



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Μ.Π.Σ. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη της αποδόμησης του μυκητοκτόνου
iprodione σε οργανικό βιομίγμα αποτελούμενο
από έδαφος, άχυρο και τύρφη»**



**Επιβλέπων Καθηγητής: Καρούζας Δημήτριος
Εκπόνηση: Καραβασίλης Δημήτριος**

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Μ.Π.Σ. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

«Μελέτη της αποδόμησης του μυκητοκτόνου iprodione σε οργανικό βιομίγμα αποτελούμενο από έδαφος, άχυρο και τύρφη»

«Study of the dissipation of the fungicide iprodione in organic biomixtures composed of soil, straw and peat»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Δημήτριος Καρούζας: Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας-Βιοτεχνολογίας**
- **Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών**
- **Μόσιαλος Δημήτριος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Βιοτεχνολογία-Ποιότητας Διατροφής και Περιβάλλοντος» με στόχο την μελέτη της αποδόμησης του μυκητοκτόνου iprodione σε οργανικό βιομίγμα αποτελούμενο από έδαφος, άχυρο και τύρφη.

Με την ολοκλήρωση της διατριβής θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας. Συγκεκριμένα ευχαριστώ τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα και επιβλέποντα της μεταπτυχιακής εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, την υποστήριξη, την καθοδήγηση και την άψογη συνεργασία μας καθώς χωρίς την βοήθεια του η ολοκλήρωση της εργασίας δεν θα ήταν δυνατή.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Marco Campos του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την πολύτιμη βοήθεια του, ο οποίος καθ' όλη την διάρκεια της διεκπεραίωσης της παρούσας εργασίας ήταν καθοδηγητής τόσο στο πειραματικό μέρος όσο και στο θεωρητικό μέρος, την ειλικρινή συναδελφική αλληλεγγύη και την ευγενική συνεργασία. Επίσης τον ευχαριστώ για την άμεση βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και για της εύστοχες υποδείξεις του κατά τη διάρκεια εκτελέσεις των πειραμάτων.

Ευχαριστώ επίσης τους γονείς και φίλους για την ηθική υποστήριξη και συμπαράσταση καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Οι βιοκλίνες είναι ένας απλός τρόπος για τον καθαρισμό των λυμάτων που παράγονται σε αγροτικές εφαρμογές από παράτυπες πρακτικές πριν ή μετά τις διαδικασίες ψεκασμών. Η καθαριστική τους απόδοση στηρίζεται κυρίως στην υψηλή ικανότητα βιοδιάσπασης του βιομίγματος, μιας οργανικής μίξης που αποτελείται από χόμα, άχυρο και τύρφη σε συγκεκριμένες ογκομετρικές αναλογίες. Το χαμηλό pH τέτοιων βιομυμάτων βρέθηκε ότι αναστέλλει την αποσυνθετική ικανότητα όσον αφορά παρασιτοκτόνα όπως το iprodione. Η εργασία αυτή στόχο είχε τη μελέτη της επίδρασης της παρουσίας ριζόσφαιρας στο βιομίγμα και τη βιοαύξηση με συγκεκριμένα βακτήρια στην αποσύνθεση και το μεταβολισμό παρασιτοκτόνων, ενώ μελετήθηκε και η επίδραση των στρατηγικών βελτιστοποίησης στη μικροβιακή δραστηριότητα των βιομυμάτων. Συνολικά τα πειράματα έδειξαν ότι τόσο η βιοαύξηση όσο και η παρουσία ριζόσφαιρας αύξησαν την αποσύνθεση του iprodione, το οποίο αποσυντέθηκε σημαντικά πιο γρήγορα στο βιομίγμα, όπου υπήρχαν και ρίζες του *Lolium perenne* και βιοαυξήθηκε με το στέλεχος C1 του βακτηρίου *Arthrobacter* που αποσυνθέτει το iprodione. Η βιοαύξηση είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγαλύτερης ποσότητας ενός ενδιάμεσου προϊόντος υδρόλυσης, του διχλωροφαινυλο-καρβοξυαμιδίου (μεταβολίτης I), το οποίο στη συνέχεια μετατράπηκε σε 3,5 – dichlorophenylurea acetate και σε 3,5-διχλωροανιλίνη. Και τα δύο προϊόντα σχηματίστηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις σε όλες τις μεθόδους. Η μέθοδος της βιοαύξησης ή η παρουσία της ριζόσφαιρας δεν φάνηκαν να επηρεάζουν σημαντικά τη δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται σε διεργασίες όπως ο κύκλος της β- γλυκοσιδάσης, αλκαλικής φωσφατάσης και υδρολυτικής δραστηριότητας. Η μόνη εμφανής επίδραση παρατηρήθηκε για την όξινη φωσφατάση, της οποίας η συγκέντρωση βρέθηκε να είναι σταθερά υψηλή παρουσία της ριζόσφαιρας σε σύγκριση με τις μεθόδους που δεν περιελάμβαναν ριζόσφαιρα. Συνολικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία φυτών και η βιοαύξηση θα μπορούσαν να ενισχύσουν σημαντικά την ικανότητα των βιοκλινών έναντι του iprodione, το οποίο θα μπορούσε να παραμείνει σε χαμηλά pH που συχνά έχουν βιοκλίνες που περιέχουν υλικά βασισμένα σε τύρφη.

ABSTRACT

Biobeds constitute a simple on farm system for the depuration of effluents produced on farm by improper practices before or after spraying operations. Their depuration performance mostly relies on the high biodegradation capacity of the biomixture, an organic substrate composed of soil, peat and straw in specific volumetric ratios. The low pH of such biomixtures has been found to impair the degradation potential against pesticides like iprodione. The current project aimed to assess the impact of rhizosphere presence (in the biobed) and bioaugmentation with specific degrading bacteria on the degradation and metabolism of pesticides, while the impact of those optimization strategies on the microbial activity in biomixtures was also assessed. Overall, our experiments showed that primarily bioaugmentation and secondarily the presence of rhizosphere stimulated the degradation of iprodione which degraded significantly faster in the biomixture where roots of *Lolium perenne* were present and bioaugmented with an *Arthrobacter* iprodione-degrading strain C1. Bioaugmentation resulted in the formation of higher amounts of an intermediate hydrolysis product dichlorophenyl-carboxiamide (metabolite I) which was subsequently transformed to 3,5-dichlorophenylurea acetate and 3,5-dichloroaniline which were both produced in small amounts in all treatments. The application of bioaugmentation or the presence of rhizosphere did not appear to induce significant and clear effect patterns on the activity of enzymes involved in major cycles like β -glucosidase, alkaline phosphatase and hydrolytic activity. The only clear effect was observed for acid phosphatase which was found to be consistently higher in the presence of rhizosphere compared to the relevant non-rhizosphere containing treatments. Overall, our results suggest that the presence of plants and bioaugmentation of biobeds would substantially enhance their depuration capacity against iprodione which could be particularly persistent at pH levels commonly found in biobed systems packed with peat-based materials.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
Περίληψη.....	4
ABSTRACT	5
Περιεχόμενα	6
1.Εισαγωγή	8
1.1.Βιοκλίνες.....	8
1.1.1 Συστήματα βιοκλινών..... Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
1.1.2. Διεργασίες που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα των βιοκλινών.	12
1.1.3. Βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων στην ριζόσφαιρα των φυτών	14
1.2. Μέθοδοι βελτιστοποίησης της αποτελεσματικότητας των βιοκλινών.....	15
1.2.1. Βιολογικός εμπλουτισμός με βακτήρια που διασπών τα γεωργικά φάρμακα στόχους.....	15
1.2.2. Προσθήκη εδάφους προσαρμοσμένο σε αυξημένους ρυθμούς διάσπασης των γεωργικών φαρμάκων.....	16
1.3. Iprodione	16
1.3.1. Χρήσεις και μηχανισμός δράσης.....	16
1.3.2. Τοξικότητα	17
1.3.3. Περιβαλλοντική Τύχη και Συμπεριφορά	17
1.3.4. Υπολειμματικότητα, βιοαποδόμηση και μεταβολισμός του iprodione.....	18
1.4. Στόχος της πτυχιακής εργασίας.....	20
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1. Βιομίγμα	21
2.2. Βακτήρια.....	21
2.3. Γεωργικά φάρμακα και προϊόντα μεταβολισμού	22
2.4. Περιγραφή του πειράματος	22
2.5. Μικροβιολογικές μετρήσεις	24
2.5.1.Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας όξινων και αλκαλικών φωσφατασών στο έδαφος.....	24
2.5.2.Προσδιορισμός της δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης	26
2.5.3.Προσδιορισμός της γενικής υδρολυτικής ενζυμικής δραστηριότητας με την μέθοδο υδρόλυσης της 3,6-διακετυλο-φλουοροσκεΐνης (FDA)	28
2.6. Αναλυτικές Μέθοδοι	31

Για την εκχύλιση του iprodione και των μεταβολιτών του στο βιομίγμα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:.....	31
2.7. Στατιστική Ανάλυση.....	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1. Αποδόμηση του iprodione και των μεταβολιτών του στο βιομίγμα	33
3.2. Επιδράσεις στην μικροβιακή δραστηριότητα	36
3.2.1. Επιδράσεις στην δραστικότητα της β-γλυκοσιδάσης	36
3.2.2. Επιδράσεις στην υδρολυτική μικροβιακή δραστικότητα.....	37
3.2.3. Επιδράσεις στην δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης.....	38
3.2.4. Επιδράσεις στην δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης	39
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40
4.1.ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IPRODIONE	40
4.2. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.....	41
Βιβλιογραφία.....	43
Πηγές Διαδικτύου	47

1.Εισαγωγή

1.1.Βιοκλίνες

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν χημικές ουσίες που παρασκευάζονται με στόχο την αποτελεσματική καταπολέμηση οργανισμών που προσβάλλουν φυτά. Είναι προϊόντα υψηλής τεχνολογίας, που δρουν και σκοτώνουν ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς που βλάπτουν τις καλλιέργειες. Εκτός από την επιβάρυνση που δέχονται τα αγροτικά εδάφη από την αγροτική χρήση των γεωργικών φαρμάκων, υπάρχει και ο κίνδυνος απελευθέρωσης υψηλών ποσοτήτων γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον από μη ορθολογικές πρακτικές όπως το πλύσιμο των ψεκαστικών μηχανημάτων που οδηγεί στην παραγωγή υγρών αποβλήτων με υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων.

Η ορθή χρήση των γεωργικών φαρμάκων πρέπει να είναι πρωτεύον θέμα για όσους εμπλέκονται με αυτά. Οι εμπλεκόμενοι θα πρέπει να επικεντρώνονται όσον αφορά την έκχυση του φυτοφαρμάκου: Στον τομέα ψεκασμού, στην διάλυση του η οποία πρέπει να γίνεται στην δεξαμενή ψεκασμού και τη σωστή διαχείριση των υπολειμμάτων του φυτοφαρμάκου που έχει απομείνει εσωτερικά και εξωτερικά της δεξαμενής ψεκασμού. Η μη ικανοποιητική διαχείριση των φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών έχουν ως αποτέλεσμα την συσσώρευση κατάλοιπων στα επιφανειακά και τα υπόγεια ύδατα και σε μεγάλους όγκους χώματος. Περίπου 0.1 – 1.7 g γεωργικών φαρμάκων ελευθερώνονται στο περιβάλλον με το εξωτερικό πλύσιμο των ψεκαστικών μηχανημάτων και 1 – 9 g με το εσωτερικό πλύσιμο των ψεκαστικών μηχανημάτων. Έτσι υπάρχει κίνδυνος για την βιοποικιλότητα της περιοχής.[1*]

Η Σουηδία πρώτη δημιούργησε απλά συστήματα τα οποία ονομάστηκαν **βιοκλίνες (Biobeds)**. Οι βιοκλίνες είναι βιοφίλτρα που εγκαθίστανται στον αγρό με σκοπό την απορρόπηση του συγκεκριμένου εδάφους από τοξικά απόβλητα και για να ελαχιστοποιηθεί η ρύπανση του περιβάλλοντος από τη χρήση φυτοφαρμάκων τα οποία λόγω συσσώρευσης οδηγούν στην υποβάθμιση του εδάφους. Εμπνευστής και δημιουργός των βιοκλινών ήταν ο καθηγητής Lenard Torstensson από το Agricultural University of Sweden και σήμερα στην Σουηδία οι βιοκλίνες έχουν φτάσει τις 1.500. Διάφορες παραλλαγές του αρχικού σχεδίου χρησιμοποιούνται σήμερα και σε άλλες

χώρες της Β. Ευρώπης, όπως Μεγάλη Βρετανία, Βέλγιο, Δανία και Γαλλία αλλά και σε χώρες της νοτίου Ευρώπης όπως Ιταλία και Κύπρος.

Ο σχεδιασμός τους είναι σχετικά απλός: Αποτελούνται από ορύγματα βάθους 0.5 – 1 m και επιφάνειας 10-45 m² τα οποία γεμίζονται με οργανικά υποστρώματα που ονομάζονται **βιομίγματα (biomixture)**. Τα βιομίγματα λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους ευνοούν την προσρόφηση και την μικροβιακή διάσπαση σε μεγάλο βαθμό. Η αποτελεσματικότητα της κατακράτησης και της υποβάθμισης των γεωργικών φαρμάκων εξαρτάται από καθένα από τα συστατικά της βιοκλίνης τα οποία είναι: α) το στρώμα αργίλου στον πυθμένα της βιοκλίνης, β) το βιομίγμα - πληρωτικό υλικό της βιοκλίνης, γ) η φυτοκάλυψη της επιφάνειας της βιοκλίνης.

α) Το στρώμα αργίλου έχει χαμηλή διαπερατότητα και χρησιμοποιείται σαν αδιαπέραστο στρώμα για να μειωθεί η απορροή νερού από τον πυθμένα της βιοκλίνης και να αυξηθεί ο χρόνος κατακράτησης των γεωργικών φαρμάκων στη βιοκλίνη.

β) Το βιομίγμα που συνήθως χρησιμοποιείται στο παραδοσιακό σύστημα αποτελείται από έδαφος, άχυρο και τύρφη σε αναλογία κατ' όγκο 25:50:25. Το ιδανικό βιομίγμα θα πρέπει να παρουσιάζει υψηλή μικροβιακή δραστηριότητα και αυξημένη ικανότητα προσρόφησης των γεωργικών φαρμάκων. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από παράγοντες όπως η σύνθεση, η ομοιογένεια, η ηλικία, η υγρασία και η θερμοκρασία στην οποία διατηρήθηκε. Καθένα από τα παραδοσιακά υλικά από τα οποία αποτελείται το βιομίγμα έχει συγκεκριμένο ρόλο. Ειδικότερα:

Το έδαφος αποτελεί σημαντική πηγή μικροοργανισμών με υψηλή αποδομητική ικανότητα έναντι των γεωργικών φαρμάκων. Έτσι η παρουσία των βακτηρίων του εδάφους μπορεί να ενισχύσει την έκταση της αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων, όπως έχει παρατηρηθεί για άλλους οργανικούς ρύπους.

