



ΤΜΗΜΑ
**ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

<<Μελέτη ενζυμικής δράσης κυτοχρώματος p450 του Cladosporium Herbarum
ως προς τον μεταβολισμό του μυκητοκτόνου imazalil >>

<< Study of the enzymatic action of cytochrome p450 of Cladosporium
Herbarum on the metabolism of the fungicide imazalil >>

ΝΕΣΤΩΡ ΣΙΜΟΣ ΑΔΕΛΦΟΠΟΥΛΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2024-2025

Υπεύθυνος καθηγητής: Καρπούζας Δημήτριος

Τριμελής επιτροπή:

Καρπούζας Δημήτριος : Καθηγητής περιβαλλοντικής μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας.

Βασιλειάδης Σωτήριος: Επίκουρος καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Παναγιώτης Καράς: Ακαδημαϊκός Υπότροφος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Καρπούζα Δημήτριο που μου παρείχε την πολύτιμη ευκαιρία να διεκπεραιώσω αυτή τη μελέτη .

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Παναγιώτη Καρά για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας καθώς βρισκόμουν υπό την επίβλεψή του.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την συνεργασία και βοήθειά τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, για όλη την ηθική και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν κατά την διάρκεια της φοίτησής μου στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Σίμος- Αδελφόπουλος Νέστωρ του Σίμου Μιχαήλ

Περιεχόμενα

• Περίληψη-Abstract	4-5
• Κεφάλαιο 1 ^ο Εισαγωγή	5-15
• 1.1 Το έναυσμα της μελέτης	5-6
• 1.2. Μύκητας Cladosporium Herbarum	6-8
• 1.2.1 Γενικές πληροφορίες	6-7
• 1.2.2 Οικολογία και περιβάλλον ανάπτυξης	7
• 1.2.3 Συνθήκες ανάπτυξης γένους Cladosporium	7
• 1.2.4 Γενικό ενζυμικό προφίλ γένους Cladosporium	8
• 1.3. Το μυκητοκτόνο imazalil	8-11
• 1.3.1. Γενική περιγραφή	8-9
• 1.3.2 Χημική σύσταση και δομή imazalil	9
• 1.3.3 Δράση imazalil	9
• 1.3.4 Η Περιβαλλοντική τύχη του imazalil	10
• 1.3.5. Τοξικότητα του imazalil σε ζωντανούς οργανισμούς μη στόχους	10-11
• 1.4 Piperonyl Butoxide	11-13
• 1.4.1 Χημική δομή του PB	12
• 1.4.2 Δράση PB	12
• 1.4.3 Τοξική επίδραση του PB	12-13
• 1.5 1-aminobenzotriazole (1-ABT)	13-14
• 1.5.1 Χημική σύνθεση και μοριακή δομή	14
• 1.5.2 Δράση του 1-ABT	14
• 1.5.3 Τοξική επίδραση του ABT σε οργανισμούς μη στόχους	14
• 1.6. Σκοπός της μελέτης	14-15
• Κεφάλαιο 2 ^ο Υλικά και μέθοδοι	15-22
• 2.1 Προκαταρκτικό πείραμα διάσπασης του μυκητοκτόνου imazalil	15-16
• 2.2 Προετοιμασία του θρεπτικού υλικού MSMN	16-18
• 2.3. Προετοιμασία θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Broth (PDB)	18
• 2.4 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το IMZ	18-19
• 2.5. Ανάλυση του γεωργικού φαρμάκου IMZ σε σύστημα HPLC	19
• 2.6. Μέθοδος εκχύλισης του IMZ από υγρά διαλύματα και θρεπτικές καλλιέργειες	19
• 2.7 Αρχική καλλιέργεια εκκίνησης του μύκητα	19

• 2.8 Υπολογισμός κονιδίων μυκητιακών αποικιών	20
• 2.9 Προετοιμασία προκαταρκτικού πειράματος	20
• 2.10 Προετοιμασία κύριου πειράματος	20-22
• 3. Κεφάλαιο 3 ^ο Αποτελέσματα	22-26
• 3.1. Αποτελέσματα προκαταρκτικού πειράματος	22-23
• 3.2 Επίδραση του αναστολέα 1-ABT στη διάσπαση του IMZ	23-24
• 3.3 Επίδραση του αναστολέα PB στη διάσπαση του IMZ	25-26
• 4. Κεφάλαιο 4 ^ο Συμπεράσματα και συζήτηση	26-27
• 5. Κεφάλαιο 5 ^ο Βιβλιογραφία	27-31

Περίληψη:

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να εξακριβωθεί εάν η αποδόμηση του μυκητοκτόνου imazalil από τον μύκητα *Cladosporium herbarum* οφείλεται εξ ολοκλήρου στα ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης επιλέχθηκαν δύο γενικοί μη ειδικευμένοι αναστολείς της ενζυμικής οικογένειας κυτοχρώματος P450 για να διερευνηθεί ο ρόλος τους στη διάσπαση του μυκητοκτόνου IMZ. Ο πρώτος αναστολέας ήταν το piperonyl butoxide (PB) και ο δεύτερος το 1-aminobenzotriazole (1-ABT). Ο πειραματικός σχεδιασμός του πειράματος αποτελούνταν από συνολικά 11 μεταχειρίσεις με τρεις επαναλήψεις η καθεμία. Οι μεταχειρίσεις που χρησιμοποιήθηκαν περιελάμβαναν τον αβιοτικό μάρτυρα που περιείχε θρεπτικό MSMN και το imazalil, το βιολογικό μάρτυρα με την μόνη διάφορα από τον αβιοτικό να είναι η παρουσία του μύκητα *C. herbarum*, τους αβιοτικούς μάρτυρες με προσθήκη των αναστολέων PB και 1-ABT συγκέντρωσης 1mM, τον αβιοτικό μάρτυρα με προσθήκη μεθανόλης και τρεις μεταχειρίσεις με τον μύκητα παρουσία των αναστολέων PB και 1-ABT με συγκεντρώσεις 0,01, 0,1, 1 mM αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία 1-ABT οδήγησε σε πλήρη αναστολή της αποδομητικής ικανότητας του *C. herbarum* ενισχύοντας την υπόθεση πως ένζυμα CYP450 είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση του imazalil. Αντιθέτως, παρουσία PB δεν παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή στην αποδόμηση του imazalil υποδεικνύοντας πως ο εν λόγω αναστολέας δεν επηρεάζει τα γονίδια CYP450 του *C. herbarum*.

Abstract :

In this study, experiments were conducted to determine whether the degradation of the fungicide imazalil by the fungus *Cladosporium herbarum* is driven by cytochrome P450 enzymes. To confirm this hypothesis, two general non-specific inhibitors of the cytochrome P450 enzyme family were selected to investigate their role in the breakdown of the fungicide imazalil. The first inhibitor was piperonyl butoxide (PB) and the second was 1-aminobenzotriazole (1-ABT). The experimental design consisted of a total of 11 treatments, each with three repetitions. The tests included: an abiotic control containing only imazalil (without the fungus), a biotic control with the only difference from the abiotic being the presence of the fungus *C. herbarum*, abiotic controls with the addition of PB and 1-ABT inhibitors at a concentration of 1mM, an abiotic control with the addition of methanol, and three treatments with the fungus in the presence of PB and 1-ABT inhibitors at three concentrations: 0.01, 0.1, and 1 mM. Based on the results, the degradation of imazalil by *C. herbarum* was inhibited only in the presence of 1-ABT reinforcing the hypothesis that CYP450 enzymes are responsible for the degradation of imazalil. In contrast, the presence of PB did not impose any impairment in the degradation of imazalil by the fungal strain indicating that this inhibitor is not as efficient as 1-ABT in the inhibition of the CYP450 genes of *C. herbarum*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το έναυσμα της μελέτης.

Η απορρύπανση του εδάφους από γεωργικά φάρμακα και χημικούς ρύπους αποτελεί ένα σημαντικό θέμα που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα. Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη γεωργία και στη βιομηχανία μπορούν να εισχωρήσουν στο έδαφος, να διαλυθούν στα ύδατα ή στον αέρα και να προκαλέσουν σημαντική ρύπανση, η οποία μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η χρήση των συμβατικών μεθόδων αποκατάστασης εδαφών επιβαρυνμένων με γεωργικά φάρμακα είναι δαπανηρή, η επιστημονική κοινότητα άρχισε να πειραματίζεται στην εύρεση πιο φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων βιοαπορρύπανσης. Κάποιες από τις μεθόδους αυτές για παράδειγμα είναι η φωτοαποδόμηση που αποτελεί τη διάσπαση γεωργικών φαρμάκων μέσω της UV

