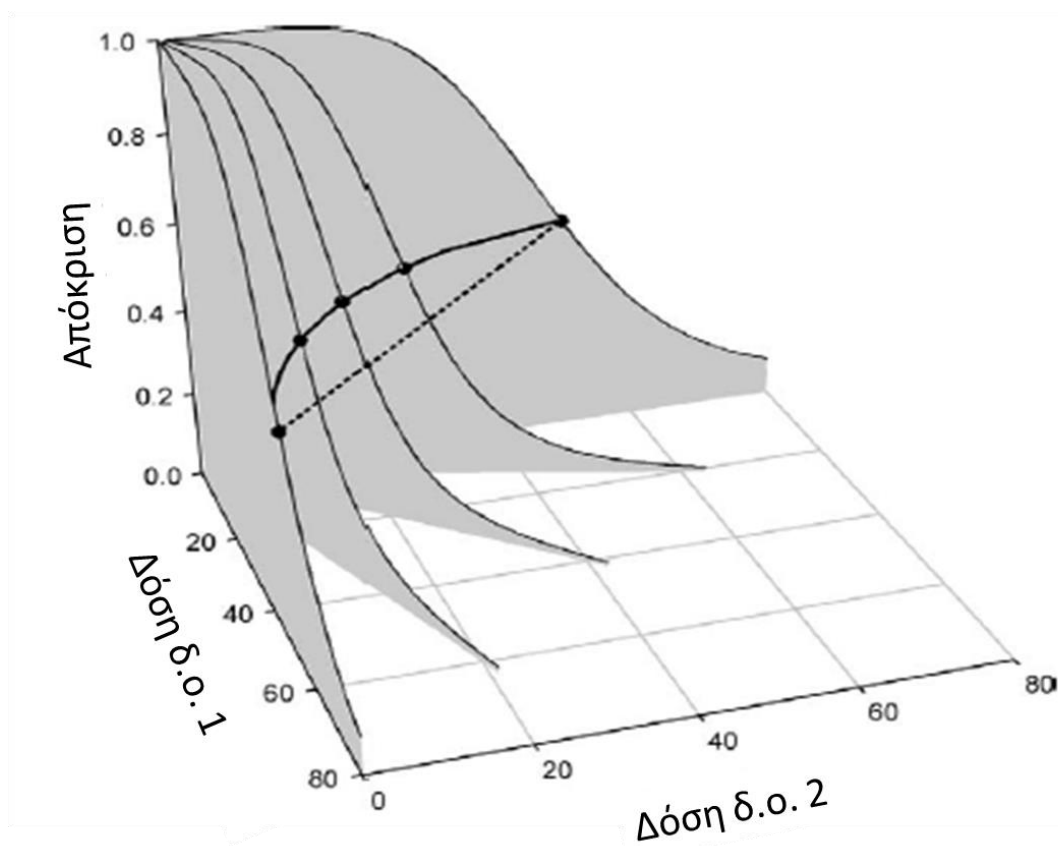
1.4.2 Αποτελέσματα συνδυασμένης τοξικότητας ζιζανιοκτόνων

Τα αποτελέσματα της τοξικότητας των μιγμάτων terbuthylazine–metribuzin, metribuzin-tritosulfuron, terbuthylazine-tritosulfuron και tritosulfuron-tribenuron methyl στην ανάπτυξη της *L.minor* παρουσιάζονται στη συνέχεια. Ως κριτήριο αξιολόγησης της τοξικότητας επιλέχθηκε ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης φυλλιδίων,

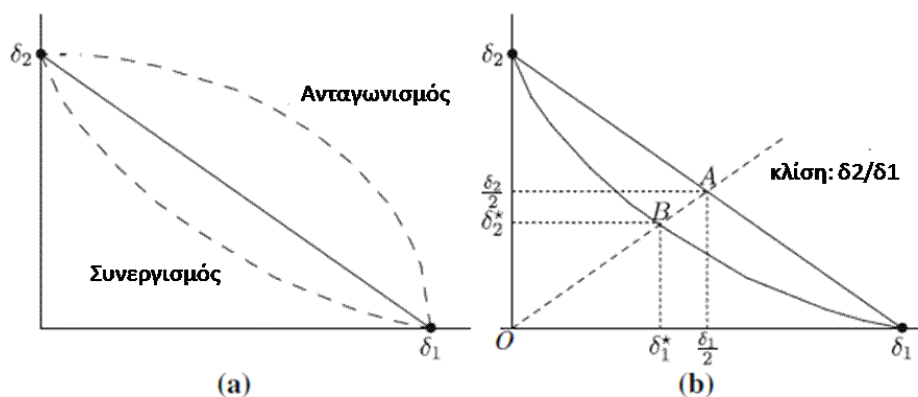
καθώς παρουσίαζε την καλύτερη προσαρμογή στην λογιστική καμπύλη από όλα τα κριτήρια αξιολόγησης.

1.4.2.1 Ανάλυση ισοβολογραφημάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλ. υποκεφ. 1.3.4), ενώ για την γραφική απεικόνιση τους όσο αφορά στην προσθετική δράση CA και τις αποκλίσεις από αυτήν, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ισοβολογραφημάτων. Τα ισοβολογραφήματα δημιουργούνται από τις λογιστικές καμπύλες όλων των μιγμάτων (Γράφημα 1.8) και η εξήγησή τους δίνεται στο Γράφημα 1.9.



Γράφημα 1.8: Καμπύλες δόσης απόκρισης 5 μιγμάτων διαφορετικών αναλογιών των δραστικών ουσιών 1 και 2. Η 50% απόκριση της κάθε καμπύλης δίνεται από τις μαύρες τελείες. Το ισοβολογράφημα των EC_{50} περιγράφεται με την μαύρη γραμμή συνεχή γραμμή, και το θεωρητικό ισοβολογράφημα της προσθετικής δράσης περιγράφεται με την διακεκομμένη γραμμή. (τροποποίηση από Cedergreen et al. 2007a). Η προβολή των αποτελεσμάτων της απόκρισης κατά 50% και των ισοβολογραφημάτων στους άξονες x-y δίνει ισοβολογραφήματα όπως αυτά που παρουσιάζονται στο Γράφημα 1.9



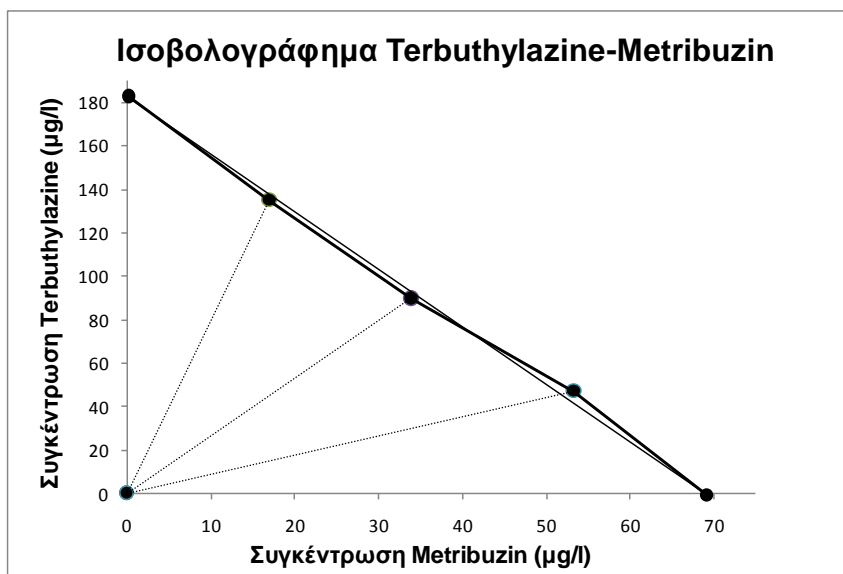
Γράφημα 1.9: a) Παράδειγμα ισοβολογραφήματος. Η ευθεία γραμμή αντιστοιχεί στην προσθετική δράση CA και οι καμπύλες με την διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχούν στον ανταγωνισμό και τον συνεργισμό. b) Το αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης για το μίγμα 50:50%. Τα σημεία A και B αντιστοιχούν σε συνδυασμούς δόσεων που δίνουν την ίδια απόκριση με τα $(\delta_1, 0)$ και $(0, \delta_2)$ στην περίπτωση προσθετικής δράσης CA και συνεργισμού αντίστοιχα. (τροποποίηση από Sorensen et al., 2007).

1.4.2.2 Αποτελέσματα *terbuthylazine-metribuzin*

Τα αποτελέσματα του μίγματος των *terbuthylazine* και *metribuzin* περιγράφηκαν με ακρίβεια από το μοντέλο της προσθετικής δράσης CA (R^2 0,987), όπως επιβεβαιώνεται και από το ισοβολογράφημα (Γράφημα 1.10) (βλ. Πίνακας 1.7, στήλη με έντονα γράμματα). Σύμφωνα με το μοντέλο της CA το άθροισμα των τοξικών μονάδων στην περίπτωση της προσθετικής δράσης θα πρέπει να είναι ίσο με 1 (βλ. Εξίσωση 1.5). Στην συγκεκριμένη περίπτωση των *terbuthylazine* και *metribuzin*, και μάλιστα για το μίγμα 50:50 το άθροισμα των τοξικών μονάδων είναι $\Sigma TU=0,98$, δηλαδή περίπου 1 επιβεβαιώνοντας την προσθετική δράση.

Το μοντέλο της ανεξάρτητης δράσης IA δεν προέβλεψε τόσο καλά τα δεδομένα, και για την καλύτερη περιγραφή τους χρειάστηκε η προσθήκη της παραμέτρου α (βλ. Πίνακας 1.1, βλ. Πίνακας 1.7, στήλη με έντονα γράμματα). Η παράμετρος αυτή ήταν αρνητική ($\alpha = -1,64$) και κατά συνέπεια υπήρχε συνεργισμός μεταξύ των δύο δραστικών ουσιών.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το μοντέλο της CA προέβλεψε με ακρίβεια τα αποτελέσματα του μίγματος του *metribuzin* και του *terbuthylazine*, ενώ το μοντέλο της IA υποεκτίμησε την δραστηριότητα του μίγματος και την περιέγραψε με το μοντέλο S/A ως συνεργιστική. Σύγκριση μεταξύ των δύο αυτών μοντέλων, του CA και του S/A της IA έγινε με τη χρήση του κριτηρίου AIC (βλ. υποκεφ. 1.3.4). Η τιμή ΔAIC είναι θετική (6,88), κατά συνέπεια επιλέγεται το απλούστερο μοντέλο (βλ. υποκεφ. 1.3.4), δηλαδή αυτό της CA, η οποία περιγράφει καλύτερα τα αποτελέσματα της τοξικολογικής δοκιμής του μίγματος *terbuthylazine* και *metribuzin*.



Γράφημα 1.10: Ισοβολογράφημα του μίγματος των ζιζανιοκτόνων terbuthylazine και metribuzin όσο αφορά την ανάπτυξη της *Lemna minor* με κριτήριο αξιολόγησης τον ειδικό ρυθμό αύξησης φυλλιδίων.

Πίνακας 1.7: Σύνοψη της ανάλυσης των επιπτώσεων του μίγματος terbuthylazine και metribuzin στον μέσο ειδικό ρυθμό αύξησης του αριθμού φυλλιδίων (εκφρασμένο σε % σε σχέση με τον μάρτυρα) στη *L. minor*. max, η μέγιστη απόκριση, β_{Terb} και β_{Metr} οι κλίσεις των καμπυλών της μεμονωμένης απόκρισης, EC_{50} (σε $\mu\text{g/l}$) η συγκέντρωση που προκαλεί 50% μείωση της ανάπτυξης, α , b_{Terb} και b_{DL} οι παράμετροι των τροποποιημένων μοντέλων (Πίνακας 1.1), SS το άθροισμα τετραγώνων των αποκλίσεων, το οποίο και ελαχιστοποιείται, β.ε. οι βαθμοί ελευθερίας, $p(\chi^2)$ το αποτέλεσμα της δοκιμασίας λόγου πιθανοφάνειας, CA η προσθετική δράση, IA η ανεξάρτητη δράση, S/A ο συνεργισμός/ανταγωνισμός, DR η απόκλιση εξαρτώμενη από την αναλογία δόσεων, DL απόκλιση εξαρτώμενη από το επίπεδο των δόσεων. Με έντονα γράμματα παρουσιάζεται το καλύτερο μοντέλο.

Terbuthylazine- Metribuzin	CA				IA			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	102,05	102,05	102,05	102,07	103,42	102,53	102,55	102,52
$\beta_{\text{Terbuthylazine}}$	2,04	2,04	2,04	2,02	1,76	1,99	1,99	2,06
$\beta_{\text{Metribuzin}}$	2,66	2,66	2,66	2,64	2,18	2,49	2,48	2,56
$EC_{50\text{Terbuthylazine}}$	179,17	180,51	183,14	180,36	154,53	180,55	181,63	180,41
$EC_{50\text{Metribuzin}}$	70,14	70,55	69,87	70,52	62,34	69,89	69,48	69,67
α	-	-0,05	0,27	0,001	-	-1,64	-1,40	-2,01
$b_{\text{Terbuthylazine}}$	-	-	-0,66	-	-	-	-0,45	-
b_{DL}	-	-	-	44,58	-	-	-	0,38
R^2	0,987	0,987	0,987	0,987	0,979	0,986	0,987	0,987
SS	1771,44	1768,80	1742,7	1768,3	5740,49	1858,2	1852,0	1840,1
			0	2		3	1	3
β.ε.	-	1	2	2	-	1	1	1
$p(\chi^2)$		0,697	0,4342	0,9140		$7,68 \cdot 10^{-7}$	0,5584	0,318

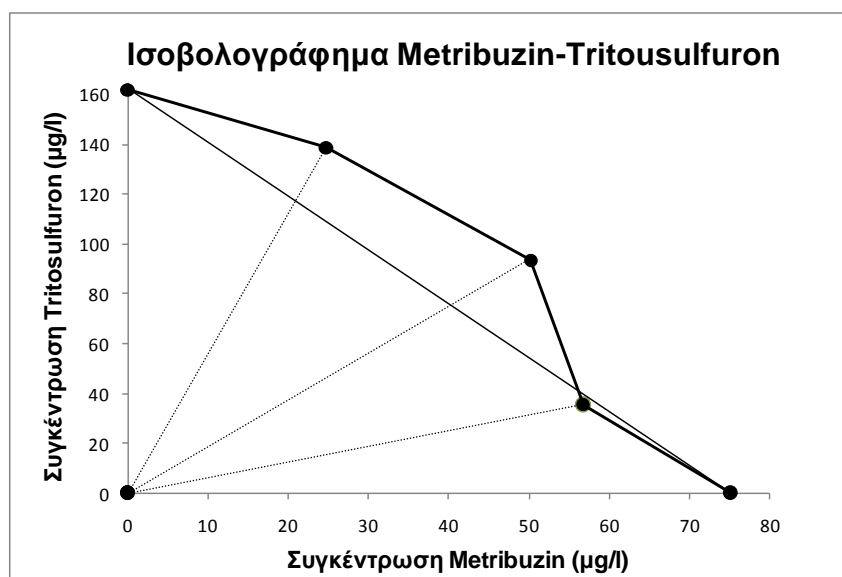
1.4.2.3 Αποτελέσματα metribuzin-tritosulfuron

Το μίγμα του metribuzin με το tritosulfuron δεν είχε την προβλεπόμενη από τα μοντέλα της CA και IA επίπτωση στην ανάπτυξη της *L. minor*. Πιο συγκεκριμένα, ξεκινώντας με βάση την CA τα δεδομένα περιγράφηκαν καλύτερα από το μοντέλο της απόκλιση που εξαρτάται από την αναλογία δόσεων-DR (Εξίσωση 1.13), κατά το οποίο, όπως διακρίνεται και από το ισοβολογράφημα (Γράφημα 1.11), υπήρχε ανταγωνιστική δράση μεταξύ των δύο δραστικών ουσιών εκτός από την περίπτωση όπου η τοξικότητα

οφείλονταν κυρίως στο metribuzin (ήταν σε μεγαλύτερη αναλογία) (βλ. Πίνακας 1.1, Πίνακας 1.8 στήλη με έντονα γράμματα). Ακόμα, το άθροισμα των τοξικών μονάδων του μίγματος 50:50 ήταν $\Sigma TU=1,44$, και κατά συνέπεια απαιτείται 44% παραπάνω από τα ζιζανιοκτόνα, σε σχέση με το προβλεπόμενο από την CA, για να επιτευχθεί παρεμπόδιση της ανάπτυξης κατά 50%. Η ανάγκη για μεγαλύτερη ποσότητα ζιζανιοκτόνων σχετίζεται με την ανταγωνιστική δράση των δύο δραστικών ουσιών.

Αντίστοιχα, με βάση το μοντέλο της ΙΑ, το μίγμα είχε ανταγωνιστική δράση καθώς τα αποτελέσματα στην συνδυασμένη τοξικότητα περιγράφονται καλύτερα με το μοντέλο του S/A με θετική τιμή της παραμέτρου α (βλ. Πίνακας 1.1, Πίνακας 1.8 στήλη με έντονα γράμματα).

Για την επιλογή ανάμεσα στα παραπάνω δύο μοντέλα αυτού που περιγράφει καλύτερα τα αποτελέσματα έγινε σύγκριση τους σύμφωνα με το κριτήριο AIC (βλ. υποκεφ. 1.3.4). Σύμφωνα με αυτό καταλληλότερο μοντέλο είναι το πιο πολύπλοκο από τα δύο, καθώς η τιμή ΔAIC ήταν αρνητική (-11,01), δηλαδή αυτό της απόκλιση που εξαρτάται από την αναλογία δόσεων-DR της προσθετικής δράσης-CA.



Γράφημα 1.11: Ισοβολουγράφημα του μίγματος των ζιζανιοκτόνων metribuzin και tritosulfuron όσο αφορά την ανάπτυξη της *Lemna minor* με κριτήριο αξιολόγησης τον ειδικό ρυθμό αύξησης φυλλιδίων.

Πίνακας 1.8: Σύνοψη της ανάλυσης των επιπτώσεων του μίγματος metribuzin και tritosulfuron στην ανάπτυξη ως προς τον μέσο ειδικό ρυθμό αύξησης του αριθμού φυλλιδίων (εκφρασμένο σε % σε σχέση με τον μάρτυρα) στη *Lemna minor*. max, η μέγιστη απόκριση, β_{Metr} και β_{Trit} οι κλίσεις των καμπυλών της μεμονωμένης απόκρισης, EC_{50} (σε $\mu\text{g/l}$) η συγκέντρωση που προκαλεί 50% μείωση της ανάπτυξης, α , b_{DL} και b_{Metr} οι παράμετροι των τροποποιημένων μοντέλων (Πίνακας 1.1), SS το άθροισμα τετραγώνων των αποκλίσεων, το οποίο και ελαχιστοποιείται, β.ε. οι βαθμοί ελευθερίας, $p(\chi^2)$ το αποτέλεσμα της δοκιμασίας λόγου πιθανοφάνειας. CA η προσθετική δράση, IA η ανεξάρτητη δράση, S/A ο συνεργισμός/ανταγωνισμός, DR η απόκλιση εξαρτώμενη από την αναλογία δόσεων, DL απόκλιση εξαρτώμενη από το επίπεδο των δόσεων. Με έντονα γράμματα παρουσιάζεται το καλύτερο μοντέλο.

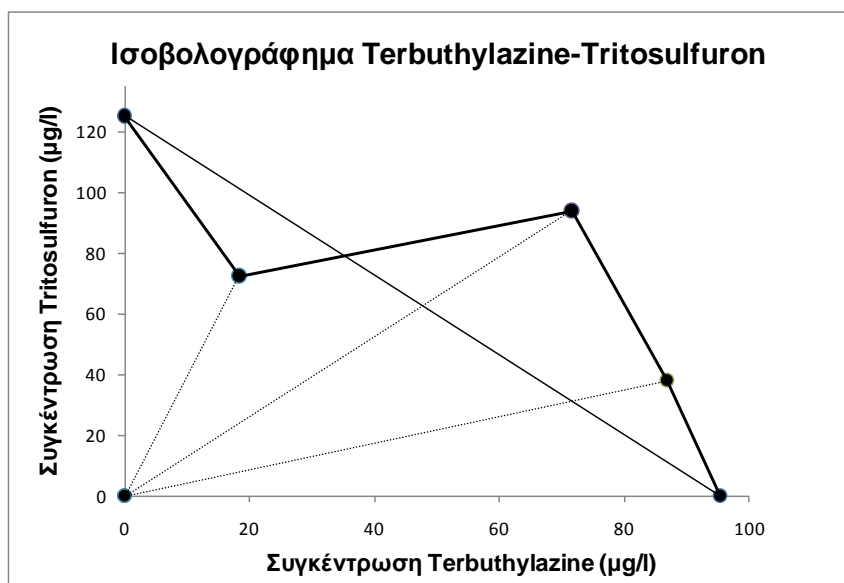
Metribuzin- Tritosulfuron	CA				IA			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	102,99	102,93	102,92	102,85	102,74	103,10	103,07	103,18
$\beta_{\text{Metribuzin}}$	2,67	2,72	2,74	2,78	2,56	2,46	2,45	2,55
$\beta_{\text{Tritosulfuron}}$	1,72	1,79	1,81	1,83	1,76	1,67	1,71	1,74
$EC_{50\text{Metribuzin}}$	76,45	65,08	67,86	65,14	68,71	65,42	67,55	65,12
$EC_{50\text{Tritosulfuron}}$	166,52	137,50	131,19	137,41	144,0349	135,51	131,50	134,96
α	-	1,398	2,369	1,243	-	0,66	1,49	0,12
$b_{\text{Metribuzin}}$	-	-	-1,87	-	-	-	-1,76	-
b_{DL}	-	-	-	-0,083	-	-	-	-7,86
R^2	0,972	0,984	0,985	0,984	0,982	0,983	0,984	0,983
SS	4275,77	2503,90	2356,27	2495,24	5800,49	2676,93	2608,75	2643,16
β.ε.	-	1	1	1	-	1	1	1
$p(\chi^2)$	-	$1,49 \cdot 10^{-13}$	0,0127	0,552	-	$6,62 \cdot 10^{-19}$	0,105	0,255

1.4.2.4 Αποτελέσματα *terbuthylazine-tritosulfuron*

Στο μίγμα του *terbuthylazine* και του *tritosulfuron*, όπως και στην περίπτωση του *metribuzin* με το *tritosulfuron*, η δράση του συνδυασμού εξαρτιόταν από την αναλογία των συγκεντρώσεων (Γράφημα 1.12). Πιο συγκεκριμένα, τόσο το μοντέλο της CA όσο και αυτό της IA δεν μπόρεσαν να περιγράψουν με ακρίβεια τα αποτελέσματα της συνδυασμένης τοξικότητας των δύο αυτών ζιζανιοκτόνων, και για να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένα μοντέλα των δύο αυτών «βασικών» μοντέλων. Και στις δύο περιπτώσεις την καλύτερη περιγραφή των δεδομένων έδωσε το μοντέλο της απόκλισης που εξαρτάται από την αναλογία των δόσεων-DR (Εξίσωση 1.12), σύμφωνα με το οποίο υπήρχε ανταγωνιστική δράση στο μίγμα όταν υπερείχε αναλογικά το *terbuthylazine* και συνεργιστική όταν υπερείχε αναλογικά το *tritosulfuron* (βλ. Πίνακας 1.1, Πίνακας 1.9 στήλη με έντονα γράμματα). Η ανταγωνιστική δράση των δύο ζιζανιοκτόνων στο μίγμα 50:50 γίνεται φανερή και από το άθροισμα των τοξικών μονάδων καθώς αυτό είναι $\Sigma TU=1,56$.

Σύγκριση μεταξύ του μοντέλου DR της προσθετικής δράσης CA και του DR της ανεξάρτητης δράσης IA, σύμφωνα με το κριτήριο AIC, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μοντέλο DR της προσθετικής δράσης CA περιγράφει καλύτερα τα αποτελέσματα του

μίγματος terbuthylazine και tritosulfuron, καθώς αυτό έχει μικρότερο SS (βλ. υποκεφ. 1.3.4).



Γράφημα 1.12: Ισοβολογράφημα του μίγματος των ζιζανιοκτόνων terbuthylazine και tritosulfuron όσο αφορά την ανάπτυξη της *Lemna minor* με κριτήριο αξιολόγησης τον ειδικό ρυθμό αύξησης φυλλιδίων.

Πίνακας 1.9: Σύνοψη της ανάλυσης των επιπτώσεων του μίγματος terbuthylazine και tritosulfuron στην ανάπτυξη ως προς τον μέσο ειδικό ρυθμό αύξησης του αριθμού φυλλιδίων (εκφρασμένο σε % σε σχέση με τον μάρτυρα) στη *Lemna minor*. Max, η μέγιστη απόκριση, β_{Terb} και β_{Trit} οι κλίσεις των καμπυλών της μεμονωμένης απόκρισης, EC_{50} (σε $\mu\text{g/l}$) η συγκέντρωση που προκαλεί 50% μείωση της ανάπτυξης, α , b_{DL} και b_{Terb} οι παράμετροι των τροποποιημένων μοντέλων (Πίνακας 1.1), SS το άθροισμα τετραγώνων των αποκλίσεων, το οποίο και ελαχιστοποιείται, β.ε. οι βαθμοί ελευθερίας, $p(\chi^2)$ το αποτέλεσμα της δοκιμασίας λόγου πιθανοφάνειας. CA η προσθετική δράση, IA η ανεξάρτητη δράση, S/A ο συνεργισμός/ανταγωνισμός, DR η απόκλιση εξαρτώμενη από την αναλογία δόσεων, DL απόκλιση εξαρτώμενη από το επίπεδο των δόσεων. Με έντονα γράμματα παρουσιάζεται το καλύτερο μοντέλο.

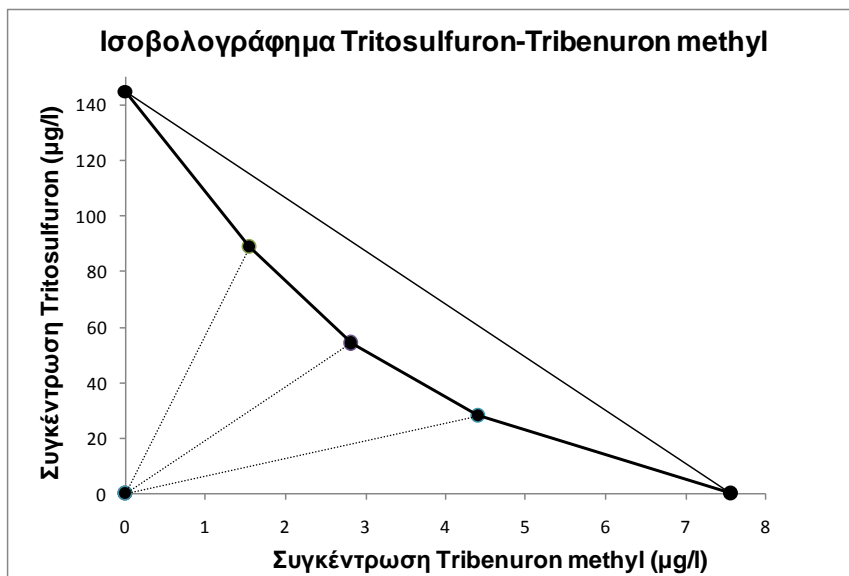
Terbuthylazine- Tritosulfuron	CA				IA			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	104,02	104,00	103,93	103,28	104,38	104,03	103,65	103,94
$\beta_{\text{Terbuthylazine}}$	1,81	1,81	1,84	2,16	1,63	1,73	1,80	2,40
$\beta_{\text{Tritosulfuron}}$	1,81	1,81	1,91	2,24	1,64	1,73	1,90	2,17
$EC_{50\text{Terbuthylazine}}$	112,28	111,86	94,08	111,42	106,09	112,42	93,75	108,13
$EC_{50\text{Tritosulfuron}}$	118,52	117,85	128,26	119,32	111,39	120,33	132,22	122,45
α	-	0,04	-5,96	-1,25	-	-0,78	-8,35	-3,84
$b_{\text{Terbuthylazine}}$	-	-	10,36	-	-	-	12,57	-
b_{DL}	-	-	-	0,85	-	-	-	1,56
R^2	0,944	0,944	0,963	0,951	0,935	0,938	0,959	0,950
SS	7610,07	7608,64	5040,89	6581,80	8727,86	8457,12	5786,16	6904,35
β.ε.	-	1	2	2	-	1	2	2
$p(\chi^2)$		0,889	$7,53 \cdot 10^{-10}$	0,0006		0,073	$7,86 \cdot 10^{-10}$	$6,44 \cdot 10^{-6}$

1.4.2.5 Αποτελέσματα tritosulfuron-tribenuron methyl

Η ανάλυση των δεδομένων του μίγματος tritosulfuron και tribenuron methyl έδειξε ότι η CA και η IA δεν μπόρεσαν να προβλέψουν την συνδυασμένη τοξικότητα. Αυτό,

όμως, επιτεύχθηκε με το μοντέλο του S/A (Εξίσωση 1.8), καθώς υπήρχε συνεργιστική δράση (αρνητική τιμή της παραμέτρου α) όταν χρησιμοποιήθηκε για βασικό μοντέλο η CA αλλά και όταν χρησιμοποιήθηκε η IA (βλ. Πίνακας 1.1, Πίνακας 1.10 στήλη με έντονα γράμματα). Την συνεργιστική δράση των δύο ζιζανιοκτόνων αποτυπώνει καθαρά το ισοβιολογράφημα (Γράφημα 1.13), ενώ το άθροισμα των τοξικών μονάδων στην αναλογία 50:50 ($\Sigma TU = 0,75$) δηλώνει ότι απαιτείται το 75% των δραστικών ουσιών για να προκληθεί 50% παρεμπόδιση στην ανάπτυξη, σε σχέση με αυτό που αναμενόταν με βάση την CA.

Η σύγκριση μεταξύ του μοντέλου συνεργισμού-ανταγωνισμού S/A της CA και του ίδιου μοντέλου της IA, σύμφωνα με το κριτήριο AIC, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μοντέλο S/A της CA περιγράφει καλύτερα τα αποτελέσματα του μίγματος tritosulfuron και tribenuron methyl, καθώς αυτό έχει μικρότερο SS (άθροισμα τετραγώνων των αποκλίσεων) (βλ. υποκεφ. 1.3.4).



Γράφημα 1.13: Ισοβιολογράφημα του μίγματος των ζιζανιοκτόνων tritosulfuron και tribenuron methyl όσο αφορά την ανάπτυξη της *Lemna minor* με κριτήριο αξιολόγησης τον ειδικό ρυθμό αύξησης φυλλιδίων.

Πίνακας 1.10: Σύνοψη της ανάλυσης των επιπτώσεων του μίγματος tritosulfuron και tribenuron methyl στην ανάπτυξη ως προς τον μέσο ειδικό ρυθμό αύξησης του αριθμού φυλλιδίων (εκφρασμένο σε % σε σχέση με τον μάρτυρα) στη *Lemna minor*. Max, η μέγιστη απόκριση, β_{Trit} και β_{Trib} οι κλίσεις των καμπυλών της μεμονωμένης απόκρισης, EC_{50} (σε $\mu\text{g/l}$) η συγκέντρωση που προκαλεί 50% μείωση της ανάπτυξης, α , b_{DL} και b_{Trit} οι παράμετροι των τροποποιημένων μοντέλων (Πίνακας 1.1), SS το άθροισμα τετραγώνων των αποκλίσεων, το οποίο και ελαχιστοποιείται, β.ε. οι βαθμοί ελευθερίας, $p(\chi^2)$ το αποτέλεσμα της δοκιμασίας λόγου πιθανοφάνειας. CA η προσθετική δράση, IA η ανεξάρτητη δράση, S/A ο συνεργισμός/ανταγωνισμός, DR η απόκλιση εξαρτώμενη από την αναλογία δόσεων, DL απόκλιση εξαρτώμενη από το επίπεδο των δόσεων. Με έντονα γράμματα παρουσιάζεται το καλύτερο μοντέλο.

Tritosulfuron- Tribenuron methyl	CA				IA			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	105,39	105,35	105,35	105,10	107,83	106,01	106,01	105,99
$\beta_{\text{Tritosulfuron}}$	1,95	1,96	1,96	2,05	1,54	1,80	1,81	1,83
$\beta_{\text{Tribenuron methyl}}$	1,66	1,68	1,68	1,76	1,38	1,63	1,63	1,66
$EC_{50\text{Tritosulfuron}}$	126,79	143,22	143,21	143,54	117,67	140,77	141,29	140,68
$EC_{50\text{Tribenuron m}}$	6,30	7,32	7,32	7,31	5,90	7,21	7,18	7,19
α	-	-1,08	-1,08	-1,40	-	-1,84	-1,69	-2,02
$b_{\text{Tritosulfuron}}$	-	-	0,0039	-	-	-	-0,31	-
b_{DL}	-	-	-	0,25	-	-	-	0,18
R^2	0,961	0,967	0,967	0,967	0,952	0,963	0,963	0,963
SS	5805,69	4916,33	4916,33	4870,02	7052,19	5533,85	5528,71	5529,61
β.ε.	-	1	1	1	-	1	1	1
$p(\chi^2)$	-	$3,82 \cdot 10^{-5}$	0,997	0,326	-	$6,59 \cdot 10^{-7}$	0,758	0,779

1.5 Συζήτηση

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα (Γράφημα 1.4, Γράφημα 1.5, Γράφημα 1.6, Γράφημα 1.7), η αύξηση των φυτών του μάρτυρα αλλά και χαμηλών συγκεντρώσεων όλων των τοξικολογικών δοκιμών ήταν εκθετική (βλ. Εισαγωγή Γράφημα 0.1), το οποίο καταδεικνύει το γεγονός ότι η ανάπτυξη δεν έχει παρεμποδιστεί από κανέναν παράγοντα. Σε αυτό έχει συνεισφέρει η αλλαγή των θρεπτικών διαλυμάτων κατά τη διάρκεια του πειραματισμού (semi-static test). Υπό τις συνθήκες αυτές η όποια διαφορά με τον μάρτυρα στην ανάπτυξη οφείλεται αποκλειστικά στην επίδραση των ζιζανιοκτόνων, ενισχύοντας την αξιοπιστία των τοξικολογικών δοκιμών. Στη βιβλιογραφία σπάνια συναντάμε semi-static τοξικολογικές δοκιμές, ενώ ειδικά στον τομέα της συνδυασμένης τοξικότητας, δεν υπάρχουν δημοσιεύσεις που να χρησιμοποιούν την μέθοδο αυτή.

Ακόμα, παρατηρώντας την ανάπτυξη των φυτών της *L.minor* και πως αυτή διαφοροποιήθηκε στις διάφορες συγκεντρώσεις των τεσσάρων ζιζανιοκτόνων (Γράφημα 1.4, Γράφημα 1.5, Γράφημα 1.6, Γράφημα 1.7), γίνεται φανερό ότι τα φυτά που ήταν εκτεθειμένα στη μικρότερη συγκέντρωση (ή και στις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις) είχαν μεγαλύτερη ανάπτυξη από τον μάρτυρα. Το γεγονός αυτό θα

μπορούσε να αποδοθεί στο φαινόμενο της «όρμισης»³, αλλά η επιβεβαίωσή της υπόθεσης αυτής χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η τοξικότητα για την *L.minor* των τεσσάρων ζιζανιοκτόνων που μελετήθηκαν όπως είναι φυσικό δεν ήταν ίδια. Συγκεκριμένα, η σειρά τοξικότητάς τους ήταν: tribenuron methyl > metribuzin > tritosulfuron > terbuthylazine (βλ. Γράφημα 1.3, Πίνακας 1.3, Πίνακας 1.4, Πίνακας 1.5, Πίνακας 1.6), και ήταν ίδια για όλα τα κριτήρια αξιολόγησης (αριθμός φυλλιδίων, επιφάνεια φυλλιδίων, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης αριθμού φυλλιδίων, μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης επιφάνειας). Και στα τέσσερα ζιζανιοκτόνα τα EC₅₀ του αριθμού φυλλιδίων και της επιφάνειας είναι μικρότερα από αυτά του μέσου ειδικού ρυθμού αύξησης τους. Αυτό όμως, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα (βλ. υποκεφ.1.1.3), δεν πρέπει να εκληφθεί ως διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ των κριτηρίων αξιολόγησης, αλλά ως μαθηματική διαφορά (OECD, 2006). Ωστόσο, μεταξύ επιφάνειας και αριθμού φυλλιδίων (και για τα δύο κριτήρια) παρατηρούμε ότι η επιφάνεια είναι για όλες τις δραστικές ουσίες πιο ευαίσθητη (μικρότερα EC₅₀), αλλά η διαφορά αυτή δεν είναι αξιόλογη. Γενικότερα, η επιλογή κριτηρίου αξιολόγησης για τον υπολογισμό της τοξικότητας των τεσσάρων αυτών ζιζανιοκτόνων αποδεικνύεται μη σημαντική, καθώς σύμφωνα με τους κανονισμούς, σημαντική θεωρείται η διαφορά των EC₅₀ όταν είναι δεκαπλάσια και άνω (Cedergreen & Streibig, 2005a), ενώ στις εξεταζόμενες περιπτώσεις η μέγιστη διαφορά ήταν 2,5.

Παρατηρώντας τις τιμές b της εξίσωσης δόσης απόκρισης (Εξίσωση 1.16) για όλα τα ζιζανιοκτόνα, διαπιστώνεται ότι για τους παρεμποδιστές του PSII (terbuthylazine, metribuzin) η μέγιστη τιμή αφορά τον αριθμό φυλλιδίων ενώ για τους παρεμποδιστές του ALS (tritosulfuron, tribenuron methyl) αφορά την επιφάνεια. Σημειώνεται, ότι όσο μεγαλύτερη η σχετική κλίση b, τόσο πιο «απότομη» η λογιστική καμπύλη. Αυτό σημαίνει ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης των ζιζανιοκτόνων του PSII επηρεάζεται περισσότερο ο αριθμός των φυλλιδίων, ενώ με αύξηση της συγκέντρωσης των ζιζανιοκτόνων που παρεμποδίζουν το ALS επηρεάζεται περισσότερο η επιφάνεια των φυλλιδίων. Υπάρχει, δηλαδή, μια ένδειξη ότι τα πρώτα με τον μηχανισμό δράσης τους επηρεάζουν κατά κύριο λόγο την δημιουργία νέων φυλλιδίων ενώ τα δεύτερα επηρεάζουν κατά κύριο λόγο την αύξηση της επιφάνειας των φυλλιδίων.

³ Όρμιση είναι το φαινόμενο εκείνο κατά το οποίο ενώ μια χημική ένωση είναι τοξική σε υψηλές συγκεντρώσεις, σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχει διεγερτική επίδραση σε ένα ή και παραπάνω χαρακτηριστικά ενός οργανισμού (Calabrese & Baldwin, 2002).

Συγκρίνοντας τα πλακίδια των παρεμποδιστών του PSII, στην Εικόνα 1.4, με τα πλακίδια των παρεμποδιστών του ALS, στην Εικόνα 1.5, συμπεραίνεται ότι στα δεύτερα παρατηρούνται χλωρωτικά συμπτώματα στα φυτά σε ορισμένες συγκεντρώσεις ενώ στα πρώτα δεν υπάρχει κανένα σύμπτωμα. Με δεδομένο ότι οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις σε όλα τα ζιζανιοκτόνα δημιουργούν παρόμοια παρεμπόδιση στην ανάπτυξη (εύρος 0-100%) υποθέτουμε ότι σε συγκεντρώσεις ίδιας τοξικότητας για την ανάπτυξη της *L.minor* οι παρεμποδιστές του ALS μειώνουν την συγκέντρωση της χλωροφύλλης ενώ οι παρεμποδιστές του PSII όχι. Η υπόθεση αυτή έχει επιβεβαιωθεί σε προηγούμενη εργασία (Mouzaki-Paxinou et al., 2013). Σύμφωνα με το θεωρητικό υπόβαθρο του μηχανισμού δράσης των παρεμποδιστών του PSII (βλ. Εισαγωγή υποκεφ. 0.4.1) τα ζιζανιοκτόνα αυτά δημιουργούν χλωρωτικά συμπτώματα λόγω καταστροφής των χλωροφυλλών μέσω των αντιδράσεων φωτοοξειδωτικής (Ελευθεροχωρινός, 2008). Το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν τέτοια συμπτώματα οφείλεται πιθανώς στην χρονική διάρκεια της τοξικολογικής δοκιμής (7 ημέρες), καθώς ενδέχεται να απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την εμφάνιση αυτών των συμπτωμάτων. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν είναι τόσο υψηλές ώστε να προκαλέσουν τα συμπτώματα αυτά. Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ώστε να υπάρχουν συγκεντρώσεις στο εύρος παρεμποδίσεων 0-100% αλλά, δόθηκε έμφαση στις χαμηλές συγκεντρώσεις με στόχο να εντοπιστούν άλλες διαφορές (πχ. φθορισμός χλωροφύλλης, αντιοξειδωτικά ένζυμα, βλ. Κεφ.2,3) σε συγκεντρώσεις κάτω από το LOEC ή ακόμα και το NOEC της ανάπτυξης. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα η μεγαλύτερη συγκέντρωση να προκαλεί παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της τάξεως του 85-95%, ενώ παράλληλα δεν ήταν ικανή να προκαλέσει, σε διάρκεια μίας εβδομάδας, χλωρωτικά συμπτώματα στα φυτά της *L.minor*.

Τα αποτελέσματα της τοξικότητας του terbutylazine έρχονται σε συμφωνία με αυτά των Cedergreen & Streibig (2005b), που βρήκαν ότι το E_rC_{50} του στη *L.minor* ήταν 105 $\mu\text{g/l}$ (κριτήριο αξιολόγησης ο μέσος ειδικός ρυθμός αύξησης της επιφάνειας) ενώ στην παρούσα εργασία ήταν 162 $\mu\text{g/l}$. Η τοξικολογική δοκιμή της εργασίας αυτής είναι, σε αντίθεση με την παρούσα, σε static συνθήκες (χωρίς αλλαγές των θρεπτικών υλικών κατά τη διάρκεια του πειραματισμού), αλλά, παρόλα αυτά, τα EC_{50} είναι παρεμφερή. Όσο αφορά στο metribuzin, οι Fairchild et al. (1997), με κριτήριο αξιολόγησης τον αριθμό φυλλιδίων, υπολόγισαν το E_yC_{50} στη *L.minor* για δοκιμή τεσσάρων ημερών, φωτοπερίοδο 16:8 h και static συνθήκες, στα 37 $\mu\text{g/l}$. Μολονότι υπήρχαν διαφορές στη

διάρκεια αλλά και στις συνθήκες των τοξικολογικών δοκιμών, η διαφορά στο E_yC_{50} με την παρούσα εργασία (46,87μg/l) είναι αμελητέα. Αντίστοιχα, παρεμφερή τοξικότητα με αυτή του tritosulfuron (E_yC_{50} 87,2 μg/l), βρέθηκε για την *Lemna gibba* (E_yC_{50} 35,5 μg/l) (BVL, 2002). Τέλος, σε μελέτη της τοξικότητας του tribenuron-methyl, πάλι στην *Lemna gibba*, το E_yC_{50} για 14 μέρες έκθεση προσδιορίστηκε στα 4,25 μg/l (FAO, 2011), έχοντας ελάχιστη διαφορά με το αντίστοιχο της *L.minor* που παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.6 και ήταν 3,48 μg/l. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι για τα δύο τελευταία ζιζανιοκτόνα δεν βρέθηκε καμία δημοσίευση σε επιστημονικό περιοδικό που να αναφέρει EC_{50} τους για είδη του γένους *Lemna*.

Όσο αφορά στα μίγματα των ζιζανιοκτόνων, το μοντέλο της προσθετικής δράσης CA περιέγραψε με ακρίβεια το μίγμα του terbuthylazine με το metribuzin, των δύο παρεμποδιστών του PSII, ενώ το μοντέλο της ανεξάρτητης δράσης IA δεν προέβλεψε τα αποτελέσματα σε ικανοποιητικό βαθμό. Συνεπώς, τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την καταλληλότητα της CA να προβλέπει το αποτέλεσμα μιγμάτων με τον ίδιο τρόπο δράσης (van Gestel et al., 2010) όπως ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με το θεωρητικό υπόβαθρο της (βλ. υποκεφ. 1.1.4.1). Σύμφωνα με τους Perez et al. (2011) η τοξικότητα του μίγματος του terbuthylazine με το simazine (επίσης παρεμποδιστή του PSII) στο φύκος *Pseudokirchneriella subcapitata* προβλέφθηκε επίσης από την CA, ενώ στο ίδιο συμπέρασμα έφτασαν και οι Drost et al. (2003), για μίγματα τριαζινών στη *L.minor*, αλλά και οι Faust et al. (2001) για μίγματα επίσης τριαζινών στο φύκος *Scenedesmus vacuolatus*.

Και στις δύο περιπτώσεις μιγμάτων ενός ζιζανιοκτόνου του PSII και ενός παρεμποδιστή του ALS παρατηρήθηκε ανταγωνισμός (Γράφημα 1.11, Γράφημα 1.12) για τις περισσότερες αναλογίες των συγκεντρώσεων. Μια πιθανή αιτία της ανταγωνιστικής δράσης σχετίζεται με την ταχύτητα δράσης των ζιζανιοκτόνων αυτών, καθώς αυτή των παρεμποδιστών του ALS είναι αργή (Shaner, 1991), ενώ αυτή των παρεμποδιστών του PSII είναι γρήγορη (Cedergreen et al., 2007b). Οι γρήγορης δράσης παρεμποδιστές του PSII, λοιπόν, μειώνουν την απορρόφηση αλλά και την μετακίνηση του παρεμποδιστή του ALS, καθώς καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες λόγω της υπεροξειδωσής των λιπαρών οξέων, το οποίο οδηγεί τελικά στην παρεμπόδιση και των δύο διαδικασιών (Schuster et al., 2009). Σε πολλές εργασίες έχει βρεθεί ανταγωνιστική δράση μεταξύ συστηματικών ζιζανιοκτόνων που έχουν αργό τρόπο δράσης και ζιζανιοκτόνων με γρήγορο τρόπο δράσης. Οι Cedergreen et al. (2007), βρήκαν ανταγωνιστική δράση στην

L.minor μεταξύ του terbuthylazine και του metsulfuron methyl (παρεμποδιστής του ALS). Ανάλογη δράση είχε και στο *Alternanthera philoxeroides* ο συνδυασμός του propanil (παρεμποδιστής του PSII) με το penoxsulam (αργής δράσης συστηματικό ζιζανιοκτόνο, παρεμποδιστής του ALS) (Willingham et al., 2008).

Σε αντίθεση τόσο με το μίγμα των δύο παρεμποδιστών του PSII όσο και με το θεωρητικό υπόβαθρο της CA, η τοξικότητα του μίγματος των δύο σουλφονουλουριών δεν προβλέφθηκε από τη CA όπως ήταν αναμενόμενο, αλλά ήταν συνεργιστική σε όλα τα επίπεδα των συνδυασμών. Η συνεργιστική αυτή δράση δεν είναι έντονη καθώς για την επίτευξη 50% παρεμπόδισης στην ανάπτυξη χρειάζεται το 75% των αναμενόμενων ($\Sigma TU=0,75$), με βάση την CA, συγκεντρώσεων. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από το σχήμα της καμπύλης του ισοβιολογραφήματος (Γράφημα 1.13). Αντίστοιχα συνεργιστική δράση βρήκαν σε φ.π. με ίδιο μηχανισμό δράσης, αλλά σε πολύ μεγάλο βαθμό ($\Sigma TU=0,25$), βρήκαν οι Woods et al. (2002) μεταξύ των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων chlorpyrifos και profenofos. Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς που μπορούν να οδηγήσουν σε φαινόμενα συνεργισμού μιγμάτων φ.π. σχετίζεται με τις μεταβολικές ενζυμικές δραστηριότητες. Η μία δραστική ουσία μπορεί να μειώσει τον ρυθμό μεταβολισμού της άλλης δραστικής ουσίας, δημιουργώντας τελικά αυξημένη τοξικότητα (Cedergreen, 2014). Καθώς το tritosulfuron και το tribenuron methyl παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση αμινοξέων, δημιουργούν προβλήματα στη σύνθεση πρωτεϊνών άρα και ενζύμων. Μια πιθανή εξήγηση της συνεργιστικής δράσης που παρατηρήθηκε θα ήταν η δημιουργία προβλημάτων στην λειτουργία ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στον μεταβολισμό των ζιζανιοκτόνων από το κύτταρο, όπως για παράδειγμα οι S μεταφοράδες της γλουταθειόνης-GST's, οδηγώντας, σύμφωνα με τα παραπάνω, σε συνεργισμό. Η υπόθεση αυτή, όμως, απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση καθώς είναι αναγκαία η σύγκριση της δραστηριότητας των ενζύμων αυτών όταν τα φυτά εκτίθενται στις μεμονωμένες δραστικές ουσίες με την δραστηριότητά τους σε έκθεση στο μίγμα των δύο δραστικών.

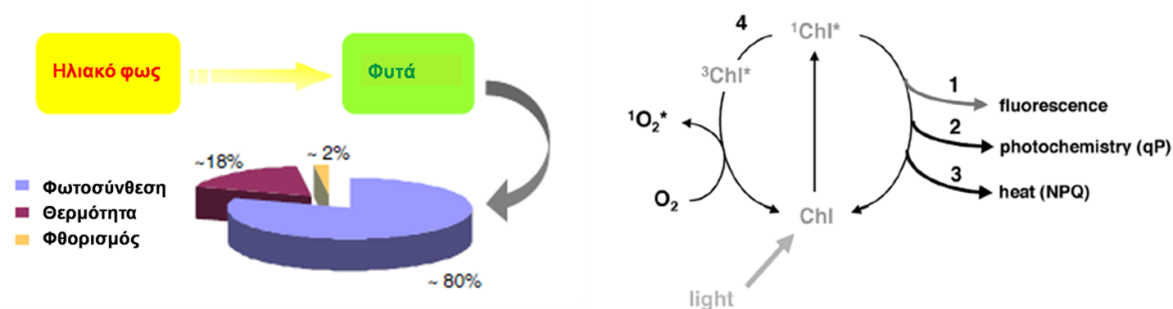
Όπως ήδη αναφέρθηκε, σύμφωνα με το θεωρητικό υπόβαθρο των μοντέλων της προσθετικής δράσης CA και της ανεξάρτητης δράσης IA, το πρώτο αφορά μίγματα δραστικών ουσιών με τον ίδιο μηχανισμό δράσης και το δεύτερο μίγματα δραστικών ουσιών με διαφορετικό τρόπο δράσης. Ως εκ τούτου, αναμένεται η CA να περιγράψει καλύτερα τα αποτελέσματα των terbuthylazine- metribuzin και tritosulfuron- tribenuron methyl και η IA αυτά των terbuthylazine-tritosulfuron και metribuzin - tritosulfuron. Η

ΙΑ όμως, όχι μόνο δεν περιέγραψε τα αποτελέσματα των μιγμάτων αυτών, καθώς βρέθηκε ανταγωνιστική δράση σε αυτά, αλλά και το τροποποιημένο μοντέλο της CA τα περιέγραψε καλύτερα, σε σχέση με το τροποποιημένο μοντέλο της ΙΑ, και στις δύο περιπτώσεις. Ακόμα, συγκρίνοντας στις δύο αυτές περιπτώσεις τα βασικά μοντέλα της CA και ΙΑ (σύμφωνα με το άθροισμα τετραγώνων των αποκλίσεων) συμπεραίνουμε ότι η CA είναι καταλληλότερη για την περιγραφή των δεδομένων της συνδυασμένης τοξικότητας. Το μοντέλο της CA έχει προταθεί ως το μοντέλο για την πρόβλεψη της συνδυασμένης τοξικότητας, σε ανασκόπηση που έγινε για την Ευρωπαϊκή Επιτροπή με θέμα την τοξικότητα μιγμάτων (Kortenkamp et al., 2009). Σύμφωνα με την ανασκόπηση αυτή η CA είναι πιο συντηρητικό μοντέλο, ενώ για την πρόβλεψη της τοξικότητας απαιτείται η τιμή EC_{50} , η οποία σε πολλές περιπτώσεις είναι γνωστή για τα φ.π, γεγονός που διευκολύνει τον υπολογισμό. Ακόμα το θεωρητικό υπόβαθρο της ΙΑ τίθεται υπό αμφισβήτηση καθώς η απόλυτα ανεξάρτητοι μηχανισμοί δράσης στην πραγματικότητα είναι σπάνιοι λόγω των συνδεδεμένων υποσυστημάτων και των κοινών μονοπατιών μεταφοράς σημάτων (Kortenkamp et al., 2009, Cedergreen et al., 2008).