Το άχυρο αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα για τους μικροοργανισμούς και ειδικότερα υπόστρωμα των μυκήτων λευκής σήψης τα οποία παράγουν φαινολοξειδάσες (υπεροξειδάσες και λακκάσες). Η χαμηλή εξειδίκευση των παραπάνω ενζύμων τα καθιστά ιδιαίτερα αποτελεσματικά για την αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων όπως έχει αποδειχτεί σε προηγούμενες μελέτες όπως των: Castillo et al (1997,2000).Castillo,Andersson et al(2001).Castillo, et al(2001). Von Wiren-Lehr et al

(2001).[12,14,15,16,54] Η υψηλή περιεκτικότητα του βιομίγματος σε άχυρο έχει βρεθεί ότι ευνοεί την αποδομητική ικανότητα των βιοκλινών αλλά για τεχνικούς λόγους δεν μπορεί αυτή να ξεπερνά κατ'όγκο το 50% (Zadra et al,2006)[57].

Την τύρφη που αυξάνει την ικανότητα προσρόφησης των γεωργικών φαρμάκων, βοηθά στην διαχείριση της υγρασίας και αυξάνει την υδατοχωρητικότητα του βιομίγματος, και μειώνει το pH του βιομίγματος, δημιουργώντας ευνοϊκές συνθήκες για του μύκητες και ειδικότερα για τους μύκητες λευκής σήψης (Castillo et al, 2008)[13].

γ) *Η φυτοκάλυψη της βιοκλίνης με γρασίδι* βοηθά στην διατήρηση της σωστής υγρασιακής κατάστασης της βιοκλίνης, αποκαλύπτει διαρροές φυτοφαρμάκου λόγω δημιουργίας βλάβης στο χόρτο και το πιο σημαντικό είναι ότι συμβάλλει προς την αύξηση της αποτελεσματικότητας της βιοκλίνης, ιδιαίτερα δε των άνω τμημάτων, όπου τα περισσότερα από τα φυτοφάρμακα συγκρατούνται και διασπώνται (Fogg et al, 2004, Tapia et al, 2006)[24,51]. Ακόμα και αν αυτό το φαινόμενο είναι επιτυχές σε ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να επηρεαστούν από αυτόχθονες μικροβιακές κοινότητες. (Abraham et al., 2002)[3]. Σε τέτοιες περιπτώσεις μια καλή στρατηγική θα μπορούσε να είναι η προσθήκη βακτηριακών στελεχών στο χώρο της ριζόσφαιρας ώστε να έχουμε αποφυγή της συσσώρευσης φυτοφαρμάκου και των μεταβολιτών αυτού (El Fantroussi, S., Agathos, 2005)[21].

1.1.1 Συστήματα βιοκλινών

Τεχνικά υπάρχουν δύο κύρια συστήματα βιοκλινών:

α) Ο έμμεσος τύπος βιοκλινών όπου το γέμισμα, ανάμιξη και ο καθαρισμός του ψεκαστικού μηχανήματος γίνονται σε μία κατάλληλα διαμορφωμένο χώρο μονωμένο με απορροή. Τα απόνερα από την πλύση του ψεκαστικού μηχανήματος συλλέγονται και διοχετεύονται με κατάλληλες ροές σε παρακείμενη βιοκλίνη (Εικόνα 1).



***Εικόνα 1:** Σύστημα έμμεσης βιοκλίνης όπου το ψεκαστικό μηχάνημα είναι σταθμευμένο σε περιφραγμένη περιοχή χειρισμού όπου η απορροή εκτρέπεται σε κοντινή βιοκλίνη (ADAS,2006)[4].*

β) Το παραδοσιακό Σουηδικό σύστημα βιοκλίνης ή άμεσου τύπου σύστημα όπου το γέμισμα, η ανάμειξη και το πλύσιμο γίνονται επί της βιοκλίνης καθώς το ψεκαστικό μηχάνημα τοποθετείται σε κατάλληλο πλέγμα με αποτέλεσμα το υγρό απόβλητο που παράγεται να καταλήγει στην βιοκλίνη (Εικόνα 2).



***Εικόνα 2:** Άμεσου τύπου βιοκλίνη (η πρώτη παγκοσμίως που κατασκευάστηκε στη Σουηδία) Παρατηρούμε το ψεκαστικό μηχάνημα να βρίσκεται ακριβώς πάνω από την βιοκλίνη(www.biobeds.org)[2*].*

1.1.2. Διεργασίες που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα των βιοκλινών.

Οι διεργασίες οι οποίες είναι καθοριστικές για την αποτελεσματικότητα των βιοκλινών είναι η βιοαποδόμηση και η προσρόφηση.

Βιοαποδόμηση ή μικροβιακή αποδόμηση ονομάζεται η διάσπαση οργανικών ουσιών σε μικρότερα μόρια μέσω της δράσης ενζύμων που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς. Η διάσπαση των οργανικών ενώσεων πραγματοποιείται από τους μικροοργανισμούς οι οποίοι τους χρησιμοποιούν για την αύξηση και ανάπτυξη τους. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν δύο κύριες στρατηγικές για τον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών οργανικών ουσιών: τον συμμεταβολισμό και τον καταβολισμό. Κατά τον συμμεταβολισμό οι μικροοργανισμοί αποδομούν τους ρύπους με βραδείς ρυθμούς και δεν αποκομίζουν ενέργεια για την αύξηση τους σε αντίθεση με τον καταβολισμό όπου οι ρύποι αποτελούν πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που του καταβολίζουν με ταχύτατους ρυθμούς. Η μετατροπή αυτών των ουσιών βασίζεται σε μεταβολικές ή ενζυματικές διαδικασίες. Κατά τη βιοαποδόμηση σύνθετα οργανικά μόρια μετατρέπονται σε πιο απλά ή τοξικές ουσίες σε λιγότερο ή καθόλου τοξικές. Η αποδόμηση της οργανικής ύλης λαμβάνει χώρα είτε υπό αερόβιες συνθήκες (παρουσίας οξυγόνου) είτε υπό αναερόβιες συνθήκες (απουσίας οξυγόνου). Η μικροβιακή αποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών θεωρείται ως μια από τις σημαντικότερες οδούς απομάκρυνσης τους στο περιβάλλον.

Η βιοαποδόμηση χαρακτηρίζεται ως μια πολύπλοκη αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων, η οποία συχνά διαφοροποιείται ανάλογα με το μικροοργανισμό αποδομητή. Το μονοπάτι βιοαποδόμησης κάθε ουσίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ενζυμικό σύστημα που έχουν οι μικροοργανισμοί που καταλύουν τις αντιδράσεις αποδόμησης. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τις οργανικές ενώσεις ως υποστρώματα ανάπτυξης. Κάποιες φορές παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τη θέση διάσπασης του μορίου της χημικής ένωσης, ενώ υπάρχουν και μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αποδομούν οργανικούς ρύπους που παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην χημική τους δομή. Η βιοαποδόμηση επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH του μέσου στο οποίο πραγματοποιείται, η υγρασία και η συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου. Τόσο οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όσο και η χημική σύσταση της ουσίας επηρεάζουν

την ανάπτυξη και εξάπλωση των αποικιών των μικροοργανισμών καθώς και τη διάσπαση των μορίων. Η βιοαποδόμηση αποτελεί την πιο σημαντική διεργασία απομάκρυνσης των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον και αποτελεί την πιο σημαντική διεργασία απομάκρυνσης των γεωργικών φαρμάκων εντός των βιοκλινών.

Προσρόφηση είναι ένα επιφανειακό φαινόμενο κατά το οποίο επιφάνειες στερεών ή υγρών σωμάτων συγκρατούν μόρια, άτομα ή ιόντα διαφόρων ουσιών. Η προσρόφηση είναι μία διεργασία η οποία οφείλει την γένεση της σε διάφορα είδη δυνάμεων. Οι δυνάμεις αυτές διαχωρίζονται συνήθως σε δυνάμεις σθένους και δυνάμεις τύπου van der Waals. Αν η χημική ένωση μπορεί να ιονιστεί τότε μπορεί να συνδεθεί στις θέσεις της στερεάς επιφάνειας που έχουν αντίθετο φορτίο. Είναι δυνατόν να δημιουργηθεί κάποιου είδους χημικός δεσμός με την επιφάνεια του στερεού. Οι φάσεις αυτές μπορεί να ακολουθούν κάποιον από τους παρακάτω συνδυασμούς: υγρού-υγρού, υγρού-στερεού, αερίου-υγρού και αερίου-στερεού.

Πρόκειται για ένα επιφανειακό φαινόμενο που πραγματοποιείται όταν μία ουσία έρχεται σε επαφή με μία στερεή επιφάνεια. Λαμβάνει χώρα η συγκέντρωση της ουσίας στην στερεή επιφάνεια ή στη διεπιφάνεια μεταξύ δύο φάσεων. Έχουμε φυσικο-χημικές αλληλεπιδράσεις διαφόρων τύπων, οι οποίες στην φάση της επιφάνειας που γίνεται η προσρόφηση αποκαλείτε προσροφητής (adsorbent) και ο ρύπος (χημική ένωση που δημιουργείτε) που προσροφάτε αποκαλείτε προσροφημένη ουσία (adsorbate). Η προσρόφηση οφείλετε στις ελεύθερες μονάδες συγγένειας του προσροφητικού μέσου που εκπροσωπούνται από ακόρεστες δυνάμεις στις οποίες μπορούν να συγκρατηθούν οι προσροφημένες ουσίες. Τα προσροφημένα μόρια σχηματίζουν διάφορα στρώματα προσρόφησης και προκαλούν αύξηση του βάρους της στερεής επιφάνειας και πτώση της πίεσης του αερίου μέχρι το σημείο που αποκαθίστανται δυναμική ισορροπία.

Η προσρόφηση ουσιών από υδατικά διαλύματα στην επιφάνεια ενός στερεού εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες που έχουν σχέση με τα χαρακτηριστικά του προσροφητικού μέσου και της προσροφημένης ουσίας, καθώς επίσης και από τις ιδιότητες του διαλύματος (pH, θερμοκρασία, παρουσία άλλων ουσιών). Οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν τόσο την έκταση όσο και την ταχύτητα προσρόφησης της ουσίας στη στερεή επιφάνεια. Η προσρόφηση αφορά την προσκόλληση/κατακράτηση της ουσίας που θα προσροφηθεί στο προσροφητικό μέσο σε μια διαθέσιμη θέση προσρόφησης.

Μπορεί να λάβει χώρα πάνω στην εξωτερική επιφάνεια του προσροφητικού μέσου, στους μακροπόρους, μεσοπόρους, μικροπόρους, αλλά η ειδική επιφάνεια των μακρο και μεσοπόρων είναι μικρή, συγκρινόμενη με την ειδική επιφάνεια των μικροπόρων, και το ποσοστό του υλικού που προσροφάτε σε αυτούς τους πόρους συνήθως θεωρείται αμελητέο (Κλάδου-Χαρίσης 2012)[63].

1.1.3. Βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων στην ριζόσφαιρα των φυτών

Σημαντικό ρόλο στην βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος παίζει και η παρουσία της ριζόσφαιρας. Η ριζόσφαιρα αποτελεί την περιοχή γύρω από το ριζικό σύστημα των φυτών στην οποία υπάρχει έντονη μικροβιακή δραστηριότητα. που μέσω της μεταβολικής τους δραστηριότητας οι μικροοργανισμοί συμβάλλουν στις διαδικασίες αποδόμησης της οργανικής ουσίας (Walton et al, 1994)[59]. Οι ρίζες των φυτών εκκρίνουν μια σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, λιπαρά οξέα, στερόλες, πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια, κετόνες, ένζυμα κ.α. Οι εκκρίσεις των ριζών παρέχουν ικανή ποσότητα άνθρακα που ενισχύει τη δράση ενός μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών. Λόγω αυτών των εκκριμάτων, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών και η δράση τους είναι αυξημένη στην περιοχή της ριζόσφαιρας σε σχέση με τον κύριο όγκο του εδάφους. Ο αυξημένος πληθυσμός και η δράση των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα είναι δυνατόν να προκαλέσουν αυξημένη βιοαποδόμηση στο έδαφος, ενώ η αποδόμηση των ριζικών εκκριμάτων υποβοηθά το μεταβολισμό των ρύπων στην ριζόσφαιρα. Ο μικροβιακός πληθυσμός της ριζόσφαιρας διαφέρει από εκείνον που βρίσκετε μακριά από αυτήν. Έχουμε διαφορές τόσο στο είδος των μικροοργανισμών όσο και στην πυκνότητα του πληθυσμού. Έχει βρεθεί ότι η πυκνότητα και η ποιοτική σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού της ριζόσφαιρας ποικίλει ανάλογα με το είδος του φυτού και τις εδαφικές συνθήκες (Walton et al,(1994)-Shann et al,(1997)[59,43]. Η αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα στην ριζόσφαιρα είναι ευνοϊκή για την ανόργανη θρέψη των φυτών καθώς και την προστασία από παρασιτικές ασθένειες, λόγω έντονων ανταγωνιστικών σχέσεων μεταξύ μικροοργανισμών (Balis, 1992)[5].

Η πρόσληψη των ευκίνητων ιόντων από το εδαφικό διάλυμα εξαρτάται κυρίως από τη συνολική ποσότητα των ιόντων στο έδαφος και από την προσροφητική ικανότητα του ριζικού συστήματος (Alloway et al, 1995.Rechaman,2002)[1,38] όπως,

επίσης, και από τη διαπερατότητα και την ευαισθησία των κυτταρικών μεμβρανών του κάθε οργανισμού (Purkayastha,1994)[36].

1.2. Μέθοδοι βελτιστοποίησης της αποτελεσματικότητας των βιοκλινών

1.2.1. Βιολογικός εμπλουτισμός με βακτήρια που διασπούν τα γεωργικά φάρμακα στόχους

Ο βιολογικός εμπλουτισμός είναι μια μέθοδος ή στρατηγική βιοαποκατάστασης ρυπασμένων περιβαλλοντικών υποστρωμάτων και περιλαμβάνει την εισαγωγή στο ρυπασμένο υπόστρωμα εξωγενών μικροοργανισμών οι οποίοι αποδεδειγμένα αποδομούν τους οργανικούς ρύπους στόχους όπως είναι τα γεωργικά φάρμακα. Η εισαγωγή μη ενδογενών πληθυσμών μικροοργανισμών σε ένα περιβάλλον έχει ιδιαίτερη σημασία σε υποστρώματα τα οποία η πυκνότητα των ενδογενών πληθυσμών είναι χαμηλή ή ο πληθυσμός δεν έχει την ικανότητα να μεταβολίσει τις ξενοβιοτικές τοξικές ουσίες. Ο βιολογικός εμπλουτισμός έχει χρησιμοποιηθεί στην περίπτωση των βιοκλινών σε ορισμένες περιπτώσεις. Για παράδειγμα οι (Von Wiren Lehr et al.2001) [54] έδειξαν ότι ο εμβολιασμός βιοκλινών με τον μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* επιτάχυνε την αποδόμηση του isoproturon. Ανάλογες μελέτες από τους Bending et al. [6] έδειξαν ότι εμβολιασμός βιομιγμάτων με τους μύκητες λευκής σήψης *Coriolus versicolor*, *Hypholoma fasciculare* και *Stereum hirsutum* οδήγησε σε ταχύτατη αποδόμηση διαφόρων γεωργικών φαρμάκων. Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι η χρησιμοποίηση στα βιομείγματα υλικών όπως τα εξαντλημένα υποστρώματα μανιταριών που είναι αποικισμένα με καρποφορίες των μυκήτων λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus* αποτελεί μια εν δυνάμει μέθοδο βιοεμπλουτισμού των βιοκλινών για την ταχύτατη βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων.(Karanasios et al 2010a) [26].