ακτινοβολίας του φωτός που συνήθως προέρχεται από τον ήλιο. Επιπλέον μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούν τα φυτά για να επιτύχουν είτε την απορρόφηση είτε τη διάσπαση των ξενοβιοτικών ενώσεων οργανικών ή ανόργανων -όπως τα βαρέα μέταλλα- για την αποκατάσταση του εδάφους είναι η φυτοαπορρόφηση και η φυτοαποδόμηση. Η βιοαπορρόφηση και βιοαποδόμηση έχουν παρόμοια δράση με την φυτοαπορρόφηση και φυτοαποδόμηση αντίστοιχα, με τη διάφορα πως χρησιμοποιούν μικροοργανισμούς όπως μύκητες και βακτήρια για την απομάκρυνση και διάσπαση των ξενοβιοτικών τοξικών ουσιών. Βάσει δεδομένων προηγούμενων μελετών, η βιοαποδομητική δράση των ενζύμων που κωδικοποιούνται από γονίδια του κυτοχρώματος εμφανίζει ικανοποιητικά αποτελέσματα στη διάσπαση γεωργικών φαρμάκων. Πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος και συγκεκριμένα των (Papazlatani et al. 2024) ύστερα και από ανάλυση του μεταγραφώματος του μύκητα *Cladosporium herbarum*, έδειξαν υψηλές εκφράσεις σε διάφορες οικογένειες ενζύμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό και καταβολισμό οργανικών ρύπων όπως η οικογένεια των ενζύμων CYP450. Για το λόγο αυτό η οικογένεια των ενζύμων αυτών επιλέχθηκε ως στόχος της μελέτης για την ανάλυση και το ρόλο της βιοαποδομητικής ικανότητας των CYP450 ενζύμων του μύκητα *Cladosporium herbarum* ως προς το μυκητοκτόνο imazalil (Papazlatani et al. 2022),(Papazlatani et al. 2024),(Mori et al. 2017),(Wang et al. 2019),(Ning et al. 2012),(Ruomeng et al. 2023),(Wu et al. 2024),(Lin et al. 2022),(Chu et al. 2023)

1.2. Ο μύκητας *Cladosporium herbarum*

1.2.1 Γενικές πληροφορίες

Το *Cladosporium* είναι γένος μυκήτων με παγκόσμιο εύρος ανάπτυξης , αποτελεί ένα από τα πιο κοινά γένη μυκήτων που εμφανίζονται στην φύση καθώς ευδοκιμούν τόσο σε εξωτερικούς όσο και σε εσωτερικούς χώρους. Στελέχη που ανήκουν στο είδος *Cladosporium herbarum* φέρονται να έχουν παθογόνο δράση στον άνθρωπο, αλλά η πλειοψηφία των μυκήτων του γένους *Cladosporium* είναι σαπροτρόφοι μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για τη διάσπαση οργανικής ύλης. Η ταξινομική κατάταξη του μύκητα φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση του μύκητα *Cladosporium herbarum*

Βασίλειο	Fungi
Συνομοταξία	Ascomycota
Κλάση	Dothideomycetes
Τάξη	Capnodiales
Οικογένεια	Davidiellaceae
Γένος	<i>Cladosporium</i>

Το γένος περιλαμβάνει πάνω από 40 επίσημα ονομαζόμενα είδη, 180 ανώνυμα στελέχη καταχωρημένα στη διεθνή τράπεζα δεδομένων Universal Protein Resource. (Schubert et al.2007), (Bensch et al. 2012), (Seifert et al. 2007), (Zhang et al. 2023).

1.2.2 Οικολογία και περιβάλλον ανάπτυξης

Οι βέλτιστες ζώνες ανάπτυξης μυκήτων του γένους *Cladosporium* είναι οι τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Το γένος περιλαμβάνει κοινά σαπροτροφικά, φυτοπαθογόνα και ανθρώπινα παθογόνα είδη που αποτελούν κοινούς μολυσματικούς παράγοντες τροφίμων. Αναπτύσσονται στους περισσότερους τύπους εδαφών και νεκρής φυτικής ύλης, ενώ μερικά είδη είναι γνωστό ότι αναπτύσσονται και σε υγρά υλικά κατασκευής. Εμφανίζουν επίσης ικανότητα παραγωγής λιγνολυτικών ενζύμων επιτρέποντας τη διάσπαση ανθεκτικών φυτικών δομών οι οποίες αποτελούν μια από τις κύριες πηγές τροφής τους (Schubert et al. 2007), (Bensch et al. 2012), (Seifert et al. 2007), (Zhang et al. 2023)

1.2.3 Συνθήκες ανάπτυξης μυκήτων του γένους *Cladosporium*

Οι μύκητες αυτού του γένους έχουν βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας ανάπτυξης 18-28 °C με ορισμένα είδη να εμφανίζουν ανάπτυξη κάτω από 0°C. Τα περισσότερα είδη *Cladosporium* μπορούν να αναπτυχθούν στους 30-35 °C, αλλά δεν αναπτύσσονται πάνω από 35-37 °C. Οι απαιτήσεις διαθέσιμου νερού/υγρασίας αέρα (Aw) κυμαίνονται μεταξύ 0.85 και 0.88. (Schubert et al. 2007), (Bensch et al. 2012), (Seifert et al. 2007), (Zhang et al. 2023)

1.2.4 Γενικό ενζυμικό προφίλ μυκήτων του γένους *Cladosporium*

Το γένος *Cladosporium* τρέφεται κυρίως με την αποδόμηση φυτικής ύλης γι' αυτό και διαθέτει διάφορες οικογένειες ενζύμων που επιτελούν αυτή τη διαδικασία. Οι πιο σημαντικές είναι οι πεκτινομεθυλεστεράσες (PME) και οι πολυγαλακτουρονάσες (PG) που διασπούν πηκτίνη, ένα συστατικό των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Άλλα ένζυμα είναι οι λακτάσες πολυ-κοβάλτιο οξειδάσες που διασπούν τη λιγνίνη και άλλα πολύπλοκα οργανικά μόρια, παίζοντας ρόλο στη διάλυση του φυτικού υλικού και οι μαννανάσες: που διασπούν πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών. Επίσης, στο ενζυμικό τους προφίλ υπάρχουν οι κυτταρινάσες που επάγουν τη διάσπαση της κυτταρίνης και των ημικυτταρινών των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Τέλος διαθέτουν τα κυτοχρωμικά ένζυμα p450 τα οποία είναι οξειδωτικά ένζυμα υπεύθυνα για τον μεταβολισμό ή καταβολισμό ξενοβιοτικών αλλά ενδογενών οργανικών ενώσεων έχοντας σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση αυτών και στην προστασία του οργανισμού από τοξικούς παράγοντες. Εκτός από τις CYP450, οι άλλες ενζυμικές οικογένειες έχουν έναν δευτερεύοντα ρόλο στην διάσπαση γεωργικών φαρμάκων και γενικά ξενοβιοτικών ενώσεων που θα μπορούσαν να εμφανίσουν τοξικότητα στον μύκητα (Schubert et al. 2007), (Bensch et al. 2012), (Seifert et al. 2007), (Zhang et al. 2023)

1.3. Το μυκητοκτόνο imazalil

1.3.1. Γενική περιγραφή

Βάσει της (EFSA, 2018) το Imazalil ((RS)-1-(β-allyloxy-2,4-dichlorophenethyl)-imidazole, IMZ) είναι ένα διασυστημικό μυκητοκτόνο της οικογένειας ιμιδαζόλεων. Τα μυκητοκτόνα ιμιδαζόλης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

α) Μυκητοκτόνα επαφής: Αυτά τα μυκητοκτόνα δεν εισχωρούν στο εσωτερικό του φυτού αλλά παραμένουν στην επιφάνεια στην οποία εφαρμόστηκαν. Έχουν κυρίως προληπτική δράση καθώς δεν βοηθούν σε περιπτώσεις που οι μικροοργανισμοί έχουν ήδη μολύνει τον φυτικό ιστό.

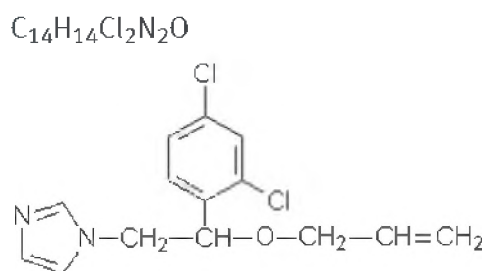
β) Διασυστημικά μυκητοκτόνα: Αυτά τα μυκητοκτόνα εισχωρούν στους φυτικούς ιστούς και βοηθούν στην καταπολέμηση μικροοργανισμών που έχουν εισβάλει στο φυτό μετά από

μόλυνση. Δρουν και ως μέσα πρόληψης αλλά και ως μέσα καταπολέμησης ήδη υπάρχουσας μόλυνσης.

Το imazalil ανήκει στην κατηγορία των διασυστημικών μυκητοκτόνων με κύρια χρήση την μετασυλλεκτική επεξεργασία φρούτων, κυρίως εσπεριδοειδών. Άλλες καταχωρημένες περιπτώσεις χρήσης του imazalil αποτελούν η προστασία τοματών που καλλιεργούνται σε τεχνητά υποστρώματα και η επεξεργασία σπόρων στα δημητριακά (EFSA, 2018). Τέλος χρησιμοποιείται στην κτηνιατρική ως τοπικό αντιμυκητιακό (Brancato et al. EFSA 2018), (Khan et al.2001), (Siegel et al.1978).

1.3.2 Χημική σύσταση και δομή imazalil

Η χημική του σύνθεση είναι $C_{14}H_{14}Cl_2N_2O_2$ και το μοριακό του βάρος 297,18 gr/mol (εικόνα 1).



