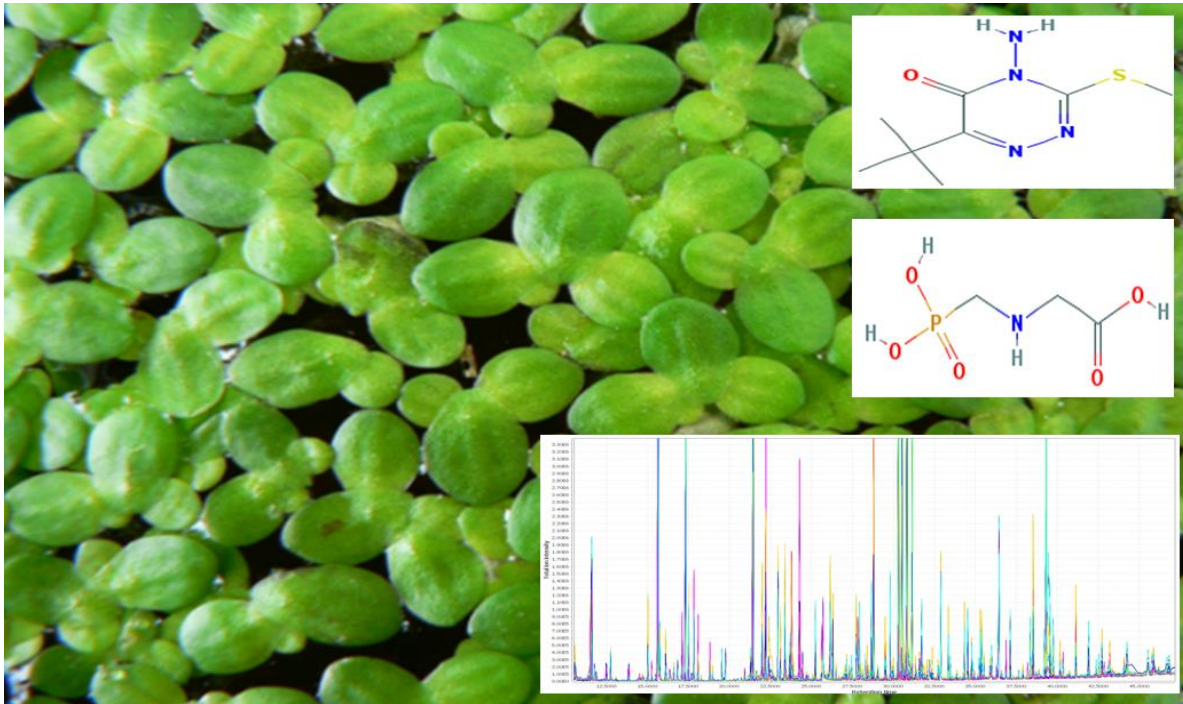


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Π.Μ.Σ.ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Εκτίμηση επικινδυνότητας φυτοπροστατευτικών
προϊόντων και μειγμάτων τους με χρήση οργανισμών-
βιοδεικτών και μεταβολομικής**



ΣΟΦΙΑ Β. ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2017

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΑΡΑΠΗΣ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Π.Μ.Σ.ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Εκτίμηση επικινδυνότητας φυτοπροστατευτικών
προϊόντων και μειγμάτων τους με χρήση οργανισμών-
βιοδεικτών και μεταβολομικής**

ΣΟΦΙΑ Β. ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2017

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΑΡΑΠΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Εκτίμηση επικινδυνότητας φυτοπροστατευτικών
προϊόντων και μειγμάτων τους με χρήση οργανισμών-
βιοδεικτών και μεταβολομικής**

ΣΟΦΙΑ Β. ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΑΡΑΠΗΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΑΡΑΠΗΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Α. ΑΛΙΦΕΡΗΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΑΪΤΑΝΗΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη των επιπτώσεων από την εκτεταμένη έκθεση ανθρώπων και οργανισμών μη-στόχων σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.), αποτελεί αντικείμενο έρευνας τόσο κατά τη φάση της έρευνας και ανάπτυξης τους όσο και κατά τη διάρκεια της χρήσης τους. Τοξικολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα ζιζανιοκτόνα πλέον της τοξικότητας που οφείλεται στον κύριο μηχανισμό δράσης τους, προκαλούν αναπτυξιακές και αναπαραγωγικές ανωμαλίες μέσω της διατάραξης της έκφρασης γονιδίων που ελέγχουν τη λειτουργία των υποδοχέων των οιστρογόνων και ανδρογόνων σε οργανισμούς μη-στόχους. Λόγω της δράσης τους αυτής, χαρακτηρίζονται ως διαταράκτες του ενδοκρινικού συστήματος (Ε.Δ.).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των ύποπτων για πρόκληση ενδοκρινικών διαταραχών ζιζανιοκτόνων metribuzin και glyphosate, και των μειγμάτων τους σε συγκεντρώσεις metribuzin και glyphosate 100-0, 0-100, 100-100, 50-50, 75-25 και 25-75 αντίστοιχα επί τις εκατό των τιμών EC_{50} στο μεταβολισμό ενός οργανισμού προτύπου για οικοτοξικολογικές μελέτες, του φυτού *Lemna minor* L. Σκοπός των πειραμάτων συνδυαστικής τοξικότητας είναι να αυξηθεί η γνώση σχετικά με τις επιπτώσεις των μειγμάτων Φ.Π. που καταλήγουν σε υδάτινα περιβάλλοντα, καθώς και η ανάπτυξη μίας σύγχρονης μεθόδου ελέγχου της ποιότητας του υδάτινου περιβάλλοντος για την εκτίμηση υπολειμμάτων ζιζανιοκτόνων με χαρακτηριστικά Ε.Δ. με την χρησιμοποίηση του φυτού *Lemna minor* L. και με εφαρμογή μεταβολομικής αέριου χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC/EI/MS).

Βιοδοκιμές τοξικότητας για τον προσδιορισμό των τιμών EC_{50} έδειξαν ότι για το metribuzin είναι 1 ppm και για το glyphosate 32 ppm. Για την εύρεση των τιμών αυτών, η πιο ευαίσθητη παράμετρος αποδείχτηκε ότι είναι ο αριθμός των φυλλιδίων. Η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων συνδυαστικής τοξικότητας σε GC/EI/MS έδειξε ότι οι βιολογικές επαναλήψεις του μάρτυρα διακρίνονται από τις επαναλήψεις των υπόλοιπων επεμβάσεων,

επιβεβαιώνοντας την επίδραση των επεμβάσεων στο μεταβολισμό του φυτού. Οι επεμβάσεις με το metribuzin και τα μείγματα των ζιζανιοκτόνων προκαλούν παρόμοιες μεταβολές στο μεταβολισμό της *Lemna minor* L, σε αντίθεση με το glyphosate. Περισσότερο επηρεάζονται οι μεταβολικές οδοί που εμπλέκονται στην παραγωγή ενέργειας και στη βιοσύνθεση αμινοξέων και λιπιδίων. Οι μεταβολίτες αυτών των οδών υπερπαραγονται κατά τις επεμβάσεις με το metribuzin και με τα μείγματα των δύο ζιζανιοκτόνων, ενώ αντίθετα υποπαραγονται κατά τις επεμβάσεις με glyphosate. Αν οι μεταβολίτες κατηγοριοποιηθούν βάσει των χημικών ομάδων στις οποίες ανήκουν, και τα δύο ζιζανιοκτόνα καθώς και τα μείγματά τους προκαλούν υπερπαραγωγή αμινοξέων, ενώ αντίθετα προκαλούν υποπαραγωγή υδατανθράκων.

Σημαντική ήταν η επίδραση των επεμβάσεων στο μεταβολισμό του φυτού οδηγώντας στην ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών (biomarkers) των αντίστοιχων τοξικοτήτων. Ανάμεσα σε αυτούς, ανακαλύφθηκαν το σαλικυλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το σκουαλένιο, η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη και το GABA, μεταβολίτες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του οργανισμού και στις αντιδράσεις του σε βιοτικά και αβιοτικά στρες.

Αν και η εφαρμογή της μεταβολομικής σε μελέτες τοξικογενετικής (toxicogenomics) βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο, η συμβολή της κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική στην περαιτέρω έρευνα σχετική με τη μελέτη της τοξικότητας μειγμάτων Φ.Π και Ε.Δ. με τη χρήση πρότυπων οργανισμών και τον έλεγχο της υγείας και ασφάλειας του περιβάλλοντος και υδάτινων όγκων.

Επιστημονική περιοχή διατριβής: Αθήνα

Λέξεις κλειδιά: οικοτοξικογενετική, εκτίμηση ποιότητας περιβάλλοντος, τοξικότητα ζιζανιοκτόνων

ABSTRACT

The effects of human and non-target organisms exposure to pesticides on their physiology and metabolism is a key factor during their development and subsequent use in crop protection. Toxicological studies have shown that certain herbicides in addition to their primary mode-of-action (MoA) exhibit secondary MoA, which make them toxic causing developmental and reproductive abnormalities via the disruption of the expression of genes that control the function of estrogen and androgen receptors. Because of this bioactivity such herbicides can be characterized as endocrine disruptors.

In the present study, we have investigated the effects of metribuzin and glyphosate, which are suspected to act as endocrine disruptors, and their mixtures on the metabolism of a model organism for ecotoxicological studies, the aquatic plant *Lemna minor* L. The purpose of the combined toxicity experiments is to increase the knowledge on the combined effects of mixtures of plant protection products (PPPs), which are present in aquatic environments and additionally to develop a modern method of monitoring the quality of aquatic environments for the estimation of endocrine disruptor herbicide presence using *L. minor* L applying gas chromatography mass spectrometry (GC/EI/MS) metabolomics.

Toxicity bioassays for the estimation of the EC₅₀ values showed that for metribuzin the EC₅₀ is 1 ppm and for glyphosate 32 ppm. To calculate the EC₅₀ values, the most sensitive parameter proved to be the number of fronds. Multivariate analysis of the data of combined toxicity showed that the biological replications of control were distinguished from the replications of the rest treatments, confirming the effect of the applied herbicides on plant's metabolism. Treatments with metribuzin and mixtures of the herbicides caused similar changes in the metabolism of *L. minor* L, in contrast to those caused by glyphosate. The metabolic pathways involved in the production of energy, biosynthesis of amino acids and lipids are the mostly affected. Metabolites of

these pathways were over-produced during the treatments with metribuzin and with the mixtures of the two herbicides, while they were down-produced following glyphosate treatment. By grouping metabolites based on their chemical groups, both herbicides and their mixtures caused an overproduction of amino acids while on the contrary they resulted to lower levels of carbohydrates. The effect of the treatments on the metabolism of the plant was substantial, leading to the discovery of biomarkers of the respective toxicities. Among them, salicylic acid, caffeic acid, squalene, tyrosine, tryptophan and GABA are metabolites that have been discovered, which play important role in plants' metabolism and their responses to biotic and abiotic stresses.

Although the application of metabolomics in toxicogenomics is still in infancy, its contribution is highly expected to be important to the research on the study of the toxicity of PPPs mixtures and endocrine disrupters using model organisms and also the research on the routine monitoring of health and environmental safety of water.

Place of study: Athens

Keywords: ecotoxicogenomics, environmental risk assessment, pesticide toxicity

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
1.1 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ Φ.Π. ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	21
1.1.1 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ Φ.Π. ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	21
1.1.2 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ Φ.Π. ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΣΤΗΝ Ε.Ε. ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ	25
1.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ.....	30
1.2.1 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ.....	30
1.2.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΕΣ	32
1.2.3 ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΩΝ	36
1.2.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΩΝ	40
1.3 ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ	42
1.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΥΣ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ	43
1.5 ΟΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ «OMICS» - ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΓΟΝΙΔΙΟΜΑΤΙΚΗ «ECOTOXICOGENOMICS».....	44
1.6 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ	45
1.6.1 ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ	47
1.6.2 ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	48
1.6.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	48
1.6.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ.....	50
1.7 ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΡΥΠΑΝΣΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ	51
1.7.1 ΠΩΛΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ ΣΤΗΝ Ε.Ε.....	52
1.7.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ GLYPHOSATE ΚΑΙ METRIBUZIN	54
1.7.2.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GLYPHOSATE	54
1.7.2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ METRIBUZIN	58
1.8 ΤΑ ΕΙΔΗ <i>LEMNA</i> SP.: Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	61
1.8.2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΩΝ <i>LEMNACEAE</i>	61
1.8.3 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ.....	63
1.8.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	64
1.8.4.1 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΚΑΙ ΦΩΤΙΣΜΟΣ.....	64

1.8.4.2 pH	65
1.8.4.3 ΑΝΕΜΟΣ ΚΑΙ ΚΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΚΙΝΗΣΗ	65
1.8.4.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ	65
1.8.4.5 ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ	66
1.8.5 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	66
1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	69
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	71
2.1 ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	73
2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ <i>LEMNA MINOR L</i>	73
2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ EC_{50} ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ METRIBUZIN ΚΑΙ GLYPHOSATE	76
2.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ	78
2.5 ΠΕΙΡΑΜΑ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ Ή ΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ <i>LEMNA MINOR L</i>	80
2.5.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	80
2.5.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗ.....	82
2.6 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ GC/EI/MS.....	84
2.7 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΒΑΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ <i>LEMNA MINOR L</i>	85
2.8 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ, ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΣΗΜΑΝΤΩΝ.....	86
2.9 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΔΙΚΤΥΩΝ	86
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	87
3.1 ΦΥΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ GLYPHOSATE, METRIBUZIN ΚΑΙ ΜΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΟ <i>LEMNA MINOR L</i> .-ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΙΜΩΝ EC_{50}	89
3.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΟ <i>LEMNA MINOR L</i>	91
3.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ <i>LEMNA MINOR L</i> . ΣΕ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ GLYPHOSATE, METRIBUZIN ΚΑΙ ΜΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥΣ	92
3.2.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΠΕΜΒΑΣΕΩΝ ΣΕ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ.....	96
3.2.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ <i>LEMNA MINOR L</i> . ΣΤΙΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕ METRIBUZIN, GLYPHOSATE ΚΑΙ ΤΑ ΜΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥΣ.....	102
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	111

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....117

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου ξεχωριστά προς όλους όσους συντέλεσαν είτε με πιο ενεργό ρόλο είτε με τις συμβουλές και τις οδηγίες τους στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μελέτης μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Γεράσιμο Αράπη για την ανάθεση αυτού του ενδιαφέροντος θέματος, για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του καθ' όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Λέκτορα Κωνσταντίνο Α. Αλιφέρη του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας για την πρόθυμη συνεργασία και συμμετοχή του στον πειραματισμό, την ανάλυση των αποτελεσμάτων αλλά και στη συγγραφή της παρούσας εργασίας καθώς όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας για την πολύτιμη βοήθεια του.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή Κωνσταντίνο Σαϊτάνη για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή και τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά την διόρθωση της μεταπτυχιακής μελέτης.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τη Διδάκτορα Ακριβή-Χαρά Μουζάκη-Παξινού που με προμήθευσε με την καλλιέργεια του οργανισμού που χρησιμοποίησα κατά τη μελέτη, καθώς και για την καθοδήγηση της σχετικά με τον χειρισμό της *Lemna minor* L και την καλλιέργεια της.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα Ιωάννη Καλαμπόκη για τον χρόνο που αφιέρωσε και την πολύτιμη βοήθεια του κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων και των αναλύσεων μεταβολομικής, για τις συμβουλές του και την εύρεση λύσεων σε οποιαδήποτε δυσκολία αντιμετώπιζα. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Μάιρα Λυκογιάννη για τις συμβουλές της και τις εύστοχες παρατηρήσεις και υποδείξεις κατά το πειραματικό μέρος και τη συγγραφή της μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τη Μεταδιδάκτορα Γεωργία Ντάτση για την καθοδήγηση της σχετικά με τις μετρήσεις του φασματοφωτομέτρου και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους φίλους και την οικογένεια μου για την κατανόηση, την υποστήριξη τους αλλά και την ενθάρρυνση τους να κυνηγάω πάντα τα όνειρα μου.

Σοφία Κωστοπούλου

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Ε.Ε.: Ευρωπαϊκή Ένωση

Ε.Δ.: Ενδοκρινικοί Διαταράκτες (Endocrine Disruptors)

Φ.Π.: Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα

¹ChI: Μόρια χλωροφύλλης σε διεγερμένη κατάσταση (single state)

³ChI: Μόρια χλωροφύλλης σταθερότερης μορφής (stable triplet state)

DMSO: Διμέθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl Sulfoxide)

EATs: Οιστρογόνα, Ανδρογόνα ή Θυρεοειδικό ορμονικό σύστημα (Estrogen, Androgen, or Thyroid hormone systems)

ECHA: Ευρωπαϊκός Οργανισμός Χημικών Προϊόντων (European Chemicals Agency)

EFSA: Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Agent)

EPSP: Φωσφοενολο-πυρουβιλο-σικιμικό οξύ (5-EnolPyruvylShikimate-3-Phosphate)

GC: Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography)

HCA: Ιεραρχική Ομαδοποίηση (Hierarchical Clustering Analysis)

HPLC: Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία (High Performance Liquid Chromatography)

Laminar: Θάλαμος οριζόντιας νηματικής ροής

LC: Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography)

LHC: Σύμπλοκα Συλλογής Φωτός (Light Harvesting Complex)

MeOX: Υδροχλωρική μεθοξυλαμίνη (Methoxylamine Hydrochloride)

MRLs: Ανώτατα όρια υπολειμμάτων (Maximum Residue Limits)

MS: Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry)

NMR: Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy)

OECD: ΟΟΣΑ-Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (Organisation for the Economic Co-operation and Development)

OPLS-DA: Μέθοδος Ορθογώνιων Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων-Διακριτικής Ανάλυσης (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis)

PCOS: Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Polycystic Ovarian Syndrome)

PEP: Φωσφοενολοπυρουβικό (Phosphoenolpyruvate)

Pheo: Φαιοφυτίνη (Pheophytin)

PLS-DA: Μέθοδος Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων-Διακριτικής Ανάλυσης (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)

PQ: Πλαστοκινόνη (Plastoquinone)

PSI: Φωτοσύστημα I (Photosystem I)

PSII: Φωτοσύστημα II (Photosystem II)

S3P: 3-Φωσφοσικιμικό οξύ (3-Phosphoshikimate)

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ Φ.Π. ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

1.1.1 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ Φ.Π. ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.) μπορούν να ρυπάνουν το έδαφος, το νερό, τον ατμοσφαιρικό αέρα αλλά και τη βλάστηση. Εκτός από την άμεσή τους τοξικότητα σε φυτικούς εχθρούς, παθογόνα ή ζιζάνια, πολλά Φ.Π. είναι τοξικά σε ένα μεγάλο αριθμό άλλων οργανισμών μη-στόχων, συμπεριλαμβανομένων των πτηνών, των ψαριών, των οφέλιμων εντόμων και καλλιεργούμενων φυτών. Τα εντομοκτόνα είναι γενικά η πλέον οξεία τοξική κατηγορία Φ.Π., αλλά τα ζιζανιοκτόνα μπορούν επίσης να θέσουν σε κίνδυνο τους οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο (Aktar et al., 2009).

Περίπου το 10% της επιφάνειας της γης είναι καλλιεργήσιμη, στην οποία η ένταση και συχνότητα εφαρμογής Φ.Π. ποικίλει. Μία ρεαλιστική εκτίμηση είναι ότι στο 10% της καλλιεργήσιμης γης εφαρμόζονται τα δύο τρίτα όλων των Φ.Π. (Miyamoto et al., 2013). Σήμερα, το πρόβλημα της παρουσίας υπολειμμάτων Φ.Π. στα τρόφιμα και στο περιβάλλον τείνει να γίνει ένα παγκόσμιο πρόβλημα.

Η πλειοψηφία των Φ.Π. παρουσιάζει μειωμένη σταθερότητα στο περιβάλλον, στα φυτά και στα ζώα. Αυτή είναι μία πολύ σημαντική ιδιότητά τους γιατί καθορίζει την αποτελεσματικότητά τους και επιτρέπει την ασφαλή χρήση τους (Tuzimski, 2012). Η παραμονή ή η μετακίνηση των Φ.Π. στο έδαφος καθορίζεται από την διαλυτότητά τους στο νερό, την σταθερά απορρόφησης του εδάφους (K_{oc}), τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερό (K_{ow}) και το χρόνο ημιζωής του Φ.Π. στο έδαφος (DT_{50}). Τα Φ.Π. και τα προϊόντα του μεταβολισμού τους μπορούν κατηγοριοποιηθούν σε υδρόφοβα, έμμονα και βιοαφομοιώσιμα, τα οποία δεσμεύονται ισχυρά στο έδαφος και τα ποτικά, σημαντικότερος εκπρόσωπος των οποίων είναι τα ζιζανιοκτόνα. Αυτά μπορούν να μεταφέρονται από το έδαφος στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα, που αποτελούν υδάτινους ταμειυτήρες πόσιμου και αρδευτικού νερού, μέσω της απορροής και της έκπλυσης (Aktar et al., 2009).

Οι διεργασίες αποδόμησης των ουσιών στο έδαφος μπορεί να είναι φυσικές, χημικές και βιολογικές όπως είναι για παράδειγμα η απορρόφηση, η εξαέρωση, η χημική και η βιολογική αποδόμηση, η απορρόφηση από τα φυτά, η έκπλυση και η απορροή, η υδρόλυση και η φωτοαποδόμηση (Tuzimski, 2012). Το διάστημα που θα παραμένει μία ουσία στο έδαφος εξαρτάται από το πόσο ισχυρά είναι δεσμευμένη στο έδαφος και με ποια διαδικασία αποδομείται. Ο σημαντικότερος παράγοντας για τη δέσμευση των Φ.Π. στο έδαφος είναι το ποσοστό της οργανικής ύλης που αυτό περιέχει. Όσο περισσότερη είναι η οργανική ύλη στο έδαφος, τόσο υψηλότερη είναι η δέσμευση των Φ.Π. Σημαντικό είναι επίσης και το pH του εδάφους. Η προσρόφηση αυξάνεται με τη μείωση του pH του εδάφους για τα ιονίζοντα Φ.Π. (Aktar et al., 2009).

Οι οργανισμοί του εδάφους συμμετέχουν στην αποδόμηση των Φ.Π. (βιοτικός και βιοχημικός μετασχηματισμός). Ο βιοτικός μετασχηματισμός των Φ.Π. κατά κύριο λόγο είναι αποτέλεσμα δράσης ενζύμων των μικροοργανισμών του εδάφους. Τέτοια είναι τα βακτήρια *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Actinomycetes*, και οι μύκητες *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*. Η συνεισφορά των μυκήτων στην αποδόμηση των Φ.Π. φτάνει το 80% γιατί παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα σε όξινα περιβάλλοντα και τα ένζυμα που παράγουν έχουν μεγαλύτερη ικανότητα αποδόμησης (Tuzimski, 2012).

Η εντατική εφαρμογή Φ.Π. στο έδαφος μπορεί να μειώσει των πληθυσμό των ωφέλιμων μικροοργανισμών του εδάφους (Aktar et al., 2009). Το glyphosate μειώνει την ανάπτυξη και την δραστηριότητα των νιτροποιητικών βακτηρίων του εδάφους (Santos and Flores, 1995). Οι μυκόρριζες αναπτύσσονται στις ρίζες πολλών φυτών και βοηθούν στην προσρόφηση των θρεπτικών στοιχείων (Kelley and South, 1978). Το glyphosate ήταν τοξικό για αυτό τον μύκητα σε εργαστηριακές μελέτες, ενώ φάνηκε τοξικό αλλά σε μικρότερο βαθμό σε πειράματα αγρού (Estok et al., 1989).

Ο φωτοχημικός μετασχηματισμός είναι περιορισμένος στην επιφάνεια του εδάφους και των φυτών και είναι δυνατός μόνο για ουσίες με ευαισθησία στην

ηλιακή ακτινοβολία (290-450 nm). Οδηγεί στο σχηματισμό ριζών, οι οποίες είναι πολύ δραστικές και οδηγούν, στα υδατικά διαλύματα, σε πολυάριθμες αντιδράσεις θραύσης δεσμών καθώς και σε αντιδράσεις ανασυνδυασμού (Tuzimski, 2012).

Παρουσία των Φ.Π. στα επιφανειακά ύδατα έχει καταγραφεί περισσότερο από 40 χρόνια πριν στη Βόρεια Αμερική, στον Καναδά και στην Ευρώπη και από τότε πολλές μελέτες έχουν καταδείξει την σοβαρότητα του προβλήματος (Vryzas et al., 2011). Τα Φ.Π. μπορούν να φτάσουν στα επιφανειακά ύδατα μέσω της απορροής και της έκπλυσης αυτών από εδάφη που έχουν υποστεί επεμβάσεις (Aktar et al., 2009). Οι κοντινές αποστάσεις μεταξύ των αγρών και των επιφανειακών υδάτων, τα χαρακτηριστικά των παράκτιων αποστραγγιστικών καναλιών (βάθος και ροή), τα περιβάλλοντα πεδία (το έδαφος, οι βοσκότοποι, η κλίση και οι αποστάσεις από τα σώματα νερού) και οι κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, άνεμοι και οι κατακρημνίσεις) της κάθε περιοχής είναι παράγοντες που επηρεάζουν την ρύπανση των επιφανειακών υδάτων (Kreuger, 1998, Capel et al., 2001).

Μια μεγάλη ποικιλία υδρόφοβων οργανικών ουσιών, όπως οργανοχλωριωμένα Φ.Π. μεταφέρονται σε ποτάμια και περιβάλλοντα των εκβολών των ποταμών μέσω διαφορετικών οδών εισόδου, όπως η απόρριψη οικιακών και βιομηχανικών λυμάτων, και η ατμοσφαιρική εναπόθεση (Doong et al., 2002). Παρά το γεγονός ότι πολλές χώρες έχουν απαγορεύσει τη χρήση οργανοχλωριωμένων Φ.Π. εδώ και πολλά χρόνια, αυτές οι συνθετικές χημικές ουσίες εξακολουθούν να υφίστανται σε σημαντικά επίπεδα παγκοσμίως (Sarkar et al., 1997). Εκτιμάται ότι 2.5 10⁴ τόνοι Φ.Π. απελευθερώνονταν στο περιβάλλον ετησίως από τη δεκαετία του 1950-1970 και αποτέλεσαν μια μακροπρόθεσμη πηγή ρύπανσης του υδάτινου οικοσυστήματος. Η μεταφορά των Φ.Π. σε μεγάλες αποστάσεις είναι επίσης μια άλλη πιθανή οδός για τη ρύπανση των υδάτων με οργανοχλωριωμένα Φ.Π. Ορισμένα, όπως το endosulfan και το heptachlor χρησιμοποιούνται ακόμα σε ορισμένες αναπτυσσόμενες χώρες γύρω από την τροπική ζώνη και μπορούν να μεταφερθούν μέσω της ατμόσφαιρας και να κατατεθούν σταδιακά σε ποτάμια

σε υψηλότερα γεωγραφικά πλάτη (Doong et al., 2002). Μετρήθηκαν οι εποχιακές μεταβολές των συγκεντρώσεων των οργανοχλωριωδών στην Ευρωπαϊκή Αρκτική και διαπιστώθηκε ότι μεταφορές μέσω του αέρα από μακρινές περιοχές θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε σημαντική αλλαγή συγκέντρωσης στην ατμόσφαιρα της Αρκτικής (Oehme et al., 1996).

Η ρύπανση των επιφανειακών υδάτων είναι ένα πολύ συχνό φαινόμενο (Aktar et al., 2009). Σε μελέτη που έγινε στις κυριότερες λεκάνες απορροής των Η.Π.Α. διαπιστώθηκε ότι το 90% των δειγμάτων νερού και ψαριών περιείχαν ένα ή περισσότερα Φ.Π. (Kole et al., 2001). Άλλη έρευνα (U.S.Geological Survey, 1999), έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις των εντομοκτόνων στα αστικά ρέματα ξεπερνούν τα όρια που προβλέπουν οι οδηγίες για την προστασία της υδάτινης ζωής. Γενικά, περισσότερα υπολείμματα Φ.Π. έχουν ανιχνευθεί σε αστικά ρέματα σε σχέση με γεωργικά ρέματα (Bortleson and Davis, 1997).

Η ρύπανση των υπόγειων υδάτων αποτελεί επίσης ένα παγκόσμιο πρόβλημα. Εάν ρυπανθούν τα υπόγεια ύδατα με χημικές ουσίες απαιτούνται πολλά χρόνια για τη μείωση των συγκεντρώσεων τους ή την απορρύπανση τους. Η απορρύπανση των υπόγειων υδροφόρων οριζόντων είναι δαπανηρή και πολύπλοκη, εάν όχι ανέφικτη (Waskom, 1994, O'Neil and Raucher, 1998).

Η εφαρμογή Φ.Π. με ψεκασμό μπορεί να βλάψει άμεσα φυτά μη-στόχους, καθώς και με την ροή τους ή την εξαέρωση τους μπορούν να ρυπάνουν τον ατμοσφαιρικό αέρα και το έδαφος. Παρότι είναι περιορισμένη η έρευνα σχετικά με αυτό το θέμα, συνεχώς σε μελέτες ανιχνεύονται υπολείμματα Φ.Π. στον ατμοσφαιρικό αέρα. Σε όλα τα δείγματα αέρα από τις Η.Π.Α. ανιχνεύθηκαν Φ.Π. (Savonen, 1997). Επίσης, η έκθεση φυτών μη-στόχων σε Φ.Π. με αυτούς τους τρόπους μπορεί, εκτός από την άμεση θανάτωση του φυτού, να επιφέρει άλλες υποθανάτιες επιπτώσεις στο φυτό. Παραδείγματος χάρη, η έκθεση σε glyphosate μπορεί να επιφέρει μείωση της ποιότητας του σπόρου (Locke et al., 1995) καθώς και αύξηση της ευαισθησίας του φυτού σε ασθένειες (Brammall and Higgins, 1988). Έτσι θέτονται σε κίνδυνο τα υπό εξαφάνιση είδη φυτών.

Τα Φ.Π. μέσω του εδάφους, του νερού και του αέρα περνούν στα τρόφιμα, απειλώντας άμεσα και έμμεσα την υγεία των καταναλωτών. Υπολείμματα τους ανιχνεύονται στα φρούτα και στα λαχανικά, είτε σε ίχνη είτε σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων (Maximum Residue Limits, MRLs).

1.1.2 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ Φ.Π. ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΣΤΗΝ Ε.Ε. ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Το 97% των δειγμάτων τροφίμων που συλλέγονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) είναι απαλλαγμένα από υπολείμματα Φ.Π. ή περιέχουν ίχνη που βρίσκονται εντός των MRLs. Το συμπέρασμα αυτό είναι μέρος της τελευταίας έκθεσης για το έτος 2014 της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Agency, EFSA) για τα υπολείμματα Φ.Π. στα τρόφιμα, το οποίο αναλύει τα αποτελέσματα των σχεδόν 83.000 δειγμάτων τροφίμων που αναλύθηκαν από τα 28 κράτη μέλη της Ε.Ε.-συμπεριλαμβανομένης της Κροατίας για πρώτη φορά-καθώς και την Ισλανδία και τη Νορβηγία.

Συγκεκριμένα, 97.1% των δειγμάτων που αναλύθηκαν στα πλαίσια των εθνικών προγραμμάτων έλεγχου ήταν εντός των MRLs. Το 53.6% των δειγμάτων ήταν απαλλαγμένα από υπολείμματα, ενώ το 43.4% περιείχαν ίχνη υπολειμμάτων που δεν ξεπερνούσαν τις επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις. Μόνο το 2.9% των δειγμάτων ξεπερνούσαν τα MRLs.

Σχετικά με τα δείγματα που προέρχονταν από τρίτες χώρες, το 6.5% των δειγμάτων ξεπερνούσε τα MRLs, ποσοστό ελαφρώς επαυξημένο σε σχέση με το 2013 (5.7%). Υπέρβαση MRLs με την χρήση μη εγκεκριμένων σκευασμάτων εντοπίστηκε σε περισσότερες περιπτώσεις σε εισαγόμενα προϊόντα (957 περιπτώσεις) και σε λιγότερες σε προϊόντα που παράγονται σε χώρες τις Ε.Ε. (245 περιπτώσεις).

Μικρή αύξηση σημειώθηκε στο ποσοστό των δειγμάτων με υπολείμματα περισσότερα του ενός Φ.Π. το 2014 (28.3%) σε σχέση με το 2013 (27.3%). Από το σύνολο των δειγμάτων των παιδικών τροφών που αναλύθηκαν, το

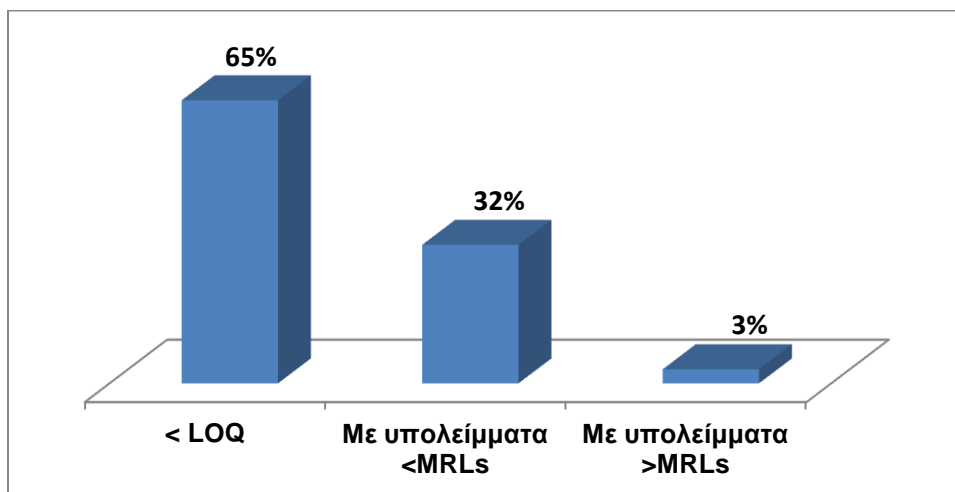
91.8% είναι απαλλαγμένο από υπολείμματα, ενώ το 7.5% των δειγμάτων περιείχε υπολείμματα που ξεπερνούσαν το 0.01 mg kg^{-1} , δηλαδή το MRL για τις παιδικές τροφές. Στο 12,4% των δειγμάτων των βιολογικών προϊόντων (595 από τα 4.792 δείγματα που αναλύθηκαν), υπολείμματα Φ.Π. εντοπίστηκαν, αλλά εντός των νομίμων ορίων. Ωστόσο, 220 από αυτά τα δείγματα περιείχαν υπολείμματα ουσιών που δεν προέρχονται υποχρεωτικά από τη χρήση Φ.Π. (π.χ. φυσικές ουσίες, έμμονοι περιβαλλοντικοί ρύποι) και ουσίες που επιτρέπονται στη βιολογική γεωργία. Στο 1,2% των δειγμάτων (57 δείγματα), σημειώθηκε υπέρβαση των MRLs. Η πλειοψηφία των δειγμάτων των ζωικών προϊόντων (9152 δείγματα) ήταν απαλλαγμένη από μετρήσιμα υπολείμματα (84,7%, 7751 δείγματα). Τα φυτοφάρμακα που ανιχνεύονταν πιο συχνά ήταν έμμονοι περιβαλλοντικοί ρύποι ή ενώσεις που προέρχονται από άλλες πηγές εκτός από τη χρήση Φ.Π.