Η **βιοενεργοποίηση** είναι μια εναλλακτική μέθοδος βιοαποκατάστασης ρυπασμένων περιβαλλοντικών υποστρωμάτων και περιλαμβάνει την εφαρμογή δράσεων που βελτιστοποιούν τις συνθήκες στο ρυπασμένο υπόστρωμα για την επίτευξη μέγιστης μικροβιακής απόδοσης. Η βελτιστοποίηση αυτή επιτυγχάνεται με προσθήκη θρεπτικών στοιχείων N, P, βελτιστοποίηση του pH, βελτίωση του αερισμού και προσαρμογή της υγρασίας σε βέλτιστα επίπεδα (Νικολάου,2010)[62].

1.2.2. Προσθήκη εδάφους προσαρμοσμένο σε αυξημένους ρυθμούς διάσπασης των γεωργικών φαρμάκων

Εκτός του άμεσου εμπλουτισμού του ρυπασμένου βιομίγματος με ζωντανούς μικροοργανισμούς έχει προταθεί η ενσωμάτωση στο βιομίγμα εδάφους που είναι προσαρμοσμένο στην ταχύτατη βιοαποδόμηση συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων (Sniegowski et al, 2011) [44]. Η εφαρμογή αυτής της στρατηγικής οδήγησε σε ταχύτατη αποδόμηση των metalaxyl και linuron τα οποία δεν ήταν δυνατό να αποδομηθούν στην βιοκλίνη χωρίς την χρήση προσαρμοσμένων εδαφών (Sniegowski et al, 2011a, De Wilde, 2010b) [45, 18]. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει περιορισμούς στην εφαρμογή της καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε περιπτώσεις όπου το πρόβλημα απορρύπανσης εστιάζεται σε συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα που δεν αποδομούνται εντός της βιοκλίνης είτε λόγω περιορισμένης βιοαποδόμησης είτε λόγω της μεγάλης κινητικότητας τους.

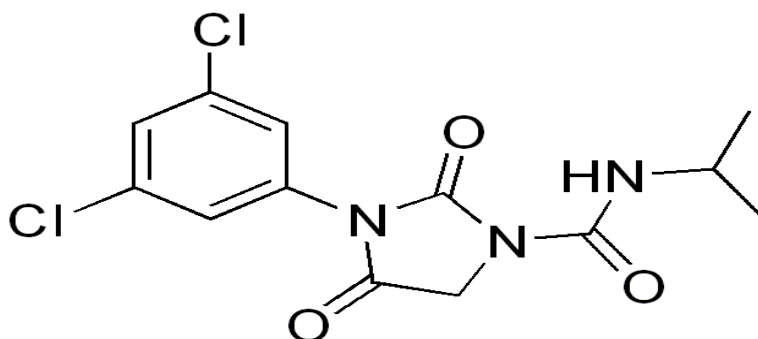
1.3. Iprodione

1.3.1. Χρήσεις και μηχανισμός δράσης

Το **iprodione** [3-(3,5-διχλωροφαινυλο)-N-ισοπροπυλο-2,4-διοξοϊμιδαζολιδινο-1-καρβοξαμίδιο] είναι προστατευτικό δικαρβοξαμίδιο μυκητοκτόνο επαφής με ευρύ φάσμα δράσης που αναστέλλει τη βλάστηση των σπορίων, των μυκήτων και μυκηλιακής ανάπτυξης. Χρησιμοποιείται ευρέως σε σιτηρά, σπυροφόρα, λαχανικά, καλλωπιστικά, και αμπέλια. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό εναντίον μυκήτων όπως οι *Botrytis cinerea*, *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Corticium sp*, *Aspergillus sp*, *Fusarium sp*, *Helminthosporium sp*, *Rhizoctonia sp*. (Grabke et al, 2013, Minambres et al, 2009) [25, 34]. Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί έγκριση χρήσης του iprodione από την ΕΕ και ως νηματοκτόνο για τον έλεγχο του *Meloidogyne sp* σε προστατευόμενες καλλιέργειες (EFSA, 2013 [23]). Το iprodione δρα σε όλες τις φάσεις του κύκλου ανάπτυξης των μυκήτων, όπως η παραγωγή σπορίων. Σε βιοχημικό επίπεδο, πρόσφατα αποτελέσματα έδειξαν ότι το iprodione μπορεί να αναστέλλει πρωτεϊνικές κινάσες που ελέγχουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της ενσωμάτωσης των υδατανθράκων σε συστατικά του κυττάρου.

1.3.2. Τοξικότητα

Το iprodione έχει ταξινομηθεί ως πιθανό καρκινογόνο (USEPA, 1998)[52], και είναι γνωστό για τη μείωση της παραγωγής τεστοστερόνης, και πειράματα έχουν δείξει ότι υπάρχει καθυστέρηση στο αρσενικό εφηβικής ανάπτυξης αρουραίου (Blystone et al., 2007)[7].



Σχήμα 1: Χημική δομή του iprodione

1.3.3. Περιβαλλοντική Τύχη και Συμπεριφορά

Το iprodione δεν προσροφάτε ισχυρά στα εδαφικά κolloειδή με K_{oc} 400 ml g⁻¹ (Strömqvist και Jarvis, 2005)[47], κατά συνέπεια εμφανίζει υψηλή κινητικότητα στο έδαφος με αποτέλεσμα υπολείμματα του να εντοπίζονται συχνά στα στραγγιστικά νερά από αγροτικές περιοχές (Ludvigsen et al, 2004)[30] αλλά και σε επιφανειακά νερά (Sequinatto et al, 2013)[42].

Το iprodione διασπάται πολύ γρήγορα στο νερό κάτω από αερόβιες συνθήκες ενώ βραδύτερη αποδόμηση συνήθως παρατηρείται υπό αναερόβιες συνθήκες. Το iprodione διασπάται εύκολα όταν εκτεθεί σε UV ακτινοβολία. Η ένωση διασπάται γρήγορα στο φυτό μετά τη λήψη από τις ρίζες και μετατοπίζεται. Ο κύριος μεταβολίτης στα φυτά είναι 3,5-διχλωριοανιλίνη. Το iprodione μόνο του ή σε συνδυασμό με διάφορα άλλα μυκητοκτόνα δεν είναι τοξικά για τα φυτά (φυτοτοξικό).

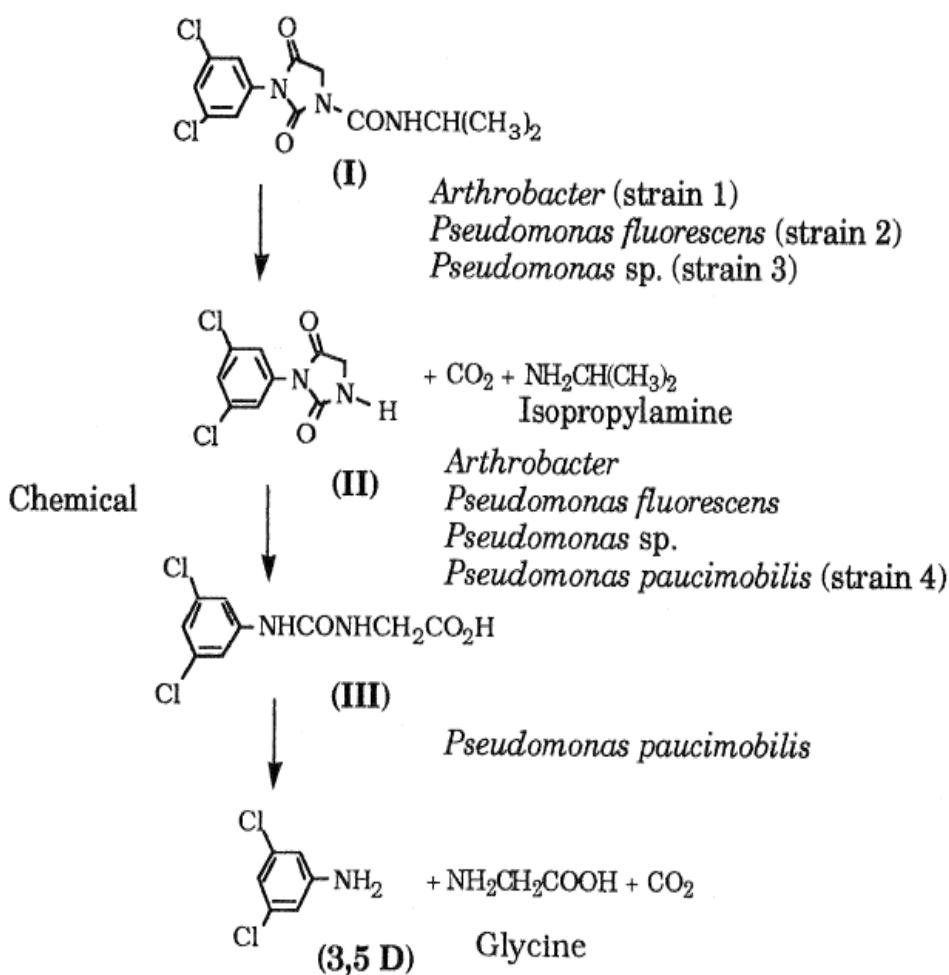
1.3.4. Υπολειμματικότητα, βιοαποδόμηση και μεταβολισμός του iprodione

Το iprodione είναι μετρίως υπολειμματικό στο έδαφος με χρόνους ημιζωής που κυμαίνονται από 7 έως περισσότερο από 100 ημέρες (Walker et al 1984,1986,1987) [55,57,58]. Το pH έχει βρεθεί ότι επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την Υπολειμματικότητα του iprodione με ταχύτερη υδρόλυση του να παρατηρείται σε αλκαλικά εδάφη (Walker,1987a)[56]. Γενικότερα το αλκαλικό pH ευνοεί τόσο την αβιοτική όσο και την βιοτική αποδόμηση του iprodione (Campos et al. 2015)[10] ενώ αντίστροφα παρατηρείται ιδιαίτερα υψηλή υπολειμματικότητα του iprodione σε όξινα υποστρώματα όπως βιομίγματα με βάση την τύρφη όπου καταγράφηκαν χρόνοι ημιζωής > 1 έτος (Karanasios et al. 2010b)[27]. Στο πλαίσιο αυτό ο στοχευμένος βιοεμπλουτισμός τέτοιων όξινων βιομιγμάτων με μικροοργανισμούς που έχουν την εξειδικευμένη ικανότητα να μεταβολίζουν το iprodione ίσως να αποτελεί μια επωφελής στρατηγική για την επιτυχή αποδόμηση μυκητοκτόνων όπως το iprodione που εμφανίζουν υψηλή υπολειμματικότητα στο όξινο pH.

Ένας δεύτερος παράγοντας που καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την υπολειμματικότητα του iprodione στο έδαφος είναι η προηγούμενη επαναλαμβανόμενη χρήση του στο ίδιο έδαφος που οδηγεί στην εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης και απώλειας της μυκητοκτόνου δράσης τους (Entwistle,1986.Martin et al,1990.Mitchel and Cain,1996)[22,32,35]. Περαιτέρω μελέτες στα συγκεκριμένα εδάφη που εμφάνιζαν ταχύτερη βιοαποδόμηση έδειξαν ότι το iprodione μεταβολίζεται ταχύτερα προς 3,5-διχλωροανιλίνη (3,5-DCA) που αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη και άλλων δικαρβοξαμιδικών μυκητοκτόνων (Vanni et al., 2000)[53]. Ο μεταβολίτης αυτός θεωρείται το πιο επίμονο ισομερές της διχλωροανιλίνης στο έδαφος και αποδείχτηκε ότι είναι ισχυρό νεφροτοξικό σε αρουραίους (Lo et al., 1990)[29] και τοξικό για τους μικροοργανισμούς του εδάφους (Rochkind et al., 1986)[39]. Παίρνοντας υπόψη αυτά τα αποτελέσματα η συσσώρευση του iprodione και των υπολειμμάτων του 3,5-DCA σε φυσικούς πόρους θα μπορούσαν να είναι επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία και την ποιότητα του περιβάλλοντος και θα πρέπει να μετριαστεί.

Εδάφη που παρουσιάζουν ενισχυμένη βιοαποικοδόμηση του iprodione έχουν χρησιμοποιηθεί ως πηγή για την απομόνωση βακτηρίων που διασπούν το iprodione (Athiel et al,1995)[2]. Έτσι από ένα τέτοιο έδαφος απομονώθηκε ένα βακτήριο που

ανήκε στο γένος *Arthrobacter* το οποίο έχει την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το iprodione (Athiel et al. 1995)[2]. Μεταγενέστερες μελέτες από την ίδια ομάδα είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση τριών στελεχών του γένους *Pseudomonas* που είναι σε θέση να μεταβολίζουν συνεργιστικά το iprodione αρχικά προς ισοπροπυλαμίνη και 3,5-dichlorophenyl-carboxiamide (μεταβολίτης I) το οποίο στην συνέχεια μετατρέπεται περαιτέρω προς 3,5-dichlorophenylurea acetate (μεταβολίτης II) και τέλος προς παραγωγή 3,5-διχλωροανιλίνη (3,5-DCA) (Mercadier et al., 1997) [33] (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Το μεταβολικό μονοπάτι του iprodione (από Mercadier et al., 1997)

1.4. Στόχος της πτυχιακής εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η αξιολόγηση μεθόδων όπως ο βιοεμπλουτισμός με βακτήρια εξειδικευμένα να αποδομούν το iprodione (*Arthrobacter sp*) καθώς και της παρουσίας ριζόσφαιρας για την βελτιστοποίηση της αποδομητικής ικανότητας του κλασσικού βιομίγματος που χρησιμοποιείται ως πληρωτικό υλικό στις παραδοσιακού τύπου βιοκλίνες. Στο ίδιο πλαίσιο μελετήθηκε παράλληλα η επίδραση των παραπάνω μεταχειρίσεων στην μικροβιακή δραστηριότητα του βιομίγματος.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Βιομίγμα

Για την προετοιμασία του βιομίγματος χρησιμοποιήθηκε επιφανειακό έδαφος Andisol (0-20) που ανήκει στην σειρά Freire (Χιλή), άχυρο σίτου και εμπορική τύρφη. Το έδαφος αεροξηράνθηκε μερικώς και στην συνέχεια κοσκινίστηκε με κόσκινο 3 mm. Το άχυρο ελήφθη από υπολείμματα καλλιεργειών σίτου και τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια (≤ 2 cm). Ακολούθησε ανάμιξη όλων των συστατικών σε ογκομετρική αναλογία έδαφος: άχυρο : τύρφη (25:50:25 v / v). Μετά την ανάμιξη στο βιομίγμα προστέθηκε νερό για την προσαρμογή της υγρασίας στο 60% της υδατοχωρητικότητας. Στην συνέχεια το βιομίγμα τοποθετήθηκε σε πλαστικούς σάκους οι οποίοι έκλιναν αεροστεγώς και τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι 20 ± 2 ° C για 40 μέρες για να γίνει ωρίμανση τους πριν χρησιμοποιηθεί στο πείραμα. Χαρακτηριστικά του βιομίγματος:

pH: 5.5 (1 : 4 σε νερό)

Ηλεκτρική Αγωγιμότητα: 1200 $\mu\text{S cm}^{-1}$

Άζωτο (N): 0.6 $\mu\text{g g}^{-1}$

Bray-Phosphorus (P): 0,178 $\mu\text{g g}^{-1}$ %

Κάλιο ανταλλάξιμο (K) : 3000 $\mu\text{g g}^{-1}$

Νάτριο ανταλλάξιμο (Na): 582 $\mu\text{g g}^{-1}$

Οργανικός Άνθρακα % (OC): 12%

2.2. Βακτήρια

Για τον βιοεμπλουτισμός του βιομίγματος χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Arthrobacter sp* στέλεχος C1 που είχε προηγούμενος απομονωθεί από έδαφος της Χιλής και είχε την ικανότητα να διασπά ταχύτατα το μυκητοκτόνο iprodione με παράλληλη παραγωγή ισοπροπυλαμίνης (Campos et al. 2015)[10]. Το στέλεχος C1 εμβολιάστηκε σε θρεπτικό μέσο LB στο οποίο προστέθηκαν 20 mg L^{-1} iprodione και επώαστηκε υπό ανάδευση στις 160 rpm για 2 μέρες και θερμοκρασία 28 °C. Με την ολοκλήρωση της επώασης το βακτηριακό μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 6000 rpm στους 20 °C για 5 λεπτά και το περιεχόμενο της φιάλης ξεπλύθηκε 3 φορές με αποστειρωμένο

αλατούχο διάλυμα (NaCl 0,85%) και τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιαλυτοποιήθηκαν στο διάλυμα άλατος σε πυκνότητα εμβολίου 8.3×10^7 CFU mL⁻¹ (με βάση την οπτική πυκνότητα OD600).