Molar mass: 297,17 g/mol

Εικόνα 1. Η χημική δομή του μυκητοκτόνου imazalil

1.3.3 Δράση imazalil

Το imazalil δρα στην μονοπάτι βιοσύνθεσης των στερόλων. Ειδικότερα το imazalil στοχεύει το ένζυμο λανοστερόλη 14α-απομεθυλάση (ένα ένζυμο κυτοχρώματος P450), το οποίο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης. Η εργοστερόλη είναι ένα ζωτικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων, παρόμοιο με τη χοληστερόλη στα ζωικά κύτταρα. Με την αναστολή της σύνθεσης εργοστερόλης, το ιμαζαλίλ διαταράσσει την ακεραιότητα και τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων. Αυτό οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης, διαρροή κυτταρικών περιεχομένων και τελικά, κυτταρικό θάνατο. (Khan et al.2001),(Siegel et al1978),(Brancato et al. EFSA 2018)

1.3.4 Η Περιβαλλοντική τύχη του imazalil

Το IMZ είναι ένα έμμοιο γεωργικό φάρμακο στο έδαφος αλλά και σε συστήματα νερού/ιζήματος με τιμές χρόνου ημιζωής D_{T50} 41-135 ημερών και 161-165 ημερών αντίστοιχα (EFSA. 2018). Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να παραμείνει ενεργό στο περιβάλλον για αρκετούς μήνες. Η διάρκεια ζωής του στο έδαφος επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και η παρουσία οργανικής ύλης.

Προσρόφηση στα Σωματίδια του Εδάφους: Το imazalil δεσμεύεται ισχυρά στην οργανική ύλη του εδάφους ($K_{Foc} = 4753-7942.9 \text{ mL g}^{-1}$) (EFSA. 2018),(Karas et al. 2015), κάτι που το καθιστά δυσκίνητο στο έδαφος με χαμηλό κίνδυνο για ρύπανση των υπογείων υδάτων. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα το imazalil αναμένεται να μη μετακινείται ιδιαίτερα στο έδαφος και να παραμένει κυρίως στα ανώτερα εδαφικά στρώματα.

Αποδόμηση: Η αποδόμηση του imazalil στο έδαφος γίνεται μέσω βιολογικών και χημικών διεργασιών. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του. Ένας από αυτούς τους μικροοργανισμούς είναι και ο *Cladosporium herbarum*. (Papazlatani et al. 2022),(Brancato et al. EFSA, 2011, EFSA 2018),(Karas et al 2015),(Karas et al 2016),(Omirou et al., 2012). (Khan et al., 2001), (Siegel et al .1978)

1.3.5. Τοξικότητα του imazalil σε ζωντανούς οργανισμούς μη στόχους

Φυτοτοξικότητα: Το imazalil μπορεί να προκαλέσει φυτοτοξικές επιπτώσεις σε φυτά όπως αναστολή ανάπτυξης, διαταραχή φυσιολογικών διεργασιών όπως φωτοσύνθεση, διαπνοή, μεταφορά θρεπτικών, οξειδωτικό στρες.

Ζώοτοξικότητα

Πτηνά και Ιχθείς: Το imazalil έχει βρεθεί ότι έχει μέτρια οξεία και χρόνια τοξικότητα για τα πτηνά και τους ιχθύες. Αυτό περιλαμβάνει πιθανές επιπτώσεις στην αναπαραγωγή και τα ποσοστά επιβίωσης τους.

Υδρόβια Ασπόνδυλα: Επίσης, ενέχει κινδύνους για τα υδρόβια ασπόνδυλα όπως η Δάφνια, επηρεάζοντας την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή τους.

Επιπτώσεις στον Άνθρωπο

Οξεία Τοξικότητα: Το imazalil μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό του δέρματος και των ματιών κατά την άμεση επαφή. Η εισπνοή ή η κατάποση μπορεί να οδηγήσει σε πιο σοβαρά συμπτώματα όπως ναυτία, ζάλη και αναπνευστική δυσφορία.

Χρόνια Τοξικότητα: Η μακροχρόνια έκθεση στο imazalil έχει συσχετιστεί με βλάβες στο ήπαρ και τους νεφρούς. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις που υποδεικνύουν πιθανές ενδοκρινικές διαταραχές.

Καρκινογένεση: Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι το imazalil μπορεί να έχει καρκινογόνο και μεταλλαξιογόνο δράση.

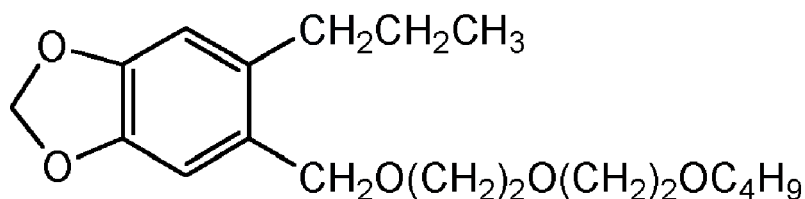
Γαιοσκώληκες: Το imazalil μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες και κυτταροτοξικότητα στους γαιοσκώληκες, επηρεάζοντας την αναπαραγωγή τους και τη συνολική τους υγεία. Αυτό υποδεικνύει πιθανές μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην υγεία του εδάφους και τη βιοποικιλότητα. (EPA, 1999),(Jin et al.2019),(Jin et al., 2024). (Flores et al 2014),(Jin et al. 2016), (Brancato et al. EFSA 2018),(Karas et al. 2015, 2016),(Omirou et al., 2012). (Khan et al., 2001),(Siegel et al .1978)

1.4 Piperonyl Butoxide

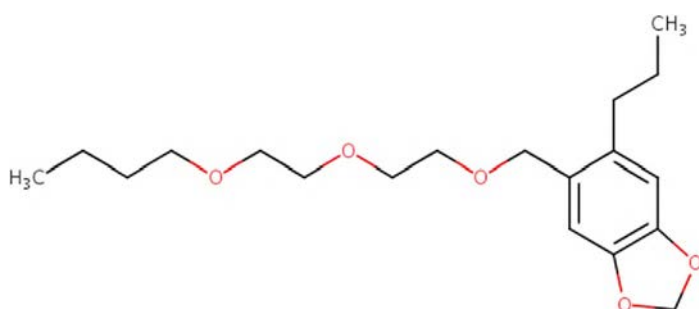
Το piperonyl butoxide (PB) είναι ένα ημισυνθετικό χημικό που βρίσκεται σε εκατοντάδες τύπους γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σε γεωργικές, εμπορικές και οικιακές εφαρμογές. Το PB δρα ως συνεργατικό των γεωργικών φαρμάκων, αναστέλλοντας τα ένζυμα CYP450 των εντόμων και των μικροοργανισμών. Συχνά απαντάται ως συν-παράγοντας σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις στα συστατικά εμπορικών σκευασμάτων εντομοκτόνων, οδηγώντας σε πιθανή συσσώρευση του σε γεωργικά προϊόντα και εδάφη, μετά από εκτεταμένη χρήση εντομοκτόνων φαρμάκων. Ο κίνδυνος για συσσώρευση του PB σε υδάτινα περιβάλλοντα είναι χαμηλός, καθώς το PB εμφανίζει μικρή διαλυτότητα στο νερό. (Gonzalez et al. 2021),(Bae et al. 2021),(Jenkins et al. 2023),(Hazarika et al. 2024)

1.4.1 Χημική δομή του PB

Η χημική σύνθεση του PB είναι $C_{19}H_{30}O_5$ και το μοριακό βάρος του 338,44 g/mol



Εικόνα 2. Η χημική δομή του piperonyl butoxide



1.4.2 Δράση

Η δράση του PB είναι η αναστρέψιμη συναγωνιστική αναστολή, δηλαδή συναγωνίζεται το υπόστρωμα-γεωργικό φάρμακο για πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο των CYP450 ενζύμων, τα οποία είναι απαραίτητα για τις διαδικασίες αποτοξίνωσης. Αναστέλλοντας αυτά τα ένζυμα, το PB εμποδίζει τη διάσπαση των εντομοκτόνων, επιτρέποντάς τους να παραμένουν ενεργά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ακόμα και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Αυτή η αναστολή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική κατά του συστήματος της οξειδάσης μικτής λειτουργίας (MFO) στα έντομα, το οποίο είναι υπεύθυνο για την οξειδωτική αποδόμηση πολλών εντομοκτόνων. (Gonzalez et al.2021),(Bae et al. 2021),(Jenkins et al. 2023),(Hazarika et al. 2024)

1.4.3 Τοξική επίδραση του PB

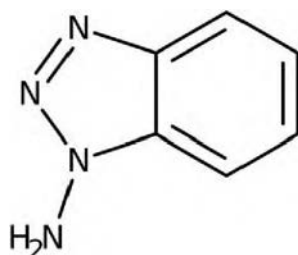
Με βάση τις μελέτες (Gonzalez et al.2021),(Bae et al.2021). το PB μπορεί να εμφανίσει πιθανές τοξικές δράσεις σε οργανισμούς μη στόχους. Στα φυτά το PB μπορεί να έχει φυτοτοξικές επιπτώσεις, ιδιαίτερα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Μπορεί να προκαλέσει βλάβες στους φυτικούς ιστούς, οδηγώντας σε συμπτώματα όπως η χλώρωση και η νέκρωση, ενώ στα ζώα, θεωρείται γενικά ότι έχει χαμηλή οξεία τοξικότητα. Ωστόσο, μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες σε υψηλότερες δόσεις ή σε παρατεταμένη έκθεση. Τα συμπτώματα τοξικότητας στα ζώα μπορεί να περιλαμβάνουν διόγκωση του ήπατος και επαγωγή ενζύμων. Στους ανθρώπους, το PB θεωρείται ότι έχει χαμηλή τοξικότητα όταν χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις προδιαγραφές . Ωστόσο, η έκθεση σε υψηλά επίπεδα μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα όπως ερεθισμό του δέρματος, αναπνευστικά προβλήματα και πιθανές επιδράσεις στο ήπαρ. Οι μελέτες μακροχρόνιας έκθεσης είναι περιορισμένες, αλλά υπάρχουν κάποιες ενδείξεις που υποδηλώνουν πιθανή αναπαραγωγική και αναπτυξιακή τοξικότητα. Στους μικροοργανισμούς το PB μπορεί να επηρεάσει τις μικροβιακές κοινότητες στο περιβάλλον. Μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη ορισμένων ευεργετικών μικροοργανισμών, διαταράσσοντας ενδεχομένως τα οικοσυστήματα του εδάφους και του υδροφόρου ορίζοντα. Επιπλέον ανακαλύφθηκε ότι το PB αναστέλλει την οδό σήματος Sonic hedgehog (Shh), μια βασική μοριακή οδό στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και στη μορφογένεση του εγκεφάλου και του προσώπου. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να προκαλέσει εμφανείς κρανιοπροσωπικές μορφολογικές ανωμαλίες ή λιγότερο διακριτές νευροαναπτυξιακές ανωμαλίες. (Gonzalez et al. 2021),(Bae et al. 2021),(Jenkins et al. 2023),(Hazarika et al. 2024)