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Εισαγωγή

Όταν η φωτεινή ενέργεια απορροφάται από τα μόρια χλωροφύλλης, προκαλεί διέγερση του κέντρου αντίδρασης των φωτοσυστημάτων. Η αποδιέγερση των κέντρων αντίδρασης μπορεί να συντελεστεί μέσω τριών οδών, όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα (βλ. Εισαγωγή υποκεφ. Φωτεινές αντιδράσεις, υποκεφ. Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος II) Συγκεκριμένα, μπορεί να αποβληθεί με την μορφή θερμότητας (μη φωτοχημική απόσβεση-Non Photochemical Quenching-NPQ), με την μορφή φθορισμού της χλωροφύλλης *a* ή τέλος να οδηγήσει σε φωτοχημικές αντιδράσεις (φωτοχημική απόσβεση/photochemical quenching) (Εικόνα 2.1) (Müller et al., 2001, Αϊβαλάκης κ.α., 2005). Αυτοί οι τρεις δρόμοι ανταγωνίζονται μεταξύ τους έτσι ώστε η όποια αύξηση στην απόδοση του ενός, θα οδηγήσει σε μείωση της απόδοσης των άλλων δύο. Συνεπώς, με την μέτρηση της απόδοσης του φθορισμού της χλωροφύλλης *a*, λαμβάνονται πληροφορίες αφενός για τις αλλαγές στην αποδοτικότητα των φωτοχημικών αντιδράσεων και αφετέρου για την απαγωγή θερμότητας (Maxwell & Johnson, 2000).



Εικόνα 2.1: Οι τρεις «δρόμοι» της φωτεινής ενέργειας (τροποποίηση από: Buonasera et al., 2011, Müller et al., 2001)

Παρόλο που ο φθορισμός αντιστοιχεί στο 1-2% της συνολικής απορροφώμενης φωτεινής ενέργειας, είναι εύκολα, γρήγορα και αξιόπιστα μετρήσιμος και αποτελεί βασικό εργαλείο για την εκτίμηση της φυσιολογικής κατάστασης του φυτού. Ο φθορισμός αντανακλά την αποτελεσματικότητα των σκοτεινών αντιδράσεων καθώς και την συνολική κατάσταση καταπόνησης (stress status) του φυτού. (Bolhar-Nordenkamp et al., 1989). Πιο αναλυτικά, δίνει πληροφορίες για: τη σύνθεση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, τη μεταφορά της ενέργειας διέγερσης, τις αλλαγές στα συμπλέγματα πρωτεϊνών-χρωστικών, τις φωτοχημικές αντιδράσεις, την κινητική και τον ρυθμό ροής ηλεκτρονίων στο PSII, και, τη θέση διαφόρων παρεμποδιστών (Govindjee, 2004). Κάθε

αλλαγή, λοιπόν, στην φωτοσυνθετική διαδικασία ή σε σχετικές βιοχημικές ή φυσιολογικές διαδικασίες θα οδηγήσει σε σημαντικές αλλαγές στην απόδοση και την κινητική του φθορισμού. Καθώς ξενοβιοτικές ουσίες (ζιζανιοκτόνα, φυτοπροστατευτικά προϊόντα, βαρέα μέταλλα κλπ.) δημιουργούν συνθήκες καταπόνησης στα φυτά επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την φωτοσυνθετική λειτουργία οπότε και τον φθορισμό της χλωροφύλλης και μάλιστα σε βαθμό εξαρτώμενο από την συγκέντρωσή τους. Κατά συνέπεια, ο φθορισμός της χλωροφύλλης μπορεί να αποτελέσει ένα ακόμα κριτήριο αξιολόγησης (endpoint), πέρα από την ανάπτυξη, για την εκτίμηση των επιπτώσεων ξενοβιοτικών ουσιών σε φυτά (Buonasera et al., 2011). Είναι, δηλαδή, ένας βιοσημαντής⁴ για την αξιολόγηση τοξικότητας ιδιαίτερα χρήσιμος στις οικοτοξικολογικές μελέτες (Fai et al., 2007, Juneau et al., 2007). Πέρα από την θεωρητική βάση του φθορισμού της χλωροφύλλης, όμως, οι αλλαγές που παρατηρούνται, in vivo είναι πολύπλοκες. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα να είναι συχνά δύσκολη η σωστή εξήγηση των αλλαγών που παρατηρούνται στις διάφορες μετρούμενες παραμέτρους του φθορισμού (Baker, 2008).

Πολλές δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά έχουν χρησιμοποιήσει τον φθορισμό για την μελέτη της τοξικότητας ζιζανιοκτόνων σε υδροχαρή φυτά και σε φύκη (Marwood et al., 2001, Conrad et al., 1993, Kumar et al., 2014, Iriel et al., 2014, Flores et al., 2013, Wahedally et al., 2012), αλλά και συγκεκριμένα στη *L.minor* (Cedergreen et al., 2005, Eullaffroy et al., 2009, Hulsen et al., 2002, Geoffroy et al., 2004). Ακόμα, έχουν γίνει επιστημονικές έρευνες της συνδυασμένης τοξικότητας ζιζανιοκτόνων και βαρέων μετάλλων στη *L.minor*, χρησιμοποιώντας και πάλι τον φθορισμό (Eullaffroy et al., 2007, Frankart et al., 2002), αλλά μόνο μία αντίστοιχη μελέτη που αφορά την συνδυασμένη τοξικότητα ζιζανιοκτόνων (Kumar et al., 2011). Υπάρχει, συνεπώς, ευρύ πεδίο έρευνας της τοξικότητας μιγμάτων ζιζανιοκτόνων στη *L.minor* μέσω της μέτρησης του φθορισμού της χλωροφύλλης.

⁴ Οι βιοσημαντές είναι δείκτες που επισημαίνουν ένα γεγονός ή μια κατάσταση σε ένα βιολογικό σύστημα ή δείγμα και που δίνουν ένα μέτρο της έκθεσης, της επίδρασης ή της ευαισθησίας. Οι δείκτες αυτοί, μπορεί να είναι μια μετρήσιμη μεταβολή σε έναν οργανισμό η οποία μπορεί να είναι χημική, βιοχημική, μεταβολή στη φυσιολογία ή τη συμπεριφορά του, ή ενός άλλου είδους αλλαγή μέσα σε ένα οργανισμό (IUPAC). Παραδείγματα τέτοιων αλλαγών αποτελούν αλλαγές στη δραστηριότητα συγκεκριμένων ενζύμων, αλλαγές στις ορμόνες ή στα πρωτεϊνικά επίπεδα.

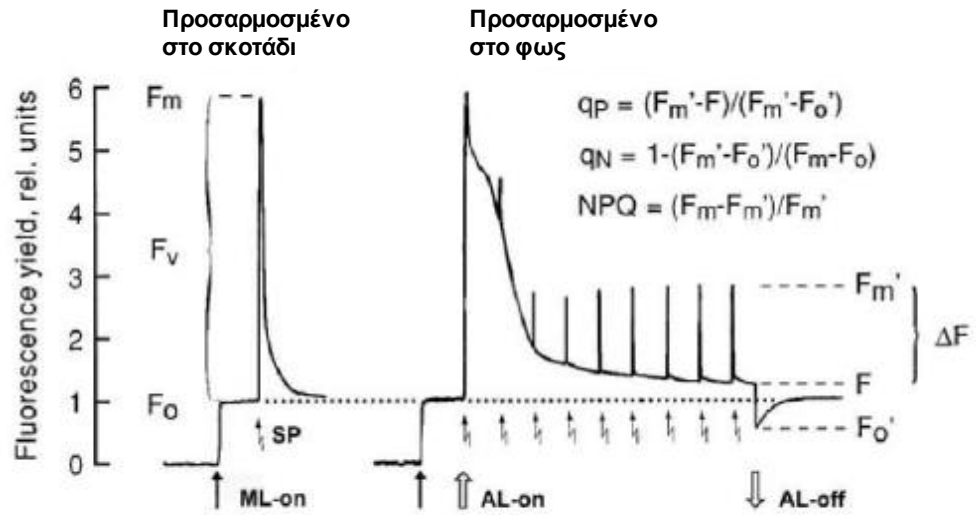
2.1.1 Παράμετροι και κινητική φθορισμού χλωροφύλλης

Αλλαγές στην απόδοση του φθορισμού της χλωροφύλλης παρατηρήθηκαν πρώτη φορά το 1931 από τους Kautsky και Hirsch. Παρατήρησαν ότι η μεταφορά φύλλων από το σκοτάδι στο φως συνοδευόταν από μεγιστοποίηση της απόδοσης του φθορισμού της χλωροφύλλης για χρονικό διάστημα περίπου ενός δευτερολέπτου. Αυτή η αύξηση αποδίδεται στη διαδοχική αναγωγή των αποδεκτών ηλεκτρονίων κατά την αρχική ροή ηλεκτρονίων στο PSII, ιδίως των πλαστοκινονών και συγκεκριμένα της πλαστοκινόνης A (Q_A) (βλ. Εισαγωγή υποκεφ. Ροή ηλεκτρονίων και παραγωγή ενέργειας στις φωτεινές αντιδράσεις). Όταν το PSII απορροφά φως και η Q_A έχει αναχθεί δεχόμενη ένα ηλεκτρόνιο, δεν έχει την δυνατότητα να δεχθεί άλλο ηλεκτρόνιο μέχρι να οξειδωθεί δίνοντας το ηλεκτρόνιό της στην Q_B . Κατά το χρονικό διάστημα αυτό το κέντρο αντίδρασης θεωρείται κλειστό (ανηγμένο). Η παρουσία ποσοστού κλειστών κέντρων αντίδρασης, σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, οδηγεί σε μείωση της απόδοσης της φωτοχημικής απόσβεσης, οπότε και σε αύξηση της απόδοσης του φθορισμού (Maxwell & Johnson, 2000).

Όταν ένα φύλλο παραμένει στο σκοτάδι για αρκετό χρονικό διάστημα (προσαρμοσμένο στο σκοτάδι), οι αποδέκτες ηλεκτρονίων του PSII είναι πλήρως οξειδωμένοι και τα κέντρα αντίδρασης του PSII θεωρούνται ανοικτά (οξειδωμένα) όντας έτοιμα να προσλάβουν φωτεινή ενέργεια. Με την μεταφορά του φύλλου στο φως, τα κέντρα αντίδρασης του PSII κλείνουν (ανάγονται) προοδευτικά. Ο φθορισμός που εμφανίζεται μέσα στα πρώτα ms από την έκθεση στο φως, οπότε και τα κέντρα αντίδρασης του PSII είναι ανοικτά, ονομάζεται ελάχιστος φθορισμός F_0 (Εικόνα 2.2). Η τιμή του F_0 είναι αυξημένη σε περιπτώσεις καταστροφής ορισμένων κέντρων αντίδρασης του PSII ή σε περιπτώσεις όπου παρεμποδίζεται η μεταφορά ενέργειας από τα φωτοσυλλεκτικό σύμπλοκο προς το κέντρο αντίδρασης. Στη συνέχεια της έκθεσης στο φως, στα πρώτα χιλιοστά του δευτερολέπτου, ο εκπεμπόμενος φθορισμός αυξάνεται και φτάνει σε μια μέγιστη τιμή-μέγιστος φθορισμός F_m . Όταν ο φθορισμός γίνεται μέγιστος, τα κέντρα αντίδρασης του PSII καθώς και οι αποδέκτες ηλεκτρονίων έχουν αναχθεί πλήρως και θεωρούνται κλειστά, ενώ η ροή ηλεκτρονίων έχει μηδενιστεί. Στη συνέχεια, όμως, το επίπεδο του φθορισμού αρχίζει και μειώνεται ξανά. Το φαινόμενο αυτό, που ονομάζεται απόσβεση φθορισμού, εξηγείται με δύο τρόπους. Πρώτον, υπάρχει αύξηση του ρυθμού με τον οποίο τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το PSII προς το PSI, οπότε και αποκαθίσταται η ομαλή ροή τους, οι αποδέκτες των

ηλεκτρονίων επανοξειδώνονται, τα κέντρα αντίδρασης του PSII ανοίγουν σταδιακά (μερικώς), και ξεκινά η φωτοσυνθετική αφομοίωση του CO₂. Αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της φωτοχημικής απόσβεσης, οπότε και μειώνεται ο φθορισμός. Το πόσο μεγάλη θα είναι η μείωση αυτή, εξαρτάται από το πόσο αποτελεσματικά συνεργάζονται τα δύο φωτοσυστήματα καθώς και από το πόσο αποδοτική είναι η λειτουργία του κύκλου του Calvin. Η άλλη εξήγηση της απόσβεσης του φθορισμού σχετίζεται με την αύξηση της αποτελεσματικότητας με την οποία η ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα, απόσβεση που ονομάζεται μη φωτοχημική. Ο βασικότερος μηχανισμός μη φωτοχημικής απόσβεσης είναι ο κύκλος των ξανθοφυλλών (Καραμπουρνιώτης κ.α., 2012, Maxwell & Johnson, 2000).

Η βασική τεχνική που έδωσε την δυνατότητα μέτρησης των διαφόρων παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης, είναι αυτή των φθορισμομέτρων παλμικής διαμόρφωσης εύρους (σήματος) PAM. Τα φθορισμόμετρα αυτά, λειτουργούν με τρία είδη φωτός, το φως μέτρησης (ΦΜ), το φως κορεσμού (ΦΚ) και το ακτινικό φως (ΑΦ) και ο συνδυασμός τους επιτρέπει την ανάλυση της απόσβεσης του φθορισμού. Αρχικά, σε δείγμα προσαρμοσμένο στο σκοτάδι με την εφαρμογή του φωτός μέτρησης υπολογίζεται ο ελάχιστος φθορισμός F_0 , και αμέσως μετά, με εφαρμογή φωτός κορεσμού (αναλαμπή, ~1sec), υπολογίζεται ο μέγιστος φθορισμός F_m . (Εικόνα 2.2). Στη συνέχεια, εφαρμόζεται ακτινικό φως οπότε και το δείγμα προσαρμόζεται στο φως και γίνεται επαγωγή της φωτοσύνθεσης. Τότε ο τρέχων φθορισμός παίρνει την τιμή F (ή F_t). Με εφαρμογή ανά διαστήματα φωτός κορεσμού μετράται ο μέγιστος φθορισμός σε δείγμα προσαρμοσμένο στο φως, ο F_m' . Η τιμή F_m' είναι μικρότερη από την F_m λόγω παράλληλης απόσβεσης μέρους της ενέργειας διέγερσης της χλωροφύλλης υπό μορφή θερμότητας (μη φωτοχημική απόσβεση). Η μη φωτοχημική απόσβεση υπολογίζεται από την σχετική διαφορά $F_m - F_m'$ και η φωτοχημική απόσβεση από την σχετική διαφορά $F_m' - F$ (Εικόνα 2.2) (Schreiber, 2004). Λεπτομερής καταγραφή και εξήγηση όλων των παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης που χρησιμοποιούνται γίνεται στον Πίνακα 2.1 όπου διακρίνονται με έντονα γράμματα οι πλέον βασικές.



Μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PSII, $\Phi_{PSIIo} = (F_m - F_o) - F_m = F_v / F_m$

Λειτουργική φωτοχημική απόδοση του PSII, $\Phi_{PSII} = (F_m' - F) / F_m' = \Delta F / F_m'$

Εικόνα 2.2: Κινητική της απόδοσης του φθορισμού. Η πρώτη καμπύλη (προσαρμοσμένο στο σκοτάδι) είναι η καμπύλη Kautsky. ML: φως μέτρησης, AL: ακτινικό φως, SP: φως κορεσμού (Schreiber, 2004)

Πίνακας 2.1: Ονοματολογία, υπολογισμός και φυσιολογική σημασία των παραμέτρων του φθορισμού χλωροφύλλης (Καραμπουρνιώτης κ.α., 2012 Baker, 2008)

Συμβολισμός	Υπολογισμός	Παράμετρος	Φυσιολογική σημασία	Συνθήκες φωτισμού κατά τη μέτρηση
F, F', F'_t	-	απόδοση φθορισμού	η σχετική ένταση του φθορισμού όπως καταγράφεται από το όργανο μέτρησης, δίνουν λίγες πληροφορίες για την φωτοσυνθετική απόδοση	ΦΜ και επιπλέον οποιοδήποτε άλλο είδος ακτινοβολίας
F_o	-	ελάχιστος φθορισμός βάσης	η ελάχιστη σχετική ένταση φθορισμού σε δείγμα εγκλιματισμένο στο σκοτάδι (φωτοχημικά κέντρα PSII ανοικτά, πλαστοκινόνη Q_A πλήρως οξειδωμένη)	ΦΜ
F_m	-	απόλυτα μέγιστος φθορισμός	η μέγιστη σχετική ένταση φθορισμού σε δείγμα εγκλιματισμένο στο σκοτάδι (φωτοχημικά κέντρα PSII κλειστά, πλαστοκινόνη Q_A πλήρως αναγμένη)	ΦΜ και ΦΚ
F'_m	-	μέγιστος φθορισμός	η μέγιστη σχετική ένταση φθορισμού σε δείγμα εγκλιματισμένο στο φως (φωτοχημικά κέντρα PSII κλειστά, πλαστοκινόνη Q_A πλήρως αναγμένη)	ΦΜ, ΑΦ και ΦΚ
F'_o	-	φθορισμός βάσης	η ελάχιστη σχετική ένταση φθορισμού σε δείγμα εγκλιματισμένο στο φως (φωτοχημικά κέντρα PSII ανοικτά, πλαστοκινόνη Q_A πλήρως οξειδωμένη)	ΦΜ και καταγραφή αμέσως μετά την παύση του ΑΦ
F_v	$F_m - F_o$	μεταβλητός φθορισμός	διαφορά μεταξύ απόλυτα μέγιστου φθορισμού και ελάχιστου φθορισμού βάσης / μέγιστη απόδοση χρήσης του απορροφημένου φωτός για την διεξαγωγή φωτοχημικών αντιδράσεων (για την αναγωγή της πλαστοκινόνης Q_A)	ΦΜ και ΦΚ
ΔF	$F'_m - F'_t$	διαφορά φθορισμού μεταξύ F'_m και F'_t	φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού από τα ανοικτά φωτοχημικά κέντρα PS II	ΦΜ, ΑΦ και ΦΚ
Φ_{PSIIo}	F_v / F_m	μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PSII	απόλυτα μέγιστη απόδοση χρήσης του απορροφημένου φωτός για την διεξαγωγή φωτοχημικών αντιδράσεων (για αναγωγή της πλαστοκινόνης Q_A) σε δείγμα εγκλιματισμένο στο σκοτάδι (φωτοχημικά κέντρα PSII ανοικτά)	ΦΜ, ΑΦ και ΦΚ
Φ_{PSII}	$\Delta F / F'_m$	λειτουργική απόδοση του PSII	λειτουργική απόδοση χρήσης του απορροφημένου φωτός για την διεξαγωγή φωτοχημικών αντιδράσεων/ εκτίμη την αποτελεσματικότητα με την οποία το φως που απορροφάται από το PSII χρησιμοποιείται για την αναγωγή της πλαστοκινόνης Q_A	ΦΜ, ΑΦ και ΦΚ
qP	$\Delta F / (F'_m - F'_o)$	συντελεστής απόσβεσης του φθορισμού	συντελεστής της λειτουργικής προς την απόλυτα μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PS II / ποσοστό ανοικτών φωτοχημικών κέντρων PS II (πλαστοκινόνη Q_A οξειδωμένη)	ΦΜ, ΑΦ και ΦΚ
NPQ	$(F_m - F'_m) / F'_m$	ρυθμός μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού	μη-φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού από F_m σε F'_m / εκτίμηση του ρυθμού θερμικής απόσβεσης της ενέργειας του PS II	ΦΜ, ΑΦ και ΦΚ
qN	$(F_m - F'_m) / (F_m - F'_o)$	συντελεστής μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού	συντελεστής της μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού	ΦΜ, ΑΦ και ΦΚ

2.1.2 Μηχανισμός δράσης των ζιζανιοκτόνων και φθορισμός

Στο υποκεφάλαιο αυτό τίθεται το ερώτημα του κατά πόσον ο φθορισμός της χλωροφύλλης αναμένεται να είναι ενδεικτικός της τοξικότητας στη *L.minor* των ζιζανιοκτόνων του PSII αλλά και των παρεμποδιστών της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού. Ο φθορισμός της χλωροφύλλης μπορεί να αποτελέσει, σύμφωνα με το άρθρο ανασκόπησης των Juneau et al. (2007), ένα χρήσιμο δείκτη των επιπτώσεων ζιζανιοκτόνων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης σε φωτοσυνθέτοντες οργανισμούς. Πέρα από το γενικό αυτό συμπέρασμα και πιο συγκεκριμένα, οι παρεμποδιστές του PSII επηρεάζουν με άμεσο τρόπο την φωτοσύνθεση (βλ. Εικόνα 0.7), και όπως αναφέρθηκε στο εισαγωγικό κεφάλαιο (βλ. Εισαγωγή υποκεφ. Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος II) αυξάνουν την εκπομπή φθορισμού και την εκπομπή θερμότητας. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι σε περίπτωση που όλα τα φωτοχημικά κέντρα του PSII είναι κλειστά λόγω της παρουσίας ζιζανιοκτόνων του PSII 95-97% της απορροφούμενης ενέργειας διαχέεται ως θερμότητα και 3-5% ως φθορισμός (Cobb & Reade, 2010). Τα ποσοστά αυτά είναι σημαντικά μεγαλύτερα από ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες (Εικόνα 2.1) και αποτελούν ένδειξη της αποτελεσματικότητας μέτρησης του φθορισμού για την καταγραφή της τοξικότητας των ζιζανιοκτόνων του PSII.

Σε αντίθεση με τα ζιζανιοκτόνα του PSII αυτά που παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού δεν αναμένεται να έχουν άμεση επίδραση στην φωτοσύνθεση. Αναμένεται όμως να επηρεάσουν με έμμεσο τρόπο τις παραμέτρους που μετρώνται μέσω της παραπάνω τεχνικής. Τα ζιζανιοκτόνα αυτά παρεμποδίζοντας την βιοσύνθεση αμινοξέων ουσιαστικά παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση πρωτεϊνών. Έτσι λοιπόν μπορούν να αποδιοργανώσουν τη συγκρότηση των πρωτεϊνών των συμπλόκων των φωτοσυστημάτων (βλ. Εισαγωγή υποκεφ. Χλωροπλάστες και υποκεφ. Φωτεινές αντιδράσεις), την απόδοση των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών και των μηχανισμών επιδιόρθωσης του χλωροπλάστη και συνεπώς να επηρεάσουν την φωτοσύνθεση.

Συμπερασματικά, τόσο τα ζιζανιοκτόνα του PSII terbuthylazine και metribuzin όσο και αυτά που παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού tritosulfuron και tribenuron methyl αναμένεται να επηρεάσουν τις φωτοχημικές παραμέτρους της *L.minor*. Κατά συνέπεια οι μετρήσεις του φθορισμού και ο

υπολογισμός των σχετικών παραμέτρων αναμένεται να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για την τοξικότητα των ζιζανιοκτόνων αυτών.

2.2 Σκοπός του κεφαλαίου

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η επίπτωση των ζιζανιοκτόνων *terbuthylazine*, *metribuzin*, *tritosulfuron* και *tribenuron methyl*, καθώς και η επίπτωση συνδυασμών τους ανά δύο, στον φθορισμό της χλωροφύλλης της *L.minor*. Σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση των διαφορετικών παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης σαν κριτήρια αξιολόγησης της τοξικότητας των ανωτέρω ζιζανιοκτόνων καθώς και η σύγκριση της ευαισθησίας τους. Επίσης στόχος ήταν η διερεύνηση των επιπτώσεων του συνδυασμού των ζιζανιοκτόνων στο φθορισμό της χλωροφύλλης, ώστε να εξακριβωθεί αν υπάρχουν φαινόμενα συνεργισμού ή ανταγωνισμού και αυτά να συγκριθούν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της ανάπτυξης, που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 1.

2.3 Υλικά και μέθοδοι για την φθορισμομετρία χλωροφύλλης

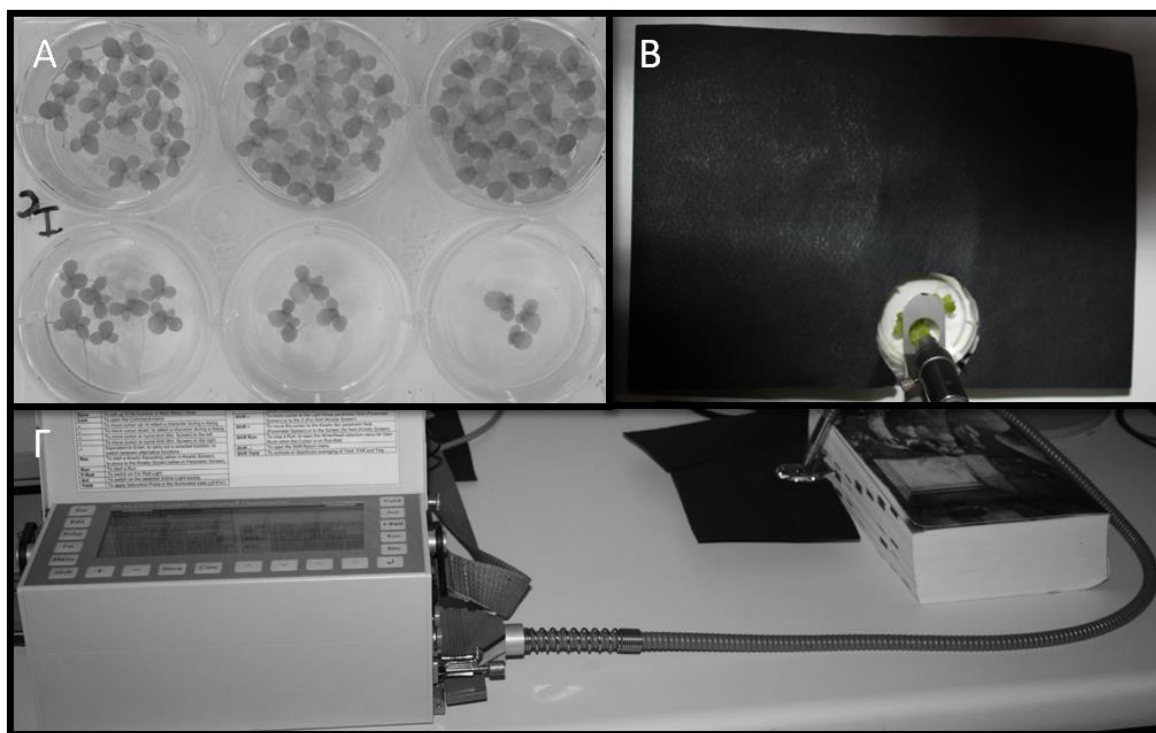
Η μέτρηση των παραμέτρων φθορισμού της χλωροφύλλης έγινε σε τοξικολογικές δοκιμές με μίγματα ζιζανιοκτόνων στη *L.minor*. Η αναλυτική παρουσίαση των παραμέτρων αυτών καθώς και της σημασίας τους γίνεται στον Πίνακα 2.1. Οι δοκιμές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με τις παραμέτρους του φθορισμού που μετρήθηκαν και ανάλογα με τον πλήθος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Στην πρώτη κατηγορία μετρήθηκε η μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PSII (Φ_{PSII} ή F_v/F_m), ενώ στη δεύτερη έγινε καταγραφή της βραδείας κινητικής επαγωγής του φθορισμού της χλωροφύλλης. Σε όλα τα πειράματα των τεσσάρων συνδυασμών *terbuthylazine-metribuzin*, *terbuthylazine-tritosulfuron*, *metribuzin-tritosulfuron*, και *tritosulfuron-tribenuron methyl* γίνονταν καθημερινά μετρήσεις (day0-day7). Αυτές, έγιναν με το φορητό φθορισμόμετρο χλωροφύλλης Walz PAM-2100 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany), με τη χρήση της υποδοχής ίνας φθορισμού σταθερής απόστασης (Distance Clip) (Εικόνα 2.3) και σε συνθήκες πολύ χαμηλής έντασης του περιβάλλοντος φωτισμού ώστε να μην υπάρχει ακτινική επίδρασή του στα δείγματα.

2.3.1 Μέτρηση της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης του PSII (Φ_{PSII})

Στην πρώτη κατηγορία πειραμάτων ο σχεδιασμός του πειράματος το πρωτόκολλο πειραματισμού καθώς και οι συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών που μελετήθηκαν, ήταν ίδια με αυτά που περιγράφονται στο ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 (βλ. υποκεφ. 1.2). Συνεπώς,

για κάθε συνδυασμό ζιζανιοκτόνων δοκιμάστηκαν 5 μίγματα*6 συγκεντρώσεις=30 διαφορετικές μεταχειρίσεις. Στις πειραματικές δοκιμές ο αριθμός των επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση ήταν 3 (3*30=90 παρατηρήσεις) και 12 για τους μάρτυρες αντίστοιχα, συνολικά δηλαδή 102 παρατηρήσεις. Σε όλες τις παρατηρήσεις μετρήθηκε η μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PSII (Φ_{PSII_0} ή F_v/F_m). Την πρώτη μέρα πειραματισμού έγινε μέτρηση στις 3 ώρες έκθεσης και στην συνέχεια κάθε 24 ώρες.

Αρχικά, τα φυτά προσαρμόστηκαν στο σκοτάδι για 20 min και στη συνέχεια εφαρμόστηκε ερυθρό φως μέτρησης (ML, 650 nm, PAR <0,15 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) και κατόπιν λευκό φως κορεσμού (Saturation Pulse, SP) έντασης 15.000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για 0,8 sec. Καθώς τα πλακίδια στα οποία έγινε ο πειραματισμός έχουν 6 θέσεις, κατά τη μέτρηση της κάθε μεταχείρισης οι υπόλοιπες 5 μεταχειρίσεις μασκάρωνταν με μαύρο χαρτόνι ώστε να μην δέχονται τον φωτισμό των μετρούμενων θέσεων.



Εικόνα 2.3: Απεικονίζονται: Α) Πλακίδιο κυτταροκαλλιέργειας με την *Lemna minor* εκτεθειμένη σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις Β) Η ίνα φθορισμού στην υποδοχή σταθερής απόστασης (Distance Clip) κατά τη διάρκεια της μέτρησης (όψη από πάνω) Γ) Η συνδεσμολογία του φθορισμόμετρου χλωροφύλλης PAM-2100 και της ίνας φθορισμού κατά την διάρκεια της μέτρησης.

2.3.2 Μέτρηση των παραμέτρων της καμπύλης βραδείας κινητικής επαγωγής της φωτοσύνθεσης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρώτης κατηγορίας πειραμάτων επιλέχθηκαν τρεις συγκεντρώσεις από τα μεμονωμένα ζιζανιοκτόνα και μία συγκέντρωση από τον κάθε συνδυασμό ώστε να μετρηθούν σε αυτές οι παράμετροι της καμπύλης βραδείας

κινητικής επαγωγής του φθορισμού. Η μόνη εξαίρεση ήταν ο συνδυασμός terbuthylazine-metribuzin για τον οποίο έγιναν μετρήσεις των παραπάνω παραμέτρων σε όλες τις συγκεντρώσεις και τους συνδυασμούς. Την πρώτη μέρα πειραματισμού έγινε μέτρηση στις 4 και τις 8 ώρες έκθεσης και στην συνέχεια κάθε 24 ώρες μέχρι το τέλος (day 7).

Αρχικά, τα φυτά προσαρμόστηκαν στο σκοτάδι για 20 min και στη συνέχεια εφαρμόστηκε ερυθρό φως μέτρησης και κατόπιν λευκό φως κορεσμού (Saturation Pulse, SP) έντασης $15.000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για 0,8 sec, ακριβώς όπως και στην προηγούμενη πειραματική ενότητα. Ακολούθως, εφαρμόστηκε ερυθρό ακτινικό φως (AL, ερυθρό, PAR 80 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) και εφαρμόζονταν παλμοί κορεσμού (SP, λευκό, PAR 15.000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) κάθε 1 λεπτό για το αναγκαίο χρονικό διάστημα ώστε να προσδιοριστεί η λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} .

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τον Πίνακα 2.1, η μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PSII, Φ_{PSII_0} ή F_v/F_m , η λειτουργική φωτοχημική απόδοση του PSII Φ_{PSII} , ο συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού qP , ο συντελεστής μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού qN , ο ρυθμός μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού NPQ, και ο ρυθμός ροής ηλεκτρονίων στη φωτοχημική αλυσίδα, ETR. Η παράμετρος ETR αντιστοιχεί στον ρυθμό ροής ηλεκτρονίων λαμβάνοντας υπόψη την φωτοχημική απόδοση του PSII και την απορροφητικότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Υπολογίζεται από τον τύπο $\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times Q \times f_1 \times f_2$, όπου Q η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (στην προκειμένη περίπτωση 80 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), f_1 ο συντελεστής κατανομής φωτονιακής ενέργειας μεταξύ PSII και PSI (τυπικά ίσος με 0,5), f_2 ο συντελεστής απορροφητικότητας φύλλου (τυπικά χρησιμοποιείται η τιμή 0,84) (Baker, 2008).

2.3.3 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων από τα μίγματα των ζιζανιοκτόνων στις περιπτώσεις που υπήρχαν αρκετά δεδομένα για την δημιουργία καμπύλης δόσης-απόκρισης (Εξίσωση 1.16), τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν (και για τα μεμονωμένα ζιζανιοκτόνα και για τους συνδυασμούς τους) σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 1.3.4 και σε συμφωνία με τους Marwood et al. (2001).

Στις περιπτώσεις που **δεν** υπήρχαν αρκετά δεδομένα για την δημιουργία καμπύλης δόσης-απόκρισης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που προτείνεται από τον Gisi (1996). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, το ποσοστό της προβλεπόμενης παρεμπόδισης του μίγματος σε σχέση με τον μάρτυρα υπολογίζεται από την Εξίσωση 2.1:

$$\text{Εξίσωση 2.1:} \quad \% I_{\text{exp}} = A + B - (A * B / 100)$$

Όπου $\% I_{\text{exp}}$ είναι το ποσοστό της προβλεπόμενης παρεμπόδιση του μίγματος σε σχέση με τον μάρτυρα, A είναι το ποσοστό της παρεμπόδισης του συστατικού A όταν δρα μόνο του στην ίδια συγκέντρωση που βρίσκεται και στο μίγμα, και B είναι το ποσοστό της παρεμπόδισης του συστατικού B όταν δρα μόνο του, στην ίδια συγκέντρωση που βρίσκεται και στο μίγμα.

Με βάση τα παραπάνω, υπολογίζεται ο λόγος των παρεμποδίσεων (ratio of inhibition, RI), των μιγμάτων σύμφωνα με την Εξίσωση 2.2:

$$\text{Εξίσωση 2.2:} \quad \text{RI} = \text{Παρατηρούμενη παρεμπόδιση} / \% I_{\text{exp}}$$

Αν ο λόγος των παρεμποδίσεων RI είναι ίσος με 1 το μίγμα έχει προσθετική δράση, αν είναι μεγαλύτερος από 1 συνεργιστική και αν είναι μικρότερος από 1 ανταγωνιστική. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε το εξής εύρος τιμών του RI για την εκτίμηση της δράσης του μίγματος: <0,5 ανταγωνιστική, 0,5-1,5 προσθετική και >1,5 συνεργιστική.

Τέλος, ο προσδιορισμός των NOEC και LOEC και των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ συγκεντρώσεων, έγινε μετά από ανάλυση διασποράς (ANOVA) και εφαρμογή της post-hoc δοκιμασίας Dunnett, με το στατιστικό πρόγραμμα JMP version 10 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

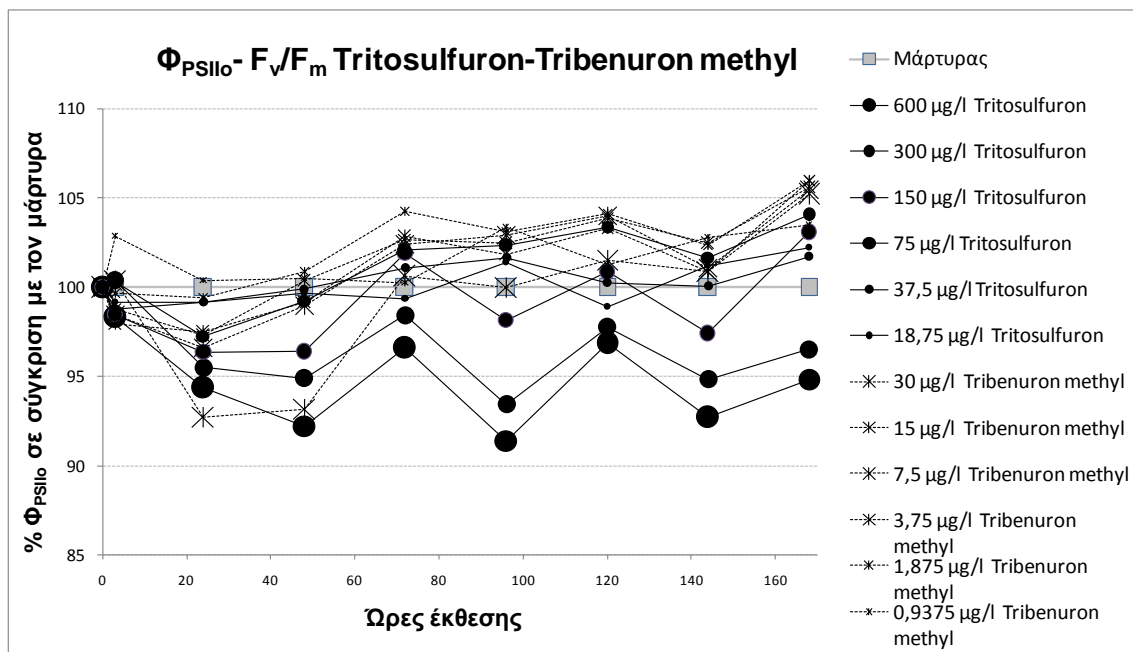
2.4 Αποτελέσματα φθορισμομετρίας χλωροφύλλης

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φθορισμομετρίας της χλωροφύλλης. Εκτενής είναι η αναφορά στη μέγιστη και τη λειτουργική φωτοχημική απόδοση, καθώς αποτελούν και τις βασικότερες μετρούμενες παραμέτρους του φθορισμού, ενώ γίνεται επιλεκτική αναφορά στις υπόλοιπες παραμέτρους.

2.4.1 Tritosulfuron-Tribenuron methyl

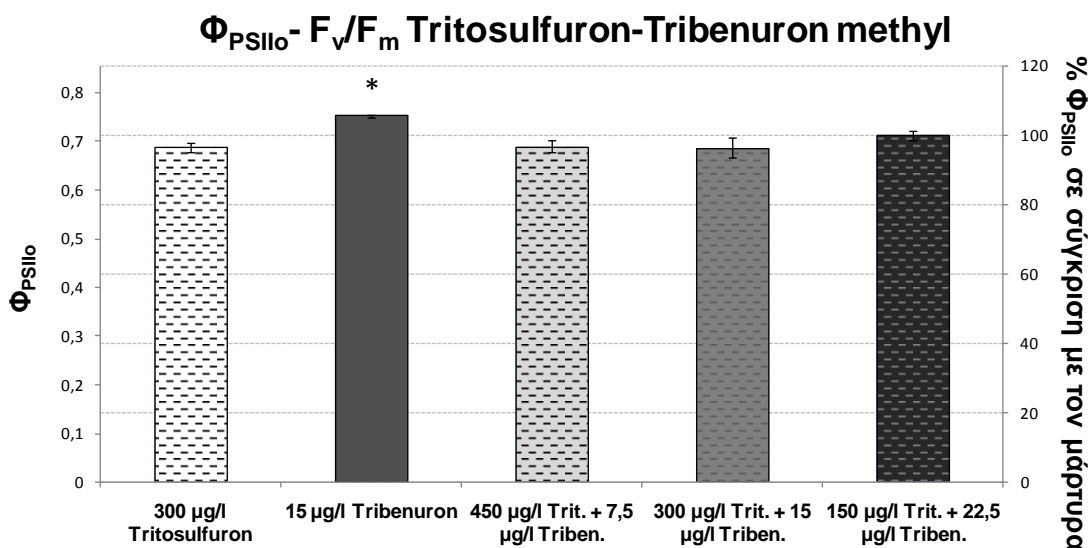
Στην πρώτη σειρά πειραμάτων του συνδυασμού tritosulfuron-tribenuron methyl μετρήθηκε η μέγιστη φωτοχημική απόδοση (Φ_{PSIIo} ή F_v/F_m). Στο Γράφημα 2.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων (% σε σχέση με τον μάρτυρα)

για τις έξι συγκεντρώσεις του tritosulfuron και τις έξι συγκεντρώσεις του tribenuron methyl στη διάρκεια της τοξικολογικής δοκιμής. Η μέγιστη μείωση της Φ_{PSII} παρατηρείται στη μέγιστη συγκέντρωση του tritosulfuron, και φτάνει στο 9% (91% του μάρτυρα), ενώ διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τον μάρτυρα από τις 24 ώρες και μέχρι το τέλος της έκθεσης (One-way ANOVA, Dunnett's test). Το tribenuron methyl στη μεγαλύτερη συγκέντρωσή του προκαλεί σημαντική μείωση κατά 7% στις 24 και στις 48 ώρες (One-way ANOVA, Dunnett's test, $p < 0,001$), ενώ στη συνέχεια φτάνει στο επίπεδο του μάρτυρα ξανά.



Γράφημα 2.1: Η μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} της *Lemna minor* σε σύγκριση με τον μάρτυρα καθ' όλη την διάρκεια της έκθεσης στις 6 συγκεντρώσεις του tritosulfuron και στις 6 συγκεντρώσεις του tribenuron methyl (Μάρτυρας=100%)

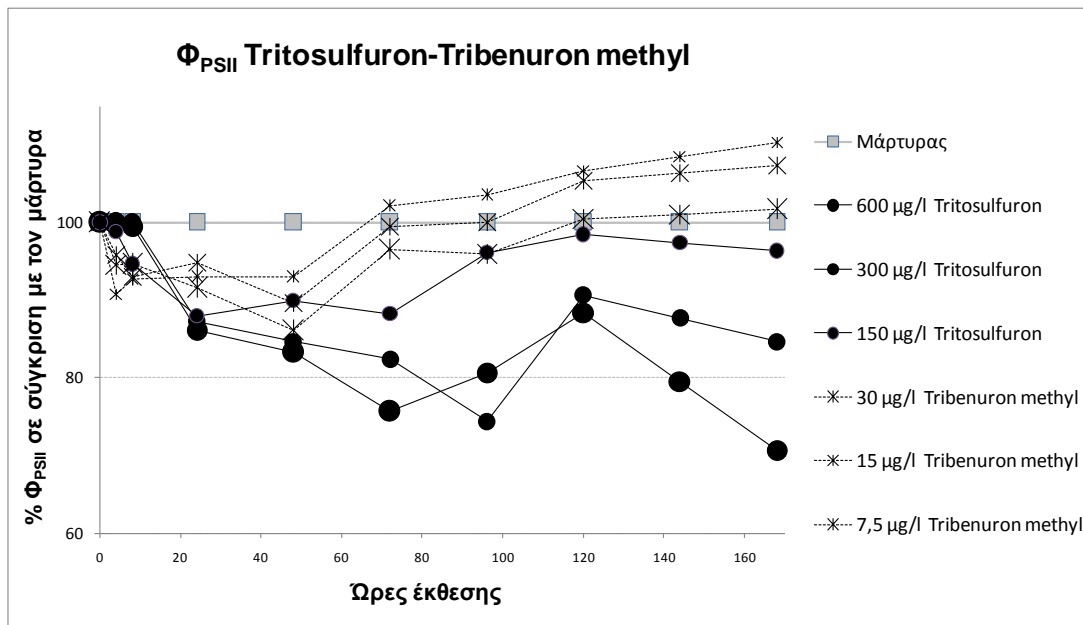
Στο Γράφημα 2.2 παρουσιάζεται η μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} - F_v/F_m για τις τρεις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των συνδυασμών, καθώς και τις δεύτερες μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των μεμονωμένων δραστικών ουσιών κατά την τελευταία μέρα έκθεσης. Όπως διαφαίνεται από το γράφημα, η μέγιστη φωτοχημική απόδοση των συγκεντρώσεων αυτών δεν διαφέρει από αυτή του μάρτυρα (100%). Εξαιρέση αποτελεί η δεύτερη μεγαλύτερη συγκέντρωση του tribenuron methyl, στην οποία ήταν αυξημένη κατά 5%. Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάστηκε για όλες τις συγκεντρώσεις, τόσο των μεμονωμένων δραστικών όσο και των συνδυασμών και σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.



Γράφημα 2.2: Η μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} της *Lemna minor* μετά από 7 ημέρες έκθεσης σε μία συγκέντρωση του tritosulfuron, μία του tribenuron methyl αλλά και σε τρεις συνδυαστικές συγκεντρώσεις των δύο δραστικών (Μάρτυρας=100%, μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p \leq 0,05).

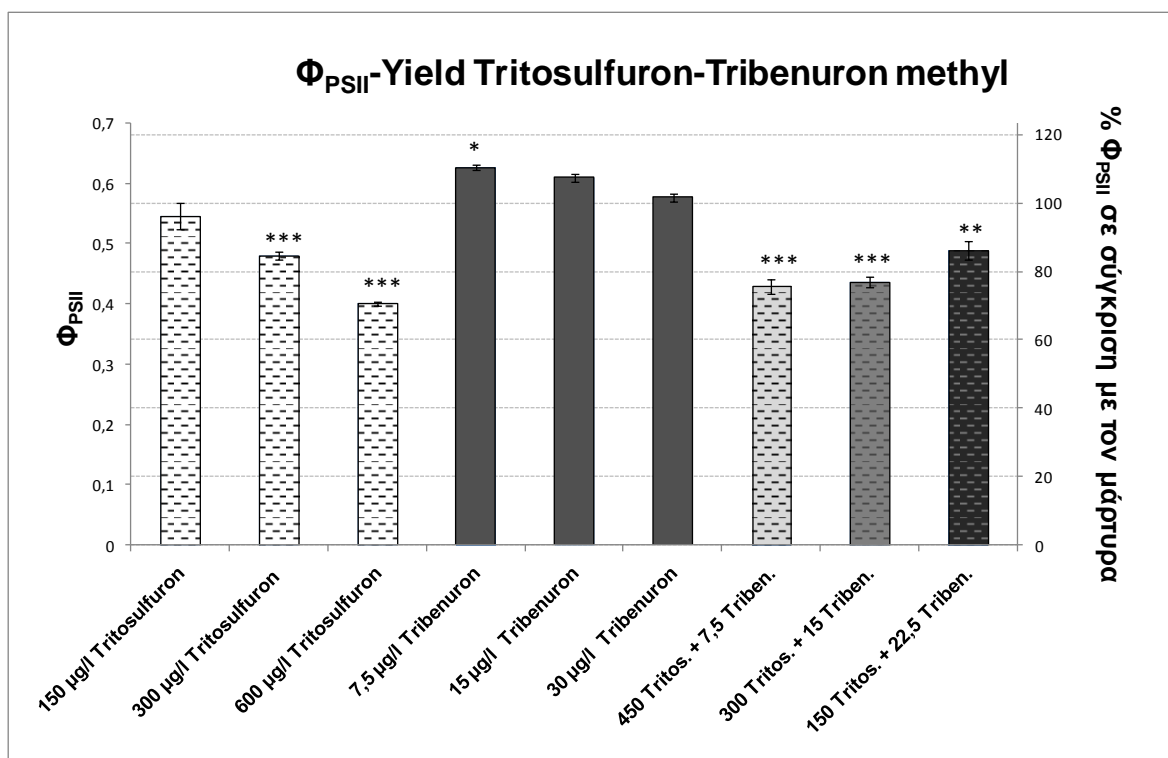
Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δεύτερης σειράς πειραμάτων του συνδυασμού tritosulfuron-tribenuron methyl. Για την μελέτη των παραμέτρων της καμπύλης βραδείας κινητικής επαγωγής της φωτοσύνθεσης επιλέχθηκαν οι τρεις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των tritosulfuron και tribenuron methyl, και η μεγαλύτερη συγκέντρωση από τον κάθε ένα συνδυασμό τους.

Η συμπεριφορά της λειτουργικής φωτοχημική απόδοσης (% σε σχέση με τον μάρτυρα) στη διάρκεια της έκθεσης στα δύο ζιζανιοκτόνα αποτυπώνεται στο Γράφημα 2.3. Η Φ_{PSII} μειώνεται με τον χρόνο όταν τα φυτά είναι εκτεθειμένα στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του tritosulfuron με μέγιστη μείωση 30%, στο τέλος της έκθεσης και στην μεγάλη συγκέντρωση. Στη μικρότερη από τις τρεις συγκεντρώσεις του tritosulfuron μειώθηκε λίγο, σε σχέση με τον μάρτυρα, στις πρώτες 24 ώρες της έκθεσης, αλλά στη συνέχεια επανήλθε στα επίπεδα του μάρτυρα. Το tribenuron methyl φαίνεται να προκάλεσε και στις 3 συγκεντρώσεις μια πολύ μικρή μείωση της Φ_{PSII} η οποία ήταν εμφανής από τις πρώτες 4 ώρες της έκθεσης, στη συνέχεια όμως αυτή επανήλθε στα επίπεδα του μάρτυρα και μάλιστα τα ξεπέρασε.



Γράφημα 2.3: Η λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} της *L.minor* σε σύγκριση με τον μάρτυρα καθ' ολη την διάρκεια της έκθεσης στις 3 συγκεντρώσεις του tritosulfuron και στις 3 συγκεντρώσεις του tribenuron methyl (Μάρτυρας=100%)

Η Φ_{PSII} της *L.minor* την τελευταία μέρα του πειραματισμού για τις τρεις συγκεντρώσεις των δύο ζιζανιοκτόνων και για τους τρεις συνδυασμούς τους παρουσιάζεται στο Γράφημα 2.4. Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζεται το ποσοστό παρεμπόδισης της Φ_{PSII} για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των τριών μιγμάτων των δύο ζιζανιοκτόνων, όπως επίσης και το αναμενόμενο ποσοστό της παρεμπόδισης, σύμφωνα με την Εξίσωση 2.1, και ο λόγος των παρεμποδίσεων RI, σύμφωνα με την Εξίσωση 2.2. Τόσο το μίγμα 450 µg/l tritosulfuron + 7,5 µg/l tribenuron methyl όσο και το μίγμα 300 µg/l tritosulfuron + 15 µg/l tribenuron methyl έχουν προσθετική δράση ($0,5 \leq RI \leq 1,5$), ενώ το μίγμα 150 µg/l tritosulfuron + 22,5 µg/l tribenuron methyl είχε συνεργιστική δράση ($RI > 1,5$). ως προς την λειτουργική φωτοχημική απόδοση.



Γράφημα 2.4: Η λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} της *Lemna minor* μετά από 7 ημέρες έκθεσης σε τρεις συγκεντρώσεις του tritosulfuron, τρεις του tribenuron methyl αλλά και σε τρεις συνδυαστικές συγκεντρώσεις των δύο δραστικών. (Μάρτυρας=100%, μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, One way ANOVA, Dunnett's test, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001).

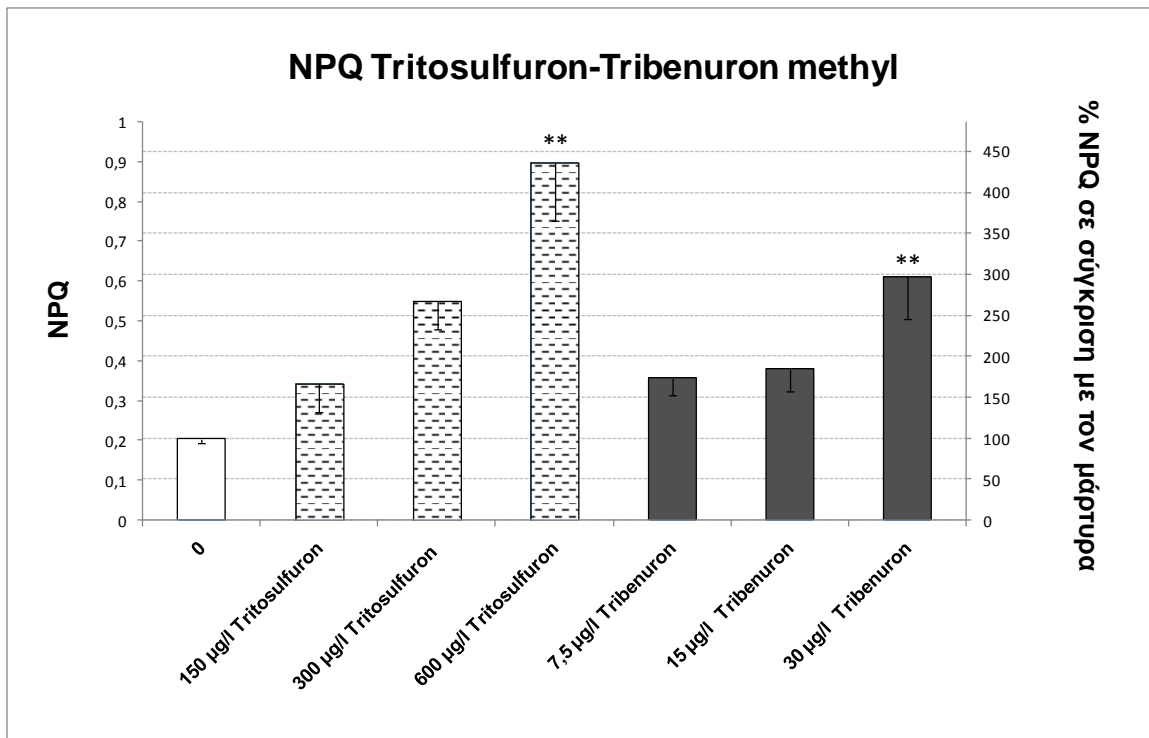
Πίνακας 2.2: Τα ποσοστά της παρατηρούμενης και της αναμενόμενης παρεμπόδισης της λειτουργικής φωτοχημικής απόδοσης Φ_{PSII} και ο λόγος των παρεμποδίσεων RI για 3 μίγματα του tritosulfuron και του tribenuron methyl.