Η EFSA πραγματοποίησε επίσης εκτίμηση του κινδύνου οξείας και χρόνιας τοξικότητας από Φ.Π. που καταναλώνονται από τον Ευρωπαϊκό καταναλωτή μέσω των τροφίμων. Κατέληξε και στις δύο περιπτώσεις ότι η πιθανότητα να τεθεί σε κίνδυνο η ζωή ενός Ευρωπαϊκού πολίτη που έχει εκτεθεί σε υπολείμματα Φ.Π. μέσω της διατροφής του είναι αμελητέα, αλλά για ένα περιορισμένο αριθμό δειγμάτων η πιθανότητα οξείας τοξικότητας δεν μπορεί να αποκλειστεί (EFSA, 2016a).

Τα εθνικά προγράμματα για τον έλεγχο των υπολειμμάτων των Φ.Π. αποσκοπούν στην εξασφάλιση της συμμόρφωσης με τα ανώτατα επίπεδα υπολειμμάτων και την αξιολόγηση της έκθεσης των καταναλωτών, προκειμένου να επιτευχθεί υψηλό επίπεδο προστασίας και η εφαρμογή των ορθών γεωργικών πρακτικών σε όλα τα στάδια της παραγωγής και συγκομιδής των γεωργικών προϊόντων.

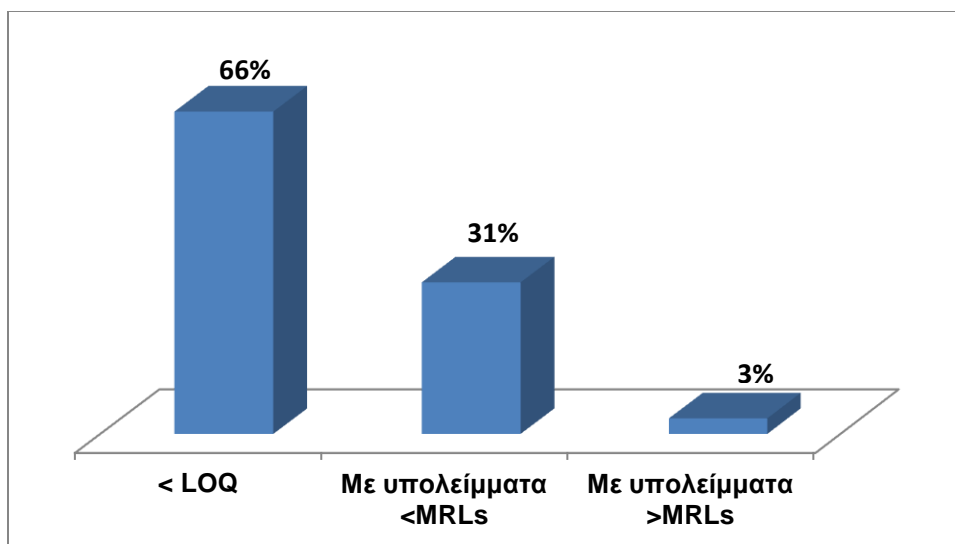
Όσον αφορά την Ελλάδα, τα προγράμματα ελέγχου σχεδιάζονται και συντονίζονται από το υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Τα επίσημα εργαστήρια που αναλύουν δείγματα για τα υπολείμματα Φ.Π. είναι διαπιστευμένα και οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούνται είναι σύμφωνες με τα κριτήρια που ορίζονται στις σχετικές διατάξεις του δικαίου της Ε.Ε.

Από τα 2.376 δείγματα που αναλύθηκαν συνολικά στα ελληνικά εργαστήρια το 2014, το 65% των δειγμάτων ήταν απαλλαγμένα από υπολείμματα. Στο 32% των δειγμάτων ανιχνεύτηκαν υπολείμματα, που δεν ξεπερνούσαν τα ανώτατα επίπεδα υπολειμμάτων. Μόνο στο 3% των δειγμάτων εντοπίστηκαν υπολείμματα που ξεπερνούσαν τις τιμές των ανώτατων επιπέδων υπολειμμάτων (**Εικόνα 1**).



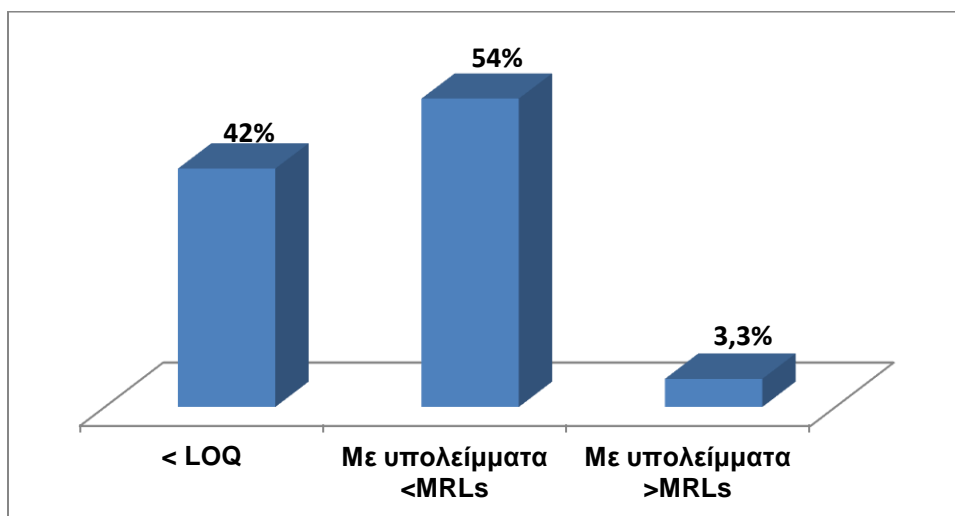
Εικόνα 1 Δείγματα τροφίμων που αναλύθηκαν συνολικά από ελληνικά εργαστήρια το 2014 για παρουσία υπολειμμάτων Φ.Π. (Πηγή EFSA, 2016).

Από τα 2.294 μη-ύποπτα δείγματα για υπολείμματα, στο 66% των δειγμάτων δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα, στο 31% ανιχνεύθηκαν υπολείμματα σε συγκεντρώσεις κατώτερες από τα ανώτατα επίπεδα υπολειμμάτων, ενώ στο 3% βρέθηκαν υπολείμματα Φ.Π. σε τιμές μεγαλύτερες από τα ανώτατα επίπεδα υπολειμμάτων (**Εικόνα 2**).



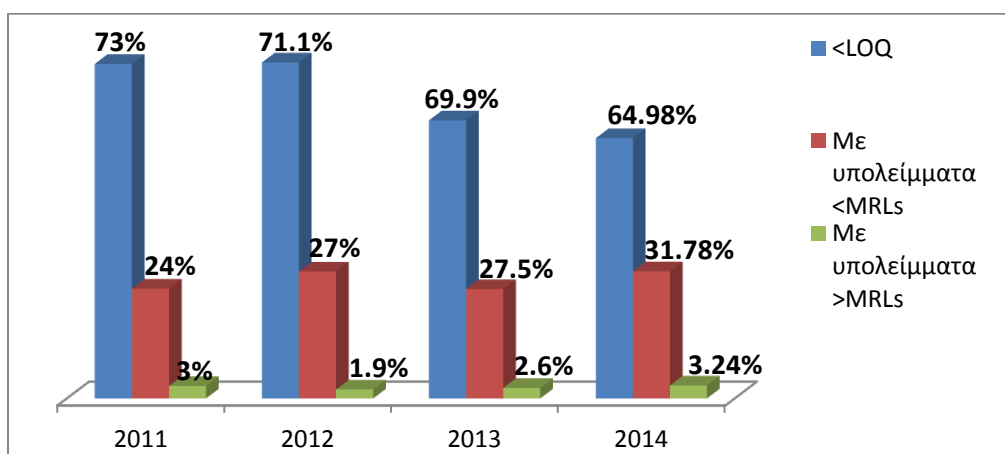
Εικόνα 2 Τα μη-ύποπτα για υπολείμματα δείγματα τροφίμων που αναλύθηκαν στην Ελλάδα το 2014 για παρουσία υπολειμμάτων Φ.Π. (Πηγή EFSA, 2016).

Σχετικά με τα δείγματα ύποπτα για υπολείμματα, τα οποία ήταν 82 στο σύνολο τους, το 42% ήταν απαλλαγμένο υπολειμμάτων, το 54% περιείχε υπολείμματα αλλά κάτω από τα ανώτατα επίπεδα και το 3,3% περιείχε υπολείμματα των οποίων οι συγκεντρώσεις τους ξεπερνούσαν τα ανώτατα επίπεδα υπολειμμάτων (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 3 Ύποπτα για υπολείμματα Φ.Π. δείγματα τροφίμων που αναλύθηκαν στην Ελλάδα το 2014 (Πηγή EFSA, 2016).

Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4**, κάθε έτος από το 2011 έως το 2014 παρατηρείται μία μικρή αύξηση στο ποσοστό των δειγμάτων στα οποία ανιχνεύονται υπολείμματα χωρίς να ξεπερνούν οι συγκεντρώσεις τους τα ανώτατα επίπεδα. Ενώ το ποσοστό των δειγμάτων με συγκεντρώσεις υπολειμμάτων που ξεπερνούν τα ανώτατα επίπεδα έχει αυξηθεί ελαφρώς σε σχέση με το 2011 (EFSA, 2016c).



Εικόνα 4. Διακύμανση της ανίχνευσης υπολειμμάτων Φ.Π. στα τρόφιμα από το 2011-2014 στην Ελλάδα (Πηγή EFSA, 2016).

Αν και σε μικρό βαθμό, από τα παραπάνω στοιχεία, φαίνεται ότι στην Ελλάδα και στην Ε.Ε. ανιχνεύονται υπολείμματα Φ.Π. στα τρόφιμα, παρά τους τακτικούς και συντονισμένους ελέγχους των αρμόδιων αρχών.

Σε δείγματα μηλοειδών και κηπευτικών που συλλέχτηκαν από περιοχές της Θεσσαλίας αποδείχτηκε ότι στο 30.3% των δειγμάτων ανιχνεύθηκαν υπολείμματα Φ.Π. με χαρακτηριστικά Ε.Δ., ενώ το 80% των δειγμάτων με υπολείμματα υπερέβαινε τα MRLs βάσει του ισχύοντος κανονισμού (EU, 2016) (Βλάσση, 2017). Οι Ε.Δ. είναι ένα σχετικά νέο προς μελέτη αντικείμενο, λόγω της αυξανόμενης ανησυχίας για τις πιθανές βλάβες που μπορούν να προκαλέσουν στους ανθρώπους και σε άλλους οργανισμούς.

1.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ

1.2.1 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Η ύπαρξη υπολειμμάτων Φ.Π. στα τρόφιμα, στο έδαφος και στο νερό προκαλεί πολλά προβλήματα στην υγεία των ανθρώπων καθώς και αυτή άλλων οργανισμών. Η πρόκληση ενδοκρινικών διαταραχών είναι σχετικά πρόσφατη παράμετρος κατά τον έλεγχο τοξικότητας χημικών ουσιών. Οι χημικές ουσίες που δρουν ως Ε.Δ. και η ρύθμιση αυτού του προβλήματος αποτελούν ένα από τα πιο επίκαιρα θέματα προς συζήτηση της επιστημονικής κοινότητας και των δημόσιων αρχών. Ωστόσο, σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια στην Ε.Ε. και διεθνείς οργανισμούς, οδηγώντας σε αύξηση της επιστημονικής γνώσης που είναι διαθέσιμη.

Τα δύο ζιζανιοκτόνα που επιλέχθηκαν να μελετηθούν στην παρούσα έρευνα, καθώς και άλλα Φ.Π. (π.χ., εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα κ.ά.), παρά το ότι εξασφαλίζουν στο γεωργό μεγαλύτερη απόδοση, έχουν εγείρει υποψίες για επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία και οργανισμούς μη-στόχους. Η ανησυχία αυτή οφείλεται στην αυξανόμενη τάση εκδήλωσης χρόνιων, μη λοιμωδών ασθενειών παγκοσμίως. Παιδιατρικά δεδομένα αποκαλύπτουν κρούσματα άσθματος, γενετικών ανωμαλιών, νευροαναπτυξιακών ανωμαλιών, καρκίνου, διαβήτη και αύξηση της παχυσαρκίας. Στον ενήλικο πληθυσμό, συναντώνται συχνά φαινόμενα καρδιαγγειακών παθήσεων, καρκίνου, παχυσαρκίας, αυτοάνοσων νοσημάτων, διαβήτη και μεταβολικών συνδρόμων.

Σε όλο τον κόσμο, δισεκατομμύρια ανθρώπων υποφέρουν από ασθένειες που σχετίζονται με την παχυσαρκία, όπως η δυσανεξία στη γλυκόζη, αντίσταση στην ινσουλίνη, και αυξημένη αρτηριακή πίεση. Οι πρόωροι θάνατοι από διαβήτη στις αναπτυσσόμενες περιοχές αποτελούν πρόβλημα ανάλογο με αυτό του HIV/AIDS, πρόβλημα όμως που ακόμα δεν έχει αναγνωρισθεί το μέγεθος του. Παλιότερα οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι καρδιακές προσβολές και τα εγκεφαλικά αποτελούσαν προβλήματα των βιομηχανικών χωρών, ενώ

πλέον φαίνεται να επηρεάζουν με ταχύτατο ρυθμό και αναπτυσσόμενες χώρες.

Επίσης, γυναικείες αναπαραγωγικές διαταραχές όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Polycystic Ovarian Syndrome, PCOS), ινομυώματα της μήτρας και η ενδομητρίωση είναι κύριες αιτίες υπογονιμότητας και στειρότητας, επηρεάζοντας σημαντικό ποσοστό γυναικών της αναπαραγωγικής ηλικίας. Μεγάλα ποσοστά (μέχρι 40%) των νέων ανδρών σε ορισμένες χώρες έχουν χαμηλής ποιότητας σπέρμα, γεγονός που μειώνει την ικανότητά τους να τεκνοποιήσουν. Ανησυχητική είναι και η αύξηση των πρόωρων τοκετών, ενώ οι γενετικές ανωμαλίες είναι η κύρια αιτία θανάτου βρεφών, όπως αυτή των αρσενικών αναπαραγωγικών οργάνων που αυξάνεται σε πολλές χώρες. Νευρολογικές διαταραχές, όπως δυσλεξία, νοητική καθυστέρηση, διαταραχή ελλειμματικής προσοχής/υπερκινητικότητα και αυτισμός απαντώνται όλο και συχνότερα στον παιδικό πληθυσμό (Bergman et al., 2012).

Η φαινομενική ομοιότητα μεταξύ ασθενειών και διαταραχών που αναφέρθηκαν σε ανθρώπους και σε διάφορους πληθυσμούς άγριων ζώων δεν είναι έκπληξη, δεδομένου ότι υπάρχει συχνά σημαντική επικάλυψη μεταξύ των περιβαλλόντων τους και των τροφικών αλυσίδων, καθώς και ομοιότητες στη φυσιολογία τους. Για παράδειγμα, η μη κάθοδος των όρχεων παρατηρήθηκε στο 68% των αρσενικών σε έναν πληθυσμό μαύρων ελαφιών στην Αλάσκα. Γενετικές δυσπλασίες, μείωση της ποιότητας του σπέρματος και μεταβολές στα επίπεδα των ορμονών του φύλου παρατηρήθηκαν σε αρσενικά ψάρια σε αστικές περιοχές και σε αμφίβια στις αγροτικές περιοχές. Υπάρχουν πρόσφατες ενδείξεις ότι τα ζώα που ζουν κοντά σε ανθρώπους έχουν την τάση να αυξάνουν το σωματικό τους βάρος. Όλες αυτές οι ασθένειες έχουν εκτός από γενετική και μια περιβαλλοντική συνιστώσα, άξια προς μελέτη, η οποία θα δώσει φως σε κοινές αιτίες των διαταραχών των οργανισμών και είναι ευκολότερο να εξεταστούν στα ζώα από ότι στον ανθρώπινο πληθυσμό. Η αναγνώριση ότι οι περισσότερες από τις διαταραχές αυτές συνδέονται με το ενδοκρινικό σύστημα, στρέφει την προσοχή των ερευνητών στην έκθεση του

περιβάλλοντος σε χημικές ουσίες και συγκεκριμένα στους Ε.Δ., μία υποκατηγορία χημικών ουσιών που διαταράσσουν την κανονική λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος, παρεμβαίνοντας στην φυσιολογική δράση των ορμονών (Bergman et al., 2012).

1.2.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΕΣ

Το ενδοκρινικό σύστημα αποτελείται από μια σειρά αδένων που εκκρίνουν ορμόνες απευθείας στο αίμα, το οποίο και τις μεταφέρει στα σημεία όπου επενεργούν. Οι ορμόνες είναι χημικά μόρια που δρουν ως μηνύματα για το συντονισμό της βιοχημικής δραστηριότητας των κυττάρων και των πολυκύτταρων οργανισμών και προκαλούν ορισμένες βιοχημικές τροποποιήσεις στη δραστηριότητα των οργάνων ή των κυττάρων όπου δρουν (όργανα-στόχοι ή κύτταρα-στόχοι). Αλληλεπιδρούν με συγγενείς πρωτεΐνες, που ονομάζονται υποδοχείς και χωρίς αυτές, δε μπορούν να εκφράσουν τις ιδιότητες τους. Οι υποδοχείς μπορούν να ταξινομηθούν σε 2 μεγάλες ομάδες:

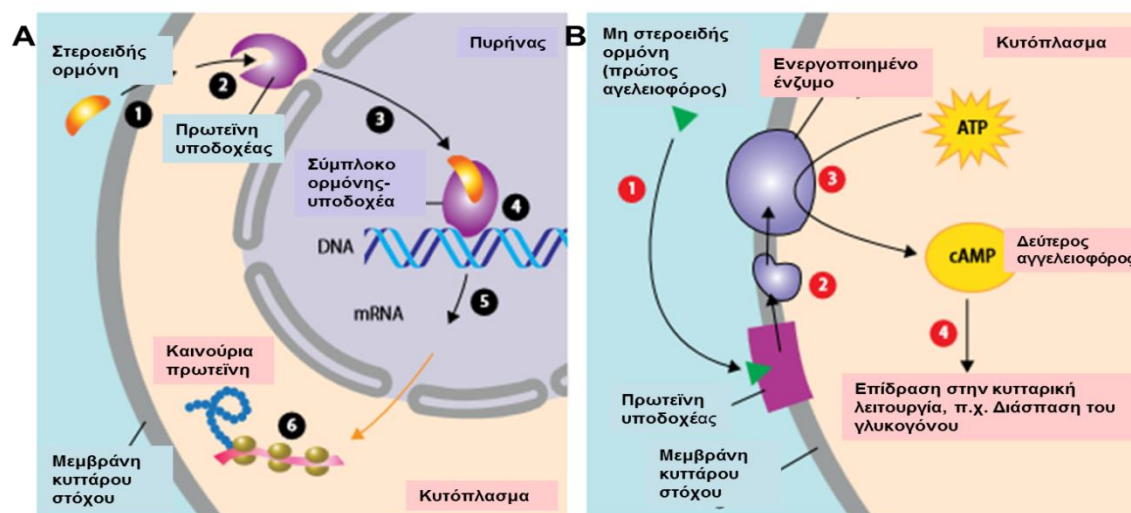
A) Στους μεμβρανικούς, όπου απαντούν σε πεπτιδικές ορμόνες, όπως η ινσουλίνη **(Εικόνα 5A)**.

B) Στους ενδοκυττάρους, όπου απαντούν σε μικρές λιπόφιλες ορμόνες, όπως οι στεροειδείς ορμόνες (Casals-Casas and Desvergne, 2011) **(Εικόνα 5B)**.

Στην περίπτωση των ενδοκυττάρων υποδοχέων (υποδοχείς για στεροειδείς και θυρεοειδικές ορμόνες), το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα δεσμεύεται σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA για τη ρύθμιση της διαδικασίας της γονιδιακής μεταγραφής με αποτέλεσμα τη βιοσύνθεση νέων πρωτεϊνών. Αυτές οι ορμόνες ρυθμίζουν διαφορετικά γονίδια σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων και σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης. Ενώ αυτή η ευελιξία είναι εν μέρει λόγω του ότι έχουν διαφορετικούς τύπους υποδοχέων σε διαφορετικά κύτταρα, υπάρχουν επίσης μηχανισμοί που επιτρέπουν στους ίδιους

υποδοχείς να έχουν διαφορετικά αποτελέσματα στα διάφορα κύτταρα. Αυτοί οι μηχανισμοί δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά περιλαμβάνουν μηχανισμούς που επιτρέπουν την ενεργοποίηση και την απενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων ανεξάρτητα της ορμόνης.

Οι μεμβρανικοί υποδοχείς βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη. Για παράδειγμα, η ινσουλίνη συνδέεται με τον μεμβρανικό υποδοχέα και διεγείρει τα κύτταρα να απορροφήσουν και να χρησιμοποιήσουν την γλυκόζη. Εφόσον ινσουλίνη συνδεθεί με τον υποδοχέα της, στο εσωτερικό του κυττάρου συμβαίνουν ειδικές διεργασίες ώστε να προκληθεί η απορρόφηση της γλυκόζης.



Εικόνα 5. (A) Μεμβρανικοί υποδοχείς, (B) Ενδοκυτταριοί υποδοχείς [τροποποιημένη από (Bergman et al., 2012)].

Οι ορμόνες είναι σημαντικές τόσο για τα σπονδυλωτά όσο και για τα ασπόνδυλα. Οι ορμόνες δρουν καθ' όλη την διάρκεια της ζωής. Τα αποτελέσματα αυτών όμως που δρουν κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης ή σε άλλο κρίσιμο για την ανάπτυξη στάδιο είναι αμετάβλητα. Είναι απαραίτητες για τον έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού διεργασιών στο σώμα, όπως η διαφοροποίηση των κυττάρων και ο σχηματισμός οργάνων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και ο έλεγχος της λειτουργίας των ιστών και

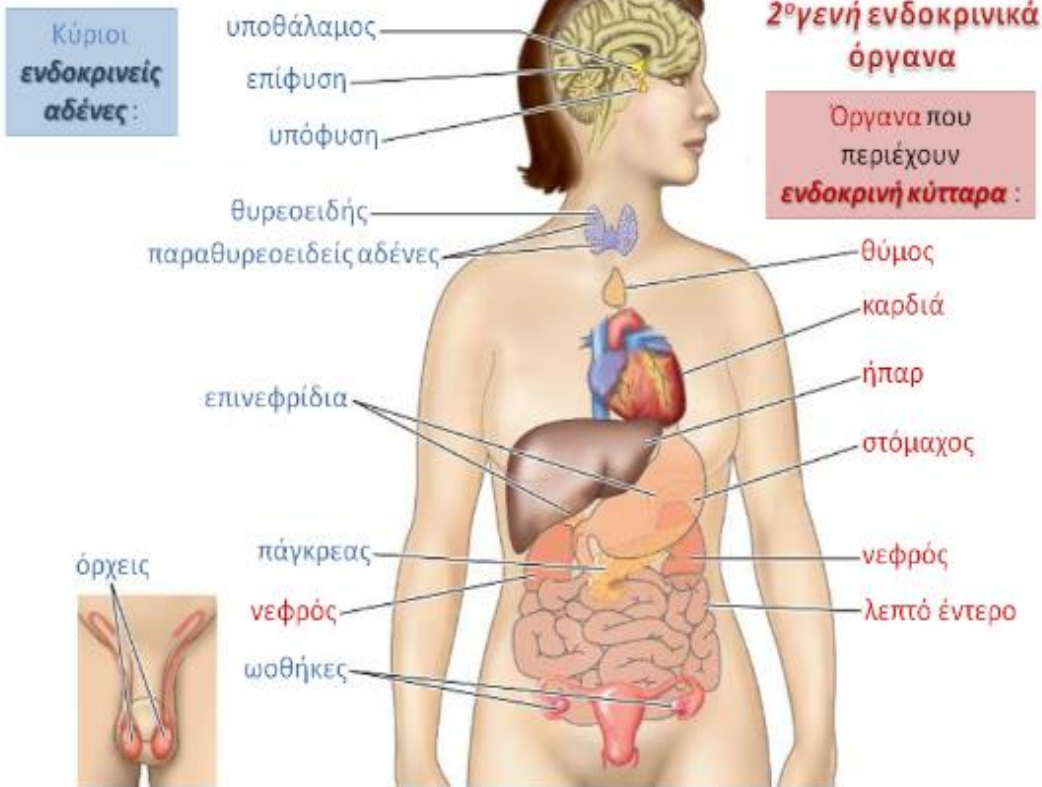
οργάνων στην ενήλικη ζωή. Ένα πολύ γνωστό παράδειγμα είναι αυτό της ινσουλίνης, μιας μικρής πρωτεϊνικής ορμόνης που παράγεται από εξειδικευμένα κύτταρα στο πάγκρεας που ονομάζονται β-κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα διεγείρονται και εκκρίνουν ινσουλίνη στο αίμα από την άμεση δράση του σακχάρου, γλυκόζη. Καθώς τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα αυξάνονται κατά τη διάρκεια και μετά από ένα γεύμα, αυτή εισέρχεται στα β-κύτταρα μέσω μίας ειδικής πρωτεΐνης-μεταφορέα στην κυτταρική μεμβράνη και μετατρέπεται μέσα στο κύτταρο σε μόρια υψηλής ενέργειας ATP. Αυτή η διαδικασία προκαλεί άμεσα αλλαγές στο εσωτερικό των β-κυττάρων, με αποτέλεσμα την έκκριση της ινσουλίνης, που είχε ήδη παραχθεί και αποθηκευτεί σε αναμονή αυτών των γεγονότων. Ινσουλίνη στη συνέχεια ταξιδεύει μέσω του αίματος σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς και κύτταρα. Ως αποτέλεσμα, τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα πέφτουν και σταματάει η έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό, η ινσουλίνη είναι σημαντική όχι μόνο για να διατηρούνται τα επίπεδα της γλυκόζης σε ένα αρκετά στενό εύρος στο αίμα, αλλά και για να μπορεί ο ιστός να χρησιμοποιεί την γλυκόζη για ενέργεια. Επιπλέον, η ινσουλίνη φθάνει στον εγκέφαλο, όπου επιδρά σημαντικά στην όρεξη.

Κατά τον ίδιο τρόπο, άλλες ορμόνες ελέγχουν σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες. Παραδείγματος χάρη, ορμόνες, όπως στεροειδή (οιστρογόνα, ανδρογόνα, προγεστίνες) και πρωτεΐνες (ωχρινοτροπίνη και γοναδιοτροπίνη) ελέγχουν τις πολύπλοκες φυσιολογικές διαδικασίες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή. Οι θυρεοειδικές ορμόνες ελέγχουν τις μεταβολικές διαδικασίες και συντονίζουν άλλες ορμόνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση του σωματικού βάρους, της όρεξης και του μεταβολισμού. Εκτός από αυτές τις δράσεις τους, πολλές ορμόνες ελέγχουν επίσης τη δική τους έκκριση. Για παράδειγμα, η έκκριση ορμονών του θυρεοειδούς διεγείρεται από μία πρωτεϊνική ορμόνη της υπόφυσης, την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη, και θυρεοειδικές ορμόνες με τη σειρά τους καταστέλλουν την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη. Το ενδοκρινικό σύστημα περιλαμβάνει αδένες όπως την υπόφυση στη βάση του εγκεφάλου, τον θυρεοειδή αδένα στο λαιμό, τα επινεφρίδια στην κοιλιά δίπλα στα νεφρά, τις

γονάδες και ορισμένα τμήματα του παγκρέατος. Εκτός από αυτούς τους εξειδικευμένους ενδοκρινείς αδένες, άλλα όργανα, όπως η καρδιά, το σωματικό λίπος, μύες, το ήπαρ, το εντερικό σύστημα και τα νεφρά έχουν δευτερογενείς ενδοκρινικές λειτουργίες και επίσης εκκρίνουν ορμόνες **(Εικόνα 6)**.

Ένας μεγάλος αριθμός αναπτυξιακών προβλημάτων, ασθενειών και διαταραχών είναι γνωστά ότι προκαλούνται από τη μη-κανονική λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος. Επίσης, είναι πλέον σαφές ότι διαταραχές των ορμονών που ασκούν δράση κατά την περίοδο του εμβρύου, επηρεάζουν ή υπαγορεύουν τις λειτουργίες του ενδοκρινικού συστήματος στον ενήλικα. Η γνώση που έχει αποκτηθεί με τη μελέτη του ορμονικού συστήματος και των αντίστοιχων ασθενειών, μας δίνει την δυνατότητα να αναγνωρίσουμε και να ταυτοποιήσουμε χημικές ουσίες που παρεμβαίνουν στην λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος και να αξιολογήσουμε τις επιπτώσεις της έκθεσης των οργανισμών και του περιβάλλοντος σε αυτές.

1^ογενή ενδοκρινικά όργανα



Εικόνα 6. Ενδοκρινικό σύστημα του ανθρώπου.

1.2.3 ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΩΝ

Ο όρος ενδοκρινικός διαταράκτης όπως ορίζεται από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας είναι μια εξωγενής ουσία ή μείγμα που αλλοιώνει λειτουργία (-ες) του ενδοκρινικού συστήματος και, κατά συνέπεια, προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία σε έναν ανέπαφο οργανισμό, ή στους απογόνους του, ή σε (υπο) πληθυσμούς (Damstra et al., 2002). Ο όρος αυτός επινοήθηκε από την Ana Soto και τους συνεργάτες της, οι οποίοι ταυτοποίησαν έναν αριθμό αναπτυξιακών επιδράσεων των Ε.Δ. σε ανθρώπους, ζώα και άλλους οργανισμούς (Casals-Casas and Desvergne, 2011).

Διαταράκτες του ενδοκρινικού συστήματος μπορεί να προέρχονται από φυσικές πηγές όπως από ζώα, ανθρώπους ή και από τα φυτά (φυτοοιστρογόνα). Ωστόσο, ως επί το πλείστον η διεθνή ανησυχία αυτή τη στιγμή επικεντρώνεται σε συνθετικές χημικές ουσίες-διαταράκτες του ενδοκρινικού συστήματος. Η ανησυχία αυτή ενισχύεται περαιτέρω από την επέκταση της παραγωγής χημικών προϊόντων, η οποία έχει φτάσει πλέον 400 εκατομμύρια τόνους σε παγκόσμιο επίπεδο, και την αύξηση της ρύπανσης από αυτές. Ως εκ τούτου, οι επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία μέσω γνωστών ή άγνωστων επιδράσεων αυτών των χημικών ουσιών στο ορμονικό σύστημα είναι μεγάλες.

Λόγω του ότι πολλές ουσίες που διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα είναι μικρές λιπόφιλες ενώσεις, η είσοδος μέσω των ενδοκυττάρων υποδοχέων προκαλεί αλλοίωση στην έκφραση των γονιδίων, όπως συμβαίνει με την λειτουργία των υποδοχέων των οιστρογόνων και των ανδρογόνων.

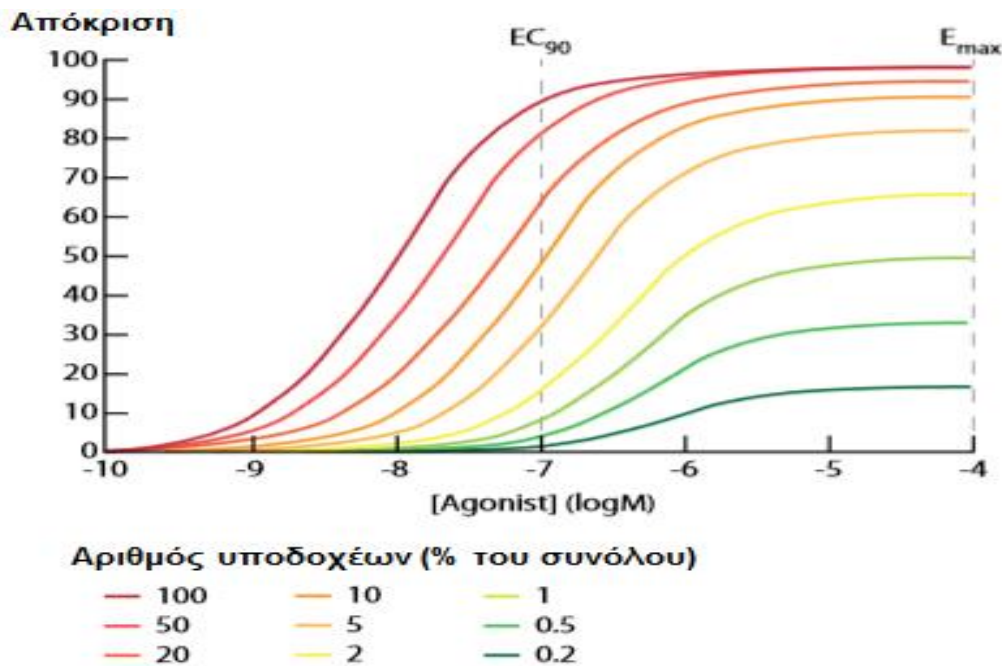
Οι Ε.Δ. λειτουργούν στον οργανισμό με διάφορους τρόπους:

1. Μιμούνται την βιολογική δραστηριότητα μίας ορμόνης, καθώς προσδένονται στον κυτταρικό υποδοχέα και προκαλούν την φυσική, μη επιθυμητή στην προκειμένη περίπτωση, απόκριση του κυττάρου σε λάθος στιγμή ή σε υπερβολική έκταση (agonistic effect).
2. Προσδένονται στον υποδοχέα χωρίς να τον ενεργοποιούν, αλλά η παρουσία τους εμποδίζει την πρόσδεση της φυσικής ορμόνης (antagonistic effect).
3. Προσδένονται στις πρωτεΐνες μεταφοράς στο αίμα και μεταβάλλουν έτσι την ποσότητα των φυσικών ορμονών στην κυκλοφορία του αίματος.
4. Μπορούν μέσω των μεταβολικών διαδικασιών του οργανισμού να επηρεάσουν την σύνθεση, τα ποσοστά διάσπασης και απελευθέρωσης των ορμονών (Kolle et al., 2012).

Οι Ε.Δ. μπορούν να δράσουν σε χαμηλές δόσεις, ακόμη και αν η συγγένειά τους με τους υποδοχείς της ορμόνης είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτήν της φυσικής ορμόνης. Επιπλέον, οι διαφορές στην αφθονία των υποδοχέων έχουν μια πολύ μεγάλη επίδραση στη

συγκέντρωση των ορμονών (ή Ε.Δ.) που απαιτούνται για να παραχθεί ένα αποτέλεσμα. Στο παρακάτω γράφημα φαίνεται ξεκάθαρα ότι όσο η συγκέντρωση των υποδοχέων αυξάνεται, τόσο πιο «ισχυρή» γίνεται η ορμόνη ή ο Ε.Δ., δηλαδή απαιτείται μικρότερη ποσότητα ορμόνης για να παράγει το ίδιο αποτέλεσμα (**Εικόνα 7**).