1.5 1-aminobenzotriazole (1-ABT)

Το 1-Αμινοβενζοτριαζόλιο (ABT) χρησιμοποιείται ευρέως ως μη-ειδικός αναστολέας του κυτοχρωμικού P450 (CYP) σε ζώα, φυτά, έντομα και μικροοργανισμούς. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε έρευνες για την ανίχνευση και αξιολόγηση της ικανότητας των CYP450 ενζύμων ως προς τη διάσπαση και τον καταβολισμό ξενοβιοτικών και ενδογενών οργανικών ενώσεων και γενικά για την μέτρηση της ικανότητας αποτοξικοποίησης των οργανισμών στόχων (Montellano et al. 2018) , (Emoto et al. 2003), (Colby et al. 1995), (Xu et al. 1994)

1.5.1 Χημική σύνθεση και μοριακή δομή

Η χημική σύνθεση του 1-ABT είναι $C_6H_4N_4O_2$ και το μοριακό του βάρος είναι 134.14 g/mol



Εικόνα 3. Η χημική δομή του 1-Αμινοβενζοτριαζόλιου

1.5.2 Δράση του 1-ABT

Η δράση του 1-ABT είναι η μη αντιστρέψιμη αναστολή με πρόσδεση εκτός καταλυτικού κέντρου των CYP450 ενζύμων. Τα CYP450 οξειδώνουν το 1-ABT, παράγοντας έναν ενεργό μεταβολίτη ο οποίος προσδένεται στο ένζυμο αλλοιώνοντας μόνιμα τη δομή του. (Montellano et al. 2018) , (Emoto et al. 2003), (Colby et al. 1995), (Xu et al. 1994)

1.5.3 Τοξική επίδραση του ABT σε οργανισμούς μη στόχους

Ο αναστολέας του κυτοχρώματος P450 1-ABT δεν εμφανίζει ιδιαίτερη τοξική δράση ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις 100 mg/kg/day σε οργανισμούς μη στόχους. Επίσης δεν έχουν ανιχνευθεί άλλες πιθανές παρενέργειες σε οργανισμούς. (Montellano et al. 2018) , (Emoto et al. 2003), (Colby et al. 1995), (Xu et al. 1994)

1.6. Σκοπός της μελέτης

Η μελέτη αυτή έχει ως σκοπό να ανιχνεύσει και να εξακριβώσει εάν η διάσπαση του imazalil από τον μύκητα *C. herbarum* οφείλεται εξ ολοκλήρου στην οικογένεια των ενζύμων CYP450 ή αν παίζουν ρόλο στη διάσπαση και άλλες ενζυμικές ομάδες. Ο τρόπος με τον οποίο θα επιτευχθεί ο σκοπός της μελέτης αυτής είναι με τη χρήση γενικών αναστολέων της οικογένειας των κυτοχρωματικών P450 ενζύμων που δρουν ικανοποιητικά αλλά και ανεξάρτητα από την ισομορφή του ενζύμου, το είδος, το γένος, το βασίλειο του οργανισμού στον οποίο εκφράζεται το ένζυμο. Τα αρχικά βήματα ήταν να διαπιστωθεί εάν η παρουσία των αναστολέων σε καλλιέργειες του μύκητα *C. herbarum* επηρεάζουν τη

διάσπαση του μυκητοκτόνου imazalil από τον μύκητα. Εάν για παράδειγμα η διάσπαση του imazalil δεν επηρεάζεται από την παρουσία των αναστολέων τότε αυτό θα σημαίνει πως τα CYP450 δεν είναι η μόνη οικογένεια ενζύμων που έχει σημαντική δράση στη διάσπαση του imazalil, ενώ εάν η διάσπαση μειωθεί ή ανασταλεί τότε σημαίνει πως η μόνη ομάδα υπεύθυνη για την διάσπαση του imazalil είναι η οικογένεια των CYP450 ενζύμων. Οι δύο αναστολείς που επιλέχθηκαν ήταν το Piperonyl butoxide ένας αντιστρεπτός συναγωνιστικός αναστολέας και το 1-Aminobenzotriazole ένας μη αντιστρέψιμος-μόνιμος αναστολέας. Αυτοί οι δύο είναι διαδεδομένοι αναστολείς που συνήθως βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες σε σκευάσματα γεωργικών φαρμάκων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί συνέχεια μιας εκτεταμένης μελέτης του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, που αφορά την απομόνωση, τον χαρακτηρισμό και τέλος την εύρεση του μεταβολικού μονοπατιού της διάσπασης του μυκητοκτόνου imazalil από το στέλεχος του μύκητα *C. herbarum*. Στα πλαίσια των πειραμάτων αυτών έγινε μεταγραφωμική ανάλυση και βρέθηκε ότι ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που κωδικοποιούν CYP450 υπερεκφράζονται στο μύκητα όταν αυτός διασπάει το μυκητοκτόνο imazalil. Για τον παραπάνω λόγο επιλέξαμε τους αναστολείς του CYP450, piperonyl butoxide και 1-aminobenzotriazole για να γίνει επαλήθευση ότι τα γονίδια του CYP450 ευθύνονται για την διάσπαση του imazalil.

2.1 Προκαταρκτικό πείραμα διάσπασης του μυκητοκτόνου imazalil

Το προκαταρκτικό πείραμα είχε ως σκοπό την επιβεβαίωση της ικανότητας των δύο διαφορετικών στοκ γλυκερόλης μυκηλίου και κονιδίων του *Cladosporium herbarum*, στους – 80 °C, να διασπούν το imazalil, καθώς υπάρχει η πιθανότητα ο μικροοργανισμός να έχει χάσει την ικανότητα αυτή μετά από παρατεταμένη αποθήκευση και διατήρηση του σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για τον παραπάνω λόγο επιλέχθηκαν δυο στοκ γλυκερόλης και δοκιμάστηκαν για την ικανότητα τους στην διάσπαση του IMZ. Συγκεκριμένα έγινε

εμβολιασμός του κάθε στοκ σε κωνικές φιάλες των 100 ml με τρεις επαναλήψεις, οι οποίες περιείχαν αποστειρωμένο εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MSMN παρουσία IMZ συγκέντρωσης 50 mg/L. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τρεις ακόμη κωνικές φιάλες με MSMN + IMZ συγκέντρωσης 50 mg/L χωρίς να εμβολιαστούν με το μύκητα. Στη συνέχεια η διάσπαση του IMZ παρακολουθήθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας HPLC. Όλες οι λεπτομέρειες παρασκευής του θρεπτικού υποστρώματος και η ανάλυση του IMZ σε σύστημα HPLC αναφέρονται διεξοδικά παρακάτω.

2.2 Προετοιμασία του θρεπτικού υλικού MSMN

Η ανάπτυξη του μύκητα τόσο στο κύριο πείραμα της μελέτης όσο και στο προκαταρκτικό πείραμα έγινε στο εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MSMN που εμπλουτίστηκε με άζωτο και προστέθηκε έξτρα IMZ τελικής συγκέντρωσης 50 mg/L και γλυκόζη, βιταμίνης B12 και casamino acids τελικών συγκεντρώσεων 0.5% β.ο., 0.025 μg/ml και 0.15 g/L, αντίστοιχα.

Προετοιμασία διαλύματος γλυκόζης

Για την προετοιμασία του αρχικού διαλύματος γλυκόζης 10% β.ο. που θα χρησιμοποιούνταν στο τελικό θρεπτικό μέσο MSMN ζυγίστηκαν 10 g γλυκόζης και προστέθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml με βιδωτό πώμα που περιείχε 100 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια η κωνική αποστειρώθηκε σε κλίβανο στους 121°C για 20 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους 4°C για αποθήκευση μέχρι τη χρήση του.

Προετοιμασία διαλύματος Βιταμίνης B12

Για την προετοιμασία του αρχικού διαλύματος Βιταμίνης B12 συγκέντρωσης 100 μg/ml, που θα χρησιμοποιούνταν στο τελικό θρεπτικό μέσο MSMN, ζυγίστηκαν 0.002 g Βιταμίνης B12 και προστέθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο των 25 ml με βιδωτό πώμα που περιείχε 20 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια το διάλυμα αποστειρώθηκε με τη βοήθεια φίλτρου σύριγγας διαστάσεων πόρων 0.22 μm, διαμέτρου 25 mm και μεμβράνης PES και φιλτραρίστηκε σε νέο αποστειρωμένο γυάλινο φιαλίδιο των 25 ml. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε στους 4°C για αποθήκευση μέχρι τη χρήση του.