Μίγμα	% Παρατηρούμενης παρεμπόδισης του Φ_{PSII}	% Αναμενόμενης παρεμπόδισης του $\Phi_{PSII}(I_{exp})$	Λόγος των παρεμποδίσεων (RI) (\pm 95% διάστημα εμπιστοσύνης)
450µg/l Tritosulfuron + 7,5µg/l Tribenuron methyl	24,33	21,39	1,15 (\pm0,21)
300 µg/l Tritosulfuron + 15 µg/l Tribenuron methyl	22,99	15,39	1,49 (\pm0,19)
150 µg/l Tritosulfuron + 22,5 µg/l Tribenuron methyl	13,79	3,73	3,69 (\pm1,35)

Όσο αφορά στη μη φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού, και σύμφωνα με τις μετρήσεις της παραμέτρου NPQ (ρυθμός μη φωτοχημικής απόσβεσης, βλ. Πίνακας 2.1), αυτή αυξήθηκε μετά από την έκθεση στα δύο ζιζανιοκτόνα που παρεμποδίζουν το ALS. Αναλυτικότερα, όπως αποτυπώνεται στο Γράφημα 2.5: Ο ρυθμός μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού NPQ μετά από 7 ημέρες έκθεση σε τρεις συγκεντρώσεις του tritosulfuron και τρεις του tribenuron methyl (Μάρτυρας=100%,

μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, One-way ANOVA, Dunnett's test, $**p \leq 0,01$). Γράφημα 2.5, η μη φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού, την τελευταία μέρα του πειραματισμού, ήταν αυξημένη σε σχέση με τον μάρτυρα για τις τρεις συγκεντρώσεις του tritosulfuron όπως και για αυτές του tribenuron methyl.

Αναφορικά με την φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού, σημειώνεται ότι αυτή, σύμφωνα με τις μετρήσεις του συντελεστή qP (βλ. Πίνακας 2.1), δεν παρουσίασε διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα για καμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις των δύο σουλφονουριών.

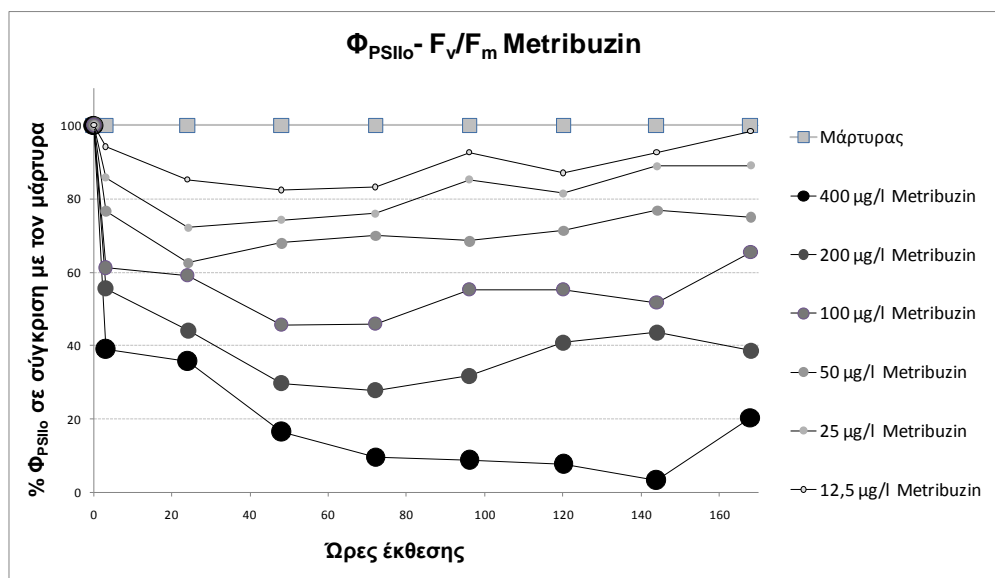


Γράφημα 2.5: Ο ρυθμός μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού NPQ μετά από 7 ημέρες έκθεση σε τρεις συγκεντρώσεις του tritosulfuron και τρεις του tribenuron methyl (Μάρτυρας=100%, μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, One-way ANOVA, Dunnett's test, $**p \leq 0,01$).

2.4.2 Metribuzin-Tritosulfuron

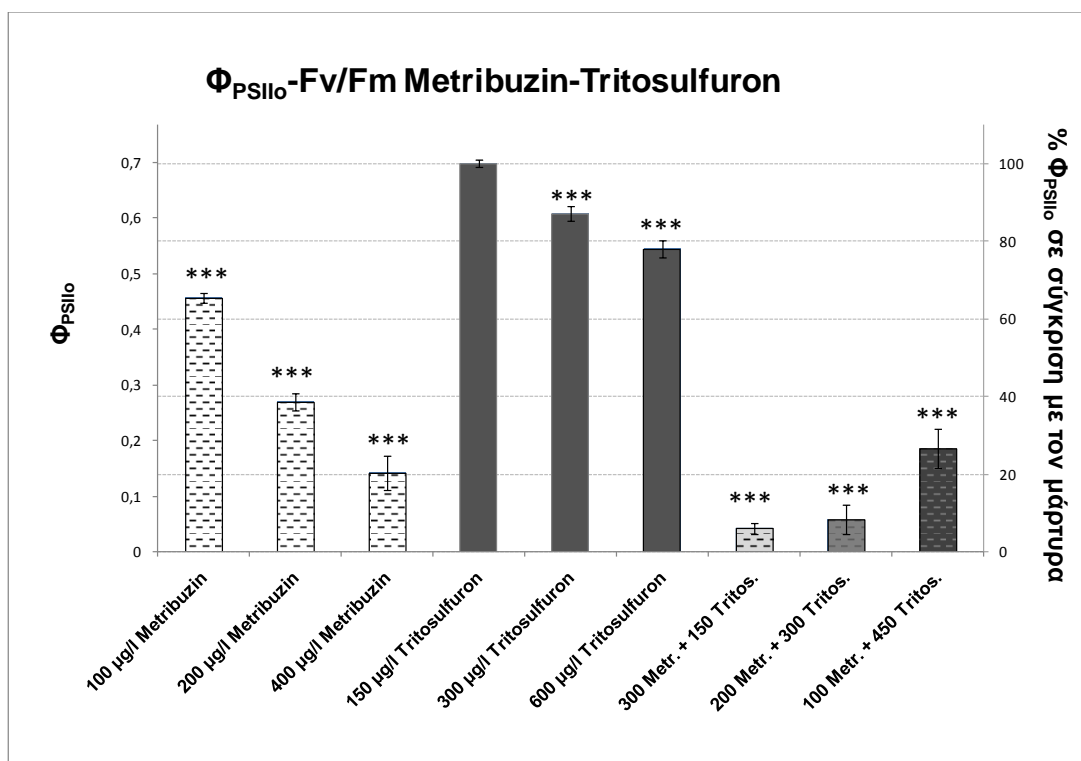
Στην πρώτη σειρά πειραμάτων του συνδυασμού metribuzin-tritosulfuron μετρήθηκε η μέγιστη φωτοχημική απόδοση ($\Phi_{PSII_0} - F_v/F_m$) της *Lemna minor* μετά από έκθεση σε στις διάφορες συγκεντρώσεις των δύο ζιζανιοκτόνων και των μιγμάτων τους καθ'όλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Στο Γράφημα 2.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της έκθεσης στις έξι συγκεντρώσεις του metribuzinως προς το χρόνο. Όπως διαφαίνεται από το γράφημα, η Φ_{PSII_0} μειώνεται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (αύξηση της μείωσης με την αύξηση της συγκέντρωσης). Παράλληλα γίνεται φανερό ότι η μείωση αυτή είναι πολύ άμεση καθώς ήδη από τις 3 πρώτες ώρες έκθεσης παρουσιάζεται σημαντική

πτώση (πχ. 60% μείωση στην μεγαλύτερη συγκέντρωση), ενώ η πτώση αυτή σταθεροποιείται αρκετά μετά τις 48h.



Γράφημα 2.6: Η μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} της *L. minor* σε σύγκριση με τον μάρτυρα καθ' όλη την διάρκεια της έκθεσης στις 6 συγκεντρώσεις του metribuzin (Μάρτυρας=100%)

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για επιλεγμένες συγκεντρώσεις των δύο ζιζανιοκτόνων και των μιγμάτων τους την τελευταία μέρα του πειραματισμού. Πιο συγκεκριμένα, στο Γράφημα 2.7 παρουσιάζεται η $\Phi_{PSII}-F_v/F_m$ για τις τρεις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του metribuzin και τις τρεις μεγαλύτερες του tritosulfuron, καθώς και για την μεγαλύτερη συγκέντρωση των 3^{ov} μιγμάτων τους. Το tritosulfuron οδήγησε σε μικρές μειώσεις της Φ_{PSII} στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του, ενώ η αμέσως μικρότερη συγκέντρωσή του (όπως και αυτές που ακολούθησαν), δεν έδωσε σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα. Όσο αφορά στη μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων των μιγμάτων η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται στον Πίνακα 2.3. Σύμφωνα με αυτά, τα μίγματα 75% metribuzin-25% tritosulfuron και 50%-50% (300μg/l metribuzin+150μg/l tritosulfuron και 200 μg/l metribuzin + 300 μg/l tritosulfuron αντίστοιχα) έχουν προσθετική δράση όσο αφορά στη μέγιστη φωτοχημική απόδοση, ενώ το μίγμα 25% metribuzin-75% tritosulfuron έχει οριακά συνεργιστική δράση.



Γράφημα 2.7: Η μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSIIo} της *Lemna minor* μετά από 7 ημέρες έκθεσης σε τρεις συγκεντρώσεις του metribuzin, τρεις συγκεντρώσεις του tritosulfuron αλλά και σε τρεις συνδυαστικές συγκεντρώσεις των δύο δραστικών. (Μάρτυρας=100%, μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, One-way ANOVA, Dunnett's test, $***p \leq 0,001$).

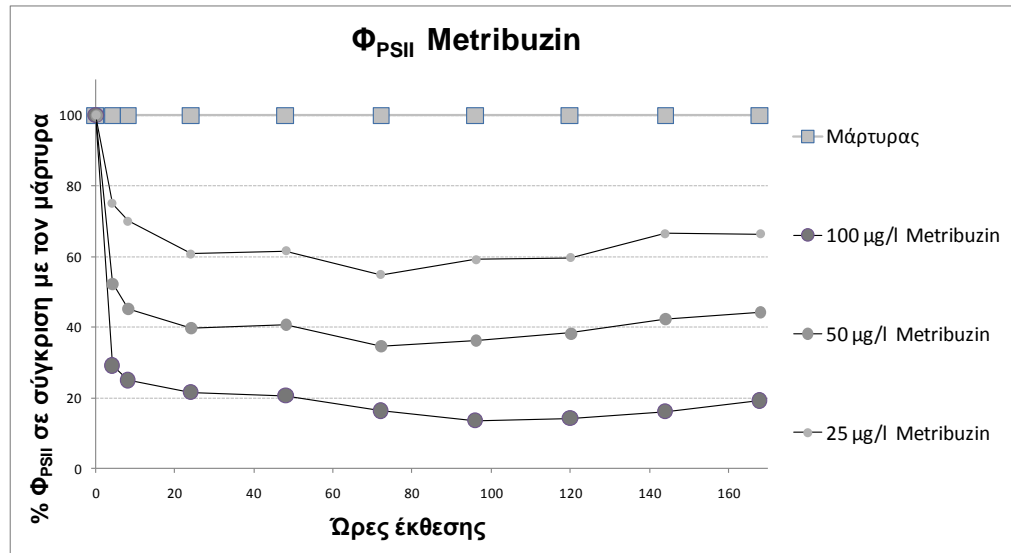
Πίνακας 2.3: Τα ποσοστά της παρατηρούμενης και της αναμενόμενης παρεμπόδισης της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης Φ_{PSIIo} και ο λόγος των παρεμποδίσεων RI για 3 μίγματα του metribuzin και του tritosulfuron.

Μίγμα	% Παρατηρούμενης παρεμπόδισης του Φ_{PSIIo}	% Αναμενόμενης παρεμπόδισης του $\Phi_{PSIIo}(I_{exp})$	Λόγος των παρεμποδίσεων (RI) (\pm 95% διάστημα εμπιστοσύνης)
300µg/lMetribuzin+ 150µg/l Tritosulfuron	93,98	67,84	1,38 ($\pm 0,04$)
200 µg/l Metribuzin + 300 µg/l Tritosulfuron	91,74	66,40	1,39 ($\pm 0,11$)
100 µg/l Metribuzin + 450µg/l Tritosulfuron	73,50	45,25	1,62 ($\pm 0,22$)

Καθώς η λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} φάνηκε από τα προηγούμενα πειράματα να είναι πιο ευαίσθητη παράμετρος από την μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSIIo} , για την δεύτερη σειρά πειραμάτων επιλέχθηκαν ορισμένες ενδιάμεσες συγκεντρώσεις από το εύρος που χρησιμοποιήθηκε στο πειραματισμό για την Φ_{PSIIo} . Ενδεικτικά αναφέρεται ότι σε προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν συγκέντρωση που προκάλεσε 60% παρεμπόδιση στην Φ_{PSIIo} οδήγησε αντίστοιχα σε 97% παρεμπόδιση της Φ_{PSII} .

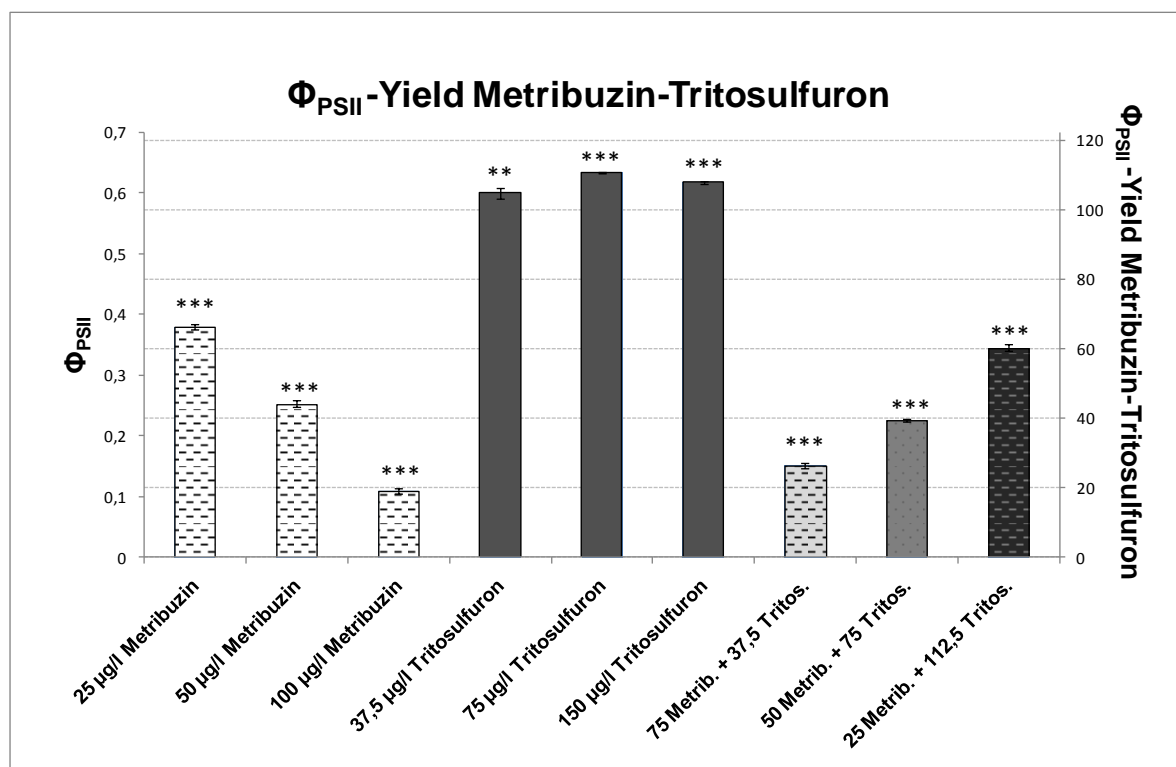
Η Φ_{PSII} μειώνεται σε σχέση με τον μάρτυρα μέσα στις πρώτες 24 ώρες έκθεσης στις τρεις συγκεντρώσεις του metribuzin και στη συνέχεια παραμένει στα ίδια επίπεδα μέχρι

το τέλος της τοξικολογικής δοκιμής (Γράφημα 2.8). Η μείωση αυτή επέρχεται πολύ γρήγορα καθώς από τις πρώτες 4 ώρες έκθεσης φτάνει σχεδόν στα τελικά επίπεδα.



Γράφημα 2.8: Η μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} της *L. minor* σε σύγκριση με τον μάρτυρα καθ' όλη την διάρκεια της έκθεσης για τις τρεις συγκεντρώσεις του metribuzin (Μάρτυρας=100%)

Τα αποτελέσματα της τελευταίας μέρας πειραματισμού για τις συγκεντρώσεις και τους συνδυασμούς που επιλεχθήκαν παρουσιάζονται στο Γράφημα 2.9 και στον Πίνακα 2.4. Το metribuzin μείωσε τη λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} με δόσοεξαρτώμενο τρόπο ενώ η μέγιστη μείωση ήταν ~80% και αφορούσε τα 100 μg/l metribuzin (την μέγιστη συγκέντρωση αυτής της σειράς πειραμάτων). Το tritosulfuron στις συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν δεν μείωσε την Φ_{PSII} στη *L. minor* σε σχέση με τον μάρτυρα (100%), αλλά αντίθετα οι τιμές της ήταν σε υψηλότερα επίπεδα από αυτόν. Και τα τρία μίγματα των δύο ζιζανιοκτόνων είχαν προσθετική δράση ως προς την Φ_{PSII} .



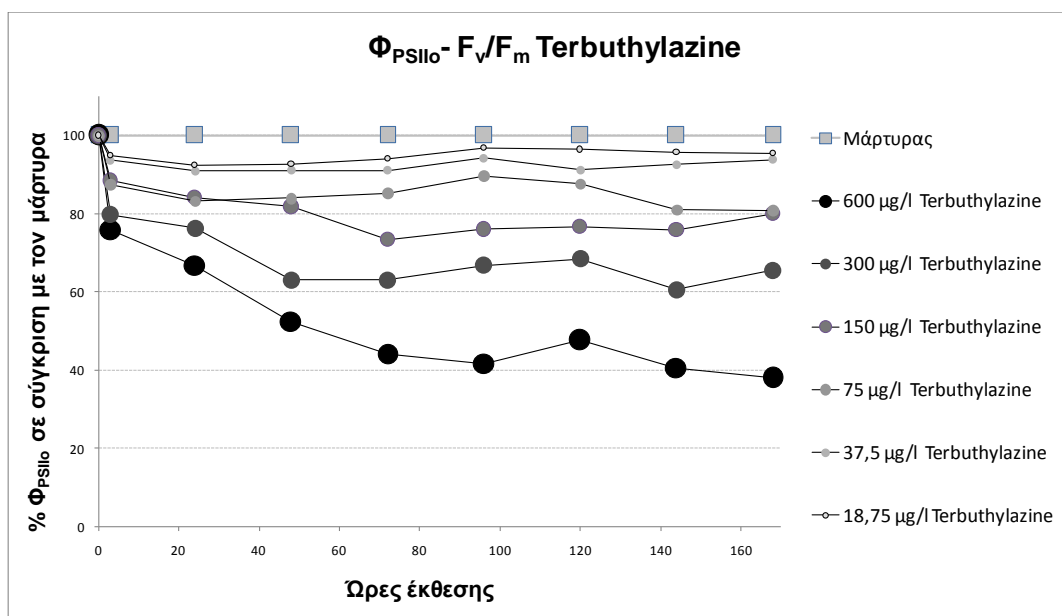
Γράφημα 2.9: Η λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} της *Lemna minor* μετά από 7 ημέρες έκθεσης σε τρεις συγκεντρώσεις του metribuzin, τρεις του tritosulfuron αλλά και σε τρεις συνδυαστικές συγκεντρώσεις των δύο δραστικών. (Μάρτυρας=100%, μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, $n=3$, One-way ANOVA, Dunnett's test, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$).

Πίνακας 2.4: Τα ποσοστά της παρατηρούμενης και της αναμενόμενης παρεμπόδισης της λειτουργικής φωτοχημικής απόδοσης Φ_{PSII} και ο λόγος των παρεμποδίσεων RI για 3 μίγματα του metribuzin και του tritosulfuron.

Μίγμα	% Παρατηρούμενης παρεμπόδισης του Φ_{PSII}	% Αναμενόμενης παρεμπόδισης του Φ_{PSII} (I_{exp})	Λόγος των παρεμποδίσεων (RI) (\pm 95% διάστημα εμπιστοσύνης)
75µg/l Metribuzin+ 37,5µg/l Tritosulfuron	73,66	66,93	1,10 ($\pm 0,02$)
50 µg/l Metribuzin + 75 µg/l Tritosulfuron	60,48	55,79	1,08 ($\pm 0,01$)
25 µg/l Metribuzin + 112,5µg/l Tritosulfuron	39,58	33,76	1,17 ($\pm 0,05$)

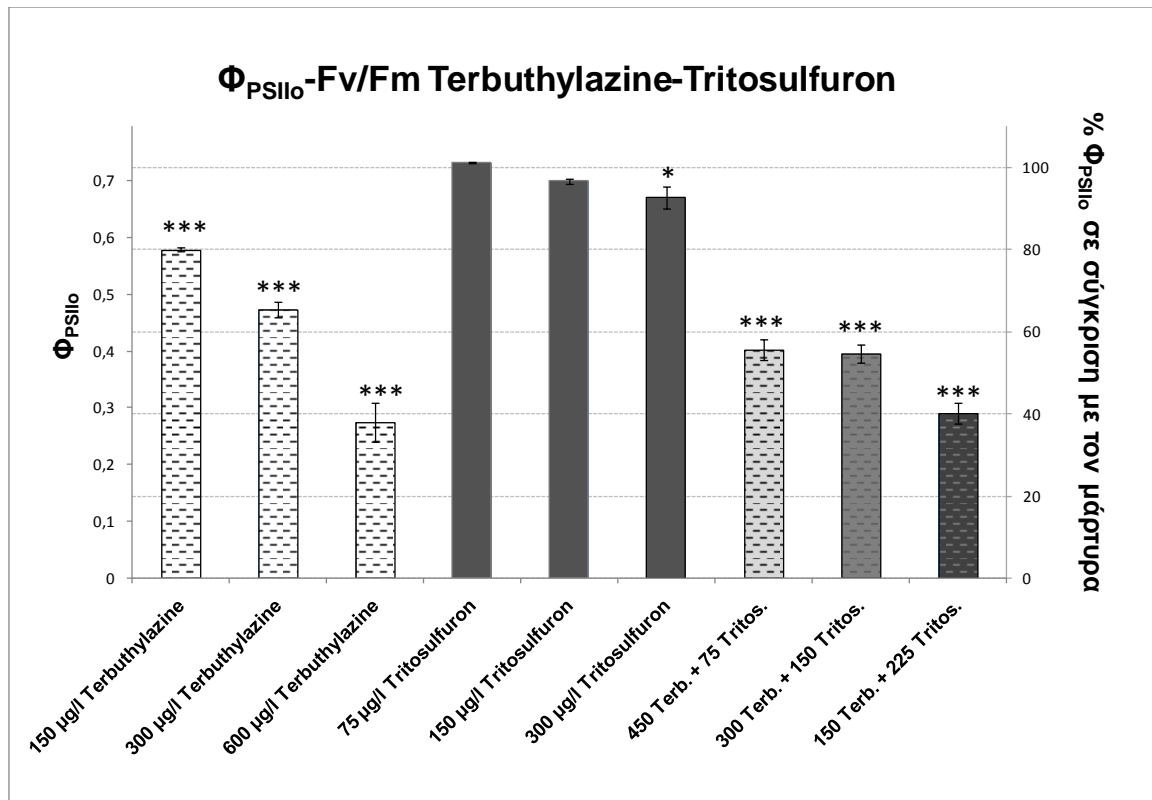
2.4.3 Terbutylazine-Tritosulfuron

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων του συνδυασμού terbutylazine-tritosulfuron μετρήθηκε η μέγιστη φωτοχημική απόδοση ($\Phi_{PSII_0} - F_v/F_m$) της *L.minor* μετά από έκθεση στις διάφορες συγκεντρώσεις των δύο ζιζανιοκτόνων και των μιγμάτων τους καθ'όλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Η Φ_{PSII_0} μειώνεται κατά την έκθεση των φυτών στο terbutylazine με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Γράφημα 2.10). Η μείωση αυτή γίνεται σταδιακά αλλά παρόλα αυτά είναι εμφανής από τις 3 πρώτες ώρες έκθεσης (πχ. ~25% μείωση στην μεγαλύτερη συγκέντρωση). Μετά τις 48h η μείωση αυτή σταθεροποιείται στις περισσότερες συγκεντρώσεις.



Γράφημα 2.10: Η μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSIIo} της *L. minor* σε σύγκριση με τον μάρτυρα καθ' όλη την διάρκεια της έκθεσης στις 6 συγκεντρώσεις του terbuthylazine (Μάρτυρας=100%)

Στο Γράφημα 2.11 παρουσιάζονται ορισμένες από τις μετρήσεις της Φ_{PSIIo} κατά την τελευταία μέρα της τοξικολογικής δοκιμής. Συγκεκριμένα παρουσιάζονται οι μετρήσεις για τις τρεις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των terbuthylazine και tritosulfuron και η μεγαλύτερη συγκέντρωση των 3^{ov} μιγμάτων τους. Όπως και στις προηγούμενες πειραματικές δοκιμές, παρατηρούμε ότι το tritosulfuron έχει οδηγήσει σε μικρή σχετικά μείωση της λειτουργικής φωτοχημικής απόδοσης, συγκεκριμένα στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ το terbuthylazine, όπως έγινε φανερό και από το προηγούμενο γράφημα, μείωσε αισθητά την Φ_{PSIIo} (~60% η μείωση από την μεγαλύτερη συγκέντρωση). Όσο αφορά στα μίγματα των δύο ζιζανιοκτόνων, από τον Πίνακα 2.5 διαπιστώνουμε ότι ενώ στα δύο πρώτα μίγματα (75% terbuthylazine-25% tritosulfuron και 50%-50%) υπάρχει συνδυαστική δράση στην Φ_{PSIIo} , στο τρίτο μίγμα (25% terbuthylazine-75% tritosulfuron) η δράση είναι συνεργιστική.



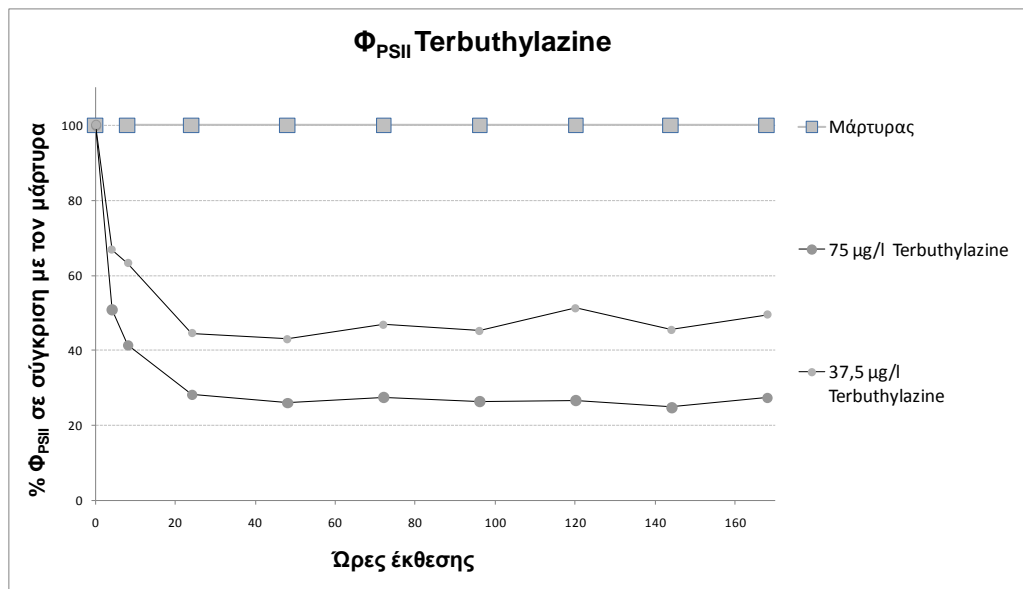
Γράφημα 2.11: Η μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} της *Lemna minor* μετά από 7 ημέρες έκθεσης σε τρεις συγκεντρώσεις του terbuthylazine, τρεις του tritosulfuron αλλά και σε τρεις συνδυαστικές συγκεντρώσεις των δύο δραστικών. (Μάρτυρας=100%, μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$).

Πίνακας 2.5: Τα ποσοστά της παρατηρούμενης και της αναμενόμενης παρεμπόδισης της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης Φ_{PSII} και ο λόγος των παρεμπόδισεων RI για 3 μίγματα του terbuthylazine και του tritosulfuron.

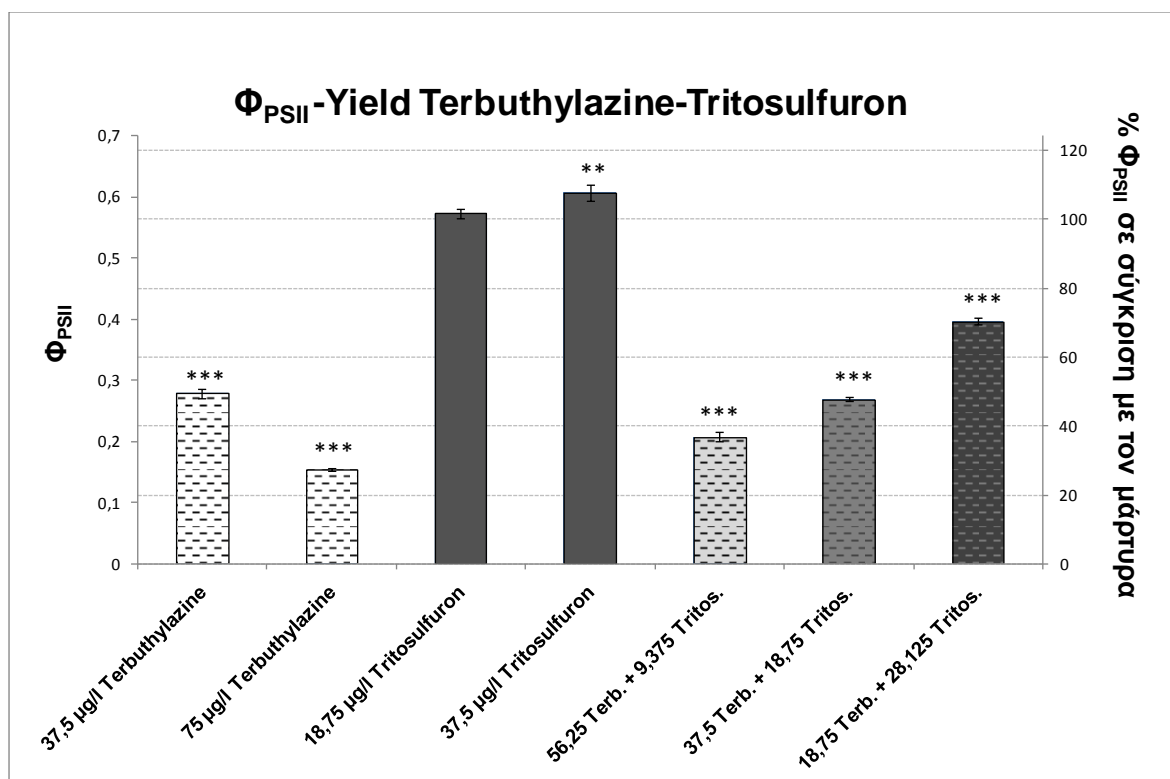
Μίγμα	% Παρατηρούμενης παρεμπόδισης του Φ_{PSII}	% Αναμενόμενης παρεμπόδισης του Φ_{PSII} (I_{exp})	Λόγος των παρεμπόδισεων (RI) (\pm 95% διάστημα εμπιστοσύνης)
450µg/l Terbuthylazine + 75µg/l Tritosulfuron	44,39	48,13	0,92 ($\pm 0,10$)
300 µg/l Terbuthylazine + 150 µg/l Tritosulfuron	45,41	36,62	1,24 ($\pm 0,12$)
150 µg/l Terbuthylazine + 225µg/l Tritosulfuron	59,81	23,95	2,50 ($\pm 0,20$)

Για τη δεύτερη σειρά πειραμάτων επιλέχθηκαν πάλι, σύμφωνα με τα προηγούμενα πειράματα, ορισμένες συγκεντρώσεις για τις δοκιμές τοξικότητας και μετρήθηκε η λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} στα φυτά που εκτέθηκαν σε αυτές. Οι συγκεντρώσεις του terbuthylazine οδήγησαν σε μείωση της Φ_{PSII} σε σχέση με τον μάρτυρα, η οποία έφτασε τον μέγιστο βαθμό της στις πρώτες 24 ώρες, όπως ακριβώς είχε γίνει και στην περίπτωση του metribuzin (Γράφημα 2.8), ενώ στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή μέχρι τη λήξη του πειραματισμού. Η επίπτωση του terbuthylazine στη Φ_{PSII} είναι άμεση καθώς από τις 4 πρώτες ώρες έκθεσης η μείωση είναι μεγαλύτερη

από 50% της συνολικής μείωσης (η οποία επέρχεται στις 24 ώρες). Την τελευταία μέρα της τοξικολογικής δοκιμής, όπως φαίνεται και από το Γράφημα 2.13, το terbutylazine έχει οδηγήσει σε μεγάλη μείωση, στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις, την Φ_{PSII} (70% μείωση από τα 75 $\mu\text{g/l}$ terbutylazine). Αντίθετα, στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις για το tritosulfuron αυτό δεν μειώνει την Φ_{PSII} , και μάλιστα στη συγκέντρωση 37,5 $\mu\text{g/l}$ αυτή είναι υψηλότερη από αυτή του μάρτυρα. Όσο αφορά στη μείωση που προκλήθηκε από τους συνδυασμούς (Πίνακας 2.6) η παρατηρούμενη και η αναμενόμενη μείωση ήταν παραπλήσιες και όπως αποδεικνύεται και από τον συντελεστή RI η δράση των ζιζανιοκτόνων στα μίγματα ήταν προσθετική.



Γράφημα 2.12: Η λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} της *L. minor* σε σύγκριση με τον μάρτυρα καθ' όλη την διάρκεια της έκθεσης για τις δύο συγκεντρώσεις του terbutylazine (Μάρτυρας=100%)



Γράφημα 2.13: Η λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} της *Lemna minor* μετά από 7 ημέρες έκθεσης σε δύο συγκεντρώσεις του terbutylazine, δύο του tritosulfuron αλλά και σε τρεις συνδυαστικές συγκεντρώσεις των δύο δραστικών. (Μάρτυρας=100%, μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001).

Πίνακας 2.6: Τα ποσοστά της παρατηρούμενης και της αναμενόμενης παρεμπόδισης της λειτουργικής φωτοχημικής απόδοσης Φ_{PSII} και ο λόγος των παρεμποδίσεων RI για 3 μίγματα του terbutylazine και του tritosulfuron.

Μίγμα	% Παρατηρούμενης παρεμπόδισης του Φ_{PSII}	% Αναμενόμενης παρεμπόδισης του Φ_{PSII} (I_{exp})	Λόγος των παρεμποδίσεων (RI) (\pm 95% διάστημα εμπιστοσύνης)
56,25µg/l Terbutylazine + 9,375µg/l Tritosulfuron	63,17	61,62	1,03 (\pm0,04)
37,5 µg/l Terbutylazine + 18,75 µg/l Tritosulfuron	52,18	50,57	1,03(\pm0,02)
18,75 µg/l Terbutylazine+ 28,125µg/l Tritosulfuron	29,50	39,51	0,75 (\pm0,04)

2.4.4 Terbutylazine-Metribuzin

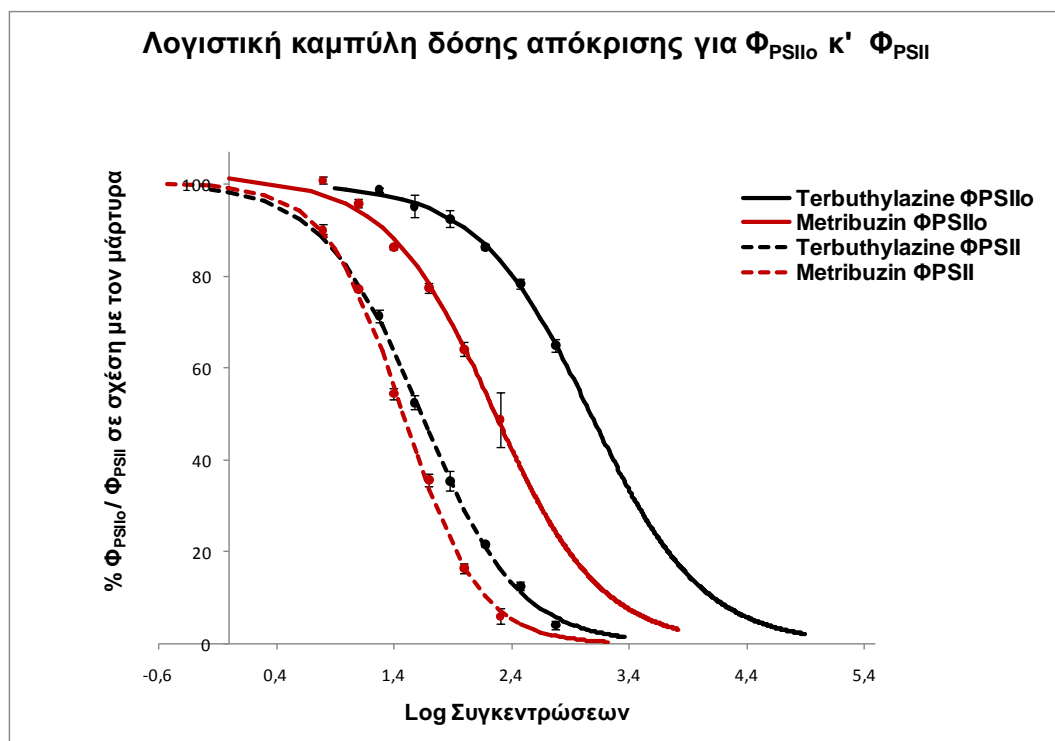
Τόσο το terbutylazine όσο και το metribuzin, όπως διαπιστώθηκε ήδη, επηρεάζουν με δόσοεξαρτώμενο τρόπο τόσο την μέγιστη φωτοχημική απόδοση όσο και την λειτουργική φωτοχημική απόδοση. Για το λόγο αυτό στην τοξικολογική δοκιμή του συνδυασμού αυτού μετρήθηκαν την τελευταία μέρα του πειραματισμού όλες οι παράμετροι της καμπύλης βραδείας κινητικής του φθορισμού σε όλες τις συγκεντρώσεις, έτσι ώστε έγινε εφικτή η δημιουργία της λογιστικής καμπύλης δόσης απόκρισης και ο προσδιορισμός του EC₅₀ και του NOEC.

Στο Γράφημα 2.14 απεικονίζεται η λογιστική καμπύλη δόσης απόκρισης όσο αφορά στη μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII_0} (% σε σχέση με τον μάρτυρα) για τα δύο ζιζανιοκτόνα, που προκύπτει μετά από εφαρμογή της Εξίσωσης 1.16:

$$U = \frac{\max}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^b} = \frac{\max}{1 + \exp\{b[\ln(x) - \ln(EC50)]\}}$$

Από το γράφημα αυτό προκύπτει ότι το terbuthylazine είναι λιγότερο τοξικό για την Φ_{PSII_0} της *L.minor* από το metribuzin και, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.7, το metribuzin έχει μικρότερο EC_{50} και μικρότερο NOEC από το terbuthylazine.

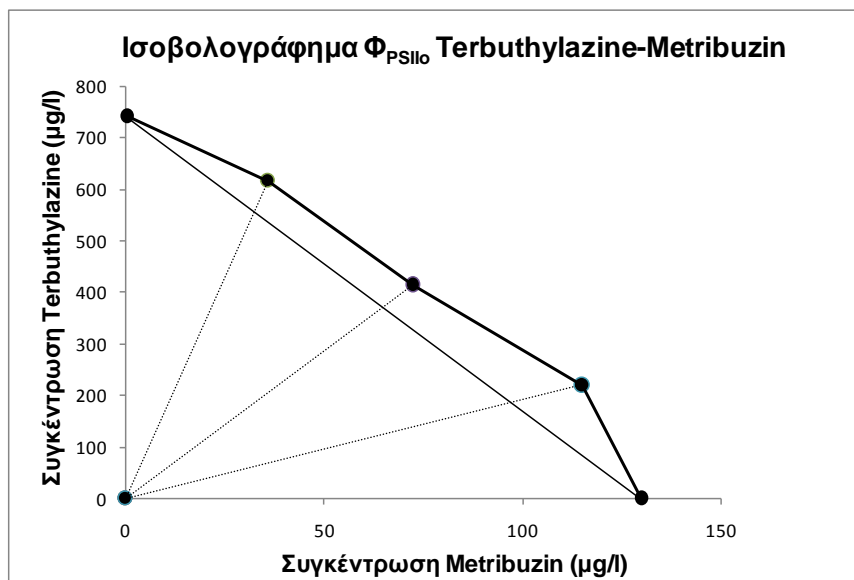
Όσο αφορά στο συνδυασμό των δύο δραστικών ουσιών, από το ισοβολογράφημα (Γράφημα 2.15) διαπιστώνεται ότι η δράση τους για την Φ_{PSII_0} είναι ελαφρώς ανταγωνιστική. Το συμπέρασμα αυτό βγαίνει τόσο από την ανάλυση σύμφωνα με την προσθετική δράση (CA) όσο και με την ανεξάρτητη δράση (IA). Αναλυτικά στοιχεία για τα αποτελέσματα της εφαρμογής των μοντέλων δίδονται στο Παράρτημα στον Πίνακα 0.1.



Γράφημα 2.14: Η λογιστική καμπύλη για το terbuthylazine και το metribuzin με απόκριση τη μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII_0} και τη λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} . Παρουσιάζονται επίσης οι μέσοι όροι των μετρήσεων καθώς και το τυπικό τους σφάλμα.

Πίνακας 2.7: Τα EC_{50} , NOEC, και η σχετική κλίση b της λογιστικής καμπύλης, της τοξικολογικής δοκιμής του terbuthylazine και του metribuzin ως προς την μέγιστη φωτοχημική απόδοση $\Phi_{PSII_0} - F_v/F_m$ της *Lemna minor*.

	Terbuthylazine	Metribuzin
	Φ_{PSII} -Fv/Fm	
EC ₅₀ (μg/l)	741,6	129,7
Τυπικό σφάλμα EC ₅₀	36,25	7,621
95% CI EC ₅₀	665,5 to 817,8	113,7 to 145,8
b	1,310	1,095
R ²	0,9710	0,9763
NOEC (μg/l)	75	12,5



Γράφημα 2.15: Ισοβιολογράφημα του μίγματος των ζιζανιοκτόνων terbuthylazine και metribuzin όσο αφορά τη μέγιστη φωτοχημική απόδοση της *Lemna minor*.

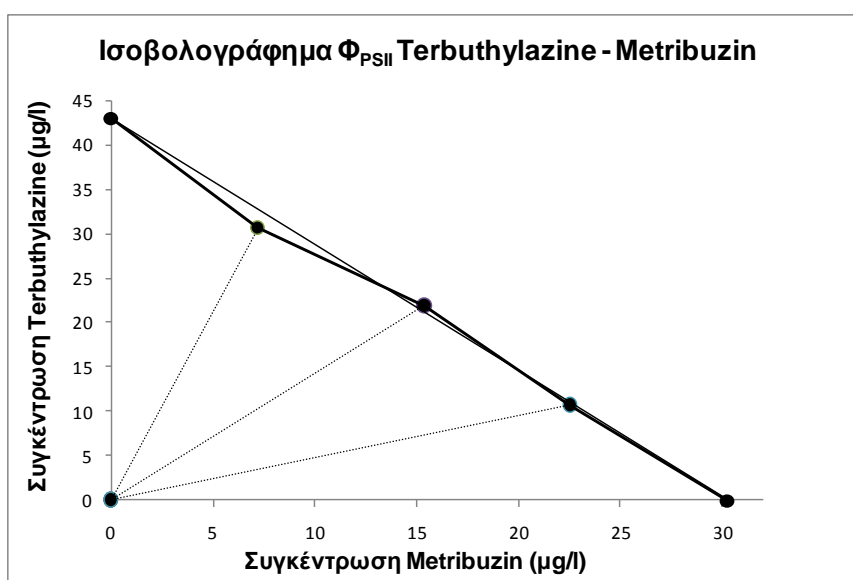
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} είναι πιο ευαίσθητη στην παρουσία ζιζανιοκτόνων από την μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII_0} , γεγονός που διαπιστώνεται και από το Γράφημα 2.14. Και στην περίπτωση της Φ_{PSII} το terbuthylazine είναι λιγότερο τοξικό από το metribuzin, αλλά η διαφορά τους είναι πολύ μικρή (Γράφημα 2.14, Πίνακας 2.8). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ακόμα και στις πιο χαμηλές συγκεντρώσεις από τις έξι που επιλέχθηκαν για την τοξικολογική δοκιμή των δύο δραστικών ουσιών, η Φ_{PSII} είχε στατιστική σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα και κατά συνέπεια η τιμή NOEC δεν μπόρεσε να προσδιορισθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια (Πίνακας 2.8).

Πίνακας 2.8: Τα EC₅₀, NOEC, και η σχετική κλίση b της λογιστικής καμπύλης, της τοξικολογικής δοκιμής του terbuthylazine και του metribuzin ως προς την λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} -Yield της *Lemna minor*.

Terbuthylazine	Metribuzin
----------------	------------

Φ_{PSII} -Yield		
EC_{50} ($\mu\text{g/l}$)	43,04	30,24
Τυπικό σφάλμα EC_{50}	1,688	0,9683
95% CI EC_{50}	39,50 - 46,59	28,20 - 32,27
b	1,055	1,352
R^2	0,9959	0,9964
NOEC ($\mu\text{g/l}$)	<18,75	<6,25

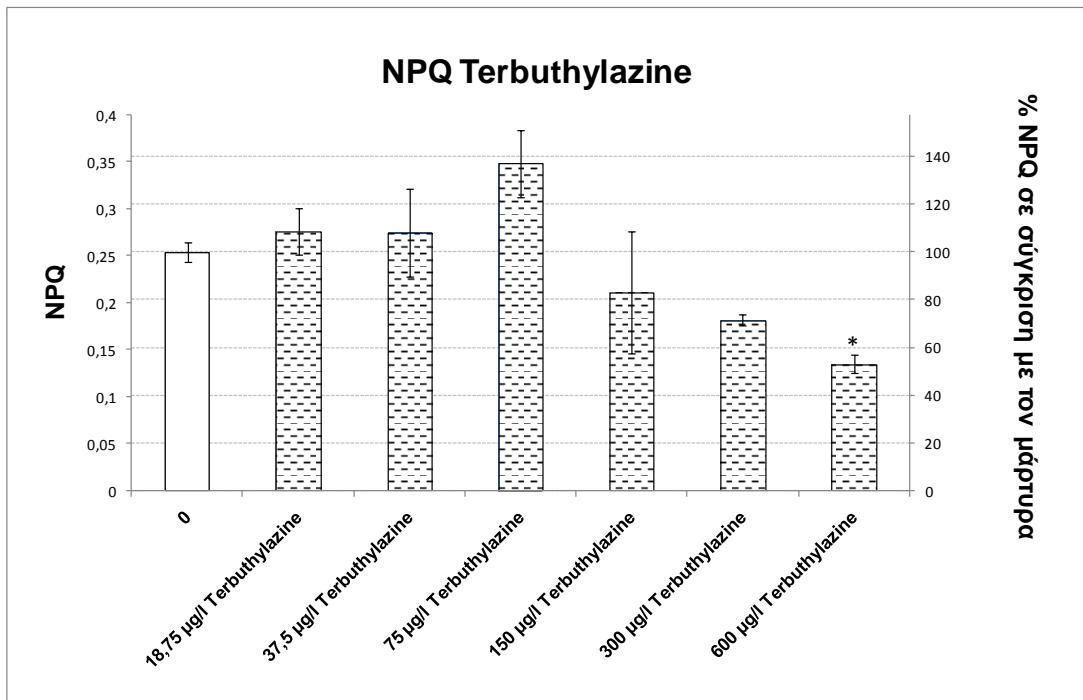
Ο συνδυασμός των terbuthylazine και metribuzin είχε προσθετική δράση στην Φ_{PSII} της *L.minor* (Γράφημα 2.16). Αναλυτικά στοιχεία για τα αποτελέσματα της εφαρμογής των μοντέλων της προσθετικής και της ανεξάρτητης δράσης δίδονται στο Παράρτημα στον Πίνακα 0.2.



Γράφημα 2.16: Ισοβολουγράφημα του μίγματος των ζιζανιοκτόνων terbuthylazine και metribuzin όσο αφορά τη λειτουργική φωτοχημική απόδοση της *Lemna minor*.

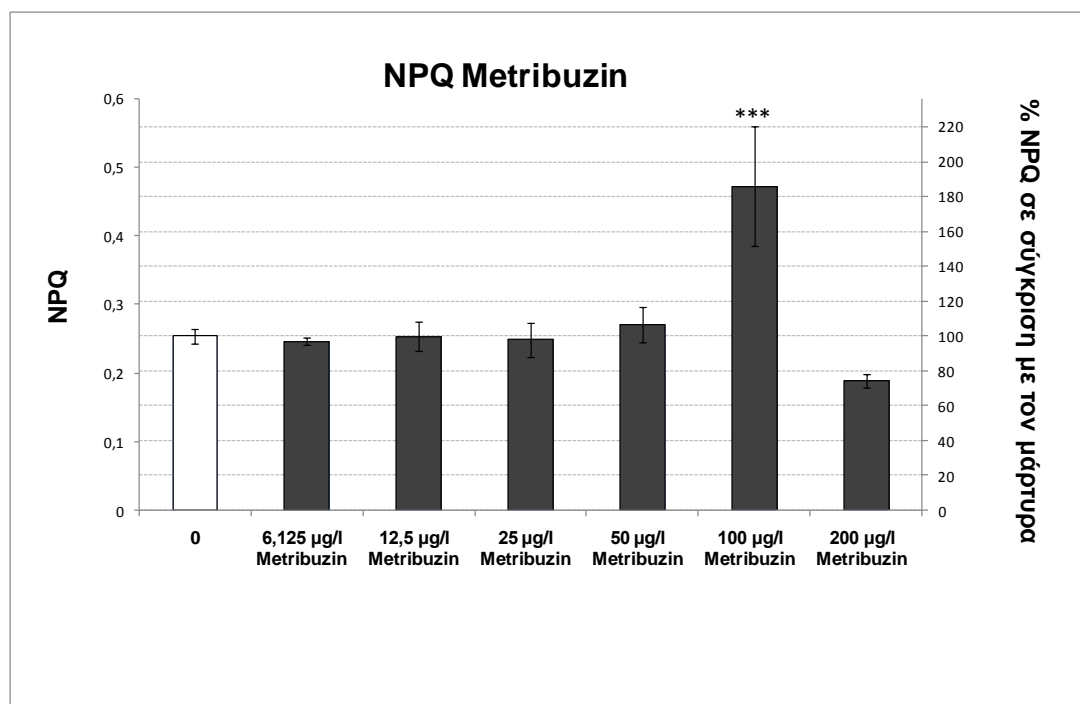
Όσο αφορά στην μη φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού αυτή αποδόθηκε από την παράμετρο NPQ (βλ.

Πίνακας 2.1). Όπως διακρίνεται στο Γράφημα 2.17 και στο Γράφημα 2.18 η NPQ επηρεάστηκε από τα δύο ζιζανιοκτόνα του PSII. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις δεν παρατηρείται διαφορά με τον μάρτυρα. Με την αύξηση της συγκέντρωσης όμως παρατηρείται το εξής φαινόμενο, αρχικά αύξηση της NPQ σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά όταν αυξηθεί και άλλο η συγκέντρωση παρατηρείται μείωση της NPQ σε σχέση με τον μάρτυρα.



Γράφημα 2.17: Ο ρυθμός μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού NPQ μετά από 7 ημέρες έκθεση σε έξι συγκεντρώσεις του terbutylazine (Μάρτυρας=100%, μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p<0,05).

