



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών
Επιστημών και
Διαχείρισης
Περιβάλλοντος

Πτυχιακή εργασία

**Μελέτη οξείας τοξικότητας σε καρκινοειδή οργανισμούς,
χρόνιας τοξικότητας σε φυτά και οιστρογονικότητας της
λουπανίνης**

Ειρήνη Ζαχαρία

Λεμεσός, Δεκέμβριος 2017

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή εργασία

ΜΕΛΕΤΗ ΘΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ
ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ, ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΦΥΤΑ ΚΑΙ
ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΛΟΥΠΙΑΝΙΝΗΣ

της

Ειρήνης Ζαχαρία

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Δρ. Μάρλεν Βάσκες

Λεμεσός, Δεκέμβριος 2017

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Ειρήνη Ζαχαρία, 2017

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ. Μάρλεν Βάσκες για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε, τις πολύτιμες συμβουλές, καθώς και την επίβλεψη και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μελέτης όπως και την Δρ. Κατερίνα Δράκου για την πολύτιμη βοήθεια της σε κάποια από τα πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Στέλλα Παρμάκη για την συνεργασία που είχαμε για τη δημιουργία της δημοσίευσης μέρους των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη και τη συμπαράσταση σε όλη την ακαδημαϊκή μου πορεία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία έγινε εξέταση της τοξικότητας και οιστρογονικότητας της λουπανίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων στους οργανισμούς *Vibrio fischeri* και *Daphnia magna* και στα φυτά *Sinapis alba* και *Sorghum saccharatum* ενώ η οιστρογονικότητα μελετήθηκε στη γενετικά τροποποιημένη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Τα είδη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αντιπροσωπεύουν ένα συγκεκριμένο περιβάλλον (π.χ. έδαφος, γλυκά νερά κ.α.) προς μελέτη της τοξικολογικής δράσης της λουπανίνης. Κύριο μέλημα αποτέλεσε ο προσδιορισμός της αποφυγής της αρνητικής δράσης της λουπανίνης όταν ελευθερωθεί στο περιβάλλον. Λόγω έλλειψης ερευνών της δράσης της λουπανίνης στο νερό και το έδαφος η παρούσα εργασία κρίνεται μεγάλης σημασίας. Η λουπανίνη η οποία χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη προήλθε από το *Lupinus albus*.

Αρχικά έγιναν τα πειράματα μελέτης της οξείας τοξικότητας της λουπανίνης στο βακτήριο *Vibrio fischeri* τα οποία βασίζονταν στην μείωση της βιοφωταύγειας του βακτηρίου στη παρουσία τοξικής ουσίας. Η μέτρηση της βιοφωταύγειας πραγματοποιείται με τη χρήση του λουμινόμετρου μετά από 5 και 15 λεπτά έκθεσης στη τοξική ουσία η οποία βρισκόταν σε συγκεντρώσεις 2000 mg/L - 0.23 mg/L. Από τις μετρήσεις που λαμβάνονται υπολογίζεται το EC₅₀ για κάθε χρόνο. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις της οξείας τοξικότητας του βακτηρίου ήταν 89 mg/L μετά από 5 λεπτά ενώ μετά από 15 λεπτά ήταν 47 mg/L.

Στο δεύτερο πείραμα μελετήθηκε η οξεία τοξικότητα στο καρκινοειδές *Daphnia magna*. Μέσω του πειράματος μετρήθηκε η ακινητοποίηση του καρκινοειδούς σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας (50 mg/L - 3.125 mg/L) μετά από 24 και 48 ώρες έκθεσης του. Με βάση την ακινητοποίηση υπολογίζεται το EC₅₀ για κάθε ώρα μέτρησης ξεχωριστά με τα αποτελέσματα να είναι 60 mg/L και 12 mg/L μετά από 24 και 48 ώρες έκθεσης, αντίστοιχα στη λουπανίνη.

Στο επόμενο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη φυτών, το μονοκοτυλήδονο *Sorghum saccharatum* και το δικοτυλήδονο *Sinapis alba*. Από αυτά τα είδη μελετήθηκε η αναστολή της βλάστησης αλλά και η ανάπτυξη των ριζιδίων με σπέρματα του κάθε φυτού ξεχωριστά. Οι μετρήσεις λήφθηκαν μετά από 96 ώρες έκθεσης των σπερμάτων στη τοξική ουσία με τις συγκεντρώσεις στις οποίες εκτέθηκαν να είναι 100 mg/L - 6.25 mg/L.