Προετοιμασία διαλύματος imazalil

Για την προετοιμασία του αρχικού διαλύματος IMZ συγκέντρωσης 25 g/L, που θα χρησιμοποιούνταν στο τελικό θρεπτικό μέσο MSMN πάρθηκαν 0.5 ml εμπορικού σκευάσματος imazalil (Fangazil 50% w/v) και προστέθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο των 10 ml με βιδωτό πώμα που περιείχε 9.5 ml απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια το διάλυμα αποστειρώθηκε με τη βοήθεια φίλτρου σύριγγας διαστάσεων πόρων 0.22 μm, διαμέτρου 25 mm και μεμβράνης PES και φιλτραρίστηκε σε νέο αποστειρωμένο γυάλινο φιαλίδιο των 25 ml. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε στους 4 °C για αποθήκευση μέχρι τη χρήση του και η συγκέντρωση του IMZ μετρήθηκε σε σύστημα HPLC.

Προετοιμασία του θρεπτικού μέσου MSMN + IMZ

Το θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο MSMN παρέχει στους μικροοργανισμούς όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μικροστοιχεία με τη μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N) ενώ την πηγή άνθρακα προσφέρει το γεωργικό φάρμακο στη περίπτωση αυτή το imazalil και εν μέρει η γλυκόζη. Το θρεπτικό διάλυμα MSMN παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα (stock), τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες και έδωσαν το τελικό MSMN. Τα stock 1 και 2 προετοιμάστηκαν σε γυάλινες φιάλες τύπου Duran με διάλυση των συστατικών τους σε αποσταγμένο νερό (πίνακας 2) και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C υπό πίεση 1,2 atm για 25 min. Το stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση με φίλτρα σύριγγας 0,22 μm υπό ασηπτικές συνθήκες επειδή ο FeSO₄ είναι θερμοευαίσθητος. Για την προετοιμασία 1000ml MSMN, 100ml από το stock 1 διαλύθηκαν σε 780ml αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε εκ νέου. Μόλις το διάλυμα έφτασε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες 100ml stock 2, 20ml stock 3, 50 ml από το αρχικό διάλυμα της γλυκόζης, 250 ml από το αρχικό διάλυμα της βιταμίνης B12 και 2 ml από το αρχικό διάλυμα του imazalil για να έχουμε τελική συγκέντρωση του φαρμάκου 50 mg/L και το θρεπτικό αποθηκεύτηκε στους 4 °C μέχρι τη χρήση του.

Πίνακας 2. Συστατικά στοιχεία για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος MSMN

	Συστατικά	g/L
Stock1	KH ₂ PO ₄	22,7
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	59,7
	NH ₄ Cl	10
	Casamino Acids	0,15
Stock2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,15
Stock3	FeSO ₄	0,46

2.3. Προετοιμασία θρεπτικού υποστρώματος Potato Dextrose Broth (PDB)

Για την προετοιμασία του θρεπτικού υγρού υποστρώματος PDB ζυγίστηκαν 20 g PDB (Appllichem, Germany) σε γυάλινο δοχείο τύπου Duran των 2000 ml και προστέθηκε 1 λίτρο απιονισμένο νερό. Το γυάλινο Duran στη συνέχεια αποστειρώθηκε στους 121 °C υπό πίεση 1,2 atm για 25 min και τοποθετήθηκε στους 4 °C μέχρι τη χρήση του.

2.4 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το IMZ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του γεωργικού φαρμάκου της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε με την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκε αρχικά διάλυμα του IMZ συγκέντρωσης 1000 mg/L σε μεθανόλη (Merck GmbH, Germany), ζυγίζοντας κατάλληλη ποσότητα αναλυτικού πρότυπου IMZ καθαρότητας 99%, από την εταιρεία HPC-standards από τη Γερμανία. Στη συνέχεια, ποσότητα από το αρχικό διάλυμα του IMZ πάρθηκε και τοποθετήθηκε σε γυάλινη ογκομετρική φιάλη των 10 ml για την παρασκευή διαλύματος IMZ 100 mg/L και συμπληρώθηκε ποσότητα μεθανόλης μέχρι τη χαραγή της φιάλης. Το παραπάνω διάλυμα

χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία με διαδοχικές αραιώσεις, πρότυπα διαλύματα σε μεθανόλη συγκέντρωσης 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1 και 0.05 mg/L. Τα εν λόγω διαλύματα στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς σε σύστημα HPLC.

2.5. Ανάλυση του γεωργικού φαρμάκου IMZ σε σύστημα HPLC

Το IMZ αναλύθηκε σε σύστημα HPLC (ECOM HPLC system 2000) αποτελούμενο από ανιχνευτή πολλαπλών διοδίων (diode array detector) και στήλη C18 reverse phase διαστάσεων 4.6 x 150 mm (Athena, CNW, Shanghai). Η έκλουση του φαρμάκου έγινε με κινητή φάση αποτελούμενη από μεθανόλη και υδατικού διαλύματος αμμωνίας 0.25% σε αναλογία 80:20 αντίστοιχα και με ροή 1 ml/min. Η ανίχνευση του IMZ έγινε στα 204 nm και ο χρόνος κατακράτησης ήταν στα 5.4 min.

2.6. Μέθοδος εκχύλισης του IMZ από υγρά διαλύματα και θρεπτικές καλλιέργειες

Η μέθοδος για την εκχύλιση του IMZ από τις θρεπτικές καλλιέργειες της παρούσας μελέτης, καθώς επίσης και από τα αρχικά διαλύματα στοκ του IMZ έγινε ως εξής: σε 2 ml πλαστικά σωληνάκια τύπου Eppendorf υπό ασηπτικές συνθήκες πάρθηκαν 200 μl από το υγρό διάλυμα και τοποθετήθηκαν σε αυτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 800 μl μεθανόλης και πραγματοποιήθηκε ανακίνηση σε vortex για 10 sec. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν σε μέγιστη ταχύτητα για 5 min και το υπερκείμενο φιλτραρίστηκε σε γυάλινα φιαλίδια κατάλληλα για το HPLC με φίλτρα σύριγγας 0.45 μm και μεμβράνης PTFE και τοποθετήθηκαν για αποθήκευση στους -20 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

2.7 Αρχική καλλιέργεια εκκίνησης του μύκητα

Σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 250 mL για την καλλιέργεια των αποψυγμένων μυκητιακών αποικιών Α και Β γίνεται προσθήκη PDB από 100 έως 150 ml και εμβολιασμός με μικρή ποσότητα του μύκητα (μεταξύ 700 μl και 1000 μl) από κάθε αποικία. 2 εμβολιασμοί Α και 2 εμβολιασμοί Β. Επώαση για 2 με 3 εβδομάδες σε αναδευτήρα στους 25 °C. Προκύπτουν πυκνές και πηκτές μαύρες υγρές καλλιέργειες του μύκητα.

2.8 Υπολογισμός κονιδίων μυκητιακών αποικιών

Για τον υπολογισμό των κονιδίων στις καλλιέργειες εκκίνησης του μύκητα, έγινε φιλτράρισμα των καλλιεργειών αυτών με τη βοήθεια αποστειρωμένου υφάσματος τύπου τουλουπάνι, σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon των 50 ml για τη συγκράτηση του μυκηλίου. Στη συνέχεια τα falcon φυγοκεντρίθηκαν (8000 rpm, 5 min), το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και η πελέτα επαναδιαλύθηκε με 5 ml αποστειρωμένου νερού. Έπειτα, η καταμέτρηση των κονιδίων έγινε με τη βοήθεια μικροσκοπίου και την επίστρωση κατάλληλης αραιωμένης ποσότητας αιωρήματος από τις καλλιέργειες, σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubower. Η αντικειμενοφόρος πλάκα Neubower είναι εξειδικευμένη στην καταμέτρηση κυττάρων και κονιδίων υγρών δειγμάτων και περιέχει 64 ισομεγέθη τετραγωνισμένα κελιά στην επιφάνειά της που χρησιμοποιούνται για την καταμέτρηση των στόχων. Ο τελικός υπολογισμός των κονιδίων έγινε με τον εξής τύπο της Neubower για υπολογισμό κονιδίων:

$$N = \Sigma(\text{Τιμών}) / 64 * \text{αραίωση} * 10^4$$

Σ(τιμών): το άθροισμα των παρατηρούμενων κονιδίων/κυττάρων στα 64 τετράγωνα

2.9 Προετοιμασία προκαταρκτικού πειράματος

Για την δοκιμή του στοκ γλυκερόλης του μύκητα *C. herbarum* και της ικανότητάς του στην αποδόμηση του IMZ σε αποστειρωμένες κωνικές φλάσκες των 100 mL σε τρεις επαναλήψεις, τοποθετήθηκαν με ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής 30 ml θρεπτικού υποστρώματος MSMS + IMZ μαζί με κατάλληλη ποσότητα βιταμίνης B12 και γλυκόζης και στο τέλος εμβολιάστηκαν με 100 μl από το στοκ γλυκερόλης Α και Β, αντίστοιχα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τρεις κωνικές φιάλες με MSMN + IMZ χωρίς εμβολιασμό τους με τον μύκητα της μελέτης ως οι μεταχειρίσεις του μάρτυρα. Τέλος, οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε αναδευόμενο επωαστήρα (180 rpm, 28 °C), πάρθηκαν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