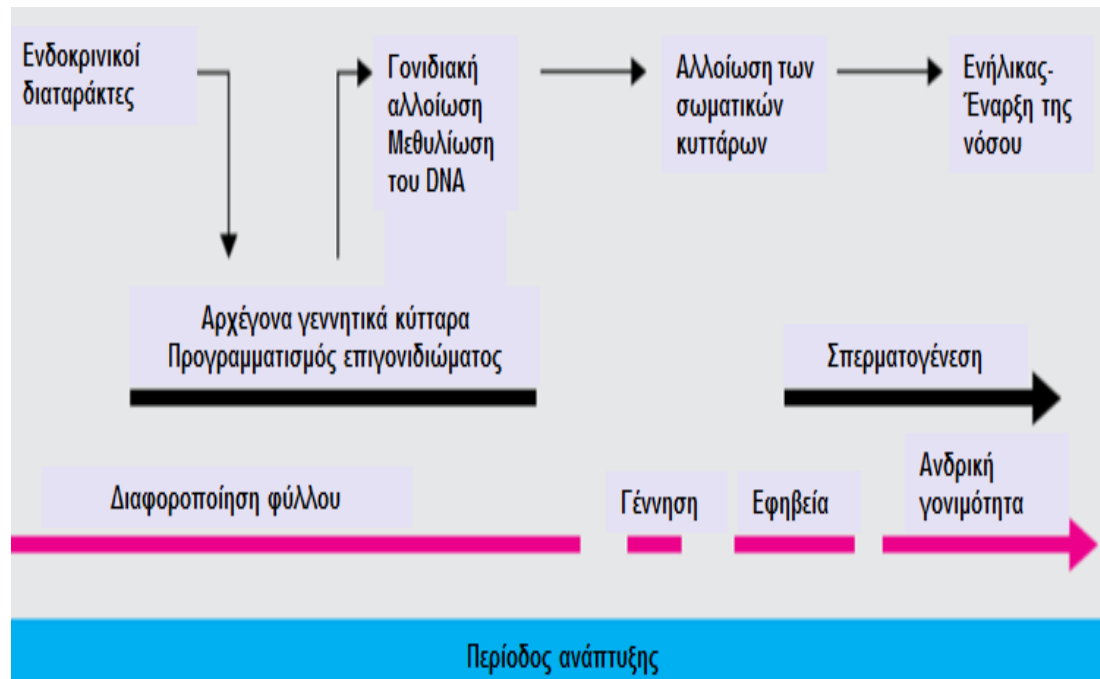
Οι Ε.Δ. μπορούν να δράσουν καθ' όλη την διάρκεια της ζωής ακριβώς όπως δρουν οι ορμόνες. Όταν ένας οργανισμός εκτεθεί σε χημικές ουσίες με χαρακτηριστικά Ε.Δ. κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, θα επηρεαστούν ο προγραμματισμός των κυττάρων και η ανάπτυξη των ιστών και, επομένως, τα αποτελέσματά τους αναμένεται να είναι μόνιμα. Φυσικά, το αποτέλεσμα μπορεί να μην είναι ορατά μέχρι την ενηλικίωση σε ορισμένες περιπτώσεις. Αν ο οργανισμός εκτεθεί στον ίδιο Ε.Δ. σε άλλο στάδιο της ζωής του, οι επιπτώσεις μπορεί να είναι διαφορετικές και παροδικές. Αυτό μπορεί να είναι πιο πιθανό για τις χημικές ουσίες που δεν παραμένουν στο σώμα (π.χ. πολλά Φ.Π.), από ότι για τις χημικές ουσίες που είναι έμμονες (π.χ. επιβραδυντικά φλόγας, POPs).



Εικόνα 7. Όσο η συγκέντρωση των υποδοχέων αυξάνεται, απαιτείται μικρότερη ποσότητα ορμόνης για να παράγει το ίδιο αποτέλεσμα [Τροποποιημένη, (Charlton, 2009)].

Οι Ε.Δ. που δρουν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μπορούν ακόμα να μεταβάλλουν το επιγονιδίωμα του οργανισμού, δηλαδή τον συνδυασμό των γονιδίων που μπορούν ή δεν μπορούν να εκφραστούν. Αν και οι μηχανισμοί που διέπουν αυτά τα αποτελέσματα είναι ένας σχετικά νέος τομέας μελέτης, μία εκδήλωση μίας ενδοκρινικής διαταραχής είναι να αλλάξει ένα μικρό υποσύνολο των επιγενετικών μηχανισμών που εξαρτώνται από ορμόνες και έτσι να μεταβάλλουν την ανάπτυξη. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι Ε.Δ. παράγουν κληρονομικές "διαγενεαλογικές" επιδράσεις ως αποτέλεσμα της ικανότητάς τους να μεταβάλλουν επιγενετικές διεργασίες. Η επίπτωση αυτή παρατηρήθηκε όταν ένα μυκητοκτόνο (Vinclozolin) με αντιανδρογονικές ιδιότητες δόθηκε σε νεαρά ποντίκια εφάπαξ, όταν οι όρχεις ήταν σε ένα κρίσιμο στάδιο της ανάπτυξης. Το Vinclozolin είχε αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των όρχεων, και το αποτέλεσμα αυτό μεταβιβάστηκε στις επόμενες τρεις γενιές των ποντικών (Skinner et al., 2011). Αυτή η επίδραση είναι

πιθανόν να προκαλείται από επιγενετικές αλλαγές που μεταβιβάστηκαν από μία γενιά στην άλλη, μέσω των γεννητικών κυττάρων (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8. Μηχανισμός με τον οποίο οι Ε.Δ. μπορούν να επιδράσουν στην μετάδοση μίας νόσου από γενιά σε γενιά. Η έκθεση σε EDCs κατά την περίοδο του προγραμματισμού των γεννητικών κυττάρων μπορεί να μεταβάλει επιγενετικά σήματα τα οποία στη συνέχεια μεταδίδονται τόσο στα γεννητικά κύτταρα (δηλαδή, γαμέτες) και μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού στις μελλοντικές γενεές, καθώς και στα σωματικά κύτταρα που αναπτύσσονται στα έμβρυα αλλάζοντας έτσι την ανάπτυξη των ιστών [τροποποιημένη, (Skinner and Guerrero-Bosagna, 2009)].

1.2.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΩΝ

Εκατοντάδες συνθετικές και φυσικές χημικές ουσίες είναι ύποπτες ότι αλληλεπιδρούν με το ενδοκρινικό σύστημα των ανθρώπων και των ζώων. Οι πηγές των ουσιών αυτών, οι χημικές τους ιδιότητες, και η τύχη τους στο περιβάλλον ποικίλλουν ευρέως. Οι χημικές ουσίες με χαρακτηριστικά Ε.Δ. που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα έχουν μεγάλη ποικιλία μοριακών δομών. Οι άνθρωποι και τα ζώα εκτίθενται σε ένα ευρύ αριθμό Ε.Δ. μέσα από μια ποικιλία διαδρομών και τα επίπεδα των συγκεντρώσεων που βρίσκονται στους

ιστούς τους εξαρτώνται από περιβαλλοντικούς και κοινωνικοοικονομικούς παράγοντες. Παρά την γνώση που έχει αποκτηθεί για τα είδη των Ε.Δ. που βρίσκονται στο περιβάλλον, εξακολουθούν να υπάρχουν κενά.

Κάποιοι Ε.Δ. είναι έμμονοι στο περιβάλλον, βιοσυσσωρεύονται μέσω τροφικών πλεγμάτων σε υψηλές συγκεντρώσεις στα ζώα και ανθρώπους, και μπορούν να μεταφερθούν στο αναπτυσσόμενο έμβρυο και το νεογέννητο μέσω του πλακούντα ή το μητρικό γάλα, αντίστοιχα. Άλλοι Ε.Δ. είναι λιγότερο έμμονοι στο περιβάλλον και δεν παραμένουν στον άνθρωπο και στα ζώα για πολύ καιρό (μικρό χρόνο ημιζωής), όπως η δισφαινόλη Α με χρόνο ημιζωής 4-8 ώρες. Παρόλα αυτά όμως, οι επιπτώσεις τους στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων είναι ανησυχητική, εξαιτίας της συνεχόμενης έκθεσης των οργανισμών σε αυτές.

Αρκετά Φ.Π., έχουν χαρακτηριστεί ως Ε.Δ. και άλλα ως ύποπτα για ενδοκρινικές διαταραχές. Ως Φ.Π. θεωρείται οποιαδήποτε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζονται για την πρόληψη καλλιεργειών από παράσιτα, την καταστροφή, την απώθηση, ή η μείωση των παρασίτων. Αρκετές εκατοντάδες διαφόρων χημικών ουσιών χρησιμοποιούνται ως παρασιτοκτόνα, και η έκθεση του ανθρώπου σε αυτά είναι αναπόφευκτη. Οι κυριότερες ομάδες Φ.Π. που έχουν έμμονο χαρακτήρα είναι οργανοχλωριωμένα Φ.Π. (OCPs), οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά, τριαζίνες, και πυρεθροειδή. Ακόμα και αν πολλά οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα έχουν απαγορευθεί από τις περισσότερες χώρες, όπως το DDT, συγκεντρώσεις αυτών εξακολουθούν να υπάρχουν στο περιβάλλον. Οργανοχλωριωμένα Φ.Π. ανιχνεύονται στο ανθρώπινο μητρικό γάλα και στο λιπώδη ιστό και μπορεί να εμφανίζουν οιστρογονική, αντι-οιστρογονική, ή αντιανδρογόνο δράση. Υπάρχουν επίσης υποψίες ότι συνδέονται με τον καρκίνο του μαστού.

Άλλες ουσίες που έχουν χαρακτηριστεί ως Ε.Δ. είναι οι έμμονοι οργανικοί ρύποι π.χ. διοξίνες (PCBs), οι πλαστικοποιητές και άλλα πρόσθετα π.χ. φθαλικές ενώσεις (DEHP, TPP), οι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες π.χ. το βενζο[α]πυρένιο (BaP), οι αλογονωμένες και μη αλογονωμένες φαινολικές ενώσεις π.χ. PCP, 2,4,6-τριβρωμοφαινόλη,

triclosan, τα φαρμακευτικά προϊόντα, οι αυξητικοί παράγοντες και τα προϊόντα προσωπικής φροντίδας π.χ. οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI) και η 17β-trenbolone, τα μέταλλα και οργανομεταλλικές χημικές ουσίες π.χ. το αρσενικό, το κάδμιο, ο μόλυβδος και οι φυσικές ορμόνες και τα φυτοοιστρογόνα π.χ. η τεστοστερόνη, η οιστραδιόλη, η προγεστερόνη.

1.3 ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ

Το ζήτημα των Ε.Δ. κίνησε την δημόσια και πολιτική ανησυχία, με αποτέλεσμα η Ευρωπαϊκή Επιτροπή να θέσει μία «στρατηγική για τους Ε.Δ.» το 1999. Αυτή έθετε μία σειρά από δράσεις σε ευρωπαϊκό επίπεδο, που περιελάμβανε βραχυπρόθεσμα (έρευνα και διεθνή συνεργασία), μεσοπρόθεσμα (δοκιμαστικές μεθόδους) και μακροπρόθεσμα (regulatory) βήματα, με στόχο την μείωση της έκθεσης των ευρωπαίων πολιτών σε Ε.Δ. Στους τομείς των βιοκτόνων και των Φ.Π. η νομοθεσία καθορίζει ρυθμιστικές συνέπειες για τους Ε.Δ.. Απαιτεί, επίσης, από την Επιτροπή να τεθούν τα επιστημονικά κριτήρια που ορίζουν τους Ε.Δ.

Η Επιτροπή έχει επιστήσει ιδιαίτερη προσοχή στο έργο της ανάπτυξης κριτηρίων για αυτούς τους δύο τομείς. Το αποτέλεσμα αποτυπώνεται σε δύο σχέδια μέτρων που θα είναι τώρα το αντικείμενο των καθιερωμένων διαδικασιών με εμπειρογνώμονες από τα κράτη μέλη και τα άλλα θεσμικά όργανα της Ε.Ε., πριν από την τελική έγκριση από την Επιτροπή (EC, 2016).

Το καλοκαίρι του 2016 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή πρότεινε επιστημονικά κριτήρια για την ταυτοποίηση των Ε.Δ. στο πλαίσιο της νομοθεσίας της Ε.Ε. για τα Φ.Π. προϊόντα και τα βιοκτόνα. Εφόσον τα κριτήρια τεθούν σε εφαρμογή, θα πρέπει να διασφαλιστεί η εφαρμοσιμότητα τους χωρίς καθυστερήσεις από τις υπόλοιπες αρχές της Ε.Ε. Η EFSA και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Χημικών Προϊόντων (European Chemicals Agency, ECHA), με την υποστήριξη του Κοινού Κέντρου Ερευνών της Επιτροπής, θα έχουν

ολοκληρώσει και δημοσιεύσει μέχρι το επόμενο έτος οδηγίες που θα παρέχουν πληροφορίες για τις διαδικασίες σύνταξης και έγκρισης (EFSA, 2016b).

Η επιστημονική επιτροπή της EFSA, ακολουθώντας τον ορισμό που εισήγαγε ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας για τους Ε.Δ., έθεσε τρία κριτήρια που ορίζουν έναν Ε.Δ. Αυτά είναι τα εξής:

1. Η παρουσία μίας δυσμενής επίδρασης σε έναν ανέπαφο οργανισμό ή υποπληθυσμό.
2. Η παρουσία μίας ενδοκρινικής δραστηριότητας.
3. Η λογική και αποδεδειγμένη σχέση μεταξύ της ενδοκρινικής δραστηριότητας και της δυσμενής επίδρασης (EFSA, 2013).

1.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΥΣ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ

Ο Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (ΟΟΣΑ-Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) έχει επικυρώσει πρωτόκολλα για τον έλεγχο πρόκλησης ενδοκρινικής διαταραχής από χημικές ουσίες καθώς και η ανάπτυξη και άλλων μεθόδων είναι ακόμα σε εξέλιξη. Αυτά είναι:

- Υπολογιστική τοξικολογία: Εφαρμογή *in silico* μεθόδων, συνδυάζοντας αξιόπιστα ειδικά προγράμματα.
- *In vitro* πειράματα για τον έλεγχο της στερεοειδογόνου δραστηριότητας (estrogen, androgen, or thyroid hormone systems, EATS) στα συστήματα των θηλαστικών.
 - *In vivo* EATS πειράματα σε σπονδυλωτά
 - Non-EATS πειράματα σε σπονδυλωτά
 - EATS και Non-EATS σε ασπόνδυλα

Δεν είναι όμως δυνατό μία μόνο μέθοδος να παρέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για να αποφασιστεί κατά πόσον μια ουσία είναι Ε.Δ.. Είναι αναγκαία η παροχή πληροφοριών που δείχνουν πως η ουσία αλληλεπιδρά με το ενδοκρινικό σύστημα και που περιγράφουν τις αρνητικές συνέπειες που μπορεί αυτή η αλληλεπίδραση να προκαλέσει (EFSA, 2013).

1.5 ΟΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ «OMICS» - ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΓΟΝΙΔΙΟΜΑΤΙΚΗ «ECOTOXICOGENOMICS»

Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές όλο και περισσότερο υιοθετούν τις λεγόμενες «ομικές» τεχνικές (-omics) για τον έλεγχο της ποιότητας και ασφάλειας του περιβάλλοντος και των τροφίμων (Garcia-Reyero and Denslow, 2006). Ο όρος «omics» περιλαμβάνει διάφορες τεχνικές, όπως τη γονιδιοματική (genomics), μεταγραφομική (transcriptomics), την πρωτεομική (proteomics) και την μεταβολομική (metabolomics) οι οποίες εξετάζουν αντίστοιχα τον πολυμορφισμό των γονιδίων, τη μεταγραφή του mRNA, τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και μεταβολιτών (Garcia-Reyero and Denslow, 2006). Λόγω του μεγάλου όγκου και της πολυπλοκότητας των δεδομένων που αποκτώνται από τις «ομικές», απαιτείται προηγμένη ανάλυσή τους με χρήση εξελιγμένων λογισμικών βιοπληροφορικής (bioinformatics). Οι μελέτη των Ε.Δ. είναι ένα από τα πεδία έρευνας της οικοτοξικολογίας, στο οποίο οι «ομικές» μπορούν να διαδραματίσουν πολύ σημαντικό ρόλο.

Ο όρος οικοτοξικογονιδιοματική (ecotoxicogenomics) αναφέρεται στην ενσωμάτωση «ομικών» τεχνικών στην οικοτοξικολογία που βασίζονται σε μεταγραφομική, πρωτεομική ή μεταβολομική (Oliveira et al., 2016). Λαμβάνοντας υπόψη την ανάγκη να εξισορροπηθούν οι όλο και αυξανόμενες απαιτήσεις για οικοτοξικολογικά δεδομένα, είναι απαραίτητο να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή γνώσης από περιορισμένες δοκιμές με κατώτερα σπονδυλωτά, προκειμένου να μειωθούν μελλοντικά οι δοκιμές οικοτοξικότητας. Οι τεχνικές

ecotoxicogenomics είναι πιθανό να παρέχουν ένα ζωτικό ρόλο στο πλαίσιο αυτό (Snape et al., 2004). Αυτή η προσέγγιση έχει περιγραφεί (Moore, 2002), προσδιορίζοντας την ανάγκη να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς τοξικότητας, την ανάπτυξη μοντέλων προσομοίωσης και τοξικών επιδράσεων, να συνδεθούν μοριακοί και κυτταρικοί βιοσημαντές (biomarkers) με ανώτερα επίπεδα του πληθυσμού και του οικοσυστήματος και να χρησιμοποιηθεί αυτή η γνώση για να προβλέψει τα πιθανά ζητήματα αξιολόγησης του οικολογικού κινδύνου για νέες χημικές ουσίες και αναδυόμενες τεχνολογίες μέσω κατασκευής προγνωστικών μοντέλων. Επιπλέον, είναι αναγκαίο να γίνει μια πιο ολιστική προσέγγιση της οικοτοξικολογίας, κάτι που είναι εφικτό με τη δύναμη των «ομικών» για την κατανόηση των επιπτώσεων των τοξικών ουσιών στους οργανισμούς (Snape et al., 2004). Οι «ομικές» μαζί με τα κατάλληλα εργαλεία θα σηματοδοτήσουν το μέλλον της αξιολόγησης των ενδοκρινικών διαταραχών στην άγρια ζωή και στους ανθρώπους (Oliveira et al., 2016).

1.6 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

Η μεταβολομική είναι μία ραγδαία αναπτυσσόμενη «ομική» τεχνική και αποτελεί μία υψηλής ρυθμοαπόδοσης μέθοδο για την αξιολόγηση και κατανόηση της επίδρασης της έκθεσης βιολογικών συστημάτων σε βιοδραστικούς παράγοντες μέσω της μελέτης του μεταβολισμού τους (Aliferis and Jabaji, 2011). Ως μεταβολομική ορίζεται η ποσοτική και η ποιοτική ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011, Fiehn, 2002), όπως αμινοξέα, λιπίδια, υδατάνθρακες, ορμόνες κ.ά. Βάση του κεντρικού δόγματος της μοριακής βιολογίας, η γονιδιοματική, η μεταγραφομική και η πρωτεομική παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το τι αναμένεται να συμβεί σε ένα βιολογικό σύστημα, ενώ η μεταβολομική παρέχει πληροφορίες σχετικά με το τι ακριβώς

συμβαίνει σε αυτό, συνδέοντας τη λειτουργία του γονιδιώματος με το φαινότυπο (Aliferis and Jabaji, 2011). Το μεγάλο πλεονέκτημα που παρέχει είναι η ταυτόχρονη παρακολούθηση των μεταβολικών δικτύων κατά τρόπο που να επιτρέπει τη σύνδεση των αλλαγών σε αυτά με τους βιοτικούς και/ή αβιοτικούς παράγοντες που τις προκαλούν και την ανίχνευση των αντίστοιχων μεταβολικών-βιοσημαντών (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Η μεταβολή στη συγκέντρωση των μεταβολικών αντανάκλαται στην φυσιολογία και τον φαινότυπο των οργανισμών που έχουν υποστεί την επίδραση κάποιου βιοδραστικού παράγοντα. Σε πειράματα έρευνας και ανάπτυξης Φ.Π., η μεταβολομική αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την υψηλής ρυθμοαπόδοσης επιλογή βιοδραστικών ουσιών ή παραγόντων, ώστε να ανακαλυφθούν και να επιλεγθούν εκείνες με τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, νέους μηχανισμούς δράσης και βελτιωμένα οικοτοξικολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες. Αυτό είναι δυνατό με την εξέλιξη των αναλυτικών οργάνων και κατασκευή λογισμικών για την ανάλυση μεγάλου όγκου δεδομένων και μεταβολικών βάσεων δεδομένων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Η μεταβολομική είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ολοκληρωμένη μελέτη της φυσιολογίας των οργανισμών, που περιλαμβάνει εκτός από χημικές αναλύσεις και την εξαγωγή δεδομένων, τον πειραματικό σχεδιασμό και την εκτέλεση, την προεπεξεργασία των δεδομένων, αναλύσεις βιοπληροφορικής, και τη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Κεντρικό ρόλο στη μεταβολομική έχει η επιλογή της αναλυτικής πλατφόρμας που θα χρησιμοποιηθεί για τις αναλύσεις των δειγμάτων. Η επιλογή εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες και η χημική σύνθεση των δειγμάτων, ο σκοπός της μελέτης, και τα διαθέσιμα όργανα και τεχνογνωσία. Αν και έχουν αναπτυχθεί αρκετά αναλυτικά όργανα για την μεταβολομική, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR) και η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS) έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κύριο λόγο σε μελέτες μεταβολομικής (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

1.6.1 ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ

Η πλειοψηφία των μεταβολομικών μελετών έχει γίνει με την χρήση NMR (Ralston-Hooper et al., 2008) και MS (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Το NMR έχει υψηλή επαναληψιμότητα και ελαχιστοποιεί τις απαιτήσεις κατά την προετοιμασία των δειγμάτων. Παρουσιάζει όμως κάποιους περιορισμούς, όπως είναι η σχετικά χαμηλή ευαισθησία (όριο ανίχνευσης 1-5 μM) που έχει σαν αποτέλεσμα την ανίχνευση περιορισμένου σχετικά αριθμού μεταβολιτών, το υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης του οργάνου και η δυσκολία αναγνώρισης των μεταβολιτών σε πολύπλοκα δείγματα μέσα από βάσεις δεδομένων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Δεδομένου ότι τα βιολογικά δείγματα είναι αρκετά πολύπλοκα, ο χαρακτηρισμός του συνόλου των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος είναι δύσκολος και απαιτεί το συνδυασμό περισσότερων του ενός αναλυτικών μηχανημάτων.

Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι η χρήση υγρής (Liquid Chromatography, LC) ή αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC) για τον διαχωρισμό των μεταβολιτών και MS για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους (Ralston-Hooper et al., 2008). Η MS παρέχει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης μειονεκτεί όμως ως προς την επαναληψιμότητα, που είναι χαμηλότερη σε σχέση με την NMR (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Επιπλέον, η δύο διαστάσεων GC σε συνδυασμό με ανιχνευτή πτήσης ιόντων (Time of Flight, TOF) και φασματομετρία μάζας (GCxGC/TOF-MS) έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον χαρακτηρισμό των μεταβολικών προφίλ σε πολύπλοκα βιολογικά μείγματα (Hope et al., 2005, Welthagen et al., 2005, Mohler et al., 2006). Τα πλεονεκτήματα της GCxGC/TOF-MS αφορούν στο ότι επιτυγχάνει μεγάλο διαχωρισμό κορυφών, οπότε η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών είναι ακριβής (Ralston-Hooper et al., 2008, Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Η LC σε συνδυασμό με ανιχνευτή Orbitrap είναι από τις πιο πρόσφατες εξελίξεις των αναλυτικών οργάνων. Η είσοδος του Orbitrap MS άνοιξε νέους ορίζοντες στη εφαρμογή της μεταβολομικής, το

οποίο αποτελεί έναν κορυφαίο ανιχνευτή μάζας με μεγάλη διακριτική ικανότητα και ακρίβεια μάζας (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

1.6.2 ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Αρχικά, ενώσεις που δεν σχετίζονται με το βιολογικό υλικό που αναλύεται πρέπει να ανιχνευθούν και να αποκλειστούν από την περαιτέρω ανάλυση. Τέτοια σήματα είναι συνήθως αποτέλεσμα ρύπανσης του οργάνου ή των δειγμάτων, προσμείξεις του διαλύτη και των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στα διάφορα στάδια επεξεργασίας των δειγμάτων. Μη ανίχνευση αυτών των σημάτων θα έχει ως αποτέλεσμα την λανθασμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση του τυφλού δείγματος, το οποίο έχει παρασκευαστεί σύμφωνα με τα ίδια πρωτόκολλα όπως τα βιολογικά δείγματα, είναι πολύ χρήσιμη για την ανίχνευση τέτοιων σημάτων. Στη συνέχεια, τα φάσματα ευθυγραμμίζονται βάση του χρόνου κατακράτησης (retention time, RT), του λόγου μάζας/φορτίου (m/z) ή της χημικής μετατόπισης (NMR). Επιπροσθέτως, πολλαπλά σήματα που προκύπτουν από μία απλή ένωση θα πρέπει να ανιχνεύονται. Τέλος, τα φάσματα υποβάλλονται σε πολυπαραγοντική ανάλυση για την ανίχνευση των τάσεων και των βιοσημαντών (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

1.6.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η πολυπαραγοντική ανάλυση είναι η στατιστική προσέγγιση για την ανάλυση του τεράστιου όγκου των δεδομένων που προέρχονται από πειράματα μεταβολομικής. Η εφαρμογή της μεθόδου μερικών ελαχίστων τετραγώνων-διακριτικής ανάλυσης (Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA) επιτυγχάνει μια περιστροφή της προβολής για να ανακαλυφθούν οι κρυφές μεταβλητές που συμβάλλουν στο διαχωρισμό των κατηγοριών. Έτσι, η

ανίχνευση των πλέον σημαντικών μεταβλητών (βιοσημαντές) των παρατηρούμενων διαχωρισμών πρέπει να βασίζεται στο PLS-DA. Τα ορθογώνιος PLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis OPLS-DA) είναι μια εναλλακτική μέθοδος που έχει σχεδιαστεί για να χειριστεί την διακύμανση στον άξονα X ο οποίος είναι κάθετος ως προς τον άξονα Y . Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για τη διάκριση μεταξύ των επεμβάσεων και την ανίχνευση βιοσημαντών σε πειράματα μεταβολομικής.

Επιπλέον, η multi-block πολυπαραγοντική ανάλυση σε συνδυαστικά δεδομένα που λαμβάνονται από διαφορετικές αναλυτικές πλατφόρμες φαίνεται να είναι μια ισχυρή στατιστική μέθοδος η οποία παρέχει πολύτιμες πληροφορίες συμπληρωματικές για την αναγνώριση ουσιών σε πολύπλοκα δείγματα. Προεπεξεργασμένες μήτρες δεδομένων λαμβάνονται από διαφορετικές αναλυτικές πλατφόρμες και συνδυάζονται σε μία ενιαία μήτρα και στη συνέχεια υποβάλλονται σε multi-block πολυπαραγοντικές αναλύσεις όπως multi-block PLS-DA.

Η ιεραρχική ομαδοποίηση (Hierarchical Clustering Analysis, HCA) είναι μια στατιστική μεθοδολογία που παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την ομαδοποίηση μεγάλου αριθμού επεμβάσεων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά της PLS-DA. Η HCA αποσκοπεί στην ομαδοποίηση των επεμβάσεων που βρίσκονται η μία κοντά στην άλλη. Ο υπολογισμός των αποστάσεων των ομάδων βασίζεται σε αλγόριθμους. Τα αποτελέσματα του HCA παρουσιάζονται σε δένδρογράμματα, όπου οι παρατηρήσεις απεικονίζονται σε σχέση με τις αποστάσεις.

Ένα ακόμα σημαντικό εργαλείο για την ανάλυση και την οπτικοποίηση των μεταβολικών δεδομένων είναι τα heatmaps. Τα heatmaps παρουσιάζουν οπτικοποιημένα, χρησιμοποιώντας διάφορους χρωματισμούς, την διακύμανση των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών σε σχέση με τις επεμβάσεις και αποκαλύπτουν τάσεις ή και ομοιότητες στην συμπεριφορά των μεταβολιτών μεταξύ των επεμβάσεων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

1.6.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Στη βιβλιογραφία είναι λίγα τα άρθρα που εφαρμόζουν και συνδυάζουν τη μεταβολομική ανάλυση με τη μελέτη Ε.Δ. Η εφαρμογή της μεταβολομικής σε οικοτοξικολογικές μελέτες βρίσκεται ακόμα σε αρχικό στάδιο (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Η αξία όμως της μεταβολομικής στη διαλεύκανση των φυσιολογικών διαδικασιών που εμπλέκονται στην χημική τοξικότητα, συμπεριλαμβανομένων των ενδοκρινικών διαταραχών, αναγνωρίζεται γενικά (Oliveira et al., 2016).

Υδροχαρή φυτά, όπως είναι η λέμνα (*Lemna spp.*) αποτελούν πολύτιμους πρότυπους οργανισμούς για τέτοιες εφαρμογές, λόγω του μεγέθους τους, της μορφολογία τους και της ευαισθησία τους σε ξενοβιοτικές ουσίες (Aliferis et al., 2009). Εφαρμογή μεταβολομικής έχει γίνει επίσης σε πολλά καρκινοειδή όπως τα *Daphnia magna*, *Diporeia spp* και *Hyaella Azteca* (Nagato et al., 2016, Ralston-Hooper et al., 2008, Ralston-Hooper et al., 2011), αποδεικνύοντας ότι είναι πρότυποι οργανισμοί κατάλληλοι για την εκτίμηση του οικολογικού κινδύνου. Το πράσινο μύδι (*Perna viridis*) (Song et al., 2016) υφίστανται την μεταβολή αρκετών μεταβολιτών μετά την έκθεση σε DDT. Γεωσκώληκες έχουν εκτενώς χρησιμοποιηθεί σαν οργανισμοί μοντέλα σε εφαρμογές μεταβολομικής, γιατί αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό ποσοστό της πανίδας του εδάφους (Warne et al., 2000). Διάφορα είδη ψαριών έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του κινδύνου τοξικότητας από Φ.Π. στο υδάτινο περιβάλλον, όπως αυγά και γόννοι του *Oncorhynchus tshawytscha* (Viant et al., 2006b) και *Oryzias latipes* (Viant et al., 2006a). Τέλος, αρουραίοι και ποντίκια είναι εξαιρετικά μοντέλα θηλαστικά για την εκτίμηση κινδύνου ξενοβιοτικών ουσιών γιατί μοιάζουν με τον ανθρώπινο οργανισμό. *Wistar rats* χρησιμοποιήθηκαν (Kolle et al., 2012, van Ravenzwaay et al., 2013) για να αποσαφηνίσουν τον μηχανισμό δράσης Ε.Δ. και να ταυτοποιήσουν τις ουσίες που επηρεάζουν τις στεροειδείς ορμόνες.

1.7 ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΡΥΠΑΝΣΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Με τον όρο ζιζάνιο εννοούμε κάθε φυτό που δεν καλλιεργείται και αναπτύσσεται όπου και όταν δεν είναι επιθυμητό. Τα ζιζάνια ανταγωνίζονται τα καλλιεργούμενα φυτά για νερό, φως, χώρο και θρεπτικά στοιχεία, υποβαθμίζοντας την ποιότητα των γεωργικών προϊόντων και την ποσοτική απόδοση της καλλιέργειας. Η αντιμετώπιση των ζιζανίων μπορεί να γίνει με την εφαρμογή ή/και συνδυασμό καλλιεργητικών τεχνικών, βιολογικών μέσων (βιοζιζανιοκτόνα) και χημικών ενώσεων (ζιζανιοκτόνα).

Η μεταφορά του εργατικού δυναμικού στην αναπτυσσόμενη βιομηχανία, με αυξανόμενο ρυθμό από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, οδήγησε στην έλλειψη εργατικών χεριών για τη γεωργία με αποτέλεσμα την εμφάνιση σοβαρών προβλημάτων στην καταπολέμηση των ζιζανίων. Διάφορα προγράμματα αμειψισποράς που εφαρμόστηκαν για να περιορίσουν τα προβλήματα των ζιζανίων δεν έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Έτσι γρήγορα δημιουργήθηκε η ανάγκη χρησιμοποίησης χημικών ουσιών. Οι πρώτες χημικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ενώσεις του χαλκού και άλλες ανόργανες ενώσεις, όπως του αρσενικού, του θειϊκού οξέος, του χλωρικού νατρίου και αργότερα τα μη ραφηναρισμένα ορυκτέλαια και ορισμένα αποστάγματα του πετρελαίου.

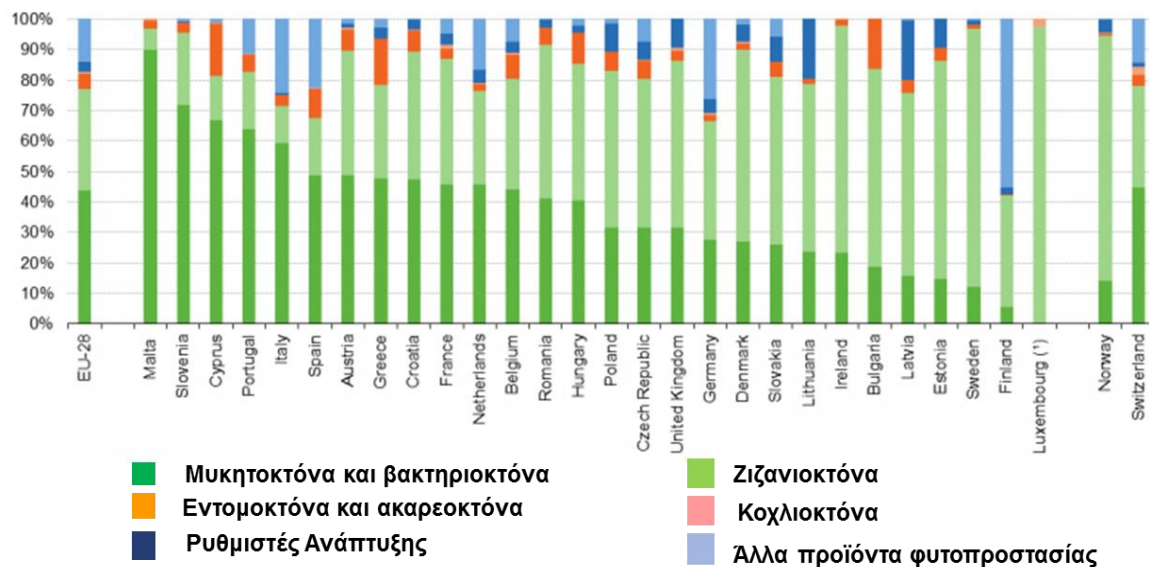
Η ανάπτυξη ζιζανιοκτόνων με εξειδικευμένη δράση στον κυτταρικό μεταβολισμό ξεκίνησε με την χρησιμοποίηση της δινιτροορθοκρεζόλης (DNOC) για την καταπολέμηση των ζιζανίων στα σιτηρά και του dinoseb στα ψυχανθή στη δεκαετία του '30. Στις αρχές της δεκαετίας του '40 ακολούθησε η ανακάλυψη του MCPA, του 2,4-D και του proham. Τα ζιζανιοκτόνα αυτά αποτελούν την «αιχμή του δόρατος» των εκλεκτικών ζιζανιοκτόνων.