2.3. Γεωργικά φάρμακα και προϊόντα μεταβολισμού

Αναλυτικά πρότυπα των iprodione και 3,5-διχλωροανιλίνη (3,5-DCA) (97% καθαρότητα, Sigma-Aldrich) χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις αναλυτικές διαδικασίες προσδιορισμού των υπολειμμάτων τους στο βιομίγμα. Τα μεταβολικά προϊόντα dichlorophenyl-carboxiamide (μεταβολίτης I) και 3,5-dichlorophenylurea acetate (μεταβολίτης II) συντέθηκαν χημικά στο Εργαστήριο Γεωργικών Φαρμάκων της Γεωπονικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Athiel et al (1995). Για την πραγματοποίηση του πειράματος το iprodione εφαρμόστηκε στο βιομίγμα ως υδατικό διάλυμα για την παρασκευή του οποίου χρησιμοποιήθηκε εμπορικό σκεύασμα iprodione (ROVRAL AQUAFLOW 50SC) που μας προσφέρθηκε από την εταιρεία BASF HELLAS.

2.4. Περιγραφή του πειράματος

Αρχικά ελήφθησαν 112 πλαστικά φυτοδοχεία διαμέτρου 15x10x10 cm και πληρώθηκαν με 60 g βιομίγματος. Στα μισά εξ αυτών πραγματοποιήθηκε σπορά 100 περίπου σπόρων *Lolium perenne* var ExproAR1 (Phillips et al., 2012)[37] και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με φωτοπερίοδο 16 ώρες ημέρα και θερμοκρασία 20-28° C για 20 ημέρες (Louvel et al., 2011)[31]. Τα υπόλοιπα φυτοδοχεία στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε σπορά φυτού διατηρήθηκαν επίσης στο ίδιο θάλαμο για ομοιομορφία. Το βιομίγμα εντός των φυτοδοχείων διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα υγρασίας με συχνή προσθήκη νερού. Με την ολοκλήρωση της εκβλάστησης των φυτών τα φυτοδοχεία με φυτά και χωρίς φυτά διαχωρίστηκαν εκ νέου σε δύο ομάδες των 28. Στην πρώτη ομάδα φυτοδοχείων με φυτά η χωρίς φυτά προστέθηκαν ομοιόμορφα 6 ml του εμβολίου του βακτηριακού στελέχους *Arthrobacter* sp C1 που αντιστοιχούν σε πυκνότητα εμβολίου 8.3×10^6 cfu g⁻¹ βιομίγματος και αποτέλεσαν τις μεταχειρίσεις B+P+C1 (βιομίγμα + ριζόσφαιρα + βακτήριο C1) και B+C1 (βιομίγμα + βακτήριο C1).

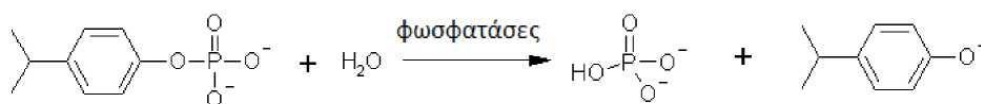
Ακολούθως στην δεύτερη ομάδα φυτοδοχείων με ή χωρίς φυτό προστέθηκε η ίδια ποσότητα (6 ml) διαλύματος χλωριούχου νατρίου χωρίς βακτήρια και αποτέλεσαν τις μεταχειρίσεις B+P (βιομίγμα + ριζόσφαιρα) και B (βιομίγμα) αντίστοιχα. Όλες οι μεταχειρίσεις αφέθηκαν σε ηρεμία για διάστημα 1 ημέρας και στην συνέχεια δέχτηκαν εφαρμογή 6 ml υδατικού διαλύματος iprodione (910 mM) ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση στην ριζόσφαιρα ίση με 90 mM. Αμέσως μετά την εφαρμογή του iprodione τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών και 7, 14, 21, 28, 35 και 49 ημέρες μετά την εφαρμογή 4 φυτοδοχεία από κάθε μεταχείριση απομακρύνονταν ώστε να μετρηθεί η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του iprodione.

Για την λήψη της ριζόσφαιρας από τα δείγματα B + P + C1 και B + P, τα φυτά απομακρύνθηκαν προσεκτικά και ακολούθησε έντονη ανακίνηση τους. Το έδαφος που παρέμεινε προσκολλημένο στις ρίζες θεωρήθηκε ως ριζόσφαιρα και αποθηκεύτηκε για περαιτέρω μετρήσεις. Για τις μεταχειρίσεις B + C1 και B, το περιεχόμενο στις γλάστρες ήταν ομογενοποιημένο, χωρίς ριζικό σύστημα, και χρησιμοποιήθηκε ως είχε. Σε κάθε περίπτωση τα φυτά και τα δείγματα του βιομίγματος χρησιμοποιήθηκαν για άμεση εκχύλιση των οργανικών οξέων και για ενζυμική δραστηριότητα αντίστοιχα. Μεγάλη ποσότητα του βιομίγματος αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -20° C μέχρι την εκχύλιση και ανάλυση του iprodione και μεταβολιτών αυτού.

2.5. Μικροβιολογικές μετρήσεις

2.5.1. Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας όξινων και αλκαλικών φωσφατασών στο έδαφος

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας όξινων και αλκαλικών φωσφατασών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Tabatabai (1994) με κάποιες μικρές τροποποιήσεις. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην προσθήκη στο έδαφος, κατάλληλου υποστρώματος για την δράση των φωσφατασών, (φωσφορική π-νιτροφαινόλη) που οδηγεί στην υδρόλυση του φωσφοεστερικού δεσμού του και στην ελευθέρωση π-νιτροφαινόλης που μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά (Tabatabai, 1994)[49].



φωσφορική π-νιτροφαινόλη

π-νιτροφαινόλη

Σχήμα 3: Η αντίδραση υδρόλυσης της φωσφορικής π-νιτροφαινόλης με την δράση φωσφατασών που οδηγεί στην παραγωγή π-νιτροφαινόλης.

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας των όξινων και αλκαλικών φωσφατασών χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- ✓ Τολουόλιο Pestanal, Riedel-de-Haen
- ✓ MUB (Modified Universal Buffer)

12.1 g THAM (τρις-υδροξυμέθυλ- αμινομεθάνιο)

11.6 g μαλεϊκό οξύ

14 g κιτρικό οξύ

6.3 g βορικό οξύ (H₃BO₃)

Διαλύθηκαν σε 488 ml 1N NaOH και ο όγκος συμπληρώθηκε στο 1L με αποσταγμένο H₂O.

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα MUB pH=6.5

Σε 100 ml MUB προστέθηκε κατάλληλος όγκος διαλύματος HCl 0.1 M, για προσαρμογή του pH στην τιμή 6.5 και ακολούθησε προσθήκη αποσταγμένου νερού για προσαρμογή του διαλύματος στον επιθυμητό όγκο (500 ml).

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα MUB pH=11

Σε 100 ml MUB προστέθηκε κατάλληλος όγκος διαλύματος 0.1 M NaOH για προσαρμογή του pH στην τιμή 11 και ακολούθησε προσθήκη αποσταγμένου νερού για προσαρμογή του διαλύματος στον επιθυμητό όγκο (500 ml).

- ✓ PNP(Διάλυμα φωσφορικής π-νιτροφαινόλης) 0.05 M

Διαλύθηκαν 0.928 g ένυδρου π- νιτροφαινυλο-φωσφορικού νατρίου σε 25ml MUB pH 6.5 για τις όξινες φωσφατάσες και σε 25ml MUB pH 11 για τις αλκαλικές φωσφατάσες και κατόπιν ο όγκος συμπληρώθηκε στα 50 ml με προσθήκη αντίστοιχου pH MUB.

- ✓ CaCl₂ 0,5M

Διαλύθηκαν 36,75g CaCl₂ σε 500 ml αποσταγμένου νερού και συμπλήρωση με αποσταγμένο H₂O μέχρι το 1000ml.

- ✓ NaOH 0.5M

Διαλύθηκαν 10g NaOH σε 500 ml αποσταγμένου νερού και συμπλήρωση με αποσταγμένο H₂O μέχρι το 1000ml.

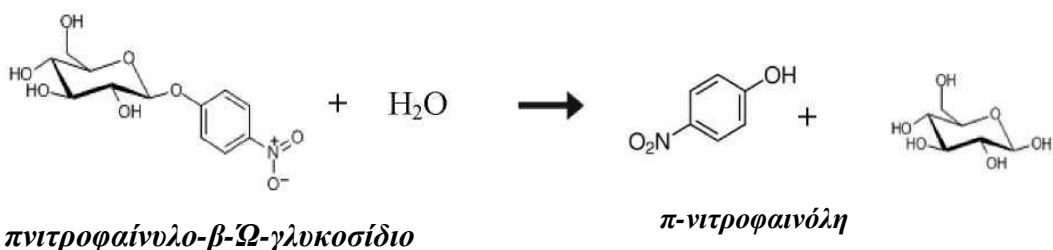
Περιγραφή Διαδικασίας: Σε γυάλινα δοκιμαστικά φιαλίδια των 10ml τοποθετήθηκε 1g εδάφους από κάθε δείγμα και αμέσως μετά προστέθηκαν 0.2ml τολουόλιο για την πλασμολυτική και απολυμαντική του δράση, 4ml MUB (με pH 6.5 για τις όξινες και με pH 11 για τις αλκαλικές φωσφατάσες) ώστε να προσαρμοστεί το pH σε βέλτιστα επίπεδα για τη δράση των όξινων και αλκαλικών φωσφατασών, αντίστοιχα και 1ml διαλύματος φωσφορικής π- νιτροφαινόλης (PNP) που αποτελεί το υπόστρωμα το οποίο μετά την επώαση του με το εδαφικό δείγμα και τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, αποδίδει το φωτομετρικά ανιχνεύσιμο προϊόν της αντίδρασης δηλαδή την π-νιτροφαινόλη. Ακολούθησε σύντομη ανάδευση σε vortex για ανάμιξη των επιμέρους υλικών και κατόπιν τα γυάλινα φιαλίδια, αφού σφραγίστηκαν με parafilm, τοποθετήθηκαν για 1 ώρα στα 200rpm/sec σε σκοτεινό θάλαμο επώασης στους 37°C υπό ανάδευση. Η ανάδευση των δειγμάτων κατά τη επώαση εκτιμάται ότι επηρεάζει τις τιμές της Km (σταθερά Michaelis) και την ομοιογένειά τους μεταξύ των δειγμάτων (Tabatabai and Bremner, 1971)[50], (Eivazi and Tabatabai, 1977)[19]. Μετά το πέρας της μίας ώρας, ακολούθησε προσθήκη 1ml CaCl₂ 0.5M και 4ml NaOH 0.5M με σκοπό i) την αναστολή της δράσης των φωσφατασών, ii) την ανάπτυξη του κίτρινου χρώματος που χαρακτηρίζει την

παραγόμενη νιτροφαινόλη και iii) την ανάκτηση της π-νιτροφαινόλης από τα εδαφικά δείγματα και στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν ελαφρώς. Ακολούθησε διήθηση των εδαφικών διαλυμάτων με χρήση ηθμών Whatman PS, σε πάγο ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο σχηματισμός CaPO_4^- που προκαλεί θολερότητα στο διήθημα. Παράλληλα με τα προς ανάλυση δείγματα, παρασκευαστήκαν δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δείγματα, στα δείγματα του μάρτυρα η ποσότητα 1ml του PNP διαλύματος προστέθηκε αμέσως μετά τα CaCl_2 0.5M και NaOH 0.5M (ακριβώς πριν τη διήθηση). Στο τελευταίο βήμα πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης του εκχυλίσματος που προέκυψε, στα 420 nm, όπου τα δείγματα του μάρτυρα καθορίζουν το μηδέν της απορρόφησης.

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας των όξινων και αλκαλικών φωσφατασών στο έδαφος έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης της πάρα-νιτροφαινόλης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, παρασκευάστηκαν αρχικά πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 1, 2,4,5 και 10,15,20,25 mg/L π-νιτροφαινόλης. Για το σκοπό αυτό, 1 ml από το πρότυπο διάλυμα π-νιτροφαινόλης ($1000 \mu\text{M}$) διαλύθηκε σε 10ml και 100 ml H_2O αντίστοιχα και ακολούθησε ανάδευση. Στη συνέχεια, 0, 1, 2,4,5 και 10,15,20,25 ml από το αραιωμένο πρότυπο διάλυμα μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες όπου προστέθηκε νερό 25,20,15,10, 5, 4, 2, 1 και 0 ml αντίστοιχα, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 5 ml. Τέλος, προστέθηκαν 1ml CaCl_2 0.5M και 4ml NaOH 0.5M και ακολούθησε διήθηση και φωτομέτρηση στα 420nm (Tabatabai, 1994) [49].