Τόσο το terbutylazine όσο και το metribuzin με τον μηχανισμό δράσης τους παρεμποδίζουν την ροή των ηλεκτρονίων στο PSII. Ως εκ τούτου, είναι αναμενόμενο να μειώνουν τον αριθμό των ανοικτών φωτοχημικών κέντρων, άρα τον συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού qP (βλ. Πίνακας 2.1) καθώς και τον ρυθμό ροής ηλεκτρονίων στη φωτοχημική αλυσίδα, ETR. Η μείωση των qP και ETR επιβεβαιώθηκε από τις μετρήσεις, και καθώς ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης των ζιζανιοκτόνων υπολογίστηκαν τα EC50 και για τις δύο αυτές παραμέτρους, ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση της ευαισθησίας μεταξύ παραμέτρων (Πίνακας 2.9).



Γράφημα 2.18: Ο ρυθμός μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού NPQ μετά από 7 ημέρες έκθεση σε έξι συγκεντρώσεις του metribuzin (Μάρτυρας=100%, μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, ***p<0,001).

Πίνακας 2.9: Τα EC₅₀ του terbuthylazine και του metribuzin ως προς τον συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού qP και τον ρυθμό ροής ηλεκτρονίων στη φωτοχημική αλυσίδα, ETR της *Lemna minor*.

	Terbuthylazine	Metribuzin
EC ₅₀ qP (μg/l)	43,25	40,6
EC ₅₀ ETR (μg/l)	43,04	30,24

2.5 Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα των τοξικολογικών δοκιμών συμπεραίνουμε ότι υπάρχει σαφής διαφοροποίηση στις παραμέτρους του φθορισμού της χλωροφύλλης μεταξύ των φυτών που εκτίθενται στους παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού (tritosulfuron και tribenuron methyl), και αυτών που εκτίθενται στους παρεμποδιστές του PSII (terbuthylazine και metribuzin).

Όπως αναφέρθηκε ήδη, παρόλο που η φωτοσύνθεση δεν είναι ο βασικός στόχος των tritosulfuron και tribenuron methyl αναμένεται να επηρεάσουν με έμμεσο τρόπο τον φθορισμό της χλωροφύλλης. Όπως είδαμε από τα αποτελέσματα, το tritosulfuron επηρεάζει σε μικρό βαθμό την μέγιστη φωτοχημική απόδοση (Φ_{PSII_0} ή F_v/F_m) στις υψηλές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και σε μεγαλύτερο βαθμό την λειτουργική φωτοχημική απόδοση (Φ_{PSII}) (μέχρι ~30%), πάλι στις υψηλές μόνο συγκεντρώσεις. Το tribenuron methyl φαίνεται να επηρεάζει τις δύο αυτές παραμέτρους

ελάχιστα στις υψηλές συγκεντρώσεις και μόνο για τις πρώτες 48 ώρες της έκθεσης. Τέλος, ο συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού qP δεν επηρεάστηκε καθόλου από τις δραστικές αυτές. Παρόλο που όσο αφορά την τοξικότητα ως προς την ανάπτυξη της *L.minor* οι συγκεντρώσεις των δύο δραστικών είναι αντίστοιχες και επηρεάζουν την ανάπτυξη σε μεγάλο βαθμό (βλ. Γράφημα 1.3), ενώ επιπλέον έχουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης, επηρεάζουν σε διαφορετικό βαθμό τον φθορισμό της χλωροφύλλης. Το tritosulfuron δηλαδή επηρεάζει την φωτοσύνθεση, σε μικρό βαθμό βέβαια, ενώ το tribenuron methyl δεν φαίνεται να την επηρεάζει καθόλου. Παράλληλα, και οι δύο αυτές βασικές παράμετροι του φθορισμού είναι λιγότερο ευαίσθητες από την ανάπτυξη του φυτού όσο αφορά την αξιολόγηση της τοξικότητας από τις δύο αυτές δραστικές ουσίες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με των Frankart et al (2003), Olette et al (2008), Eullaffroy et al (2009), Nenova & Kocheva. (2014), που έχουν κάνει μετρήσεις παραμέτρων φθορισμού χλωροφύλλης σε φυτά μετά από έκθεση σε ζιζανιοκτόνα παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση των αμινοξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα ατόμων άνθρακα. Για παράδειγμα, οι Frankart et al. (2003) βρήκαν ότι όταν η *L.minor* εκτεθεί για 48 ώρες σε 100 µg/l flzasulfuron η ανάπτυξη μειώνεται κατά 25%, η μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII_0} μειώνεται 6% και η λειτουργική φωτοχημική απόδοση 9%, ενώ οι Olette et al. (2008) βρήκαν ότι στην ίδια συγκέντρωση η δραστική αυτή μειώνει στις 7 ημέρες έκθεσης την Φ_{PSII_0} της *L.minor* κατά 16%. Επίσης οι Nenova & Kocheva (2014) αφού εξέθεσαν νεαρά φυτά μπιζελιού στο chlorsulfuron, είδαν ότι η συγκέντρωση 10^{-5} M μειώνει την ανάπτυξη των φυτών 37%, δεν επηρεάζει την Φ_{PSII_0} και οδηγεί την Φ_{PSII} σε πτώση 14%.

Το γεγονός ότι τόσο η Φ_{PSII_0} όσο και η Φ_{PSII} μειώνονται σε μικρό βαθμό ή και δεν επηρεάζονται καθόλου από το tritosulfuron και το tribenuron methyl, σε αντίθεση με αυτό που είχε προβλεφθεί, πιθανώς να οφείλεται στο ότι αυτές δρουν αργά (βλ. Εισαγωγή υποκεφ. Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλλικού) και ενδεχομένως στη διάρκεια της τοξικολογικής δοκιμής, και στις συγκεντρώσεις αυτές, να μην έχουν «προλάβει» να επηρεάσουν τις πρωτεΐνες της φωτοσυνθετικής συσκευής και τελικά τη φωτοσύνθετική λειτουργία. Αύξηση της διάρκειας της έκθεσης του φυτού στα ζιζανιοκτόνα, πιθανώς να επηρεάζει την φωτοσύνθεση σε μεγαλύτερο βαθμό. Οι Barbagallo et al. (2003) σε αντίθεση με την παρούσα εργασία και τις προαναφερθείσες, αναφέρουν μεγάλη μείωση στην Φ_{PSII_0} φυτών *Arabidopsis* μετά από έκθεση στο Imazapir (παρεμποδιστής της βιοσύνθεσης

αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλλικού) σε συγκεντρώσεις που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη από 25 έως 100% και σε χρονικό διάστημα 48 ωρών. Συγκεκριμένα, βρήκαν γραμμική συσχέτιση μεταξύ της παρεμπόδισης της ανάπτυξης και της παρεμπόδισης της Φ_{PSII} . Η διαφορά της εργασίας αυτής με τις υπόλοιπες ίσως να οφείλεται στην προσθήκη της επιφανειοδραστικής ουσίας Tween 20, η χρήση της οποίας επιταχύνει την δράση του ζιζανιοκτόνου.

Τα ζιζανιοκτόνα του PSII terbutylazine και metribuzin, όπως ήταν αναμενόμενο λόγω του μηχανισμού δράσης τους, επέδρασαν στον φθορισμό της χλωροφύλλης. Καθώς τα ζιζανιοκτόνα αυτά παρεμποδίζουν τη διεξαγωγή των φωτεινών αντιδράσεων (βλ. Εικόνα 0.6, Εικόνα 0.7), δεν αξιοποιείται η ηλιακή ακτινοβολία προς αυτή την κατεύθυνση. Κατά συνέπεια η Φ_{PSII} , η Φ_{PSII} , η qP (βλ. ορισμούς Πίνακας 2.1) και ο ρυθμός ροής ηλεκτρονίων στη φωτοχημική αλυσίδα, ETR, μειώνονται εξαιτίας της δράσης των ζιζανιοκτόνων. Το metribuzin είναι πιο τοξικό από το terbutylazine και όλες αυτές τις παραμέτρους του φθορισμού (Γράφημα 2.14, Πίνακας 2.9), το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της τοξικότητας ως προς την ανάπτυξη (Γράφημα 1.3). Σύμφωνα με τα EC_{50} των παραμέτρων αυτών (Πίνακας 2.7, Πίνακας 2.8, Πίνακας 2.9), η σειρά ευαισθησίας τους για τους παρεμποδιστές του PSII είναι: $\Phi_{PSII} = ETR > qP > \Phi_{PSII}$. Αν, δε, συμπεριληφθεί και η ανάπτυξη στη σειρά ευαισθησίας αυτή γίνεται: $\Phi_{PSII} = ETR > qP > ανάπτυξη > \Phi_{PSII}$. Ενδεικτικό της μεγάλης ευαισθησίας της Φ_{PSII} στους δύο παρεμποδιστές του PSII είναι ότι τα EC_{50} και NOEC της, σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Γράφημα 2.8, Γράφημα 2.12), μπορούν να προσδιοριστούν από τις πρώτες 24 ώρες της έκθεσης των φυτών στα ζιζανιοκτόνα, ενώ ήδη από τις 4 ώρες έκθεσης υπάρχει πολύ μεγάλη διαφοροποίηση σε σχέση με τον μάρτυρα. Το EC_{50} της Φ_{PSII} είναι χαμηλότερο από το αντίστοιχα της ανάπτυξης (Πίνακας 1.3, Πίνακας 1.4) για τα δύο ζιζανιοκτόνα και ιδιαίτερα για το terbutylazine, για το οποίο είναι υποδιπλάσιο. Ανάλογα, το NOEC της Φ_{PSII} ήταν χαμηλότερο από τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις του πειραματισμού, οπότε και δεν μπόρεσε να προσδιορισθεί, σε αντίθεση με το NOEC της ανάπτυξης (37,5 $\mu\text{g/l}$ και 25 $\mu\text{g/l}$ για το terbutylazine και το metribuzin αντίστοιχα) το οποίο ήταν μεγαλύτερο από την μικρότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (18,75 $\mu\text{g/l}$ και 6,25 $\mu\text{g/l}$ για το terbutylazine και το metribuzin αντίστοιχα). Από τα παραπάνω καταδεικνύεται η μεγάλη ευαισθησία της Φ_{PSII} στα ζιζανιοκτόνα του PSII, η οποία είναι εμφανώς μεγαλύτερη από αυτή της ανάπτυξης.

Διαφοροποίηση παρατηρήθηκε και στην μη φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού μεταξύ όσων φυτών εκτέθηκαν στα ζιζανιοκτόνα που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού και όσων εκτέθηκαν στους παρεμποδιστές του PSII. Η πρώτη ομάδα ζιζανιοκτόνων οδήγησε σε αύξηση του ρυθμού μη φωτοχημικής απόσβεσης, NPQ, ενώ η αύξηση αυτή είχε θετική συσχέτιση με την συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα υπήρξε έως και τετραπλασιασμός της NPQ στους χειρισμούς με το tritosulfuron και έως τριπλασιασμός της στους χειρισμούς με το tribenuron methyl (Γράφημα 2.5). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με αυτά των Frankart et al. (2003) που επίσης αναφέρουν μεγάλη αύξηση της μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού στην *L.minor* μετά από έκθεση στο flazasulfuron (επίσης παρεμποδιστή της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού). Από την άλλη μεριά οι παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος II δεν έδωσαν τόσο ξεκάθαρα αποτελέσματα. Οι πιο υψηλές συγκεντρώσεις οδήγησαν σε μείωση της NPQ, ιδίως στο terbuthylazine, ενώ αμέσως μικρότερες έδειξαν αύξηση της NPQ αλλά όχι στα επίπεδα που παρατηρήθηκε στο tritosulfuron και στο tribenuron methyl (Γράφημα 2.17, Γράφημα 2.18.). Μείωση της NPQ σε φύλλα νεαρών φυτών ελιάς μετά από έκθεση στο terbuthylazine καταγράφηκε από τους Canero et al. (2011), ενώ οι Cao et al. (2013) αναφέρουν επίσης μείωση της NPQ σε φύκη του γένους *Nannochloropsis sp* μετά από έκθεση στο diuron (DCMU) (παρεμποδιστή του PSII). Αντιθέτως, σύμφωνα με τους Råberg et al. (2003) και τους de Sousa et al. (2014) υπήρξε αύξηση της NPQ μετά από έκθεση σε ζιζανιοκτόνα του PSII στο κοράλλι *Porites cylindrical* και στην σόγια αντίστοιχα. Τα ανωτέρω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μη φωτοχημική απόσβεση δεν έχει σταθερή απόκριση μετά από την επίδραση των παρεμποδιστών του φωτοσυστήματος II.

Κρίνεται σκόπιμο να δοθεί μια πιθανή εξήγηση για τις προαναφερθείσες επιπτώσεις των ζιζανιοκτόνων του PSII στη μη φωτοχημική απόσβεση. Ο βασικός μηχανισμός της μη φωτοχημικής απόσβεσης είναι, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, ο κύκλος των ξανθοφυλλών, οπότε και η λειτουργία του τελευταίου είναι απαραίτητη. Όμως, για την ενεργοποίησή του είναι απαραίτητη η ύπαρξη υψηλής ΔpH μεταξύ του μικροχώρου lumen και του στρώματος (Καραμπουρνιώτης κ.α., 2012, βλ. Εικόνα 0.4). Λόγω της μεγάλης παρεμπόδισης της φωτονιακής ροής από τις υψηλές συγκεντρώσεις των ζιζανιοκτόνων σταματά η παραγωγή H^+ , οπότε τελικά δεν υπάρχει η απαραίτητη ΔpH για την ενεργοποίηση του κύκλου των ξανθοφυλλών. Με τον τρόπο αυτό η μη

φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού μειώνεται. Από την άλλη πλευρά, όπως αναφέρθηκε στην αρχή του κεφαλαίου, η απορροφούμενη φωτεινή ενέργεια μετατρέπεται είτε σε φωτοσυνθετική (φωτοχημική απόσβεση, qP), είτε σε φθορισμό, είτε σε θερμική ενέργεια (μη φωτοχημική απόσβεση). Όταν τα φυτά εκτίθενται στα ζιζανιοκτόνα του PSII η φωτοχημική απόσβεση qP μειώνεται, και συνεπώς για την απόσβεση της ενέργειας ενεργοποιείται ο μη φωτοχημικός μηχανισμός προστασίας της φωτοσυνθετικής συσκευής, οπότε και παρατηρείται αύξηση της NPQ. Αυτός ο μηχανισμός, όμως, δεν λειτουργεί στις υψηλές συγκεντρώσεις ζιζανιοκτόνων, όπου υπάρχει μεγάλη παρεμπόδιση της φωτονιακής ροής, για τους λόγους που ήδη αναφέρθηκαν. Τοιουτοτρόπως, εξηγείται η αύξηση της NPQ που παρατηρήθηκε σε ορισμένες συγκεντρώσεις όπως και η μείωσή της που παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Η μεγάλη αύξηση της NPQ που καταγράφηκε μετά την έκθεση των φυτών της *L. minor* στους παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού δείχνει ότι οι τελευταίοι ενεργοποίησαν τον προστατευτικό μηχανισμό της μη φωτοχημικής απόσβεσης. Με δεδομένο ότι η μη φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού περιλαμβάνει ιδιαίτερα πολύπλοκους μηχανισμούς, οι οποίοι δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί (Müller et al., 2001) και καθώς οι σουλφονουλουρίες επηρεάζουν έμμεσα την φωτοσύνθεση, η εξήγηση των μηχανισμών που οδήγησαν στην αύξηση αυτή είναι δύσκολη και απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν ανωτέρω και όσο αφορά στις παραμέτρους του φθορισμού της χλωροφύλλης μετά από έκθεση στα tritosulfuron και tribenuron methyl, η NPQ αναδεικνύεται ως η πλέον ευαίσθητη παράμετρος για τις δραστικές αυτές, καθώς οι υπόλοιπες επηρεαστήκαν ελάχιστα έως και καθόλου. Πρέπει, όμως, στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι οι μετρήσεις της NPQ παρουσίασαν μεγάλο τυπικό σφάλμα, χαρακτηριστικό το οποίο δεν είναι επιθυμητό και μπορεί να αποτελέσει αιτία μη επιλογής της παραμέτρου αυτής για τη διερεύνηση της τοξικότητας.

Συμπερασματικά, ανάμεσα στις δύο βασικές παραμέτρους του φθορισμού, την λειτουργική φωτοχημική απόδοση Φ_{PSII} και την μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{PSIIo} , η πρώτη είναι η πιο ευαίσθητη όσο αφορά την τοξικότητα των παρεμποδιστών του PSII. Το ίδιο ισχύει και για τα ζιζανιοκτόνα που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού, αλλά στην περίπτωση τους η ευαισθησία της Φ_{PSII} δεν

ήταν ανάλογη της τοξικότητας των δραστικών αυτών στα φυτά της *L.minor*, όπως αυτή καταγράφεται από την παρεμπόδιση της ανάπτυξης. Την μεγαλύτερη ευαισθησία της Φ_{PSII} σε σχέση με την Φ_{PSII0} καταδεικνύουν και οι Juneau et al. (2007) σε άρθρο στο οποίο κάνουν ανασκόπηση της χρήσης του φθορισμού της χλωροφύλλης ως εργαλείο για τον καθορισμό της τοξικότητας των ζιζανιοκτόνων, ενώ ίδια άποψη εκφράζεται και από τους Iriael et al. (2014) που μελέτησαν παραμέτρους του φθορισμού σε υδροχαρή φυτά εκτεθειμένα σε ζιζανιοκτόνα που παρεμποδίζουν το PSI και το PSII. Επιπρόσθετα αναφέρεται ότι τα αποτελέσματα αναδεικνύουν διαφοροποίηση στην τοξικότητα των υπό μελέτη ζιζανιοκτόνων με αναφορά στην ανάπτυξη της *L.minor* και με αναφορά στις παραμέτρους του φθορισμού. Για τον λόγο αυτό δεν θα πρέπει να βγαίνουν συμπεράσματα για την ανάπτυξη με βάση τα αποτελέσματα του φθορισμού και το αντίστροφο.

Όσο αφορά τους συνδυασμούς των ζιζανιοκτόνων, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τόσο στην περίπτωση του συνδυασμού metribuzin-tritosulfuron όσο και σε αυτή των terbuthylazine-tritosulfuron, παρατηρείται συνεργισμός στη μέγιστη φωτοχημική απόδοση όταν το μίγμα αποτελείται κατά 75% από το tritosulfuron. Στα μίγματα αυτά ενδεχομένως να έχει αποδιοργανωθεί η πρωτεϊνική συγκρότηση των πρωτεϊνών των συμπλόκων των φωτοσυστημάτων σε ένα αρκετά μεγάλο βαθμό, καθώς η συγκέντρωση του tritosulfuron είναι αυξημένη. Όταν τα φυτά εγκλιματιστούν στο σκοτάδι, κανονικά τα κέντρα αντίδρασης είναι ανοικτά (οξειδωμένα), και είναι έτοιμα να προσλάβουν φωτεινή ενέργεια. Λόγω της δράσης του tritosulfuron, το ποσοστό των λειτουργικών κέντρων αντίδρασης μειώνεται. Παράλληλα, μέρος από τα μειωμένα αυτά λειτουργικά κέντρα, λόγω της δράσης των παρεμποδιστών του PSII δεν μπορούν να οξειδωθούν στο σκοτάδι, αλλά παραμένουν ανηγμένα (κλειστά), οπότε και δεν είναι σε θέση να προσλάβουν φωτεινή ενέργεια όταν εκτεθούν στο φως. Γίνεται φανερό ότι στην περίπτωση που το tritosulfuron είναι σε μεγάλη αναλογία σε σχέση με τους παρεμποδιστές του PSII, ο τελικός αριθμός των μη λειτουργικών κέντρων αντίδραση αυξάνεται σημαντικά και η απόλυτα μέγιστη απόδοση χρήσης του απορροφούμενου φωτός για την διεξαγωγή φωτοχημικών αντιδράσεων μειώνεται περισσότερο από το αναμενόμενο, οδηγώντας σε συνεργισμό. Αυτή η υπόθεση, για την εξήγηση του συνεργισμού που παρατηρήθηκε, απαιτεί διερεύνηση, καθώς με τα μέχρι τώρα δεδομένα δεν αποδεικνύεται, ενώ επιπλέον πειραματισμός με αντίστοιχους συνδυασμούς είναι απαραίτητος ώστε να επιβεβαιωθεί το κατά πόσον αυτό

επαναλαμβάνεται. Επίσης, δεν έχει εντοπιστεί καμία έρευνα σε επιστημονικό περιοδικό που να αφορά μελέτη του φθορισμού της χλωροφύλλης σε συνδυασμό ζιζανιοκτόνων με αυτούς τους μηχανισμούς δράσης, οπότε δεν είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων. Το γεγονός αυτό δεν αποτελεί εξαίρεση αλλά αντίθετα τον κανόνα δοθέντος ότι δεν έχει γίνει αξιοποίηση του φθορισμού ως εργαλείο για την εκτίμηση της τοξικότητας μιγμάτων ξενοβιοτικών σε βιοδοκιμές με *Lemna* sp. (Mkandawire et al, 2014) αλλά και με άλλα φυτά, και ως εκ τούτου πολύ λίγες μελέτες υπάρχουν στη βιβλιογραφία.

Η μέγιστη φωτοχημική απόδοση στον συνδυασμό του terbuthylazine με το metribuzin έδειξε ανταγωνιστική δράση. Σε περιπτώσεις μιγμάτων που ο τρόπος δράσης των φ.π. είναι ο ίδιος, όπως σε αυτή την περίπτωση, ο ανταγωνισμός αποτελεί συχνό φαινόμενο. Αυτό οφείλεται στο ότι διεκδικούν και οι δύο δραστικές πρόσθεση στην ίδια θέση (στην D1 πρωτεΐνη του PSII στην συγκεκριμένη περίπτωση). Όποια έχει μεγαλύτερη συγγένεια με την θέση πρόσδεσης θα εκτοπίσει την άλλη (Walker et al., 2001). Οι Jansen et al. (1993), απέδειξαν την ύπαρξη ανταγωνισμού για την θέση πρόσδεσης στην D1 πρωτεΐνη μεταξύ δύο παρεμποδιστών του PSII (του diuron και του bromonitrothymol/BNT). Οι Chesworth et al. (2004) σε μελέτη που έκαναν στη F_v/F_m των θαλάσσιων φυτών του είδους *Zostera marina* μετά από έκθεση στον συνδυασμό του diuron και του irganol 1051 (παρεμποδιστές του PSII) βρήκαν ανταγωνιστική δράση. Ίδιο αποτέλεσμα έδωσε και ο συνδυασμός του atrazine και του simazine, όσο αφορά την Φ_{PSII} της *L. minor* (Kumar & Han, 2011).

Η λειτουργική φωτοχημική απόδοση είχε προσθετική δράση σε όλους τους συνδυασμούς που εξετάστηκαν, με εξαίρεση τον συνδυασμό 25% tritosulfuron-75% tribenuron methyl, που είχε συνεργιστική δράση. Οι Magnusson et al. (2010) που χρησιμοποίησαν την Φ_{PSII} ως κριτήριο αξιολόγησης της τοξικότητας συνδυασμών ζιζανιοκτόνων του PSII σε μικροφύκη κατέληξαν ότι για όλους τους συνδυασμούς που δοκιμάστηκαν η δράση ήταν προσθετική. Επίσης, στο ίδιο συμπέρασμα έφτασαν και οι Legrand et al. (2006), που μελέτησαν την Φ_{PSII} σε μικροφύκη μετά από έκθεση στον συνδυασμό του diuron και του atrazine (παρεμποδιστές του PSII).

Τα αποτελέσματα της συνδυαστικής δράσης των ζιζανιοκτόνων για την μέγιστη και την λειτουργική φωτοχημική απόδοση διέφεραν τόσο μεταξύ τους όσο και με αυτά της ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα δηλαδή της συνδυαστικής δράσης των βιοσημαντών

αυτών δεν είναι ενδεικτικά του τι συμβαίνει σε επίπεδο πληθυσμού. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την μελέτη των Cedergreen et al. (2007) που συνέκριναν τα αποτελέσματα της έκθεσης της *L.minor* σε μίγματα ζιζανιοκτόνων ως προς την ανάπτυξη και ως προς την συγκέντρωση χρωστικών ουσιών (βιοσημαντής). Κατά συνέπεια, δεν είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων για τη δράση των μιγμάτων σε επίπεδο πληθυσμού από τα αποτελέσματα της δράσης τους στις φωτοχημικές παραμέτρους του PSII.

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Εισαγωγή

3.1.1 Οξειδωτική καταπόνηση και ζιζανιοκτόνα

Ενεργές μορφές οξυγόνου, ROS, ονομάζονται οι δραστικές ανηγμένες ενδιάμεσες μορφές οξυγόνου που σχηματίζονται από την ατελή αναγωγή του οξυγόνου. Στις μορφές αυτές περιλαμβάνονται ιόντα, ελεύθερες ρίζες⁵ (ρίζα σουπεροξειδικού ανιόντος $-O_2^{\cdot-}$, ρίζα υδροξυλίου- OH^{\cdot} , υδροϋπεροξειδική ρίζα- HO_2^{\cdot} , ρίζα αλκοοξυλίου- RO^{\cdot}) μόρια (υπεροξειδίο του υδρογόνου- H_2O_2 , οξυγόνο διέγερσης απλότητας 1O_2) κ.α. Οι ROS είναι βραχύβιες και εξαιρετικά δραστικές και προκαλούν αλλοιώσεις σε πρωτεΐνες, λιπίδια, υδρογονάνθρακες και στο DNA, ενώ μπορούν να οδηγήσουν και στον θάνατο των κυττάρων (Gill & Tuteja, 2010, Καραμπουρνιώτης κ.α., 2012). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ROS παράγονται σε μικρές συγκεντρώσεις και εξουδετερώνονται σε οργανίδια όπως οι χλωροπλάστες, τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξυσώματα. Παρόλα αυτά, η ισορροπία μεταξύ των μονοπατιών που παράγουν ROS και των μηχανισμών εξουδετέρωσής τους μπορεί να διαταραχθεί όταν τα φυτά υποβάλλονται σε συνθήκες καταπόνησης, οδηγώντας σε υπερπαραγωγή ROS και οξειδωτική καταπόνηση⁶. Οι συνθήκες αυτές μπορεί να προέρχονται τόσο από βιοτικούς όσο και από αβιοτικούς παράγοντες όπως η αλατότητα, η UV ακτινοβολία, η ξηρασία, τα βαρέα μέταλλα, οι ακραίες θερμοκρασιακές συνθήκες, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, η αέρια ρύπανση, τα ζιζανιοκτόνα και τα παθογόνα (Gill & Tuteja, 2010).

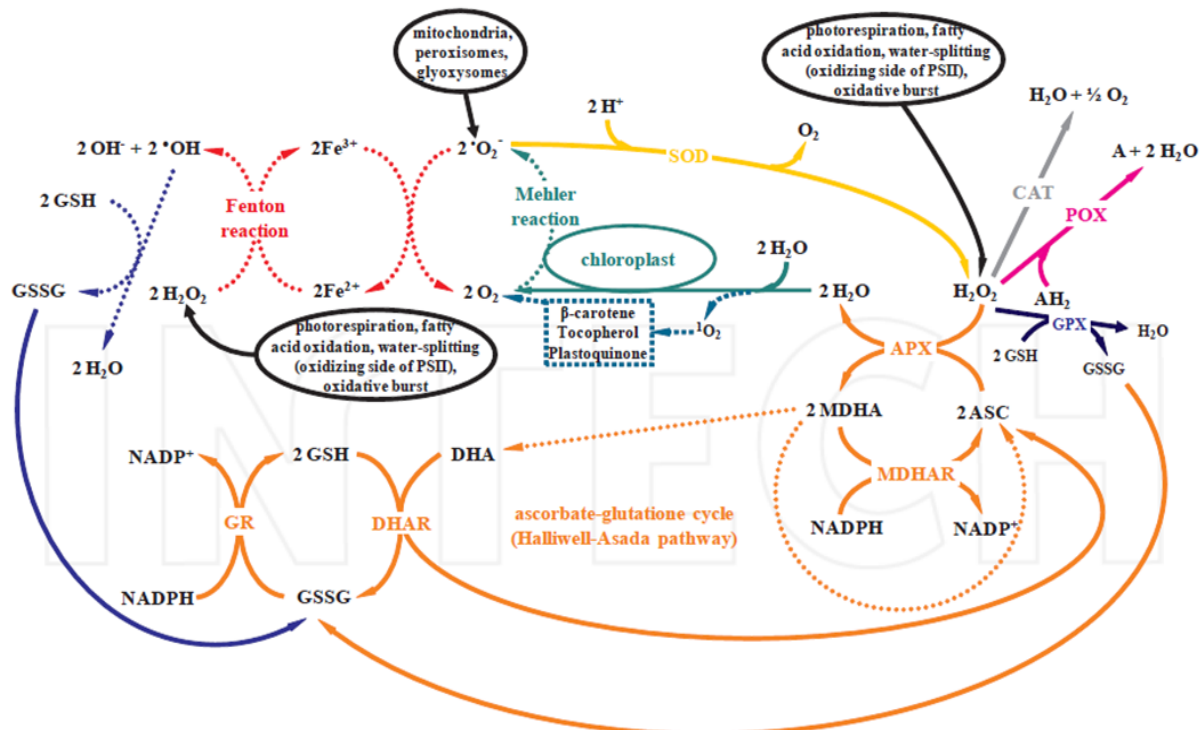
Για να μετριάσουν την επιπτώσεις της οξειδωτικής καταπόνησης, τα φυτά έχουν ένα πολύπλοκο αντιοξειδωτικό μηχανισμό που περιλαμβάνει μη ενζυμικά αλλά και ενζυμικά αμυντικά συστήματα. Στα μη ενζυμικά περιλαμβάνονται υδρόφιλες ενώσεις, όπως το ασκορβικό οξύ (ASC), η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και λιπόφιλες ενώσεις όπως η α-τοκοφερόλη και τα καροτενοειδή, οι οποίες είναι ικανές να αποσβένουν τις ROS. Τα ενζυμικά συστήματα περιλαμβάνουν τη δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD),

⁵ Οι ελεύθερες ρίζες ορίζονται ως τα άτομα ή τα μόρια εκείνα που έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (Abdollahi et al., 2004)

⁶ Η οξειδωτική καταπόνηση ορίζεται ως η ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών ικανών να προκαλέσουν υπεροξείδωση της στιβάδας των λιπιδίων των κυττάρων και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού (Abdollahi et al., 2004)

την καταλάση (CAT), και την υπεροξειδάση (POX) (da Silva et al., 2013). Η SOD αποσβένει τις παραγόμενες ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος $-O_2^{\cdot-}$ μετατρέποντάς τες σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια εξουδετερώνεται από την CAT και/ή την POX (Εικόνα 3.1.). Με τον τρόπο αυτό η SOD και η CAT δρουν στην σειρά την πρώτη γραμμή της αντιοξειδωτικής άμυνας (Scandalios, 2005). Επιπρόσθετα, μια σειρά από ένζυμα χρειάζονται για την επαναδημιουργία των ενεργών μορφών των αντιοξειδωτικών (ρεδουκτάση της γλουταθειόνης - GR, ρεδουκτάση του μόνοδευδρασκορβικού - MDHAR και του δευδρασκορβικού - DHAR) (Εικόνα 3.1.) (da Silva et al., 2013).

Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν στο εισαγωγικό κεφάλαιο (βλ. υποκεφ. Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος II, Εικόνα 0.7, υποκεφ. Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλλικού) αλλά και σε συνδυασμό με τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα ζιζανιοκτόνα που παρεμποδίζουν το PSII όσο και αυτά που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση των αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλλικού με τον μηχανισμό δράσης τους οδηγούν στην δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου. Κατά συνέπεια, τα ζιζανιοκτόνα αυτά ενεργοποιούν τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των φυτών.

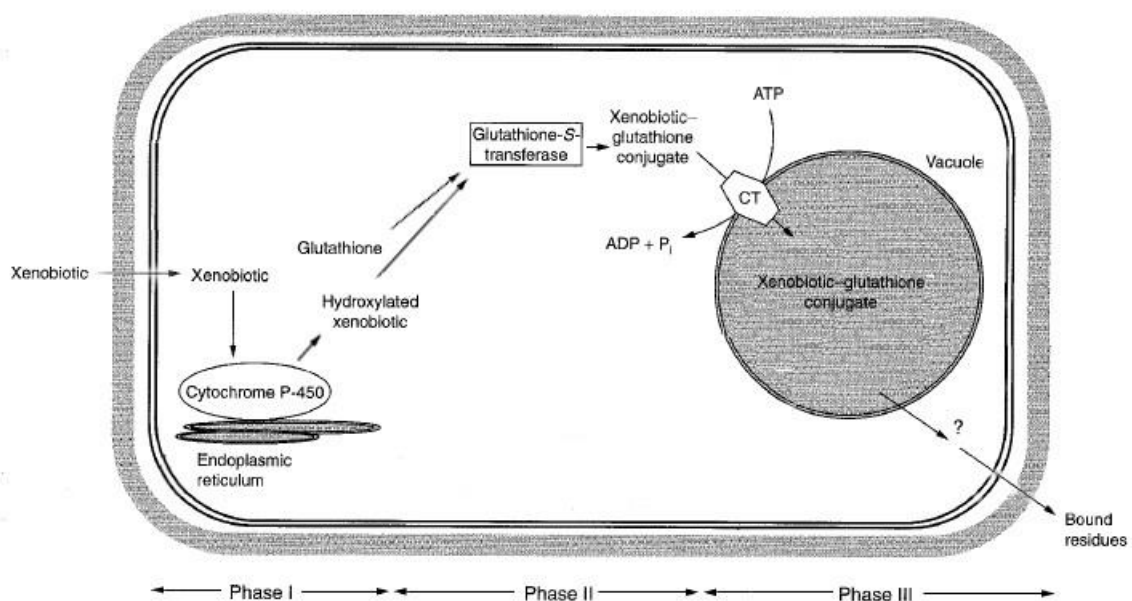


Εικόνα 3.1: Βιοχημικοί μηχανισμοί εξουδετέρωσης ROS (da Silva et al., 2013)

3.1.2 Μεταβολισμός ζιζανιοκτόνων στα φυτικά κύτταρα

Τα ζιζανιοκτόνα, μετά την απορρόφησή τους από τα φυτά, μετακινούνται σε διάφορες θέσεις των φυτών όπου και εκδηλώνεται η δράση τους. Αρκετά συχνά, όμως, πριν εκδηλώσουν τη δράση τους, μεταβολίζονται ή αδρανοποιούνται εντός των φυτών ή απεκκρίνονται από αυτά. Ο μεταβολισμός των ζιζανιοκτόνων, είναι το σύνολο των φυσιολογικών και βιοχημικών διεργασιών που οδηγούν στην απώλεια της δράσης τους (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Το μεταβολικό μονοπάτι της αποτοξίνωσης των ξενοβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων και των ζιζανιοκτόνων, αποτελείται από τρεις φάσεις (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Οι τρεις φάσεις της αποτοξίνωσης των ξενοβιοτικών προϊόντων σε φυτά. (τροποποίηση από Coleman et al., 1997).

Στην πρώτη φάση, φάση μετασχηματισμού, το ξενοβιοτικό προϊόν ενεργοποιείται. Αυτό γίνεται μέσω της υδρόλυσης, της αναγωγής ή της οξείδωσης. Συνήθως όμως, οι αντιδράσεις ενεργοποίησης γίνονται μέσω της οξείδωσης. Αυτές οι διαδικασίες καταλύονται από τις μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450, που βρίσκονται σε μεμβρανικά μέρη ή από υπεροξειδάσες (POX), οι οποίες βρίσκονται στον αποπλάστη και στο κυτταρόπλασμα (Schroder, 2007). Τα προϊόντα του μετασχηματισμού είναι περισσότερο υδρόφιλα από την αρχική ένωση ενώ η κύρια λειτουργία της φάσης αυτής είναι η δημιουργία ενεργών κέντρων στο ξενοβιοτικό με την προσθήκη λειτουργικών ομάδων (πχ. υδροξυλομάδες, καρβοξυλομάδες), προετοιμάζοντάς το για την αντιδράσεις της επόμενης φάσης (Coleman et al., 1997).

Η δεύτερη φάση είναι η φάση της σύζευξης. Η γλουταθειόνη δημιουργεί στο κυτταρόπλασμα ένα υδατοδιαλυτό σύμπλοκο με ηλεκτρονιόφιλες ουσίες όπως τα ξενοβιοτικά προϊόντα, η οποία έχει μειωμένη βιολογική δραστηριότητα, τοξικότητα και κινητικότητα. Τα ένζυμα που καταλύουν τη σύζευξη αυτή είναι οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs). Ο σχηματισμός συμπλόκων γίνεται και με σάκχαρα και αμινοξέα, εκτός της γλουταθειόνης (Coleman et al., 1997, Van Eerd et al., 2009). Πολλά ζιζανιοκτόνα αποτοξινώνονται μέσω αντίδρασης με τη γλουταθειόνη (Coleman et al., 1997), όπως οι τριαζίνες, οι σουλφονουλουρίες, τα χλωροακεταμίδια, τα θειοκαρβαμιδικά, οι διφαινυλικοί αιθέρες και τα αρυλοξυφαινοξυπροπιοικά (Naylor, 2002).

Η τρίτη φάση περιγράφεται ως φάση της διαμερισματοποίησης. Καθώς η συσσώρευση των συζεύξεων της γλουταθειόνης στο κυτταρόπλασμα μπορεί να είναι καταστρεπτική για το κύτταρο των φυτών, αυτές οι συζεύξεις μεταφέρονται και απομονώνονται στα χυμοτόπια από ATP εξαρτώμενες πρωτεΐνες (Coleman et al., 1997). Από τη στιγμή που οι συζεύξεις εισέρχονται στο χυμοτόπιο μπορεί να μεταβολιστούν περαιτέρω, να φυλαχθούν εκεί ή να απεκκριθούν από το κύτταρο (Naylor, 2002).

3.1.3 Ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των φυτών και στον μεταβολισμό των ζιζανιοκτόνων

Σύμφωνα με τα παραπάνω, πολλά ένζυμα εμπλέκονται τόσο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των κυττάρων όσο και στον μεταβολισμό των ζιζανιοκτόνων. Παρακάτω γίνεται αναλυτική αναφορά σε ορισμένα από αυτά, στα οποία και μελετήθηκε η δραστηριότητα.

3.1.3.1 Υπεροξειδάση - POX

Οι υπεροξειδάσες αποτελούν μια κατηγορία ενζύμων στους ιστούς ζώων, φυτών και μικροοργανισμών, που καταλύουν την οξειδοαναγωγή μεταξύ υπεροξειδίου του υδρογόνου και διαφορετικών αναγωγικών. Υπάρχουν τρεις βασικές κατηγορίες υπεροξειδάσων στα φυτά, οι οποίες σχετίζονται με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς: οι τάξης III φυτικές υπεροξειδάσες (ή μη συγκεκριμένες υπεροξειδάσες ή υπεροξειδάσες τύπου γουαϊακόλης, POX), οι υπεροξειδάσες του ασκορβικού οξέος (APX) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) (da Silva et al., 2013).

Η τάξης III υπεροξειδάση (POX) είναι μια φυτική οξειδοοξειδοουκτάση η δραστηριότητα της οποίας περιγράφηκε από το 1855. Η POX συναντάται στο κυτταρόπλασμα, στο χυμοτόπιο και στα κυτταρικά τοιχώματα και αποσυνθέτει το H_2O_2 μέσω της οξείδωσης υποστρωμάτων όπως φαινολικές ενώσεις (πχ. γουαϊακόλη, πυρογαλλόλη) και/ή ασκορβικό (Εικόνα 3.1.). Ανάμεσα στα διάφορα αντιοξειδωτικά, η POX μπορεί να θεωρηθεί ως μια από τα πλέον βασικά, καθώς τόσο η εξωκυτταρική όσο και η εσωκυτταρική μορφή της συμμετέχουν στην αποσύνθεση του H_2O_2 . Γενικά η POX είναι αποδεκτή σαν ένζυμο καταπόνησης, ενώ η δραστηριότητα της διαφοροποιείται πολύ ανάλογα με το είδος του φυτού και τις συνθήκες καταπόνησης (Gill & Tuteja, 2010, Karuppanandian et al., 2011, Sharma et al., 2012, da Silva et al., 2013).

3.1.3.2 Καταλάση - CAT

Η καταλάση (CAT) ήταν το πρώτο από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που αναγνωρίστηκε και χαρακτηρίστηκε. Είναι τετραμερές ένζυμο που και καταλύει την οξειδοαναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο και με τον τρόπο αυτό προστατεύει το κύτταρο από τις καταστροφικές επιπτώσεις της συσσώρευσης H_2O_2 (Εικόνα 3.1). Βρίσκεται σε όλους τους ευκαριωτικούς οργανισμούς, περιέχει αίμη και καταλύει τη μετατροπή του του H_2O_2 που προέρχεται από βιοχημικές διαδικασίες όπως η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, η φωτοαναπνοή, ο καταβολισμός των πουρινών και η οξειδωτική καταπόνηση, σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Υψηλή δραστηριότητα εντοπίζεται στα υπεροξεισώματα. Ένα χαρακτηριστικό της καταλάσης είναι ο πολύ υψηλός ρυθμός ανακυκλίσεως (turnover rate). Συγκεκριμένα, ένα μόριο CAT μπορεί να μετατρέψει ~6 εκατομμύρια μόρια H_2O_2 σε H_2O και O_2 ανά λεπτό. Το H_2O_2 έχει ενοχοποιηθεί για πολλές καταστάσεις καταπόνησης όπως για παράδειγμα όταν τα κύτταρα έχουν έλλειψη ενέργειας. Στις περιπτώσεις αυτές το H_2O_2 δημιουργείται πολύ γρήγορα μέσω καταβολικών διαδικασιών, και τελικά μειώνεται λόγω της δράσης της καταλάσης, η οποία παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα. Η περιβαλλοντική καταπόνηση προκαλεί είτε αύξηση είτε μείωση της δραστηριότητας της CAT, ανάλογα με την ένταση, την διάρκεια και το είδος της. Σε γενικές γραμμές όταν η καταπόνηση μειώνει τον ρυθμό ανακυκλίσεως (turnover rate) των πρωτεϊνών μειώνει και την δραστηριότητα της καταλάσης. Αυτή η μείωση της δραστηριότητά της μπορεί να μειώσει και την ανοχή των φυτών στη περιβαλλοντική καταπόνηση (Gill & Tuteja, 2010, Karuppanandian et al., 2011, Sharma et al., 2012, da Silva et al., 2013).

3.1.3.3 Ρεδουκτάση της γλουταθειόνης - GR

Η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR), βρίσκεται σε προκαριωτικούς και σε ευκαριωτικούς οργανισμούς και συναντάται κυρίως στους χλωροπλάστες αλλά και στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και τα υπεροξυσώματα. Η γλουταθειόνη GSH, όταν δρα σαν αντιοξειδωτικό παίρνοντας μέρος σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς οξειδοαναγωγικούς κύκλους, οξειδώνεται στην μορφή GSSG. Στον κύκλο ασκορβικού γλουταθειόνης (κύκλος Halliwell-Asada), η οξείδωση της GSH σε GSSG καταλύεται από την DHAR (Εικόνα 3.1.). Από την άλλη μεριά, η GR, ένα ένζυμο εξαρτώμενο από το NADPH, καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH και, έτσι, διατηρεί σε υψηλό επίπεδο τον λόγο GSH/ GSSG. Τόσο η GR όσο και η GSH παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντοχή του φυτού σε διάφορες συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (πχ. υψηλές θερμοκρασίες, παγετός) όπως επίσης και σε περιπτώσεις καταπόνησης από ζιζανιοκτόνα και βαρέα μέταλλα. Κάτω από τις συνθήκες αυτές η δραστηριότητα της GR αυξάνεται (Gill & Tuteja, 2010, Karuppanapandian et al., 2011, Sharma et al., 2012).

3.1.3.4 S-μεταφοράσες της γλουταθειόνης- GSTs

Οι S-μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs) είναι μια μεγάλη ομάδα ενζύμων του δευτερογενούς μεταβολισμού με μεγάλη ποικιλομορφία. Απαντώνται σε όλους τους ευκαριωτικούς οργανισμούς και αποτοξινώνουν ηλεκτρονιόφιλα ξενοβιοτικά καταλύοντας τη σύζευξη με τη γλουταθειόνη (βλ. Εικόνα 3.2 και παράγραφο 3.1.2) (Edwards & Dixon, 2000). Οι S-μεταφοράσες της γλουταθειόνης και η γλουταθειόνη έχουν εξελιχθεί μαζί καθώς απαντώνται σε ζώα, σε φυτά αλλά και σε βακτήρια (Schröder, 2001). Στα φυτά απαντώνται κυρίως στο κυτταρόπλασμα αλλά έχουν βρεθεί και στα μικροσώματα, στα πλαστίδια, και στον πυρήνα (Gill & Tuteja, 2010).

Οι GSTs εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στα φυτά στην αντίδραση σύζευξης μεταξύ του atrazine (χλωροτριαζίνη, ζιζανιοκτόνο του PSII) και της γλουταθειόνης GSH στον αραβόσιτο (Frear & Swanson, 1970). Η σύζευξη του atrazine με τη GSH οδήγησε σε άμεση και πλήρη απενεργοποίηση του atrazine, καταδεικνύοντας την σημαντικότητα των GSTs. Έκτοτε, έχουν μελετηθεί εντατικά ως προς τη συμμετοχή τους στην αποτοξίνωση από τα ζιζανιοκτόνα και πολλές GSTs θεωρούνται υπεύθυνες για την ανοχή κάποιων καλλιεργειών στα ζιζανιοκτόνα καθώς και για την ανθεκτικότητα ορισμένων ζιζανίων σε αυτά (Schröder, 2001). Εκτός από την αποτοξίνωση από τα

ζιζανιοκτόνα οι GSTs, σύμφωνα με τις μελέτες, διατελούν και άλλους ρόλους οι οποίοι περιγράφονται παρακάτω. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου που παράγονται σε συνθήκες καταπόνησης προκαλούν οξείδωση μεμβρανικών λιπιδίων, μετατρέποντάς τα σε υπεροξειδία των λιπιδίων. Επίσης, οι ROS δημιουργούν και προϊόντα οξειδωτικής αποδόμησης του DNA. Όλα τα προϊόντα αυτά είναι κυτταροτοξικά και με τη βοήθεια των GSTs αποτοξινώνονται καθώς δημιουργούν σύμπλοκα με τη γλουταθειόνη. Μερικές GSTs λειτουργούν σαν υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης και αποτοξινώνουν απευθείας τέτοια προϊόντα. Επίσης παίζουν ρόλο και στον φυσιολογικό κυτταρικό μεταβολισμό, και συγκεκριμένα στον δευτερογενή μεταβολισμό προϊόντων όπως οι ανθοκυάνες. Τέλος, βοηθούν στην ομοίωση των ορμονών καθώς και στην αντιμετώπιση της καταπόνησης που προκαλείται από παθογόνα και από βαρέα μέταλλα (Marrs, 1996, Dixon et al., 2010, Gill & Tuteja, 2010).

3.2 Σκοπός του κεφαλαίου

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, σχηματίζεται η υπόθεση ότι τόσο τα ζιζανιοκτόνα του PSII όσο και τα ζιζανιοκτόνα που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση των αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού ενεργοποιούν τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό της *L.minor* και οδηγούν σε αύξηση της δραστηριότητας της CAT, της POX, της GR και των GSTs. Επιπρόσθετα, και σε συμφωνία με υπάρχουσες μελέτες της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων μετά από έκθεση σε ζιζανιοκτόνα (Teisseire & Vernet, 2000, Geoffroy et al., 2004, Mitsou et al., 2006), γίνεται η υπόθεση ότι η ενεργοποίηση αυτή είναι σύντομη (ακόμα και πριν τις 24 ώρες έκθεσης). Επιλέχθηκαν, συνεπώς, οι 48 ώρες έκθεσης των φυτών στα ζιζανιοκτόνα ως η χρονική στιγμή για την μέτρηση της δραστηριότητας των παραπάνω ενζύμων. Παράλληλα, στις 48 ώρες έκθεσης η παρεμπόδιση της ανάπτυξης έχει μόλις ξεκινήσει, αλλά είναι ακόμα μικρή, κυρίως στις χαμηλές συγκεντρώσεις. Δεν είναι δηλαδή η παρεμπόδιση της ανάπτυξης ακόμα ενδεικτική του τοξικολογικού κινδύνου. Εφόσον λοιπόν ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός ενεργοποιηθεί σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα έκθεσης και ειδικά αν αυτό συμβεί και σε συγκεντρώσεις που δεν διαφέρουν με τον μάρτυρα ως προς την ανάπτυξη, η δραστηριότητα των ενζύμων θα μπορούσε να αποτελέσει ένα ευαίσθητο βιοσημαντή της τοξικότητας από τα ζιζανιοκτόνα που θα επέτρεπε την διάγνωση του κινδύνου νωρίς. Στόχος λοιπόν του παρόντος κεφαλαίου ήταν καταρχάς η εξέταση των παραπάνω υποθέσεων και δευτερευόντως η μελέτη των ενζύμων αυτών σε έκθεση σε συνδυασμό

δύο ζιζανιοκτόνων με τον διαφορετικό μηχανισμό δράσης, καθώς στη βιβλιογραφία η συνδυασμένη τοξικότητα έχει μελετηθεί ελάχιστα στο επίπεδο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Καμία δημοσιευμένη επιστημονική εργασία δεν βρέθηκε για το πώς το tritosulfuron επηρεάζει τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, γεγονός που καθιστά ακόμα πιο ενδιαφέρουσα τη μελέτη του.

3.3 Υλικά και μέθοδοι για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων

Για τον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες στα φυτά της *L. minor* κάτω από έκθεση σε ζιζανιοκτόνα που παρεμποδίζουν το PSII και την βιοσύνθεση αμινοξέων καθώς και σε συνδυασμό τους, επιλέχθηκαν τα terbuthylazine και tritosulfuron.

3.3.1 Σχεδιασμός του πειράματος

Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν όπως επίσης και ο σχεδιασμός του πειράματος και το πρωτόκολλο πειραματισμού ήταν ίδια με αυτά που περιγράφονται στο ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 (βλ. υποκεφ. 1.3). Οι συνολικές μεταχειρίσεις των μεμονωμένων ζιζανιοκτόνων και των συνδυασμών τους ήταν 30 και οι παρατηρήσεις ήταν 102. Η μέτρηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων έγινε μετά από 48 h έκθεση στις δραστικές ουσίες. Για τον λόγο αυτό την μέρα που ξεκινούσε η δοκιμή σε κάθε βοθρίο του πλακιδίου κυτταροκαλλιέργειας τοποθετούνταν 7 φυτά με περίπου τέσσερα φυλλίδια το κάθε ένα. Μετά την πάροδο 48 h τα φυτά τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο, αφού προηγουμένως κοβόταν το ριζικό τους σύστημα. Στη συνέχεια φυλάσσονταν στους -80 °C μέσα σε κρυοφιαλίδια (cryovials, Corning). Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές και ο φυτικός ιστός κάθε παρατήρησης ενοποιήθηκε με τον αντίστοιχο τις προηγούμενης επανάληψης του πειράματος έτσι ώστε να υπάρχει τελικά επαρκής ποσότητα για κάθε δείγμα (~ 250 mg).

3.3.2 Χημικά που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματισμό

Τα χημικά γλουταθειόνη (GSH), ανηγμένη γλουταθειόνη (GSSG), γουαϊακόλη καθώς και το διάλυμα Bradford (Coomassie Protein Assay Reagent), αγοράστηκαν από την Fluka. Το υδροχλώριο, το Tris, το 1-γλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), το δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄) και το όξινο φωσφορικό κάλιο (K₂HPO₄) ήταν της Merk. Το 1,4-Dithioerythritol (DTE), το EDTA και η γλυκερόλη αποκτήθηκαν από την εταιρία Roth. Η αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), το p-nitrophenyl acetate (pNpa) και το

H₂O₂ αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich. Τέλος, το Fluorodifen ήταν της εταιρίας RDH.

3.3.3 Εκχύλιση ενζύμων από τον φυτικό ιστό

Η διαδικασία εκχύλισης των ενζύμων καθώς και η μέτρηση της δραστητικότητάς τους πραγματοποιήθηκαν στο Research Unit for Microbe-Plant Interactions (AMP) του Helmholtz Zentrum στο Μόναχο της Γερμανίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Peter Schröder.

Αρχικά ο φυτικός ιστός λειοτριβήθηκε με υγρό άζωτο και ζυγίστηκε. Στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα εκχύλισης σε αναλογία 1 ml διαλύματος για κάθε 150 mg ιστού. Ο ιστός σε κάθε παρατήρηση ήταν περίπου 250 mg. Το διάλυμα εκχύλισης περιείχε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH 7,6, 0,1 mM EDTA, 10% γλυκερόλη και 5mM DTE (1,4-Dithrioerythritol).

Ακολούθως τα δείγματα φυγοκετρήθηκαν για 30 min στις 13.000 στροφές στους 4°C (Eppendorf Certifuge, 5415R). Το υπερκείμενο υγρό όλων των δειγμάτων παραλήφθηκε σε σωληνάρια τύπου Eppendorf και αφού τοποθετήθηκε σε υγρό άζωτο, φυλάχθηκε στους -80 °C.