2.10 Προετοιμασία κύριου πειράματος

Για την προετοιμασία του κυρίως πειράματος της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν 5 μεταχειρίσεις που αποτελούσαν τα δείγματα του μάρτυρα και 6 μεταχειρίσεις που αποτελούσαν τους αναστολείς PB και 1-ABT σε τρεις δόσεις των συγκεντρώσεων 0.01, 0.1 και 1 mM, αντίστοιχα, με όλες τις μεταχειρίσεις να έχουν τρεις επαναλήψεις. Οι μεταχειρίσεις φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3. Συνολικά, προετοιμάστηκαν 33 κωνικές φιάλες των 100 ml και προστέθηκε σε όλες 30 ml περίπου θρεπτικό υπόστρωμα MSMS + IMZ μαζί με κατάλληλη ποσότητα βιταμίνης B12 και γλυκόζης. Οι τρεις πρώτες κωνικές φιάλες χωρίς άλλη προσθήκη αποτέλεσαν τις επαναλήψεις του μάρτυρα 1 (αβιοτική διάσπαση του IMZ), ενώ οι επόμενες τρεις εμβολιάστηκαν με το μύκητα *C.herbarum* αποτελώντας τα δείγματα του μάρτυρα 2 (θετικός μάρτυρας διάσπασης του IMZ). Στη συνέχεια, σε δύο σετ τριών κωνικών φιαλών προστέθηκαν οι αναστολείς PB και 1-ABT με συγκέντρωση 1 mM και αποτέλεσαν τους μάρτυρες 3 και 4 αντίστοιχα για την αβιοτική διάσπαση των αναστολέων. Άλλες τρεις κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν με το μύκητα *C.herbarum*, προστέθηκε μεθανόλη (<0.1% του συνόλου του όγκου της καλλιέργειας) και αποτέλεσε το μάρτυρα 5 για την επίδραση της μεθανόλης στη διάσπαση του IMZ από τον *C.herbarum*. Οι τελευταίες 18 κωνικές φιάλες χρησιμοποιήθηκαν ανά τρεις για τις μεταχειρίσεις των αναστολέων PB και 1-ABT στις συγκεντρώσεις 0.01, 0.1 και 1 mM, αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προετοιμασίας του πειράματος οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε αναδευόμενο επωαστήρα (180 rpm, 28 °C) και πάρθηκαν δείγματα ανά 0, 4, 7, 10, 14, 17, 21 και 24 ημέρες για παρακολούθηση της διάσπασης του μυκητοκτόνου. Ακολουθήθηκε εκ νέου η προαναφερθείσα διαδικασία.

Πίνακας 3. Πίνακας με τις μεταχειρίσεις της μελέτης και τις επεμβάσεις του πειράματος

	Μεθανόλη	<i>C. herbarum</i>	IMZ	PB	1-ABT	Περιγραφή μεταχείρισης
1	-	-	+	-	-	Control Imazalil
2	-	+	+	-	-	Control Imazalil + <i>C. herbarum</i>
3	+	-	+	+	-	Control Imazalil + PB
4	-	-	+	-	+	Control Imazalil + ABT
5	+	+	+	+	-	Control -Imazalil + <i>C. herbarum</i> + MeOH
6	+	+	+	+	-	Imazalil + <i>C. herbarum</i> + PB (0,01 mM)
7	+	+	+	+	-	Imazalil + <i>C. herbarum</i> + PB (0,1 mM)
8	+	+	+	+	-	Imazalil + <i>C. herbarum</i> + PB (1 mM)
9	-	+	+	-	+	Imazalil + <i>C. herbarum</i> + ABT-(0,01 mM)
10	-	+	+	-	+	Imazalil + <i>C. herbarum</i> + ABT (0,1 mM)
11	-	+	+	-	+	Imazalil + <i>C. herbarum</i> + ABT (1 mM)

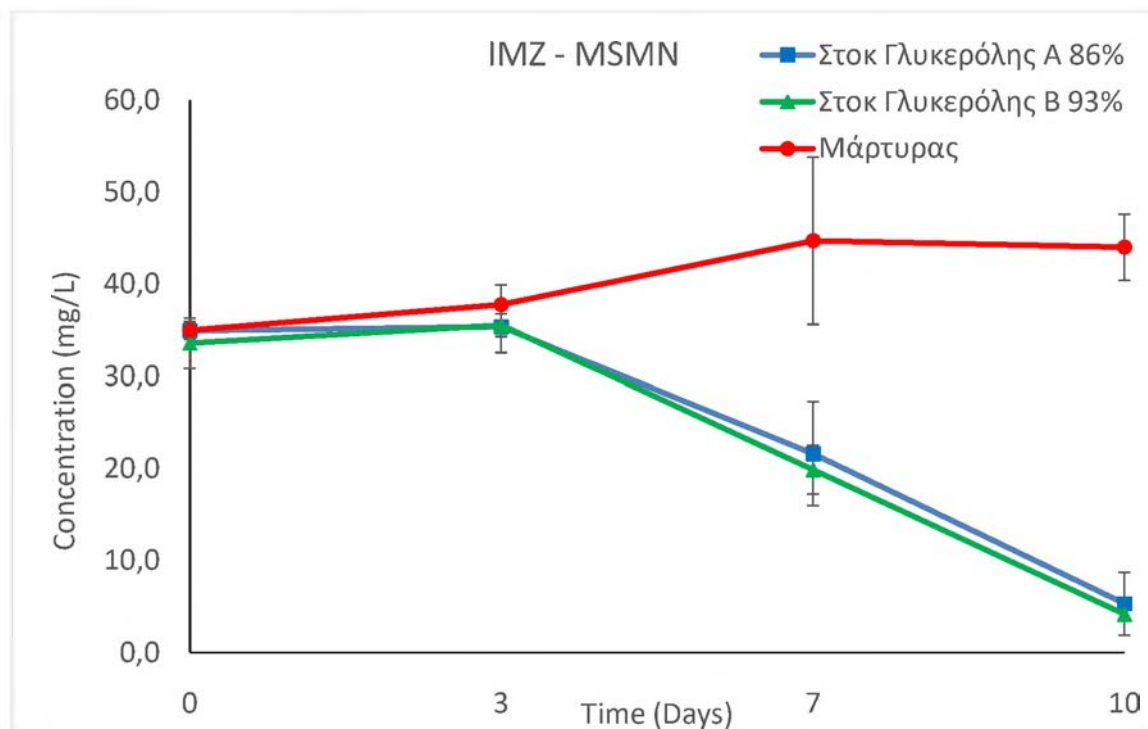
(T0,T4,T7,T10,T14,T17,T21,T24)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα προκαταρκτικού πειράματος

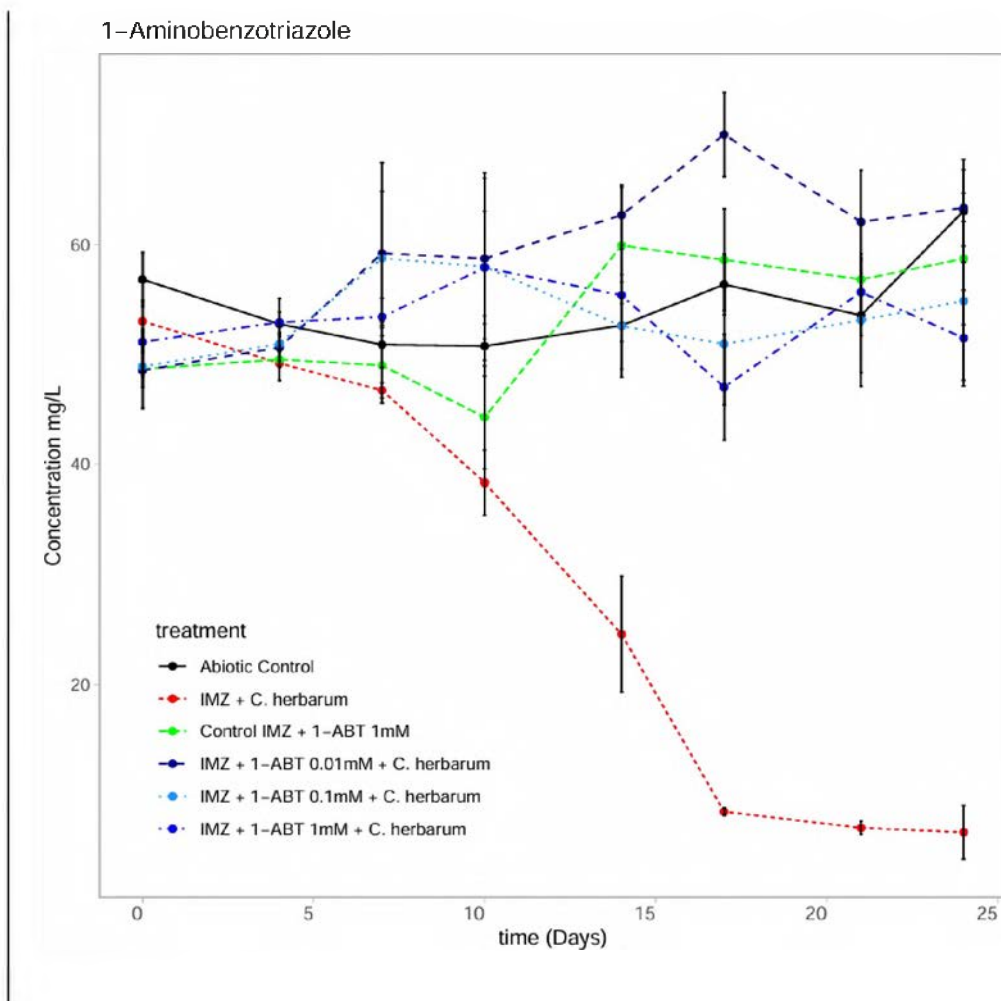
Για την επιλογή του καταλληλότερου στοκ γλυκερόλης μύκητα *C.herbarum* που δεν έχει χάσει την ικανότητα αποδόμησης του μυκητοκτόνου IMZ έγινε το προκαταρκτικό πείραμα, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Το εν λόγω πείραμα έδειξε πως και τα δυο στοκ που επιλέχτηκαν και αποψύχθηκαν από τους -80 °C, ήταν ικανά να διασπάσουν το IMZ κατά περίπου 90% τις πρώτες 10 ημέρες του πειράματος , σε αντίθεση με τα δείγματα του μάρτυρα στα οποία η συγκέντρωση IMZ πρακτικά δεν μεταβλήθηκε (Διάγραμμα 1). Με βάση το διάγραμμα αποτελεσμάτων επιλέχθηκε το στοκ Β για το κύριο πείραμα της παρούσας μελέτης.