Η ανάπτυξη και χρησιμοποίηση των εκλεκτικών οργανικών ζιζανιοκτόνων, σε μεγάλη κλίμακα, άρχισε ουσιαστικά μετά το τέλος του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, αλλά γνώρισε τη μεγαλύτερη πρόοδο τα τελευταία είκοσι περίπου χρόνια του 20^{ου} αιώνα, δίνοντας νέες δυνατότητες στην φυτοπροστασία.

Σήμερα ένας μεγάλος αριθμός οργανικών ενώσεων, συνθετικής ή φυτικής προέλευσης, επιδεικνύει ζιζανιοκτόνο δράση, παρεμποδίζοντας εξειδικευμένα σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες ή μεταβολικές διεργασίες των ζιζανίων (Ζιώγας and Μαρκόγλου, 2010).

1.7.1 ΠΩΛΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ ΣΤΗΝ Ε.Ε.

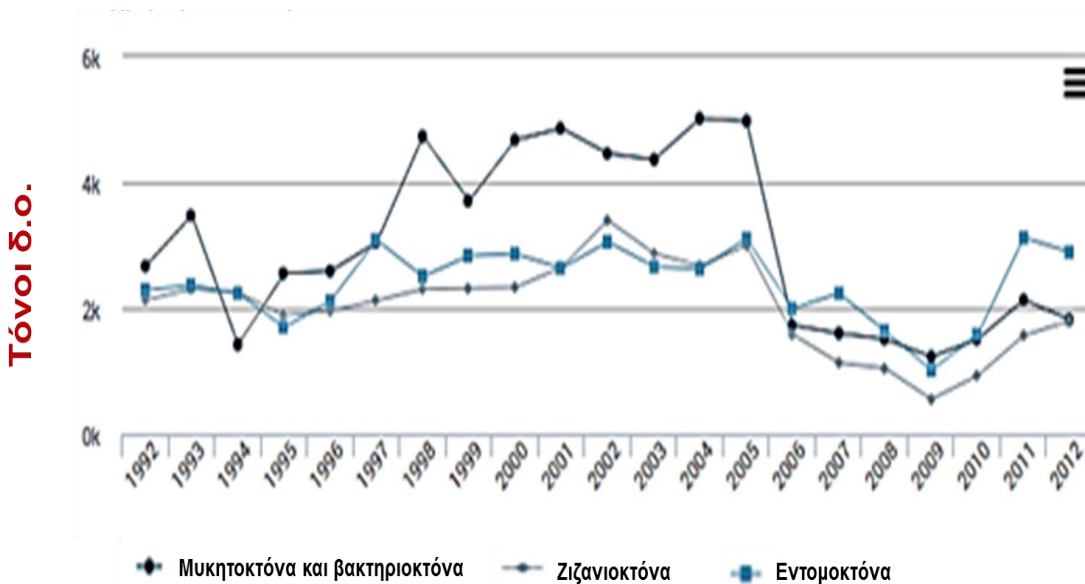
Αν και η τάση στη φυτοπροστασία είναι η μείωση της χρήσης χημικών Φ.Π., η αντικατάστασή τους με άλλες εναλλακτικές μεθόδους φυτοπροστασίας δεν φαίνεται να μπορεί να γενικευθεί με επιτυχία τουλάχιστον στην επιχειρηματική γεωργία. Έτσι και στην περίπτωση των ζιζανίων, η σύγχρονη πρακτική φυτοπροστασίας βασίζεται κυρίως στην χρήση χημικών ενώσεων, τουλάχιστον στις περιοχές με αναπτυγμένη γεωργία. Έρευνα της Eurostat έδειξε ότι μεταξύ του 2011 και 2014 οι πωλήσεις των Φ.Π. μειώθηκαν στην Ε.Ε. Παρ' όλα αυτά το 2014 οι πωλήσεις άγγιξαν περίπου τους 400.000 τόνους. Η Ισπανία, η Γαλλία, η Ιταλία, η Γερμανία και η Πολωνία είναι οι χώρες που παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες πωλήσεις Φ.Π. Το 44% των πωλήσεων καταλαμβάνουν τα μυκητοκτόνα και τα βακτηριοκτόνα, και ακολουθούν τα ζιζανιοκτόνα με 33% (**Εικόνα 9**). Σε 12 κράτη-μέλη το ποσοστό των πωλήσεων σε ζιζανιοκτόνα ξεπερνάει το μισό του συνόλου των πωλήσεων των Φ.Π.



Εικόνα 9. Πωλήσεις Φ.Π. στην Ευρώπη από το 2011-2014 (τροποποιημένη από <http://ec.europa.eu/eurostat> Πρόσβαση 2017) .

Οι πωλήσεις των Φ.Π. μειώθηκαν και στην Ελλάδα το διάστημα 2011-2014, αλλά όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10** η χημική φυτοπροστασία εξακολουθεί να αποτελεί τον πυλώνα της φυτοπροστασίας.

Λόγω εκτεταμένης χρήσης σε περιοχές της Ελλάδας και αναφορών παρουσίας υπολειμμάτων τους σε υδάτινους όγκους, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δύο συνθετικές δραστικές ουσίες με ζιζανιοκτόνο δράση, που δρουν σε διαφορετικές μεταβολικές λειτουργίες των ζιζανίων. Η πρώτη είναι το glyphosate, η οποία είναι παρεμποδιστής της βιοσύνθεσης των αρωματικών αμινοξέων και συγκεκριμένα δρα στο μεταβολικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Η δεύτερη είναι το metribuzin, που δρα ως παρεμποδιστής του φωτοσυστήματος II.



Εικόνα 10. Η χρήση των Φ.Π. στην Ελλάδα 1992-2012 (τροποποιημένη από <http://www.fao.org/faostat/en/>. Πρόσβαση 2017).

1.7.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ GLYPHOSATE ΚΑΙ METRIBUZIN

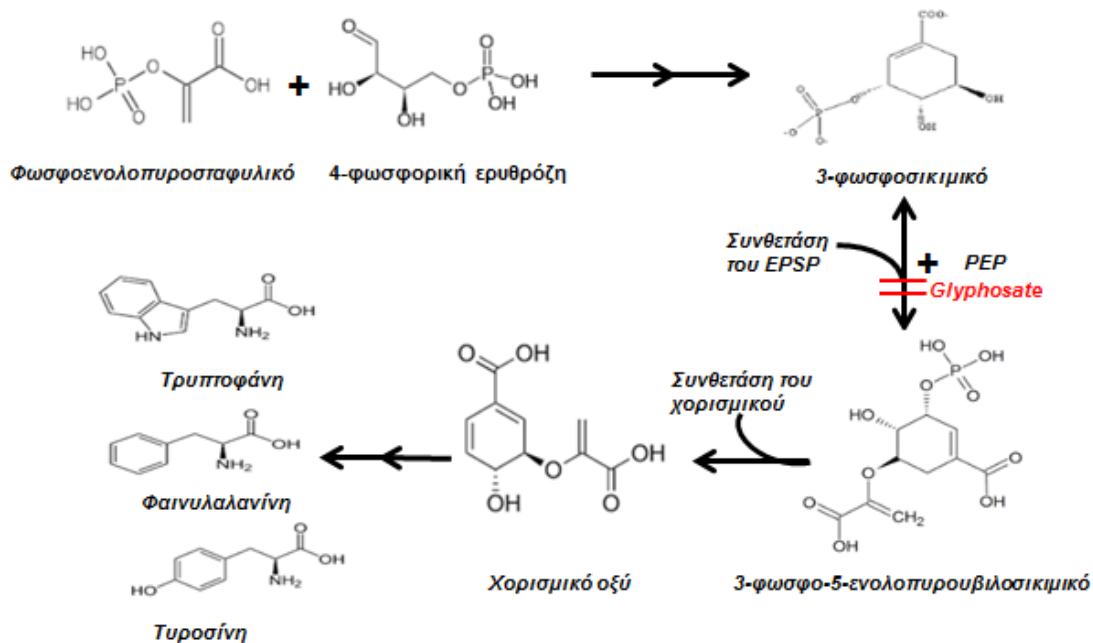
1.7.2.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ GLYPHOSATE

Μία σημαντική μεταβολική οδός στην βιοσύνθεση των αμινοξέων είναι το μονοπάτι του σικιμικού οξέος (shikimate pathway), που οδηγεί στη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαιτυλαλανίνη (Ζιώγας and Μαρκόγλου, 2010). Η ονομασία του μονοπατιού οφείλεται στο φυτό *Illicium religiosum*, γνωστό ως ιαπωνικός γλυκάνισος (shikimi), από τον καρπό του οποίου απομονώθηκε για πρώτη φορά το σικιμικό οξύ. Για τη βιοσύνθεση των παραπάνω αρωματικών αμινοξέων καταναλώνεται πάνω από το 30% του άνθρακα που προσλαμβάνουν τα φυτά (Maeda and Dudareva, 2012). Από τη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων προκύπτουν πολλές σημαντικές ενώσεις του δευτερογενούς μεταβολισμού, όπως φλαβοπρωτεΐνες, φλαβονοειδή, λιγνίνες, βιταμίνες, ανθοκυάνες, αυξίνες, φυτοαλεξίνες και

αλκαλοειδή (Ζιώγας and Μαρκόγλου, 2010). Το σικιμικό μονοπάτι αποτελείται από 7 μεταβολικά στάδια, ξεκινώντας από την συμπύκνωση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEP) και 4-φωσφορικής ερυθρόζης (E4P) και καταλήγει με την σύνθεση του χορισμικού (Herrmann and Weaver, 1999). Το χορισμικό είναι επίσης πρόδρομος των βιταμινών K₁ και B₉ και του σαλικυλικού οξέος, που είναι υπεύθυνο για την άμυνα του φυτού (Maeda and Dudareva, 2012). Τα ένζυμα του σικιμικού μονοπατιού εντοπίζονται στο κυτοσόλιο και στους χλωροπλάστες (Rubin et al., 1984) που υπάρχουν σε βακτήρια, μύκητες, στα φυτά και σε κάποια πρώτιστα, αλλά απουσιάζει από τα ζώα, γεγονός που το κάνει έναν καλό στόχο για αντιμικροβιακούς παράγοντες και ζιζανιοκτόνα (Herrmann and Weaver, 1999, Maeda and Dudareva, 2012).

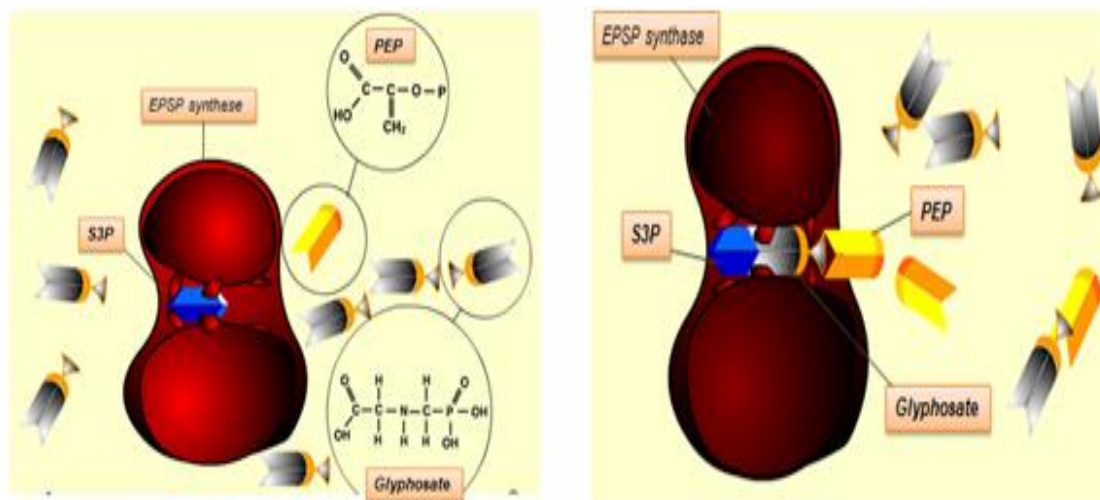
Το προτελευταίο και σημαντικό στάδιο της μεταβολικής οδού, είναι ο σχηματισμός του φωσφοενολο-πυρουβιλο-σικιμικού οξέος (5-EnolPyruvylShikimate-3-Phosphate, EPSP). Κατά το στάδιο αυτό το φωσφοενολοπυρουβικό (Phosphoenolpyruvate, PEP) αντιδρά με το 3-φωσφοσικιμικό οξύ (3-Phosphoshikimate, S3P) και παράγεται το EPSP. Αυτή η αμφίδρομη αντίδραση καταλύεται από την συνθετάση του φωσφοενολο-πυρουβιλο-σικιμικού οξέος (EPSP synthase), ένα μονομερές ένζυμο με μοριακό βάρος 48.000 (Herrmann and Weaver, 1999).

Η EPSPs αποτελεί θέση δράσης των ζιζανιοκτόνων της ομάδας των γλυκινών (glycines) ή φωσφονογλυκινών (phosphono-glycine). Στην κατηγορία αυτή υπάγονται οι ενώσεις του glyphosate (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11. Η μεταβολική οδός του σικιμικού και η θέση δράσης του glyphosate.

Το glyphosate προσδένεται στο σύμπλοκο που σχηματίζει η συνθετάση με το S3P, δηλαδή ανταγωνίζεται ισχυρά το PEP και καταλαμβάνει την θέση πρόσδεσης του, με αποτέλεσμα να καταρρέει το μεταβολικό μονοπάτι (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 12. Το glyphosate ανταγωνίζεται το PEP και προσδένεται στο σύμπλοκο EPSP συνθετάση-S3P (τροποποιημένη από https://passel.unl.edu/pages/animation.php?a=herbicide_competition.swf&b=990818776. Πρόσβαση 2017).

Το glyphosate (N-phosphono-methyl-glycine) είναι διασυστηματικό, καθολικό ζιζανιοκτόνο φυλλώματος. Στο εμπόριο κυκλοφορεί ως άλας ισοπροπυλαμίνης (glyphosate-isopropylammonium, $C_6H_{17}N_2O_5P$) με το γνωστό εμπορικό όνομα Roundup. Άλλες ενώσεις του ζιζανιοκτόνου είναι άλατα αμμωνίου, καλίου, νατρίου και θείου. Απορροφάται από τα φύλλα και μετακινείται εύκολα εντός των φυτικών ιστών. Όταν εφαρμόζεται στο έδαφος καθίσταται γρήγορα ανενεργό. Εφαρμογή του glyphosate στο έδαφος ελάχιστα ή καθόλου επηρεάζει το φύτευμα μεγάλου αριθμού ζιζανίων ή καλλιεργούμενων φυτών. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μεγάλου φάσματος ετήσιων και πολυετών αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων σε πολλές καλλιέργειες. Εφαρμοζόμενο διαφυλλικά ως προφυτρωτικό, κινείται προς το ριζικό σύστημα, όπου καταστρέφει τις ρίζες, τους υπόγειους βλαστούς, τους κονδύλους και τα ριζώματα των ζιζανίων. Έτσι δρα σε βαθύρριζα και επιπολαιόριζα ζιζάνια. Το πιο κοινό σύμπτωμα της φυτοτοξικότητας του είναι η χλώρωση των φύλλων που ακολουθείται από την νέκρωση τους. Τα συμπτώματα αυτά εμφανίζονται 1-3 εβδομάδες μετά την εφαρμογή. Γι' αυτό στα ψεκασμένα ζιζάνια δεν πρέπει να γίνεται καμία επέμβαση τουλάχιστον για 3 εβδομάδες μετά την εφαρμογή του.

Η απομάκρυνση του από τα περισσότερα εδάφη είναι πάρα πολύ γρήγορη και οφείλεται κυρίως στην μικροβιακή αποδόμηση (βιοαποδόμηση). Υποστηρίζεται ότι αυξάνει την ευαισθησία των φυτών στα παθογόνα γιατί παρεμποδίζει την παραγωγή φυτοαλεξινών φαινυλαλανίνη (Ζιώγας and Μαρκόγλου, 2010).

1.7.2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ METRIBUZIN

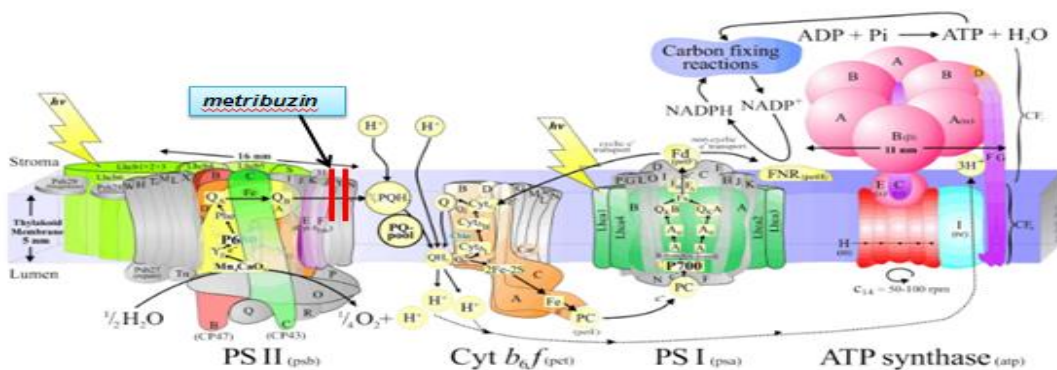
Η βιολογική λειτουργία που δίνει την μοναδική ικανότητα στα φυτά να απορροφούν φωτεινή ενέργεια και να την μετατρέπουν σε χημική ονομάζεται φωτοσύνθεση. Την ικανότητα αυτή έχουν επίσης και μερικοί αυτότροφοι (φωτότροφοι) προκαρυωτικοί οργανισμοί και τα μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα φύκοι. Η φωτοσύνθεση δηλαδή, είναι μία πολύπλοκη μεταβολική διεργασία μετατροπής της ηλιακής ενέργειας σε χημική, μέσω της οποίας ο άνθρακας της ατμόσφαιρας (CO_2) χρησιμεύει για την βιοσύνθεση οργανικών ενώσεων (υδατάνθρακες). Τα «εργοστάσια» δέσμησης και αξιοποίησης της ηλιακής ακτινοβολίας των φωτοσυνθετικών φυτικών κυττάρων είναι οι χλωροπλάστες.

Ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης περιλαμβάνει τη δέσμηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και την μετατροπή της σε χημική με μία αλληλουχία οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, που η ροή των ηλεκτρονίων από το δότη προς το δέκτη γίνεται ενάντια στη διαφορά των δυναμικών αναγωγής. Δηλαδή τα ηλεκτρόνια κινούνται από υποστρώματα με αρνητικότερα δυναμικά, δηλαδή από χαμηλότερα προς υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα.

Η δέσμηση της ηλιακής ακτινοβολίας γίνεται με δύο κύριες χρωστικές τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Οι χλωροφύλλες (χλωροφύλλη α και β) δίνουν στα φυτά το πράσινο χρώμα, για αυτό και ονομάζονται πράσινες χρωστικές. Τα καροτενοειδή βρίσκονται σε επαφή με τις χλωροφύλλες, που τις προστατεύουν από την έντονη ηλιακή ακτινοβολία. Τα συστατικά της κάθε φωτοσυνθετικής ομάδας είναι οργανωμένα σε τέσσερα μεγάλα δομικά σύμπλοκα, το φωτοσύστημα II (Photosystem II, PSII), το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων b_6/f , το φωτοσύστημα I (Photosystem I, PSI) και το σύμπλοκο της συνθετάσης του ATP, που βρίσκονται εντός της μεμβράνης των θυλακοειδών. Επιπλέον των παραπάνω συμπλόκων, κάθε φωτοσυνθετική μονάδα περιλαμβάνει και τα σύμπλοκα συλλογής του φωτός (Light Harvesting Complex, LHC) που συνδέονται με τα PSI και II, το σύμπλοκο της φωτόλυσης του νερού που συνδέεται με το PSII και το σύμπλοκο της Fd (φερρεδοξίνης)-NADP-αναγωγής.

Το PSII, είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο του οποίου το κέντρο αντίδρασης ή φωτοχημικό κέντρο παρουσιάζει ένα μέγιστο απορρόφησης στα 680 nm και ονομάζεται P-680. Ο βιολογικός ρόλος του PSII είναι η πρόσληψη της ενέργειας των φωτονίων από το LHC, η διέγερση των μορίων χλωροφύλλης *a* σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες και η μεταφορά των ηλεκτρονίων στην πλαστοκινόνη (Plastoquinone, PQ), μέσω της φαιοφυτίνης (Pheophytin, Pheo). Η PQ βρίσκεται ελεύθερη μέσα στη μεμβράνη του θυλακοειδούς. Ο ρόλος της είναι η μεταφορά των ηλεκτρονίων και πρωτονίων από το PSII στο σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων.

Στους παρεμποδιστές του PSII ανήκουν ζιζανιοκτόνα πολλών χημικών ομάδων, μία από αυτές είναι οι τριαζιόνες. Οι ενώσεις αυτές προσκολλώνται στη θέση σύνδεσης της PQ με την πρωτεΐνη D₁ (**Εικόνα 13**). Όπως προαναφέρθηκε, υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα μόρια της χλωροφύλλης *a* με την απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας μεταφέρονται σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες, και βρίσκονται σε μία διεγερμένη κατάσταση που ονομάζεται «single state» (¹Chl). Σε περίπτωση που η ενέργεια διέγερσης δεν χρησιμοποιηθεί για την αναγωγή του επόμενου μεταφορέα ηλεκτρονίων, λόγω της παρουσίας κάποιου παρεμποδιστή, έχουμε απώλεια ενέργειας και τα μόρια της χλωροφύλλης μετατρέπονται σε μόρια σταθερότερης μορφής (stable triplet state, ³Chl). Τα ³Chl μόρια της χλωροφύλλης μπορεί να οξειδώσουν τα μεμβρανικά λιπίδια, αλλά το σημαντικότερο διεγείρουν το οξυγόνο και παράγονται ενεργές μορφές του (single oxygen, ¹O₂). Οι ενεργές μορφές O₂ στη συνέχεια προκαλούν οξειδωτικές αντιδράσεις στα λιπίδια, τις μεμβράνες, τα νουκλεϊνικά οξέα και άλλα συστατικά του κυττάρου, που οδηγούν στην νέκρωση των φυτών. Η νέκρωση των φυτών μπορεί επίσης να προκληθεί από έλλειψη αναγωγικής δύναμης (NADPH), λόγω διακοπής της ροής των ηλεκτρονίων.



Εικόνα 13. Θέση δράσης του metribuzin και άλλων ζιζανιοκτόνων που δρουν ως παρεμποδιστές του συμπλόκου του PSII (τροποποιημένη από http://macromol.sbcs.qmul.ac.uk/resources/AllComplexes_25Nov2011_1800p.x.gif . Πρόσβαση 2017)

Αποτέλεσμα του τρόπου δράσης των ζιζανιοκτόνων της κατηγορίας αυτής είναι η γρήγορη εμφάνιση χλωρωτικών συμπτωμάτων στα φύλλα, που αποτελεί σαφή ένδειξη δυσλειτουργιών στο φωτοσυνθετικό σύστημα και ακολουθείται από γενική αναστολή της αύξησης των φυτών, με τελικό αποτέλεσμα τη νέκρωση τους. Η εκδήλωση των χλωρωτικών συμπτωμάτων εμφανίζεται πιο έντονα σε συνθήκες έντονης ηλιακής ακτινοβολίας, λόγω του μεγαλύτερου ρυθμού μεταφοράς των μορίων της χλωροφύλλης α σε διεγερμένη κατάσταση και στη συνέχεια στην μορφή ^3Chl , που είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου.

Το metribuzin ανήκει στην υποομάδα των τριαζινονών, στις οποίες υπάγονται αζωτο-ετεροκυκλικές ενώσεις, με εναλλασσόμενα (συμμετρικές τριαζιόνες) ή μη εναλλασσόμενα (ασύμμετρες τριαζιόνες) άτομα άνθρακα και αζώτου, και που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη κετονομάδας ($\text{C}=\text{O}$).

Το metribuzin είναι διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο φυλλώματος και εδάφους, που χρησιμοποιείται προφυτρωτικά ή μεταφυτρωτικά για την καταπολέμηση πολλών αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων σε πολλές καλλιέργειες, όπως στην πατάτα, την τομάτα, τη σόγια, τον αραβόσιτο, τα σιτηρά, το

σπαράγγι, τη μηδική, το τριφύλλι, το καρότο κ.ά. (Ζιώγας and Μαρκόγλου, 2010).

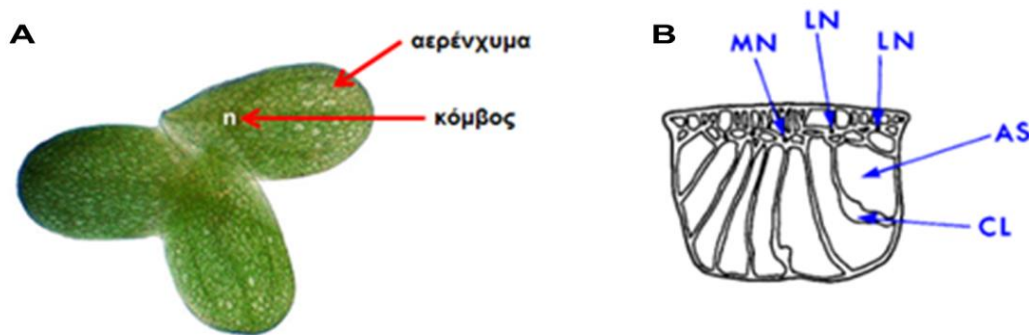
1.8 ΤΑ ΕΙΔΗ *LEMNA SP.*: Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Η οικογένεια φυτών *Lemnaceae* ή αλλιώς «φακές του νερού» αποτελείται από τα πιο απλά και μικρότερα ανθοφόρα φυτά (0,5-18 mm). Είναι υδροχαρή και πολυετή φυτά και αναπτύσσονται επιπλέοντας σε σταθερά ή με μικρή ροή καθαρά ή μολυσμένα νερά σε όλες τις περιοχές του κόσμου, εκτός από τις ψυχρότερες περιοχές και της ερήμους. Τα φυτά αυτά είναι υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και η ανάπτυξη τους μπορεί να είναι εξαιρετικά γρήγορη. Τα άνθη τους είναι μονογενή και τα φυτά μόνοικα (Στεφανάκη and Νικηφοράκη, 1999). Τα είδη *Lemna sp.* είναι ένα από τα πιο γνωστά αυτής της ομάδας και έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών. Οι ερευνητές χρησιμοποιούν αυτά τα φυτά για να μελετήσουν την ανάπτυξη των φυτών, τις βιοχημικές διεργασίες τους, την φωτοσύνθεση καθώς επίσης και την τοξικότητα επικίνδυνων ουσιών. Έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ομοιοπαθητικών φαρμακευτικών προϊόντων, για απορρύπανση των υδάτων, ενώ επίσης αποτελεί για τους υχθειοκαλλιεργητές μια φθηνή πηγή τροφής για ιχθυοκαλλιέργεια (www.mobot.org. Πρόσβαση 2017).

1.8.2 ANATOMIA ΤΩΝ LEMNACEAE

Τα φύλλα και τα στελέχη, τα οποία είναι διακριτά στα φυτά με αγγειακό σύστημα, αντικαθίσταται στα υδροχαρή φυτά από μία κοινή κατασκευή των δύο που καλείται φυλλίδιο ή θαλλός 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 με λεία άνω επιφάνεια (Landolt, 1998). Το σώμα του φυτού αποτελείται από ένα μέχρι μερικά επίπεδα αερενχύματος, το οποίο παρέχει άνωση στα φυτά, και ένα έως περισσότερα νεύρα (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14. Α) Φυλλίδια *Lemna minor*, Β) Διατομή φυλλιδίου – AS: αερέγχυμα, CL: στρώσεις κυττάρων που περικλείουν το αερέγχυμα, LN: πλευρικό νεύρο, MN: κεντρικό νεύρο (Landolt, 1986a)

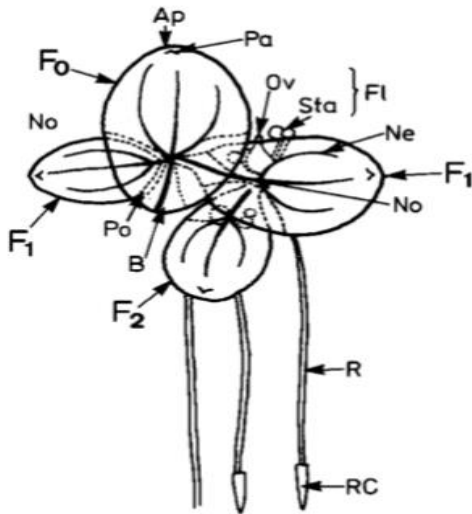
Αυτές οι θαλλοειδείς, ωοειδείς ή επίπεδες δομές μπορεί να φέρουν μία ή περισσότερες ρίζες στην κάτω πλευρά ή να μην φέρουν ρίζες, ανάλογα με το είδος. Τα είδη *Spirodela*, *Landoltia* και *Lemna* αναπτύσσουν ρίζες. Ο μέγιστος αριθμός που σχηματίζουν ανά φυλλίδιο εξαρτάται από το είδος. Η *Lemna* σχηματίζει μία ρίζα ανά φυλλίδιο ενώ η *Spirodela* και *Landoltia* σχηματίζουν περισσότερες δύο ανά φυλλίδιο. Η *Wolffiella* και η *Wolffia* δεν σχηματίζουν ρίζες (www.mobot.org. Πρόσβαση 2017).

Η δομή των ριζών των υδροχαρών φυτών είναι πολύ απλή. Δεν παρουσιάζουν δευτερογενή ανάπτυξη ή διακλάδωση και δεν αναπτύσσουν ριζικά τριχίδια, όπως συμβαίνει με τα περισσότερα φυτά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ρίζες τους να είναι πολύ λεπτές, λιγότερο από 0,5 mm. Οι ρίζες των υδροχαρών φυτών διαιρούνται σε 4 ζώνες: την καλύπτρα, την μεριστωματική ζώνη, την ζώνη επιμήκυνσης και την ζώνη των ώριμων κυττάρων. Ο ρόλος της ρίζας είναι η σταθεροποίηση του φυτού.

Σχετικά με την δομή των υδροχαρών φυτών, αυτά αποτελούνται από μεταβολικά ενεργά κύτταρα με μικρή δομική ίνα. Κάθε φυλλίδιο απορροφά θρεπτικά στοιχεία μέσω όλου του φυτού και όχι μέσω του κεντρικού συστήματος της ρίζας. Τα υδροχαρή φυτά μπορούν κατευθείαν να αφομοιώνουν οργανικά μόρια όπως απλούς υδρογονάνθρακες και διάφορα αμινοξέα (www.mobot.org. Πρόσβαση 2017).

1.8.3 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Τα *Lemnaceae* πολλαπλασιάζονται κυρίως αγενώς και δευτερευόντως εγγενώς (Philbrick PhD and Les PhD, 1996). Ο πολλαπλασιασμός της *L. minor* L. γίνεται κατά την διάρκεια του καλοκαιριού. Κατά τον αγενή πολλαπλασιασμό, καθώς κάθε νέο φυλλίδιο ωριμάζει ενεργοποιεί την δημιουργία νέων φυλλιδίων. Κάθε θυγατρικό φυλλίδιο αρχίζει σαν οφθαλμός στη μεριστωματική ζώνη κατά μήκος του κεντρικού άξονα του μητρικού φυλλιδίου, και στη συνέχεια εκπτύσσεται από το θυλάκιο στο πλαϊνό μέρος του μητρικού φυλλιδίου από το οποίο ξεκίνησε. Κάθε νέο φυλλίδιο συνδέεται με το μητρικό με ένα πολύ λεπτό μίσχο, ο οποίος επιμηκύνεται καθώς το νέο φυλλίδιο ωριμάζει. Όταν το θυγατρικό φυλλίδιο φτάσει σε πλήρη ωριμότητα, ο μίσχος αποκόπτεται απελευθερώνοντας μια καινούρια αποικία φυλλιδίων. Μέχρι να συμβεί αυτό, το φυλλίδιο που μόλις απελευθερώθηκε έχει ήδη δημιουργήσει θυγατρικά φυλλίδια, και με τον τρόπο αυτό συνεχίζεται η αναπαραγωγή (**Εικόνα 15**). Επίσης, οι ανθοφόροι οφθαλμοί παράγονται στο μερίστωμα του φυλλιδίου, αλλά ο σχηματισμός τους δεν είναι απαραίτητος για την αγενή αναπαραγωγή. Κάθε φυλλίδιο μπορεί να παράγει έναν πεπερασμένο αριθμό θυγατρικών φυλλιδίων μέχρι να γεράσει. Τα γερασμένα φυλλίδια αφού σταματήσουν να αναπτύσσονται γίνονται κίτρινα (Landolt, 1986b).



Ap: Κορυφή
 B: Βάση
 Fo: Μητρικός θαλλός
 F₁: Θυγατρικός θαλλός 1^{ης} γενιάς
 F₂: Θυγατρικός θαλλός 2^{ης} γενιάς
 F1: Άνθος
 Ne: Νεύρα
 No: Κόμβος
 Ov: Ωοθήκη
 Po: Θυλάκιο
 R: Ρίζα
 RC: Καλύπτρα
 Sta: Στήμονας

Εικόνα 15. Ανατομία του φυτού *Lemna aequinoctialis* (Landolt, 1986b)

1.8.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν άμεσα την ανάπτυξη των υδροχαρών φυτών είναι η θερμοκρασία, το pH, ο φωτισμός, ο άνεμος και η κυματοειδής κίνηση και η ύπαρξη ρυπαντών (Landolt and Kalender, 1987).

1.8.4.1 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΚΑΙ ΦΩΤΙΣΜΟΣ

Τα υδροχαρή φυτά αναπτύσσονται εξίσου καλά σε πλήρες φως και πυκνό σκοτάδι. Η βέλτιστη ανάπτυξη εξασφαλίζεται μεταξύ 20°C και 30°C, ενώ σοβαρά προβλήματα προκύπτουν σε θερμοκρασίες μεταξύ 35°C και 40°C. Είναι περισσότερο ανθεκτικά στο κρύο από φυτά με αγγειακό σύστημα και μπορούν να αναπτύσσονται κανονικά μέχρι και τους 7°C. Σε θερμοκρασίες παγετού μπορούν να παραμείνουν αδρανή στον πυθμένα της λίμνης μέχρι οι θερμοκρασίες να ανέλθουν και να επανακτηθούν οι κανονικές συνθήκες ανάπτυξης. Σε ένα τμήμα καλυμμένο από υδροχαρή φυτά, οι θερμοκρασίες μπορεί να είναι περίπου 10°C πάνω από την θερμοκρασία του ατμοσφαιρικού

αέρα, εξαιτίας της απορρόφησης της ακτινοβολίας (Landolt and Kalender, 1987).

1.8.4.2 pH

Τα υδροχαρή φυτά μπορούν να αντέξουν σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH, αλλά επιβιώνουν καλύτερα σε pH μεταξύ 4,5 και 7,5. Τιμές μεγαλύτερες από το 10 επηρεάζουν σοβαρά την ανάπτυξη, μειώνοντας την ικανότητα επέκτασης στα νερά που αναπτύσσονται (Landolt and Kalender, 1987).