2.5.2. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Eivazi and Tabatabai, (1988) με κάποιες μικρές τροποποιήσεις. Οι β-γλυκοσιδάσες καταλύουν την υδρόλυση των β-γλυκοσιδίων. Τα προϊόντα της υδρόλυσης των β-γλυκοσιδίων αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η μέθοδος αυτή είναι βασισμένη στον φωτομετρικό προσδιορισμό της π-νιτροφαινόλης που απελευθερώνεται από τη δράση της β-γλυκοσιδάσης, όταν τα δείγματα εδάφους επωάζονται με κατάλληλο υπόστρωμα όπως το π-νιτροφαινόλη- β -D-γλυκοσίδιο (Eivazi and Tabatabai, 1988) [20].



Σχήμα 4: Η αντίδραση υδρόλυσης του π-νιτροφαίνυλο-β-γλυκοσίδιου από τις β-γλυκοσιδάσες με τελικό προϊόν την παραγωγή π-νιτροφαινόλης.

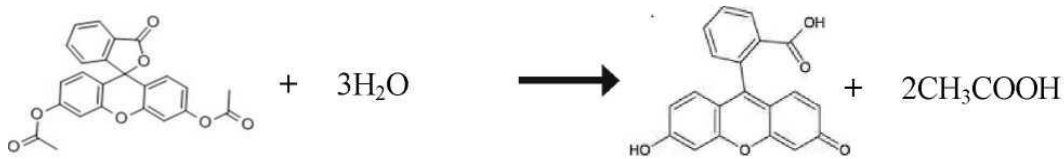
Για τη μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- ✓ Τολουόλιο Pestanal, Riedel-de-Haen
- ✓ PNG (Διάλυμα π-νιτροφαίνυλο-β-Η-γλυκοζιδίου) 0.05M
0.755g PNG διαλύθηκαν σε 50ml MUB pH 6.0 και ο όγκος συμπληρώθηκε με το ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι τα 50ml.
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα THAM 0.1M, pH 12
Διαλύθηκαν 12,2g THAM σε 600ml αποσταγμένου νερού και κατόπιν το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 12 με διάλυμα NaOH 0.5M. Ο όγκος του διαλύματος συμπληρώθηκε στο 1000ml με αποσταγμένο νερό.
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα MUB pH 6.0
Σε 100ml MUB προστέθηκε κατάλληλος όγκος διαλύματος 0.1M HCL για προσαρμογή του pH στην τιμή 11 και ακολούθησε προσθήκη αποσταγμένου νερού για προσαρμογή του διαλύματος στον επιθυμητό όγκο (500 ml).
- ✓ CaCl₂ 0,5M
Διαλύθηκαν 36,75g CaCl₂ σε 500 ml αποσταγμένου νερού και συμπλήρωση με αποσταγμένο H₂O μέχρι το 1000ml.

Περιγραφή Διαδικασίας: Σε γυάλινα φιαλίδια των 50ml τοποθετήθηκε 1g εδάφους από κάθε δείγμα και ακολούθως προστέθηκαν στις κωνικές φιάλες 0.25ml τολουόλιο, 4ml MUB pH 6.0 που σύμφωνα με ευρήματα των Eivazi and Tabatabai (1988) αποτελεί την κατάλληλη τιμή pH για την εκδήλωση της βέλτιστης δραστηριότητας των β-γλυκοσιδασών και 1ml PNG που αποτελεί το υπόστρωμα υδρόλυσης των β-γλυκοσιδασών για την απελευθέρωση της π-νιτροφαινόλης. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναδεύτηκαν σε Vortex και αφού καλύφθηκαν με parafilm τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο επώασης για 1 ώρα στα 200 rpm/sec στους 37°C. Αμέσως μετά στα δείγματα προστέθηκαν 1ml CaCl₂ 0.5M και 4ml THAM buffer 0.1M, pH 12, για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν στην περίπτωση προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας όξινων και αλκαλικών φωσφατασών στο έδαφος (παράγραφος 2.4.1.) και αφού αναδεύτηκαν ελαφρά ακολούθησε διήθηση με ηθμό Whatman PS. Για την προετοιμασία των δειγμάτων του μάρτυρα αναφοράς, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι το διάλυμα PNG προστέθηκε ακριβώς πριν από την διήθηση. Τα δείγματα του μάρτυρα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό του σημείου μηδέν της απορρόφησης, ενώ τα διηθήματα φωτομετρήθηκαν στα 420 nm (Eivazi and Tabatabai, 1988)[20]. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της δραστηριότητας των β- γλυκοσιδασών στο έδαφος, έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης της ουσίας π-νιτροφαινόλης, η οποία παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην περίπτωση των όξινων και αλκαλικών φωσφατασών.

2.5.3.Προσδιορισμός της γενικής υδρολυτικής ενζυμικής δραστηριότητας με την μέθοδο υδρόλυσης της 3,6-διακετυλο-φλουοροσκεΐνης (FDA)

Η μέθοδος FDA χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής υδρολυτικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών του εδάφους. Ειδικότερα, το υπόστρωμα 3,6-διακετυλο-φλουοροσκεΐνη (FDA:3,6- diacetylfluorescein) υδρολύεται μη εξειδικευμένα από έναν αριθμό ενζύμων όπως πρωτεάσες, εστεράσες και λιπάσες. Το φθορίζον προϊόν αυτής της ενζυμικής μετατροπής είναι η φλουοροσκεΐνη (Swisher and Carroll, 1980) [48].



FDA (3,6 — διακετολο-φλουοροσκεΐνη) φλουοροσκεΐνη

Σχήμα 5: Υδρόλυση του υποστρώματος 3,6-διακετυλο-φλουοροσκεΐνη (FDA: 3',6'-diacetylfluorescein) από πρωτεάσες, εστεράσες λιπάσες προς φλουοροσκεΐνη (fluorescein) η ποσότητα της οποίας προσδιορίζεται φωτομετρικά

Η υδρολυτική δραστηριότητα FDA προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται από τους Schnurer και Rosswall, (1982)[41], με ελαφρές τροποποιήσεις. Για τη μέτρηση της υδρολυτικής δραστηριότητας του FDA χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού καλίου, 0,06M, pH 7.6
8.7g K₂HPO₄ και 1.3g KH₂PO₄ διαλύθηκαν σε 1000ml αποσταγμένου νερού. Μόνο σε περίπτωση που αυτό είναι αναγκαίο για να προσαρμοστεί το pH στο 7,6.
- ✓ FDA (Διάλυμα 3,6-διακετυλο-φλουοροσκεΐνης) 1000μg/ml
0.1g FDA διαλύθηκαν σε 100ml ακετόνης για να διατηρούνται υπό ψύξη.
- ✓ Διάλυμα χλωροφόρμο:μεθανόλη (2:1 ο/ο): 666.6 ml χλωροφορμίου τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη και κατόπιν προστέθηκε μεθανόλη μέχρι το 1L.
- ✓ Πυκνό διάλυμα φλουοροσκεΐνης 2000μg/ml
0.2265g άλατος νατρίου της φλουοροσκεΐνης, διαλύθηκαν σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος όξινου φωσφορικού καλίου.
- ✓ Διάλυμα φλουοροσκεΐνης (20 μg L⁻¹)
1ml από το πυκνό διάλυμα (2000 μg/ L) μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη και αραιώθηκε στα 100 ml με ρυθμιστικό διάλυμα.

Περιγραφή Διαδικασίας: Ειδικότερα, ποσότητα 1g εδάφους από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα Falcon των 50 ml και κατόπιν προστέθηκαν 15ml ρυθμιστικού

διαλύματος φωσφορικού καλίου 0.06 M pH 7.6, ώστε να διασφαλιστεί η βέλτιστη δραστικότητα των ενζύμων που υδρολύουν την FDA (Schnurer and Rosswall, 1982)[41]. Ακολούθησε προσθήκη 0.2ml διαλύματος αναφοράς FDA (2 mg mL^{-1}) ως υπόστρωμα για τα διάφορα μικροβιακά ένζυμα που θα οδηγήσουν στη μετατροπή της στη φωτομετρικά προσδιορίσιμη φλουοροσκεΐνη, έντονη ανακίνηση με το χέρι και στην συνέχεια ανάδευση σε αναδευτήρα στα 100rpm/sec για 20 λεπτά στους 30°C με σκοπό την ομογενοποίηση των δειγμάτων και την ελευθέρωση ενζύμων που μπορεί να είναι δεσμευμένα σε συσσωματώματα του εδάφους (Breeuwer et al., 1995)[8], (Soderstrom, 1976)[46]. Αμέσως μετά, προστέθηκαν στα επιμέρους δείγματα 15ml διαλύματος χλωροφορμίου:μεθανόλης (2:1,ο/ο) προκειμένου να επέλθει τερματισμός της υδρόλυσης. Το χλωροφόρμιο βοηθάει στην εκχύλιση της φλουοροσκεΐνης από τις κυτταρικές μεμβράνες, καθώς η μη πολική φύση του FDA εξασφαλίζει την είσοδο του στα κύτταρα αλλά το πολικό προϊόν υδρόλυσης (φλουοροσκεΐνη) που σχηματίζεται, απεκκρίνεται μόνο όταν το όριο της χωρητικότητας των κυττάρων έχει ξεπεραστεί (Rotman and Papermaster, 1966)[40]. Η μεθανόλη βοηθάει την αλληλεπίδραση του χλωροφορμίου με το έδαφος και τον τερματισμό της αντίδρασης.

Στη συνέχεια, τα δείγματα διηθήθηκαν σε ηθμό Whatman PS και το κάθε διήθημα μεταφέρθηκε σε σωλήνες Falcon και ακολούθησε ο διαχωρισμός των δύο φάσεων που σχηματίστηκαν. Η φλουοροσκεΐνη που παράχθηκε με το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, κινήθηκε προς την πιο πολική άνω φάση του διαλύματος που αποτελεί μίγμα όξινου φωσφορικού καλίου και μεθανόλης, το οποίο και συλλέχθηκε με σιφώνιο και πιπέτα Pasteur και μεταφέρθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα για την μέτρηση της απορρόφησης στα 490 nm. Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον καθορισμό του σημείου μηδέν της απορρόφησης.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της παραγόμενης φλουοροσκεΐνης στα υπό μελέτη εδαφικά δείγματα κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν διαλύματα φλουοροσκεΐνης με συγκεντρώσεις από 0 ως 7,5 $\mu\text{g/L}$. Από το διάλυμα φλουοροσκεΐνης συγκέντρωσης 20 $\mu\text{g/L}$, με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 και 7.5 $\mu\text{g/L}$ φλουοροσκεΐνης και η απορρόφηση τους προσδιορίστηκε στα 490 nm.

2.6. Αναλυτικές Μέθοδοι

Για την εκχύλιση του iprodione και των μεταβολιτών του στο βιομίγμα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- ✓ Ακετονιτρίλιο (ACN)
- ✓ H₂O
- ✓ Κωνικές φιάλες των 100 ml
- ✓ Γυάλινα δοκιμαστικά μπουκαλάκια
- ✓ Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας

Τα iprodione, μεταβολίτης I, II και το 3,5 DCA εκχυλίστηκαν από το έδαφος, ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Wang et al., (2004) [60], με ελαφρές τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα 5 g εδάφους ζυγίστηκε με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας και τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 100 ml. Στην συνέχεια προστέθηκαν 10 ml ακετονιτρίλιο και αφού κλείστηκαν με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή εξάτμισης του τελευταίου, τοποθετήθηκαν στη συσκευή ανάδευσης και ανακινήθηκαν στις 200 rpm για 1 ώρα στους 25° C. Εν συνεχεία, το εκχύλισμα μοιράστηκε σε δοκιμαστικά φιαλίδια teflon που τοποθετήθηκαν σε ψυχομένη φυγόκεντρο (Eppendorf-Centrifuge 5804 R), ρυθμίζοντας την θερμοκρασία στους 15° C στις 10000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω μεμβράνης από PTFE πόρου διαμέτρου 0.22 και αναλύθηκαν απευθείας σε σύστημα HPLC.

Ο διαχωρισμός των iprodione και 3,5-DCA, πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Marathon III HPLC-UV εξοπλισμένο με στήλη Grace Smart RP C18 (150mm x 4.6 mm; Grace, USA) με κινητή φάση ακετονιτριλίου - νερού (70-30 v / v) όπως περιγράφεται από Carlucci et al, (2005) [11]. Για τους μεταβολίτες I και II, χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση ακετονιτριλίου:νερού του οποίου το pH προσαρμόστηκε στο 2,6 με οξικό οξύ (32:68 v / v). Η ροή της κινητής φάσης ήταν σε κάθε περίπτωση 1 ml/min και η ανίχνευση όλων των ουσιών πραγματοποιήθηκε στα 220 nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραπάνω ουσιών πραγματοποιήθηκε με την χρήση εξωτερικής καμπύλης αναφοράς. Σε όλες τις περιπτώσεις οι ανακτήσεις του iprodione και των προϊόντων μεταβολισμού του από το βιομίγμα ήταν υψηλότερες από 70%.

2.7. Στατιστική Ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με παραμετρικό τεστ ANOVA και οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ανιχνεύθηκαν μέσω τεστ Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποδόμηση του iprodione και των μεταβολιτών του στο βιομίγμα

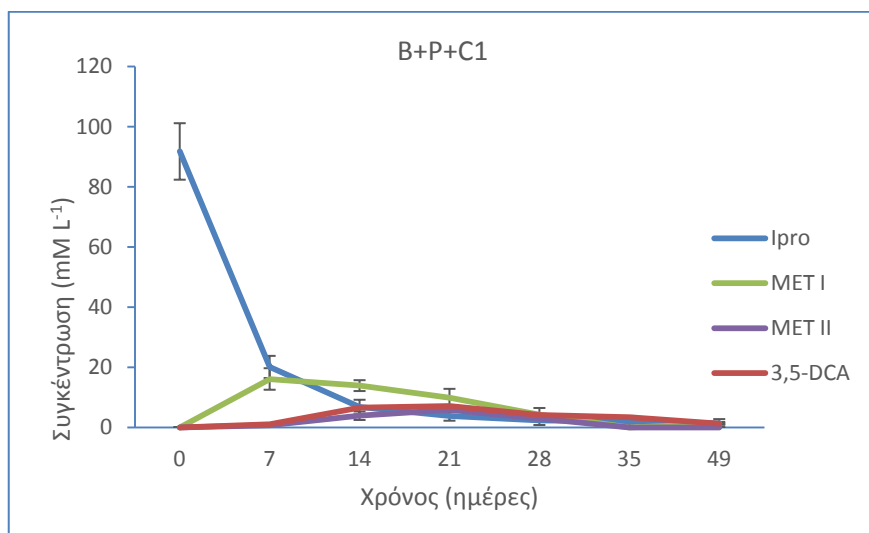
Στα Διαγράμματα 1 ως 4 παρουσιάζεται η αποδόμηση του iprodione και η πορεία σχηματισμού και αποδόμησης των προϊόντων μεταβολισμού του. Σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε μια αρχικά ταχεία φάση αποδόμησης του iprodione που διήρκησε από 7 ως 21 ημέρες και ακολούθησε μια φάση βραδείας αποδόμησης ως την ολοκλήρωση του πειράματος. Η αποδόμηση του iprodione σε όλες τις μεταχειρίσεις οδηγεί στην παραγωγή του μεταβολίτη I ο οποίος στην συνέχεια αποδομείται περαιτέρω με παράλληλη παραγωγή των μεταβολίτη II και 3,5-DCA.