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα διάσπασης του IMZ από τα στοκ γλυκερόλης στο προκαταρκτικό πείραμα.

3.2 Επίδραση του αναστολέα 1-ABT στη διάσπαση του IMZ

Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και σε όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκε ο κυτοχρωμικός αναστολέας 1-ABT οδήγησε σε σημαντική αναστολή της διάσπασης του IMZ από το μύκητα *C. herbarum*. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 2, σε όλες τις συγκεντρώσεις του 1-ABT (ανοιχτό έως σκούρο μπλέ γραμμές) δεν παρατηρήθηκε διάσπαση του IMZ και η συγκέντρωση παρέμεινε ίδια με τα δείγματα του αβιοτικού μάρτυρα (μαύρη γραμμή). Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τα δείγματα της μεταχείρισης όπου εφαρμόστηκε ο αναστολέας στις καλλιέργειες χωρίς τον εμβολιασμό του *C. herbarum*. Αντίθετα με κόκκινη γραμμή επισημαίνεται ο θετικός μάρτυρας διάσπασης του IMZ από το μύκητα *C. herbarum* με την διάσπαση να φτάνει το 90% της αρχικής συγκέντρωσης του IMZ, στο τέλος του πειράματος.

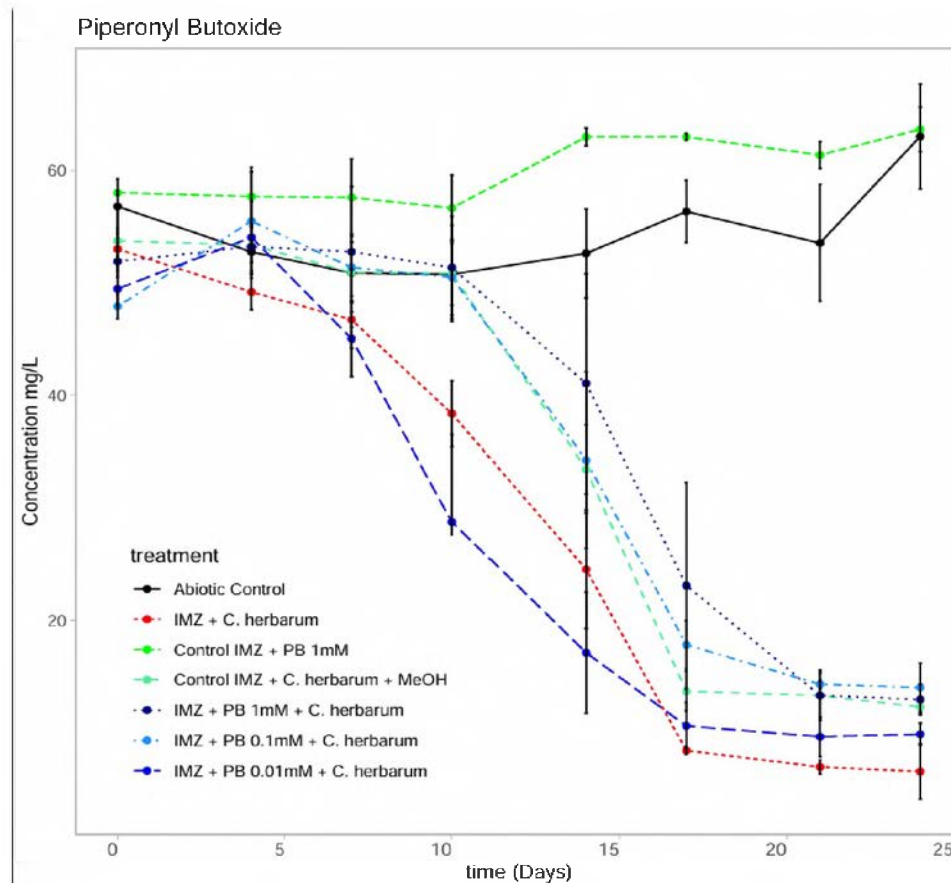


Διάγραμμα 2. Η διάσπαση του IMZ από τον *C. herbarum* με την παρουσία του αναστολέα του κυτοχρώματος P450 1-ABT στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων $\pm$ την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

3.3 Επίδραση του αναστολέα PB στη διάσπαση του IMZ

Στην περίπτωση του γενικού αναστολέα PB των CYP450, τα αποτελέσματα και ο ρόλος που διαδραματίζει στη διάσπαση του IMZ είναι ακριβώς αντίθετα από εκείνα του αναστολέα 1-ABT. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι όλες οι συγκεντρώσεις (0.01, 0.1 και 1 mM) του PB δεν επηρέασαν τη διάσπαση του IMZ καθ' όλη τη διάρκεια των 24 ημερών του πειράματος, με το ποσοστό της διάσπασης να φτάνει περίπου 90% για όλες τις μεταχειρίσεις που αναφέρθηκαν. Αντίθετα, τόσο στα δείγματα του αβιοτικού μάρτυρα όσο και στα δείγματα του μάρτυρα παρουσίας του αναστολέα PB χωρίς εμβολιασμό του μύκητα *C. herbarum* δεν παρατηρήθηκε κάποια διάσπαση στο μυκητοκτόνο IMZ. Παράλληλα φάνηκε ότι η χρήση

της μεθανόλης ως μέσο διάλυσης του PB λόγω χαμηλής υδατοδιαλυτότητάς του, δεν επηρέασε τη διάσπαση του IMZ με τα δείγματα της συγκεκριμένης μεταχείρισης να φτάνουν σε διάσπαση περίπου 90% και αυτά.



Διάγραμμα 3. Η διάσπαση του IMZ από τον *C. herbarum* παρουσία του αναστολέα του κυτοχρώματος P450 PB στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων $\pm$ την τυπική απόκλιση του μέσου όρου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Συμπεράσματα και συζήτηση

Ο κύριος λόγος διεξαγωγής των πειραμάτων διάσπασης του μυκητοκτόνου imazalil παρουσία αναστολέων του κυτοχρώματος P450, ήταν να εξακριβωθεί εάν τα CYP450 εμφανίζουν καταλυτική δράση στη διάσπαση του γεωργικού φαρμάκου. Το ερώτημα αυτό προέκυψε ύστερα από την μεταγραφωμική ανάλυση που έγινε σε δείγματα του μύκητα κατά τη διάρκεια διάσπασης του μυκητοκτόνου και την υπερέκφραση που παρατηρήθηκε σε γονίδια του CYP450 που ευθύνονται για την διάσπαση ξενοβιοτικών ουσιών (Durairaz et al. 2016). Οι CYP450 αποτελούν μια υπεροικογένεια αίμο-μονοξυγενασών που εμπλέκονται στο μετασχηματισμό μιας ευρείας και ποικίλης ομάδας τόσο βιολογικών όσο και συνθετικών χημικών ουσιών όπως οι πολύ-αρωματικοί υδρογονάνθρακες, τα φαρμακευτικά προϊόντα και γεωργικά φάρμακα (Gao et al. 2018) (Li et al. 2018) (Mori et al. 2021) προσφέροντας την ικανότητα στους μικροοργανισμούς να επιβιώνουν και να προσαρμόζονται σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Όλα τα παραπάνω αποτέλεσαν ισχυρές ενδείξεις που προτείνουν ότι ο μύκητας *C. herbarum* κινητοποιεί το ενζυμικό του οπλοστάσιο των CYP450 για να μεταβολίσει το IMZ. Οι παραπάνω ισχυρισμοί επαληθεύτηκαν περαιτέρω από την παρούσα μελέτη, με την πλήρη αναστολή διάσπασης του μυκητοκτόνου IMZ παρουσία των αναστολέων του CYP450 όπως το 1-ABT, με τα αποτελέσματα αυτά να επιβεβαιώνονται και από προηγούμενες μελέτες των (Mori et al. 2017) και (Wang et al. 2019), αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση οι (Mori et al. 2017) έδειξαν ότι χρησιμοποιώντας τους αναστολείς του κυτοχρώματος P450 PB και 1-ABT σε συγκεντρώσεις 0.01, 0.1 και 1 mM σε καλλιέργειες του μύκητα λευκής σήψης *Phanerochaete sordida*, εμφάνισαν σημαντική αναστολή στη διάσπαση του εντομοκτόνου clothianidin. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με αυτά της παρούσας μελέτης. Τέλος, οι (Wang et al., 2019) χρησιμοποιώντας τους παραπάνω αναστολείς του κυτοχρώματος P450 στις ίδιες συγκεντρώσεις σε καλλιέργειες του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium*, ανέστειλαν σχεδόν πλήρως τη διάσπαση του εντομοκτόνου acetamiprid στις καλλιέργειες αυτές, με τα αποτελέσματα αυτά να επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