1.8.4.3 ΑΝΕΜΟΣ ΚΑΙ ΚΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΚΙΝΗΣΗ

Ο άνεμος και η κυματοειδής κίνηση εμποδίζουν την ανάπτυξη των υδροχαρών φυτών. Οι άριστες συνθήκες για ανάπτυξη είναι τα ήρεμα ρυάκια και οι μικρές λίμνες (Landolt and Kalender, 1987).

1.8.4.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης μετάλλων, PCB και αιθυλενίου εμποδίζουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων ειδών υδροχαρών φυτών. Η ανάπτυξη επίσης μπορεί να ανασταλεί λόγω ανεπάρκειας αζώτου σε υδάτινα περιβάλλοντα με απόβλητα, φύκη ή μύκητες (Landolt and Kalender, 1987). Τα φυτά επωφελούνται σε θρεπτικά στοιχεία από την αποσύνθεση οργανικής ύλης στο νερό γι' αυτό και συναντούνται κυρίως σε ευτροφικές λίμνες πλούσιες σε άζωτο (N) και φώσφορο (P) (FAO, 2017).

1.8.4.5 ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη είναι η αλατότητα, η συγκέντρωση δηλαδή του NaCl στο νερό ή στο έδαφος. Η αλατότητα μπορεί να είναι υψηλή εξαιτίας της παρουσίας θαλασσινού νερού, όπως στις εκβολές ποταμών ή εξαιτίας της στράγγισης από αλατούχα εδάφη σε υδάτινα περιβάλλοντα. Τα υδροχαρή φυτά μπορούν να ανεχτούν ένα μικρό ποσοστό αλατότητας και μπορεί να θεωρηθεί και διεγερτικό για την ανάπτυξη, παρόλα αυτά πάνω από ένα όριο (>60 mM NaCl) η ανάπτυξη αναστέλλεται. Σε ακόμη υψηλότερες συγκεντρώσεις τα υδροχαρή φυτά δεν μπορούν να επιζήσουν (www.mobot.org. Πρόσβαση 2017).

1.8.5 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η ταξινόμηση των υδροχαρών αυτών φυτών αποτέλεσε μυστήριο για τους βοτανολόγους, αν και πλέον έχουν τοποθετηθεί στην οικογένεια των Λεμνίδων. Τα φυτά της οικογένειας *Lemnaceae* ανήκουν στα αγγειόσπερμα. Ο σπόρος αποτελείται από το έμβρυο και το ενδοσπέρμιο. Το έμβρυο, από το οποίο θα εκπτυχθεί ένα καινούριο φυτό, έχει μόνο ένα εμβρυακό φύλλο. Γι' αυτό το λόγο τα φυτά αυτά συγκαταλέγονται στα μονοκοτυλήδονα. Οι βοτανολόγοι συνέδεαν τα υδροχαρή φυτά με τα φυτά της οικογένειας *Araceae*, αλλά μέχρι τον ερχομό της μοριακής φυλογένεσης, ο έλεγχος αυτής της υπόθεσης ήταν δύσκολος.

- Βασίλειο: *Plantae*
- Διαίρεση: *Magnoliophyta*, αγγειόσπερμα
- Κλάση: *Liliopsida*, μονοκότυλα
- Υπόκλαση: *Areceidae*
- Τάξη: *Arales*
- Οικογένεια: *Lemnaceae*, Λεμνίδες
- Γένος: *Lemna*

- Είδος: *minor*
- Γένος: *Landoltia*
- Γένος: *Spirodela*
- Γένος: *Wolffia*
- Γένος: *Wolffiella*

1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η εφαρμογή της μεταβολομικής σε μελέτες οικοτοξικότητας προβλέπεται να είναι πολύ σημαντική, αν και ακόμα είναι σε αρχικό στάδιο. Για αυτό το λόγο, σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η ανάπτυξη μίας σύγχρονης μεθόδου ελέγχου της ποιότητας του περιβάλλοντος ως προς την παρουσία ζιζανιοκτόνων και της επικινδυνότητάς του για διάφορους οργανισμούς, με την χρησιμοποίηση ενός πρότυπου φυτού βιοδείκτη, το *L. minor* L. και εφαρμογή μεταβολομικής. Επίσης, επίκαιρο ζήτημα αποτελεί η μελέτη των επιπτώσεων που μπορεί να έχει η κατάληξη διαφόρων σκευασμάτων Φ.Π. στους οργανισμούς των υδάτινων περιβαλλόντων. Η γνώση σχετική με τις επιπτώσεις των μειγμάτων Φ.Π. είναι ακόμα μικρή, οπότε για το σκοπό αυτό στην παρούσα μελέτη έγιναν επιπλέον πειράματα συνδυαστικής τοξικότητας, με μείγματα των δύο ζιζανιοκτόνων σε διάφορες συγκεντρώσεις με την χρησιμοποίηση του *L. minor* L.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δειγμάτων για GC/EI/MS ανάλυση, όπως πυριδίνη (99.8%), υδροχλωρική μεθοξυλαμίνη (methoxylamine hydrochloride, MeOX) (98%), N-methyl-N-(trimethyl-silyl) trifluoroacetamide (MSTFA), ριβιτόλη και τα αναλυτικά πρότυπα ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich Ltd (Steinheim, Germany). Στα πειράματα μεταβολομικής χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας (GC/MS grade, 99.9%) (Carlo Erba Reagents, val de Reuil, France) και το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (Merck, USA) για την εκχύλιση της χλωροφύλλης. Οι δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το glyphosate (99.5%) (Bayer, Leverkusen, Germany) και το metribuzin (99.3%) (Agan Chemical Manufacturers Ltd, Ashdod, Israel).

2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ *LEMNA MINOR* L.

Για τα πειράματα φυτοτοξικότητας στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως οργανισμός-μοντέλο, το φυτό *L. minor* L. Το φυτό ήταν ευγενική χορηγία του gaiac-Research Institute for Ecosystem Analysis and Assessment του Πανεπιστημίου Aachen (Aachen, Germany).

Η καλλιέργεια των φυτών ήταν αξενική, δηλαδή απαλλαγμένη από κύτταρα και ζωντανούς οργανισμούς οποιουδήποτε άλλου είδους και έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του ΟΟΣΑ 221 «Βιοδοκιμές χημικών ουσιών-Βιοδοκιμή παρεμπόδισης της ανάπτυξης των ειδών *Lemna sp.*» (OECD, 2006).

Διαλύματα των δραστικών παρασκευάστηκαν σε θρεπτικό διάλυμα Steinberg σε συγκεντρώσεις $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ και διατηρούνταν στους 4°C . Το υγρό θρεπτικό διάλυμα στο οποίο διατηρήθηκε η καλλιέργεια ήταν το Steinberg. Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών συστατικών που περιέχονται στο θρεπτικό διάλυμα Steinberg και στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις που περιέχονται στα stock διαλύματα από τα οποία παρασκευάζεται το τελικό διάλυμα.

Πίνακας 1. Οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών συστατικών του Steinberg medium (OECD, 2006)

Μακροστοιχεία	M.B.	mg L⁻¹	Mmol L⁻¹
KNO ₃	101.12	350.00	3.46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236.15	295.00	1.25
KH ₂ PO ₄	136.09	90.00	0.66
K ₂ HPO ₄	174.18	12.60	0.072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246.37	100.00	0.41
Μικροστοιχεία	M.B.	µg L⁻¹	Mmol L⁻¹
H ₃ BO ₃	61.83	120.00	1.94
ZnSO ₄ 7H ₂ O	287.43	180.00	0.63
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	241.92	44.00	0.18
MnCl ₂ 4H ₂ O	197.84	180.00	0.91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270.21	760.00	2.81
Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O	372.24	1500.00	4.03

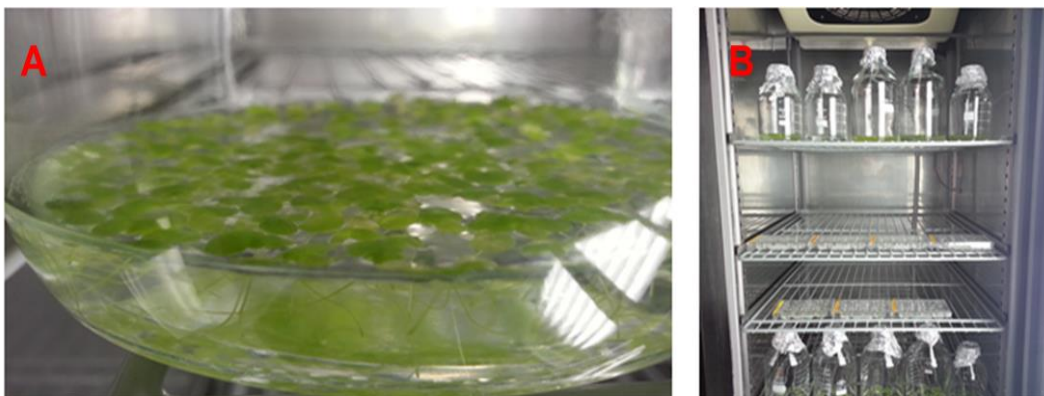
Πίνακας 2. Οι συγκεντρώσεις των stock διαλυμάτων (OECD, 2006)

Stock διαλύματα	Μακροστοιχεία	g L⁻¹
I	KNO ₃	17.50
	KH ₂ PO ₄	4.5
	K ₂ HPO ₄	0.63
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	5.00
III	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	
Stock διαλύματα	Μικροστοιχεία	mg L⁻¹
IV	H ₃ BO ₃	120.0
V	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180.0
VI	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44.0
VII	MnCl ₂ · 4H ₂ O	180.0
VIII	FeCl ₃ · 6H ₂ O	760.00
	Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O	1500.0

Για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος Steinberg, αρχικά παρασκευάστηκαν τα 8 stock διαλύματα που περιγράφονται στον **Πίνακα 2**. Στη συνέχεια, τα επτά πρώτα διαλύματα αποστειρώνονταν σε κλίβανο στους 121°C για 20 λεπτά ενώ το όγδοο διάλυμα αποστειρώνονταν με φίλτρο (0.2 μm). Τα διαλύματα διατηρήθηκαν καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων στους 4°C. Ο γυάλινος εξοπλισμός που χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος, καθώς και τα ρύγχη των μηχανικών πιπιετών και το απιονισμένο νερό, είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί. Γενικά, πριν από κάθε πειραματική διαδικασία ο γυάλινος εξοπλισμός αποστειρώνονταν σε κλίβανο, ενώ άλλα απαραίτητα υλικά αποστειρώνονταν με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (Laminar), στον οποίο στη συνέχεια λάμβανε χώρα η παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος και ο απαιτούμενος πειραματικός χειρισμός.

Για την παρασκευή Steinberg (1L) προσθέτονταν 20 mL από τα stock διαλύματα I, II, III σε περίπου 900mL απιονισμένο νερό. Από τα stock διαλύματα IV, V, VI, VII προσθέτονταν 1mL και έπειτα συμπληρώνόταν ο όγκος του νερού έως 999mL. Στη συνέχεια, ρυθμιζόταν το pH του διαλύματος στο 5.5 +/- 0.2 και το Steinberg αποστειρωνόταν ξανά σε κλίβανο στους 121°C για 20min. Με το πέρας της αποστείρωσης, προσθέταμε και 1mL από το τελευταίο stock διάλυμα, το VIII και το υλικό διατηρούνταν στους 4°C.

Η μεταφορά της αξενικής καλλιέργειας σε αποστειρωμένα γυάλινα μπουκάλια (1L), τα οποία περιείχαν αποστειρωμένο διάλυμα Steinberg, γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες στο Laminar και στη συνέχεια, κλείνονταν με αλουμινόχαρτο. Τα γυάλινα μπουκάλια με την καλλιέργεια της *L. minor* L. διατηρούνταν σε θάλαμο ανάπτυξης, στους 24±1°C με συνεχή φωτισμό έντασης 110 μmol m⁻² s⁻¹ και σχετική υγρασία (RH) 85±5% (**Εικόνα 16**). Η ανανέωση του θρεπτικού διαλύματος των φυτών γινόταν μία φορά την εβδομάδα, ενώ η μεταφορά των φυτών σε καινούρια αποστειρωμένα γυάλινα μπουκάλια γινόταν μία φορά τον μήνα, πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες.



Εικόνα 16. **A)** *Lemna minor* L. σε θρεπτικό διάλυμα Steinberg σε γυάλινο μπουκάλι 1L, **B)** Καλλιέργεια *L. minor* L. σε επωαστικό θάλαμο ανάπτυξης.

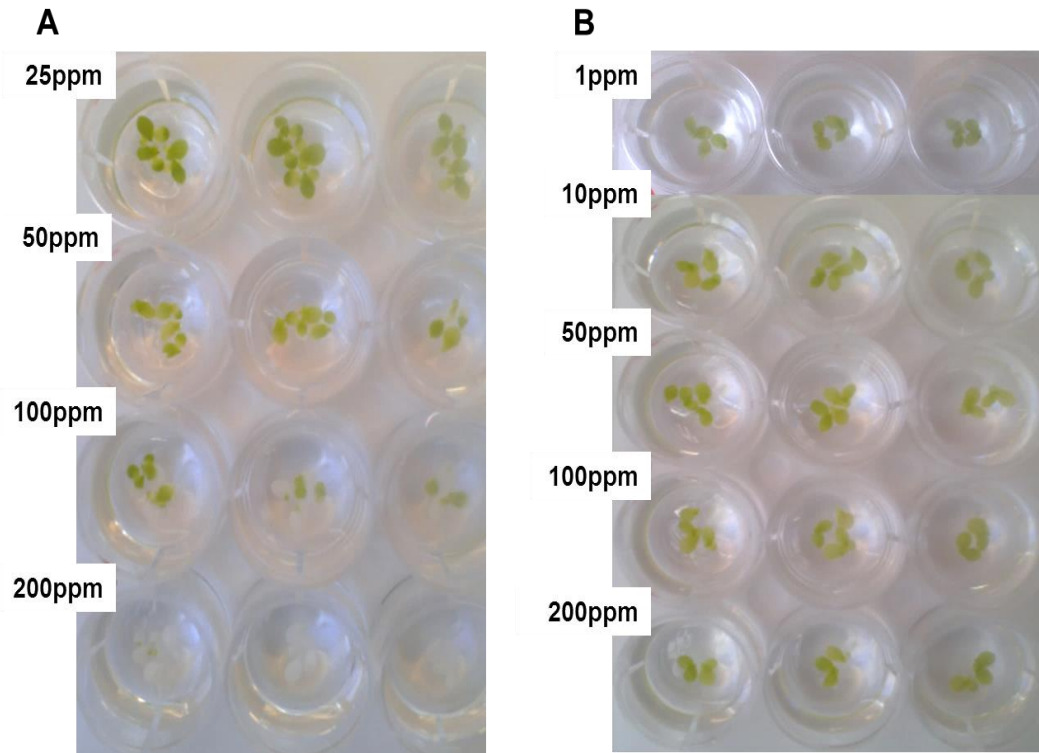
2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ EC_{50} ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ METRIBUZIN ΚΑΙ GLYPHOSATE

Για τον πειραματισμό στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν τα ζιζανιοκτόνα glyphosate και metribuzin. Για τον υπολογισμό της τοξικότητας και της συνδυαστικής τοξικότητας των δύο αυτών ζιζανιοκτόνων στο βιοδείκτη *L. minor* L. και τα πειράματα μεταβολομικής χρειαζόταν πρώτα να προσδιοριστούν οι τιμές EC_{50} .

Για το σκοπό αυτό, φυτά *L. minor* L μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένα πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 12 θέσεων, στα οποία υπήρχαν 3mL διαλύματος ζιζανιοκτόνων ή μειγμάτων τους σε διάφορες συγκεντρώσεις, προσθέτοντας δύο φυτά ανά κελί. Αναλυτικά, οι συγκεντρώσεις στις οποίες δοκιμάστηκαν τα φυτά για το glyphosate είναι 25, 50, 100 και 200ppm (**Εικόνα 17A**) και για το metribuzin 0,5, 1, 10, 50, 100 και 200ppm (**Εικόνα 17B**). Για κάθε επέμβαση έγιναν 3 επαναλήψεις. Επίσης, σε τρεις θέσεις των πλακιδίων τοποθετήθηκαν φυτά σε διάλυμα Steinberg και αποτέλεσαν τον μάρτυρα του πειράματος (**Εικόνα 18**). Έπειτα, τα πλακίδια με τα φυτά και τα ζιζανιοκτόνα παρέμειναν στο θάλαμο ανάπτυξης για 72h με φωτοπερίοδο (16h φως και 8h σκοτάδι).

Με το πέρας 72h τα πλακίδια απομακρύνθηκαν από το θάλαμο ανάπτυξης και μετρήθηκαν τρεις παράμετροι της ανάπτυξης και της ζωτικότητας του *L.*

minor L.: το νωπό βάρος, ο αριθμός των φυλλιδίων και η χλωροφύλλη. Στις τιμές EC₅₀ καταλήξαμε με την βοήθεια της μεθόδου probit.



Εικόνα 17. Αποστειρωμένα πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας για (A) επεμβάσεις με glyphosate και (B) επεμβάσεις με metribuzin σε φυτά *L. minor* L.



Εικόνα 18. Φυτά *L. minor* L. μέσα σε θρεπτικό διάλυμα Steinberg σε πλαστικά πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας αποτελεί τον μάρτυρα του πειράματος.

2.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ

Για τη μέτρηση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη είναι απαραίτητη η εκχύλιση του ιστού της *L. minor* L. Διάφοροι διαλύτες χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση χλωροφύλλης, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, η πυριδίνη και η ακετόνη με οξικό αιθυλεστέρα. Έρευνες έδειξαν όμως ότι το DMSO είναι καλύτερο από την ακετόνη για την εκχύλιση της χλωροφύλλης σε ένα μεγάλο αριθμό από άλγη (Shoaf and Liem, 1976).

Το DMSO ως διαλύτης πλεονεκτεί σε σχέση με τους προαναφερθέντες διαλύτες λόγω του ότι η εξαγωγή των χλωροφυλλών είναι πιο εύκολη και γρήγορη μιας και δεν απαιτείται λειοτρίβηση και φυγοκέντριση (Devesa et al., 2007). Επίσης, είναι δυνατή η προετοιμασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα και η σταθερότητα της εκχυλιζόμενης χλωροφύλλης από το DMSO κατά την αποθήκευση είναι καλύτερη σε σχέση με την μέθοδο της ακετόνης (Hiscox and Israelstam, 1979).

Αρχικά, ζυγίστηκε το νωπό βάρος των φυτών και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε erpendorfs και σε αυτά προστέθηκαν 500μL DMSO. Έπειτα, τα erpendorfs μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 65°C για 30min. Από κάθε εκχύλισμα που προέκυψε, 150μL μεταφέρθηκαν σε πλαστικό πλακίδιο 96 κελιών (96-well microplate). Εκτός από τα 45 κελιά του πλακιδίου που συμπληρώθηκαν με τα εκχυλίσματα των δειγμάτων, ένα κελί ακόμα συμπληρώθηκε με μόνο τον διαλύτη και αποτέλεσε το τυφλό του πειράματος.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της περιεκτικότητας των φυτών σε χλωροφύλλη χρησιμοποιήθηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο (Arnon, 1949, Mochizuki et al., 2001). Έγινε μέτρηση της απορρόφησης στα 480, 645, 663nm σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών Biochrom Anthos Zenyth 200rt της εταιρείας Biochrom Ltd (Cambridge, UK) (**Εικόνα 19**).



Εικόνα 19. Φασματοφωτόμετρο μικροπλακών Biochrom Anthos Zenyth 200rt.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις μετρήσεις της απορρόφησης στα 645, 663nm, εισήχθησαν στις παρακάτω εξισώσεις για τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης α και β :

$$\text{Συνολική Χλωροφύλλη (mg mL}^{-1}\text{)} = (0.0202) \times (A.645) + (0.00802) \times (A.663)$$

$$\text{Χλωροφύλλη '}\alpha\text{' (mg mL}^{-1}\text{)} = (0.0127) \times (A.663) - (0.00269) \times (A.645)$$

$$\text{Χλωροφύλλη '}\beta\text{' (mg mL}^{-1}\text{)} = (0.0229) \times (A.645) - (0.00468) \times (A.663).$$

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις μετρήσεις της απορρόφησης στα 480nm χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό της περιεκτικότητας των καροτενοειδών με την χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Καροτενοειδή (mg mL}^{-1}\text{)} = A.480 + (0.114 \times A.663 - 0.638 \times A.645)$$

(Kirk and Allen, 1965)

Τέλος, ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

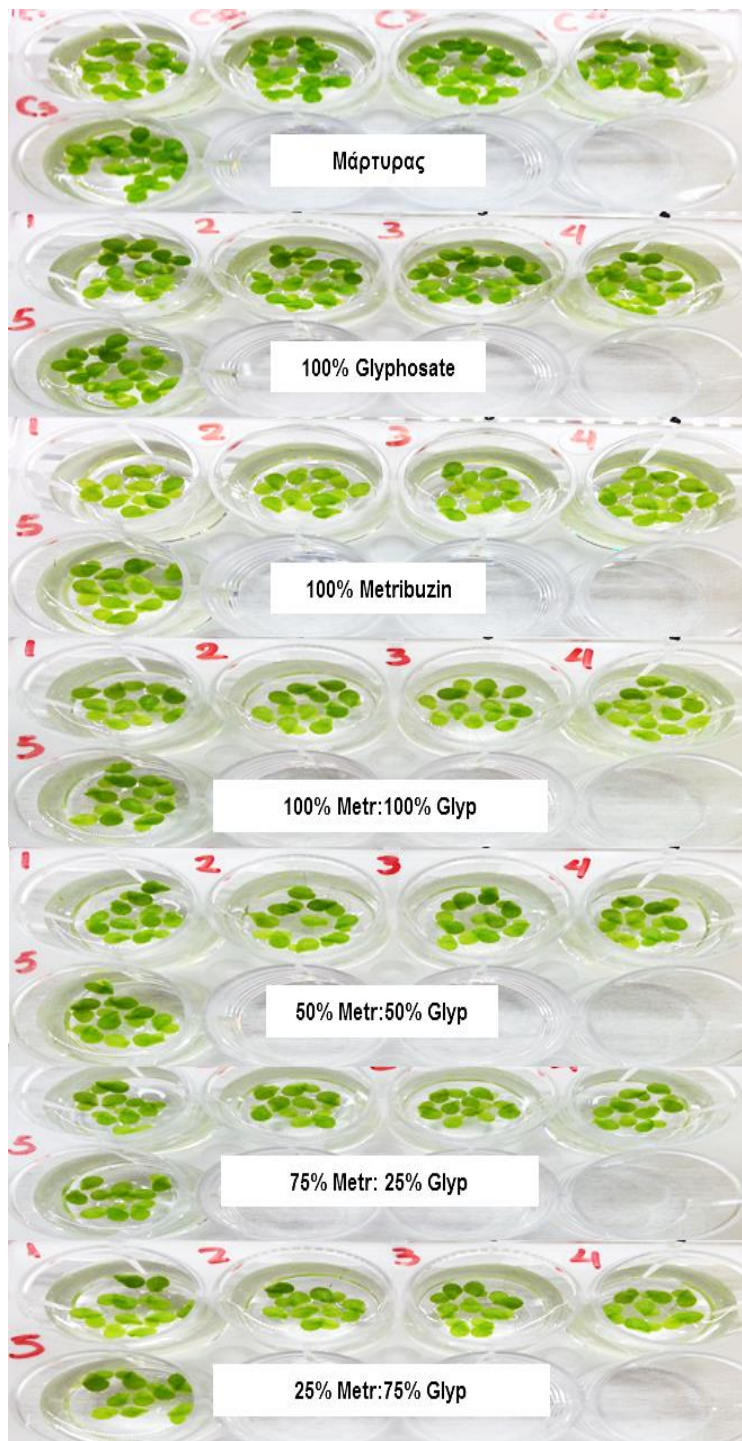
2.5 ΠΕΙΡΑΜΑ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ Ή ΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *LEMNA MINOR* L

2.5.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

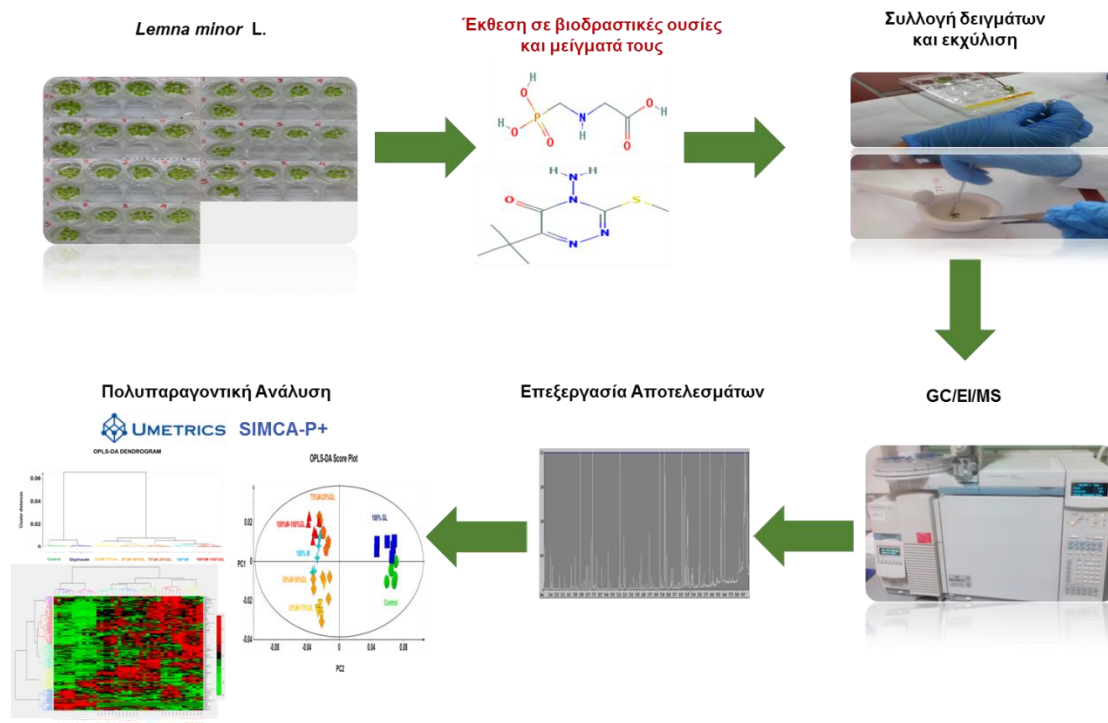
Για το πείραμα της συνδυαστικής φυτοτοξικότητας, έγιναν στα φυτά της *L. minor* L. συνολικά 6 επεμβάσεις με μεμονωμένα ζιζανιοκτόνα ή μείγματα τους και 5 επαναλήψεις για κάθε επέμβαση σε αποστειρωμένα πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 12 θέσεων (**Εικόνα 20**) ακολουθώντας το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 21**. Το πείραμα έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες. Έγιναν βιοδοκιμές στο 100% των τιμών EC₅₀ για κάθε ένα ζιζανιοκτόνο ξεχωριστά και έπειτα παρασκευάστηκαν μείγματα των δύο ζιζανιοκτόνων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις των επεμβάσεων φαίνονται αναλυτικά στον **Πίνακα 3**. Τα πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας με τις επεμβάσεις παρέμειναν σε θάλαμο ανάπτυξης για 48h με φωτοπερίοδο (16h φως και 8h σκοτάδι).

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις των ζιζανιοκτόνων metribuzin και glyphosate στις διάφορες επεμβάσεις στο φυτό *L. minor* L.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ	METRIBUZIN (%EC ₅₀)	GLYPHOSATE (%EC ₅₀)
1	0	0
2	100	0
3	0	100
4	100	100
5	50	50
6	75	25
7	25	75



Εικόνα 20. Βιοδοκιμές φυτοτοξικότητας μεμονωμένων ζιζανιοκτόνων και μειγμάτων τους σε διάφορες συγκεντρώσεις σε φυτά *L. minor* L. έπειτα από 48h με φωτοπερίοδο (16h φως και 8h σκοτάδι) (Metr=Metribuzin και Glyp=Glyphosate, % αναφέρεται στην τιμή EC₅₀)



Εικόνα 21. Στάδια πειράματος μεταβολομικής για τον προσδιορισμό της τοξικότητας των ζιζανιοκτόνων metribuzin και glyphosate και μειγμάτων τους σε φυτά *L. minor L.*

2.5.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Μετά από 48h τα φυτά συλλέχθηκαν σε erpendorfs (1,5 mL) και τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο για λίγα λεπτά ώστε να σταματήσει άμεσα ο μεταβολισμός τους (quenching). Τα φυτά συντηρήθηκαν στους -80°C . Στη συνέχεια, οι ιστοί λειοτριβήθηκαν σε γουδιά με υγρό άζωτο έως ότου να γίνουν ομοιόμορφη σκόνη (**Εικόνα 22**) και στα γουδιά προστέθηκαν 500μL μείγματος εκχύλισης μεθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (50:50, ο/ο) και το εκχύλισμα συλλέγονταν με πιπέτα σε erpendorfs. Τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν για 20min σε λουτρό υπερήχων (Branson 1210, Danbury, USA) και ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντιο περιστροφικό αναδευτήρα (GFL 3006, Gesellschaft für

Labortechnik mbH, Burfwedel, Germany) για 2h στις 150 rpm στους 24°C. Στη συνέχεια, τα



Εικόνα 22. Συλλογή φυτών *L. minor* L. σε erpendorfs και λειοτριβίση σε γουδιά με υγρό άζωτο.

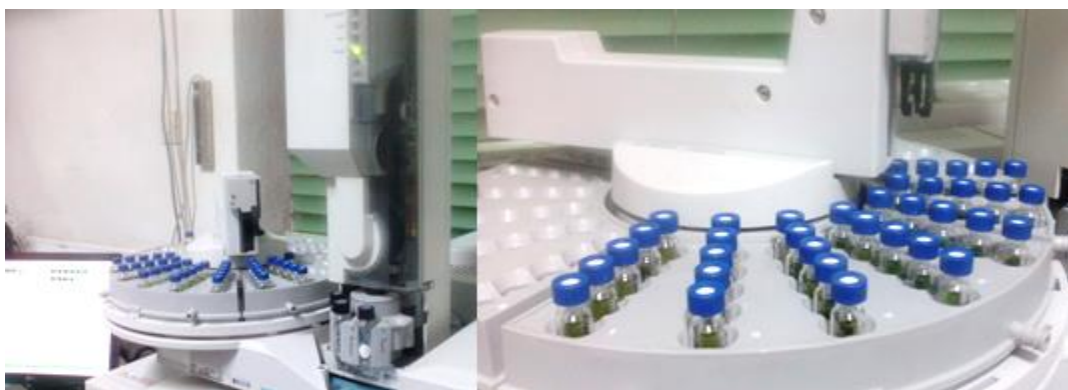
εκχυλίσματα φιλτραρίστηκαν με φίλτρο 0.2μm (Macherey-Nagel, Duren, Germany), τοποθετήθηκαν σε νέα erpendorfs και σε καθένα από αυτά προστέθηκαν 20μL διαλύματος ριβιτόλης (0.2mg/mL μεθανόλης), ως εσωτερικού προτύπου. Ακολούθησε η εξάτμιση των δειγμάτων σε συσκευή εξάτμισης και με το πέρας αυτής, έγινε η παραγωγοποίηση των δειγμάτων. Αυτή έγινε με την προσθήκη 80μL MeOX σε κάθε erpendorf και παραμονή αυτών για 2h σε υδατόλουτρο (Daihan Labtech, Gyeonggi-do, Korea) και τέλος προσθήκη 80μL MSTFA σε κάθε erpendorf και παραμονή των δειγμάτων για 2h στους 30°C και για 1,5h στους 37°C σε υδατόλουτρο. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν microinserters (Macherey-Nagel Duren, Germany). Μετά την παραπάνω διαδικασία, τα δείγματα ήταν έτοιμα για ανάλυση με GC/EI/MS

2.6 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ GC/EI/MS

Για την ανάλυση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Agilent 6890 MS (Agilent Technologies Inc.) εφοδιασμένος με ανιχνευτή μάζας 5973 inert mass selective detector (MSD) και αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler) 7683. Χρησιμοποιήθηκε στήλη (HP-5MS, μήκους 30 m, διαμέτρου 0.25 mm, πάχος υμενίου 0.25 μm , Agilent Technologies Inc.) και αναλογία έκχυσης 5:1 και θερμοκρασία 230°C. Συνολικά, 1 μL των δειγμάτων αναλυόταν. Ως φέρων αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο με ρυθμό ροής 1 mL min^{-1} . Η αρχική θερμοκρασία του κλιβάνου ήταν αρχικά σταθερή στους 70°C για 5 min και ακολούθησε αύξησή της με ρυθμό 5°C min^{-1} μέχρι τους 295°C, όπου και διατηρήθηκε σταθερή για 2 min. Χρησιμοποιήθηκε θετικός ιονισμός ηλεκτρονίων στα 70eV. Τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στην περιοχή μαζών 50-800 Da με ρυθμό 2 σαρώσεις ανά δευτερόλεπτο με αρχική καθυστέρηση 10 min. Η θερμοκρασία για την πηγή MS ρυθμίστηκε στους 230°C. και για το τετραπόλο στους 150°C. Κενά δείγματα (blanks) αναλύθηκαν προκειμένου να ανιχνευθεί πιθανή ρύπανση από το χειρισμό και την προετοιμασία του δείγματος, τα αντιδραστήρια, τη στήλη ή το όργανο.



Εικόνα 23. Αέριος χρωματογράφος Agilent 6890N με ανιχνευτή μάζας MS 5973 inert mass selective detector (MSD).



Εικόνα 24. Αυτόματος δειγματολήπτης 7683 (autosampler).

2.7 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΒΑΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ *LEMNA MINOR* L.

Η ανάπτυξη *in-house* βάσης μεταβολιτών του υπό μελέτη οργανισμού αποτελεί βασικό κομμάτι για μελέτες μεταβολομικής. Για το *L. minor* L., η βάση δεδομένων κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας δεδομένα αναλύσεων φύλλων με GC/EI/MS. Η βάση θα φιλοξενηθεί σε ιστοσελίδα η οποία θα κατασκευαστεί με μεθοδολογία που έχει ήδη αναπτυχθεί (Aliferis et al., 2015). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει παρόμοια βάση για το φυτό. Τα χρωματογραφήματα που αποκτήθηκαν αναλύθηκαν με την βοήθεια του προγράμματος AMDIS (<http://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdisexplained>). Το πρόγραμμα επιλέχθηκε λόγω των μεγάλων δυνατοτήτων του για ανάλυση δεδομένων μεταβολομικής. Το AMDIS συνδέεται με την βάση δεδομένων NIST 08 για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών. Έτσι δημιουργήθηκε μία μήτρα (matrix) που περιελάμβανε όλα τα παράγωγα από τους μεταβολίτες του φυτού. Στην μεταβολική βάση συμπληρώθηκαν επιπλέον στοιχεία από τις βάσεις δεδομένων KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-GenomeNet (<http://www.genome.jp/kegg>), pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) και Golm Metabole Database (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>).