3.3.4 Μέτρηση της ειδικής δραστητικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων

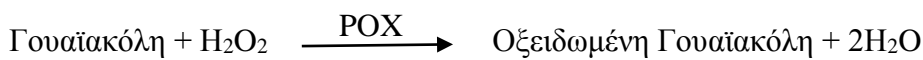
Η δραστητικότητα των ενζύμων μετρήθηκε με τη χρήση του φωτομέτρου 96 μικροβοθρίων SPECTRAMax PLUS 384 και με το λογισμικό πρόγραμμα SOFTmax PRO 6.2.1. Για τις μετρήσεις στο φάσμα του ορατού φωτός (390-750 nm), χρησιμοποιήθηκαν πλακίδια 96 μικροβοθρίων της Thermo Nunc, ενώ ειδικά πλακίδια από την Greiner χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις στο φάσμα UV. Το τυφλό δείγμα αποτελούνταν από το διάλυμα της αντίδρασης χωρίς το ενζυμικό εκχύλισμα, με απεσταγμένο νερό στη θέση του. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν με τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

Σε όλες τις παρατηρήσεις του πειραματισμού μετρήθηκε η δραστητικότητα της υπεροξειδάσης (POX) της καταλάσης (CAT), της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GR) και των S-μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται παρακάτω. Παράλληλα, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (mg/mL) οπότε και έγινε ο υπολογισμός της ειδικής δραστητικότητας (nkat/mg, με nkat=nmol/sec)

3.3.4.1 Ειδική δραστικότητα υπεροξειδάσης POX

Για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστικότητας της υπεροξειδάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Cakmak & Marschner (1992). Για την μέτρηση, κάθε βοθρίο του πλακιδίου των 96 μικροβοθρίων περιείχε σε τελικό όγκο 200 μl :190 μl με 25 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KPP) pH 7, 0,05% γουαϊακόλη (guaiacol) και 10 mM H_2O_2 , καθώς και 10 μl ενζυμικό εκχύλισμα. Η μέτρηση έγινε στα 470 nm, ενώ ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης (extinction coefficient) που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ειδικής δραστικότητας ήταν $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Η μέτρηση της δραστικότητας βασίζεται στην αντίδραση:



καθώς μετράται ο ρυθμός παραγωγής της οξειδωμένης γουαϊακόλης (Katoch, 2011).

3.3.4.2 Ειδική δραστικότητα καταλάσης CAT

Για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστικότητας της καταλάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Verma και Dubey (2003) με μια τροποποίηση. Για την μέτρηση, κάθε βοθρίο του πλακιδίου των 96 μικροβοθρίων περιείχε σε τελικό όγκο 150 μl : 100 μl 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (KPP) pH 7, 40 μl 200 mM H_2O_2 και 10 μl ενζυμικό εκχύλισμα. Η μείωση του H_2O_2 στα βοθρία μετρήθηκε στα 240 nm, ενώ ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ειδικής δραστικότητας ήταν $0,036 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Η μέτρηση της δραστικότητας βασίζεται στην αντίδραση:



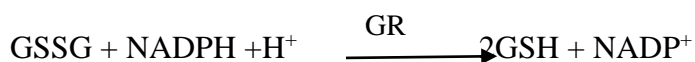
καθώς μετράται φωτομετρικά η μείωση του H_2O_2 (Chelikani et al., 2004).

3.3.4.3 Ειδική δραστικότητα ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης GR

Για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστικότητας της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Zhang και Kirkham (1996). Για την μέτρηση, κάθε βοθρίο του πλακιδίου των 96 μικροβοθρίων περιείχε σε τελικό όγκο 200 μl : 190 μl διάλυμα μέτρησης και 10 μl ενζυμικό εκχύλισμα. Το διάλυμα μέτρησης περιείχε 9,3 ml ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M Tris/HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 0,1 ml 10 mM οξειδωμένη

γλουταθειόνη (GSSG), και 0,1 ml 10 mM NADPH. Η μέτρηση έγινε στα 340 nm, ενώ ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας ήταν $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Η μέτρηση της δραστηριότητας βασίζεται στην αντίδραση:



καθώς μετράται φωτομετρικά η οξείδωση του NADPH (Sies & Packer, 2002).

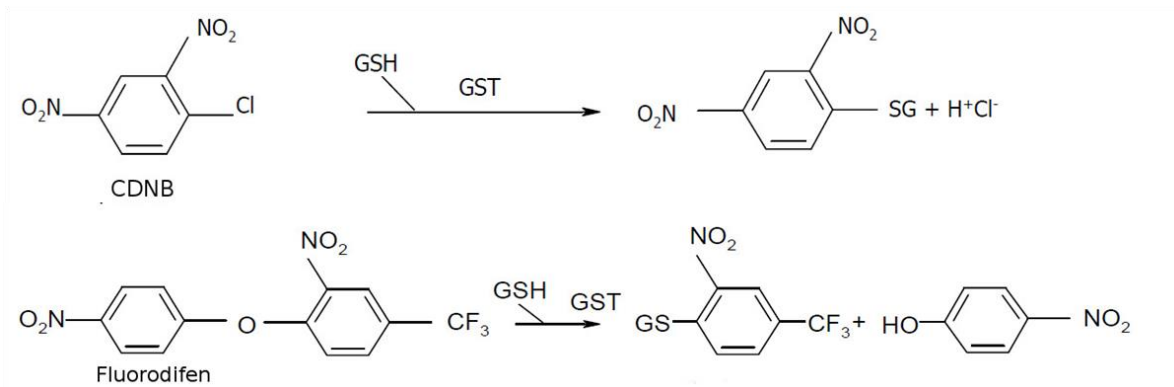
3.3.4.4 Ειδική δραστηριότητα της S-μεταφοράς της γλουταθειόνης GSTs

Για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας της S-μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST) χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά υποστρώματα: το 1-χλώρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB), το p-nitrophenyl acetate (pNpa) και το ζιζανιοκτόνο fluorodifen. Με τα διαφορετικά υποστρώματα μπορεί να προσδιοριστεί η δραστηριότητα διαφορετικών ισομορφών των GSTs. Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται όλες οι λεπτομέρειες (αντιδραστήρια, συγκεντρώσεις, μήκος κύματος, διάρκεια μέτρησης, συντελεστής μοριακής απόσβεσης) για την μεθοδολογία μέτρησης και με τα τρία υποστρώματα.

Πίνακας 3.1: Τα διαφορετικά υποστρώματα της GST και οι πληροφορίες για τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν

	CDNB	p-Npa	Fluorodifen
ρυθμιστικό διάλυμα	Tris/HCl 0,1M pH 6,4	KPP 0,1M pH 7,0	Tris/HCl 0,1M pH,7.5
μήκος κύματος	340 nm	400 nm	400 nm
συντελεστής μοριακής απόσβεσης [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	9,6	8,79	17,2
συγκέντρωση υποστρώματος [mM]	1	0,2	0,3
συγκέντρωση γλουταθειόνης (GSH) [mM]	1	0,5	1,2
Διάρκεια μέτρησης στο φωτόμετρο (min)	5	5	20

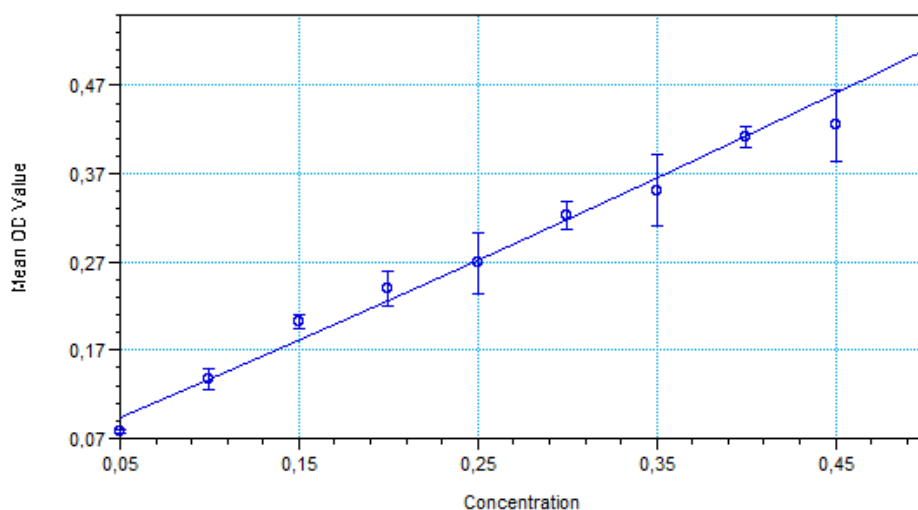
Η βιοδοκιμή έγινε σύμφωνα με τους Habig et al. (1974). Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζεται η αντίδραση του CDNB και του fluorodifen με την γλουταθειόνη.



Εικόνα 3.3: Η αντίδραση του CDNB και του fluorodifen με τη γλουταθειόνη (τροποποίηση από Lyubenova 2008)

3.3.4.5 Συγκέντρωση πρωτεϊνών

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον Bradford (1976) με την χρήση του Coomassie Protein Assay Reagent (διάλυμα Bradford). Αρχικά το ενζυμικό εκχύλισμα αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό (1:5 v/v), ενώ το διάλυμα Bradford αραιώθηκε επίσης σε αναλογία 1:10. Σε 10 μl από το αραιωμένο εκχύλισμα προστέθηκαν 200 μl από το αραιωμένο διάλυμα Bradford. Μετά από επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου έγινε μέτρηση στα 595 nm. Οι τιμές της μέτρησης μετατράπηκαν σε mg πρωτεΐνης ανά ml διαλύματος με την χρήση της πρότυπης καμπύλης. Η καμπύλη αυτή δημιουργήθηκε με την χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) (Εικόνα 3.4)



Εικόνα 3.4: Η πρότυπη καμπύλη για την ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών

3.3.5 Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας πρωτεϊνών

Η ειδική δραστηριότητα (Specific activity SA, $\mu\text{kat}/\text{mg}$) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση:

$$SA (\mu\text{kat}/\text{mg}) = A * V_{\text{tot}} / (\epsilon * t * V_{\text{enzyme}} * P)$$

όπου A είναι η μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης ανά min και cm ($\text{mOD min}^{-1} \text{cm}^{-1}$), V_{tot} είναι ο συνολικός όγκος της αντίδρασης (ενζυμικό εκχύλισμα + διάλυμα μέτρησης) σε μl , ϵ ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης, $t = 60 \text{ s}$, V_{enzyme} ο όγκος του ενζυμικού εκχυλίσματος σε μl και P η συγκέντρωση σε πρωτεΐνες σε mg/ml .

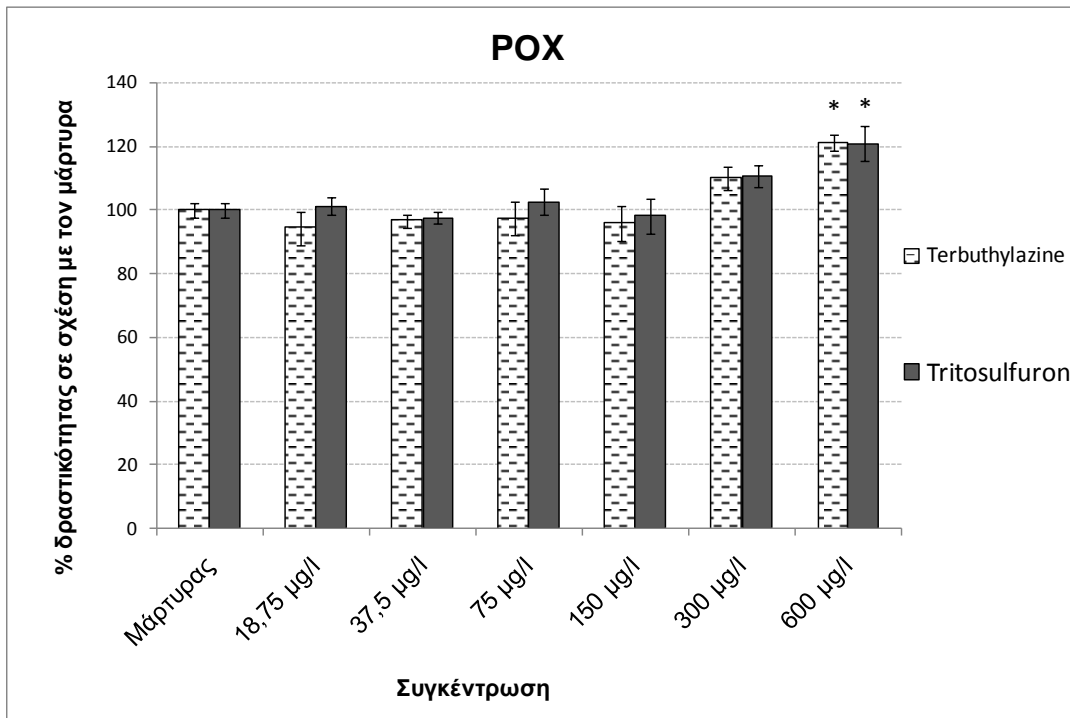
3.4 Αποτελέσματα ειδικής δραστηριότητας ενζύμων

Παρακάτω παρουσιάζονται οι ειδικές δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων υπεροξειδάση, καταλάση, ρεδουκτάση της γλουταθειόνης και S-μεταφοράσης της γλουταθειόνης μετά από τις 48 h έκθεση στις διάφορες συγκεντρώσεις των terbuthylazine και tritosulfuron καθώς και σε μίγματά τους. Συμπτωματικά, το terbuthylazine και το tritosulfuron έχουν σχεδόν ίδια τοξικότητα για την *L.minor* (βλ. Γράφημα 1.3) και για το λόγο αυτό οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι ίδιες και για τις δύο δραστικές.

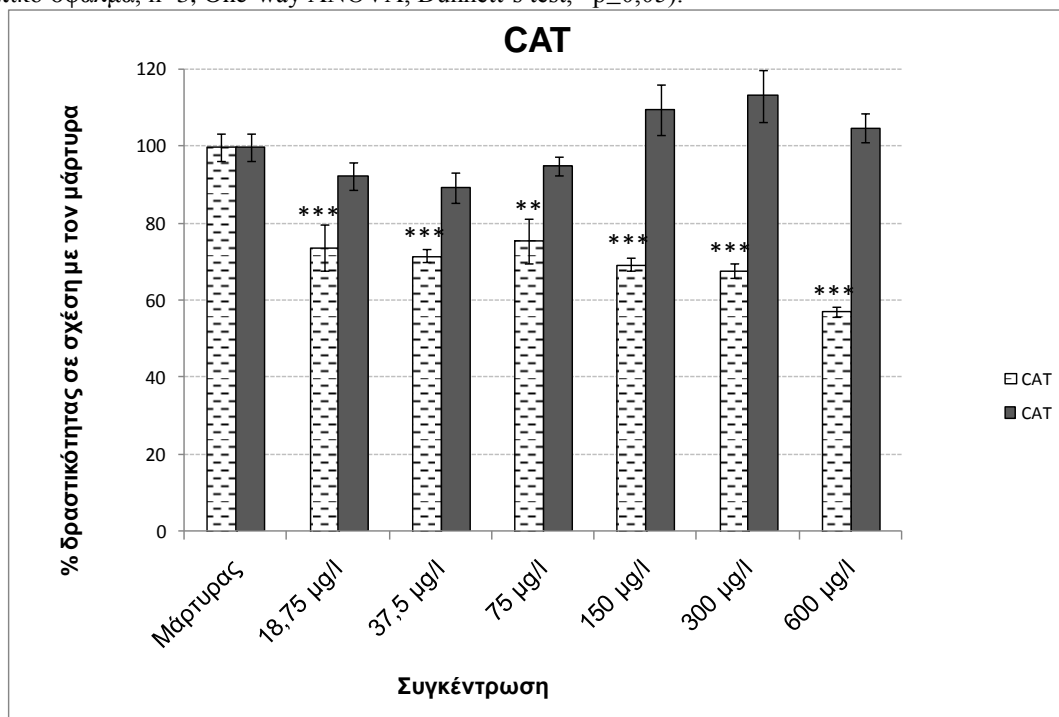
3.4.1 **Ειδική δραστηριότητα ενζύμων μετά από έκθεση στο terbuthylazine και το tritosulfuron**

Στο Γράφημα 3.1 παρουσιάζεται η ειδική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης-POX και για τις δύο δραστικές ουσίες. Σημαντική αύξησή της εντοπίζεται μόνο στην υψηλή συγκέντρωσή και των δύο ζιζανιοκτόνων και αυτή είναι της τάξεως του 20%. Η αμέσως μικρότερη συγκέντρωση είναι ελαφρά αυξημένη και στις δύο δραστικές, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά, ενώ οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις κυμαίνονται στα επίπεδα του μάρτυρα.

Η εικόνα της ειδικής δραστηριότητας της POX έρχεται σε αντίθεση με αυτή της καταλάσης- CAT (Γράφημα 3.2). Το terbuthylazine οδήγησε σε σημαντική μείωση της CAT σε όλες τις συγκεντρώσεις, η οποία έφτανε στο 43% στην μεγάλη συγκέντρωση. Αντίθετα, το tritosulfuron έδωσε μια πολύ μικρή αλλά όχι σημαντική αύξηση στην CAT στις συγκεντρώσεις πάνω από 150 mg/l , και σε γενικές γραμμές η ειδική δραστηριότητά της ήταν στο ίδιο επίπεδο με αυτή του μάρτυρα.



Γράφημα 3.1: Η ειδική δραστηκότητα της POX (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του terbutylazine και έξι συγκεντρώσεις του tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p<0,05).

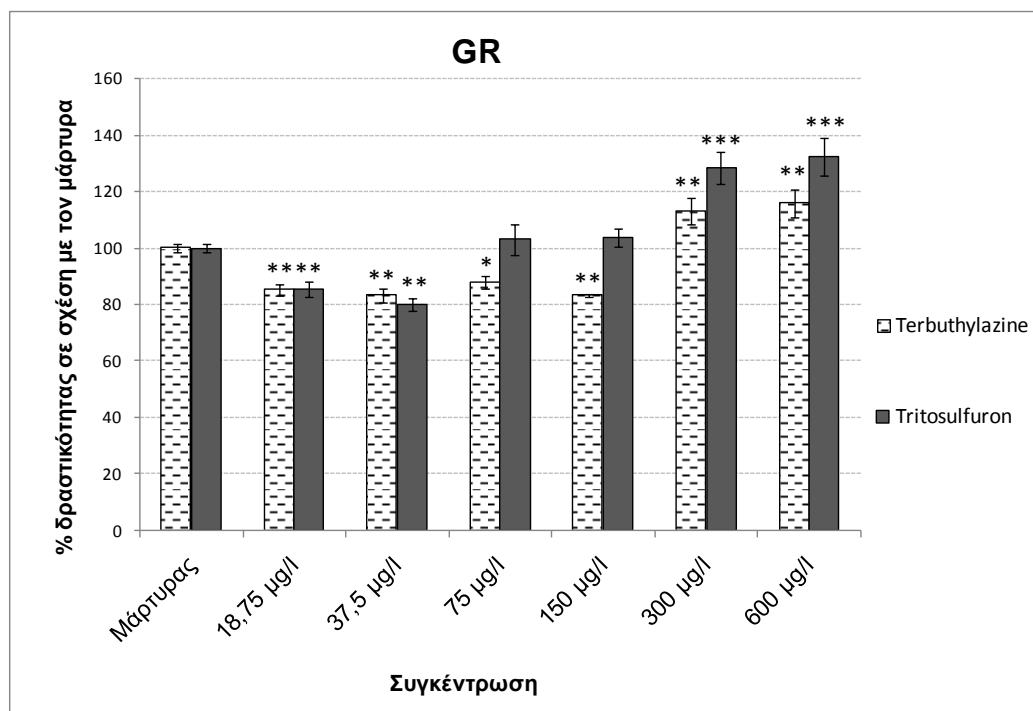


Γράφημα 3.2: Η ειδική δραστηκότητα της CAT (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του terbutylazine και έξι συγκεντρώσεις του tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

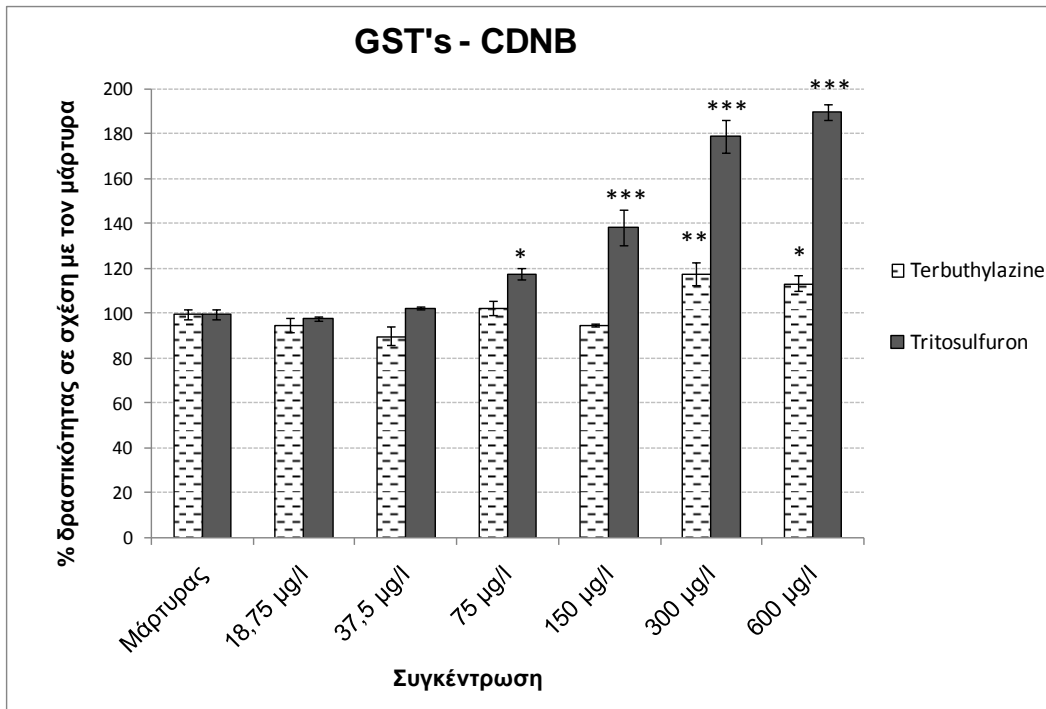
Η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης-GR, παρουσίασε αυξημένες τιμές και για τις δύο δραστικές στις μεγάλες συγκεντρώσεις, με μεγαλύτερη αύξηση, 32%, για το

tritosulfuron (Γράφημα 3.3). Στις μικρότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της δραστηριότητας σε σχέση με τον μάρτυρα.

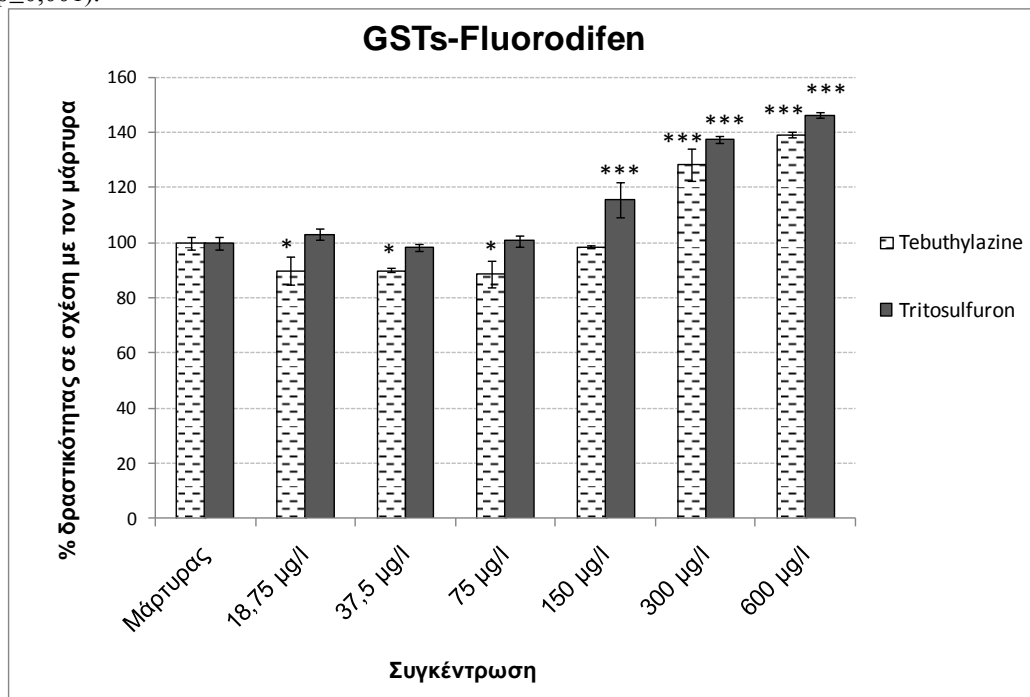
Για την δραστηριότητα της οικογένειας της S-μεταφοράς της γλουταθειόνης-GSTs χρησιμοποιείται συνήθως το υπόστρωμα CDNB. Καθώς όμως πρόκειται για πληθώρα ενζύμων με πολλές διαφορετικές ισομορφές, χρησιμοποιήθηκαν και άλλα δύο υποστρώματα, το p-Nra και το fluorodifen, έτσι ώστε να μπορούν να εντοπιστούν ομοιότητες ή διαφορές στην δραστηριότητα μεταξύ των διαφορετικών ισομορφών. Παρόλο τον διαφορετικό μηχανισμό δράσης των CDNB και fluorodifen (βλ. Εικόνα 3.3), η δραστηριότητα των GSTs με τα δύο αυτά υποστρώματα ήταν κοντινή για την έκθεση στα δύο ζιζανιοκτόνα (Γράφημα 3.4, Γράφημα 3.5). Διαφορετική εικόνα έδωσε η δραστηριότητα των GSTs με υπόστρωμα το p-Nra (Γράφημα 3.6).



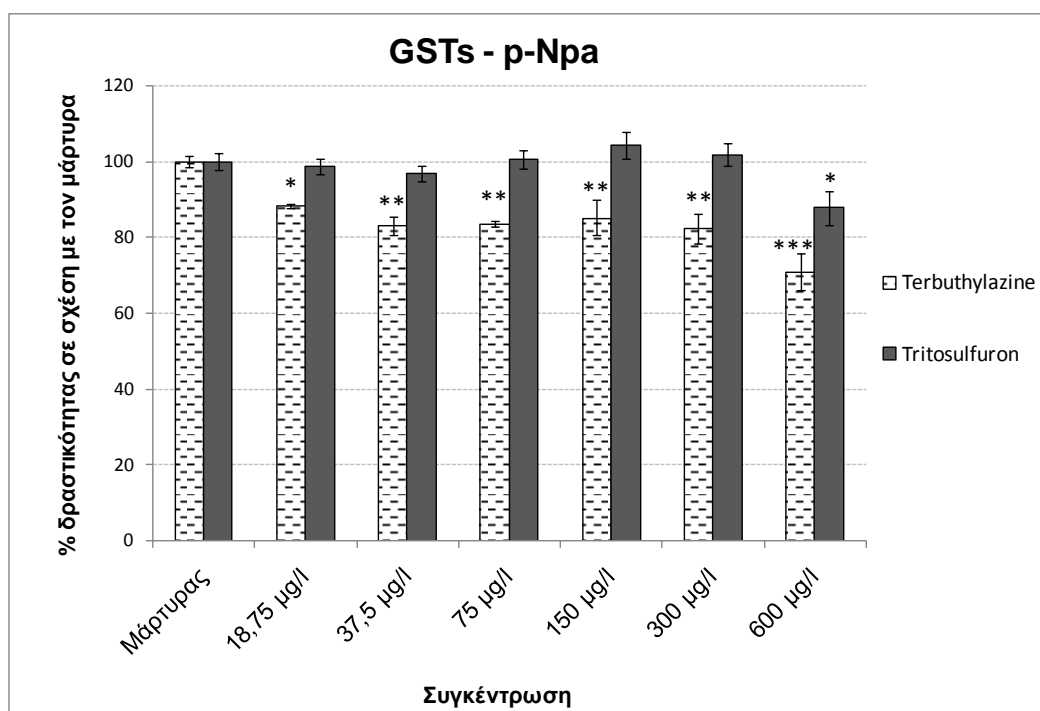
Γράφημα 3.3: Η ειδική δραστηριότητα της GR (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του terbuthylazine και έξι συγκεντρώσεις του tritosulfuron (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).



Γράφημα 3.4: Η ειδική δραστηκότητα των GSTs με υπόστρωμα το CDNB (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του terbutylazine και έξι συγκεντρώσεις του tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001).



Γράφημα 3.5: Η ειδική δραστηκότητα των GSTs με υπόστρωμα το fluorodifen (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του terbutylazine και έξι συγκεντρώσεις του tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p≤0,05, ***p≤0,001).



Γράφημα 3.6: Η ειδική δραστηριότητα των GSTs με υπόστρωμα το p-Npa (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του terbutylazine και έξι συγκεντρώσεις του tritosulfuron (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Ειδικότερα, η έκθεση της *L.minor* στο tritosulfuron οδήγησε σε πολύ μεγάλη αύξηση της δραστηριότητας των GSTs στις συγκεντρώσεις 150, 300 και 600 $\mu\text{g/l}$ με υπόστρωμα το CDNB (Γράφημα 3.4). Συγκεκριμένα, τα 600 $\mu\text{g/l}$ tritosulfuron αύξησαν την δραστηριότητα κατά 90%, τα 300 $\mu\text{g/l}$ κατά 80% και τα 150 $\mu\text{g/l}$ κατά 38%. Η αμέσως μικρότερη συγκέντρωση (75 $\mu\text{g/l}$) οδήγησε σε αύξηση 18% και στις ακόμα μικρότερες συγκεντρώσεις η δραστηριότητα ήταν ίδια με τον μάρτυρα. Το terbutylazine στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας μέχρι 18% ενώ στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις η δραστηριότητα ήταν στα επίπεδα του μάρτυρα.

Με υπόστρωμα το fluorodifen η δραστηριότητα των GSTs αυξήθηκε μέχρι και 46% λόγω του tritosulfuron και μέχρι 39% λόγω του terbutylazine (Γράφημα 3.5). Το τελευταίο, στις χαμηλές συγκεντρώσεις 18, 37,5 και 75 $\mu\text{g/l}$ μείωσε την δραστηριότητα των GSTs σε σχέση με τον μάρτυρα.

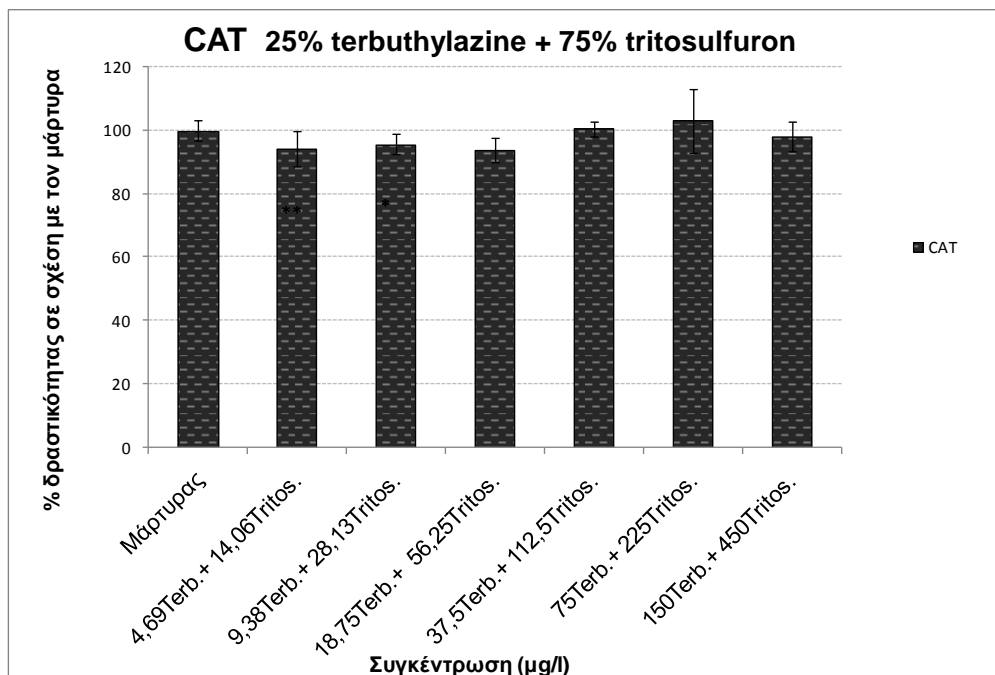
Η δραστηριότητα των GSTs με υπόστρωμα το p-Npa ήταν στα ίδια επίπεδα με τον μάρτυρα για το tritosulfuron, με εξαίρεση την μεγαλύτερη συγκέντρωση όπου ήταν 17% μικρότερη από τον μάρτυρα (Γράφημα 3.6). Το terbutylazine οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας σε όλες τις συγκεντρώσεις, και η μείωση αυτή ήταν μέχρι και 30%.

3.4.2 Ειδική δραστηριότητα ενζύμων μετά από έκθεση στο συνδυασμό *terbuthylazine-tritosulfuron*

Όσο αφορά στην συνδυασμένη τοξικότητα των δύο δραστικών και τις επιπτώσεις αυτής στη δραστηριότητα των ενζύμων, σε κανένα συνδυασμό και σε κανένα ένζυμο δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερα υψηλή ανταγωνιστική ή συνεργιστική δράση. Η συνδυασμένη δράση ήταν κυρίως προσθετική με εξαίρεση ορισμένες περιπτώσεις με μικρή, σχετικά, ανταγωνιστική δράση

Πιο συγκεκριμένα, όλοι οι συνδυασμοί των *terbuthylazine* και *tritosulfuron* οδήγησαν σε προσθετική δράση όσο αφορά την τοξικότητα της POX (βλ. Παράρτημα Γράφημα 5.1, Γράφημα 5.2, Γράφημα 5.3). Ίδια εικόνα παρουσίασε και η GR (βλ. Παράρτημα Γράφημα 5.4, Γράφημα 5.5, Γράφημα 5.6).

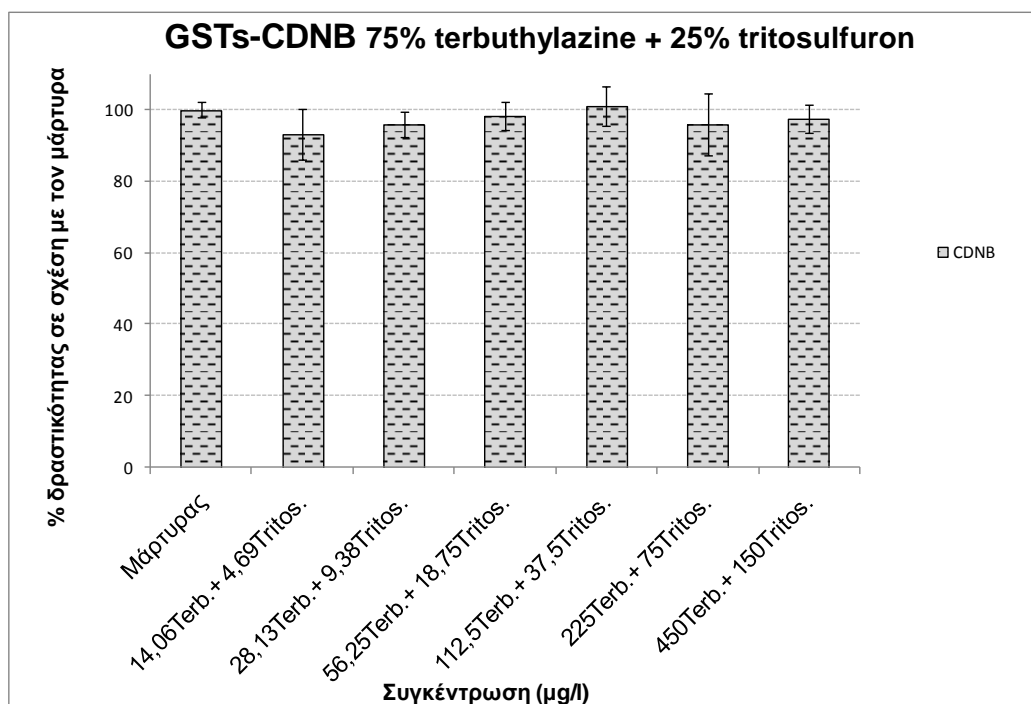
Στην CAT οι συνδυασμοί 75% *terbuthylazine* και 25% *tritosulfuron* καθώς και οι 50% *terbuthylazine* και 50% *tritosulfuron* είχαν προσθετική δράση (βλ. Παράρτημα Γράφημα 5.7 Γράφημα 5.8). Ο συνδυασμός 25% *terbuthylazine* και 75% *tritosulfuron* είχε ανταγωνιστική δράση (Γράφημα 3.7) καθώς ενώ το *terbuthylazine* στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις μειώνει την δραστηριότητα της καταλάσης περίπου 30% (Γράφημα 3.2), όταν συνδυάζεται με την υψηλότερη αναλογία (75%) του *tritosulfuron* η δραστηριότητα παραμένει στα ίδια επίπεδα με τον μάρτυρα.



Γράφημα 3.7: Η ειδική δραστηριότητα της CAT (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 25% *terbuthylazine* και 75% *tritosulfuron* (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Όσο αφορά τις GSTs ίδιο μοτίβο στις επιπτώσεις του συνδυασμού των δύο ζιζανιοκτόνων παρατηρήθηκε μεταξύ των υποστρωμάτων CDNB και fluorodifen. Οι συνδυασμοί 50% terbuthylazine και 50% tritosulfuron και 25% terbuthylazine και 75% tritosulfuron είχαν προσθετική δράση (βλ. Παράρτημα Γράφημα 5.9, Γράφημα 5.10, Γράφημα 5.11, Γράφημα 5.12), ενώ ο συνδυασμός 75% terbuthylazine και 25% tritosulfuron είχε ανταγωνιστική δράση στις υψηλές συγκεντρώσεις (Γράφημα 3.8).

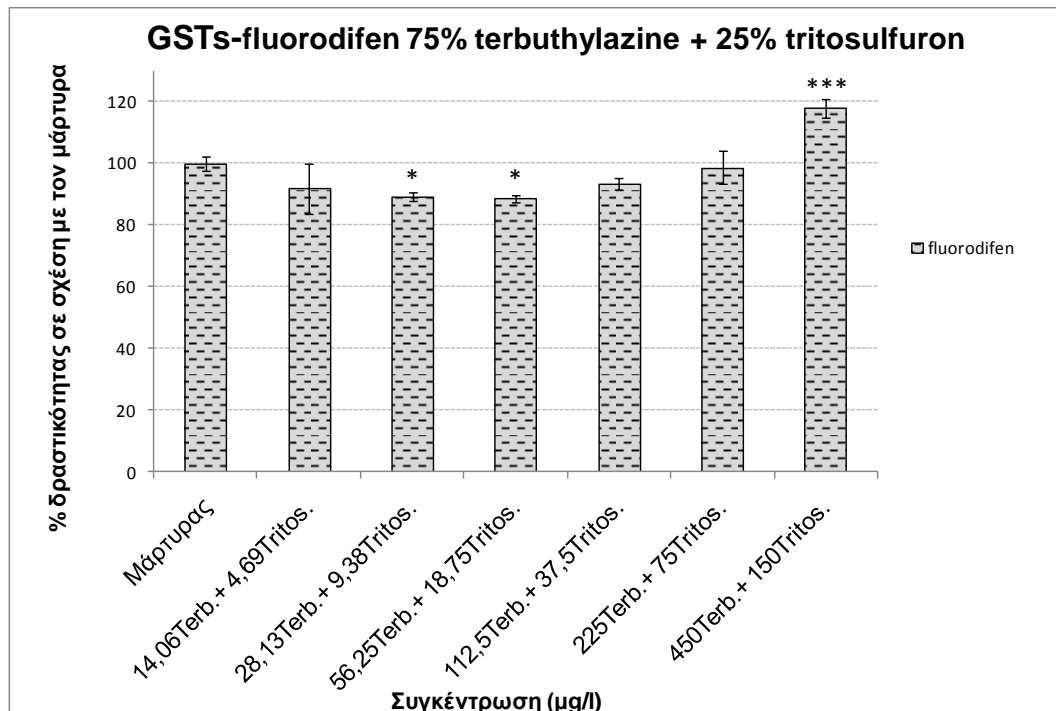
Η ανταγωνιστική δράση του συνδυασμού όταν η τοξικότητα προέρχονταν κατά κύριο λόγο από το terbuthylazine (Γράφημα 3.8), διαπιστώνεται σε σύγκριση με τις αποκρίσεις των μεμονωμένων ζιζανιοκτόνων. Πιο συγκεκριμένα, οι GSTs με υπόστρωμα το CDNB είχαν αυξηθεί στατιστικά σημαντικά στις συγκεντρώσεις 600 και 300 $\mu\text{g/l}$ terbuthylazine (13 και 17% αντίστοιχα) ενώ ήταν στο επίπεδο του μάρτυρα στην συγκέντρωση 150 $\mu\text{g/l}$ (Γράφημα 3.4). Μεγαλύτερη αύξηση παρουσίασε η δραστηριότητα των GSTs λόγω της δράσης του tritosulfuron καθώς από 75 έως 600 $\mu\text{g/l}$ ήταν στατιστικά μεγαλύτερη από τον μάρτυρα (Γράφημα 3.4). Αντίθετα, στους συνδυασμούς 450 $\mu\text{g/l}$ terbuthylazine και 150 $\mu\text{g/l}$ tritosulfuron, καθώς και 225 $\mu\text{g/l}$ terbuthylazine και 75 $\mu\text{g/l}$ tritosulfuron (Γράφημα 3.8) η δραστηριότητα ήταν στα ίδια επίπεδα με τον μάρτυρα, υπήρχε δηλαδή ανταγωνιστική δράση.



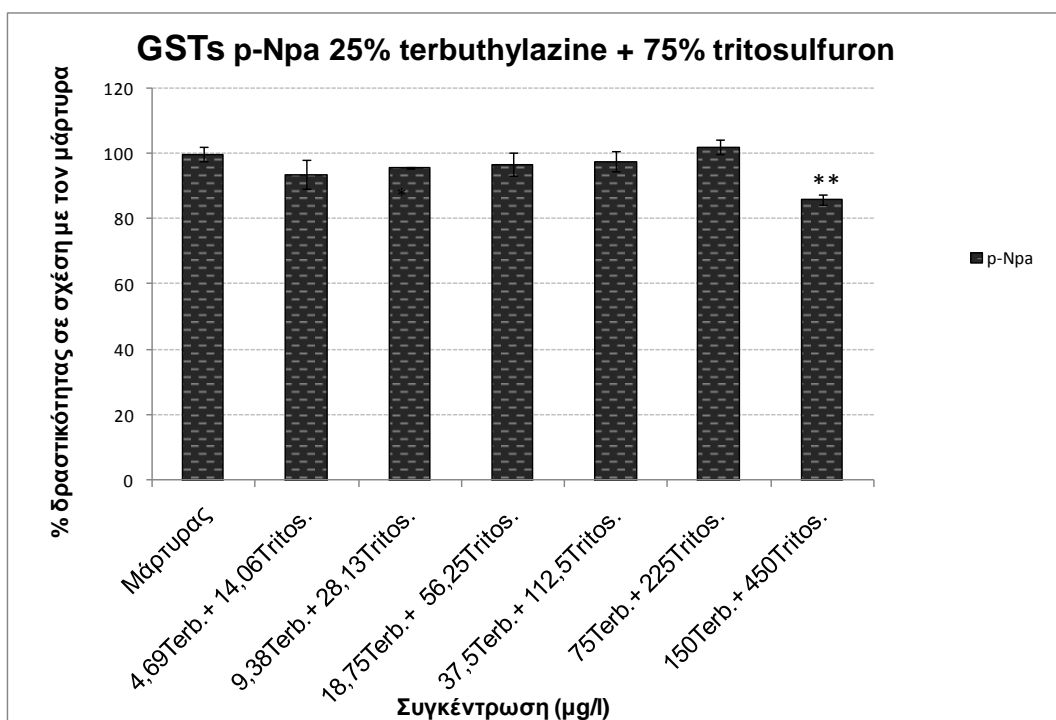
Γράφημα 3.8: Η ειδική δραστηριότητα των GSTs με υπόστρωμα το CDNB (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 75% terbuthylazine και 25% tritosulfuron (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001).

Αντίστοιχα, στις υψηλές συγκεντρώσεις του terbutylazine οι GSTs με υπόστρωμα το fluorodifen είχαν αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με τον μάρτυρα (39% στα 600 μg/l και 28% στα 300 μg/l, Γράφημα 3.5), ενώ η συγκέντρωση 150 μg/l είχε ίδια δραστηριότητα με τον μάρτυρα. Το tritosulfuron στα 150 μg/l οδήγησε σε αύξηση 16% ενώ στα 75 μg/l ήταν στο ίδιο επίπεδο με τον μάρτυρα. Κατά συνέπεια, στον συνδυασμό 450 μg/l terbutylazine και 150 μg/l tritosulfuron (Γράφημα 3.9) θα αναμένονταν μεγαλύτερη αύξηση της δραστηριότητας από αυτή που παρατηρήθηκε (18%), το οποίο ισχύει και για τον συνδυασμό 225 μg/l terbutylazine και 75 μg/l tritosulfuron, που δεν είχε διαφορά με τον μάρτυρα. Παρατηρείται δηλαδή ανταγωνισμός ως προς την δραστηριότητα των GSTs (με υπόστρωμα το fluorodifen) όταν η τοξικότητα προέρχεται κυρίως από το terbutylazine. Ο ανταγωνισμός αυτός αφορά τις υψηλές συγκεντρώσεις καθώς στις χαμηλότερες υπήρχε προσθετική δράση.

Τέλος, όσο αφορά την δραστηριότητα των GSTs με υπόστρωμα το p-Npa, ο συνδυασμός των terbutylazine και tritosulfuron είχε προσθετική δράση (βλ. Παράρτημα Γράφημα 5.13, Γράφημα 5.14), με εξαίρεση τον συνδυασμό 25% terbutylazine και 75 tritosulfuron που είχε ανταγωνιστική δράση (Γράφημα 3.10). Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, το terbutylazine μειώνει σε σχέση με τον μάρτυρα την δραστηριότητα των GSTs που μετρήθηκαν με υπόστρωμα το p-Npa σε όλες τις συγκεντρώσεις (Γράφημα 3.6), ενώ το tritosulfuron την μειώνει στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (600 μg/l) στατιστικά σημαντικά (12% μείωση), ενώ στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις η δραστηριότητα κυμαίνεται στα επίπεδα του μάρτυρα. Όταν οι δύο δραστικές συνδυάζονται με αναλογία 25% terbutylazine και 75% tritosulfuron, μείωση στην δραστηριότητα των GSTs παρατηρείται μόνο στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (150 μg/l terbutylazine + 450 μg/l tritosulfuron), ενώ σε όλες τις άλλες όχι μόνο δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά με τον μάρτυρα αλλά και η μείωση είναι πάρα πολύ μικρή (4% κατά μέσο όρο).



Γράφημα 3.9: Η ειδική δραστηκότητα των GSTs με υπόστρωμα το fluorodifen (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 75% terbuthylazine και 25% tritosulfuron (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, * $p \leq 0,05$).



Γράφημα 3.10: Η ειδική δραστηκότητα των GSTs με υπόστρωμα το p-Npa (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 25% terbuthylazine και 75% tritosulfuron (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, ** $p \leq 0,01$).

3.5 Συζήτηση

Κάτω από συνθήκες καταπόνησης, η δραστηκότητα της υπεροξειδάσης POX αναμένεται να ενισχυθεί (Gill & Tuteja, 2010, Karuppanapandian et al., 2011, Sharma et al., 2012),

όπως ήδη αναφέρθηκε, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στη μείωση των ενεργών μορφών οξυγόνου. Αύξηση στη δραστικότητα της έχει παρατηρηθεί, μεταξύ άλλων, και μετά από έκθεση φυτών σε ζιζανιοκτόνα. Για παράδειγμα, οι Teisseire & Vernet (2000) αναφέρουν μέχρι και 21% αύξηση της δραστικότητας της POX στη *L. minor* μετά από 24 ώρες έκθεση σε συγκεντρώσεις 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/l}$ του diuron (ζιζανιοκτόνο που παρεμποδίζει το PSII), ενώ στις 36 ώρες, στα 100 $\mu\text{g/l}$, ήταν στα επίπεδα του μάρτυρα και στις 48, 72 και 96 ώρες η δραστικότητά της μειώθηκε σε σχέση με τον μάρτυρα. Σε άλλη ερευνητική εργασία το chlorotoluron, που έχει και αυτό ίδιο τρόπο δράσης με το diuron, προκάλεσε διπλασιασμό έως και τριπλασιασμό της δραστικότητας της POX σε ρίζες σιταριού (Song et al., 2007), ενώ οι Zabalza et al. (2007) αναφέρουν ότι το imazethapyr (παρεμποδιστής του ALS, όπως το tritosulfuron) αύξησε τη δραστικότητα της POX στα φύλλα αρακά.

Στην παρούσα εργασία τόσο το terbuthylazine όσο και το tritosulfuron αύξησαν την δραστικότητα της POX στη *L. minor* μετά από 48 ώρες έκθεση μόνο στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (600 $\mu\text{g/l}$) των δύο ζιζανιοκτόνων. Έλλειψη αυξημένης δραστικότητας της POX παρόλη την έκθεση σε ζιζανιοκτόνα έχει επίσης καταγραφεί στην διεθνή βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, το propanil (ζιζανιοκτόνο που παρεμποδίζει το PSII) σε συγκεντρώσεις από 0,01 έως 1 mg/l δεν προκάλεσε καμία αλλαγή στην δραστικότητα της POX στη *L. minor* μετά από 12, 24, 48, 72 και 168 ώρες έκθεσης (Mitsou et al., 2006). Ακόμα, το chlorotoluron, αύξησε μεν, την δραστικότητά της στις ρίζες του σιταριού αλλά στα φύλλα δεν σημειώθηκε διαφοροποίηση από τον μάρτυρα (Song et al., 2007). Συμπερασματικά, η δραστικότητα της POX αυξάνεται όπως ήταν αναμενόμενο σε φυτά του βιοδείκτη *L. minor* μετά από 48 ώρες έκθεσης στη υψηλότερη μελετούμενη συγκέντρωση του terbuthylazine και του tritosulfuron, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη οξειδωτικού στρες στις συγκεκριμένες περιπτώσεις. Η POX λειτούργησε στις περιπτώσεις αυτές ως μηχανισμός άμυνας απέναντι στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (βλ. Εικόνα 3.1 και υποκεφ. 3.1.3.1). Η αυξημένη αυτή δραστικότητα, όμως, δεν υπήρξε στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των δύο δραστικών ουσιών. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην χρονική στιγμή της μέτρησης (48 h) καθώς ενδέχεται να είχε παρατηρηθεί ακόμα υψηλότερη δραστικότητα ή και αυξημένη δραστικότητα της POX και σε μικρότερες συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών σε προηγούμενο χρόνο ή επόμενο χρονικό σημείο αυτού των 48 h. Είναι δηλαδή μέγιστης σημασίας η χρονική στιγμή μέτρησης των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Η ανταπόκριση της καταλάσης στην καταπόνηση από το terbuthylazine και το tritosulfuron ήταν διαφορετική, καθώς το πρώτο παρεμπόδισε την δραστηριότητά της ενώ το δεύτερο δεν είχε καμία ουσιαστική επίδραση σε αυτήν (Γράφημα 3.2). Όπως ήδη αναφέρθηκε στην αρχή του κεφαλαίου (βλ. υποκεφ. 3.1.3.2) η περιβαλλοντική καταπόνηση προκαλεί είτε αύξηση είτε μείωση της δραστηριότητας της CAT, ανάλογα με την ένταση, την διάρκεια και το είδος της.

Μείωση στη δραστηριότητα της CAT έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις τοξικότητας από ζιζανιοκτόνα του PSII (Teisseire & Vernet, 2000, Song et al., 2007) αλλά και από μέταλλα (μόλυβδος, κάδμιο, θάλλιο) τόσο στη *L.minor* (Mohan & Hosetti, 1997, Babić et al., 2009) όσο και σε άλλα φυτά (Lyubenova & Schröder, 2011). Η μείωση αυτή όταν προέρχεται από βαρέα μέταλλα μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της δέσμευσης των βαρέων μετάλλων στο ίδιο το ένζυμο, η οποία μεταβάλλει την δομή και την διαλυτότητα τους (Mohan & Hosetti, 1997). Όταν, όμως, αυτή προέρχεται από το terbuthylazine και τα άλλα ζιζανιοκτόνα, ο μηχανισμός είναι άγνωστος. Μια ενδεχόμενη εξήγηση για αυτό το φαινόμενο της μείωσης της δραστηριότητας της καταλάσης σε περίπτωση οξειδωτικής καταπόνησης δόθηκε από τους Luna et al. (1994), που απέδωσαν την μείωση αυτή στη δραστηριότητα των ενεργών μορφών οξυγόνου ROS. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από την διαπίστωση ότι αντιοξειδωτικές ουσίες παρουσία του αρχικού τοξικού παράγοντα, μπόρεσαν να αποτρέψουν την μείωση της καταλάσης. Επιπρόσθετα, ο Salin (1988) έδειξε ότι η καταλάση αδρανοποιείται από τις ρίζες του σουπεροξειδικού ανιόντος. Καθώς ο ρόλος της καταλάσης στην αποτοξίνωση από το H₂O₂ είναι πολύ σημαντικός, η μειωμένη δραστηριότητά της ελαττώνει τη δυνατότητα του κυττάρου να ανταποκριθεί στα ROS, με καταστρεπτικές για αυτό συνέπειες.