Βιβλιογραφία

- Bae J.-W. , Kwon W.S., . 2021 “Piperonyl butoxide, a synergist of pesticides can elicit male-mediated reproductive toxicity”. *Reproductive Toxicology* 100 :120–25.
- K.Bensch, U.Braun, J.Z. Groenewald, P.W. Crous,. 2012 “The genus *Cladosporium*”. *Studies in Mycology* 72 : 1–401.
- Chu Y., Zhang C., Chen X., Li X., Ren N., Ho S.H. ., 2023 “Multistage defense response of microalgae exposed to pharmaceuticals in wastewater”. *Chinese Chemical Letters* 34 : 107727.
- Colby H.D., Abbott B., Cachovic M., Debolt K.M., Mico B.A., .1995 “Inactivation of adrenal cytochromes P450 by 1-aminobenzotriazole: Divergence of in vivo and in vitro actions”. *Biochemical Pharmacology* 49: 1057–1062.
- Emoto C., Murase S., Sawada Y., Jones B.C., Iwasaki K.,. 2003 “In Vitro Inhibitory Effect of 1-Aminobenzotriazole on Drug Oxidations Catalyzed by Human Cytochrome P450 Enzymes: A Comparison with SKF-525A and Ketoconazole”. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 18: 287–295.
- Brancato A., Brocca D., C. D. Lentdecker, Z. Erdos, L. Ferreira,L. Greco, J. Janossy, S. Jarrah, D. Kardassi, R. Leuschner,C. Lythgo, P. Medina, I. Miron, T. Molnar, A. Nougadere,R. Pedersen, H. Reich, A. Sacchi, M. Santos, A. Stanek,J. Sturma, J. Tarazona, A. Theobald, B. Vagenende, A. Verani ,L. V. Bouza, 2017 “Updated Review of the Existing Maximum Residue Levels for Imazalil According to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005 Following New Toxicological Information”.EFSA Journal 15.

- A. Brancato, D. Brocca, L.C. Cabrera, C.D. Lentdecker, Z. Erdos, L. Ferreira, L. Greco, S. Jarrah, D.Kardassi, R. Leuschner, A. Lostia, C. Lythgo, P. Medina, I. Miron, T. Molnar, R. Pedersen, H. Reich, A.Sacchi, M. Santos, A. Stanek, J. Sturma, J. Tarazona, A. Theobald, B. Vagenende , L.V.-Bouz , 2018 “Updated review of the existing maximum residue levels for imazalil according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005 following new toxicological information”. EFSA journal 16 .
- H. Hemanga, M. A. Laskar, H. Krishnatreyya , J.Islam, M.Kurmar, K. Zaman, D. Goyary, H.Seliya, V. Tyagi, P. Chattopadhyay, .2024 “Bioaccumulation of Deltamethrin and Piperonyl butoxide in *Labeo rohita* fish”. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 284 : 116908.
- E.P.A , R.E.D. FACTS Imazalil 2005. “Imazalil - Regulatory Actions | Chemical Search | Pesticides | US EPA.”
- A. E. Jenkins, C.O. Scarlett, T.G.Beames, K.S.R. Gonzalez, A.A. Martin, M.R. Sun, P.R. Huston, R.J Lipinski, 2023“Pharmacokinetic analysis of acute and dietary exposure to piperonyl butoxide in the mouse” *Toxicology Reports* 11 :310–17.
- C. Jin, R. Zhang, Z. Fu, Y. Jin 2019“Maternal exposure to imazalil disrupts the endocrine system in F1 generation mice”. *Molecular and Cellular Endocrinology* 486 : 105–112.
- Y. Jin, Z. Zhu, Y. Wang, E. Yang, X.Feng, Z.Fu , 2016 “The fungicide imazalil induces developmental abnormalities and alters locomotor activity during early developmental stages in zebrafish’. *Chemosphere* 153 : 455–461.
- P.A. Karas, A. Metsoviti, V. Zisis , C. Ehaliotis, M. Omirou, E.S. Papadopoulou, U.M.-Spiroudi , S. Manta, D. Komiotis, D. G. Karpouzas , 2015 “Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized

depuration of their pesticide-contaminated agro-industrial effluents”. *Science of The Total Environment* 530–531 : 129–139.

- P. A. Karas, S. Makri, E.S. Papadopoulou, C. Ehaliotis, U. M.-Spiroudi, D. G. Karpouzas, 2016 “The potential of organic substrates based on mushroom substrate and straw to dissipate fungicides contained in effluents from the fruit-packaging industry – Is there a role for *Pleurotus ostreatus*?” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124 : 447–54.
- S. Lina, J. Wei, B. Yang, M. Zhang, R. Zhuo, 2022 “Bioremediation of organic pollutants by white rot fungal cytochrome P450: The role and mechanism of CYP450 in biodegradation”. *Chemosphere* 301: 134776
- P. R. Ortiz 2018 “1-Aminobenzotriazole: A Mechanism-Based Cytochrome P450 Inhibitor and Probe of Cytochrome P450 Biology”. *Medicinal chemistry* 8
- T. Mori, J. Wang, Y. Tanaka, K. Nagai, H. Kawagishi, H. Hirai , 2017 “Bioremediation of the neonicotinoid insecticide clothianidin by the white-rot fungus *Phanerochaete sordid*”. *Journal of Hazardous Materials* 321: 586–590.
- N. Daliang, H. Wang. , 2012 “Involvement of Cytochrome P450 in Pentachlorophenol Transformation in a White Rot Fungus *Phanerochaete Chrysosporium*”. *PloS One* 9: 45887
- M. Omirou, P. Dalias, C. Costa, C. Papastefanou, A. Dados, C. Ehaliotis, D.G. Karpouzas, 2012 “Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies”. *Environmental Pollution* 166 :31–39.
- C.V. Papazlatani, Z. Mavriou, M. Kolovou, E.E. Gkounou , S. Testembasis , K. Azis , G.S. Karaoglanidis, S. Ntougias, D.G. Karpouzas, 2022 “Isolation, characterization

and industrial application of a *Cladosporium herbarum* fungal strain able to degrade the fungicide imazalil”. *Environmental Pollution* 301: 119030

- K.S.R.-González , T.G. Beames, R.J. Lipinski, 2021 “Examining the developmental toxicity of piperonyl butoxide as a Sonic hedgehog pathway inhibitor”. *Chemosphere* 264”:128414.
- B. Ruomeng, O. Meihao, Z.Siru, G. Shichen, Z. Yixian, C. Junhong, M. Ruijie, L. Yuan, X. Gezhi, C. Xingyu, Z. Shiyi, Z. Aihui, F. Baishan, 2023 “Degradation strategies of pesticide residue: From chemicals to synthetic biology”. *Synthetic and Systems Biotechnology* 8 : 302–313.
- M.R. Siegel, N. N. Ragsdale., 1978 “Antifungal mode of action of imazalil”. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 9: 48–56.
- J. Wang, H.Ohno, Y. Ide, H. Ichinose, T.Mori, H. Kawagishi, H. Hirai. 2019 “Identification of the cytochrome P450 involved in the degradation of neonicotinoid insecticide acetamiprid in *Phanerochaete chrysosporium*”. *Journal of Hazardous Materials* 371: 494–98.
- L.Wu, H. Luo, J. Xu, L. Yu, J. Xiong, Y. Liu, X. Huang, X. Zou , 2024 “Vital role of CYP450 in the biodegradation of antidiabetic drugs in the aerobic activated sludge system and the mechanisms”. *Journal of Hazardous Materials* 469: 134056.
- D. XU, J.M. VOIGT, B.A. Mico, S. KOMINAMI, S. TAKEMORI, H.D. COLBY , 1994 “Inhibition of adrenal cytochromes P450 by 1-aminobenzotriazole *in vitro* selectivity for xenobiotic metabolism”. *Biochemical Pharmacology* 48: 1421–26.
- D. Zhang, J. Zheng, M. Chu, Y. Feng, H. Li , 2023 “Secondary metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium* sp. ZLM-6”. *Biochemical Systematics and Ecology* 111: 104741.

- Durairaj, P., J. S. Hur, and H. Yun. 2016. "Versatile Biocatalysis of Fungal Cytochrome P450 Monooxygenases." *Microbial Cell Factories* 15: 125.
- Gao, N., C. X. Liu, Q. M. Xu, J. S. Cheng, and Y. J. Yuan. 2018. "Simultaneous Removal of Ciprofloxacin, Norfloxacin, Sulfamethoxazole by Co-Producing Oxidative Enzymes System of *Phanerochaete chrysosporium* and *Pycnoporus sanguineus*." *Chemosphere* 195: 146–155
- Mori, T., H. Ohno, H. Ichinose, H. Kawagishi, and H. Hirai. 2021. "White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* Metabolizes Chloropyridinyl-Type Neonicotinoid Insecticides by an N-Dealkylation Reaction Catalyzed by Two Cytochrome P450s." *Journal of Hazardous Materials* 402: 123831.