2.8 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ, ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΣΗΜΑΝΤΩΝ

Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων για μεταβολομική έγινε με τη χρήση του λογισμικού MS DIAL (Tsugawa et al., 2015). Η μήτρα που προέκυψε αναλύθηκε στο επόμενο στάδιο για την ανακάλυψη των τάσεων ανάμεσα στα δεδομένα και των αντίστοιχων βιοσημαντών. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την πολυπαραγοντική ανάλυση ήταν το SIMCA-P+ v.12.0 (Umetrics, MKS Instruments Inc. Umeå, Sweden). Για την ανίχνευση πιθανών ακραίων τιμών ακολούθησε principal component analysis (PCA). Η ανίχνευση των βιοσημαντών έγινε με την εφαρμογή OPLS-DA ($P < 0.05$). Πρότυπα σφάλματα υπολογίστηκαν με Jack-knifing με 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Επίσης, κατασκευάστηκε heatmap, με την χρήση λογισμικού Matlab 2016 και ειδικών scripts, για την οπτικοποίηση της διακύμανσης των μεταβολιτών ανάλογα με τις επεμβάσεις (Gagné-Bourque et al., 2016).

2.9 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΔΙΚΤΥΩΝ

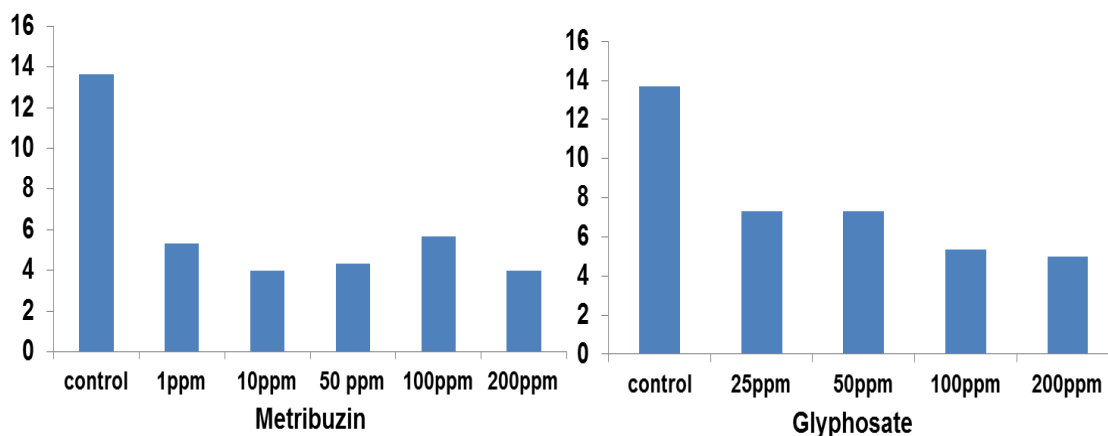
Για την καλύτερη μελέτη της επίδρασης των επεμβάσεων στο μεταβολισμό του φυτού κατασκευάστηκαν μεταβολικά δίκτυα στα οποία φαίνεται πως επηρεάζεται ο κάθε μεταβολίτης ξεχωριστά για κάθε επέμβαση. Ο κόκκινος χρωματισμός επιλέχθηκε να υποδηλώνει την υπεραύξηση της παραγωγής του μεταβολίτη μετά από κάποια επέμβαση, ο πράσινος χρωματισμός για μειωμένη παραγωγή, ενώ γκρι χρωματισμός αντιστοιχεί σε μεταβολίτες των οποίων δε μεταβλήθηκε η συγκέντρωση κατά τις επεμβάσεις. Για την κατασκευή των μεταβολικών δικτύων χρησιμοποιήθηκαν πληροφορίες από τη μεταβολική βάση δεδομένων KEGG.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 ΦΥΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ GLYPHOSATE, METRIBUZIN ΚΑΙ ΜΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΟ *LEMNA MINOR* L.-ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΙΜΩΝ EC₅₀

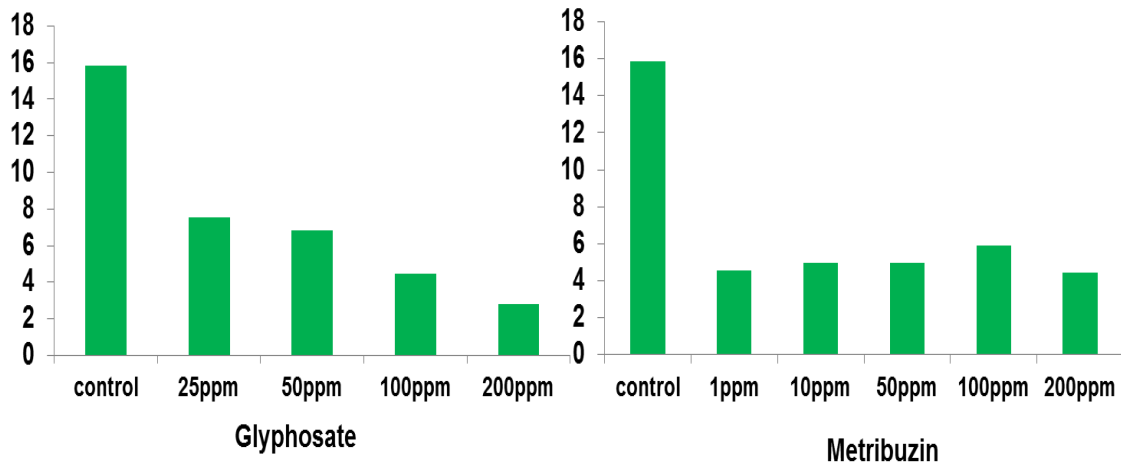
Για να είναι αποτελεσματική η εφαρμογή της μεταβολομικής, είναι απαραίτητο να διαταραχθεί ο μεταβολισμός του υπό μελέτη οργανισμού χωρίς να έχουμε πλήρη κατάρευση του (θανάτωση). Για το λόγο αυτό, είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός των τιμών EC₅₀, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν στον πειραματισμό. Μετά από πάροδο 72h όπου τα φυτά παρέμειναν στα πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας με τις διάφορες συγκεντρώσεις των ζιζανιοκτόνων, μετρήθηκαν τρεις παράμετροι: ο αριθμός των φυλλιδίων (**Εικόνα 25**), το νωπό βάρος (**Εικόνα 26**) και η περιεκτικότητά τους σε χλωροφύλλη (**Εικόνα 27**) και καρροτενοειδή (**Εικόνα 28**). Διαπιστώθηκε ύστερα από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων ότι το νωπό βάρος είναι ο πιο κατάλληλος δείκτης για τον προσδιορισμό των τιμών EC₅₀, οι οποίες για το glyphosate είναι 32ppm και για το metribuzin 1ppm.

Αριθμός Φυλλιδίων



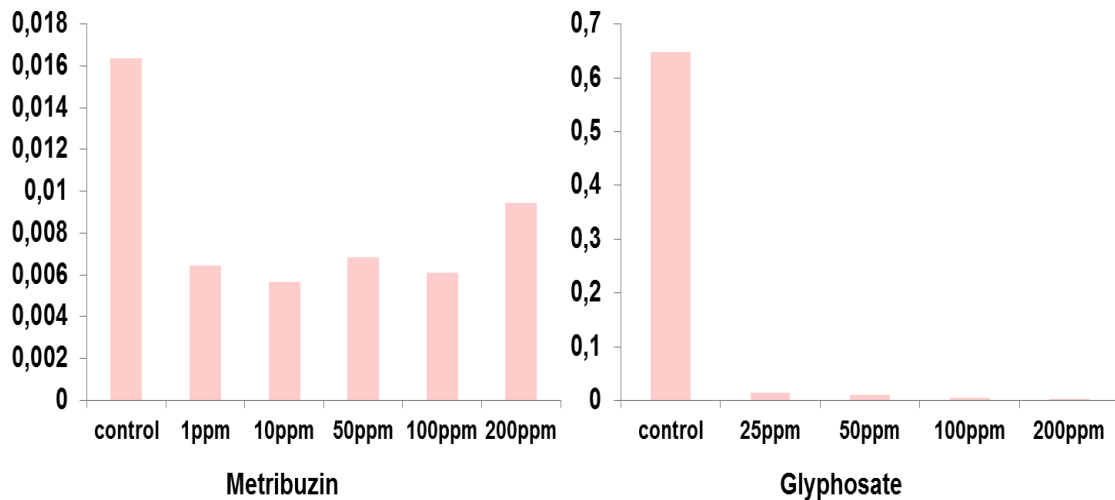
Εικόνα 25: Μέτρηση αριθμού φυλλιδίων των φυτών με την πάροδο 72h σε διάφορες συγκεντρώσεις για κάθε ζιζανιοκτόνο ξεχωριστά για τον προσδιορισμό των τιμών EC₅₀.

Νωπό Βάρος (mg)



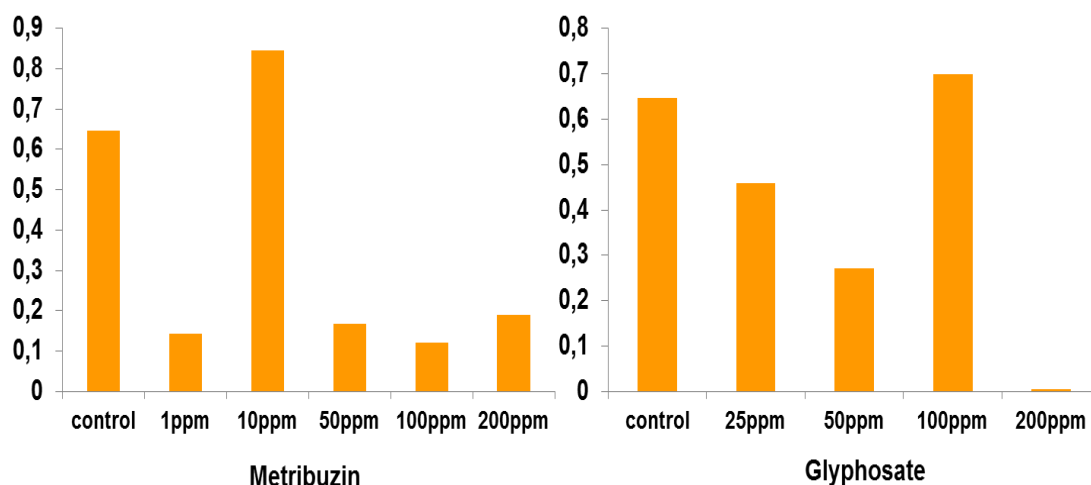
Εικόνα 26: Μέτρηση νωπού βάρους των φυτών με την πάροδο 72h σε διάφορες συγκεντρώσεις για κάθε ζιζανιοκτόνο ξεχωριστά για τον προσδιορισμό των τιμών EC_{50} .

ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗ (mg/mL)



Εικόνα 27: Μέτρηση της περιεκτικότητας των φυτών σε χλωροφύλλη με την πάροδο 72h σε διάφορες συγκεντρώσεις για κάθε ζιζανιοκτόνο ξεχωριστά για τον προσδιορισμό των τιμών EC_{50} .

Περιεκτικότητα σε καροτενοειδή (mg/mL)



Εικόνα 28: Μέτρηση της περιεκτικότητας των φυτών σε καροτενοειδή με την πάροδο 72h σε διάφορες συγκεντρώσεις για κάθε ζιζανιοκτόνο ξεχωριστά για τον προσδιορισμό των τιμών EC_{50} .

3.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΟ *LEMNA MINOR* L.

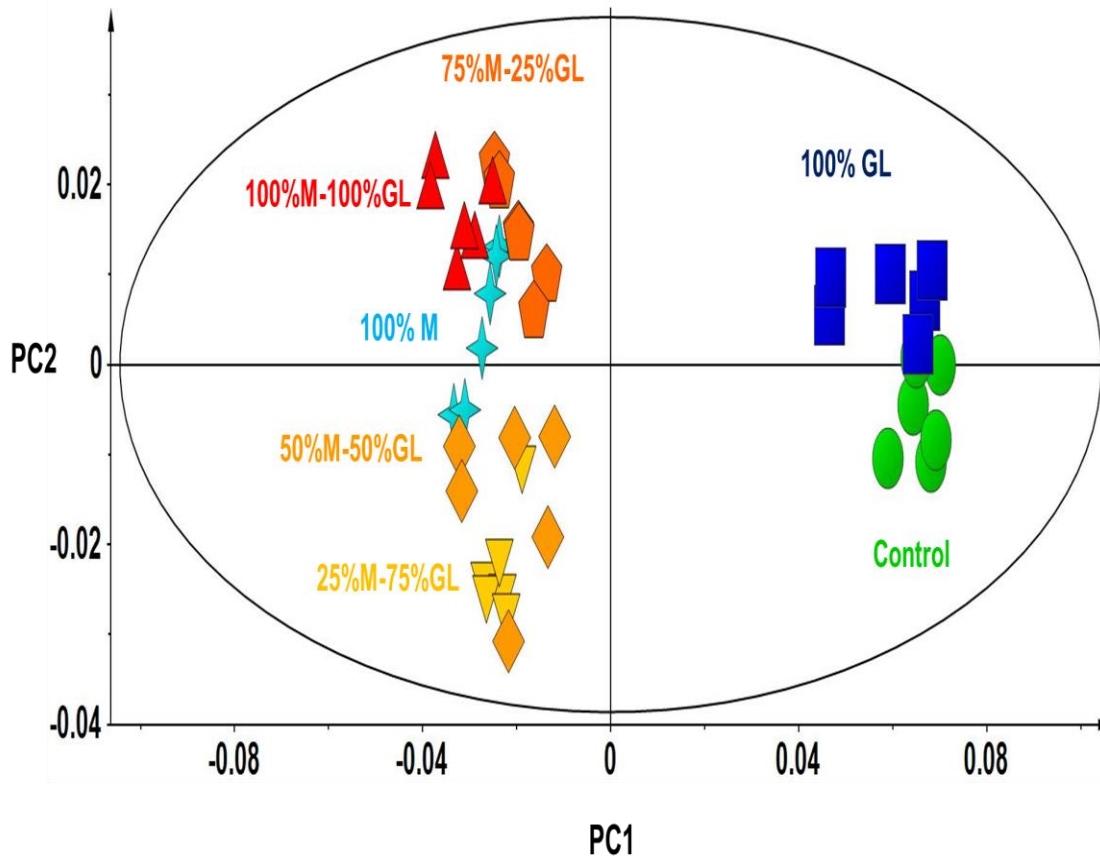
Όπως αναφέρθηκε στην **Παράγραφο 2.7**, με την ανάλυση των δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος AMDIS, ανιχνεύθηκαν 209 μεταβολικά χαρακτηριστικά. Από αυτά, τα 100 ταυτοποιήθηκαν με την βοήθεια της βάσης δεδομένων NIST 08. Έτσι δημιουργήθηκε η μεταβολική βάση δεδομένων για το *L. minor* L., που περιελάμβανε όλα τα παράγωγα από τους μεταβολίτες του φυτού (**Παράρτημα, Πίνακας 4**).

3.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ *LEMNA MINOR* L. ΣΕ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ GLYPHOSATE, METRIBUZIN ΚΑΙ ΜΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥΣ

Όπως αναφέρθηκε στην **Παράγραφο 2.5.1**, τα φυτά του *L. minor* L. υποβλήθηκαν σε βιοδοκιμές τοξικότητας των ζιζανιοκτόνων glyphosate και metribuzin, καθώς και σε βιοδοκιμές συνδυαστικής τοξικότητας με μείγματα τους σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων στο GC/EI/MS υποβλήθηκαν σε πολυπαραγοντική ανάλυση για να μελετηθούν οι αλλαγές στο μεταβολισμό του φυτού σε σχέση με τις επεμβάσεις με εφαρμογή OPLS-DA ($P < 0.05$).

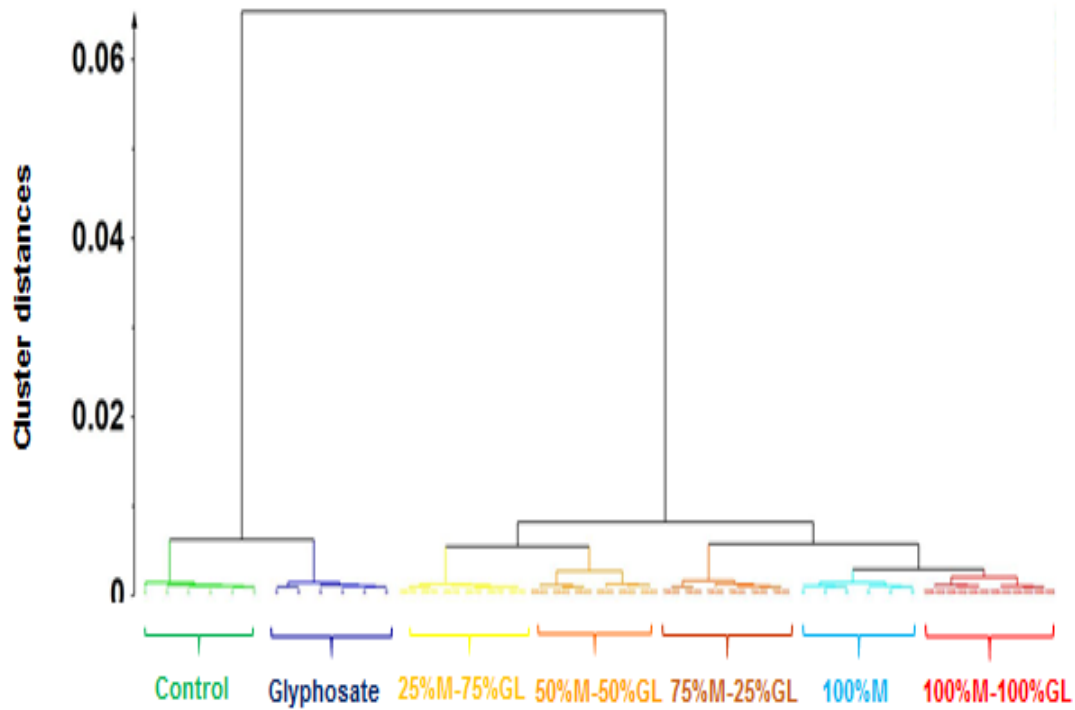
Το score plot που προέκυψε με εφαρμογή OPLS-DA για το σύνολο των επεμβάσεων (**Εικόνα 29**), έδειξε ότι οι βιολογικές επαναλήψεις του μάρτυρα διακρίνονται από τις επαναλήψεις των υπόλοιπων επεμβάσεων, επιβεβαιώνοντας έτσι την επίδραση των επεμβάσεων στον μεταβολισμό του φυτού. Επιπλέον, η καλή ομαδοποίηση των βιολογικών επαναλήψεων και η απουσία ακραίων τιμών επιβεβαιώνουν την καλή επαναληψιμότητα των πειραματικών βιοαναλυτικών και βιοπληροφοριακών πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν.

Επίσης, φαίνεται ότι οι επεμβάσεις με metribuzin και τα μείγματα των ζιζανιοκτόνων προκαλούν παρόμοιες μεταβολές στο μεταβολισμό του *L. minor* L. γιατί είναι πολύ κοντά μεταξύ τους σε αντίθεση με αυτές του glyphosate που βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση (**Εικόνα 29**).

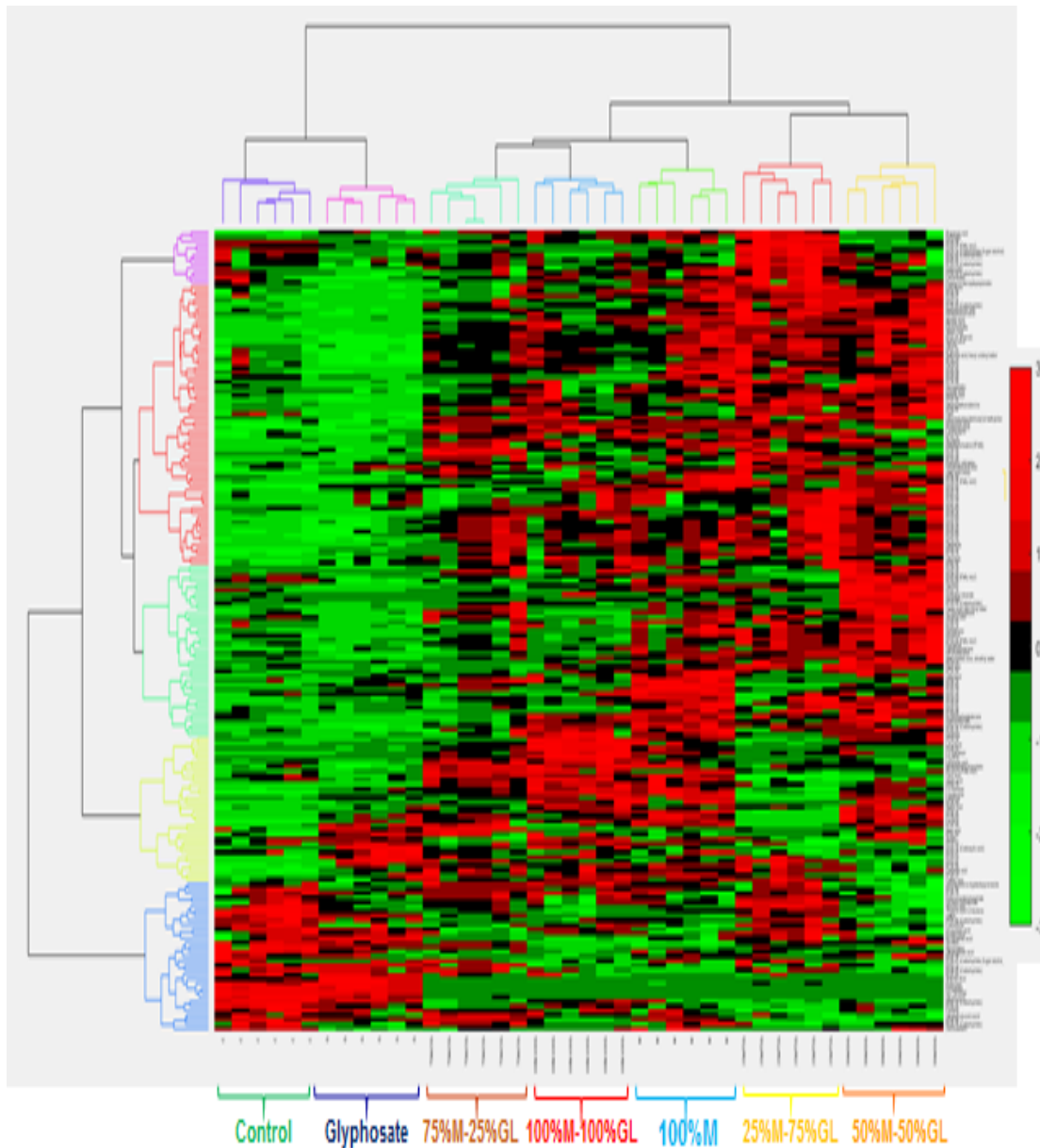


Εικόνα 29. OPLS-DA score plot για την επίδραση ζιζανιοκτόνων και μιγμάτων τους στο μεταβολισμό του *Lemna minor* L. (Control=Μάρτυρας, M=Metribuzin, GL-Glyphosate. Μάρτυρας ●, 100% glyphosate ■, 100% metribuzin ★, 100% metribuzin-100% glyphosate ▲, 50% metribuzin-50% glyphosate ◆, 75% metribuzin-25% glyphosate ⬠, 25% metribuzin-75% glyphosate ▼, τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών ως προς τις αντίστοιχες τιμές EC_{50}).

Το αντίστοιχο δενδρόγραμμα ιεραρχικής ανάλυσης HCA (**Εικόνα 30**) συμπληρώνει τα αποτελέσματα του OPLS-DA score plot, επιβεβαιώνοντας τον πλήρη διαχωρισμό μεταξύ των διαφόρων επεμβάσεων. Οι επαναλήψεις ομαδοποιούνται και φαίνεται με μεγαλύτερη ευκρίνεια οι αποστάσεις των ομάδων επεμβάσεων. Επίσης, η δισδιάστατη ιεραρχική ανάλυση με χρήση **Heatmap (2D-HCA heatmaps)** (**Εικόνα 31**) δείχνει μία γενικότερη εικόνα της συμπεριφοράς των μεταβολιτών στον μεταβολισμό του φυτού ανάλογα με την επέμβαση.



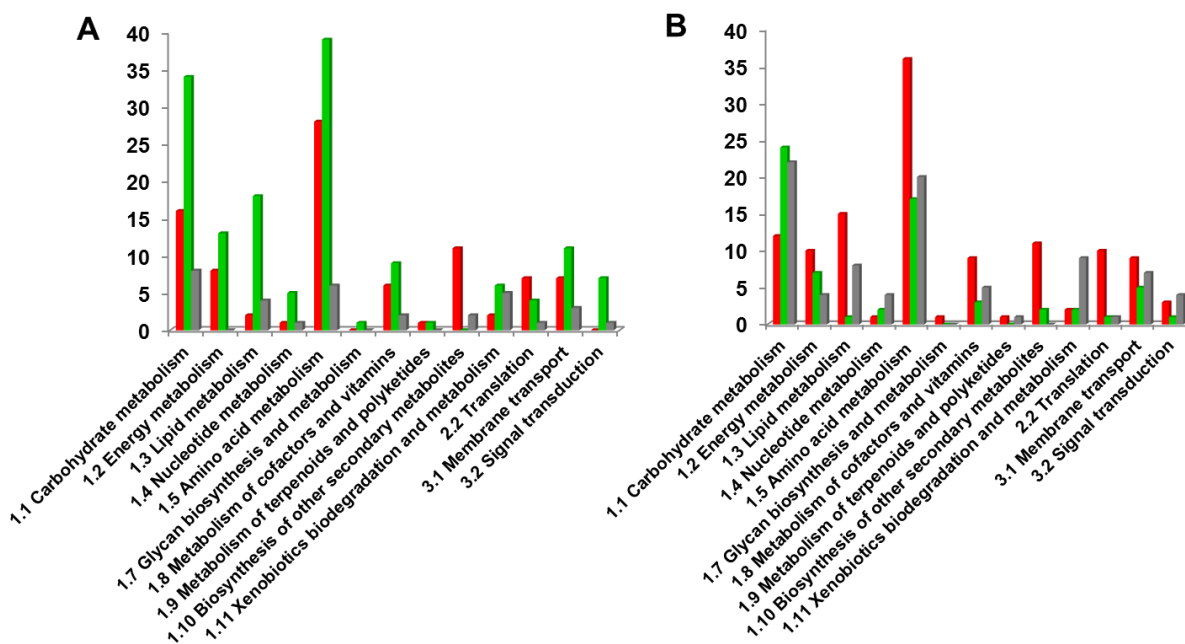
Εικόνα 30. Δενδρόγραμμα ιεραρχικής ανάλυσης HCA στο οποίο απεικονίζεται η ομαδοποίηση των επεμβάσεων και οι αποστάσεις μεταξύ τους (Control=Μάρτυρας, M=Metribuzin, GL-Glyphosate, τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών ως προς τις αντίστοιχες τιμές EC₅₀).



Εικόνα 31. Δισδιάστατη ιεραρχική ανάλυση με χρήση Heatmap (2D-HCA heatmaps). Στους Heatmaps απεικονίζονται οι μεταβολές στη συγκέντρωση μεταβολιτών μεταξύ των επεμβάσεων που κωδικοποιούνται με έναν χρωματικό κώδικα. Με πράσινο χρωματισμό δηλώνονται οι μεταβολίτες που υποπαρήχθησαν, με κόκκινο αυτοί που υπερπαρήχθησαν και με γκρι αυτοί που δεν επηρεάστηκαν από τις επεμβάσεις από τα ζιζανιοκτόνα και τα μείγματα τους. Οι αποστάσεις ταξινόμησης υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Ward. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών ως προς τις αντίστοιχες τιμές EC_{50} (Control=Μάρτυρας, M=Metribuzin, GL=Glyphosate).

3.2.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΠΕΜΒΑΣΕΩΝ ΣΕ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

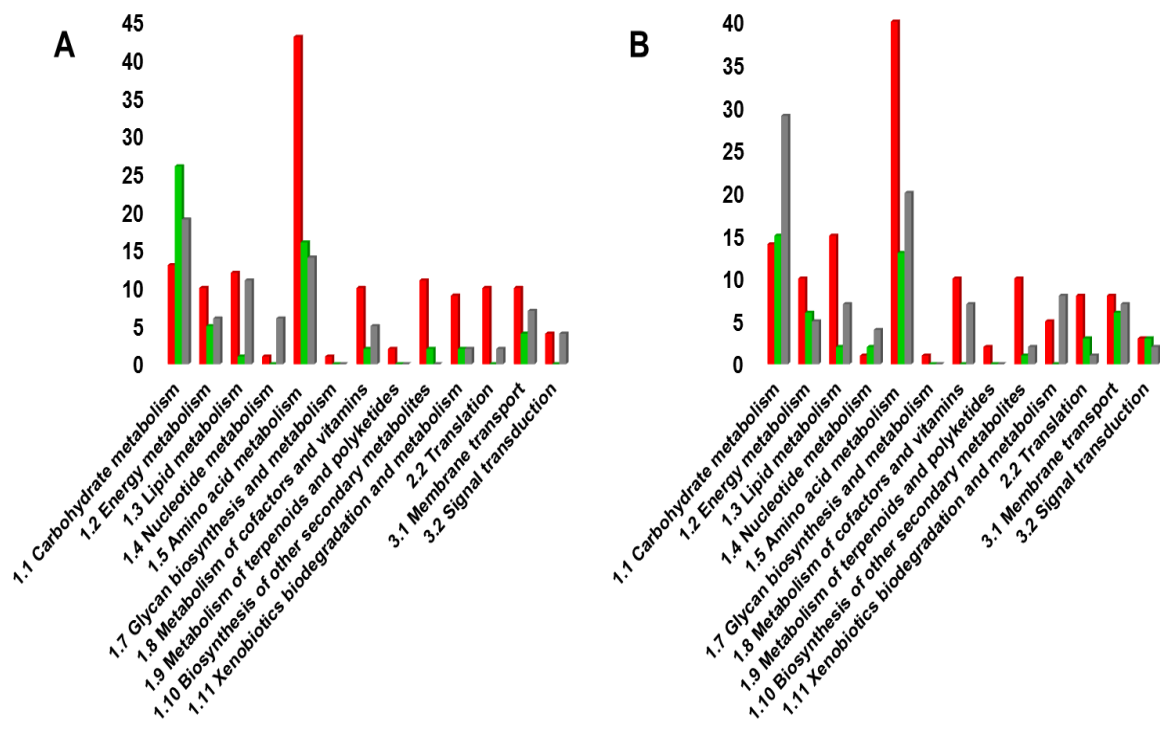
Παρατηρήθηκε ότι όλες οι επεμβάσεις επηρεάζουν κυρίως τα μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των αμινοξέων, της ενέργειας και των λιπιδίων. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι το glyphosate μειώνει την παραγωγή των περισσότερων μεταβολιτών που σχετίζονται με το μεταβολισμό των παραπάνω (**Εικόνα 32A**). Αντίθετα, το metribuzin (**Εικόνα 32B**) προκαλεί υπερπαραγωγή των περισσότερων μεταβολιτών που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των αμινοξέων, της ενέργειας και των λιπιδίων. Παρόμοια με το glyphosate, το metribuzin μειώνει την παραγωγή πολλών μεταβολιτών που συνδέονται με το μεταβολισμό των υδατανθράκων, ενώ ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών παραμένει αμετάβλητος.

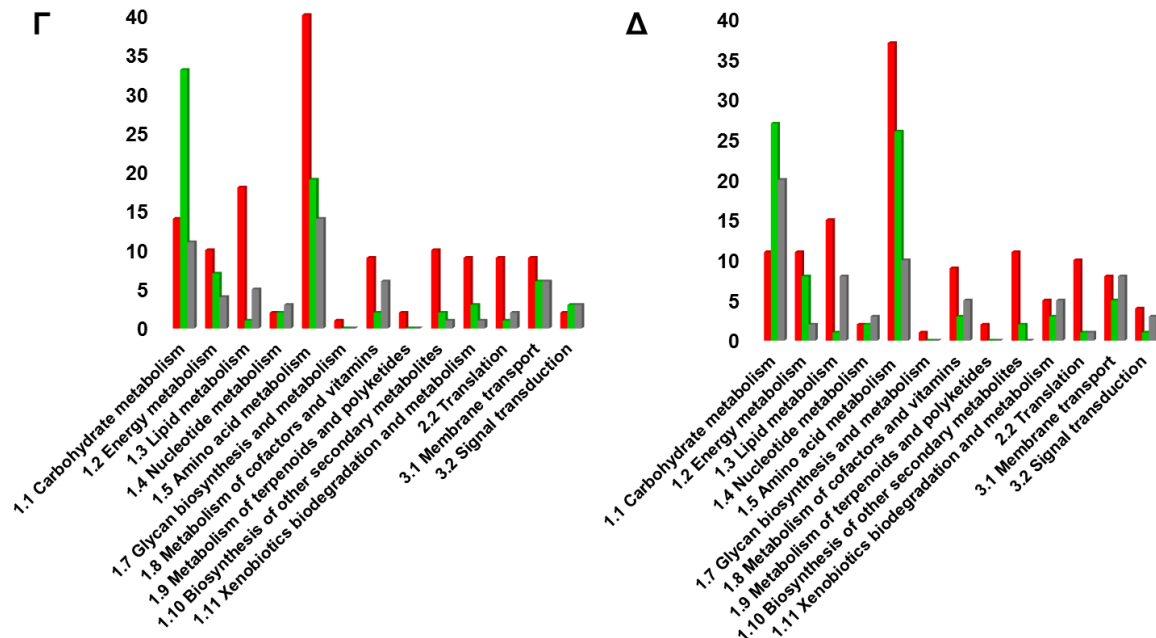


Εικόνα 32. Επίδραση επέμβασης με τα ζιζανιοκτόνα (**A**) glyphosate 100% EC₅₀ και (**B**) metribuzin 100% EC₅₀ στα βιοσυνθετικά μονοπάτια του φυτού *L. minor* L. Με κόκκινο χρωματισμό δηλώνονται οι μεταβολικές οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων έχουν υπερπαραχθεί, με πράσινο οι μεταβολικές οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων έχουν μειώσει την παραγωγή του και με γκρι

αυτές που δεν έχουν μεταβληθεί. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών ως προς τις αντίστοιχες τιμές EC₅₀.

Τα δεδομένα από τα ραβδογράμματα (**Εικόνα 33**) επιβεβαιώνουν το OPLS-DA score plot στο ότι οι επεμβάσεις με το metribuzin και τα μείγματα των ζιζανιοκτόνων επηρεάζουν παρόμοια το μεταβολισμό του φυτού. Όλα τα μείγματα των ζιζανιοκτόνων αύξησαν την παραγωγή των περισσότερων μεταβολιτών που σχετίζονται με την ενέργεια, το μεταβολισμό των αμινοξέων και των λιπιδίων, εκτός από την επέμβαση με 100% metribuzin-100% glyphosate όπου οι περισσότεροι μεταβολίτες του μεταβολισμού των λιπιδίων δεν επηρεάστηκαν. Οι μεταβολίτες που συνδέονται με το μεταβολισμό των υδατανθράκων μείωσαν την παραγωγή τους σε όλες τις επεμβάσεις των μειγμάτων, εκτός από την επέμβαση 25% metribuzin-75% glyphosate όπου οι περισσότεροι μεταβολίτες δεν επηρεάστηκαν. Επίσης, σε όλες οι υπόλοιπες ομάδες του μεταβολισμού του φυτού φαίνεται να επικρατεί η αύξηση της παραγωγής των μεταβολιτών τους.