Όσο αφορά στα αποτελέσματα της επίπτωσης του tritosulfuron στην CAT, αυτά έρχονται σε συμφωνία με την ερευνητική εργασία των Zabalza et al. (2007), οι οποίοι επίσης αναφέρουν έλλειψη διαφοροποίησης στην δραστηριότητα της καταλάσης σε αρακά εκτεθειμένο στο imazethapyr (ίδιος τρόπος δράσης με tritosulfuron). Η CAT έχει μικρή συγγένεια με το H₂O₂, γεγονός που την κάνει δραστική μόνο σε περιπτώσεις μεγάλης συγκέντρωσης H₂O₂ (Mittler, 2002). Μια ενδεχόμενη εξήγηση, λοιπόν, της έλλειψης αυξημένης δραστηριότητας της CAT θα μπορούσε να είναι η μικρή

συγκέντρωση H_2O_2 στα φυτά της *L.minor* μετά την έκθεση στο tritosulfuron, η οποία ενεργοποίησε την POX αλλά δεν ήταν αρκετή για να ενεργοποιήσει την CAT.

Η διέγερση της δραστηριότητας της GR που παρατηρήθηκε και στα δύο ζιζανιοκτόνα στις υψηλές συγκεντρώσεις καταδεικνύει την ύπαρξη οξειδωτικού στρες. Η GR, δεν συμμετέχει άμεσα στην αποτοξίνωση από τις ενεργές μορφές οξυγόνου, αλλά έμμεσα με την κατάλυση της επαναδημιουργίας της γλουταθειόνης GSH, που αποτελεί μία από τα βασικότερες μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ενώσεις (βλ. υποκεφ. 3.1.1, υποκεφ. 3.1.3.3). Αύξηση της δραστηριότητας της GR σε φυτά έχει παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις τοξικότητας ζιζανιοκτόνων με ίδιο μηχανισμό δράσης με το terbutylazine αλλά και με το tritosulfuron (Teisseire & Vernet, 2000, Zabalza et al., 2007).

Η δραστηριότητα των GSTs διαφοροποιήθηκε ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα. Το CDNB είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα, και το οποίο, όπως και το fluorodifen, έδειξε αύξηση της δραστηριότητας των GSTs στις μεγάλες συγκεντρώσεις του terbutylazine και ακόμα μεγαλύτερη αύξηση σε αυτές του tritosulfuron (Γράφημα 3.4, Γράφημα 3.5). Αντίθετα, το p-Nra δείχνει μείωση της δραστηριότητας (Γράφημα 3.6.). Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη της ύπαρξης διαφορετικών ισομορφών GSTs καθώς και του διαφορετικού ρόλου των ισομορφών αυτών τόσο στην ανοχή απέναντι σε ξενοβιοτικά όσο και στην αποτοξίνωση από αυτά. Το ίδιο ακριβώς μοτίβο, δηλαδή αύξηση της δραστηριότητας με υπόστρωμα το CDNB και το fluorodifen και μείωση με το p-Nra βρήκαν και οι Bartha et al. (2014) ως επίπτωση του diflofenac (αντιφλεγμονώδες φάρμακο), στο υδροχαρές φυτό *Typha latifolia*. Με υπόστρωμα το CDNB αύξηση στη δραστηριότητα των GSTs βρέθηκε λόγω της επίδρασης του terbutylazine στο Λόλιο το ιταλικό (*Lolium multiflorum L*) (Mimmo et al., 2015) αλλά και λόγω της επίδρασης άλλων παρεμποδιστών του PSII όπως το atrazine, το isoproturon και το diuron, στο φύκος *Scenedesmus obliquus*, στο σιτάρι και στη *L.minor* αντίστοιχα (Mofeed & Mosleh, 2013, Yin et al., 2008, Teisseire & Vernet, 2000). Όσο αφορά στους παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων, αντίστοιχη εικόνα με το tritosulfuron έδωσε το tribenuron methyl στο σιτάρι (Oztetik, 2008). Όπως ήδη αναφέρθηκε (βλ. υποκεφ. 3.1.3.4) οι GSTs παίζουν διπλό ρόλο στα φυτά καθώς λαμβάνουν μέρος στην αποτοξίνωση ξενοβιοτικών αλλά έχουν και ενεργό ρόλο στην καταπολέμηση της οξειδωτικής καταπόνησης. Η αύξηση της δραστηριότητας των GSTs που παρατηρείται στα αποτελέσματα δεν μας δίνει από μόνη της την δυνατότητα να

προσδιορίσουμε αν αυτή σχετίζεται (και σε τι ποσοστό) με την κατάλυση της σύζευξης των ζιζανιοκτόνων με την γλουταθειόνη ή με τον ρόλο των GSTs στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό.

Οι παρεμποδιστές του ALS, όπως το tritosulfuron έχει βρεθεί ότι οδηγούν σε αύξηση των ενεργών μορφών οξυγόνου αλλά αυτός δεν είναι ο βασικός μηχανισμός που οδηγεί στην νέκρωση από τα από τα ζιζανιοκτόνα αυτά (Durner et al., 1994, Cobb & Reade, 2010) (βλ. Εισαγωγή υποκεφ. Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλλικού). Αντίθετα, οι παρεμποδιστές του PSII, όπως το terbuthylazine, με τον μηχανισμό δράσης τους οδηγούν άμεσα στην δημιουργία ROS (Ελευθεροχωρινός, 2008) (βλ. Εισαγωγή παρ υποκεφ. Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος II). Ακόμα η δράση των παρεμποδιστών του ALS είναι αργή, (Shaner, 1991) ενώ αυτή των παρεμποδιστών του PSII είναι γρήγορη (Cedergreen, 2007). Τα παραπάνω μπορούν να οδηγήσουν στην υπόθεση ότι το terbuthylazine μπορεί να προκαλέσει εντονότερη ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού από το tritosulfuron. Κάτι τέτοιο δεν επιβεβαιώνεται ξεκάθαρα, από τα παραπάνω αποτελέσματα. Όμως, το γεγονός ότι η καταλάση δεν επηρεάστηκε καθόλου από το tritosulfuron, και με δεδομένο ότι αποτελεί ένζυμο της πρώτης γραμμής της αντιοξειδωτικής άμυνας (Scandalios, 2005), ίσως να οφείλεται σε μειωμένη οξειδωτική καταπόνηση από το tritosulfuron. Η επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση ενώ σε περίπτωση που ισχύει η μεγάλη αύξηση των GSTs θα μπορεί να αποδοθεί στην αποτοξίνωση από το tritosulfuron μέσω της δημιουργίας συμπλόκων.

Η συνδυασμένη δράση των δύο ζιζανιοκτόνων είχε κατά κύριο λόγο προσθετική δράση όσο αφορά στην δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Οι μεμονωμένες περιπτώσεις απόκλισης από την προσθετική δράση ήταν ανταγωνιστικές ενώ δεν παρατηρήθηκαν για το σύνολο του συνδυασμού των δύο δραστικών αλλά εξαρτώνταν από την αναλογία του μίγματος των ζιζανιοκτόνων. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την σημαντικότητα της μελέτης των συνδυασμών σε όλες τις δυνατές αναλογίες, καθώς το αποτέλεσμα της συνδυασμένης τοξικότητας μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την δραστική ουσία στην οποία οφείλεται κυρίως η τοξικότητα του μίγματος. Οι λίγες εργασίες που έχουν μελετήσει τις επιπτώσεις της συνδυασμένης τοξικότητας φ.π. στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων έχουν βρει

ανταγωνιστική δράση στις περιπτώσεις απόκλισης από την προσθετική (Geoffroy et al., 2002, Mofeed & Mosleh, 2013).

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματισμό, και οι οποίες δεν παρεμπόδισαν την ανάπτυξη της *L.minor* δεν είχαν σαν αποτέλεσμα αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων μετά από 48 ώρες έκθεσης σε αυτά. Κατά συνέπεια τα αντιοξειδωτικά ένζυμα δεν αποτελούν ευαίσθητο βιοσημαντή της τοξικότητας των terbuthylazine και tritosulfuron στη *L.minor*. Ωστόσο, η μελέτη του αντιοξειδωτικού μηχανισμού σε περισσότερα χρονικά διαστήματα, τόσο πριν (κυρίως) τις 48 ώρες, όσο και μετά, θα έδινε σημαντικές πληροφορίες όσο αφορά την κινητική των αντιοξειδωτικών ενζύμων, βοηθώντας στο να εξαχθούν πιο σωστά συμπεράσματα τόσο για την τοξικότητα των μεμονωμένων δραστικών ουσιών όσο και των συνδυασμών τους. Ενδέχεται, επίσης, η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων στις χαμηλές συγκεντρώσεις να βρεθεί αυξημένη σε κάποια άλλη χρονική στιγμή, δίνοντας στοιχεία για την αντίδραση του προστατευτικού μηχανισμού της *L.minor*. Η μέτρηση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές δεν κατέστη δυνατή στη παρούσα εργασία λόγω της δυσκολίας χειρισμού του μεγάλου αριθμού των μεταχειρίσεων και των προβλημάτων που δημιουργούνται εξαιτίας του πολύ μικρού βάρους των φυτών της *L.minor*

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Εισαγωγή

4.1.1 Ορισμός βιοαισθητήρα

Σύμφωνα με την IUPAC, ο ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας είναι μία ανεξάρτητη ολοκληρωμένη συσκευή η οποία είναι ικανή να παρέχει συγκεκριμένη ποσοτική ή ημι-ποσοτική αναλυτική πληροφορία χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (βιοχημικός υποδοχέας) το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με ένα ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη/μετατροπέα σήματος (IUPAC-Thevenot et al, 1999). Ορίζεται επίσης, πάλι σύμφωνα με την IUPAC, ως μια συσκευή που χρησιμοποιεί συγκεκριμένες βιοχημικές αντιδράσεις που γίνονται μέσω απομονωμένων ένζυμων, ανοσοσυστημάτων, ιστών, οργανιδίων ή ολόκληρων κυττάρων για την ανίχνευση χημικών ενώσεων συνήθως με τη χρήση ηλεκτρικών, θερμικών ή οπτικών σημάτων (IUPAC-McNaught & Wilkinson, 1997).

4.1.2 Ιστορία βιοαισθητήρων

Η ιστορία των βιοαισθητήρων ξεκίνησε πριν περίπου πενήντα χρόνια όταν οι Clark και Lyons δημοσίευσαν την έρευνά τους κατά την οποία συνδύασαν για πρώτη φορά τον ηλεκτροχημικό μετατροπέα, (αμπερομετρικό ηλεκτρόδιο οξυγόνου) με ένα ένζυμο-υπόστρωμα (οξειδάση της γλυκόζης) για την ανίχνευση γλυκόζης (Clark & Lyons, 1962). Λίγα χρόνια αργότερα, οι Urdike και Higs (1967) εισήγαγαν την έννοια του ενζυμικού ηλεκτροδίου, μιας μεμβράνης με ένζυμο σε σύνδεση με ένα κατάλληλο ηλεκτρόδιο.

Στα χρόνια που ακολούθησαν καταβλήθηκαν πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη αυτού του νέου διεπιστημονικού τομέα. Αποδείχθηκε ότι ο συνδυασμός βιολογικού στοιχείου με τον μεταλλάκτη σήματος και τελική παραγωγή ηλεκτρικού σήματος είναι ιδιαίτερα αποδοτικός. Όλο και πιο πολύπλοκα βιολογικά συστήματα άρχισαν να χρησιμοποιούνται πχ. κυτταρικά οργανίδια, βακτήρια, αντισώματα μέχρι και ολόκληροι οργανισμοί σε συνδυασμό με κατάλληλους μεταλλάκτες σήματος. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών άρχισαν να παρουσιάζονται σε εξειδικευμένα για τους βιοαισθητήρες επιστημονικά περιοδικά (π.χ. Biosensors and Bioelectronics), και σε συνέδρια.

Οι πρώτες πρακτικές χρήσεις των βιοαισθητήρων, έγιναν στους τομείς της οικολογίας και της ιατρικής. Σύντομα έγιναν αναντικατάστατοι, ενώ η χρήση τους αυξάνεται συνεχώς, ιδιαίτερα σε θέματα ελέγχου και παρακολούθησης της ποιότητας του περιβάλλοντος.

4.1.3 Το πρόβλημα με τα φυτοφάρμακα-ζιζανιοκτόνα

Τις τελευταίες δεκαετίες η ρύπανση του περιβάλλοντος αποτελεί ένα σοβαρό παγκόσμιο πρόβλημα. Η ρύπανση προέρχεται από πολλές πηγές όπως η γεωργία, τα ορυχεία και οι βιομηχανίες. Συγκεκριμένα, η ρύπανση του χώματος και των υδάτων, σε πολλές γεωργικές περιοχές, από την εκτεταμένη χρήση ζιζανιοκτόνων, οφείλεται στο ότι ορισμένα από αυτά είναι τοξικά ή καρκινογόνα. Γρήγορες και εύχρηστες βιολογικές αναλύσεις απαιτούνται για να ελεγχθεί ο βαθμός ρύπανσης, καθώς διάφορες αναλυτικές μέθοδοι είναι διαθέσιμες (πχ. HPLC, GC) αλλά, τα χαρακτηριστικά τους τις κάνουν δύσχρηστες. Πιο συγκεκριμένα, οι περισσότερες από αυτές απαιτούν περίπλοκους χειρισμούς, έχουν δύσκολη προετοιμασία δειγμάτων, είναι χρονοβόρες και, τέλος, το υψηλό κόστος του εξοπλισμού, αλλά και των απαραίτητων για την λειτουργία τους οργανικών διαλυτών τις καθιστούν δαπανηρές (Koblizek et al., 2002, Loranger & Carpentier, 1994). Τις ανάγκες αυτές καλύπτουν οι βιοαισθητήρες καθώς μπορούν να ανιχνεύσουν εύκολα, γρήγορα και με χαμηλό κόστος διάφορους ρύπους (Campàs et al., 2008). Ειδικά για την ανίχνευση ζιζανιοκτόνων, αναπτύχθηκαν οι φωτοσυνθετικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι αναλύονται παρακάτω.

4.1.4 Τμήματα βιοαισθητήρα

Τα τμήματα από τα οποία αποτελείται ένας αμπερομετρικός βιοαισθητήρας παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.1. Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (βιο-υποδοχέας/bioreceptor) βρίσκεται ακινητοποιημένο στη διεπιφάνεια του βιοαισθητήρα και αλληλεπιδρά επιλεκτικά με τον αναλύτη, δηλαδή την προς ανάλυση/ανίχνευση ουσία. Η διεπιφάνεια ακινητοποίησης μεταλλάκτη σήματος (transducer), μετατρέπει το μετρούμενο στοιχείο της αλληλεπίδρασης του βιο-υποδοχέα με τον αναλύτη σε ένα μετρήσιμο σήμα. Το σήμα αυτό συνήθως είναι ηλεκτρικό αλλά μπορεί να είναι και οπτικό ενώ είναι ανάλογο της έντασης του ερεθίσματος στο βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης και συνεπώς ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη που ανιχνεύεται (Buonasera et al., 2011, De Corcuera & Cavalieri, 2003)

4.1.5 Κατηγορίες βιοαισθητήρων με βάση το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης

Οι βιοαισθητήρες κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης που είναι ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του μεταλλάκτη, το οποίο μπορεί να είναι:

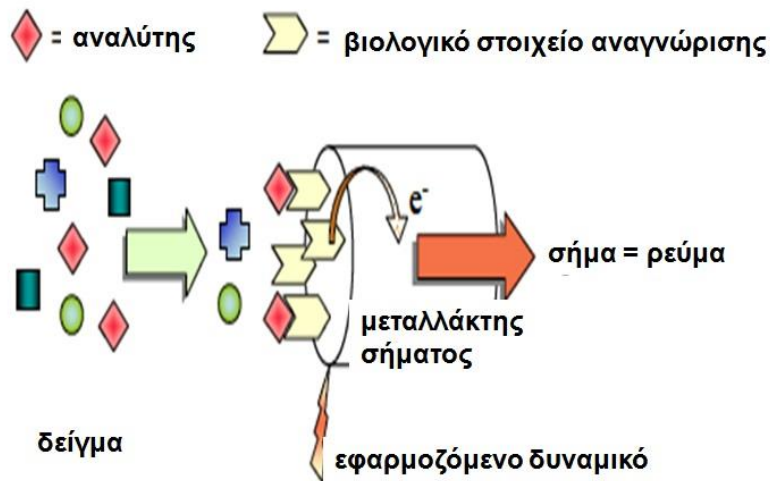
- ένζυμα, τα οποία αναγνωρίζουν τα συγκεκριμένα υποστρώματα και καταλύουν τις αντίστοιχες αντιδράσεις
- αντισώματα, τα οποία αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα αντιγόνα λόγω συγγένειας
- ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία αναγνωρίζουν τις συμπληρωματικές ακολουθίες επίσης λόγω συμπληρωματικότητας
- κύτταρα και ολόκληροι οργανισμοί των οποίων η αναπνοή, η αύξηση, ο φθορισμός ή η βιολογική ακτινοβολία μπορεί να είναι ενδεικτική της παρουσίας ορισμένων χημικών ουσιών
- ιστοί, οι οποίοι ενεργούν συνήθως ως πηγή ενζύμων,
- μεμβράνες, όπως οι θυλακοειδής μεμβράνες,
- βιομιμικά υλικά, αποκαλούμενα επίσης συνθετικοί βιο-υποδοχείς (Campàset. al, 2008, Buonasera et al., 2011)

4.1.6 Κατηγορίες βιοαισθητήρων με βάση το είδος του μεταλλάκτη

Οι βιοαισθητήρες κατηγοριοποιούνται επίσης και σύμφωνα με τον μετατροπέα/μεταλλάκτη σήματος. Υπάρχει πληθώρα διαφορετικών κατηγοριών από τις οποίες οι πιο κοινές είναι:

- ηλεκτροχημικοί, όπως οι αμπερομετρικοί και οι ποτενσιομετρικοί,
- οπτικοί, όπως οι χρωματομετρικοί, οι βιοφωταύγειας και οι φθορισμομετρικοί
- βαρυμετρικοί, όπως οι πιεζοηλεκτρικοί (Campàset. al, 2008, Buonasera et al., 2011)

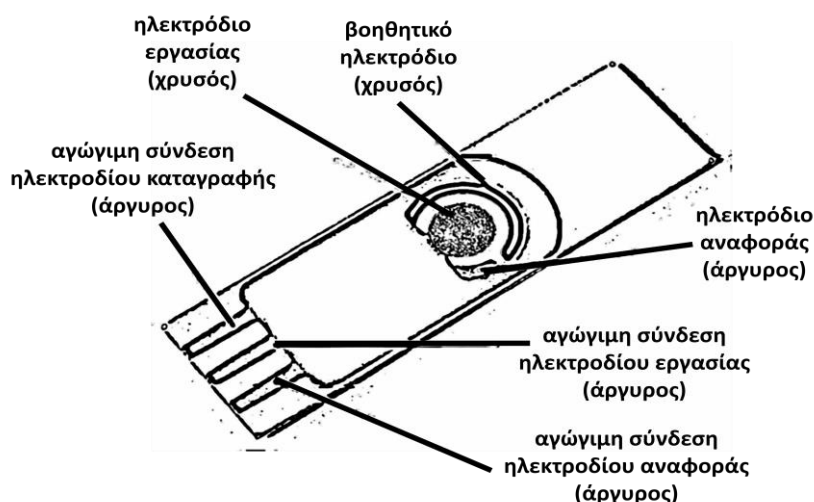
Η παρούσα εργασία πραγματεύεται τη δημιουργία ενός φωτοσυνθετικού βιοαισθητήρα. Πρόκειται για έναν ηλεκτροχημικό, και συγκεκριμένα αμπερομετρικό, βιοαισθητήρα που ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης έχει θυλακοειδείς μεμβράνες, οπότε και αναλύονται παρακάτω οι συγκεκριμένες έννοιες.



Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων του αμπερομετρικού βιοαισθητήρα, προσαρμογή από Belluzo et al., 2008.

4.1.7 Αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην μέτρηση του ρεύματος που προέρχεται από την ηλεκτροχημική οξείδωση ή αναγωγή ηλεκτρενεργών ουσιών στην επιφάνεια του μεταλλάκτη σήματος. Οι αισθητήρες αυτοί αποτελούνται από τρία ηλεκτρόδια (ηλεκτρόδιο μεταξοτυπίας), το ηλεκτρόδιο εργασίας (working electrode), το ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference electrode) και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο (counter electrode) (Εικόνα 4.2). Το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι το ηλεκτρόδιο στην επιφάνεια του οποίου γίνεται η εκάστοτε αντίδραση και για την κατασκευή του χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά υλικά όπως λευκόχρυσος, χρυσός, άργυρος, άνθρακας, νικέλιο και παλλάδιο. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς συνήθως φτιάχνεται από άργυρο/χλωριούχο άργυρο (Ag/AgCl). Η μέτρηση γίνεται με τη εφαρμογή σταθερού δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς, η οποία δημιουργεί ροή ρεύματος στο βοηθητικό ηλεκτρόδιο. Το παραγόμενο αυτό ρεύμα συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του αναλύτη (IUPAC-Thevenot et al, 1999, Wise, 1991, Rishpon & Buchner, 2005).



Εικόνα 4.2: Ηλεκτρόδιο μεταξοτυπίας αποτελούμενο από τρία ηλεκτρόδια, εργασίας, αναφοράς και βοηθητικό.

4.1.8 Φωτοσυνθετικοί βιοαισθητήρες

Οι φωτοσυνθετικοί βιοαισθητήρες αποτελούν μια από τις κατηγορίες των βιοαισθητήρων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση τοξικών ουσιών που παρεμποδίζουν την φωτοσυνθετική λειτουργία, όπως τα ζιζανιοκτόνα του φωτοσυστήματος II. Για τη δημιουργία των φωτοσυνθετικών βιοαισθητήρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικοί τύποι βιολογικών μορίων αναγνώρισης όπως ολόκληρα κύτταρα (πχ. φύκη), χλωροπλάστες, θυλακοειδής μεμβράνες και το φωτοσύστημα II (Rouillon et al. 2006). Παράλληλα, η παρεμπόδιση της ροής των ηλεκτρονίων του φωτοσυστήματος II από ζιζανιοκτόνα δίνει την δυνατότητα δημιουργίας βιοαισθητήρων με διαφορετικά είδη μεταλλάκτη όπως η μέτρηση της ροής των ηλεκτρονίων, ο φθορισμός και η παραγωγή οξυγόνου (Giardi & Pace, 2006). Η παρούσα εργασία πραγματεύεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τη δημιουργία ενός φωτοσυνθετικού βιοαισθητήρα που ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης έχει θυλακοειδείς μεμβράνες και βασίζεται στην μέτρηση της ροής των ηλεκτρονίων, πρόκειται δηλαδή για έναν ηλεκτροχημικό, και συγκεκριμένα αμπερομετρικό, βιοαισθητήρα.

4.1.8.1 Μέθοδοι ακινητοποίησης

Μετά την απομόνωση του φωτοσυνθετικού υλικού για τη δημιουργία φωτοσυνθετικού αισθητήρα η ενεργότητά του χάνεται γρήγορα. Για την αποτροπή του φαινομένου αυτού έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι ακινητοποίησης (Buonasera et al, 2011, Campàs et. al, 2008). Ακινητοποίηση είναι η μέθοδος με την οποία το βιολογικό στοιχείο

αναγνώρισης προσκολλάται στην επιφάνεια του μεταλλάκτη σήματος, δηλαδή στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Οι μέθοδοι ακινητοποίησης διαχωρίζονται σε χημικές και φυσικές, ανάλογα με το αν σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί ή όχι.

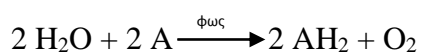
Υπάρχουν τρεις φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησης: η προσρόφηση σε ειδικά υποστρώματα, ο εγκλεισμός σε φυσική ή τεχνητή γέλη και η τεχνική ανάπτυξης μικροδομών με χρήση Λείζερ (Laser Induced Forward Transfer – LIFT). Η ακινητοποίηση με προσρόφηση είναι απλή, οικονομική και ήπια και βοηθά στη διατήρηση τις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας του υλικού καλύτερα από όλες τις μεθόδους. Παρ' όλα αυτά, οι δυνάμεις προσρόφησης είναι ασθενείς με αποτέλεσμα να είναι πιθανή η απομάκρυνση του υλικού από το υπόστρωμα ακινητοποίησης. Ως υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά διαφορετικά υλικά όπως δισκία από διηθητικό χαρτί, υάλινα δισκία μικροϊνών κ.α. Η ακινητοποίηση με εγκλεισμό, η οποία αναπτύχθηκε αρχικά για την ακινητοποίηση ενζύμων, εφαρμόζεται και στην ακινητοποίηση φωτοσυνθετικού υλικού. Στην τεχνική αυτή το φωτοσυνθετικό υλικό παγιδεύεται σε ένα τρισδιάστατο πολυμερικό δίκτυο, μια φυσική ή τεχνητή γέλη. Παραδείγματα φυσικής γέλης αποτελούν η αγαρόζη, η ζελατίνη και το άλας αλγινικού οξέος. Το τελευταίο, σε συνδυασμό με χλωριούχο ασβέστιο CaCl_2 , αποτελεί την πιο διαδεδομένη φυσική γέλη ακινητοποίησης φωτοσυνθετικού υλικού. Παραδείγματα τεχνητής γέλης αποτελούν το πολυακρυλαμίδιο, το βινίλιο και η συνθετική γέλη PVA-SbQ (poly(vinylalcohol) bearing styrylpyridinum groups). Η συνθετική γέλη μπορεί να είναι τοξική και για το λόγο αυτό προστίθεται στο μίγμα αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) πριν την ακινητοποίηση καθώς δρα σαν προστατευτικό παρεμποδίζοντας την μείωση της ροής των ηλεκτρονίων στη φωτοσυνθετική αλυσίδα (Rouillon et al., 2006). Η τελευταία φυσική μέθοδος ακινητοποίησης, η τεχνική LIFT, χρησιμοποιεί ακτίνες laser για την ακινητοποίηση του φωτοσυνθετικού υλικού στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής LIFT είναι σημαντικά καθώς, όπως και οι άλλες φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησης, δεν καταστρέφει την φωτοσυνθετική απόδοση του υλικού, ενώ παράλληλα αυξάνει την φυσική προσρόφηση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (Boutopoulos et al., 2011)

Οι χημικές μέθοδοι, που βασίζονται στη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ του φωτοσυνθετικού υλικού και της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την ακινητοποίηση ενζύμων. Η χρήση τους, όμως, στους

φωτοσυνθετικούς αισθητήρες ήταν αδύνατη καθώς αναστέλλονταν η φωτοσυνθετική τους δράση. Ο Park το 1966, απέδειξε ότι η χρήση της γλουταραλδεΐδης μπορεί να διατηρήσει την αντίδραση Hill στους χλωροπλάστες. Έτσι, η γλουταραλδεΐδη άρχισε να χρησιμοποιείται για την ακινητοποίηση φωτοσυνθετικού υλικού με την μέθοδο της διαμοριακής σύνδεσης (cross-linking), και αποτελεί μια από τα πλέον χρησιμοποιούμενες χημικές ενώσεις για ακινητοποίηση. Η όποια ανασταλτική της δράση στο φωτοσυνθετικό υλικό μπορεί να μειωθεί με την παρουσία κάποιων πρωτεϊνών κατά τον πολυμερισμό, όπως η ζελατίνη, το κολλαγόνο και η αλβουμίνη βόειου ορού (BSA). Η γλουταραλδεΐδη, δημιουργεί ένα δίκτυο ομοιοπολικών δεσμών κυρίως με τις ελεύθερες ομάδες NH₂ τόσο του φωτοσυνθετικού υλικού όσο και των πρωτεϊνών. Ανάμεσα στις χημικές μεθόδους ακινητοποίησης η ακινητοποίηση με γλουταραλδεΐδη και αλβουμίνη βόειου ορού (BSA-Glu) αποτελεί την πιο κατάλληλη μέθοδο για τους αμπερομετρικούς και τους οπτικούς βιοαισθητήρες (Buonasera et al, 2011, Campàs et. al, 2008).

4.1.8.2 Αντίδραση Hill

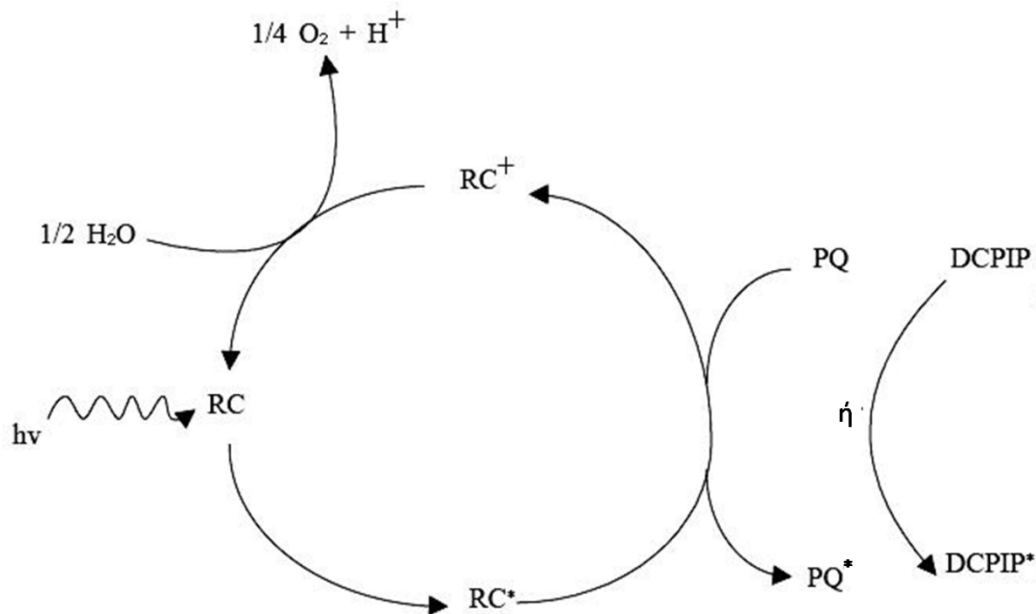
Το 1937 ο Robert Hill απέδειξε ότι όταν απομονωμένοι χλωροπλάστες φωτίζονται κατά την παρουσία ενός ηλεκτρονιοδέκτη A (συγκεκριμένα της φερεδοξίνης fd), ο ηλεκτρονιοδέκτης αυτός ανάγεται σε AH₂ και παράγεται μοριακό οξυγόνο, προερχόμενο από την διάσπαση νερού, κατά την αντίδραση:



την επονομαζόμενη δηλαδή αντίδραση Hill. In vivo, ο τελικός ηλεκτρονιοδέκτης είναι το NADP⁺ και στην συνέχεια το CO₂ στον κύκλο του Calvin (βλ. Εικόνα 0.3), ενώ in vitro μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλοί τεχνητοί ηλεκτρονιοδέκτες όπως η 2,6-διχλωροφαινόλη-ινδοφαινόλη (2,6-dichlorophenol-indophenol- DCPIP), 2,3,5,6-τετραμεθύλ-1,4-βενζοκινόνη (2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-benzoquinone -Duroquinone, DQ). Σύμφωνα με την παρατήρηση του Hill απελευθέρωση οξυγόνου μπορούσε να γίνει και σε συνθήκες απουσίας CO₂ (Hill 1937, Walker 2002).

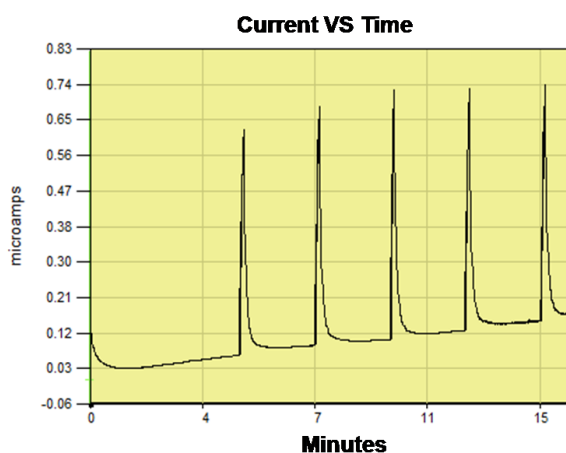
Στην περίπτωση των φωτοσυνθετικών αισθητήρων, τεχνητοί ηλεκτρονιοδέκτες (DCPIP, DQ) προστίθενται στο διάλυμα μέτρησης στην οξειδωμένη τους μορφή. Υπό φωτισμό οι ηλεκτρονιοδέκτες ανάγονται από τα ηλεκτρόνια της φωτοσυνθετικής αλυσίδας και ακολούθως οξειδώνονται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας με τη βοήθεια του

εφαρμοζόμενου δυναμικού (+0,2 V για το DCPIP), δημιουργώντας ηλεκτρικό ρεύμα (Campàs et al., 2008). Στην Εικόνα 4.3 παρουσιάζεται η αναγωγική αντίδραση του φωτοσυστήματος II υπό συνθήκες φωτός. Σε φυσιολογικές συνθήκες η αναγωγή γίνεται με την πλαστοκινόνη (PQ), ενώ στην περίπτωση του φωτοσυνθετικού αισθητήρα, η πλαστοκινόνη (PQ) αντικαθίσταται από τον τεχνητό ηλεκτρονιοδέκτη DCPIP, ο οποίος χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 4.3: Η αναγωγική αντίδραση του φωτοσυστήματος II στον φωτοσυνθετικό αισθητήρα όπου η πλαστοκινόνη αντικαθίσταται από τεχνητό ηλεκτρονιοδέκτη (DCPIP). RC, RC^* : το ενεργό κέντρο του φωτοσυστήματος II και η ανηγμένη του μορφή αντίστοιχα, PQ, PQ^* : η πλαστοκινόνη και η ανηγμένη της μορφή αντίστοιχα, DCPIP, $DCPIP^*$: ο τεχνητός ηλεκτρονιοδέκτης DCPIP και η ανηγμένη του μορφή αντίστοιχα.

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, όταν ο φωτοσυνθετικός βιοαισθητήρας φωτίζεται, δημιουργείται ρεύμα, το οποίο καταγράφεται μέσω του ποτενσιοστάτη με την τεχνική της χρονοαμπερομετρίας. Το ρεύμα αυτό, είναι ουσιαστικά η καταγραφή της ανηγμένης μορφής του τεχνητού ηλεκτρονιοδέκτη. Η μορφή της απόκρισης που λαμβάνεται παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.4. Για όσο χρόνο ο φωτοσυνθετικός αισθητήρας φωτίζεται (7 sec), παρατηρείται μια αύξηση στην παραγόμενη ένταση του ρεύματος, ενώ μόλις σταματήσει η παροχή φωτός η ένταση του ρεύματος μειώνεται ξανά, με αποτέλεσμα να παίρνουμε αυτή την χαρακτηριστική εικόνα των «κυμάτων-κορυφών».



Εικόνα 4.4: Απόκριση φωτοσυνθετικού αισθητήρα μετά από διαδοχικούς φωτεινούς κύκλους

Όπως αναφέραμε ήδη, τα ζιζανιοκτόνα του PSII παρεμποδίζουν την μεταφορά των ηλεκτρονίων της αλυσίδας του φωτοσυστήματος II. Συνεπώς, στους φωτοσυνθετικούς βιοαισθητήρες, η προσθήκη ζιζανιοκτόνων του PSII (αναλύτης), παρεμποδίζει την αναγωγή του τεχνητού ηλεκτρονιοδέκτη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα όταν ο αισθητήρας φωτίζεται η ένταση του ρεύματος που καταγράφεται να είναι αναλογικά μικρότερη από αυτή πριν την προσθήκη του ζιζανιοκτόνου.

4.2 Σκοπός του κεφαλαίου

Στην βιβλιογραφία δεν καταγράφονται βιοαισθητήρες που να χρησιμοποιούν θυλακοειδή από φυτά βιοδείκτες. Ο σκοπός, λοιπόν, του παρόντος κεφαλαίου ήταν η δημιουργία ενός φωτοσυνθετικού αισθητήρα με ακινητοποιημένα θυλακοειδή του βιοδείκτη *L.minor*, με τον οποίο να μπορεί να γίνει ανίχνευση ζιζανιοκτόνων του φωτοσυστήματος II. Η επιβεβαίωση της λειτουργίας του βιοαισθητήρα έγινε με την ανίχνευση των ζιζανιοκτόνων terbuthylazine και metribuzin, ο τρόπος δράσης των οποίων έχει μελετηθεί νωρίτερα. (βλ. Εισαγωγή υποκεφ. Ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος II). Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν καμπύλες βαθμονόμησης της απόκρισης, σύμφωνα με την οποίες υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ζιζανιοκτόνων αυτών που προκαλούν 50% παρεμπόδιση στη απόκριση του αισθητήρα, καθώς επίσης υπολογίστηκε και το όριο ανίχνευσής τους. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η απόκριση του βιοαισθητήρα σε μίγμα των δύο δραστικών ουσιών και συγκρίθηκε με αυτή των μεμονωμένων δραστικών ουσιών, οπότε και εξήχθησαν συμπεράσματα για την ύπαρξη ή όχι διαφοροποίησης στην απόκριση. Τέλος, μελετήθηκε η εκλεκτικότητα του φωτοσυνθετικού βιοαισθητήρα με την δοκιμή της απόκρισης ενός ζιζανιοκτόνου που δεν επηρεάζει, άμεσα τουλάχιστον, την ροή των ηλεκτρονίων του PSII.

4.3 Υλικά και Μέθοδοι για τη δημιουργία φωτοσυνθετικού αισθητήρα

4.3.1 Απομόνωση θυλακοειδών

Για την απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από την *L.minor*, φυτικός ιστός παραλείφθηκε από την καλλιέργεια, στραγγίσθηκε σε απορροφητικό χαρτί και ζυγίστηκε (10 g). Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε γουδί, το οποίο βρίσκονταν σε πάγο και αφού προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα άλεσης (1g ιστού/2 ml διαλύματος άλεσης) λειοτριβήθηκε. Το ρυθμιστικό διάλυμα άλεσης περιείχε 20 mM τρισίνη (Serva) pH 7.8, 300 mM σακχαρόζη (Fluka), 5 mM MgCl₂ (Merk), 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich), 1mM EDTA (Serva), 0,2% BSA (MP Biomedicals, LLC) (Varsamis et al., 2008, Touloupakis et al. 2012, Touloupakis et al., 2005).

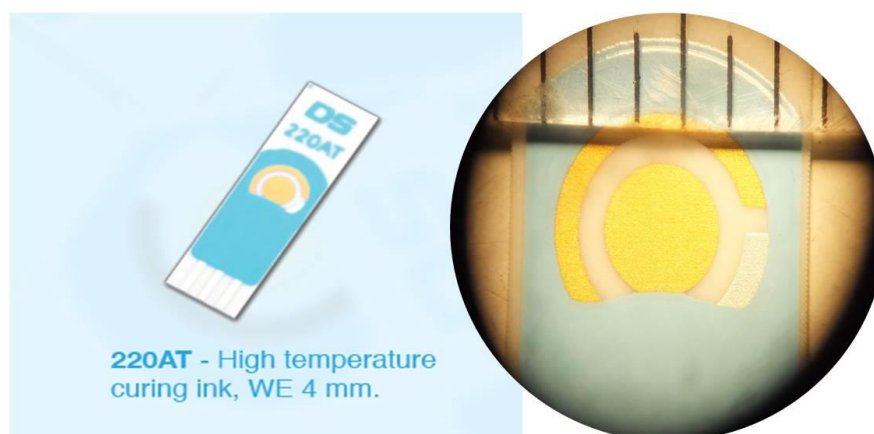
Κατόπιν, έγινε διήθηση με γάζα και παραλαβή του διηθήματος μέσα σε σωλήνα φυγοκέντρισης (falcon, 50 ml). Ακολούθησε φυγοκέντριση (Centurion Scientific Ltd / 9789-2) στις 2.500 στροφές, για 2 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε άλλο falcon και φυγοκεντρήθηκε στις 6.000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε στο διάλυμα επαναιώρησης που περιείχε 25 mM MES (Fluka), 70 mM σακχαρόζη και 15 mM NaCl (Merk) (Boutoroulos et al., 2011, Touloupakis et al. 2012). Έγινε νέα φυγοκέντριση (6.000 στροφές, 15 λεπτά, 4 °C) και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε πάλι στο διάλυμα επαναιώρησης, και αφού προσδιορίστηκε η ολική χλωροφύλλη, το διάλυμα θυλακοειδών διαμοιράστηκε σε δοχεία χωρητικότητας 1,5 ml και φυλάχθηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80°C). Η διαδικασία απομόνωσης των θυλακοειδών πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες έλλειψης φωτισμού.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ολικής χλωροφύλλης του τελικού διαλύματος των θυλακοειδών, 25 μl του διαλύματος προστέθηκαν σε 3 ml διαλύματος αιθανόλης (Merk) 95%. Κατόπιν έγινε φυγοκέντριση (4.500 στροφές, 2 λεπτά, 4 °C) και μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση του υπερκείμενου διαλύματος στα 665 και 649nm. Ο προσδιορισμός των ολικών χλωροφυλλών έγινε σύμφωνα με τον τύπο του Lichenthaler (1987) $C_{a+b} = 5,24A_{665} + 22,24A_{649}$, και η συγκέντρωσή τους ήταν 0,36 mg/ml.

4.3.2 Ακινητοποίηση θυλακοειδών σε ηλεκτρόδια χρυσού

Για τη δημιουργία του φωτοσυνθετικού αισθητήρα επιλέχθηκαν ηλεκτρόδια μεταξοτυπίας χρυσού (220AT) της εταιρίας Dropsens (Ισπανία) (Εικόνα 4.5). Η επιλογή

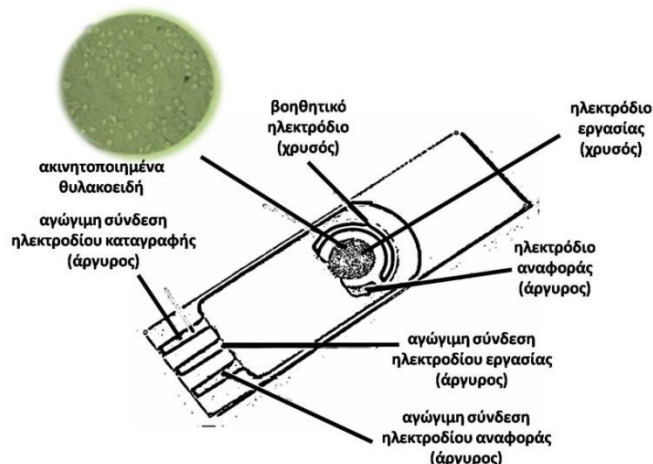
των ηλεκτροδίων με χρυσό ηλεκτρόδιο εργασίας έγινε καθώς αυτά κυρίως χρησιμοποιούνται στην βιβλιογραφία για τη δημιουργία φωτοσυνθετικών αισθητήρων (Bhalla et al., 2011, Boutopoulos et al., 2011, Touloupakis et al. 2012), αλλά και γιατί σε σύγκριση ηλεκτροδίων από διαφορετικά υλικά που έκαναν οι Touloupakis et al. (2012), αποδείχθηκε ότι τα συγκεκριμένα ηλεκτρόδια δίνουν την καλύτερη αναλογία σήματος προς θόρυβο. Στα 220 AT, το ηλεκτρόδιο εργασίας και το βοηθητικό αποτελούνται από χρυσό, ενώ το ηλεκτρόδιο αναφοράς από άργυρο. Στο ηλεκτρόδιο εργασίας έγινε η ακινητοποίηση των θυλακοειδών μεμβρανών. Για την ακινητοποίηση επιλέχθηκε η διαμοριακή σύνδεση (cross-linking) με γλουταραλδεΐδη και αλβουμίνη βόειου ορού (BSA-Glu), διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω. Η επιλογή βασίστηκε στη μελέτη των Koblizek et al. (2002), που συνέκριναν διαφορετικές μεθόδους ακινητοποίησης φωτοσυνθετικού υλικού και κατέληξαν ότι αυτή η μέθοδος ακινητοποίησης έδινε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στον «χρόνο ζωής» του βιοαισθητήρα.



Εικόνα 4.5: Το ηλεκτρόδιο μεταξοτυπίας χρυσού 220AT της Dropsens.

Αρχικά φτιάχτηκε το διάλυμα μέτρησης (15mM MES ρυθμιστικό διάλυμα, pH 6,5, 0,5 M μανιτόλη (Riedel-deHaën), 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 5* 10⁻⁵ M χλωραμφενικόλη (Serva)) (Koblizek et al., 2002). Στη συνέχεια, σε αυτό προστέθηκε αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA) με τελική συγκέντρωση 10%, και αναμείχθηκε με ίδιο όγκο διαλύματος θυλακοειδών. Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα γλουταραλδεΐδης (Fluka) 10%, ώστε η τελική συγκέντρωση της γλουταραλδεΐδης να είναι 0,3%. Το μίγμα αναμείχθηκε και 5 μl τοποθετήθηκαν στο ηλεκτρόδιο εργασίας (Εικόνα 4.6), όπου επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 4 °C. Το κάθε ηλεκτρόδιο δηλαδή είχε ακινητοποιημένα περίπου 0,85 μg χλωροφύλλης. Τα ηλεκτρόδια με τα ακινητοποιημένα

θυλακοειδή φυλάχθηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι να χρησιμοποιηθούν (Koblizek et al., 2002, Touloupakis et al., 2005, Bhalla et al., 2011). Η διαδικασία ακινητοποίησης των θυλακοειδών πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες πλήρους έλλειψης φωτισμού.



Εικόνα 4.6: Σχηματική απεικόνιση του ηλεκτροδίου μεταξοτυπίας χρυσού με τα ακινητοποιημένα θυλακοειδή στο ηλεκτρόδιο εργασίας. (τροποποίηση από διδακτορική διατριβή Φλαμπούρη (2015))

4.3.3 Συνδεσμολογία αισθητήρα και μέτρηση

Για τη μέτρηση της απόκρισης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρονοαμπερομετρίας και οι μετρήσεις έγιναν με τον ποτενσιοστάτη PG580 της εταιρείας Uniscan Instruments Ltd. (Buxton, Derbyshire, UK), στον οποίο συνδέονταν τα ηλεκτρόδια χρυσού με το ακινητοποιημένο φωτοσυνθετικό υλικό. Τα ηλεκτρόδια φυλλάσσονταν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους. Την ημέρα της μέτρησης τα ηλεκτρόδια αφήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στη συνέχεια το κάθε ένα ηλεκτρόδιο ξεχωριστά συνδέθηκε στον ποτενσιοστάτη προκειμένου να γίνει η μέτρηση (Εικόνα 4.7 Δ). Αρχικά, προστέθηκαν στο ηλεκτρόδιο 55 μl από το διάλυμα μέτρησης (βλ. παραπάνω) το οποίο περιείχε και 30 μM του ηλεκτρονιοδέκτη 2,6-διχλωροφαινόλη-ινδοφαινόλη DCPIP (2,6-dichlorophenol-indophenol, Alpha Aesar) (Boutopoulos et al. 2011, Touloupakis et al. 2012), και στη συνέχεια αυτό πολώθηκε στα +0,2 V. Τα 55 μl αυτά, κάλυπταν και τα τρία μέρη του ηλεκτροδίου (ηλεκτρόδιο εργασίας, καταγραφής και αναφοράς, Εικόνα 4.6). Όλες οι διαδικασίες αυτές έλαβαν χώρα σε συνθήκες έλλειψης φωτισμού. Η χρονοαμπερομετρία, η καταγραφή δηλαδή του ρεύματος ως προς τον χρόνο, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού UiEChem™ της εταιρείας Bio-Logic Science Instruments SAS (Claix, France). Η αλλαγή της έντασης του παραγόμενου ρεύματος στο φωτοσυνθετικό αισθητήρα, παρατηρήθηκε όταν το ηλεκτρόδιο φωτίστηκε σε διαδοχικές χρονικές στιγμές με μια ισχυρή πηγή (LED)

κόκκινου φωτός έντασης $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (βλ. Εικόνα 4.7 για την συνδεσμολογία του βιοαισθητήρα). Πιο συγκεκριμένα, το ηλεκτρόδιο εκτέθηκε στην φωτεινή πηγή για 7 sec επαναλαμβανόμενα ανά 2,5 min δίνοντας απόκριση της μορφής που παρουσιάστηκε στην Εικόνα 4.4. Το ηλεκτρικό σήμα που ελήφθη ήταν της τάξεως των 600 nA (550 ± 80 nA), ενώ υπήρξε και ένας μικρός θόρυβος (της τάξεως του 1nA). Μετά από πέντε φωτεινούς κύκλους προστέθηκαν 5μl από το διάλυμα μέτρησης με 30 μM DCPIP, τα οποία περιείχαν την επιλεγμένη συγκέντρωση του εκάστοτε ζιζανιοκτόνου (βλ. υποκεφ. 4.3.4, πιο κάτω). Οι φωτεινοί κύκλοι συνεχίστηκαν μετά την έλευση 10 min από την προσθήκη, οπότε και η ένταση του ρεύματος όπως ήταν αναμενόμενο μειώθηκε (Εικόνα 4.8).

Η απόκριση του αισθητήρα βασίζεται στην μείωση της ροής ηλεκτρονίων, και συνεπώς της απόκρισης (ρεύμα), του αισθητήρα υπό την παρουσία ζιζανιοκτόνου. Αρχικά καταγράφηκε η απόκριση χωρίς ζιζανιοκτόνο I_0 και στη συνέχεια καταγράφηκε η απόκριση μετά την προσθήκη του ζιζανιοκτόνου I_H . Σύμφωνα με τις αποκρίσεις αυτές υπολογίστηκε η υπολειπόμενη απόκριση RA (residual activity). Ο υπολογισμός έγινε από τον λόγο (σε ποσοστό) των αποκρίσεων (ρεύμα) υπό την παρουσία και απουσία των ζιζανιοκτόνων (Εξίσωση 4.1, Εικόνα 4.8) (Koblizek et al., 2002, Touloupakis et al., 2012, Bhalla & Zazubovich, 2011).

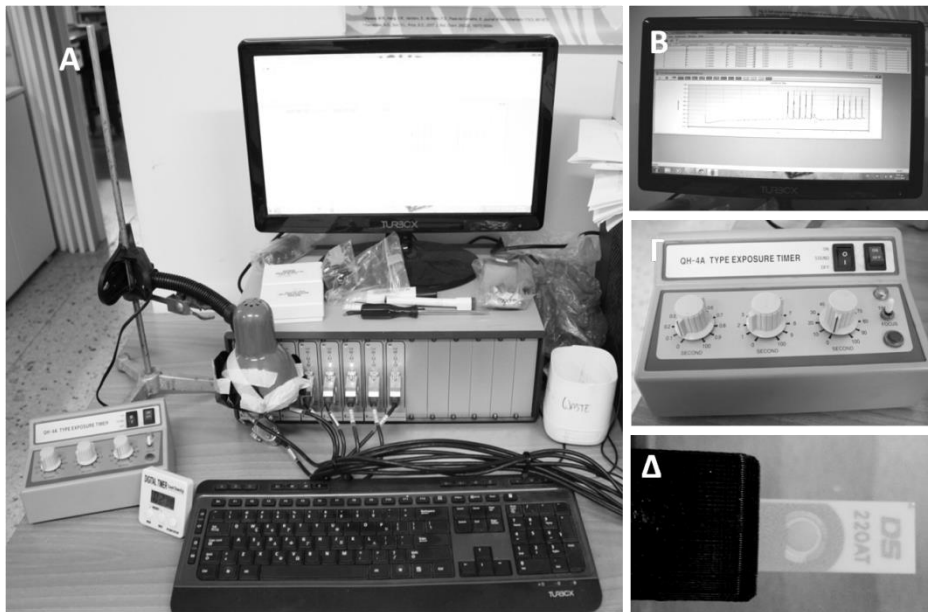
Εξίσωση 4.1:

$$RA = (\text{ρεύμα υπό την παρουσία ζιζανιοκτόνου } I_H * 100) / \text{ρεύμα χωρίς ζιζανιοκτόνο } I_0$$

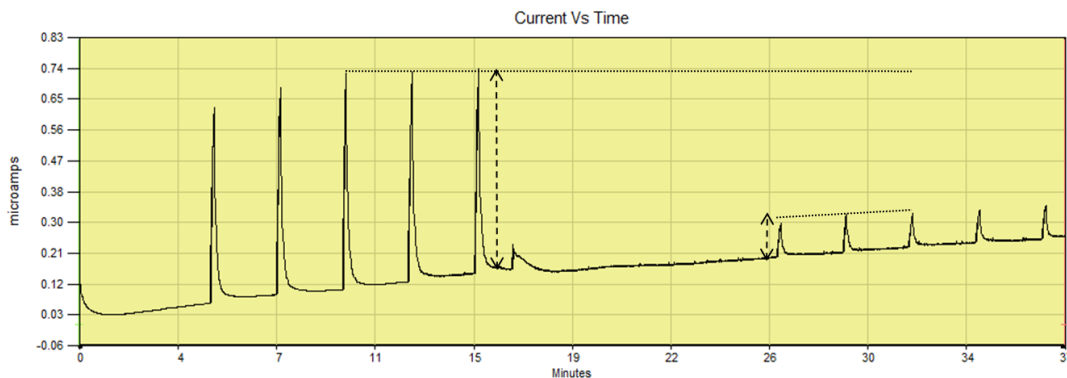
Δημιουργήθηκαν καμπύλες βαθμονόμησης βασιζόμενες στην υπολειπόμενη απόκριση RA, οι οποίες επεξεργάστηκαν με τη χρήση της εσωθερμικής καμπύλης Langmuir (Εξίσωση 4.2) (Koblizek et al., 2002, Touloupakis et al., 2012, Touloupakis et al., 2005).