Τα αποτελέσματα αφορούσαν τη μελέτη της χρόνιας τοξικότητας της λουπανίνης και μέσω αυτών υπολογίστηκε το ποσοστό αναστολής για την ανάπτυξη των ριζιδίων αλλά και το ποσοστό αναστολής φύτευσης του σπέρματος. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως η λουπανίνη είχε θετική επίδραση στην ανάπτυξη του δικοτυλήδονου φυτού *S. alba* ενώ στο μονοκοτυλήδονο φυτό *S. saccharatum* επηρέασε τόσο τη βλάστηση όσο και την ανάπτυξη του. Το ποσοστό αναστολής της βλάστησης του κυμαίνεται μεταξύ 80% ενώ το ποσοστό αναστολής στην ανάπτυξη του ριζιδίου ήταν 97-99.7 % στις συγκεντρώσεις 100 mg/L – 12.5 mg/L.

Στο τελευταίο πείραμα που πραγματοποιήθηκε μελετήθηκε η επίδραση της λουπανίνης στην οιστρογονικότητα. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η γενετικά τροποποιημένη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Δυστυχώς δεν παρατηρήθηκε οιστρογονικότητα η οποία συσχετίστηκε με πιθανή μόλυνση της ζύμης που χρησιμοποιήθηκε, κάτι το οποίο βρέθηκε μέσω της μελέτης των δειγμάτων ζύμης με PCR.

Με βάση τα αποτελέσματα τα οποία λήφθηκαν παρατηρήθηκε η τοξική δράση της λουπανίνης στα είδη τα οποία μελετήθηκαν, εκτός από το *S. alba*, με αποτέλεσμα όταν εκτεθεί στο περιβάλλον να έχει αρνητικές συνέπειες αφού αυτά τα είδη αποτελούν μέρος της τροφικής αλυσίδας.

Παρόλα αυτά προτείνεται η περαιτέρω μελέτη σε οργανισμούς του περιβάλλοντος τόσο για τη λουπανίνη όσο και για τη σπραρτεΐνη, εφόσον η σπραρτεΐνη μέσα από αποτελέσματα μελετών θεωρείται πιο τοξική από τη λουπανίνη. Επίσης, προτείνεται και η περαιτέρω μελέτη της δράσης της λουπανίνης στην οιστρογονικότητα αφού μέσω της παρούσας μελέτης δεν βρέθηκε κάποιο αποτέλεσμα.

Λέξεις κλειδιά: λουπανίνη, *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Sinapis alba*, *Sorghum saccharatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, οιστρογονικότητα

ABSTRACT

This research aims to determine the toxicity of several concentrations of lupanine on *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and the plants *Sinapis alba* and *Sorghum saccharatum*. The estrogenicity of the compound was also studied in the genetically modified yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *V. fischeri*, *D. magna*, *S. alba* and *S. saccharatum* represent a specific environment (eg soil, fresh water, etc.) and we used them to study the toxicological effect of lupanine, when released into the environment. Due to the lack of similar experiments focusing on the toxic effects of the compounds in water bodies and the soil, the information provided in the current study can be significant. The lupanine which used in the study was proceed from *Lupinus albus*.

The experiment on *Vibrio fischeri* was based on the reduction of the bacterial bioluminescence in the presence of the toxic substance. The exposure period was 5 and 15 minutes before measuring the bioluminescence by using the luminometer. Afterwards the EC₅₀ was calculated for each exposure period. The results from the acute toxicity measurements of the bacterium were 89 mg/L after 5 minutes and after 15 minutes 47 mg/L.

Acute toxicity on *Daphnia magna* was also studied. The exposure period was 24 and 48 hours, for each the EC₅₀ was calculated by estimating the immobilization of the organism with the results being 60 mg/L and 12 mg/L after 24 and 48 hours of exposure, respectively.

The plants *Sorghum saccharatum* (monocotyledon) and *Sinapis alba* (dicotyledonous) were also used as biomarkers regarding their growth inhibition, that was monitored based on the length of roots, as well as the germination index given as the number of germinated seeds, as the endpoints. The measurements were taken after 96 hours of exposure and the concentrations of exposure were 100 mg/L - 6.25 mg/L. Subsequently, growth inhibition was correlated to lupanine concentration and the corresponding EC₅₀ values were calculated. The results showed that lupanine had a positive effect on the growth of the dicotyledonous *S.alba*. Lupanine severely impacted the root growth of *S. saccharatum* demonstrating inhibition that ranged between 97 and 99.7% for the four highest alkaloid concentrations employed (100, 50, 25 and 12.5 mg/L). The alkaloid also inhibited the germination of *S. saccharatum* (40-80%) in the four highest concentrations tested.

In the last experiment, was studied the effect of lupanine on estrogenicity with *S. cerevisiae*. Unfortunately, no estrogenicity was observed which was associated with possible infection of the used yeast, which was found by the study of yeast samples by PCR.

Based on the results, lupanine was observed except for *S. alba*, with the result that when exposed to the environment it has negative consequences. However, it is proposed to further study environmental organisms for lupanine and sparteine, since sparteine is considered to be more toxic than lupanine through study results. It is also proposed to further study the effect of lupanine on estrogenicity since no results have been found through this study.

Keywords: lupanine, *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Sinapis alba*, *Sorghum saccharatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, estrogenicity