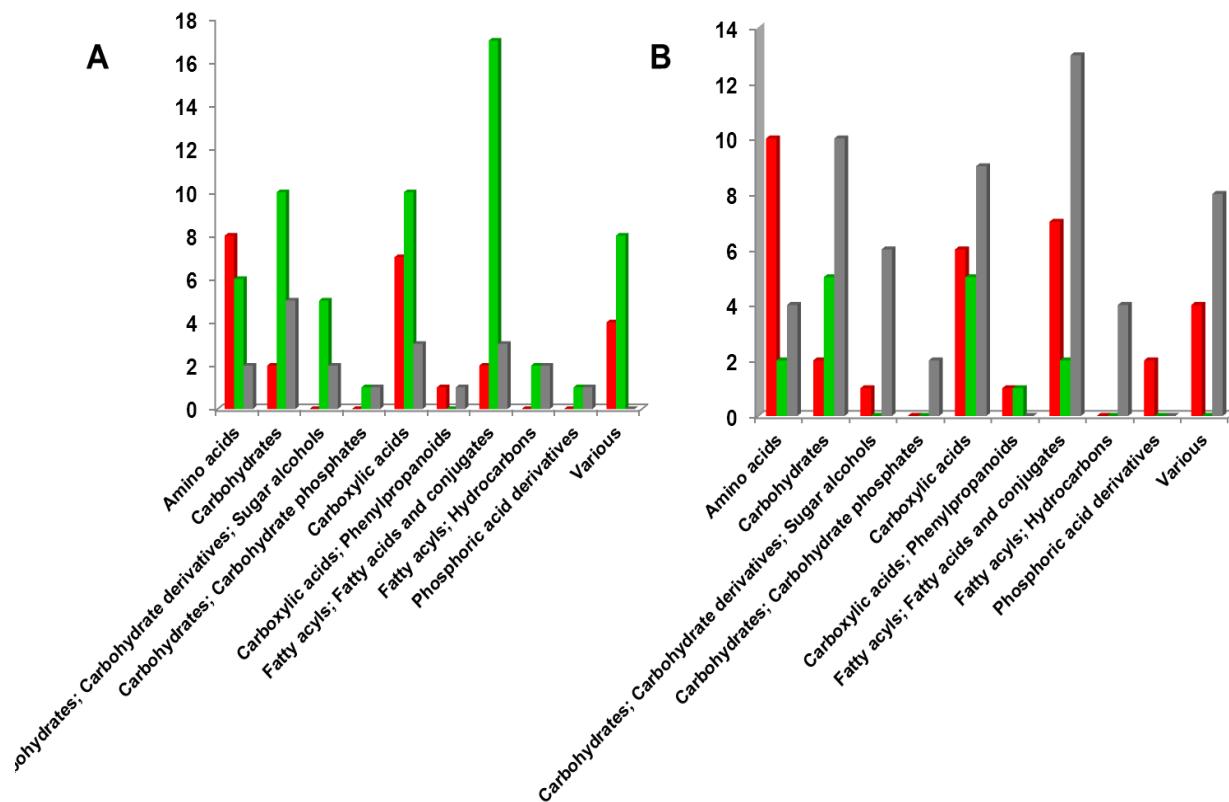




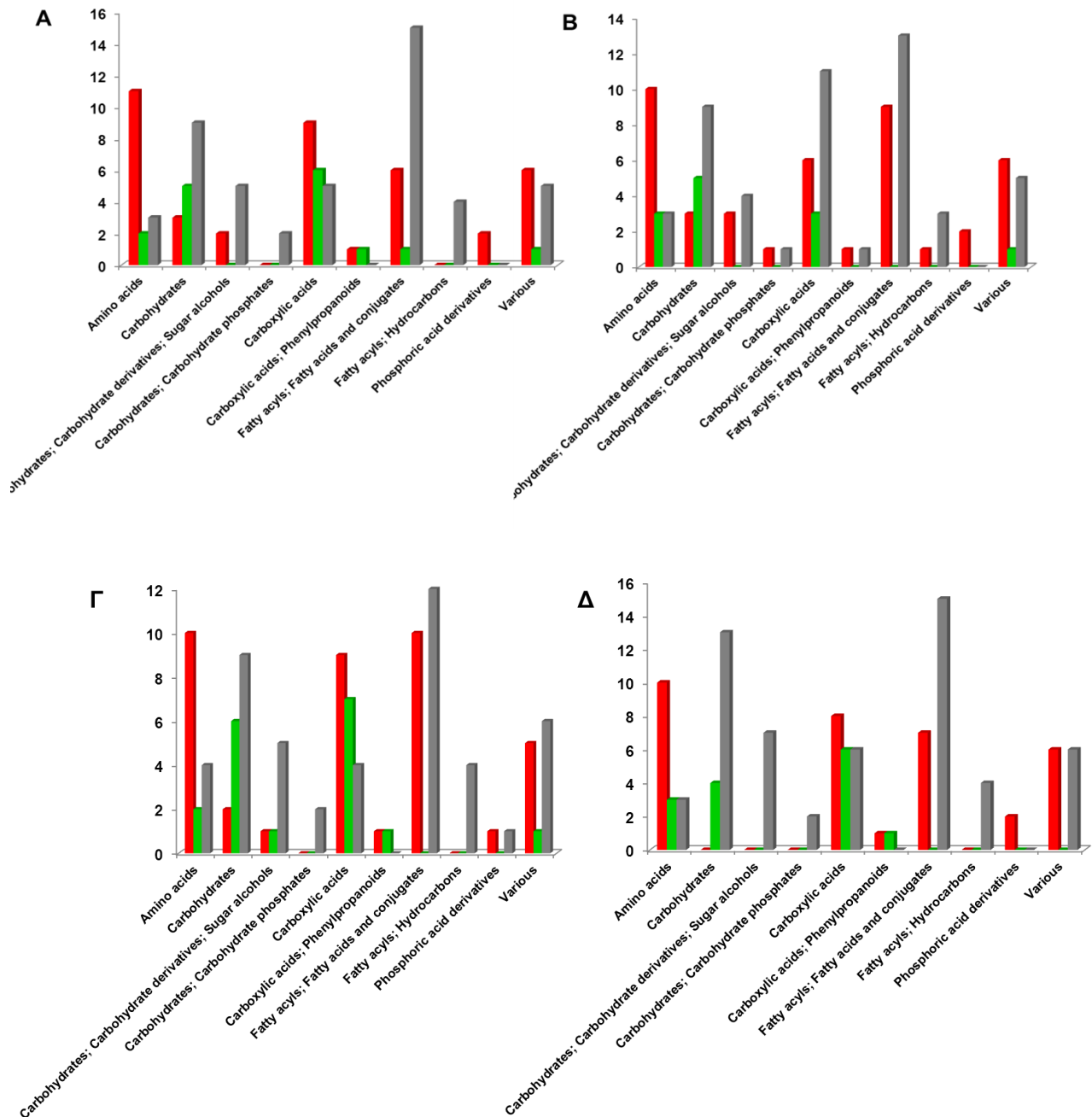
Εικόνα 33. Επίδραση στα βιοσυνθετικά μονοπάτια μεταβολισμού του φυτού *L. minor* L επεμβάσεων με μείγματα ζιζανιοκτόνων (A) 100% Metribuzin-100% Glyphosate, (B) 25% Metribuzin-75% Glyphosate, (Γ) 50% Metribuzin-50% Glyphosate, (Δ) 75% Metribuzin-25% Glyphosate (Με κόκκινο χρωματισμό δηλώνονται οι μεταβολικές οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων έχουν υπερπαραχθεί, με πράσινο οι μεταβολικές οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων είχαν υποπαραχθεί και με γκρι αυτές που δεν έχουν μεταβληθεί. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών ως προς τις αντίστοιχες τιμές EC₅₀).

Όταν οι μεταβολίτες κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με τις χημικές τους ομάδες φαίνεται ότι κατά την επέμβαση με glyphosate οι συγκεντρώσεις των περισσότερων αμινοξέων αυξάνονται, ενώ των υδατανθράκων μειώνονται. Τα περισσότερα καρβοξυλικά και λιπαρά οξέα υποβιοσυνθέτονται, ενώ μικρός αριθμός υπερβιοσυνθέεται (**Εικόνα 34A**).

Η επέμβαση με metribuzin αύξησε τη συγκέντρωση των αμινοξέων αλλά σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από το glyphosate, ενώ η παραγωγή των υδατανθράκων μειώθηκε. Τα περισσότερα καρβοξυλικά και τα λιπαρά οξέα έμειναν αμετάβλητα στην επέμβαση με metribuzin, ενώ για ένα μεγάλο ποσοστό παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής του. Τέλος, αυξήθηκε η παραγωγή όλων των φωσφορικών οξέων (**Εικόνα 34B**).



Εικόνα 34. Επίδραση των ζιζανιοκτόνων **(A)** glyphosate 100% EC₅₀ **(B)** metribuzin 100% EC₅₀ στη χημική σύνθεση του φυτού *L. minor* L. Με κόκκινο χρωματισμό δηλώνονται οι μεταβολικές οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων έχουν υπερπαραχθεί, με πράσινο οι μεταβολικές οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων είχαν υποπαραχθεί και με γκρι αυτές που δεν έχουν μεταβληθεί. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών ως προς τις αντίστοιχες τιμές EC₅₀.



Εικόνα 35. Επίδραση των μειγμάτων των ζιζανιοκτόνων (**A**) 100% Metribuzin-100% Glyphosate, (**B**) 25% Metribuzin-75% Glyphosate, (**Γ**) 50% Metribuzin-50% Glyphosate, (**Δ**) 75% Metribuzin-25% Glyphosate, στη χημική σύνθεση του μεταβολισμού του φυτού *L. minor L.* Με κόκκινο χρωματισμό δηλώνονται οι μεταβολικές οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων έχουν υπερπαραχθεί, με πράσινο οι μεταβολικές οδοί, οι μεταβολίτες των οποίων έχουν μειώσει την παραγωγή του και με γκρι αυτές που δεν έχουν μεταβληθεί. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών ως προς τις αντίστοιχες τιμές EC_{50} .

Από την **Εικόνα 35** φαίνεται ότι οι χημικές ομάδες συμπεριφέρονται παρόμοια. Συγκεκριμένα, σε όλες τις επεμβάσεις με τα μείγματα των ζιζανιοκτόνων αυξάνεται η παραγωγή των περισσότερων αμινοξέων, ενώ οι περισσότεροι υδατάνθρακες δεν μεταβάλλονται. Τα καρβοξυλικά οξέα αυξάνονται σε όλες τις επεμβάσεις με μείγματα, εκτός από την επεμβάση με 25% metribuzin-75% glyphosate, στην οποία μειώνονται. Ως επί το πλείστον, τα λιπαρά οξέα δεν επηρεάζονται από καμία επέμβαση με μείγματα, ενώ τέλος τα φωσφορικά οξέα αυξάνουν την παραγωγή τους στις επεμβάσεις 100% metribuzin-100% glyphosate, 25% metribuzin-75% glyphosate και 75% metribuzin-25% glyphosate.

3.2.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ *LEMNA MINOR* L. ΣΤΙΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕ METRIBUZIN, GLYPHOSATE ΚΑΙ ΤΑ ΜΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥΣ

Για την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης των επεμβάσεων στο γενικό μεταβολισμό του *L. minor* L. και την κατανόηση της μεταβολής της συγκέντρωσης των μεταβολιτών κατασκευάστηκε ο χάρτης των μεταβολικών μονοπατιών που εμπλέκονται στον μεταβολισμό και οι αντίστοιχες διακυμάνσεις τους για τα τις διάφορες επεμβάσεις με τα ζιζανιοκτόνα και μείγματά τους (**Εικόνα 36**).

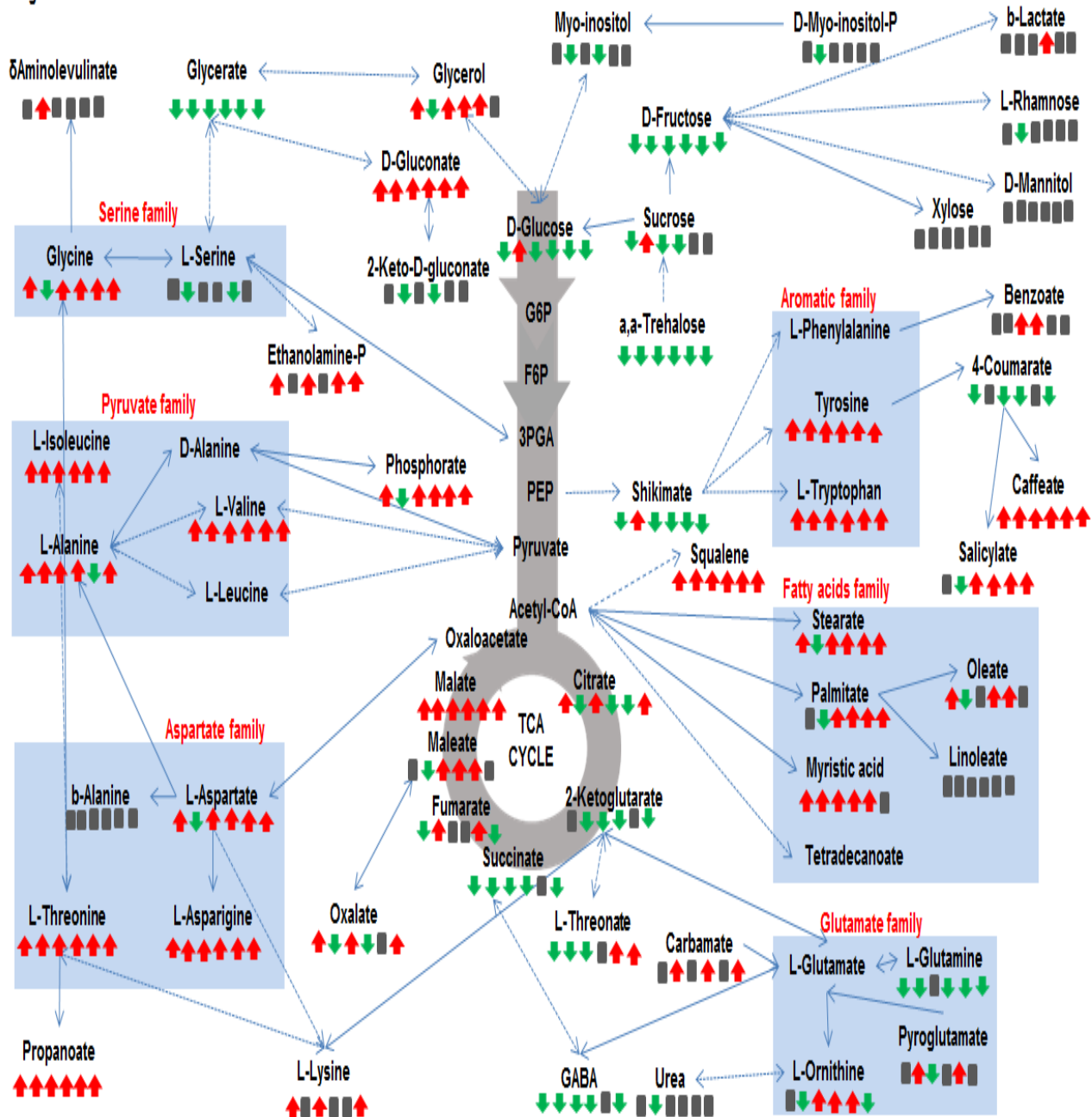
Ανιχνεύθηκαν πολλοί μεταβολίτες με διαφορετική αντίδραση σε σχέση με τις επεμβάσεις. Στην **Εικόνα 36** οι μεταβολίτες που υπερβιοσυνθέτονται σε κάθε επέμβαση σε σχέση με το μάρτυρα παρουσιάζονται με κόκκινο χρωματισμό και ανοδικό βέλος, ενώ οι μεταβολίτες που υποβιοσυνθέτονται σε σχέση με το μάρτυρα απεικονίζονται με πράσινο και καθοδικό βέλος.

Σε αντίδραση στην καταπόνηση που προκαλείται στα φυτά από όλες τις επεμβάσεις υπερβιοσυνθέτονται οι μεταβολίτες ισολευκίνη (L-Isoleucine), βαλίνη (L-Valine), θρεονίνη (L-Threonine), ασπαριγίνη, (L-Asparigine), προπανοϊκό οξύ (Propanoate), γλουκονικό οξύ (D-Gluconate), μαλικό οξύ (Malate), σκουαλένιο (Squalene), τυροσίνη (Tyrosine), τρυπτοφάνη (L-Tryptophane) και καφεϊκό οξύ (Caffeate) σε όλες τις περιπτώσεις. Αντίθετα, το γλυκερικό οξύ (Glycerate), η φρουκτόζη (D-Fructose) και η τρεχαλόζη (α,α-Trehalose) υποβιοσυνθέτονται σε όλες τις επεμβάσεις.

Τα φυτά αντιδρώντας στις επεμβάσεις με το κάθε ζιζανιοκτόνο ξεχωριστά υπερβιοσυνθέτουν τους μεταβολίτες: ισολευκίνη (L-Isoleucine), βαλίνη (L-Valine), αλανίνη (L-Alanine), θρεονίνη (L-Threonine), ασπαριγίνη, (L-Asparigine), προπανοϊκό οξύ (Propanoate), γλουκονικό οξύ (D-Gluconate), μαλικό οξύ (Malate), σκουαλένιο (Squalene), τυροσίνη (Tyrosine), τρυπτοφάνη (L-Tryptophane), καφεϊκό οξύ (Caffeate) και το μυριστικό οξύ (Myristic acid). Αντίθετα, υποβιοσυνθέτονται το γλυκερικό οξύ (Glycerate), το σουκινικό οξύ (Succinate), το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), το θρεονικό οξύ

C vs M C vs G C vs 100%M - 100%G C vs 50%M - 50%G C vs 25%M - 75%G C vs 75%M - 25%G

▲ upregulated
▼ downregulated
■ non-regulated



Εικόνα 36. Μεταβολικό δίκτυο του *Lemna minor* L. Κάτω από κάθε μεταβολίτη απεικονίζονται από αριστερά προς δεξιά οι συγκρίσεις στο μεταβολισμό του μάρτυρα σε σχέση με τις επεμβάσεις με το metribuzin, το glyphosate και με τα μείγματα 100% metribuzin-100% glyphosate, 50% metribuzin-50% glyphosate, 25% metribuzin-75% glyphosate και 75% metribuzin-25% glyphosate. ▲ υπερβιοσύνθεση του μεταβολίτη, ▼ υποβιοσύνθεση του μεταβολίτη, ■ καμία μεταβολή. Το συμπαγές βέλος μεταξύ

μεταβολιτών σημαίνει ότι η παραγωγή ενός μεταβολίτη οδηγεί στην παραγωγή του επόμενου, ενώ το διακεκομμένο βέλος ότι εμπλέκονται επιπλέον μεταβολικές διεργασίες για την παραγωγή του μεταβολίτη. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών ως προς τις αντίστοιχες τιμές EC_{50} .

(L-Threonate), η φρουκτόζη (D-Fructose), η γλουταμίνη (L-Glutamine) και η τρεχαλόζη (α,α-Trehalose).

Οι μεταβολίτες που υπερβιοσυνθέτονται μετά από τις επεμβάσεις με τα μείγματα των δύο ζιζανιοκτόνων είναι η γλυκίνη (Glycine), η ισολευκίνη (L-Isoleucine), η βαλίνη (L-Valine), το ασπαρτικό οξύ (L-Aspartate), η θρεονίνη (L-Threonine), η ασπαριγίνη, (L-Asparigine), το προπανοϊκό οξύ (Propanoate), το γλουκονικό οξύ (D-Gluconate), το φωσφορικό οξύ (Phosphate), το μαλικό οξύ (Malate), η τυροσίνη (Tyrosine), η τρυπτοφάνη (L-Tryptophane), το καφεϊκό οξύ (Caffeate), το σαλικυλικό οξύ (Salicylate), το στεαρικό οξύ (Stearate) και το παλμιτικό οξύ (Palmitate). Αντίθετα, οι μεταβολίτες που υποβιοσυνθέτονται ως αντίδραση στις επεμβάσεις των μειγμάτων των ζιζανιοκτόνων είναι το γλυκερικό οξύ (Glycerate), το σουκινικό οξύ (Succinate), η γλυκόζη (D-Glucose), η φρουκτόζη (D-Fructose), η τρεχαλόζη (α,α-Trehalose), το σικιμικό οξύ (Shikimate), το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), το κουμαρικό οξύ (4-Coumarate) και η γλουταμίνη (L-Glutamine).

Μία γενική τάση που παρατηρείται είναι ότι οι περισσότεροι μεταβολίτες υπερβιοσυνθέτονται ως αντίδραση στις διάφορες επεμβάσεις, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις η αντίδραση του φυτού στα μείγματα των ζιζανιοκτόνων είναι ίδια με την αντίδραση στην επέμβαση με το metribuzin ως μεμονωμένο ζιζανιοκτόνο. Δηλαδή, φαίνεται ότι το metribuzin επιδρά περισσότερο στο μεταβολισμό του φυτού σε σχέση με το glyphosate κατά τον έλεγχο της συνδυαστικής τοξικότητας στα τιμές EC_{50} που μελετήθηκαν.

Το σαλικυλικό οξύ είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης που ανήκει στην ομάδα των φαινολικών ενώσεων. Επάγει την άνθιση (Raskin, 1992) αλλά ο σημαντικότερος ρόλος του στα φυτά είναι ότι επάγει την ανθεκτικότητα στα παθογόνα και την παραγωγή PR-πρωτεϊνών, που συνδέονται με την αντίδραση υπερευαισθησίας και τη συστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα (Raskin, 1992, Aliferis et al., 2014). Το σαλικυλικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο ως

ενδογενές σήμα τόσο στην βιοτική όσο και στην αβιοτική καταπόνηση (Horváth et al., 2007). Φαίνεται ότι στην επέμβαση με το metribuzin η συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος δεν επηρεάστηκε, σε αντίθεση με την επέμβαση με το glyphosate που η παραγωγή του σαλικυλικού οξέος μειώθηκε. Οι επεμβάσεις συνδυαστικής τοξικότητας προκάλεσαν την υπερβιοσύνθεση αυτού του μεταβολίτη ως αντίδραση στην καταπόνηση του φυτού από τα ζιζανιοκτόνα.

Ένας ακόμα δευτερογενής μεταβολίτης είναι το καφεϊκό οξύ που λειτουργεί ως ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας (Chen and Ho, 1997) και αποτελεί πρόδρομη ένωση άλλων μεταβολιτών που συμβάλλουν στην βιοσύνθεση της λιγνίνης (Boerjan et al., 2003). Σε όλες τις επεμβάσεις με τα ζιζανιοκτόνα μεμονωμένα και με τα μείγματα, το καφεϊκό οξύ υπερβιοσυνθέθηκε, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 36** με τα κόκκινα ανοδικά βέλη σε όλες τις επεμβάσεις.

Το σκουαλένιο είναι υδρογονάνθρακας και τριτερπένιο και παίζει σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση όλων των φυτικών και ζωικών στερολών (RPI) Το σκουαλένιο είναι ο βιοχημικός πρόδρομος για όλη την οικογένεια στεροειδών. Η οξειδωση (μέσω σκουαλενικής μονοοξυγενάσης) ενός από τους τερματικούς διπλούς δεσμούς σκουαλενίου παράγει 2,3-σκουαλενοξειδίο, το οποίο υποβάλλεται σε κυκλοποίηση καταλυόμενη από ένζυμο για να δώσει λανοστερόλη, η οποία κατόπιν επεξεργάζεται σε χοληστερόλη και άλλα στεροειδή. Σε φυτά, το σκουαλένιο είναι ο πρόδρομος της στιγμαστερόλης (Bloch, 1983). Το σκουαλένιο φαίνεται ότι υπερβιοσυντίθεται σε όλες τις επεμβάσεις με τα ζιζανιοκτόνα και με τα μείγματα τους.

Το γ-αμινοβουτυρικού οξύ (GABA) συσσωρεύεται ταχέως στον καταπονημένο ιστό του φυτού και θεωρείται ότι εμπλέκεται στην αυξημένη αντίσταση στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις οδηγώντας σε έγκαιρες φυσιολογικές αποκρίσεις (Kinnnersley and Turano, 2000). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές αποκρίσεις, των φυτών όπως είναι η ρύθμιση του κυτοπλασματικού pH, των ροών άνθρακα στον κύκλο του κιτρικού οξέος (Krebs), του μεταβολισμού του αζώτου, την αποτροπή των εντόμων, την προστασία από το οξειδωτικό στρες και τη σηματοδότηση (Bouché et al., 2003). Φαίνεται, σε αντίθεση με τα παραπάνω, ότι το GABA δεν

συσσωρεύτηκε, αλλά όλες σχεδόν οι επεμβάσεις προκάλεσαν την υποβιοσύνθεση του.

Η τυροσίνη αποτελεί πρόδρομη ένωση για πολλούς και σημαντικούς για την λειτουργία του φυτού δευτερογενείς μεταβολίτες. Είναι ένα αρωματικό αμινοξύ που χρησιμοποιείται επιπλέον από τα κύτταρα για την σύνθεση των πρωτεϊνών. Εμφανίζεται σε πρωτεΐνες που αποτελούν μέρος των διαδικασιών μετάδοσης σήματος (Hoffhines et al., 2006). Η τυροσίνη στην μελέτη αυτή φαίνεται να εμφανίζει υπερβιοσύνθεση σε όλες τις επεμβάσεις.

Η τρυπτοφάνη είναι και αυτή ένα αρωματικό αμινοξύ που συμβάλλει στην βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Η τρυπτοφάνη είναι πρόδρομη ένωση για πολλές ενώσεις, όπως η σεροτονίνη (Wurtman and Anton-Tay, 1969), το νικοτινικό οξύ (Ikeda et al., 1965) και η αυξίνη (Palme and Nagy, 2008). Η τρυπτοφάνη, όπως και η τυροσίνη, φαίνεται να υπερβιοσυντίθεται σε όλες τις επεμβάσεις.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα μελέτη αποδείχθηκε ότι ο πρότυπος οργανισμός *Lemna minor* L. είναι ένας ιδανικός οργανισμός για τη μελέτη της συνδυαστικής τοξικότητας Φ.Π. σε συνδυασμό με αναλύσεις μεταβολομικής. Για τον προσδιορισμό των τιμών EC_{50} το νωπό βάρος φάνηκε να είναι ο πιο κατάλληλος δείκτης. Η εφαρμογή μεταβολικής αποτελεί μία αποτελεσματική βιοαναλυτική μέθοδο για τον έλεγχο της τοξικότητας και της συνδυαστικής τοξικότητας των ζιζανιοκτόνων metribuzin και glyphosate στο μεταβολισμό του φυτού-προτύπου *Lemna minor*, καθώς ανιχνεύθηκαν πολλοί μεταβολίτες που μπορούν να αξιοποιηθούν ως αξιόπιστοι βιοσημαντές.

Ειδικότερα, οι βιολογικές επαναλήψεις του μάρτυρα διακρίνονται από τις επαναλήψεις των υπόλοιπων επεμβάσεων, επιβεβαιώνοντας την επίδραση των ζιζανιοκτόνων στο μεταβολισμό του φυτού. Οι επεμβάσεις με το metribuzin και τα μείγματά του προκαλούν παρόμοιες μεταβολές στον μεταβολισμό σε αντίθεση με το glyphosate.

Σε όλες τις επεμβάσεις επηρεάζονται κυρίως οι μεταβολικές οδοί βιοσύνθεσης των υδατανθράκων, των αμινοξέων, και λιπιδίων και παραγωγή ενέργειας. Το glyphosate προκαλεί την υποπαραγωγή των μεταβολιτών που σχετίζονται με τα παραπάνω, ενώ το metribuzin προκαλεί την υπερπαραγωγή των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των αμινοξέων, της ενέργειας και των λιπιδίων.

Σε όλα τα μείγματα των ζιζανιοκτόνων υπερπαραγονται οι μεταβολίτες που συνδέονται με την ενέργεια, τον μεταβολισμό των αμινοξέων και των λιπιδίων. Οι μεταβολίτες που συνδέονται με τον μεταβολισμό των υδατανθράκων υποπαραγονται σε όλες τις επεμβάσεις με τα μείγματα των ζιζανιοκτόνων.

Αν οι μεταβολίτες κατηγοριοποιηθούν βάσει τις χημικές τους ομάδες, το glyphosate προκαλεί την υπερπαραγωγή των αμινοξέων, ενώ προκαλεί την υποπαραγωγή των υδατανθράκων, των καρβοξυλικών οξέων και των λιπαρών οξέων. Το metribuzin προκαλεί την υπερπαραγωγή των αμινοξέων και των φωσφορικών οξέων, ενώ προκαλεί την υποπαραγωγή των υδατανθράκων. Ως επί το πλείστον, οι επεμβάσεις με τα μείγματα των ζιζανιοκτόνων προκαλούν

την υπερπαραγωγή των αμινοξέων, των καρβοξυλικών οξέων και των φωσφορικών οξέων.

Πολλοί μεταβολίτες θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως βιοσημαντές. Ανάμεσα σε αυτούς, σημαντικοί είναι το σαλικυλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το σκουαλένιο, η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη και το GABA, επειδή είναι ουσίες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του φυτού και στην αντίδρασή του σε καταπονήσεις από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες.

Επόμενος και μακροπρόθεσμος στόχος της μελέτης αυτής είναι η ανάπτυξη και πρακτική εφαρμογή της μεθόδου σε επιφανειακά ύδατα, κανάλια, πηγάδια, αποταμιευτήρες νερού κ.ά. για τον έλεγχο της ποιότητάς τους και την ανίχνευση υπολειμμάτων Φ.Π. που απειλούν τους οργανισμούς μη-στόχους και την ανθρώπινη υγεία. Για την υλοποίηση αυτού του στόχου, απαιτείται η διεξαγωγή περισσότερων πειραμάτων, μελέτης μεγάλου αριθμούς Φ.Π., ώστε η μέθοδος να μπορέσει να εφαρμοστεί για ελέγχους ρουτίνας για την αξιολόγηση της ποιότητας και ασφάλειας των υδάτων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης ήταν ενθαρρυντικά προς αυτή την κατεύθυνση θέτοντας τις βάσεις για περαιτέρω έρευνα σε αυτό το επιστημονικό πεδίο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AKTAR, W., SENGUPTA, D. & CHOWDHURY, A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2, 1-12.
- ALIFERIS, K. A., CHAMOUN, R. & JABAJI, S. 2015. Metabolic responses of willow (*Salix purpurea* L.) leaves to mycorrhization as revealed by mass spectrometry and ¹H NMR spectroscopy metabolite profiling. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- ALIFERIS, K. A. & CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M. 2011. Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives. *Metabolomics*, 7, 35-53.
- ALIFERIS, K. A., FAUBERT, D. & JABAJI, S. 2014. A metabolic profiling strategy for the dissection of plant defense against fungal pathogens. *PLoS One*, 9, e111930.
- ALIFERIS, K. A. & JABAJI, S. 2011. Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100, 105-117.
- ALIFERIS, K. A., MATERZOK, S., PAZIOTOU, G. N. & CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M. 2009. Lemna minor L. as a model organism for ecotoxicological studies performing ¹H NMR fingerprinting. *Chemosphere*, 76, 967-973.
- ARNON, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1.
- BERGMAN, Å., HEINDEL, J. J., JOBLING, S., KIDD, K. A. & ZOELLER, R. T. 2012. Endocrine Disrupting Chemicals-2012.
- BLOCH, K. E. 1983. Sterol, structure and membrane function. *Critical Reviews in Biochemistry*, 14, 47-92.
- BOERJAN, W., RALPH, J. & BAUCHER, M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519-546.
- BORTLESON, G. C. & DAVIS, D. 1997. *Pesticides in selected small streams in the Puget Sound Basin, 1987-1995*, US Geological Survey.
- BOUCHÉ, N., LACOMBE, B. T. & FROMM, H. 2003. GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends in Cell biology*, 13, 607-610.
- BRAMMALL, R. & HIGGINS, V. 1988. The effect of glyphosate on resistance of tomato to *Fusarium* crown and root rot disease and on the formation of host structural defensive barriers. *Canadian Journal of Botany*, 66, 1547-1555.
- CAPEL, P. D., LARSON, S. J. & WINTERSTEIN, T. A. 2001. The behaviour of 39 pesticides in surface waters as a function of scale. *Hydrological processes*, 15, 1251-1269.
- CASALS-CASAS, C. & DESVERGNE, B. 2011. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*, 73, 135-162.
- CHARLTON, S. J. 2009. Agonist efficacy and receptor desensitization: from partial truths to a fuller picture. *British Journal of Pharmacology*, 158, 165-168.
- CHEN, J. H. & HO, C.-T. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2374-2378.

- DAMSTRA, T., BARLOW, S., BERGMAN, A., KAVLOCK, R. & VAN DER KRAAK, G. 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. *Geneva: World Health Organization*.
- DEVESA, R., MOLDES, A., DÍAZ-FIERROS, F. & BARRAL, M. 2007. Extraction study of algal pigments in river bed sediments by applying factorial designs. *Talanta*, 72, 1546-1551.
- DOONG, R.-A., PENG, C.-K., SUN, Y.-C. & LIAO, P.-L. 2002. Composition and distribution of organochlorine pesticide residues in surface sediments from the Wu-Shi River estuary, Taiwan. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 246-253.
- EC 2016. COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL on endocrine disruptors and the draft Commission acts setting out scientific criteria for their determination in the context of the EU legislation on plant protection products and biocidal products.
- EFSA 2013. Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. *EFSA Journal*, 11.
- EFSA 2016a. The 2014 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *In: EFSA Journal*. (ed.).
- EFSA. 2016b. *Endocrine disruptors: EFSA and ECHA outline Guidance plans* [Online]. Available: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/161220-0> [2017]. (Πρόσβαση 2017)
- EFSA 2016c. National summary reports on pesticide residue analysis performed in 2014. *EFSA Journal*.
- ESTOK, D., FREEDMAN, B. & BOYLE, D. 1989. Effects of the herbicides 2, 4-D, glyphosate, hexazinone, and triclopyr on the growth of three species of ectomycorrhizal fungi. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 42, 835-839.
- EU 2016. COMMISSION REGULATION (EU) 2016/60 of 19 January 2016 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for chlorpyrifos in or on certain products Official Journal of the European Union.
- FAO DUCKWEED: A tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment. <http://www.fao.org/ag/AGAInfo/resources/documents/DW/Dw2.htm>. (Πρόσβαση 2017)
- FIEHN, O. 2002. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48, 155-171.
- GAGNÉ-BOURQUE, F., BERTRAND, A., CLAESSENS, A., ALIFERIS, K. A. & JABAJI, S. 2016. Alleviation of drought stress and metabolic changes in timothy (*Phleum pratense* L.) colonized with *Bacillus subtilis* B26. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- GARCIA-REYERO, N. & DENSLOW, N. D. 2006. Applications of genomic technologies to the study of organochlorine pesticide-induced reproductive toxicity in fish. *Journal of Pesticide Science*, 31, 252-262.
- HERRMANN, K. M. & WEAVER, L. M. 1999. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 50, 473-503.
- HISCOX, J. T. & ISRAELSTAM, G. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57, 1332-1334.