Εξίσωση 4.2:
$$RA = 100 - 100 * [H] / (I_{50} + [H])$$

Όπου: RA = η υπολειπόμενη απόκριση RA (residual activity) μετά την προσθήκη ζιζανιοκτόνου, [H] = η συγκέντρωση του ζιζανιοκτόνου στο τελικό διάλυμα μέτρησης και I_{50} = η συγκέντρωση του ζιζανιοκτόνου που προκαλεί 50% παρεμπόδιση της απόκρισης.



Εικόνα 4.7: Η συνδεσμολογία του φωτοσυνθετικού αισθητήρα. Α) Ο Η/Υ, ο ποτενσιοστάτης PG580 της εταιρείας Uniscan Instruments Ltd, η φωτεινή πηγή (κάτω από την οποία βρίσκεται το ηλεκτρόδιο συνδεδεμένο με τον ποτενσιοστάτη, καθώς και η συσκευή ρύθμισης της παροχής ρεύματος στην φωτεινή πηγή. Β) Η οθόνη του Η/Υ στην οποία καταγράφεται η απόκριση του αισθητήρα με τη βοήθεια του λογισμικού UiEChem™ της εταιρείας Bio-Logic Science Instruments SAS Γ) Η συσκευή ρύθμισης της παροχής ρεύματος στην φωτεινή πηγή με την βοήθεια της οποίας επιλέγονταν τα sec για τα οποία φωτίζονταν ο αισθητήρας Δ) Το ηλεκτρόδιο μεταξοτυπίας χρυσού (220AT) της εταιρίας Dropsens συνδεδεμένο με τον ποτενσιοστάτη (χωρίς ακινητοποιημένα θυλακοειδή)



Εικόνα 4.8: Η απόκριση του βιοαισθητήρα χωρίς ζιζανιοκτόνο I_0 και μετά την προσθήκη του ζιζανιοκτόνου I_H (βέλη).

Έγινε επίσης και υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης (LOD) σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο (Εξίσωση 4.3). Ο υπολογισμός αυτός γίνεται στην βάση ενός διαστήματος εμπιστοσύνης 99 % (confidence internal) το οποίο, θεωρώντας ότι υπάρχει κανονική κατανομή, αντιστοιχεί στο $2,6 \cdot$ τυπικό σφάλμα των μετρήσεων (σ) (Koblizek et al., 2002, Touloupakis et al., 2012, Touloupakis et al., 2005).

Εξίσωση 4.3:
$$LOD = 2,6 \cdot \sigma \cdot I_{50} / (100 - 2,6 \cdot \sigma)$$

4.3.4 Διαλύματα ζιζανιοκτόνων

Αρχικά, το terbutylazine και το metribuzin, διαλύθηκαν σε αιθανόλη και δημιουργήθηκαν διαλύματα stock. Στη συνέχεια 5μl από τα διαλύματα αυτά μεταφέρονταν σε διάλυμα μέτρησης με 30 μM DCPIP, και από το νέο αυτό διάλυμα που περιείχε το ζιζανιοκτόνο 5μl μεταφέρονταν με πιπέτα στο ηλεκτρόδιο στο οποίο είχαν προστεθεί τα 55 μl διαλύματος μέτρησης με 30 μM DCPIP και στο οποίο είχε γίνει η μέτρηση της απόκρισης χωρίς ζιζανιοκτόνο (βλ. υποκεφ. 4.3.3). Η συγκέντρωση του stock διαλύματος επιλέγονταν με βάση την τελική επιθυμητή συγκέντρωση του ζιζανιοκτόνου, ενώ η συγκέντρωση του διαλύτη στην τελική σταγόνα του αισθητήρα ήταν μικρότερη από 0,1%.

4.4 Αποτελέσματα ανίχνευσης ζιζανιοκτόνων με τον φωτοσυνθετικό βιοαισθητήρα

Όπως αναφέρθηκε ήδη, ο φωτοσυνθετικός βιοαισθητήρας που δημιουργήθηκε στόχο έχει την ανίχνευση ζιζανιοκτόνων του φωτοσυστήματος II. Μετρήθηκε, λοιπόν, η απόκριση του βιοαισθητήρα πριν και μετά την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων των terbutylazine και metribuzin. Η επιλογή των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν έγινε αφενός με τα δεδομένα από τις τοξικολογικές μελέτες που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 1 (παρεμπόδιση ανάπτυξης βλ. υποκεφ. 1.4.1), και αφετέρου έγιναν δοκιμές ώστε οι τελικές αυτές συγκεντρώσεις να δίνουν αποκρίσεις σε όλο το εύρος 0-100%. Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις αυτές. Η υπολειπόμενη απόκριση (RA, Εξίσωση 4.1) κάθε συγκέντρωσης μετρήθηκε τουλάχιστον 3 φορές, με διαφορετικό ηλεκτρόδιο κάθε φορά. Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των επαναλήψεων. Μετρήθηκαν επίσης, οι υπολειπόμενες αποκρίσεις (RA) σε μίγμα των δύο δραστικών.

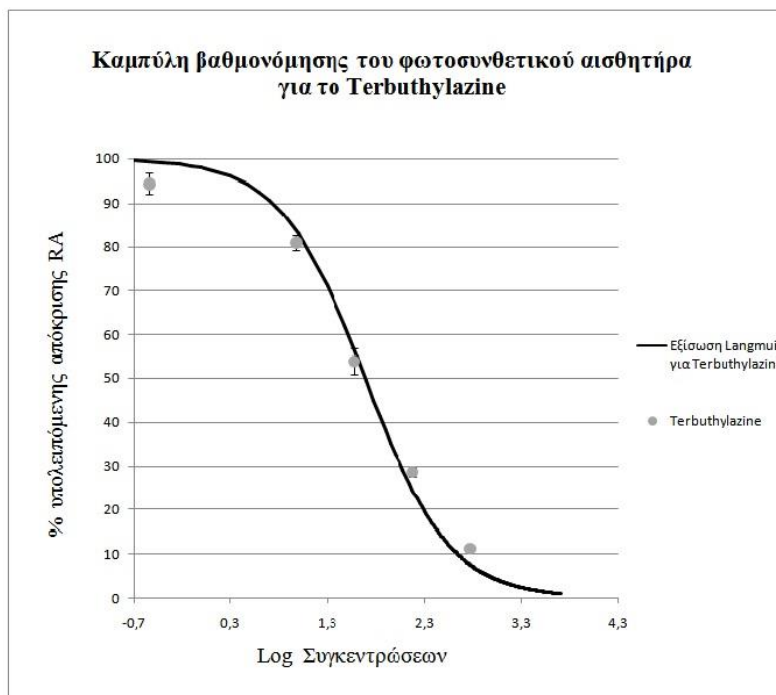
Από τα αποτελέσματα αυτά δημιουργήθηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης της απόκρισης για τις δύο δραστικές ουσίες (Γράφημα 4.1, Γράφημα 4.2) και έγινε υπολογισμός του I_{50} (Πίνακας 4.2) με εφαρμογή της καμπύλης Langmuir (Εξίσωση 4.2) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Graphpad Prism 5. Επίσης, υπολογίστηκε όριο ανίχνευσης από την Εξίσωση 4.3, και σύμφωνα με τα αποτελέσματα των I_{50} . Το τυπικό σφάλμα σ που χρησιμοποιήθηκε υπολογίστηκε από τον μέσο όρο των τυπικών σφαλμάτων όλων των μετρήσεων.

Πίνακας 4.1: Οι συγκεντρώσεις του terbutylazine και του metribuzin καθώς και του μίγματός τους, στις οποίες έγινε μέτρηση της απόκρισης του φωτοσυνθετικού αισθητήρα.

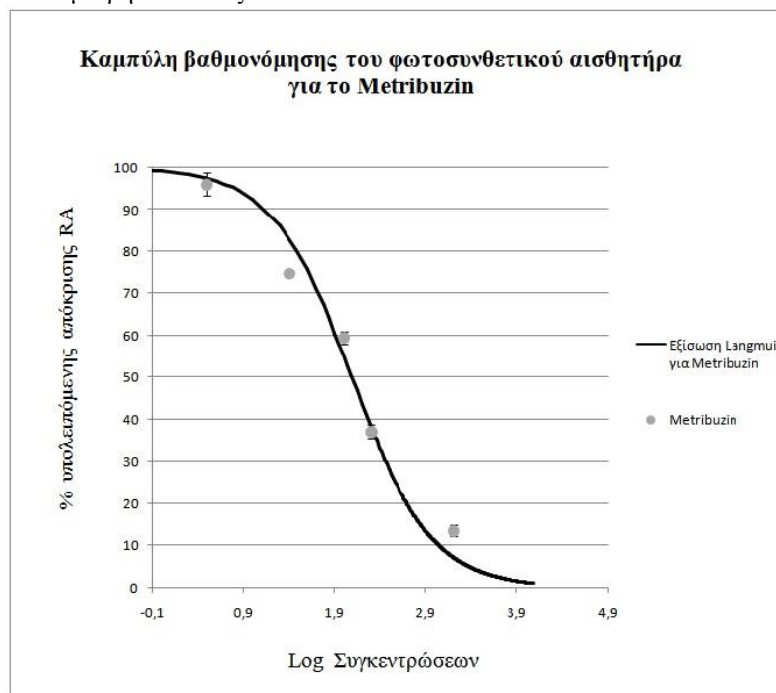
Terbutylazine (μg/l)	Metribuzin (μg/l)
600	0
150	0
37,5	0
9,375	0
0,293	0
0	1600
0	200
0	100
0	25
0	3,124
600	1600
150	200
37,5	100
9,375	25
0,293	3,124

Στη συνέχεια έγιναν οι ίδιοι υπολογισμοί για το μίγμα των δύο δραστικών. Για την περίπτωση των μιγμάτων χρησιμοποιήθηκαν αντί για τις συγκεντρώσεις οι τοξικές μονάδες (TU, βλ. υποκεφ. 1.1.4.1). Στο Γράφημα 4.3 παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης της απόκρισης για το μίγμα των δραστικών και για την κάθε μία ξεχωριστά (ίδια εξίσωση λόγω ίδιου I_{50} , βλ. Πίνακας 4.3), σύμφωνα με την εξίσωση Langmuir. Στον Πίνακα 4.3 αποτυπώνονται τα αντίστοιχα I_{50} και τα όρια ανίχνευσης (LOD), σε τοξικές μονάδες αυτή τη φορά.

Τέλος, έγινε μέτρηση της υπολειπόμενης απόκρισης του φωτοσυνθετικού βιοαισθητήρα υπό την παρουσία ενός ζιζανιοκτόνου που δεν δρα στο φωτοσύστημα II, ώστε να επιβεβαιωθεί η εκλεκτικότητα του βιοαισθητήρα. Για την δοκιμή αυτή χρησιμοποιήθηκε το tritosulfuron, ζιζανιοκτόνο που παρεμποδίζει την βιοσύνθεση αμινοξέων. Επιλέχθηκαν δύο συγκεντρώσεις, η 600 μg/l, που παρεμποδίζει στα τεστ τοξικότητας την ανάπτυξη της *L.minor* κατά 85-90%, καθώς και η τετραπλάσια συγκέντρωσή της, η 2400 μg/l. Όπως ήταν αναμενόμενο και οι δύο αυτές συγκεντρώσεις δεν προκάλεσαν μείωση της υπολειπομένης απόκρισης ($\pm 1,27\%$, $\pm 1,47\%$ αντίστοιχα), καθώς η μείωση αυτή εμφανίζεται μόνο όταν έχουμε παρεμπόδιση της ροής των ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα II.



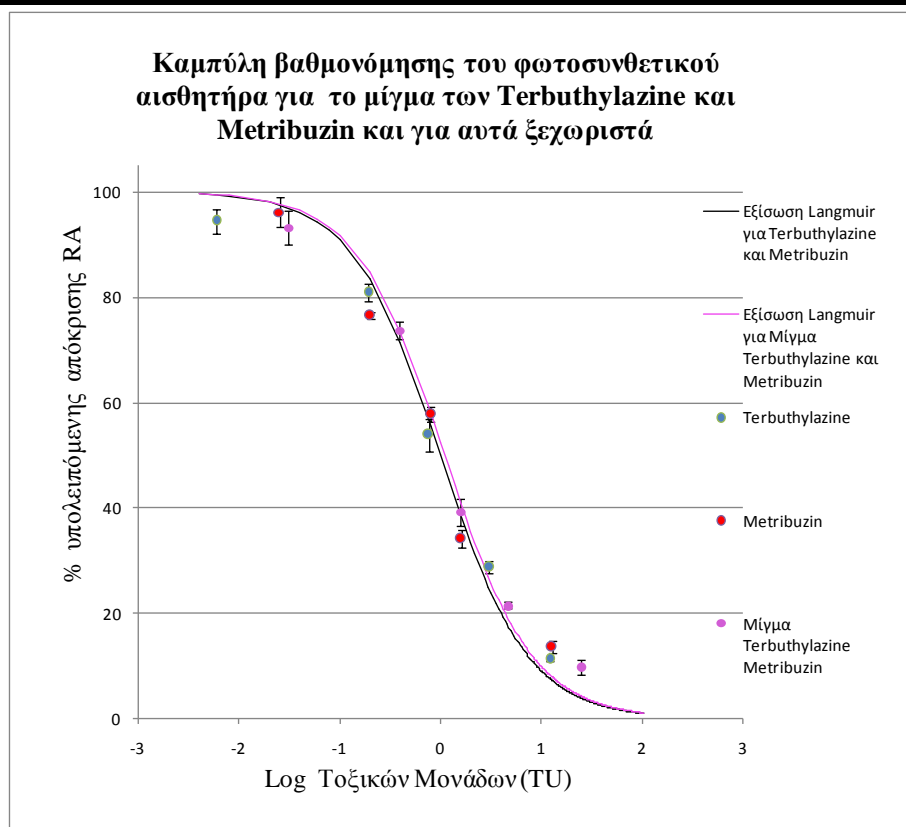
Γράφημα 4.1: Καμπύλη βαθμολόγησης του φωτοσυνθετικού αισθητήρα για το terbutylazine. Παρουσιάζεται το ποσοστό της υπολειπόμενης απόκρισης, RA, του σήματος του φωτοσυνθετικού αισθητήρα μετά την προσθήκη terbutylazine, ως προς τον λογάριθμο των συγκεντρώσεων, σύμφωνα με την εξίσωση Langmuir. Διακρίνονται οι RA των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα τυπικά σφάλματα των μετρήσεών τους.



Γράφημα 4.2: Καμπύλη βαθμολόγησης του φωτοσυνθετικού αισθητήρα για το metribuzin. Παρουσιάζεται το ποσοστό της υπολειπόμενης απόκρισης, RA, του σήματος του φωτοσυνθετικού αισθητήρα μετά την προσθήκη metribuzin, ως προς τον λογάριθμο των συγκεντρώσεων, σύμφωνα με την εξίσωση Langmuir. Διακρίνονται οι RA των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα τυπικά σφάλματα των μετρήσεών τους.

Πίνακας 4.2: Τα I₅₀ του terbuthylazine και του metribuzin σύμφωνα με την καμπύλη Langmuir, καθώς και τα όρια ανίχνευσης LOD των δύο δραστικών.

	Terbuthylazine	Metribuzin
LOD	2,27(μg/l) $9,884 \cdot 10^{-9} (M)$	5,24 (μg/l) $2,4468 \cdot 10^{-8} (M)$
I₅₀	48,93(μg/l) $2,13 \cdot 10^{-7} (M)$	123,7 (μg/l) $5,77228 \cdot 10^{-9} (M)$
Τυπικό σφάλμα I₅₀	3,795	10,8
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	40,88 - 56,97	100,7 - 146,8
R²	0,9814	0,9661



Γράφημα 4.3: Καμπύλη βαθμονόμησης του φωτοσυνθετικού αισθητήρα για το μίγμα των terbuthylazine και metribuzin και για αυτά ξεχωριστά.. Παρουσιάζεται το ποσοστό της υπολειπόμενης απόκρισης, RA, του σήματος του φωτοσυνθετικού αισθητήρα μετά την προσθήκη των 2 δραστικών σε μίγμα και ξεχωριστά, ως προς τις τοξικές μονάδες, σύμφωνα με την εξίσωση Langmuir. Διακρίνονται οι RA των τοξικών μονάδων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα τυπικά σφάλματα των μετρήσεών τους.

Πίνακας 4.3: Τα I₅₀ και LOD του terbuthylazine, του metribuzin και του μίγματός τους σύμφωνα με την καμπύλη Langmuir και με βάση τις τοξικές μονάδες, TU

	Terbuthylazine	Metribuzin	Μίγμα Terb+Metrib
LOD (TU)	0,0464	0,04238	0,0574
I₅₀ (TU)	1	1	1,103
Τυπικό σφάλμα I₅₀	0,07752	0,08730	0,08231
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	0,8356 - 1,164	0,8140 - 1,186	0,9278 - 1,279
R²	0,9814	0,9661	0,9825

4.5 Συζήτηση

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο φωτοσυνθετικός βιοαισθητήρας που δημιουργήθηκε έχει ακινητοποιημένα θυλακοειδή από το φυτό βιοδείκτη *L.minor*. Από όσο γνωρίζουμε, πρώτη φορά χρησιμοποιείται το συγκεκριμένο φυτό για τη δημιουργία τέτοιου τύπου βιοαισθητήρα. Στην βιβλιογραφία συναντά κανείς βιοαισθητήρες που βασίζονται σε φωτοσυνθετικό υλικό κυρίως από σπανάκι *Spinacia oleracea* L (Rouillon et al., 1994, Loranger & Carpentier, 1994, Touloupakis et al., 2011, Boutopoulos et al., 2011, Touloupakis et al., 2012, Bhalla et al., 2011, Bhalla & Zazubovich, 2011) αλλά και από άλλα φυτά όπως *Senecio vulgaris* (Touloupakis et al., 2011) καθώς και από τα θερμοφιλικά κυανοβακτήρια *Synechococcus elongates* (Koblizek et al., 2002) και *Synechococcus bigranulatus* (Maly et al., 2005). Ενδιαφέρον θα είχε μελλοντικά η σύγκριση της ευαισθησίας των θυλακοειδών της *L.minor* στα ζιζανιοκτόνα του φωτοσυστήματος II, με αυτή άλλων φυτών με τη χρήση φωτοσυνθετικών αισθητήρων με τον ίδιο ακριβώς τρόπο απομόνωσης, ακινητοποίησης και μέτρησης της απόκρισης. Θα ήταν εφικτό με τον τρόπο αυτό να εξακριβωθεί αν η ευαισθησία στα ζιζανιοκτόνα που χαρακτηρίζει τον βιοδείκτη αυτό μπορεί να αξιοποιηθεί και στους βιοαισθητήρες.

Το σήμα του φωτοσυνθετικού βιοαισθητήρα που δημιουργήθηκε ήταν της τάξης των 600 nA, συγκεκριμένα 550 ± 80 nA, το οποίο είναι σημαντικά μεγαλύτερο από αυτά που βρίσκουμε στην βιβλιογραφία όπως 300 nA, (Touloupakis et al., 2012, Boutopoulos et al., 2011), 20-40 nA (Touloupakis et al., 2005) και 5-15 nA (Koblizek et al., 2002). Χρειάζεται όμως, να μελετηθεί το χρονικό διάστημα για το οποίο παραμένει ενεργή η φωτοσυνθετική δραστηριότητα των μονιμοποιημένων θυλακοειδών, τόσο όταν παραμένουν φυλαγμένα τα μονιμοποιημένα ηλεκτρόδια (-80 °C), όσο και κατά την διάρκεια συνεχούς μέτρησης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ θα πρέπει να μελετηθεί και πως το σήμα διαφοροποιείται στα χρονικά διαστήματα αυτά. Για να υπάρξει μια συνολική εικόνα όσο αφορά τη «διάρκεια ζωής» του βιοαισθητήρα, θα πρέπει επίσης να ελεγχθεί το διάστημα για το οποίο τα απομονωμένα θυλακοειδή παραμένουν ενεργά στους -80 °C, καθώς και αν το διάστημα αυτό διαφοροποιείται όταν αυτά είναι ακινητοποιημένα στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Υπάρχουν ήδη ενδείξεις για την μείωση του σήματος από μετρήσεις σε ηλεκτρόδια όπου η ακινητοποίηση έγινε σε θυλακοειδή που είχαν διατηρηθεί στους -80 °C μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Όσο αφορά στην ανίχνευση του terbutylazine και το LOD που παρουσιάστηκε παραπάνω ($9,884 \cdot 10^{-9} \text{M}$), είναι λίγο βελτιωμένο συγκριτικά με αυτό που προκύπτει από την ακινητοποίηση θυλακοειδών από σπανάκι με την ίδια μέθοδο διαμοριακής σύνδεσης (BSA-Gly) σε ηλεκτρόδια γραφίτη, αλλά με συνεχόμενη ροή διαλύματος μέτρησης ($\text{LOD} = 2,52 \cdot 10^{-8}$) (Touloupakis et al., 2005). Η διαφορά αυτή ίσως οφείλεται, μεταξύ άλλων, στον τύπο του βιοαισθητήρα καθώς η συνεχής ροή διαλυμάτων που εφαρμόζεται κατά την μέτρηση οδηγεί σε απομάκρυνση φωτοσυνθετικού υλικού από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου (Touloupakis et al., 2012). Στην βιβλιογραφία δεν βρέθηκαν φωτοσυνθετικοί βιοαισθητήρες με τους οποίους να είχε γίνει ανίχνευση στο metribuzin.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των δύο δραστικών ως προς την ανίχνευσή τους από τον φωτοσυνθετικό αισθητήρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.2 το terbutylazine έχει σχεδόν 3 φορές μικρότερο I_{50} από το metribuzin. Αυτό σημαίνει ότι για να επιτευχθεί μείωση του σήματος του βιοαισθητήρα κατά 50% χρειάζεται 3πλάσια συγκέντρωση metribuzin από terbutylazine, καθιστώντας τον φωτοσυνθετικό βιοαισθητήρα πιο ευαίσθητο στην παρουσία του δεύτερου. Η εικόνα αυτή έρχεται σε αντιδιαστολή με αυτή από την παρεμπόδιση της ανάπτυξης της *L.minor* από τις δύο δραστικές ουσίες (βλ. Γράφημα 1.3) όπως επίσης και από την μείωση στον φαινόμενο ρυθμό γραμμικής ροής ηλεκτρονίων της φωτοχημικής αλυσίδας, ETR (βλ. Πίνακας 2.9). Πιο συγκεκριμένα, για την επίτευξη 50% παρεμπόδισης στην ανάπτυξη, απαιτείται περίπου διπλάσια συγκέντρωση terbutylazine από ότι metribuzin (βλ. Πίνακας 1.3, Πίνακας 1.4), ενώ αντίστοιχα για τον ETR απαιτείται περίπου 1,5 φορά μεγαλύτερη συγκέντρωση (βλ. Πίνακας 2.9). Φαίνεται δηλαδή ότι το αποτέλεσμα της σύγκρισης της τοξικότητας μεταξύ των δύο δραστικών διαφοροποιείται μεταξύ ολόκληρου του φυτού της *L.minor* (ανάπτυξη, ETR) και των ακινητοποιημένων θυλακοειδών του βιοαισθητήρα. Όσο αφορά στην ευαισθησία του βιοαισθητήρα, αυτή εξαρτάται από την σταθερά πρόσδεσης του ζιζανιοκτόνου στην πρωτεΐνη D1 του φωτοσυστήματος II, η οποία με τη σειρά της σχετίζεται με την στεreoχημική δομή τόσο του ζιζανιοκτόνου όσο και της D1 πρωτεΐνης. Τα ζιζανιοκτόνα ανταγωνίζονται την πλαστοκινόνη Q_B για την θέση πρόσδεσης στην D1 πρωτεΐνη και καθώς η συμπληρωματικότητά τους είναι μεγαλύτερη από αυτή της Q_B , καταλαμβάνουν αυτά τη θέση. Παράλληλα το κάθε ζιζανιοκτόνο έχει, όπως είναι λογικό, διαφορετική συμπληρωματικότητα με τη θέση πρόσδεσης (Oettmeier et al., 1982, Sobolev & 162

Edelman, 1995). Κατά συνέπεια και λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι η συμπληρωματικότητα του terbutylazine με την θέση πρόσδεσης είναι μεγαλύτερη από αυτή του metribuzin. Κάτι τέτοιο όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης καθώς ρόλο στην διαφορά της τοξικότητάς τους όσο αφορά στα θυλακοειδή παίζει και ο τρόπος ακινητοποίησης του φωτοσυνθετικού υλικού, καθώς τα ζιζανιοκτόνα έρχονται και σε επαφή με τις ουσίες που εμπεριέχονται στο διάλυμα ακινητοποίησης πριν «φτάσουν» στη θέση πρόσδεσης. Από την άλλη πλευρά, η μεγαλύτερη τοξικότητα του metribuzin σε σχέση terbutylazine στο φυτό της *L.minor* ενδεχομένως να σχετίζεται με διαφορές στην πρόσληψη και την κίνηση των δραστικών ουσιών αυτών στο φυτό ή/και στον μεταβολισμό τους από το φυτό (βλ. υποκεφ. 3.1.2). Η κίνηση των ζιζανιοκτόνων μέσα στο φυτό σχετίζεται με την ισορροπία λιπόφιλης-υδρόφιλης ιδιότητάς του (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2007). Σύμφωνα με την παράμετρο Log Pow, η οποία παρουσιάζεται στον Πίνακα 0.1, το terbutylazine είναι περισσότερο λιπόφιλο από το metribuzin (Log Pow 3,4 και 1,6 αντίστοιχα). Οι λιπόφιλες ιδιότητες βοηθούν τη δραστική ουσία να εισέρχεται δια μέσου λιπόφιλων στοιβάδων όπως οι κηροί και η εφυμενίδα ενώ οι υδρόφιλες στη μετακίνηση εντός των φυτών (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2007). Ενδεχομένως το πιο υδρόφιλο metribuzin να ευνοείται σε σχέση με το terbutylazine στο να «φτάσει» στη θέση πρόσδεσης και ως εκ τούτου να είναι πιο τοξικό από το terbutylazine για το φυτό. Ενδέχεται επίσης το terbutylazine να μεταβολίζεται από το φυτό καλύτερα από το metribuzin. Οι παραπάνω υποθέσεις, όμως, θα πρέπει να επιβεβαιωθούν ή να απορριφθούν με επιπλέον πειράματα καθώς δεν μπορούν με τα υπάρχοντα δεδομένα να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Όσο αφορά στο συνδυασμό των ζιζανιοκτόνων, διακρίνεται (Πίνακας 4.3), ότι το I_{50} του μίγματος του metribuzin και του terbutylazine, είναι λίγο μεγαλύτερο από αυτό των μεμονωμένων ζιζανιοκτόνων. Ταυτόχρονα, στο Γράφημα 4.3 βλέπουμε ότι η καμπύλη Langmuir για το μίγμα έχει μια μικρή μετατόπιση προς τα δεξιά σε σχέση με αυτή των δύο δραστικών. Αυτή η διαφορά όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική ($F(2,47) = 0,4052$, $p = 0,6692$). Κατά συνέπεια, στην περίπτωση των terbutylazine και metribuzin, δεν υπάρχει παρέκκλιση από την προσθετική δράση (CA, βλ. υποκεφ. 1.1.4.1), οπότε και μπορεί να υιοθετηθεί το μοντέλο αυτό για την πρόβλεψη της απόκρισης του μίγματος των δύο ζιζανιοκτόνων, και αντίστροφα, η απόκριση του μίγματος αντιστοιχεί στις συγκεντρώσεις των δύο ζιζανιοκτόνων και δεν οδηγεί σε υπό

ή υπέρ εκτίμηση τους. Η προσθετική δράση και τα πλεονεκτήματά της αυτά δεν μπορούν να θεωρηθούν δεδομένα σε μίγματα ζιζανιοκτόνων που δεν έχουν μελετηθεί, καθώς υπάρχει ενδεχόμενο ανταγωνισμού ή συνεργισμού μεταξύ των δύο ζιζανιοκτόνων ως προς την απόκριση του φωτοσυνθετικού αισθητήρα. Σε μια τέτοια περίπτωση, η αποδοχή της προσθετικής δράσης θα οδηγούσε σε λανθασμένες εκτιμήσεις.

Αναφορικά με την εκλεκτικότητα του βιοαισθητήρα, τα αποτελέσματα από την δοκιμή ενός ζιζανιοκτόνου που δεν επηρεάζει άμεσα την φωτοσυνθετική ροή των ηλεκτρονίων ήταν ενθαρρυντικά, καθώς δεν οδήγησαν σε αλλαγή της απόκρισης του αισθητήρα. Περαιτέρω διερεύνηση της εκλεκτικότητας είναι αναγκαία παρ'όλα αυτά, καθώς παρεμπόδιση του σήματος του φωτοσυνθετικού βιοαισθητήρα μπορούν να προκαλέσουν και άλλοι ρύποι όπως τα βαρέα μέταλλα (Koblizek et al., 2002). Στην περίπτωση των βαρέων μετάλλων συγκεκριμένα, η παρεμπόδιση συμβαίνει σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες από αυτές στις οποίες το επιτυγχάνουν τα ζιζανιοκτόνα. Για παράδειγμα, ο χαλκός αρχίζει να παρεμποδίζει το σήμα φωτοσυνθετικού αισθητήρα σε συγκεντρώσεις πάνω από $10^{-6}M$ (Koblizek et al., 2002). Πρόκειται δηλαδή, για συγκέντρωση 100 με 1000 φορές πάνω από το όριο ανίχνευσης των ζιζανιοκτόνων.

Ο βιοαισθητήρας που δημιουργήθηκε αποτελεί έναν ευαίσθητο και φθινό τρόπο ανίχνευσης ζιζανιοκτόνων που παρεμποδίζουν το φωτοσύστημα II. Η δημιουργία του δεν απαιτεί ακριβά μηχανήματα και περίπλοκους χειρισμούς, όπως για παράδειγμα οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν την τεχνική ανάπτυξης μικροδομών με χρήση Λείζερ (LIFT). Επίσης, το σύστημα μέτρησης, το οποίο δεν περιλαμβάνει συνεχή ροή διαλυμάτων, είναι ιδιαίτερα απλό και χωρίς κόστος. Το γεγονός όμως ότι δεν υπάρχει συνεχής ροή διαλυμάτων έχει και ορισμένα μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα, δεν επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση του ίδιου ηλεκτροδίου για άλλη μέτρηση. Ακόμα, η δυνατότητα ξεπλύματος με την ροή διαλύματος μέτρησης, στους αισθητήρες συνεχούς ροής, δίνει την δυνατότητα επιβεβαίωσης της παρουσίας ζιζανιοκτόνων και όχι για παράδειγμα χαλκού, καθώς η επίπτωση του τελευταίου στο φωτοσύστημα II είναι μη αναστρέψιμη (Koblizek et al., 2002).

Άλλο ένα πλεονέκτημα του φωτοσυνθετικού βιοαισθητήρα που δημιουργήθηκε είναι η ταχύτητα μέτρησης σε σχέση με τις κλασικές αναλυτικές τεχνικές της χρωματογραφίας,

καθώς και η πολύ μεγάλη οικονομία σε σχέση με αυτές, τόσο λόγω της πολύ μικρής ποσότητας διαλυτών όσο και λόγω του φθηνότερου εξοπλισμού. Ο βιοαισθητήρας αυτός, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί συνδυαστικά με τις μεθόδους αυτές για μια πρώτη διαλογή δειγμάτων, ώστε να επιλέγονται αυτά στα οποία απαιτείται να εφαρμοστούν οι κλασικές αναλυτικές τεχνικές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agrow (2006). Global agrochemical market flat in 2005. Issue 490, p. 15, February 24th, 2006.

Altenburger, R., Walter, H., & Grote, M. (2004). What contributes to the combined effect of a complex mixture?. *Environmental Science & Technology*, 38(23), 6353-6362.

Ashton, F. M., & Crafts, A. S. (1981). *Mode of action of herbicides*. 2nd edition, New York: John Wiley and Sons

Babić, M., Radić, S., Cvjetko, P., Roje, V., Pevalek-Kozlina, B., & Pavlica, M. (2009). Antioxidative response of *Lemna minor* plants exposed to thallium (I)-acetate. *Aquatic Botany*, 91(3), 166-172.

Backhaus, T., Arrhenius, Å., & Blanck, H. (2004). Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: predictive power and limitations of independent action and concentration addition. *Environmental science & technology*, 38(23), 6363-6370.

Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 89-113.

Barbagallo, R. P., Oxborough, K., Pallett, K. E., & Baker, N. R. (2003). Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology*, 132(2), 485-493.

Barr, R., & Crane, F. L. (2005). Inhibition or inactivation of higher plant chloroplast electron transport. *Pessarakli, M eds*, 149-168.

Bartha, B., Huber, C., & Schröder, P. (2014). Uptake and metabolism of diclofenac in *Typha latifolia*—How plants cope with human pharmaceutical pollution. *Plant Science*, 227, 12-20.

Belluzo, M. S., Ribone, M. É., & Lagier, C. M. (2008). Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics. *Sensors*, 8(3), 1366-1399.

Benz, J. P., Lintala, M., Soll, J., Mulo, P., & Bölder, B. (2010). A new concept for ferredoxin–NADP (H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. *Trends in plant science*, 15(11), 608-613.

Berenbaum, M. C. (1989). What is synergy?. *Pharmacological reviews*, 41(2), 93-141.

Bhalla, V., & Zazubovich, V. (2011). Self-assembly and sensor response of photosynthetic reaction centers on screen-printed electrodes. *Analytica chimica acta*, 707(1), 184-190.

Bhalla, V., Zhao, X., & Zazubovich, V. (2011). Detection of explosive compounds using Photosystem II-based biosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 657(1), 84-90.

Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology* 26, 585-615.

Bolhar-Nordenkamp, H. R., Long, S. P., Baker, N. R., Oquist, G., Schreiber, U. L. E. G., & Lechner, E. G. (1989). Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, 497-514.

Boutopoulos, C., Touloupakis, E., Pezzotti, I., Giardi, M. T., & Zergioti, I. (2011). Direct laser immobilization of photosynthetic material on screen printed electrodes for amperometric biosensor. *Applied Physics Letters*, 98(9), 093703.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.

Buonasera, K., Lambreva, M., Rea, G., Touloupakis, E., & Giardi, M. T. (2011). Technological applications of chlorophyll a fluorescence for the assessment of environmental pollutants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401(4), 1139-1151.

Buonasera, K., Pezzotti, G., Pezzotti, I., Cano, J. B., & Giardi, M. T. (2011). BIOSENSORS: NEW FRONTIERS FOR THE ENVIRONMENTAL ANALYSIS. *Revista Politécnica*, 7(13).

BVL - Tritosulfuron-Report and Proposed Decision (2002), [www.bvl.bund.de, http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/02_eu_berichte/Tritosulfuron-DAR.pdf?__blob=publicationFile](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/02_eu_berichte/Tritosulfuron-DAR.pdf?__blob=publicationFile)

Caims, J., & Niederlehner, B. R. (1992). Coping with the environmental effects of point-source discharges. *Journal of Environmental Sciences*, 1, 000.

Cakmak, I., & Marschner, H. (1992). Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant physiology*, 98(4), 1222-1227.

Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2002). Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, 21(2), 91-97.

Campàs, M., Carpentier, R., & Rouillon, R. (2008). Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. *Biotechnology advances*, 26(4), 370-378.

Canero, A. I., Cox, L., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Hermosín, M. C., & Cornejo, J. (2011). Effect of the herbicides terbuthylazine and glyphosate on photosystem II photochemistry of young olive (*Olea europaea*) plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10), 5528-5534.

Cao, S., Zhang, X., Xu, D., Fan, X., Mou, S., Wang, Y., ... & Wang, W. (2013). A transthylakoid proton gradient and inhibitors induce a non-photochemical fluorescence quenching in unicellular algae *Nannochloropsis sp.* *FEBS letters*, 587(9), 1310-1315.

Cedergreen N, Svendsen C, Backhaus T (2013) Chemical Mixtures: Concepts for Predicting Toxicity. In: Jorgensen SE, editors. *Encyclopedia of Environmental Management*. New York: Taylor & Francis. 2601–2610.

Cedergreen, N. (2008). Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time? *Environmental pollution*, 156(3), 1099-1104.

Cedergreen, N. (2014). Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PloS one*, 9(5), e96580.

Cedergreen, N., & Streibig, J. C. (2005a). Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments?. *Environmental toxicology and chemistry*, 24(7), 1676-1683.

Cedergreen, N., & Streibig, J. C. (2005b). The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest management science*, 61(12), 1152-1160.

Cedergreen, N., Abbaspoor, M., Sørensen, H., & Streibig, J. C. (2007). Is mixture toxicity measured on a biomarker indicative of what happens on a population level? A study with *Lemna minor*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 67(3), 323-332.

Cedergreen, N., Andersen, L., Olesen, C. F., Spliid, H. H., & Streibig, J. C. (2005). Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on K_{ow} or mode of action?. *Aquatic toxicology*, 71(3), 261-271.

Cedergreen, N., Christensen, A. M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., Streibig, J. C., & Sørensen, H. (2008). A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(7), 1621-1632.

Cedergreen, N., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., & Streibig, J. C. (2007b). Combination effects of herbicides on plants and algae: do species and test systems matter? *Pest management science*, 63(3), 282-295.

Cedergreen, N., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., Sørensen, H., & Streibig, J. C. (2007a). Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(1), 149-156.

Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208.

Chesworth, J. C., Donkin, M. E., & Brown, M. T. (2004). The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquatic toxicology*, 66(3), 293-305.

Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, 102(1), 29-45.

Cobb, A. H., & Reade, J. P. (2010) *Herbicides and Plant Physiology*, 2nd edition, UK: A John Wiley & Sons, Ltd., Publication:

Coleman, J., Blake-Kalff, M., & Davies, E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in plant science*, 2(4), 144-151.

Conrad, R., Büchel, C., Wilhelm, C., Arsalane, W., Berkaloff, C., & Duval, J. C. (1993). Changes in yield of in-vivo fluorescence of chlorophyll a as a tool for selective herbicide monitoring. *Journal of applied phycology*, 5(5), 505-516.

da Silva, E. C., de Albuquerque, M. B., de Azevedo Neto, A. D., & da Silva Junior, C. D. (2013). Drought and Its Consequences to Plants—From Individual to Ecosystem. *RESPONSES OF ORGANISMS TO WATER STRESS*, 17.

De Corcuera, J. I. R., & Cavalieri, R. P. (2003). Biosensors. In *Encyclopedia of agricultural, food, and biological engineering* (pp. 119-123).

de Sousa, C. P., de Farias, M. E., Schock, A. A., & Bacarin, M. A. (2014). Photosynthesis of soybean under the action of a photosystem II-inhibiting herbicide. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(11), 3051-3062.

Deneer, J. W. (2000). Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Management Science*, 56(6), 516-520.

Directive, C. (1991). Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. *Official Journal of the European Communities L230*, 1-32.

Dixon, D. P., Skipsey, M., & Edwards, R. (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 71(4), 338-350.

Drost, W., Backhaus, T., Vassilakaki, M., & Horst Grimme, L. (2003). Mixture toxicity of s-triazines to *Lemna minor* under conditions of simultaneous and sequential exposure. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12(6), 601-607.

Durner, J., Gailus, V., & Böger, P. (1994). The oxygenase reaction of acetolactate synthase detected by chemiluminescence. *FEBS letters*, 354(1), 71-73.

EC (Environment Canada) (2007) Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*, Environmental Protection Service, Report EPS 1/RM/37, 2nd Ed, Ottawa, ON,

EC, 2009. Council of the European Union, *Press Release, Brussels European Council, 22 December 2009*, 17764/2/09

EC, 2012. Communication from the Commission to the Council. The combination effects of chemicals. Chemical mixtures. COM(2012) 252 final, 10 p

Edwards, R., & Dixon, D. P. (2000). The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. *Herbicides and their mechanisms of action*, 8, 38-71.

EFSA Scientific Report(2004) 15, 1-52, Conclusion on the peer review of tribenuron

Endo, M., Shimizu, T., Fujimori, T., Yanagisawa, S., & Toki, S. (2013). Herbicide-resistant mutations in acetolactate synthase can reduce feedback inhibition and lead to accumulation of branched-chain amino acids.

Environment Canada. Method Development and Applications Section, Environmental Technology Centre, 2007. Biological Test Method: Test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte, *Lemna minor*. Report EPS 1/RM/37, 2nd Ed.: 112 pp.

EPA US Environmental Protection Agency (1995), 738-F-95-006A, R.E.D. FACTS - Terbutylazine

EPA US Environmental Protection Agency (1998), 738-F-96-006, R.E.D. FACTS - Metribuzin

Eullaffroy, P., Frankart, C., & Biagianti, S. (2007). Toxic effect assessment of pollutant mixtures in *Lemna minor* by using polyphasic fluorescence kinetics. *Toxicological and Environ Chemistry*, 89(4), 683-696.

Eullaffroy, P., Frankart, C., Aziz, A., Couderchet, M., & Blaise, C. (2009). Energy fluxes and driving forces for photosynthesis in *Lemna minor* exposed to herbicides. *Aquatic Botany*, 90(2), 172-178.

Fai, P. B., Grant, A., & Reid, B. (2007). Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(7), 1520-1531.

Fairchild, J. F., Ruessler, D. S., Haverland, P. S., & Carlson, A. R. (1997). Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32(4), 353-357.

FAO Specifications and evaluations for plant protection products -Tribenuron methyl (2011), www.fao.org, http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Tribenuronmethyl_2011.pdf

Farran, A., & Ruiz, S. (2004). Application of solid-phase extraction and micellar electrokinetic capillary chromatography to the study of hydrolytic and photolytic degradation of phenoxy acid and phenylurea herbicides. *Journal of Chromatography A*, 1024(1), 267-274.

Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., ... & Grimme, L. H. (2003). Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology*, 63(1), 43-63.

Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., ... & Grimme, L. H. (2001). Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology*, 56(1), 13-32.

Fedtke, C. (1982). *Biochemistry and physiology of herbicide action*. Springer-Verlag

Fenske, C., Daeschlein, G., Günther, B., Knauer, A., Rudolph, P., Schwahn, C., ... & Kramer, A. (2006). Comparison of different biological methods for the assessment of ecotoxicological risks. *International journal of hygiene and environmental health*, 209(3), 275-284.

Flores, F., Collier, C. J., Mercurio, P., & Negri, A. P. (2013). Phytotoxicity of four photosystem II herbicides to tropical seagrasses. *PloS one*, 8(9), e75798.

Frank, P., & Ottoboni, M. A. (2011). The dose makes the poison: a plain-language guide to toxicology. John Wiley & Sons.

Frankart, C., Eullaffroy, P., & Vernet, G. (2002). Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(3), 439-445.

Frankart, C., Eullaffroy, P., & Vernet, G. (2003). Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. *Environmental and Experimental Botany*, 49(2), 159-168.

Frear, D. S., & Swanson, H. R. (1970). Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: Partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry*, 9(10), 2123-2132.

Geoffroy, L., Frankart, C., & Eullaffroy, P. (2004). Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environmental Pollution*, 131(2), 233-241.

Geoffroy, L., Teisseire, H., Couderchet, M., & Vernet, G. (2002). Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72(3), 178-185.

Giardi M. T. & Pace E., "Photosystem II-Based Bio- sensors for the Detection of Photosynthetic Herbicides," In: Giardi M. & Piletska E. V., Eds., *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins; Biochips, Bio- sensors and Biodevices*, Landes Bioscience, Georgetown, 2006, pp. 147-154.

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.

Gisi, U. (1996). Synergistic interaction of fungicides in mixtures. *Phytopathology*, 86(11), 1273-1279.

Gorton, L. (Ed.). (2005). *Biosensors and modern biospecific analytical techniques* (Vol. 44). Elsevier. Chapter 8 Electrochemical antibody-based sensors, Judith Rishpon and Virginia Buchner p.p.266, 336

Govindjee, G. (2004). Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, Dordrecht, 1-42.

Greco, W. R., Bravo, G., & Parsons, J. C. (1995). The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological reviews*,47(2), 331-385.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

Hall, D. O., & Rao, K. K. (1999). *Photosynthesis*, 6th edition, New York: Cambridge University Press.

Hao, O. J. (1996). Bioindicators for water quality evaluation-- a review. *Journal of the Chinese Institute of Environmental Engineering*, 6(1), 1-19.

Hess, F.D. (2000). Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Science*, 48(2), 160-170.

Hill, R. (1937). Oxygen evolved by isolated chloroplasts. *Nature*, 139(881), i939.

Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton Jr, G. A., & Cairns Jr, J. (Eds.). (2003). Handbook of ecotoxicology. CRC press

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>

Hulsen, K., Minne, V., Lootens, P., Vandecasteele, P., & Höfte, M. (2002). A chlorophyll a fluorescence-based *Lemna minor* bioassay to monitor microbial degradation of nanomolar to micromolar concentrations of linuron. *Environmental microbiology*, 4(6), 327-337.

Iriel, A., Novo, J. M., Cordon, G. B., & Lagorio, M. G. (2014). Atrazine and Methyl Viologen Effects on Chlorophyll-a Fluorescence Revisited—Implications in Photosystems Emission and Ecotoxicity Assessment. *Photochemistry and photobiology*,90(1), 107-112.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).

Jablonkai, I. (2011). Molecular Mechanism of Action of Herbicides. *Mohammed Naguib Abd El-Ghany Hasaneen*, 1.

Jansen, M. A. K., Mattoo, A. K., Malkin, S., & Edelman, M. (1993). Direct demonstration of binding-site competition between photosystem II inhibitors at the Q B niche of the D1 protein. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 46(1), 78-83.

Jonker, M. J., Gerhardt, A., Backhaus, T., & van Gestel, C. A. (2011). Test design, mixture characterization, and data evaluation (pp. 121-56). in van Gestel, C. A., Jonker, M., Kammenga, J. E., Laskowski, R., & Svendsen, C. (Eds.). Mixture toxicity: linking approaches from ecological and human toxicology. CRC Press.

Jonker, M. J., Svendsen, C., Bedaux, J. J., Bongers, M., & Kammenga, J. E. (2005). Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose

ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental toxicology and chemistry*, 24(10), 2701-2713.

Juneau, P., Qiu, B., & Deblois, C. P. (2007). Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review. *Toxicological and Environ Chemistry*, 89(4), 609-625.

Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., & Kim, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*

Katoch, R. (2011). *Analytical techniques in biochemistry and molecular biology*. Springer Science & Business Media.

Kienzler A., Berggren E., Bessems J., Bopp S., van der Linden S., Worth A., 2014 *Assessment of Mixtures: Review of Regulatory Requirements and Guidance*. Publications Office of the European Union, 2014.

Kirk, J. T., & Tilney-Bassett, R. A. (1978). *The plastids*, 2nd edition, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Koblížek, M., Malý, J., Masojídek, J., Komenda, J., Kučera, T., Giardi, M. T., ... & Pilloton, R. (2002). A biosensor for the detection of triazine and phenylurea herbicides designed using Photosystem II coupled to a screen-printed electrode. *Biotechnology and bioengineering*, 78(1), 110-116.

Kortenkamp A, Backhaus T, Faust M. 2009. State of the art report on mixture toxicity. Final report, European Commission. Study Contract Number 070307/2007/485103/ETU/D.1.

Kumar, K. S., & Han, T. (2011). Toxicity of single and combined herbicides on PSII maximum efficiency of an aquatic higher plant, *Lemna sp.* *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3(2), 97-105.

Kumar, K. S., Dahms, H. U., Lee, J. S., Kim, H. C., Lee, W. C., & Shin, K. H. (2014). Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicology and environmental safety*, 104, 51-71.

Kurepin, L. V., Dahal, K. P., Savitch, L. V., Singh, J., Bode, R., Ivanov, A. G., ... & Hüner, N. (2013). Role of CBFs as integrators of chloroplast redox, phytochrome and plant hormone signaling during cold acclimation. *International journal of molecular sciences*, 14(6), 12729-12763.

Landolt, E. (1998). *Lemnaceae In Kubitzki K. [ed.]*, The families and genera of vascular plants, vol. 4, 264–269. Springer–Verlag, Berlin, Germany

Landolt, E. 1986. *The Family of Lemnaceae: A Monographic Study* (Vol. 1). Veroff. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rubel 71.

LeBaron, H. M., McFarland, J. E., & Burnside, O. (2008). *The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture*. Elsevier Science Ltd.

- Legrand, H., Herlory, O., Guarini, J. M., Blanchard, G., & Richard, P. (2006). Inhibition of microphytobenthic photosynthesis by the herbicides atrazine and diuron. *Cahiers de biologie marine*, 47(1), 39-45.
- Les, D. H., Crawford, D. J., Landolt, E., Gabel, J. D., & Kimball, R. T. (2002). Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family. *Systematic Botany*, 27(2), 221-240.
- Lewis, M. A. (1995). Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environmental Pollution*, 87(3), 319-336.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methodsenzymol*, 148, 350-382.
- Lichtenthaler, H. K. (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of plant physiology*, 148(1), 4-14.
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Über die Kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. Naunyn Schmiedebergs Archiv der experimentellen pathologischen Pharmakologie 114, 313-326.
- Loranger, C., & Carpentier, R. (1994). A fast bioassay for phytotoxicity measurements using immobilized photosynthetic membranes. *Biotechnology and bioengineering*, 44(2), 178-183.
- Luna, C. M., González, C. A., & Trippi, V. S. (1994). Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant and Cell Physiology*, 35(1), 11-15.
- Lüönd, A. (1980). Effects of nitrogen and phosphorus upon the growth of some Lemnaceae. *Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae)*, 1, 118-141.
- Lyubenova L. S. (2008) Untersuchungen der Entgiftungskapazität verschiedener Pflanzenarten im Hinblick auf ihre Verwendung für die Phytoremediation unter Berücksichtigung von Schwermetallen. (Dissertation), Technische Universität München, Weihenstephan
- Lyubenova, L., & Schröder, P. (2011). Plants for waste water treatment—effects of heavy metals on the detoxification system of *Typha latifolia*. *Bioresource technology*, 102(2), 996-1004.
- Magnusson, M., Heimann, K., Quayle, P., & Negri, A. P. (2010). Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11), 1978-1987.
- Maly, J., Masojidek, J., Masci, A., Ilie, M., Cianci, E., Foglietti, V., ... & Pilloton, R. (2005). Direct mediatorless electron transport between the monolayer of photosystem II and poly (mercapto-p-benzoquinone) modified gold electrode—new design of biosensor for herbicide detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(6), 923-932.

- Markert, B. A., Breure, A. M., & Zechmeister, H. G. (Eds.). (2003). *Bioindicators and biomonitors* (Vol. 6). Elsevier Science Ltd, Amsterdam
- Marrs, K. A. (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 127-158.
- Marwood, C. A., Solomon, K. R., & Greenberg, B. M. (2001). Chlorophyll fluorescence as a bioindicator of effects on growth in aquatic macrophytes from mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(4), 890-898.
- Mason, H. L. (1957). *A flora of the marshes of California*. Univ of California Press.
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345), 659-668.
- McNaught, A. D., & McNaught, A. D. (1997). *Compendium of chemical terminology* (Vol. 1669). Oxford: Blackwell Science, the "Gold Book
- Mimmo, T., Bartucca, M. L., Del Buono, D., & Cesco, S. (2015). Italian ryegrass for the phytoremediation of solutions polluted with terbuthylazine. *Chemosphere*, 119, 31-36.
- Mitsou, K., Koulianou, A., Lambropoulou, D., Pappas, P., Albanis, T., & Lekka, M. (2006). Growth rate effects, responses of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanil in the aquatic plant *Lemna minor*. *Chemosphere*, 62(2), 275-284.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mkandawire, M., Teixeira da Silva, J. A., & Dudel, E. G. (2014). The *Lemna* bioassay: contemporary issues as the most standardized plant bioassay for aquatic ecotoxicology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44(2), 154-197.
- Mofeed, J., & Mosleh, Y. Y. (2013). Toxic responses and antioxidative enzymes activity of *Scenedesmus obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine, alone and in mixture. *Ecotoxicology and environmental safety*, 95, 234-240.
- Mohan, B. S., & Hosetti, B. B. (1997). Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environmental Pollution*, 98(2), 233-238.
- Motulsky, H., & Christopoulos, A. (2004). *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting*. Oxford University Press.
- Mouzaki-Paxinou A.-C., Foundoulakis M., Arapis G., 2013, The use of the biomarkers chlorophylls and carotenoids, for the interpretation of the effects in *Lemna minor* after exposure of two herbicides with different mode of action
- Müller, P., Li, X. P., & Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant physiology*, 125(4), 1558-1566.