Συνολικά η ταχύτερη αποδόμηση του iprodione παρατηρήθηκε στις μεταχειρίσεις B+P+C1 και B+C1 και ακολούθησε η μεταχείριση B+P με τους βραδύτερους ρυθμούς αποδόμησης να καταγράφονται στην μεταχείριση B, δηλαδή απουσίας τόσο βιοεμπλουτισμού όσο και ριζόσφαιρας.

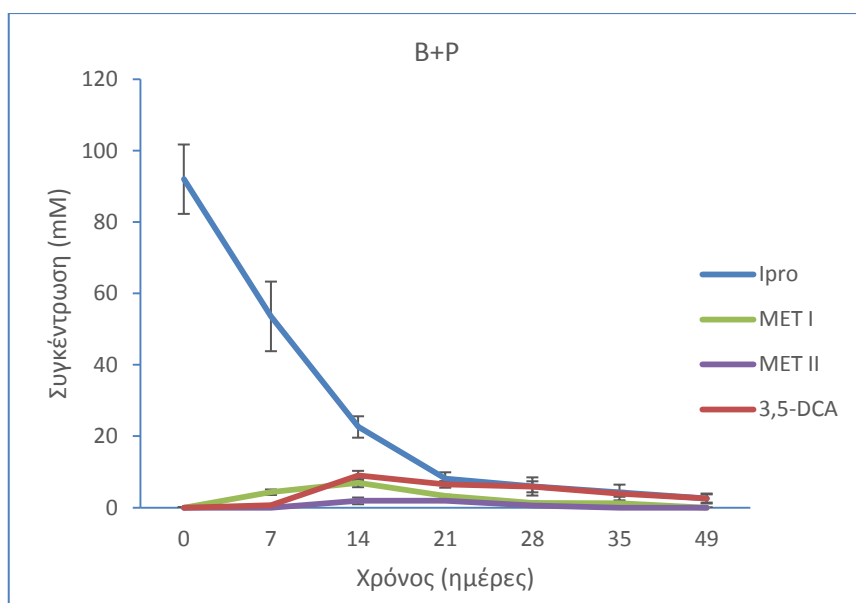
Αναφορικά με τις διάφορες μεταχειρίσεις που μελετήθηκαν, η προσθήκη του βακτηριακού στελέχους *Arthrobacter C1* οδήγησε σε σημαντική επιτάχυνση της αποδόμησης του iprodione που έφτασε σε επίπεδα αποδόμησης 80 και 70% στις μεταχειρίσεις B+P+C1 και B+C1 στις 7 ημέρες (Διαγράμματα 1 και 3) σε σύγκριση με ποσοστά αποδόμησης 50 και 25% που παρατηρήθηκαν στις αντίστοιχες μεταχειρίσεις B+P και B χωρίς την παρουσία του βακτηρίου (Διάγραμμα 2 και 4). Η ταχύτερη αποδόμηση του iprodione στο βιομίγμα που εμβολιάστηκε με το βακτηριακό στέλεχος *Arthrobacter C1* συνοδεύτηκε και από αυξημένη παραγωγή του μεταβολίτη I στις 7 ημέρες που έφτασε και ξεπέρασε τα 20 mM στις δύο μεταχειρίσεις (Διαγράμματα 1 και 3). Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις του μεταβολίτη I στις μη βιοεμπλουτισμένες μεταχειρίσεις δεν ξεπέρασαν τα 10 mM (Διαγράμματα 2 και 4).

Η παρουσία ριζόσφαιρας φαίνεται ότι επηρέασε και αυτή με την σειρά της την ταχύτητα αποδόμησης του iprodione σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με τον βιοεμπλουτισμό. Έτσι ανεξάρτητα από τον βιοεμπλουτισμό του βιομίγματος, η αποδόμηση του iprodione ήταν ελαφρώς ταχύτερη στις μεταχειρίσεις B+P+C1 και B+P (Διαγράμματα 1, 2) σε σχέση με τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις B+C1 και B απουσία φυτού (Διαγράμματα 3, 4). Πιο συγκεκριμένα στις δύο πρώτες μεταχειρίσεις παρουσία

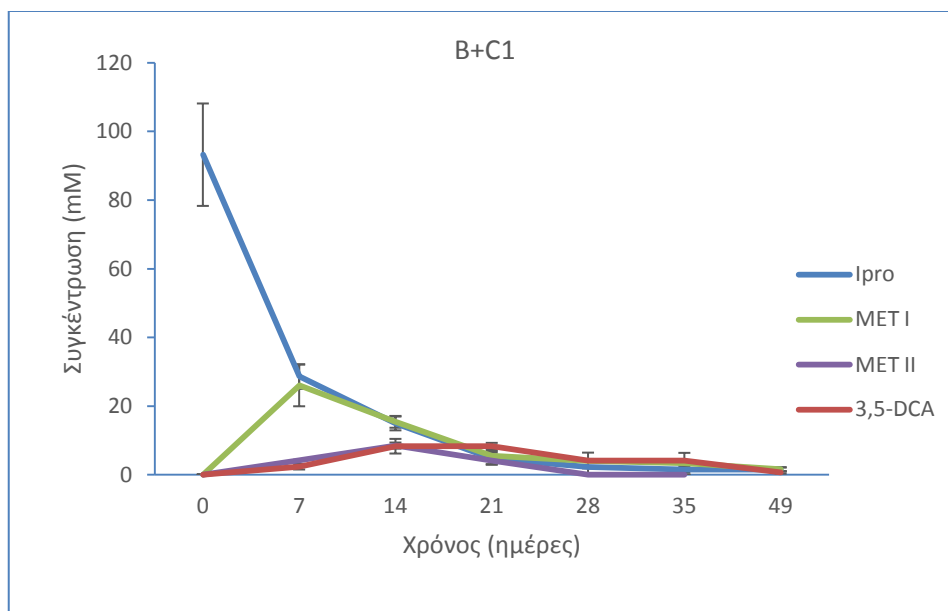
φυτού παρατηρήθηκε αποδόμηση 80 και 50% του iprodione αντίστοιχα στις 7 ημέρες, συγκριτικά με τις δύο άλλες μεταχειρίσεις απουσία φυτού (B+C1, B) όπου τα επίπεδα αποδόμησης στον ίδιο χρόνο ήταν 70 και 25% αντίστοιχα. Περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις θα διαπιστώσουν εάν αυτές οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές.



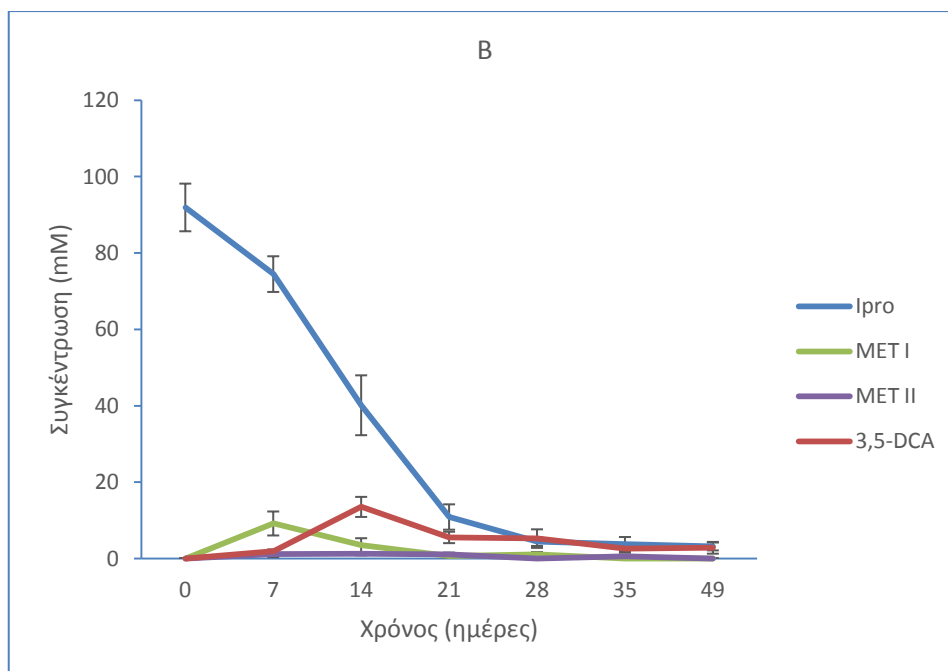
Διάγραμμα 1: Η πορεία της αποδόμησης του μυκητοκτόνου iprodione και του σχηματισμού των μεταβολιτών του σε βιομίγμα παρουσία ριζόσφαιρας και του βακτηρίου *Athrobacter sp* στέλεχος C1.



Διάγραμμα 2: Η πορεία αποδόμησης του μυκητοκτόνου iprodione και σχηματισμού των μεταβολιτών του σε βιομίγμα παρουσία ριζόσφαιρας.



Διάγραμμα 3: Η πορεία αποδόμησης του μυκητοκτόνου iprodione και σχηματισμού των μεταβολιτών του σε βιομύγμα που έχει βιοεμπλουτιστεί με το βακτηριακό στέλεχος *Arthrobacter sp C1*.

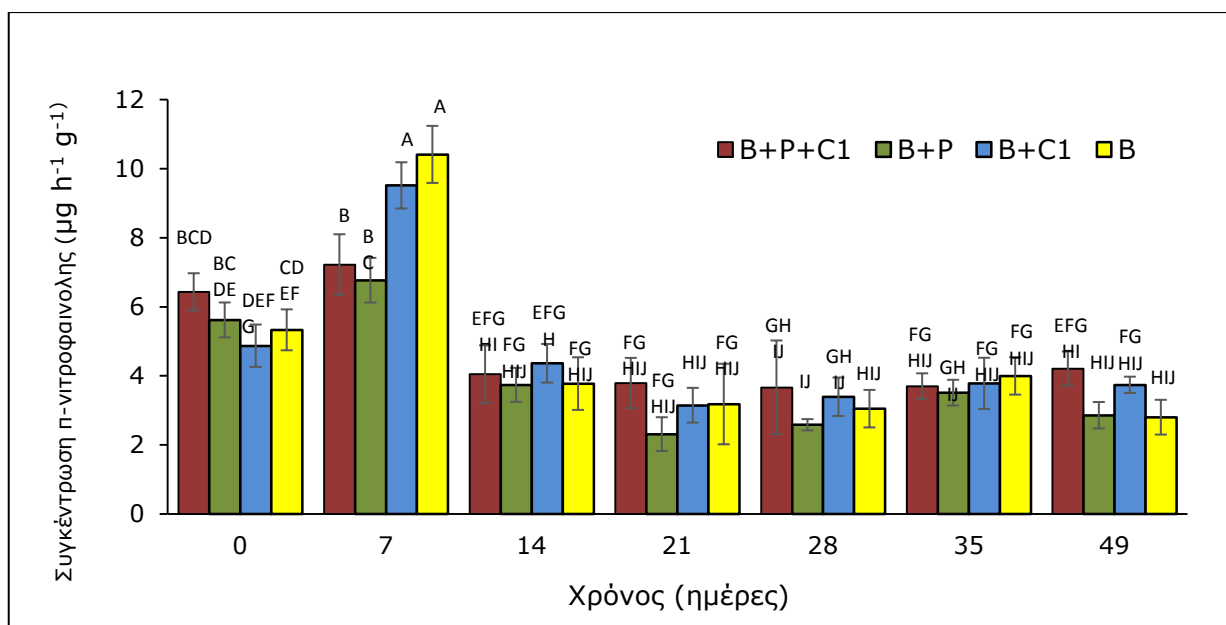


Διάγραμμα 4: Η πορεία αποδόμησης του μυκητοκτόνου iprodione και σχηματισμού των μεταβολιτών του στο βιομύγμα απουσία ριζόσφαιρας και βιοεμπλουτισμού.

3.2. Επιδράσεις στην μικροβιακή δραστηριότητα

3.2.1. Επιδράσεις στην δραστικότητα της β-γλυκοσιδάσης

Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τόσο οι υπό μελέτη μεταχειρίσεις όσο και ο χρόνος ως κύριοι παράγοντες, προκαλούν σημαντικές στατιστικές μεταβολές ($p > 0.05$) στην δραστηριότητα των β-γλυκοσιδασών στο βιομίγμα. Αναφορικά με τον χρόνο, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δραστικότητας της β-γλυκοσιδάσης στις 7 ημέρες, ανεξάρτητα από την μεταχείριση, σε σχέση με τους υπόλοιπους χρόνους δειγματοληψίας (Διάγραμμα 5). Ως αναφορά τις επιμέρους μεταχειρίσεις δεν παρατηρήθηκε κάποιο πρότυπο επίδρασης των διαφόρων μεταχειρίσεων στον χρόνο. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε η σημαντική αύξηση της δραστικότητας της β-γλυκοσιδάσης στις μεταχειρίσεις B+C1 και B, δηλαδή απουσία φυτού και ριζόσφαιρας στις 7 ημέρες σε σχέση με τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις στον ίδιο χρόνο αλλά και σε όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις στις άλλες δειγματοληψίες.

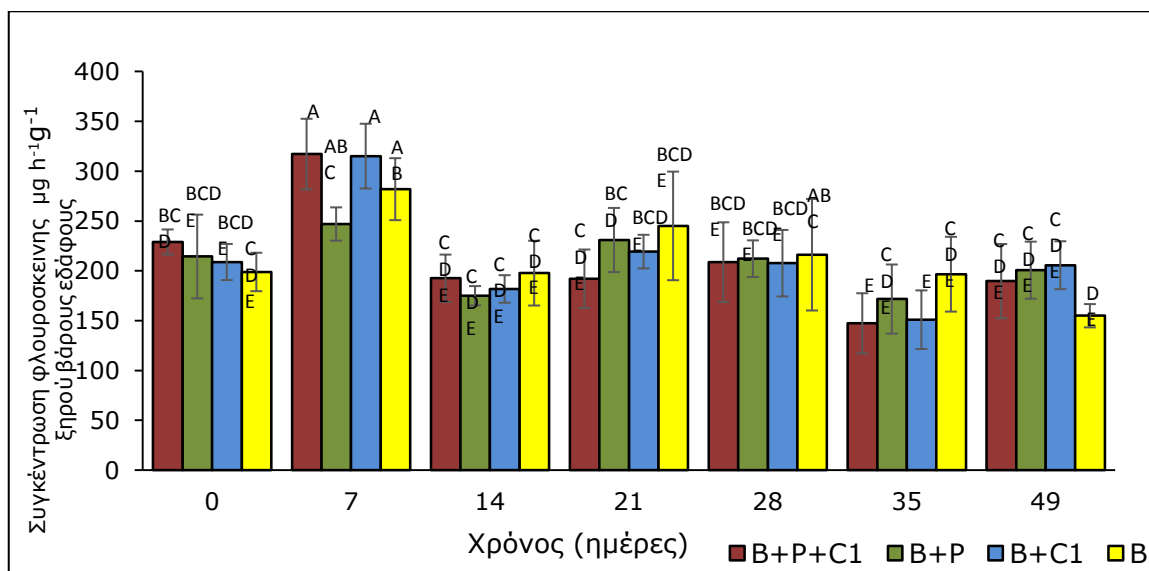


Διάγραμμα 5: Εκτίμηση της επίδρασης της παρουσίας ριζόσφαιρας και/ή του βιοεμπλουτισμού στην δραστικότητα των β- γλυκοσιδασών στο βιομίγμα. Παρουσία των ίδιων γραμμάτων επάνω από κάθε ράβδο καταδεικνύει μη στατιστικά σημαντικές ($p > 0.05$) διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.2.2. Επιδράσεις στην υδρολυτική μικροβιακή δραστηριότητα

Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τόσο οι υπό μελέτη μεταχειρίσεις όσο και ο χρόνος ως κύριοι παράγοντες, προκαλούν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ($p>0.05$) στην υδρολυτική ενζυμική δραστηριότητα των μικροοργανισμών του εδάφους όπως αυτήν εκτιμήθηκε με την μέθοδο FDA.