- HOFFHINES, A. J., DAMOC, E., BRIDGES, K. G., LEARY, J. A. & MOORE, K. L. 2006. Detection and purification of tyrosine-sulfated proteins using a novel anti-sulfotyrosine monoclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 37877-37887.
- HOPE, J. L., SINHA, A. E., PRAZEN, B. J. & SYNOVEC, R. E. 2005. Evaluation of the DotMap algorithm for locating analytes of interest based on mass spectral similarity in data collected using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1086, 185-192.
- HORVÁTH, E., SZALAI, G. & JANDA, T. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 290-300.
- IKEDA, M., TSUJI, H., NAKAMURA, S., ICHIYAMA, A., NISHIZUKA, Y. & HAYAISHI, O. 1965. Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide II. A role of picolinic carboxylase in the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide from tryptophan in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 240, 1395-1401.
- KELLEY, W. & SOUTH, D. In vitro effects of selected herbicides on growth and mycorrhizal fungi. Weed Science. Society of America Meeting. Auburn University, Auburn, Alabama, 1978. 74-76.
- KINNERSLEY, A. M. & TURANO, F. J. 2000. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19, 479-509.
- KIRK, J. & ALLEN, R. 1965. Dependence of chloroplast pigment synthesis on protein synthesis: effect of actidione. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 21, 523-530.
- KOLE, R., BANERJEE, H. & BHATTACHARYYA, A. 2001. Monitoring of market fish samples for Endosulfan and Hexachlorocyclohexane residues in and around Calcutta. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67, 554-559.
- KOLLE, S. N., RAMIREZ, T., KAMP, H. G., BUESEN, R., FLICK, B., STRAUSS, V. & VAN RAVENZWAAY, B. 2012. A testing strategy for the identification of mammalian, systemic endocrine disruptors with particular focus on steroids. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63, 259-278.
- KREUGER, J. 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990–1996. *Science of the Total Environment*, 216, 227-251.
- LANDOLT, E. 1986a. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae). Veroff. Geobot. Inst. ETH, Zurich. Vol. 1, pp 15, 61-64, 134-137.
- LANDOLT, E. 1986b. The family of Lemnaceae-a monographic study, Vols. 1: Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der Eidgenössischen Technische Hochschule, Stiftung Rubel. *Stiftung Rubel*.
- LANDOLT, E. 1998. Lemnaceae in Kubitzki K. [ed.], The families and genera of vascular plants. *Springer-Verlag*, 4, 264-269.
- LANDOLT, E. & KALENDER, R. 1987. The family of Lemnaceae - a monographic study. Vol 2, Phytochemistry, physiology, application, bibliography. Veroff. Geobot. Inst. ETH, Zurich.
- LOCKE, D., LANDIVAR, J. & MOSELEY, D. The effects of rate and timing on glyphosate applications on defoliation efficiency, regrowth inhibition, lint yield, fiber quality and seed quality. Beltwide Cotton Conferences (USA), 1995.
- MAEDA, H. & DUDAREVA, N. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 73-105.

- MIYAMOTO, J., KEARNEY, P. C. & GREENHALGH, R. 2013. *Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment: Pesticide Residues and Formulation Chemistry*, Elsevier.
- MOCHIZUKI, N., BRUSSLAN, J. A., LARKIN, R., NAGATANI, A. & CHORY, J. 2001. Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 2053-2058.
- MOHLER, R. E., DOMBEK, K. M., HOGGARD, J. C., YOUNG, E. T. & SYNOVEC, R. E. 2006. Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry analysis of metabolites in fermenting and respiring yeast cells. *Analytical Chemistry*, 78, 2700-2709.
- MOORE, M. N. 2002. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 59, 1-15.
- NAGATO, E. G., SIMPSON, A. J. & SIMPSON, M. J. 2016. Metabolomics reveals energetic impairments in *Daphnia magna* exposed to diazinon, malathion and bisphenol-A. *Aquatic Toxicology*, 170, 175-186.
- O'NEIL, W. & RAUCHER, R. 1998. Groundwater public policy leaflet series# 4: The costs of groundwater contamination. Wayzata, MN: Groundwater Policy Education Project.
- OECD 2006. 221: Lemna sp. *Growth Inhibition Test*.
- OEHME, M., HAUGEN, J.-E. & SCHLABACH, M. 1996. Seasonal changes and relations between levels of organochlorines in Arctic ambient air: first results of an all-year-round monitoring program at Ny-Ålesund, Svalbard, Norway. *Environmental Science & Technology*, 30, 2294-2304.
- OLIVEIRA, E., BARATA, C. & PIÑA, B. 2016. Endocrine Disruption in the Omics Era: New Views, New Hazards, New Approaches. *The Open Biotechnology Journal*, 10.
- PALME, K. & NAGY, F. 2008. A new gene for auxin synthesis. *Cell*, 133, 31-32.
- PHILBRICK PHD, T. & LES PHD, D. E. 1996. Evolution of Aquatic Angiosperm Reproductive Systems, *Bioscience*, Vol. 46, No. 11, pp. 813-826.
- RALSTON-HOOPER, K., HOPF, A., OH, C., ZHANG, X., ADAMEC, J. & SEPÚLVEDA, M. S. 2008. Development of GCxGC/TOF-MS metabolomics for use in ecotoxicological studies with invertebrates. *Aquatic Toxicology*, 88, 48-52.
- RALSTON-HOOPER, K. J., ADAMEC, J., JANNASH, A., MOLLENHAUER, R., OCHOA-ACUÑA, H. & SEPÚLVEDA, M. S. 2011. Use of GC× GC/TOF-MS and LC/TOF-MS for metabolomic analysis of *Hyalella azteca* chronically exposed to atrazine and its primary metabolite, desethylatrazine. *Journal of Applied Toxicology*, 31, 399-410.
- RASKIN, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 43, 439-463.
- RPI. *Cholesterol Synthesis* [Online]. Available: <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/cholesterol.htm#prenyl>. (Πρόσβαση 2017)
- RUBIN, J. L., GAINES, C. G. & JENSEN, R. A. 1984. Glyphosate inhibition of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. *Plant Physiology*, 75, 839-845.
- SANTOS, A. & FLORES, M. 1995. Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 20, 349-352.

- SARKAR, A., NAGARAJAN, R., CHAPHADKAR, S., PAL, S. & SINGBAL, S. 1997. Contamination of organochlorine pesticides in sediments from the Arabian Sea along the west coast of India. *Water Research*, 31, 195-200.
- SAVONEN, C. 1997. Soil microorganisms object of new OSU service. *Good Fruit Grower*. <http://www.goodfruit.com/archive/1995/6other.html>.
- SHOAF, W. T. & LIUM, B. W. 1976. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulfoxide. *Limnology and Oceanography*, 21, 926-928.
- SKINNER, M. K. & GUERRERO-BOSAGNA, C. 2009. Environmental signals and transgenerational epigenetics. *Future Medicine* Vol.1 111-117
- SKINNER, M. K., MANIKKAM, M. & GUERRERO-BOSAGNA, C. 2011. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reproductive Toxicology*, 31, 337-343.
- SNAPE, J. R., MAUND, S. J., PICKFORD, D. B. & HUTCHINSON, T. H. 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 67, 143-154.
- SONG, Q., ZHENG, P., QIU, L., JIANG, X., ZHAO, H., ZHOU, H., HAN, Q. & DIAO, X. 2016. Toxic effects of male *Perna viridis* gonad exposed to BaP, DDT and their mixture: a metabolomic and proteomic study of the underlying mechanism. *Toxicology Letters*, 240, 185-195.
- TSUGAWA, H., CAJKA, T., KIND, T., MA, Y., HIGGINS, B., IKEDA, K., KANAZAWA, M., VANDERGHEYNST, J., FIEHN, O. & ARITA, M. 2015. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods*, 12, 523-526.
- TUZIMSKI, T. 2012. Pesticide residues in the environment. *Pesticides Evaluation of Environmental Pollution*, Edited by Hamir S. Rathore and Leo M.L. Nollet, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- VAN RAVENZWAAY, B., KOLLE, S. N., RAMIREZ, T. & KAMP, H. G. 2013. Vinclozolin: a case study on the identification of endocrine active substances in the past and a future perspective. *Toxicology Letters*, 223, 271-279.
- VIANT, M. R., PINCETICH, C. A., HINTON, D. E. & TJEERDEMA, R. S. 2006a. Toxic actions of dinoseb in medaka (*Oryzias latipes*) embryos as determined by in vivo ³¹P NMR, HPLC-UV and ¹H NMR metabolomics. *Aquatic Toxicology*, 76, 329-342.
- VIANT, M. R., PINCETICH, C. A. & TJEERDEMA, R. S. 2006b. Metabolic effects of dinoseb, diazinon and esfenvalerate in eyed eggs and alevins of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) determined by ¹H NMR metabolomics. *Aquatic Toxicology*, 77, 359-371.
- VRYZAS, Z., ALEXOUDIS, C., VASSILIOU, G., GALANIS, K. & PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. 2011. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 174-181.
- WARNE, M., LENZ, E., OSBORN, D., WEEKS, J. & NICHOLSON, J. 2000. An NMR-based metabolomic investigation of the toxic effects of 3-trifluoromethyl-aniline on the earthworm *Eisenia veneta*. *Biomarkers*, 5, 56-72.
- WASKOM, R. 1994. Best management practices for private well protection. Colorado State Univ. Cooperative Extension (August).
- WELTHAGEN, W., SHELLIE, R. A., SPRANGER, J., RISTOW, M., ZIMMERMANN, R. & FIEHN, O. 2005. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC × GC-TOF) for high resolution metabolomics: biomarker discovery on spleen tissue extracts of obese NZO compared to lean C57BL/6 mice. *Metabolomics*, 1, 65-73.

- WURTMAN, R. J. & ANTON-TAY, F. 1969. The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Recent Progress in Hormone Research*, 25, 493-522.
- ΒΛΑΣΣΗ. 2017. Ανίχνευση υπολειμμάτων των φαρμάκων που δρουν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, σε κηπευτικά και μηλοειδή στην περιοχή της Θεσσαλίας. Πτυχιακή μελέτη.
- ΖΙΩΓΑΣ, Β. & ΜΑΡΚΟΓΛΟΥ, Α. 2010. Γεωργική Φαρμακολογία: Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων.
- ΣΤΕΦΑΝΑΚΗ & ΝΙΚΗΦΟΡΑΚΗ 1999. Συστηματική βοτανική. Εκδότης Σταμούλης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 4: Μεταβολική βάση δεδομένων (matrix) *Lemna minor* L. Αναχνεύθηκαν 209 μεταβολικά χαρακτηριστικά, εκ των οποίων 100 ταυτοποιήθηκαν.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
Retention time (min)	Metabolites (Raw)	Metabolites (Common name)	Metabolites (Derivatives)	Synonyms	KEGG ID	Metabolite name	PubChem CID	Registry Number	Biosynthetic pathway(s)																								
10.32	N-(dimethylsilyl)-timethy	L-Alanine	L-Alanine (2TMS)	amino propionic acid	C00041	A119004	5950	56-41-7	tion in photosynthetic organisms m																								
10.59	isobutyryl(dimethylsilyl)	NA	NA	butoxy(dimethyl)2-ri	NA	NA	NA	89043-32-3	NA																								
11.15	Nonanol 4-O-timethylsilyl	NA	NA	silyl-1-Propylhexyl	NA	NA	NA	39789-12-3	NA																								
11.35	dic acid, bis(trimethylsilyl)	Oxalic acid	Oxalic acid 2TMS	oxalic acid diTMS, Ox	C00209	971	18294-04-7	id dicarboxylate metabolism map011																									
11.52	RT11.50 (GMD NA114002)	GMD NA114002	GMD NA114002	NA	NA	NA	NA	NA	NA																								
11.63	3-[(trimethylsilyl)oxy]-tri	D-lactate	D-lactate (2TMS)	3-hydroxy, di-TMS,	C00186	A105001	107689	79-33-4	lactate metabolism map00640Prop																								
11.83	RT11.83	RT11.83	RT11.83	NA	NA	NA	NA	NA	NA																								
12.22	RT12.22	RT12.22	RT12.22	NA	NA	NA	NA	NA	NA																								
12.44	isoleucine, trimethylsilyl es	L-isoleucine	L-isoleucine TMS	isoleucine, tris deriva	C00407	6306	73-32-5	of alkaloids derived from ornithine, lys																									
12.62	acid (trimethylsilyl)(trimet	Carbanic acid	Carbanic acid (2TMS)	NA	NA	A116008	NA	NA	NA																								
13.15	RT13.15	RT13.15	RT13.15	NA	NA	NA	NA	NA	NA																								
13.83	L-Valine	L-Valine	L-Valine (2TMS)	mino-3-methylbutyric	C00183	A122001	6287	72-18-4	NA biosynthesis map00966 Glucose																								
14.26	2-Trimethylsilyloxyethyl eth	N-Ethyldecanamine	N-Ethyldecanamine (2TMS)	panamine; N-Ethyldeci	NA	NA	8769	250688-29-0	NA																								
14.34	Pentane 3,3-dimethyl-	Pentane	Pentane	thylpentane (C2H5)2	NA	na	8003	562-49-2	NA																								
14.46	iszoic acid trimethylsilyl es	Benzoic acid	Benzoic acid 2TMS	of benzoic acid, Tri	C00180	A128003	243	2078-12-8	of alkaloids derived from shikimate f																								
14.55	rea, N,N-bis(trimethylsilyl)	Urea	Urea (2TMS)	methylsilylurea, N,N	C00086	A127002	1176	18297-63-7	degradation map01100 Metabolic p																								
14.68	RT14.68	RT14.68	RT14.68	NA	NA	NA	NA	NA	NA																								
14.73	thylsilyl)(trimethylsilyl)ox	Carbanic acid	Carbanic acid 3 TMS	ethylsilyl)(trimethylsilyl	C01563	na	277	463-77-4	imidine metabolism map00910Nitrog																								
14.88	RT14.88	RT14.88	RT14.88	NA	NA	NA	NA	NA	NA																								
14.99	Serine, bis(trimethylsilyl)-	L-Serine	L-Serine 2TMS	-trimethylsilyl ester	C00065	A128001	5951	70125-39-2	pathways map01110 Biosynthesis of																								
15.04	isoc acid, dimethyl(tert-but	2-Ethylhexanoic acid	γ-butyroic acid, 2-Ethyl hexanoic acid, 2-Ethylcaproi	NA	NA	A116006	8697	NA	NA																								
15.25	Amino levulinic acid tri-TM	δ Amino levulinic acid	δ Amino levulinic acid (3TMS)	levulinate, 5-Amino	C00430	A177003	137	106-60-5	ynthesis of plant secondary metab																								
15.49	RT15.49	RT15.49	RT15.49	NA	NA	NA	NA	NA	NA																								
15.63	rol, trimethyl-, phosphate	Phosphoric acid	Phosphoric acid (3TMS)	phoric acid, tris-TMS	C00009	A129001	1004	7664-38-2	Photosynthesis map00509Epidog																								
15.68	yl-2-butenedioic acid, dim	Dimethyl citraconate	NA	thyl maleate, Methyl	C05126	NA	5280755	617-54-9	NA																								
15.72	cerol, tris(trimethylsilyl) et	Glycerol	Glycerol (3TMS)	-[(trimethylsilyl)oxy]	C00116	A129003	753	56-81-5	Galactose metabolism map0																								
16.07	L-Threonine	L-Threonine	L-Threonine (2TMS)	-TMS, L-threonine 2	C00188	A132001	6288	72-19-5	abolism map00970Aminoacyl-tRNA																								
16.09	N-(dimethylsilyl)-, trimeth	L-Isoleucine	L-Isoleucine (2TMS)	2TMS derivative, Isol	C00407	A132002	6306	7483-92-3	f alkaloids derived from ornithine, lys																								
16.35	isic acid (Z)-, bis(trimethyl	Maleic acid	Maleic acid 2TMS	silyl)(Z)-2-butenedi	C01384	A133003	444266	23508-82-9	abolism map00750Nicotinate and nicotinamide																								
16.58	isic acid, bis(trimethylsilyl	Succinic acid	Succinic acid (TMS)	bis-TMS, Succinic a	C00042	A134001	1110	110-15-6	Sulfur metabolism map01060 Bios																								
17.09	tert-butyl(dimethylsilyl)-, ter	L-Ornithine	L-Ornithine (3TBDMS)	L-Ornithine, N2,N5-di	C00077	NA	6262	NA	abolism map01060 Bios																								

Πίνακας 4 (Συνέχεια)

Retention Time (min)	Metabolites (Raw)	Metabolites (Common name)	Metabolites (Derivatives)	Synonym(s)	KEGG ID	Metabolite name	PubChem CID	Registry Number	Biosynthetic pathway(s)
17.29	3-bis(trimethylsilyloxy)-	Glycemic acid	Glycemic acid (3TMS)	(3TMS): Glycemic acid	C00258	A135003	439194	473-81-4	map00630Glyoxylate
17.48	2-oxo-4-oxo-1,4-bis(trimethylsilyloxy)-	Fumaric acid	Fumaric acid (TMS)	(2TMS): Fumaric acid	C00122	A137001	444972	110-17-8	map01062Biosynthesis of terpenoids
17.63	8,10-Dioxahexadecane	NA	NA	NA	NA	NA	14631730	NA	NA
17.72	2-methyl-, trimethylsilyloxy-	Salicylic acid	Salicylic acid (2TMS)	(TMS): Salicylic acid	C00805	A152003	338	3789-85-3	map01060Biosynthesis of plant secondary metabolites
17.81	N,N-tris(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyloxy-	L-Asparagine	L-Asparagine (3TMS)	(TMS): 2-Aminosuccinyl-L-aspartic acid	C00152	A168001	6267	70-47-3	map01060Biosynthesis of plant secondary metabolites
17.94	RT17.94	RT17.94	RT17.94	NA	NA	NA	NA	NA	NA
18.07	Serine trims	Serine	Serine (3TMS)	(TMS): trimethylsilyloxy-L-serine	C00065	A138001	5951	64625-17-8	threonine metabolism
18.24	3,4-bis(trimethylsilyloxy)-	Threonic acid	Threonic acid-1,4-lactone (2TMS)	(2TMS): Threonic acid-1,4-lactone	NA	A140005	2724794	55220-79-6	NA
18.8	3-tris(trimethylsilyloxy)-L-threonine	L-threonine	L-threonine (3TMS)	(3TMS): β-(trimethylsiloxy)-L-threonine	C00188	A140001	6288	7537-02-2	map01100Metabolic pathways
18.94	RT18.94	RT18.94	RT18.94	NA	NA	NA	NA	NA	NA
19.07	RT19.07	RT19.07	RT19.07	NA	NA	NA	NA	NA	NA
19.3	lutamine, tris(trimethylsilyloxy)-	Glutamine	Glutamine (3TMS)	(TMS): LUTAMINE, N,N,O-TM	C00303	A178001	738	6899-04-3	NA
19.5	2-oxo-3,4-bis(trimethylsilyloxy)-	L-aspartic acid	L-aspartic acid (3TMS)	(3TMS): L-Aspartic acid, (3TMS)	C00049	A152002	5960	55268-53-6	map01060Biosynthesis of plant secondary metabolites
19.63	N-bis(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyloxy-	β-Alanine	β-Alanine (3TMS)	(3TMS): Alanine, N,N-bis(trimethylsilyloxy)-	C00099	A144001	239	55255-77-1	map01100Metabolic pathway
19.73	1-(trifluoroacetyl)-, trimethylsilyloxy-	glycine	glycine (TMS)	(TMS): N-(trifluoroacetyl)-glycine	C00037	NA	750	52568-79-9	map01100Metabolic pathway
20.25	RT20.25	RT20.25	RT20.25	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20.46	1-oxo-undecyl-, trimethylsilyloxy-	NA	NA	hexyl undecyl sulfite	NA	NA	6421372	NA	NA
20.48	RT20.46	RT20.46	RT20.46	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20.71	RT 20.71 (-ane)	RT 20.71 (-ane)	RT 20.71 (-ane)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20.91	N-(trimethylsilyloxy)-, bis(trimethylsilyloxy)-	L-Aspartic acid	L-Aspartic acid (3TMS)	(3TMS): Aspartic acid derivative	C00049	A152002	5960	55268-53-6	map01060Biosynthesis of plant secondary metabolites
20.94	Octane, 2,7-dimethyl-, trimethylsilyloxy-	2,7-Dimethyloctane	NA	(TMS): Diisoamylglycolate	NA	NA	14070	1072-16-8	NA
21.17	RT21.17	RT21.17	RT21.17	NA	NA	NA	NA	NA	NA
21.39	1-(trimethylsilyloxy)-, bis(trimethylsilyloxy)-	Malic acid	Malic acid (3TMS)	(3TMS): oxybutanedioic acid	C00149	A149001	222656	97-67-6	map01063Biosynthesis of alkaloids derivative
21.56	RT21.56	RT21.56	RT21.56	NA	NA	NA	NA	NA	NA
21.63	1-(trimethylsilyloxy)-, bis(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyloxy-	Pyroglutamic acid	Pyroglutamic acid (2TMS)	(2TMS): Diethyl 2-ethylpyrrolidonecarboxylate	C01879	A153002	7405	30274-77-2	map00480Glutathione metabolism
21.79	RT21.79	RT21.79	RT21.79	NA	NA	NA	NA	NA	NA
21.96	2-oxo-1-(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyloxy-	D-Threitol	D-Threitol (4TMS)	(4TMS): Threitol, 1,2,3,4-tetra-O-(trimethylsilyloxy)-	C16884	A149002	169019	32381-52-5	NA
22.01	RT22.01	RT22.01	RT22.01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
22.06	2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyloxy)-	L-Aspartic acid	L-Aspartic acid (3TMS)	(3TMS): Aspartic acid derivative	C00049	A152002	5960	55268-53-6	map01060Biosynthesis of plant secondary metabolites
22.14	N-(trimethylsilyloxy)-, bis(trimethylsilyloxy)-	GABA	GABA (3TMS)	(3TMS): γ-aminobutyramide	C00334	A153003	119	56-12-2	map00410beta-Alanine metabolism
22.19	3-(trimethylsilyloxy)-4-aminobutanoic acid	3,6-Pentadecanol	3,6-Pentadecanol (TMS)	(TMS): 5-trimethylthio	NA	NA	NA	NA	NA
22.32	1-(trimethylsilyloxy)-, bis(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyloxy-	3,6-Pentadecanol	3,6-Pentadecanol (TMS)	(TMS): 5-trimethylthio	NA	NA	NA	NA	NA

Πίνακας 4 (Συνέχεια)

1	Retention time (min)	Metabolites (Raw)	Metabolites (Common name)	Metabolites (Derivatives)	Synonyms	KEGG ID	Metabolite name	PubChem CID	Registry Number	Biosynthetic pathway(s)
67	22.41	263	2,6-Bis(tert-butyl)phenol	2,6-Bis(tert-butyl)phenol (TMS)	phenylsilane, 2,6-Bis(tert-butyl)phenol	NA	NA	NA	10416-73-6	NA
68	22.68	69	Threonic acid	Threonic acid (4TMS)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
69	22.91	243	1-Dodecanol	1-Dodecanol (TMS)	dimethylsilyl ether, 1-Dodecanol	C01620	A156001	15152	38191-88-7	0053Ascorbate and aldarate metabolism
70	23.08	219	Propanoic acid	Propanoic acid 3TMS	methylpropanoic acid	C00163	NA	1032	6221-88-1	NA
71	23.34	73	Threonic acid	Threonic acid (4TMS)	dimethylsilyl ether, 2-Aminosuccinic acid	C01620	A156001	15152	38166-00-6	ppd1120Microbial metabolism in diverse environments
72	23.55	57	Threonic acid	Threonic acid (4TMS)	dimethylsilyl ether, 2-Aminosuccinic acid	NA	NA	NA	NA	0053Ascorbate and aldarate metabolism
73	23.61	73	Threonic acid	Threonic acid (4TMS)	dimethylsilyl ether, 2-Aminosuccinic acid	NA	NA	NA	NA	NA
74	23.71	159	L-Asparagine	L-asparagine (2TMS)	Asparagine, 2-Iminosuccinic acid	C00152	NA	6267	70-47-3	D1100Metabolic pathways map01110
75	23.8	306	Xylose	Xylose (4TMS)	TMS derivative, Xylose	C00181	A165001	135191	NA	mino sugar and nucleotide sugar metabolism
76	24.24	73	L-Asparagine	L-Asparagine (3TMS)	Asparagine, 2-Aminosuccinic acid	C00152	A168001	6267	70-47-3	map01060Biosynthesis of plant secondary metabolites
77	24.44	246	L-Phenylalanine	L-Phenylalanine (2TMS)	dimethylphenylalanine, Asparagine, L-Glutamine-L-2-amino-3-hydroxybutanoic acid	C00079	NA	6140	7364-51-4	pd from shikimate pathway map01060
78	24.44	246	Glutamine	Glutamine (3TMS)	IS: L-Glutamine-L-2-amino-3-hydroxybutanoic acid	C00064	A178001	5961	NA	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism
79	24.67	217	Glutamine	RT24.67 (Carbohydrate)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
80	24.69	328	Glutamine	RT24.69	NA	NA	NA	NA	NA	NA
81	24.92	217	Glutamine	RT24.92 (Carbohydrate)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
82	25.05	307	Glutamine	RT25.05 (Carbohydrate)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
83	25.31	233	Glutamine	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
84	25.48	71	L-Asparagine	L-Asparagine (3TMS)	s-TMS, Asparagine, 13-Oxo-3,6,9,12-tetrahydro-2H-pyridin-2-one	C00152	A168001	6267	55649-62-2	D1100Metabolic pathways map01110
85	25.6	73	L-Asparagine	L-Asparagine (3TMS)	s-TMS, Asparagine, 13-Oxo-3,6,9,12-tetrahydro-2H-pyridin-2-one	NA	NA	3034434	17831-71-9	NA
86	25.67	55	L-Asparagine	L-Asparagine (3TMS)	s-TMS, Asparagine, 13-Oxo-3,6,9,12-tetrahydro-2H-pyridin-2-one	NA	NA	6267	55649-62-2	D1100Metabolic pathways map01110
87	25.8	71	L-Asparagine	L-Asparagine (3TMS)	s-TMS, Asparagine, 13-Oxo-3,6,9,12-tetrahydro-2H-pyridin-2-one	NA	NA	6267	55649-62-2	D1100Metabolic pathways map01110
88	26.01	173	Ascorbic acid	Ascorbic acid (3TMS)	Ascorbic acid, 2,3-Dihydroxybutanedioic acid	NA	NA	NA	NA	NA
89	26.11	307	Ascorbic acid	Ascorbic acid (3TMS)	Ascorbic acid, 2,3-Dihydroxybutanedioic acid	NA	NA	NA	NA	NA
90	26.23	206	Ascorbic acid	Ascorbic acid (3TMS)	Ascorbic acid, 2,3-Dihydroxybutanedioic acid	NA	NA	NA	NA	NA
91	26.26	275	Ascorbic acid	Ascorbic acid (3TMS)	Ascorbic acid, 2,3-Dihydroxybutanedioic acid	NA	NA	NA	NA	NA
92	26.47	307	Sugar alcohols	Sugar alcohols (3TMS)	Sugar alcohols, 1,2,3-Propanetriol	NA	NA	NA	NA	NA
93	26.66	69	Sugar alcohols	Sugar alcohols (3TMS)	Sugar alcohols, 1,2,3-Propanetriol	NA	NA	NA	NA	NA
94	26.85	221	Sugar alcohols	Sugar alcohols (3TMS)	Sugar alcohols, 1,2,3-Propanetriol	NA	NA	NA	NA	NA
95	26.93	117	Sugar alcohols	Sugar alcohols (3TMS)	Sugar alcohols, 1,2,3-Propanetriol	NA	NA	NA	NA	NA
96	27.11	73	RIBITOL IS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
97	27.27	271	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Πίνακας 4 (Συνέχεια)

1	RT(quant mat)	Metabolites (Raw)	Metabolites (Common name)	Metabolites (Derivatives)	Synonyms	KEGG ID	Metabolome	PubChem CID	Registry Number	Biosynthetic pathway(s)
129	31.56	232	RT31.56	RT31.56	NA	NA	NA	NA	NA	NA
130	31.74	131	RT31.74	RT31.74	NA	NA	NA	NA	NA	NA
131	31.91	57	Eicosane	NA	icosane, n-td	NA	NA	8222	112-95-8	NA
132	31.93	396	l-lyl 3,4-bis(trimethylsilyloxy) Caffeic acid	Caffeic acid 3TMS	-bis(trimethylsilyloxy)ic	C01197	A214001	689043	10586-03-5	pp01100Metabolic pathways map011
133	32.03	299	RT23.03	RT23.03	NA	NA	NA	NA	NA	NA
134	32.17	106	ic acid, 3-mercaptop, dodecyldecyl 3-mercaptopropion	NA	nate; Lauryl 3-merca	NA	NA	80796	6380-71-8	NA
135	32.27	227	RT32.27	RT32.27	NA	NA	NA	NA	NA	NA
136	32.37	293	RT32.37	RT32.37	NA	NA	NA	NA	NA	NA
137	32.38	204	oxy-2,3,4,5-tetrakis-O-(tri	L-Rhamnose	lannose, 6-deoxy-2,3	C00507	A173003	25310	19127-15-2	p metabolism map0120Microbial me
138	32.5	282	RT32.50	RT32.50	NA	NA	NA	NA	NA	NA
139	32.68	292	5,6-pentakis-O-(trimethylsi	D-Gluconic acid	-; Gluconic acid, (6T	C00267	A196001	10690	34290-52-3	lary metabolites map0120Microbial
140	32.73	131	RT32.73	RT32.73	NA	NA	NA	NA	NA	NA
141	32.86	313	mitic acid, trimethylsilyl es	Palmitic acid (TMS)	S, Palmitic acid, tms	C00249	A205001	985	57-10-3	wax biosynthesismap0140Biosynth
142	33.09	221	RT33.09	RT33.09	NA	NA	NA	NA	NA	NA
143	33.32	204	RT33.32	RT33.32	NA	NA	NA	NA	NA	NA
144	33.43	122	Oleantile	NA	decentilite (Z)- O	NA	NA	6420241	NA	NA
145	33.53	122	RT33.53	RT33.53	NA	NA	NA	NA	NA	NA
146	33.6	131	RT33.60	RT33.60	NA	NA	NA	NA	NA	NA
147	33.75	259	ido-3,6-dimethyl-2,3,5-tris (tr	ido-3,6-dimethyl-2,3,5-tris (tr	ido-3,6-dimethyl-2,3,5-tris (tr	NA	NA	NA	NA	NA
148	33.89	131	RT33.89	RT33.89	NA	NA	NA	NA	NA	NA
149	34.05	131	RT34.05	RT34.05	NA	NA	NA	NA	NA	NA
150	34.3	305	1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(tr	Myoinositol	Myo-inositol (6TMS)	C00137	A209002	892	87-89-8	metabolism map0120Microbial met
151	34.44	145	RT34.44	RT34.44	NA	NA	NA	NA	NA	NA
152	34.56	131	RT34.56	RT34.56	NA	NA	NA	NA	NA	NA
153	34.66	327	hecanoic acid, trimethylsilyl	Heptadecanoic acid (TMS)	e, TMS, Heptadecan	NA	A214005	10465	55617-58-3	NA
154	34.73	396	l-yl 3,4-bis(trimethylsilyloxy) Caffeic acid	Caffeic acid 3TMS	-bis(trimethylsilyloxy)ic	C01197	A214001	689043	10586-03-5	pp01100Metabolic pathways map011
155	34.88	327	RT34.88	RT34.88	NA	NA	NA	NA	NA	NA
156	35.24	203	RT35.24	RT35.24	NA	NA	NA	NA	NA	NA
157	35.34	319	RT35.34 (Carbohydrate)	RT35.34 (Carbohydrate)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
158	35.48	73	RT35.48	RT35.48	NA	NA	NA	NA	NA	NA
159	35.56	57	Docosane	Docosane	cosane, Normal-doc	NA	NA	12405	629-97-0	NA

Πίνακας 4 (Συνέχεια)

1	RT(quant mass)	Metabolites (Raw)	Metabolites (Common name)	Metabolites (Derivatives)	Synonym(s)	KEGG ID	Metabolite	PubChem CID	Registry Number	Biosynthetic pathway(s)
192	41.96	342	RT41.96	RT41.96	NA	NA	NA	NA	NA	NA
193	42.19	328	RT42.19	RT42.19	NA	NA	NA	NA	NA	NA
194	42.25	227	RT42.25	RT42.25	NA	NA	NA	NA	NA	NA
195	42.32	371	cid_2,3-bis(trimethylsilyl) Monopalmitin	1-Monopalmitin (TMS)	1-α-Glycerol palmitate	C00249	NA	985	57-10-3	and wax biosynthesis map01040Bic
196	42.49	131	RT41.49	RT41.49	NA	NA	NA	NA	NA	NA
197	42.62	366	RT42.62	RT42.62	NA	NA	NA	NA	NA	NA
198	42.64	204	RT42.64 (Carbohydrate)	RT42.64 (Carbohydrate)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
199	42.91	131	RT42.91	RT42.91	NA	NA	NA	NA	NA	NA
200	43.02	204	RT43.02 (Carbohydrate)	RT43.02 (Carbohydrate)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
201	43.08	57	RT43.08	RT43.08	NA	NA	NA	NA	NA	NA
202	43.7	73	RT43.70	RT43.70	NA	NA	NA	NA	NA	NA
203	44.00	361	alose, alpha, alpha-, D-, (8T)	Trehalose	α-D-glucopyranose, alpha-D-glucopyranose	C01083	A274002	7427	99-20-7	110Biosynthesis of secondary meta
204	44.61	412	RT44.61	RT44.61	NA	NA	NA	NA	NA	NA
205	44.88	316	ionosteinin trimethylsilyl ether, Octadecanoic acid, 2-[[trimethylsilyloxy]-1-[[trimethylsilyloxy]methyl]monosteinin, methyl ester	Stearic acid (TMS)	Stearic acid (TMS)	NA	NA	NA	53336-13-3	NA
206	45.44	399	cid_2,3-bis(trimethylsilyl) Stearic acid	Stearic acid (TMS)	Stearic acid (TMS)	C01530	NA	5281	57-11-4	thsis of unsaturated fatty acids ma
207	45.65	361	trimethylsilyl-β-D-fructofu	Sucrose	Sucrose, octakis-O-	C00089	A264001	5988	19159-25-2	02010ABC transporters map02060P
208	45.7	410	RT45.70	RT45.70	NA	NA	NA	NA	NA	NA
209	45.77	69	Squalene	Squalene	10,15,19,23-Hexamethyl	C00751	A283001	638072	111-02-4	map01066Biosynthesis of alkaloids de
210	46.7	73	RT46.70	RT46.70	NA	NA	NA	NA	NA	NA
211	48.81	193	RT48.81	RT48.81	NA	NA	NA	NA	NA	NA