Naylor, R. E. (Ed.). (2002). *Weed management handbook.*, 9th edition, British Crop Protection Enterprises.

Nelson, N., & Yocum, C. F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 521-565.

Nenova, V., & Kocheva, K. (2014). Interaction of chlorsulfuron treatment and iron deficiency or excess in young pea plants. *Genetics and Plant Physiology*, 3-4.

Neter N, Kutner HK, Nachtsheim CJ, Wasserman W. 1996. Applied Linear Statistical Models. McGraw-Hill/Irwin, Boston, MA, USA.

Newman, M. C. (2015). *Fundamentals of ecotoxicology.* 4th edition, CRC press.

Nordberg, M., Templeton, D. M., Andersen, O., & Duffus, J. H. (2009). Glossary of terms used in Ecotoxicology (IUPAC Recommendations 2009). *Pure and Applied Chemistry*, 81(5), 829-970.

OECD Guideline for Testing of Chemicals, (2006), *Lemna* sp. Growth inhibition test, No 221, 1-22.

Oettmeier, W., Masson, K., Fedtke, C., Konze, J., & Schmidt, R. R. (1982). Effect of different photosystem II inhibitors on chloroplasts isolated from species either susceptible or resistant toward s-triazine herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18(3), 357-367.

Olette, R., Couderchet, M., Biagianti, S., & Eullaffroy, P. (2008). Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. *Chemosphere*, 70(8), 1414-1421.

Oztetik, E. (2008). Effects of herbicide (tribenuron methyl) treatment on GSH content and GST activities in selected wheat and barley varieties. *Journal of Biotechnology*, 136, S362.

Park, R. B., Kelly, J., Drury, S., & Sauer, K. (1966). The Hill reaction of chloroplasts isolated from glutaraldehyde-fixed spinach leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(5), 1056.

Pérez, J., Domingues, I., Soares, A. M., & Loureiro, S. (2011). Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures. *Ecotoxicology*, 20(6), 1167-1175.

Philbrick PhD, T., & Les PhD, D. E. (1996). Evolution of Aquatic Angiosperm Reproductive Systems.

Råberg, S., Nyström, M., Erös, M., & Plantman, P. (2003). Impact of the herbicides 2, 4-D and diuron on the metabolism of the coral *Porites cylindrica*. *Marine environmental research*, 56(4), 503-514.

Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2013) *Biology of plants.* 8th edition, New York, NY: W.H. Freeman and Company Publishers.

Relyea, R. A. (2009). A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*, 159(2), 363-376.

Relyea, R., & Hoverman, J. (2006). Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters*, 9(10), 1157-1171.

Rouillon R., Piletsky S. A., Piletska E. V., Euzet P. & Carpentier R., "Comparison of the Immobilization Techniques for Photosystem II," In: Giardi M. T. & Piletska E. V., Eds., *Biotechnological Applications of Photo-synthesis Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices*, Landes Bioscience, Georgetown, (2006), pp. 73-83

Rouillon, R., Tocabens, M., & Marty, J. L. (1994). Stabilization of chloroplasts by entrapment in polyvinylalcohol bearing styrylpyridinium groups. *Analytical letters*, 27(12), 2239-2248.

Salin, M. L. (1988). Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum*, 72(3), 681-689.

Salisbury, F. B., Ross, C. W. (1992). *Plant Physiology*, 4th edition, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California

Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7), 995-1014.

SCHER, SCENIHR, SCCS (2012), *Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures*

Schreiber, U. (2004). Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In *Chlorophyll a Fluorescence* (pp. 279-319). Springer Netherlands.

Schröder, P. (2001). The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. In *Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment* (pp. 155-183). Springer Netherlands.

Schröder, P. (2007). Exploiting plant metabolism for the phytoremediation of organic xenobiotics. In *Phytoremediation* (pp. 251-263). Humana Press.

Schuster, C. L., Al-Khatib, K., & Dille, J. A. (2009). Mechanism of antagonism of mesotrione on sulfonylurea herbicides. *Weed Science*, 55:429-434.

Senge, M. O., Ryan, A. A., Letchford, K. A., MacGowan, S. A., & Mielke, T. (2014). Chlorophylls, Symmetry, Chirality, and Photosynthesis. *Symmetry*, 6(3), 781-843.

Shaner, D.L., 1991. Physiological effects of the imidazolinone herbicides. In: Shaner, D.L., O'Connor, S.L. (Eds.), *The Imidazolinone Herbicides*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp. 129–137.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012.

Sies H., Packer L. (Eds). Protein Sensors of Reactive Oxygen Species, Part A: Selenoproteins and Thioredoxin: 347, *Methods in Enzymology*, Academic press Inc., San Diego, CA, 2002

Simoneaux, B. J., & Gould, T. J. (2008). Plant uptake and metabolism of triazine herbicides. *The triazine herbicides*, 50, 73-100.

Sobolev, V., & Edelman, M. (1995). Modeling the quinine-B binding site of the photosystem-II reaction center using notions of complementarity and contact-surface between atoms. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 21(3), 214-225.

Soll, J., & Schleiff, E. (2004). Protein import into chloroplasts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(3), 198-208.

Song, N. H., Le Yin, X., Chen, G. F., & Yang, H. (2007). Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils. *Chemosphere*, 68(9), 1779-1787.

Sørensen, H., Cedergreen, N., Skovgaard, I. M., & Streibig, J. C. (2007). An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. *Environmental and Ecological Statistics*, 14(4), 383-397.

Streibig, J. C. (1988). Herbicide bioassay. *Weed Research*, 28(6), 479-484.

Syberg, K., Jensen, T. S., Cedergreen, N., & Rank, J. (2009). On the use of mixture toxicity assessment in REACH and the water framework directive: a review. *Human and Ecological Risk Assessment*, 15(6), 1257-1272.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant physiology*, 4th edition, Sinauer Associates, Inc.

Tesseire, H., & Vernet, G. (2000). Is the “Diuron Effect” Due to a Herbicide Strengthening of Antioxidative Defenses of *Lemna minor*?. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66(3), 153-160.

Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (1999). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, 71(12), 2333-2348.

Touloupakis, E., Boutopoulos, C., Buonasera, K., Zergioti, I., & Giardi, M. T. (2012). A photosynthetic biosensor with enhanced electron transfer generation realized by laser printing technology. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(10), 3237-3244

Touloupakis, E., Giannoudi, L., Piletsky, S. A., Guzzella, L., Pozzoni, F., & Giardi, M. T. (2005). A multi-biosensor based on immobilized Photosystem II on screen-printed electrodes for the detection of herbicides in river water. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(10), 1984-1992.

Trebst, A. (2008). The mode of action of triazine herbicides in plants. *The triazine herbicide, 50 years: Amsterdam, Elsevier*, 101-110.

Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles, and perspectives. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 1, 151–173.

U.S. Environmental Protection Agency (2012). Ecological effects test guidelines OCSPP 850.4400, Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp, EPA 712-C-008, Washington, DC.

Urdike, S. J., & Hicks, G. P. (1967). The enzyme electrode. *Nature*, 214, 986-988.

Valavanidis, A., & Vlachogianni, T. (2011). Agricultural pesticides: ecotoxicological studies and environmental risk assessment. *Science advances on Environment, Toxicology and Ecotoxicology issues*. Link: <http://chem-tox-ecotox.org/wp>.

Van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M., & Hall, J. C. (2009). Pesticide metabolism in plants and microorganisms.

van Gestel, C. A., Jonker, M., Kammenga, J. E., Laskowski, R., & Svendsen, C. (Eds.). (2010). *Mixture toxicity: linking approaches from ecological and human toxicology*. CRC press.

Varsamis, D. G., Touloupakis, E., Morlacchi, P., Ghanotakis, D. F., Giardi, M. T., & Cullen, D. C. (2008). Development of a photosystem II-based optical microfluidic sensor for herbicide detection. *Talanta*, 77(1), 42-47.

Verma, S., & Dubey, R. S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164(4), 645-655

Vervliet-Scheebaum, M., Knauer, K., Maund, S. J., & Grade, R. (2006). Evaluating the necessity of additional aquatic plant testing by comparing the sensitivities of different species. In *Macrophytes in Aquatic Ecosystems: From Biology to Management*(pp. 231-236). Springer Netherlands.

Wahedally, S. F., Mamboya, F. A., Lyimo, T. J., Bhikajee, M., & Björk, M. (2012). Short-term effects of three herbicides on the maximum quantum yield and electron transport rate of tropical seagrass *Thalassodendron ciliatum*. *TaJONAS: Tanzania Journal of Natural and Applied Sciences*, 3(1), 458-466.

Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2001). *Principles of ecotoxicology*. New York: Taylor & Francis Inc.

Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2012). *Principles of ecotoxicology*. CRC Press.

Walker, D. A. (2002). ‘And whose bright presence’—an appreciation of Robert Hill and his reaction. *Photosynthesis research*, 73(1-3), 51-54.

Williams, P. L., James, R. C., & Roberts, S. M. (2000). *Principles of toxicology: environmental and industrial applications*. John Wiley & Sons.

Willingham, S. D., Senseman, S. A., McCauley, G. N., & Chandler, J. M. (2008). Effect of temperature and propanil on penoxsulam efficacy, absorption, and translocation in alligatorweed (*Alternanthera philoxeroides*). *Weed Science*, 56:780-784.

Wise, D. L. (1991). *Bioinstrumentation and biosensors*. CRC Press, pp..233

Woods, M., Kumar, A., & Correll, R. (2002). Acute toxicity of mixtures of chlorpyrifos, profenofos, and endosulfan to *Ceriodaphnia dubia*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 68(6), 801-808.

Yin, X. L., Jiang, L., Song, N. H., & Yang, H. (2008). Toxic reactivity of wheat (*Triticum aestivum*) plants to herbicide isoproturon. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12), 4825-4831.

Zabalza, A., Gaston, S., Sandalio, L. M., del Río, L. A., & Royuela, M. (2007). Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. *Environmental and experimental botany*, 59(2), 150-159.

Zhang, J., & Kirkham, M. B. (1996). Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*, 132(3), 361-373.

Zhou, Q., Liu, W., Zhang, Y., & Liu, K. K. (2007). Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide biochemistry and physiology*, 89(2), 89-96.

Αϊβαλάκης, Γ., Καραμπουρνιώτης, Γ., Φασσέας, Κ. 2005. *Γενική Βοτανική: Η Μορφολογία, η Ανατομία και η Φυσιολογία των Ανώτερων Φυτών*. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.

Βαλαβανίδης 2007, Οικοτοξικολογία και περιβαλλοντική τοξικολογία-Ερευνητική μεθοδολογία για την εκτίμηση οικολογικού κινδύνου από επικίνδυνες χημικές ουσίες. Έκδοση τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ελευθεροχωρινός, Η.(2008), *Ζιζανιολογία*, 3^η έκδοση, Αθήνα: Εκδόσεις Αγροτύπος Α.Ε.

Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α., (2007), *Γεωργική Φαρμακολογία*, Αθήνα

Καραμπουρνιώτης, Γ., Λιακόπουλος Γ., Νικολόπουλος Δ. 2012. *Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών*. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.

Σαϊτάνης Κ. και Καρανδεινός Μ. (2010), *Πληθυσμιακή Οικολογία-Δυναμική Πληθυσμών*, Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο

Φλαμπούρη Ε., (2015), Δ.Δ. Μελέτη της επίδρασης ουσιών με μυκητοκτόνο-κυτταροτοξική δράση σε κυτταρικούς πληθυσμούς με εξειδικευμένα χαρακτηριστικά μέσω μετά-γραφικής τροποποίησης αυτών για χρήση σε βιοαισθητήρες.

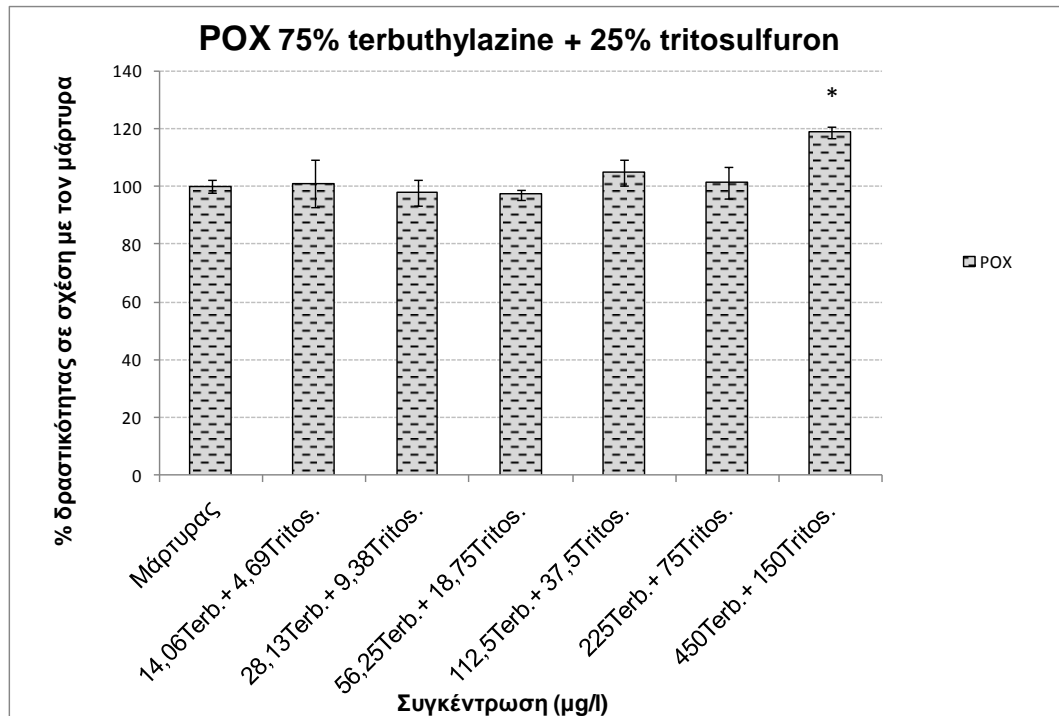
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 0.1: Σύνοψη της ανάλυσης των επιπτώσεων του μίγματος terbuthylazine και metribuzin στην μέγιστη φωτοχημική απόδοση $\Phi_{PSII_0}-F_v/F_m$ (εκφρασμένο σε % σε σχέση με τον μάρτυρα) στη *Lemna minor*. Max, είναι η μέγιστη απόκριση, β_{Terb} και β_{Metr} οι κλίσεις των καμπυλών της μεμονωμένης απόκρισης, EC50 (σε $\mu\text{g/l}$) η συγκέντρωση που προκαλεί 50% μείωση της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης, α , b_{Terb} και b_{DL} οι παράμετροι των τροποποιημένων μοντέλων (Πίνακας 1.1), SS το άθροισμα τετραγώνων των αποκλίσεων, το οποίο και ελαχιστοποιείται, β.ε. οι βαθμοί ελευθερίας, $p(\chi^2)$ το αποτέλεσμα της δοκιμασίας λόγου πιθανοφάνειας. CA η προσθετική δράση, IA η ανεξάρτητη δράση, S/A ο συνεργισμός/ανταγωνισμός, DR η απόκλιση εξαρτώμενη από την αναλογία δόσεων, DL απόκλιση εξαρτώμενη από το επίπεδο των δόσεων. Με έντονα γράμματα παρουσιάζεται το καλύτερο μοντέλο.

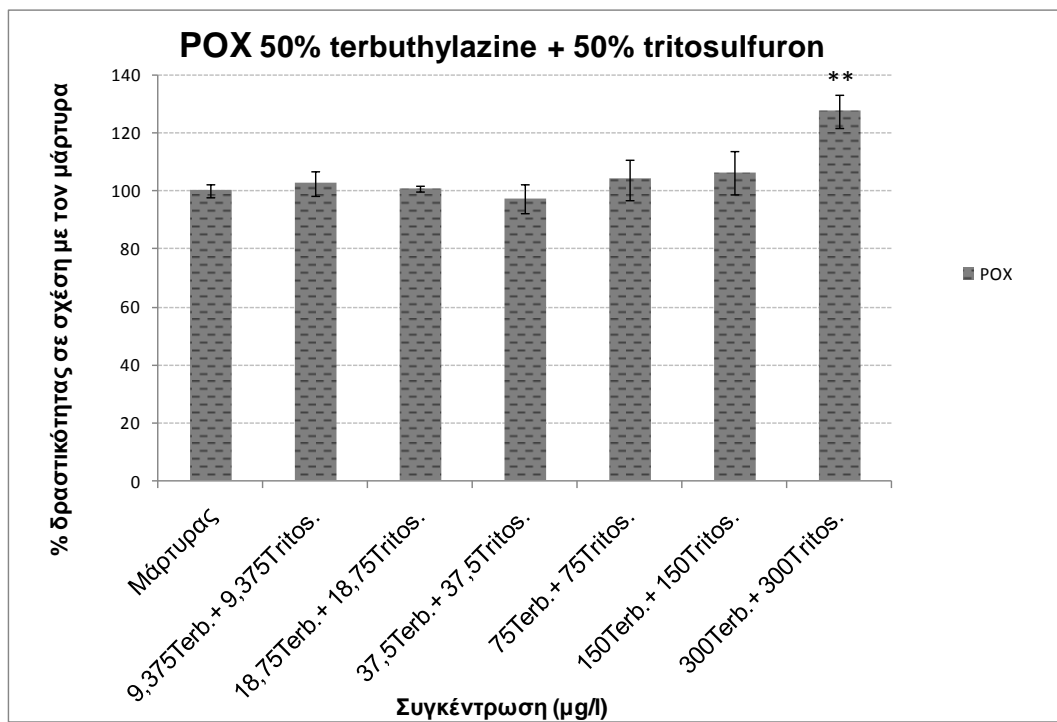
Terbuthylazine- Metribuzin	CA				IA			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	102,93	102,89	102,89	103,51	101,87	102,81	102,84	102,87
$\beta_{Terbuthylazine}$	1,16	1,19	1,19	1,13	1,28	1,15	1,14	1,18
$\beta_{Metribuzin}$	1,13	1,11	1,11	1,07	1,14	1,06	1,07	1,08
EC ₅₀ Terbuthylazine	783,86	720,42	725,02	738,58	757,92	740,97	751,06	727,43
EC ₅₀ Metribuzin	140,13	133,03	131,45	134,84	142,96	135,65	133,89	133,93
α	-	0,52	0,81	1,00	-	0,52	0,72	0,27
$b_{Terbuthylazine}$	-	-	-0,61	-	-	-	-0,41	-
b_{DL}	-	-	-	0,64	-	-	-	-2,03
R ²	0,968	0,970	0,970	0,970	0,968	0,971	0,971	0,971
SS	1117,88	1035,22	1029,27	1017,89	1113,25	1012,21	1006,85	1006,04
β.ε.	-	1	1	1	-	1	1	1
$p(\chi^2)$	-	0,0066	0,4573	0,231	-	0,0025	0,4753	0,4435

Πίνακας 0.2: Σύνοψη της ανάλυσης των επιπτώσεων του μίγματος terbutylazine και metribuzin στην λειτουργική φωτοχημική απόδοση ΦPSII-Yield (εκφρασμένο σε % σε σχέση με τον μάρτυρα) στην *Lemna minor*. Max, είναι η μέγιστη απόκριση, β_{Terb} και β_{Metr} οι κλίσεις των καμπυλών της μεμονωμένης απόκρισης, EC50 (σε $\mu\text{g/l}$) η συγκέντρωση που προκαλεί 50% μείωση της λειτουργικής φωτοχημικής απόδοσης, α , b_{Terb} και b_{DL} οι παράμετροι των τροποποιημένων μοντέλων (Πίνακας 1.1), SS το άθροισμα τετραγώνων των αποκλίσεων, το οποίο και ελαχιστοποιείται, β.ε. οι βαθμοί ελευθερίας, $p(\chi^2)$ το αποτέλεσμα της δοκιμασίας λόγου πιθανοφάνειας. CA η προσθετική δράση, IA η ανεξάρτητη δράση, S/A ο συνεργισμός/ανταγωνισμός, DR η απόκλιση εξαρτώμενη από την αναλογία δόσεων, DL απόκλιση εξαρτώμενη από το επίπεδο των δόσεων. Με έντονα γράμματα παρουσιάζεται το καλύτερο μοντέλο.

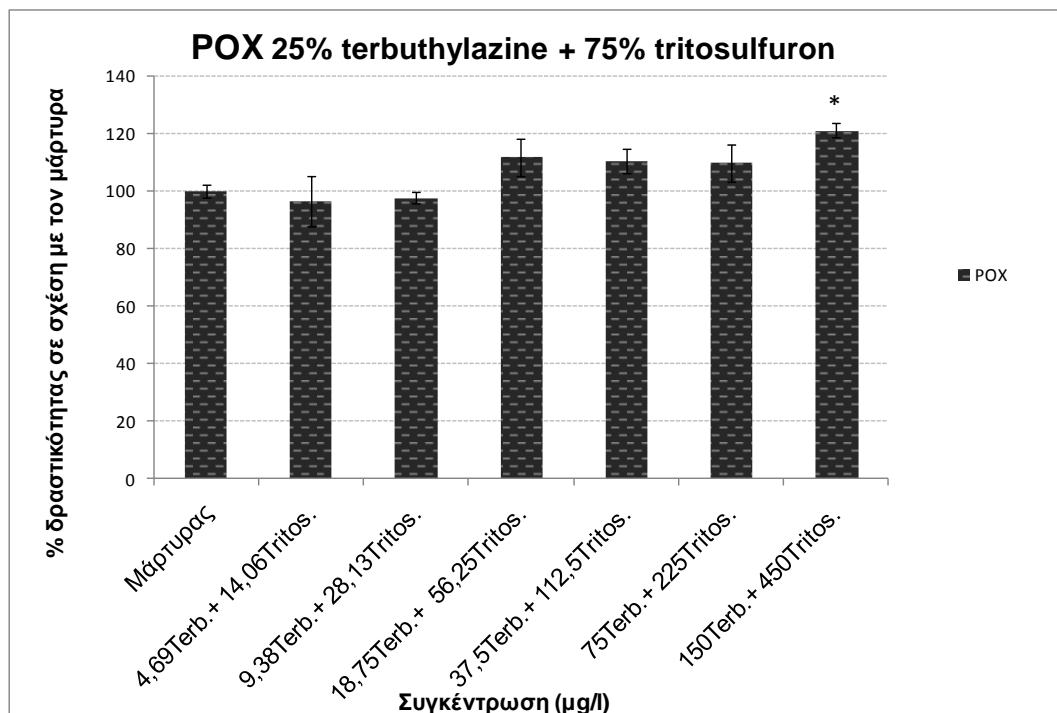
Terbutylazine- Metribuzin	CA				IA			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	100,46	100,46	100,46	100,66	99,36	100,77	100,76	101,16
$\beta_{\text{Terbutylazine}}$	1,08	1,08	1,08	1,05	1,00	0,95	0,95	1,01
$\beta_{\text{Metribuzin}}$	1,38	1,38	1,38	1,35	1,32	1,25	1,25	1,30
EC ₅₀ Terbutylazine	42,40	42,38	42,42	41,98	45,08	40,12	40,26	40,64
EC ₅₀ Metribuzin	30,08	30,07	30,06	29,98	32,88	30,24	30,21	29,82
α	-	0,004	0,02	0,17	-	0,56	0,61	-0,31
$b_{\text{Terbutylazine}}$	-	-	-0,04	-	-	-	-0,09	-
b_{DL}	-	-	-	0,61	-	-	-	4,45
R ²	0,993	0,993	0,993	0,994	0,990	0,991	0,991	0,992
SS	581,15	581,14	581,12	566,70	925,09	770,41	770,13	688,84
β.ε.	-	1	2	2	-	1	1	1
$p(\chi^2)$	-	0,9762	0,9973	0,2987	-	2,78*10 ⁻⁵	0,8513	0,0010



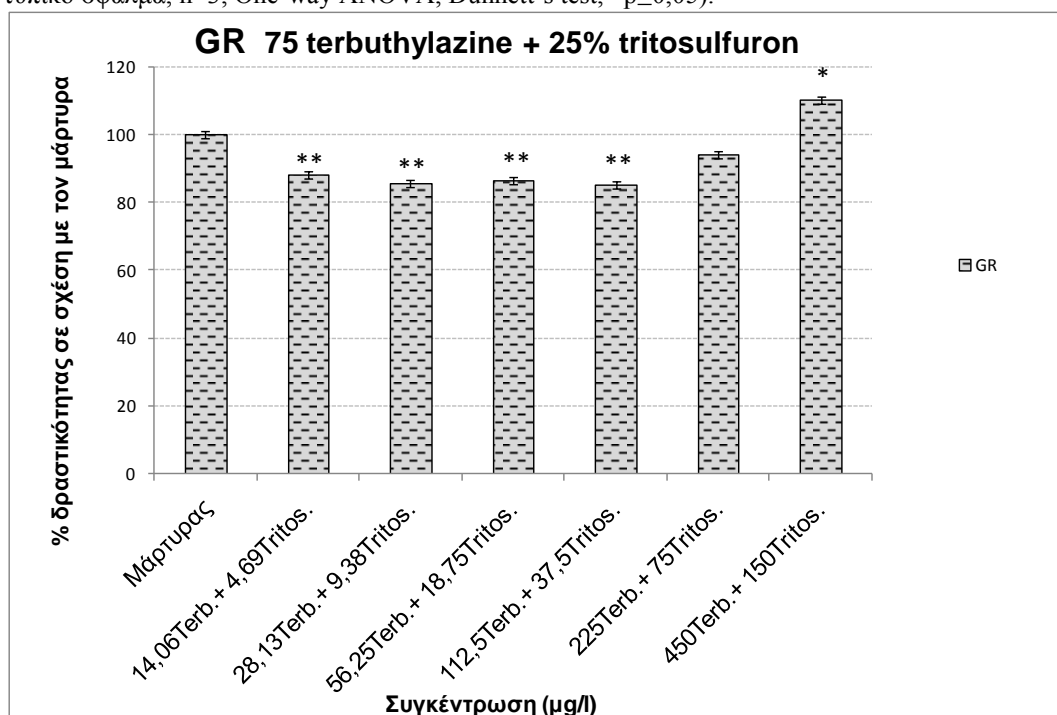
Γράφημα 5.1: Η ειδική δραστηκότητα της POX (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 75% terbuthylazine και 25% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p≤0,05).



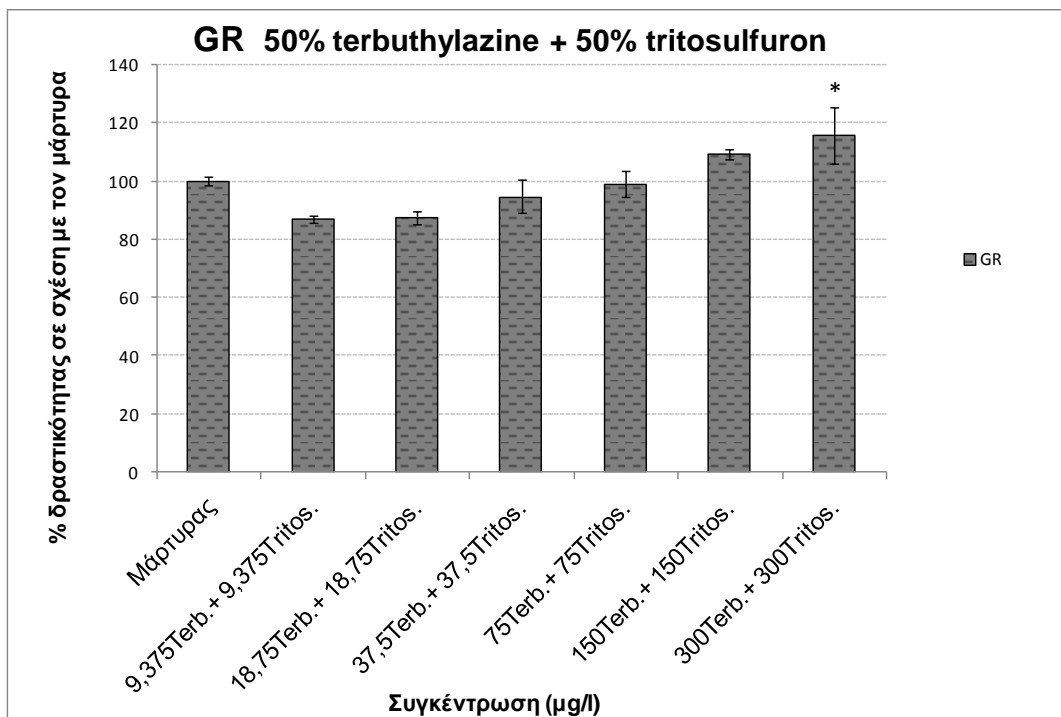
Γράφημα 5.2: Η ειδική δραστηκότητα της POX (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 50% terbuthylazine και 50% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, **p≤0,01).



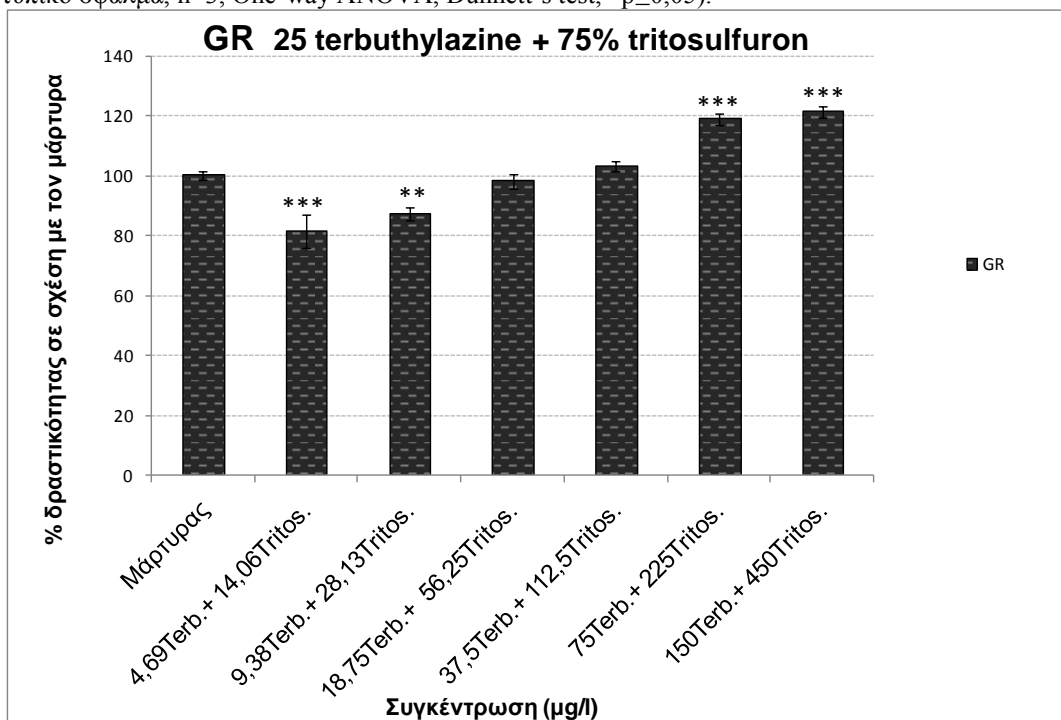
Γράφημα 5.3: Η ειδική δραστηκότητα της POX (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 25% terbuthylazine και 75% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p≤0,05).



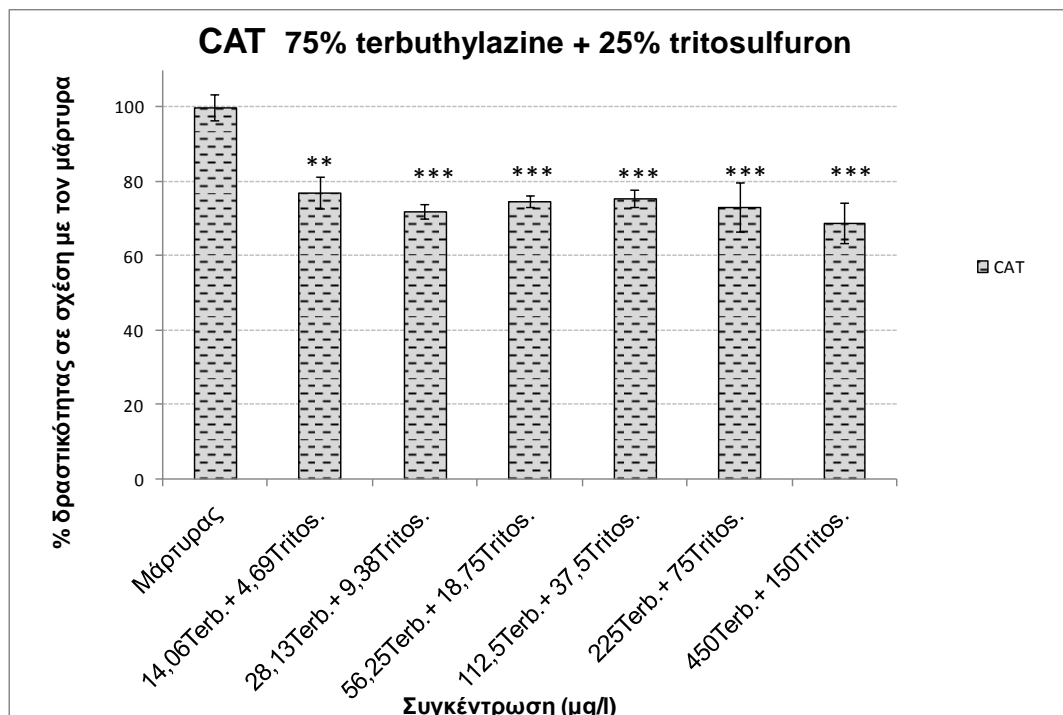
Γράφημα 5.4: Η ειδική δραστηκότητα της GR (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 75% terbuthylazine και 25% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p≤0,05, **p≤0,01).



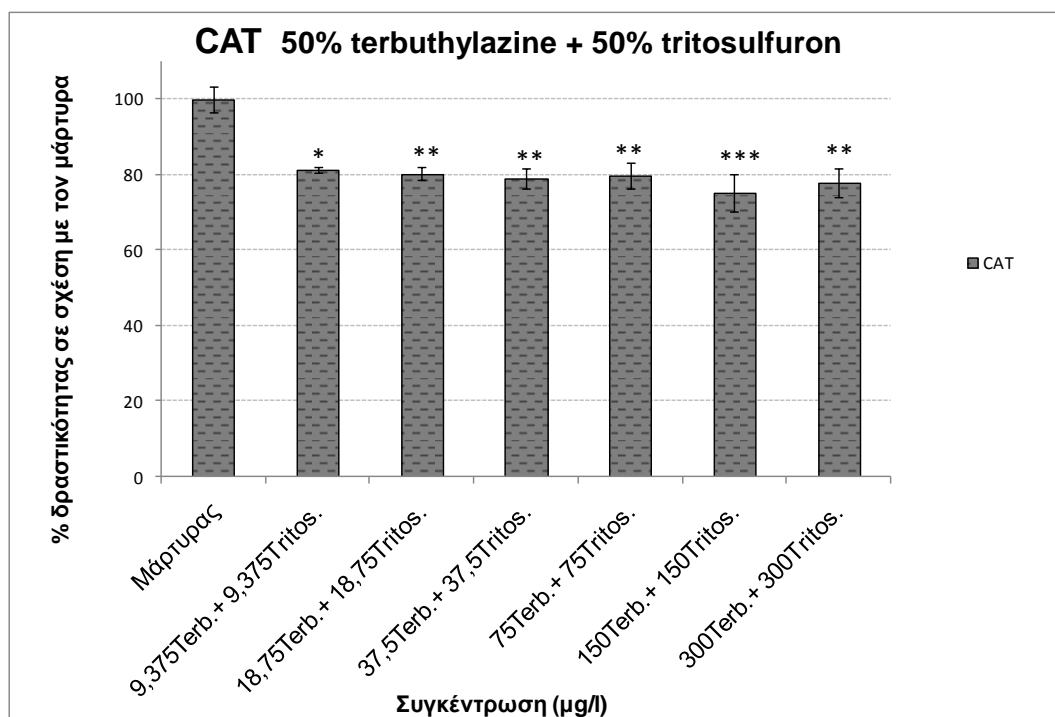
Γράφημα 5.5: Η ειδική δραστηκότητα της GR (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 50% terbuthylazine και 50% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett’s test, *p<0,05).



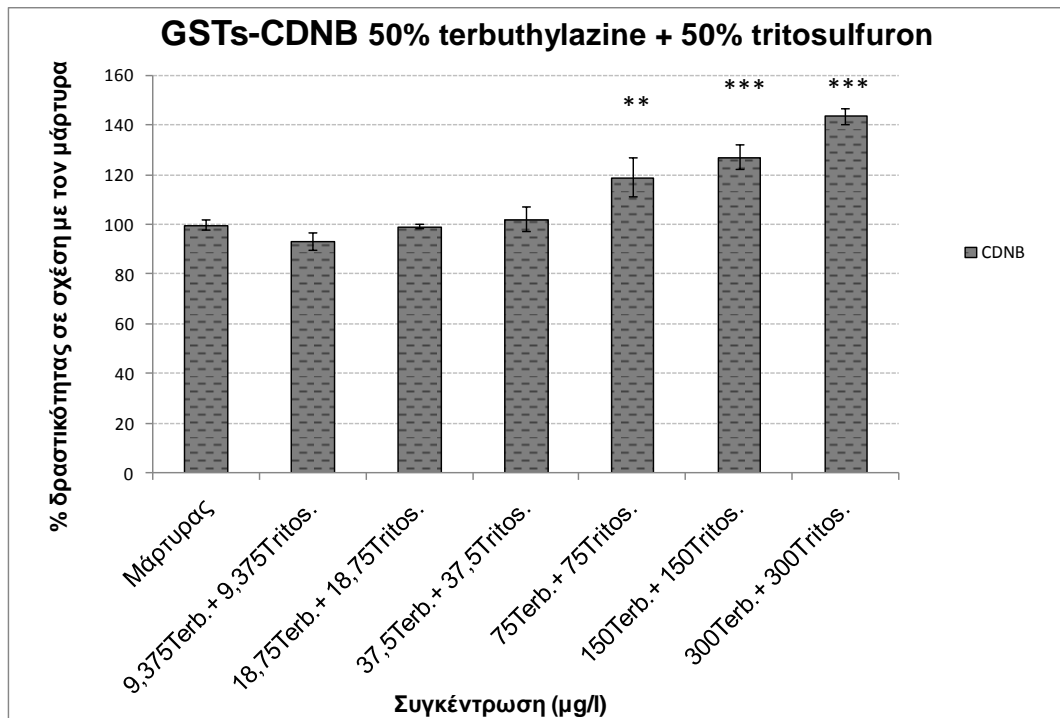
Γράφημα 5.6: Η ειδική δραστηκότητα της GR (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 25% terbuthylazine και 75% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett’s test, **p<0,01, ***p<0,001).



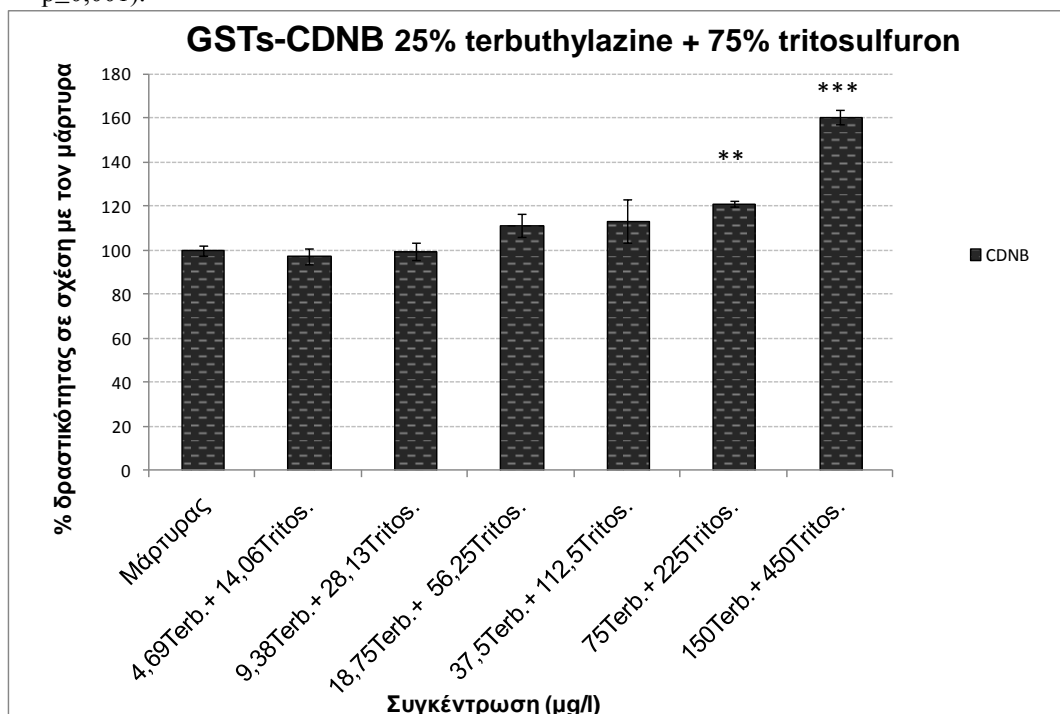
Γράφημα 5.7: Η ειδική δραστηκότητα της CAT (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 75% terbuthylazine και 25% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, **p<0,01, ***p<0,001).



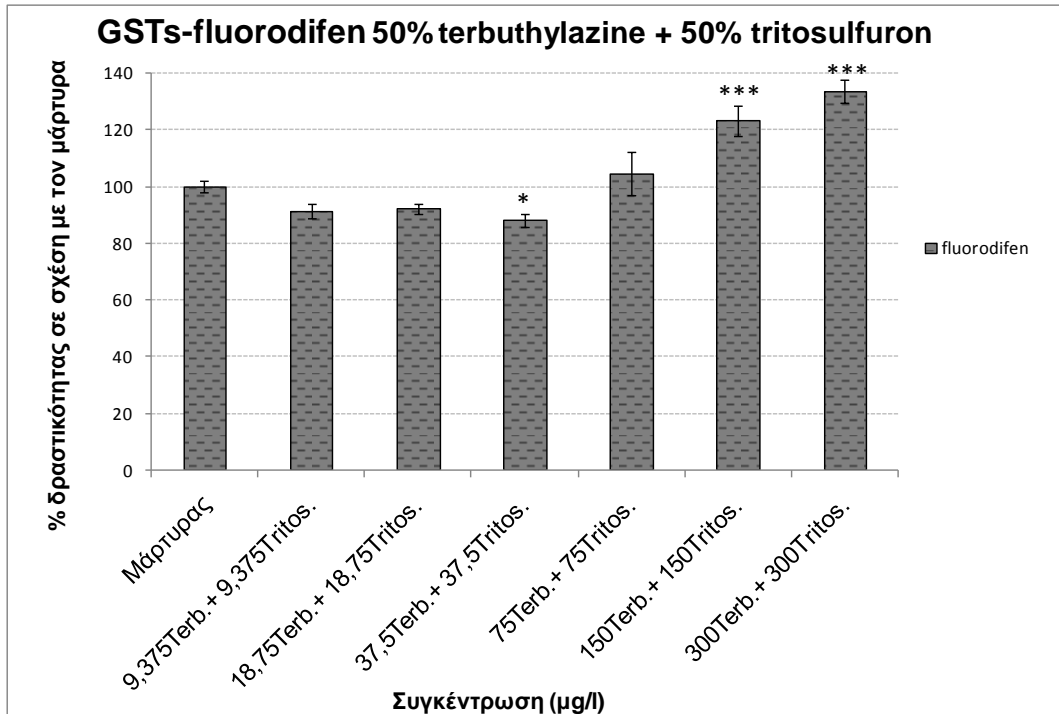
Γράφημα 5.8: Η ειδική δραστηκότητα της CAT (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 50% terbuthylazine και 50% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).



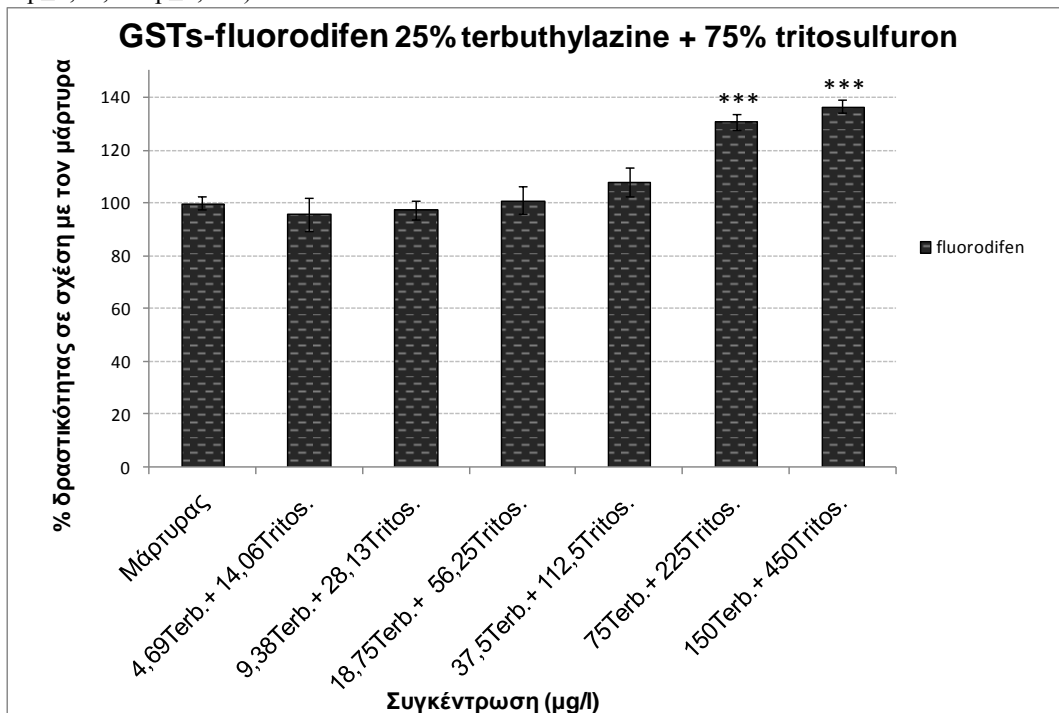
Γράφημα 5.9: Η ειδική δραστηριότητα των GSTs με υπόστρωμα το CDNB (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 50% terbuthylazine και 50% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, **p≤0,01, ***p≤0,001).



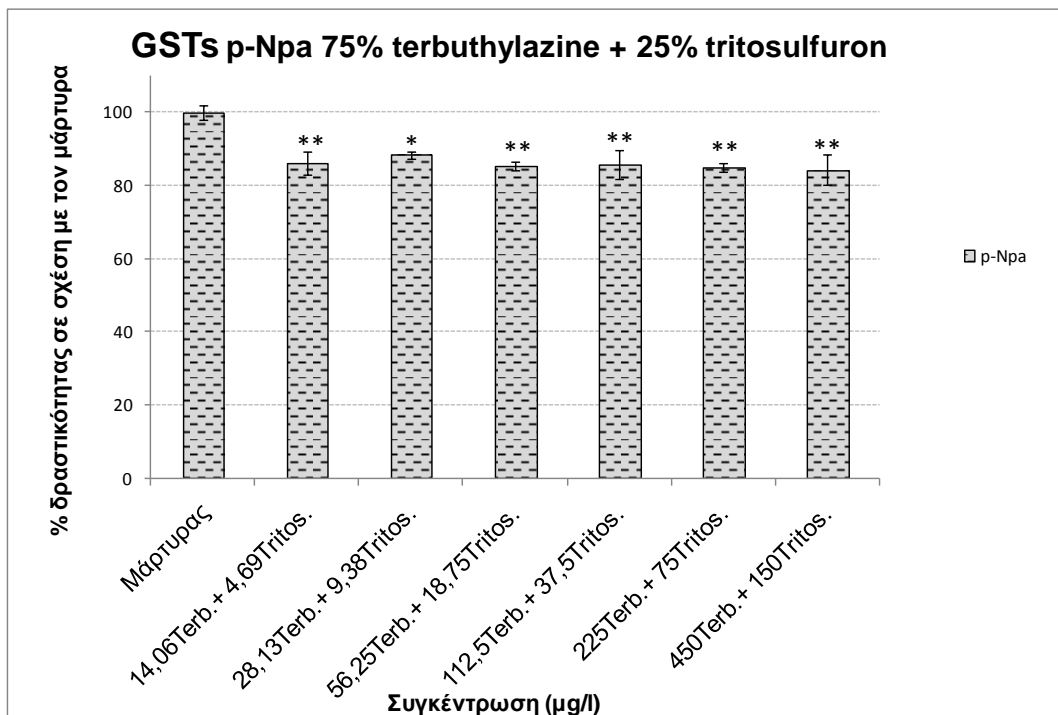
Γράφημα 5.10: Η ειδική δραστηριότητα των GSTs με υπόστρωμα το CDNB (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 25% terbuthylazine και 75% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, **p≤0,01, ***p≤0,001).



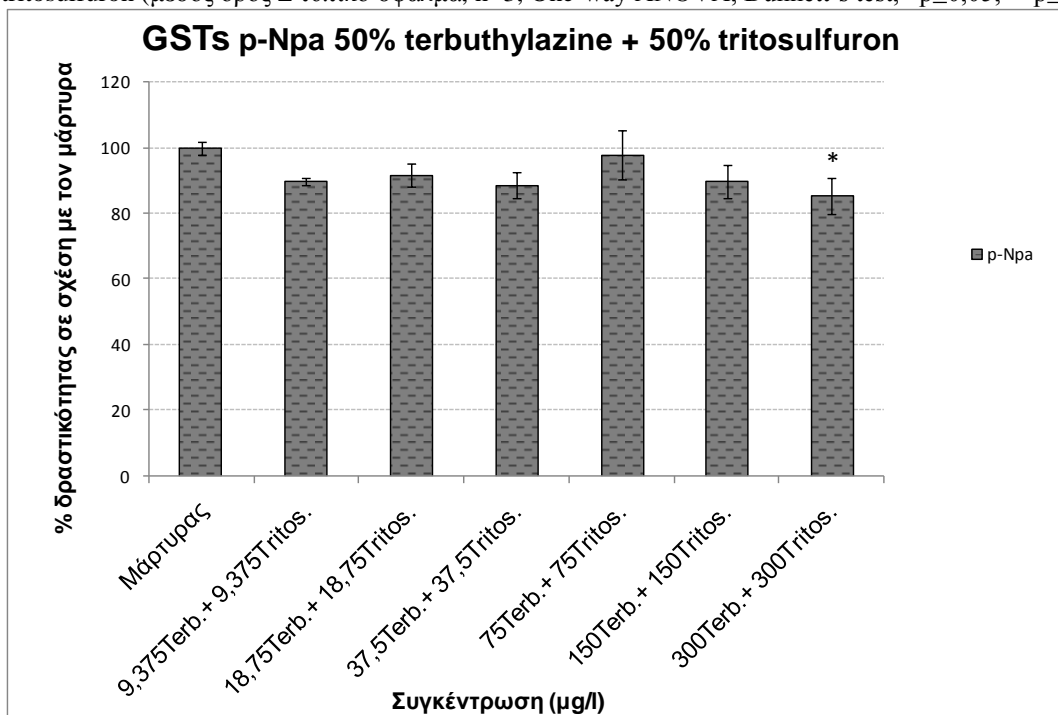
Γράφημα 5.11: Η ειδική δραστηκότητα των GSTs με υπόστρωμα το fluorodifen (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 50% terbutylazine και 50% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).



Γράφημα 5.12: Η ειδική δραστηκότητα των GSTs με υπόστρωμα το fluorodifen (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 25% terbutylazine και 75% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, ***p<0,001).



Γράφημα 5.13: Η ειδική δραστηκότητα των GSTs με υπόστρωμα το p-Npa (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 75% terbuthylazine και 25% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p<0,05, **p<0,01).



Γράφημα 5.14: Η ειδική δραστηκότητα των GSTs με υπόστρωμα το p-Npa (% σε σχέση με τον μάρτυρα) της *L.minor* μετά από 48 h έκθεσης σε έξι συγκεντρώσεις του συνδυασμού 50% terbuthylazine και 50% tritosulfuron (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα, n=3, One-way ANOVA, Dunnett's test, *p<0,05)

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή προέκυψαν οι εξής δημοσιεύσεις:

A-C. Mouzaki-Paxinou, M. Foundoulakis, G. Arapis, 2012, The use of various biomarkers of the bioindicator *Lemna minor* to estimate the toxicity of two herbicides with different mode of action, 2ο Συνέδριο Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, 4-5 Οκτωβρίου 2012, Αθήνα, Ελλάδα

A-C. Mouzaki-Paxinou, M. Foundoulakis, G. Arapis, 2013, The use of the biomarkers chlorophylls and carotenoids, for the interpretation of the effects in *Lemna minor* after exposure of two herbicides with different mode of action», 13th International Conference on Environmental Science and Technology (CEST), 5-7 Σεπτεμβρίου 2013, Αθήνα, Ελλάδα, paper CEST2013_0378 (8p).