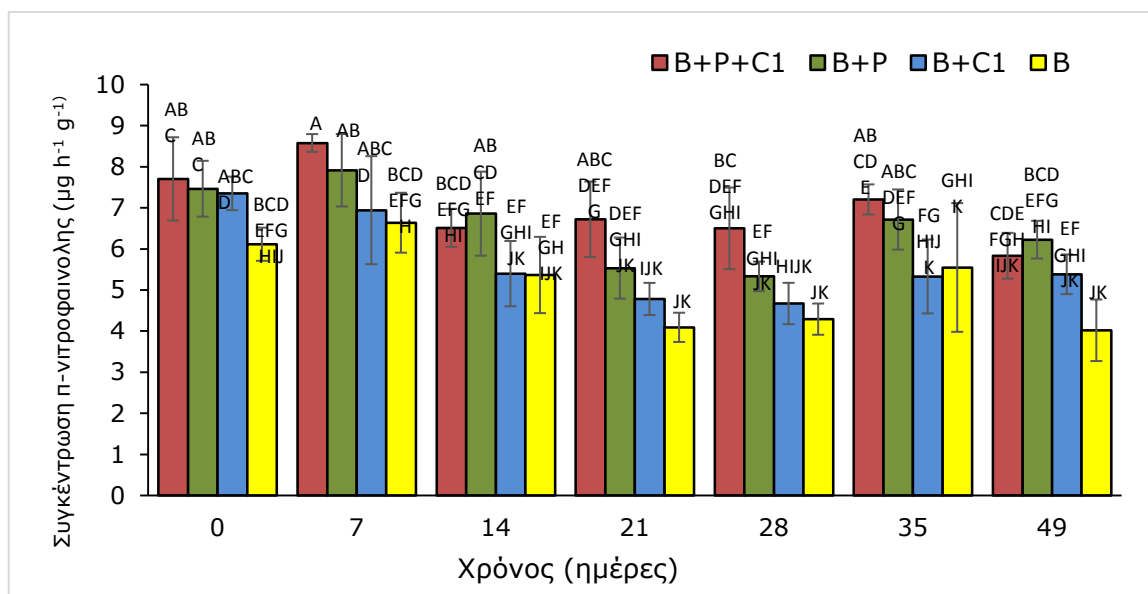
Όπως και για την β -γλυκοσιδάση παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένες τιμές υδρολυτικής δραστηριότητας FDA σε όλες τις μεταχειρίσεις στις 7 ημέρες σε σχέση με τις τιμές των αντίστοιχων μεταχειρίσεων στις άλλες ημέρες δειγματοληψίας (Διάγραμμα 6). Χαρακτηριστικά παρατηρήθηκαν αυξημένες τιμές υδρολυτικής δραστηριότητας στις μεταχειρίσεις B+P+C1 και B+C1 σε σχέση με αντίστοιχες μεταχειρίσεις χωρίς βιοεμπλουτισμό την ημέρα 7. Εκτός των παραπάνω δεν παρατηρήθηκε κάποιο ξεκάθαρο πρότυπο επίδρασης των παραγόντων που μελετήθηκαν στον χρόνο.



Διάγραμμα 6: Εκτίμηση της επίδρασης των διαφόρων μεταχειρίσεων στην ενζυμική δραστηριότητα του εδάφους, όπως αυτή εκφράζεται από τη συγκέντρωση της φλουοροσκεΐνης που ελευθερώνεται στο έδαφος από την υδρόλυση του υποστρώματος FDA. Παρουσία των ίδιων γραμμάτων επάνω από κάθε ράβδο καταδεικνύει μη στατιστικά σημαντικές ($p>0.05$) διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.2.3. Επιδράσεις στην δραστηριότητα της όξινης φωσφατάσης

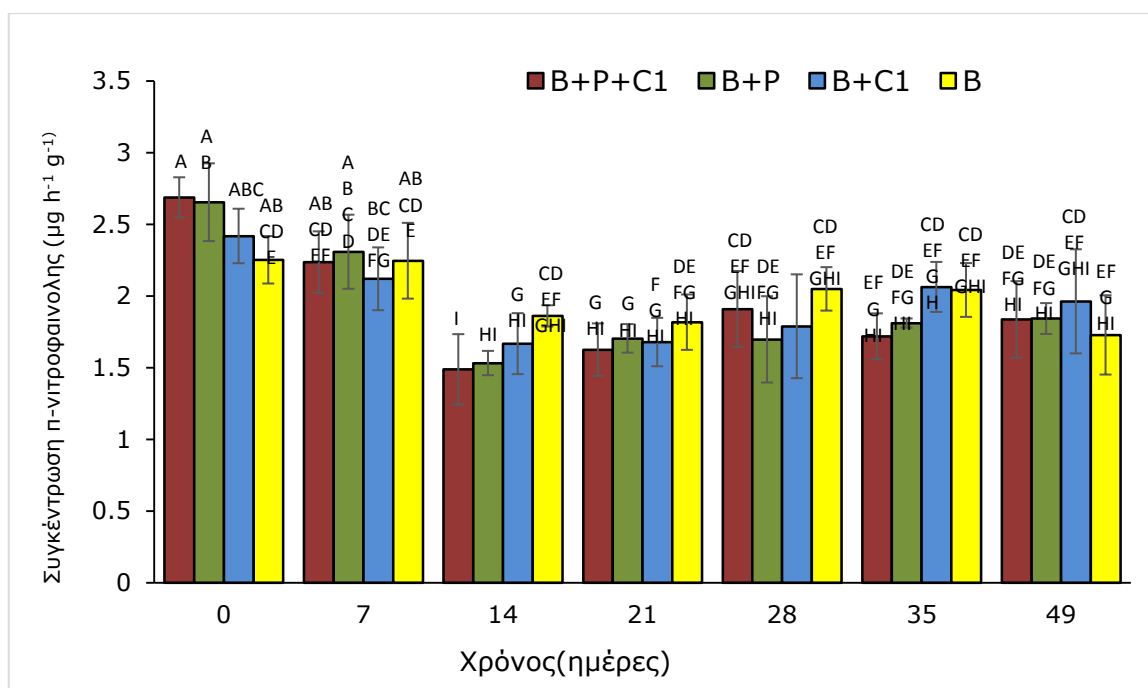
Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τόσο οι υπό μελέτη μεταχειρίσεις όσο και ο χρόνος ως κύριοι παράγοντες, προκαλούν σημαντικές στατιστικές μεταβολές ($p>0.05$) στην δραστηριότητα των όξινων φωσφατασών στο βιομίγμα. Αναλυτικότερα στην μεταχείριση B+P+C1 δηλαδή παρουσία ριζόσφαιρας και βιοεμπλουτισμού παρατηρήθηκαν σημαντική υψηλότερες τιμές ενζυμικής δραστηριότητας των όξινων φωσφατασών σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις σε την διάρκεια του πειράματα χωρίς όμως οι διαφορές αυτές να είναι πάντα στατιστικά σημαντικές. Έτσι σημαντικά υψηλότερη υδρολυτική δραστηριότητα FDA ($p<0.05$) παρατηρήθηκε στην μεταχείριση B+P+C1 σε σχέση με την μεταχείριση B στις 7, 21, 28 και 35 ημέρες και την μεταχείριση B+C1 στις 21 και 35 ημέρες (Διάγραμμα 7), δηλαδή έναντι μεταχειρίσεων απουσία ριζόσφαιρας.



Διάγραμμα 7: Εκτίμηση της επίδρασης των διαφόρων μεταχειρίσεων στην αντίδραση των όξινων φωσφατασών στο βιομίγμα. Παρουσία των ίδιων γραμμάτων επάνω από κάθε ράβδο καταδεικνύει μη στατιστικά σημαντικές ($p>0.05$) διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.2.4. Επιδράσεις στην δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης

Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τόσο οι υπό μελέτη μεταχειρίσεις όσο και ο χρόνος ως κύριοι παράγοντες, προκάλεσαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ($p>0.05$) στην δραστικότητα των αλκαλικών φωσφατασών στο βιομίγμα. Ως αναφορά την επίδραση του χρόνου, ανεξάρτητα από τις επιμέρους μεταχειρίσεις (main effect) παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές δραστικότητας των αλκαλικών φωσφατασών σε όλες τις μεταχειρίσεις στις πρώτες ημέρες μετά την εφαρμογή του iprodione (0 και 7 ημέρες) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στις διάφορες μεταχειρίσεις από τις 14 ημέρες και μέχρι το τέλος του πειράματος. Γενικότερα δεν καταγράφηκε κάποιο ξεκάθαρο και στατιστικά σημαντικό πρότυπο στον χρόνο στις διάφορες μεταχειρίσεις.



Διάγραμμα 8: Εκτίμηση της επίδρασης των διαφόρων μεταχειρίσεων στην δραστικότητα των αλκαλικών φωσφατασών στο βιομίγμα. Παρουσία των ίδιων γραμμάτων επάνω από κάθε ράβδο καταδεικνύει μη στατιστικά σημαντικές ($p>0.05$) διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IPRODIONE

Η αποδόμηση του iprodione στο βιομίγμα που μελετήθηκε ήταν σχετικά γρήγορη με εκτιμούμενες τιμές χρόνου ημιζωής = 18 ημέρες (μεταχείριση B). Προηγούμενες μελέτες σε αντίστοιχα βιομίγματα έδειξαν τιμές DT50 για το iprodione από 6 ως 30 ημέρες με τις υψηλότερες τιμές να παρατηρούνται σε βιομίγματα με όξινο pH (Karanasios et al. (2010a)[26] όπως στην περίπτωση του βιομίγματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Ανάλογες μελέτες από την ίδια ερευνητική ομάδα έδειξαν την ίδια τάση εξάρτησης της εμμόνης του iprodione από το pH του βιομίγματος με τις υψηλότερες τιμές DT50 να καταγράφονται σε βιομίγματα βασιζόμενα στην τύρφη που χαρακτηρίζονται από όξινα pH (Karanasios et al. 2010b)[27].

Ο βιοεμπλουτισμός του βιομίγματος με βακτηριακό στέλεχος που είχε την ικανότητα να αποδομεί το iprodione οδήγησε σε σημαντική επιτάχυνση της αποδόμησης του iprodione κατά την πρώτες 14 ημέρες μετά την εφαρμογή ενώ παράλληλα οδήγησε και σε παράλληλο σχηματισμό υψηλών συγκεντρώσεων του μεταβολίτη I που προκύπτει ως αρχικό προϊόν από την αρχική υδρόλυση του μυκητοκτόνου (Athiel et al. 1995)[2]. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες από τους Campos et al., [10] το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για τον βιοεμπλουτισμό του βιομίγματος έχει την ικανότητα να υδρολύει το iprodione προς μεταβολίτη I με παράλληλη ελευθέρωση ισοπροπυλαμίνης η οποία καταναλώθηκε ταχύτατα από το βακτήριο ως πηγή C και N. Ακολουθώντας σε όλες τις μεταχειρίσεις ο μεταβολίτης I αποδομήθηκε σταδιακά με μικρή παραγωγή του μεταβολίτη II και τους 3,5-DCA. Το παραπάνω μονοπάτι που παρατηρήθηκε στο βιομίγμα σε όλες τις μεταχειρίσεις βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες των Mercadier et al (1996)[33] σε δείγματα εδάφους που εμβολιάστηκαν με ένα αντίστοιχο στέλεχος *Arthrobacter* το οποίο επίσης επιτάχυνε την αποδόμηση του iprodione όπως και στην παρούσα μελέτη.

Εκτός του βιοεμπλουτισμού και η παρουσία ριζόσφαιρας επιτάχυνε περαιτέρω την αποδόμηση του μυκητοκτόνου με την ταχύτερη αποδόμηση του iprodione να καταγράφεται στην μεταχείριση B+P+C1. Προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει την θετική επίδραση της ριζόσφαιρας στην μικροβιακή αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων

(Buyanovsky et al,1995. Korade et al,2009)[9,28]. Οι αυξημένοι ρυθμοί αποδόμησης του iprodione που καταγράφηκαν και στην μεταχείριση B+P σε σχέση με την μεταχείριση B καταδεικνύει ότι εκτός της θετικής επίδρασης της παρουσίας ριζόσφαιρας στο βακτήριο *Arthrobacter C1* που προστέθηκε εξωγενώς στο βιομίγμα, η παρουσία ριζόσφαιρας ευνοεί και την αποδομητική ικανότητα και της μη εξειδικευμένης ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας του βιομίγματος. Η θετική επίδραση της ριζόσφαιρας στην βιοαποδομητική ικανότητα της ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας των βιοκλινών έναντι γεωργικών φαρμάκων όπως το chlorpyrifos και το iprodione έχει δειχθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Diez et al,2015)[17].

4.2. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Εκτός της επίδρασης του βιοεμπλουτισμού και της ριζόσφαιρας στην αποδόμηση του iprodione σε βιομίγμα βιοκλινών μελετήθηκε και η επίδραση των δύο παραπάνω παραγόντων στην μικροβιακή δραστηριότητα όπως αυτή προσδιορίστηκε με μέτρηση της δραστηριότητας βασικών εξοενζύμων που συμμετέχουν σε βασικούς γεωχημικούς κύκλους όπως C (β-γλυκοσιδασών) και P (όξινης και αλκαλικές φωσφατάσες) καθώς και την υδρολυτική δραστηριότητα (FDA).

Γενικότερα δεν παρατηρήθηκαν ξεκάθαρα πρότυπα επιδράσεων των δύο αυτών παραγόντων στην μικροβιακή δραστηριότητα στο βιομίγμα. Μοναδικές εξαιρέσεις αποτέλεσαν α) η σημαντική αύξηση στην δραστηριότητα των β-γλυκοσιδασών στον χρόνο 7 σε όλες τις μεταχειρίσεις που θα μπορούσε να αποδοθεί στην αποδόμηση του βιομίγματος από τις β-γλυκοσιδάσες κατά τις πρώτες ημέρες του πειράματος οπότε και υπάρχουν διαθέσιμοι β-γλυκοσιδικοί δεσμοί προς διάσπαση, β) η αύξηση, παρά το ότι είναι μη στατιστικά σημαντική της υδρολυτικής δραστηριότητας στις μεταχειρίσεις που δέχτηκαν βιοεμπλουτισμός στις 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του iprodione που μπορεί να αποδοθεί εν μέρη στην αυξημένη υδρολυτική δράση του *Arthrobacter* έναντι του μυκητοκτόνου κατά τις πρώτες ημέρες του πειράματος, κάτι που συνάδει και με την ταχύτερη υδρόλυση του μυκητοκτόνου και την παραγωγή του μεταβολίτη I (προϊόν υδρόλυσης) κατά τις πρώτες 7 ημέρες και γ) η αυξημένη δραστηριότητα της όξινης φωσφατάσης καθόλη την διάρκεια του πειράματος στις μεταχειρίσεις παρουσία

ριζόσφαιρας (B+P+C και B+P) που μπορεί να αποδοθεί καταρχήν στο όξινο pH του βιομίγματος και κατά δεύτερο λόγο στην αυξημένη δράση των φωσφατασών στην διαλυτοποίηση οργανικού φωσφόρου που περιέχεται σε ουσίες που εκκρίνουν οι ρίζες στην ριζόσφαιρα (πχ. κιτρικό οξύ).

Συνολικά από την παρούσα πτυχιακή προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Ο βιοεμπλουτισμός με βακτήρια ικανά να αποδομούν το μυκητοκτόνο iprodione αποτελεί αποτελεσματική μέθοδο βελτιστοποίησης της αποδομητικής ικανότητας των βιοκλινών και η αποτελεσματικότητά του μπορεί να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω παρουσία ριζικού συστήματος που ευνοεί περαιτέρω την επιτάχυνση της αποδόμησης του iprodione.
- Το μυκητοκτόνο διασπάστηκε παρουσία ή απουσία του στελέχους *Arthrobacter sp.* και παρουσία ή απουσία ριζόσφαιρας προς παραγωγή του ενδιάμεσου μεταβολικού προϊόντος I το οποίο στην συνέχεια μεταβολίστηκε μερικώς προς τον μεταβολίτη II και προς 3,5-διχλωροανιλίνη.
- Οι μεταχειρίσεις που μελετήθηκαν (βιοεμπλουτισμός και/ή παρουσία φυτού) δεν φαίνεται να επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την μικροβιακή δραστηριότητα στο βιομίγμα παρά το ότι έχουν επίδραση στην αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου.

Ακόλουθες μελέτες έχουν ως στόχο την μελέτη της επίδρασης του μυκητοκτόνου αλλά και των προϊόντων μεταβολισμού του στην μικροβιακή κοινότητα του βιομίγματος.

Βιβλιογραφία

- 1) Alloway, B.J.,(1995) Heavy Metals in Soils. Blackie Academic and rofessional, London, 1995.
- 2) Athiel, P., Mercadier, C., Vega, D., Bastide, J., Davet, P., Brunel, B., Cleyet-Marel, J., (1995). Degradation of iprodione by a soil *Arthrobacter*-like strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3216–20.
- 3) Abraham, W.R., Nogales, B., Golyshin, P.N., Pieper, D.H., Timmis, K.N., (2002). Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 246–53.
- 4) ADAS. Design manual, Pesticide Handling Areas and Biobeds (2006)
- 5) Balis, C. (1992). General Microbiology, Agricultural University of Athens:Greece.
- 6) Bending GD, Friloux M, Walker A (2002) Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiol Lett* 212: 59-63.
- 7) Blystone, C.R., Lambright, C.S., Furr, J., Wilson, V.S., Gray, L.E., (2007). Iprodione delays male rat pubertal development, reduces serum testosterone levels, and decreases ex vivo testicular testosterone production. *Toxicol. Lett.* 174, 74–81. doi:10.1016/j.toxlet.2007.08.010.
- 8) Breeuwer, P., Drocourt, J.L., Bunschoten, N., Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., Abee, T. (1995) Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescein product. *Appl Environ Microb* 61: 1614-1619.
- 9) Buyanovsky et al. (1995) Effects of corn plants and rhizosphere populations on pesticide degradation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55:689-696.
- 10) Campos M., Perruchon C., Karpouzas D.G., Vasileiadis S., Menkissoglu-Spirodi, U., Diez M.C. (2015) Isolation and characterization of bacteria from acidic pristine soil environment able to transform iprodione and 3,5-dichloraniline. *International Biodeterioration and Biodegradation* 104: 201-211.
- 11) Carlucci, G., Pasquale, D. Di, Ruggieri, F., Mazzeo, P., 2005. Determination and validation of a simple high-performance liquid chromatographic method for simultaneous assay of iprodione and vinclozolin in human urine. *J. Chromatogr.* 828, 108–12. doi:10.1016/j.jchromb.2005.08.025.
- 12) Castillo, M. d. P.; von Wire'n-Lehr, S.; Scheunert, I.; Torstensson, L.(2001) Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biol. Fertil. Soils* (2001), 33, 521–528.
- 13) Castillo, M.d.P., Torstensson L., Stenstrom J., (2008). Biobeds for environmental protection from pesticides use – a review. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6206-6219.
- 14) Castillo, M. d. P.; Ander, P.; Stenstroöm, J.(1997) Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations. *Biotechnol. Tech.* 1997, 11, 701–706.
- 15) Castillo, M. d. P.; Ander, P.; Stenstroöm, J.; Torstensson, L. Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by *Phanerochaete*

- chryso sporium in a solid substrate fermentation system. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (2000), 16,289–295.
- 16) Castillo, M. d. P.; Andersson, A.; Ander, P.; Stenstro m, J.;Torstensson, L.(2001) Establishment of the white rot fungus *Phanerochaete chryso sporium* on unsterile straw of solid substrate fermentation systems intended for degradation of pesticides. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 17, 627–633.
 - 17) Diez et al. (2015) Rhizosphere effect on pesticide degradation in biobeds under different hydraulic loads. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15: 410-421.
 - 18) De Wilde T, Spanoghe P, Sniegowski K, Ryckeboer J, Jaeken P, Springael D (2010b) Transport and degradation of metalaxyl and isoproturon in biopurification columns inoculated with pesticide-primed material. *Chemosphere* 78: 56–60.
 - 19) Eivazi, F., Tabatabai, M.A. (1977) Phosphatase in soils. *Soil Biol Biochem* 9: 167-172.
 - 20) Eivazi, F., Tabatabai, M.A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol Biochem* 20: 601-606.
 - 21) El Fantroussi, S., Agathos, S.N., (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 268–75. doi:10.1016/j.mib.2005.04.011.
 - 22) Entwistle, A.R. 1986. Loss of control of *Allium* white rot by fungicides and its implications. *Soil Use and Management* 6: 201–8.
 - 23) European Food Safety Authority, (2013). Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for ethoxyquin according to Article 12 of Regulation (EC). *EFSA J.* 11, 3231. doi:10.2903/j.efsa.2013.3231.
 - 24) Fogg, P., Boxall, A., Walker, A., Jukes, A., 2004. Degradation and leaching potential of pesticides in biobed systems. *Pest Manag. Sci.* 60, 645–54. doi:10.1002/ps.826.
 - 25) Grabke, a, Fernández-Ortuño, D., Amiri, a, Li, X., Peres, N. a, Smith, P., Schnabel, G., (2013). Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. *Phytopathology First*, 396–402. doi:10.1094/PHYTO-06-13-0156-R.
 - 26) Karanasios E, Tsiropoulos NG, Karpouzas DG, Menkissoglu-Spiroudi U (2010a) Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: Evaluation for use in biobed systems. *Chemosphere* 80: 914–921.
 - 27) Karanasios, E., Tsiropoulos, N., Karpouzas, D.G., Ehalotis C., (2010) Degradation and adsorption of pesticides in compost-based biomixtures as potential substrates for biobeds in south Europe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(16): 9147-9156.
 - 28) Korade, D.L., Fulekar, M.H. 2009. Rhizosphere remediation of chlorpyrifos in mycorrhizospheric soil using ryegrass. *J. Hazard. Mater.* 172, 1344-1350.
 - 29) Lo, H., Brown, P., Rankin, G., (1990). Acute nephrotoxicity induced by isomeric dichloroanilines in Fischer 344 rats. *Toxicology* 63, 215–31.
 - 30) Ludvigsen, G. H., Vandsemb, S., & Lode, O. (2004). Pesticider i avrenning fra norske golfbaner. *Vanni*, 2, 2004.

- 31) Louvel, B., Cébron, A., Leyval, C., (2011). Root exudates affect phenanthrene biodegradation, bacterial community and functional gene expression in sand microcosms. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 65, 947–953. doi:10.1016/j.ibiod.2011.07.003.
- 32) Martin, C., Vega, D., Bastide, J., Davet, P. (1990). Enhanced degradation of iprodione in soil after repeated treatments for controlling *Sclerotinia minor*. *Plant and Soil* 127, 104–42.
- 33) Mercadier, C., Vega, D., Bastide, J., (1997). Iprodione degradation by isolated soil microorganisms. *FEMS Microbiology Ecol.* 23, 207–15.
- 34) Miñambres, G., Conles, M., Lucini, E., Verdenelli, R., Meriles, J., Zygadlo, J., (2009). Application of thymol and iprodione to control garlic white rot (*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial communities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 161–70. doi:10.1007/s11274-009-0155-7.
- 35) Mitchel, J.A., Cain, R.B. (1996). Rapid onset of the accelerated biodegradation of dicarboxamide fungicides in a UK soil with a long history of agrochemical exclusion. *Pesticide Science* 48, 1–11.
- 36) Purkayastha, R.P.(1994), A.K. Mitra and B. Bhattacharyya Uptake and toxicological effects of some heavy metals on *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 27: 7-13, 1994.
- 37) Phillips, L. a., Greer, C.W., Farrell, R.E., Germida, J.J., (2012). Plant root exudates impact the hydrocarbon degradation potential of a weathered-hydrocarbon contaminated soil. *Appl. Soil Ecol.* 52, 56–64. doi:10.1016/j.apsoil.2011.10.009.
- 38) Reichman, S.M.,(2002) The responses of plants to metal toxicity. A review focusing on copper, manganese and zinc. Occasional Paper No. 14, Australian Minerals and Energy Environment Foundation, Melbourne,2002.
- 39) Rochkind, M. L., Blackburn, J. W., & Sayler, G. S. (1986). Microbial decomposition of chlorinated aromatic compounds (pp. 2-86). National Technical Information Service.
- 40) Rotman, B., Papermaster, B.W. (1966) Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natn Acad Sci USA* 55:134-141.
- 41) Schnurer, J., Rosswall, T., (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1256–1261.
- 42) Sequinatto, L., Reicher, J.M., Dos Santos, D.R., Reinert, D.J., Copetti, A.C.C. (2013). Occurrence of agrochemicals in surface waters of shallow soils and steep slopes cropped to tobacco. *Química Nova* 36, 768–72.
- 43) Shann, J. R., and Boyle, J. J. (1997). "Influence of plant species on in situ rhizosphere degradation". In *Bioremediation through rhizosphere technology*, T. A. Anderson and J. R. Coats, eds.: ACS Symposium Series), pp. 70-81.
- 44) Sniegowski K, Bers K, Ryckeboer J, Jaeken P, Spanoghe P, Springael (2011) Robust linuron degradation in on-farm biopurification systems exposed to sequential environmental changes. *Appl Environ Microbiol* 77: 6614-6621.
- 45) Sniegowski K, Bers K, Van Goetem K, Ryckeboer J, Jaeken P, Spanoghe P, Springael D (2011a) Improvement of pesticide mineralization in on-farm

- biopurification systems by bioaugmentation with pesticide-primed soil. *FEMS Microbiol Ecol* 76:67-73.
- 46) Söderström, B.E. (1976) Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biol Biochem* 9: 59-63.
 - 47) Strömqvist, J., Jarvis, N., (2005). Sorption, degradation and leaching of the fungicide iprodione in a golf green under Scandinavian conditions: Measurements, modelling and risk assessment. *Pest Manag. Sci.* 61, 1168–1178. doi:10.1002/ps.1101.
 - 48) Swisher, R., Carroll, G.C. (1980) Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microb Ecol* 6: 217-226.
 - 49) Tabatabai, M.A. (1994) Soil enzymes. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S. (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Microbiological and Biochemical Properties. Part 2. SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI*, pp. 775–833.
 - 50) Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. (1971) Michaelis constant of soil enzymes. *Soil Biol Biochem* 3: 317 – 323.
 - 51) Tapia, F., Jerez, J., Moyano, M., 2006. Eficiencia en la remoción de residuos de plaguicidas. *Tierra adentro* 71, 46–49.
 - 52) U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1998. Registration Eligibility Decision (RED) Iprodione. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Online at: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/2335.pdf>.
 - 53) Vanni, A., Gamberini, R., Calabria, A., Pellegrino, V., (2000). Determination of presence of fungicides by their common metabolite, 3,5-DCA, in compost. *Chemosphere* 41, 1–6.
 - 54) von Wirén-Lehr S, Castillo MdP, Torstensson L, Scheunert I (2001) Degradation of isoproturon in biobeds. *Biol Fert Soil* 33: 535–540.
 - 55) Walker, A. Further observations on the enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. *Pestic. Sci.* (1987), 21 (3), 219–223.
 - 56) Walker, A., (1987a). Further observations on the enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. *Pesticide Science* 21, 219–31.
 - 57) Walker, A.; Brown, P.A.; Entwistle, A.R. (1986) Enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. *Pestic. Sci.* 1986, 17 (2), 183–193.
 - 58) Walker, A.; Entwistle, A.R.; Dearnaley, N.Y. (1984) Evidence for enhanced degradation of iprodione in soils treated previously with this fungicide. In *Monograph 27, Soils and Crop Protection Chemicals*; Hance, R.J., Ed.; British Crop Protection Council: Croydon, UK, 1984; 117–123.
 - 59) Walton, B. T., Guthrie, E. A., and Hoylman, A. M. (1994). "Toxicant degradation in the rizosphere". In *Bioremediation through rhizosphere technology*, T. A. Anderson and J. R. Coats, eds.: (ACS Symposium Series), pp. 11-26.
 - 60) Wang, Y.-S., Wen, C.-Y., Chiu, T.-C., Yen, J.-H., (2004). Effect of fungicide iprodione on soil bacterial community. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 127–32. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.01.008.
 - 61) Zadra C, Cardanali G, corte L, Fatichenti F, Marucchini C. (2006) Biodegradation of the Fungicide Iprodione by *Zygosaccharomyces rouxii* Strain DBVPG 6399 *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 4734-4739.

- 62) Νικολάου Γ. Παπαδοπούλου (2010) Διδακτορική Διατριβή Αποικοδόμηση του ζιζανιοκτόνου terbutylazine σε τεχνητούς υγρότοπος και ανάπτυξη μεθόδων ανάλυσης αυτού και των κύριων μεταβολιτών του 18.
- 63) Κλάδου Κ, Χαρίσης Α, (2012) πτυχιακή εργασία. Απομάκρυνση οργανικών ενώσεων από το νερό με προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα και εφαρμογή νέων υλικών με βάση τη χιτίνη για την επεξεργασία υδατικών διαλυμάτων, 22-23.

Πηγές Διαδικτύου

1*) <http://www.healthyliving.gr>

2*) <http://www.biobeds.org>