



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας» «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Απομόνωση και Ταυτοποίηση Βακτηρίων με την Ικανότητα
Αποδόμησης των εντομοκτόνων-νηματοδοκτόνων Fenamiphos και
Oxamyl»**

ΧΑΝΙΚΑ ΕΛΕΝΗ

Λαρίσα 2010

«Απομόνωση και Ταυτοποίηση Βακτηρίων με την Ικανότητα Αποδόμησης των εντομοκτόνων-νηματοδοκτόνων Fenamiphos και Oxamyl»

Υπεύθυνος Καθηγητής

Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής Επιτροπή:

- Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μόσσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Δημήτριο Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την πολύτιμη βοήθεια καθώς και για την ηθική του υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Καραά και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Κωνσταντίνα Ρουσίδου για τις σημαντικές συμβουλές τους στα διάφορα πειραματικά στάδια. Ακόμη, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία καθόλη τη διάρκεια της παραμονής μου σ' αυτό.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, για την πλήρη υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν με τη μέθοδο των επλουτισμένων καλλιεργειών βακτήρια που έχουν την ικανότητα να αποδομούν τα νηματωδοκτόνα oxamyl και fenamiphos από έδαφος από περιοχή της Κρήτης με ιστορικό χρήσης των δύο γεωργικών φαρμάκων. Η απομόνωση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MSM+N όπου τα oxamyl και fenamiphos (10 mg/L) αποτελούν τη μοναδική πηγή C, και σε θρεπτικό μέσο εκχυλίσματος εδάφους (SEM). Τέσσερις αμιγείς και μια αζενική βακτηριακή καλλιέργεια που απομονώθηκαν σε MSMN + oxamyl είχαν την ικανότητα να διασπούν ταχύτατα το νηματωδοκτόνο. Ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rRNA τους έδειξε ότι ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* sp, (*P. putida* και *P. jinjuensis*). Τα παραπάνω βακτήρια είχαν την ικανότητα να υδρολούν το oxamyl προς oxamyl oxime με παράλληλη βακτηριακή αύξηση. Αντίστοιχα απομονώθηκαν και δύο αμιγείς βακτηριακές καλλιέργειες που είχαν την ικανότητα να αποδομούν ταχύτατα το fenamiphos αλλά και τα οξειδωμένα παράγωγα του, fenamiphos sulfoxide και fenamiphos sulfone προς τις αντίστοιχες φαινόλες. Τα δύο βακτήρια που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν ομοίως ως *Acinetobacter rhizosphaerae* και *P. putida*. Το στέλεχος *P. putida* είχε την ικανότητα να διασπά πλήρως και το fenamiphos phenol, χαρακτηριστικό που αναφέρεται για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία. Μοριακή αποτύπωση της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος, καθώς και στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες μέσω της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) έδειξε ότι τα βακτήρια που αποδομούσαν το oxamyl αποτελούσαν μέλη της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους αλλά ενισχύθηκαν περαιτέρω κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού σε αντίθεση με τα βακτήρια που αποδομούσαν το fenamiphos των οποίων η παρουσία φαίνεται να ενισχύεται αποκλειστικά κατά την διάρκεια του εμπλουτισμού. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι και άλλα βακτήρια τα οποία είναι παρόντα στις καλλιέργειες εμπλουτισμού δεν απομονώθηκαν. Η αποτυχία αυτή πιθανότατα οφείλεται σε περιορισμούς της μεθόδου επιλογής των αποδομητικών βακτηρίων ή στην περιορισμένη ικανότητα των βακτηρίων αυτών να αναπτυχθούν γρήγορα και αποτελεσματικά στα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν.

ABSTRACT

An enrichment culture technique was used for the isolation and identification of microorganisms responsible for the enhanced biodegradation of the nematicides oxamyl and fenamiphos in a soil from a banana monoculture area in Crete with an extensive record of treatments with these chemicals. Mineral salts medium supplemented with nitrogen (MSM+N), where oxamyl and fenamiphos (10 mg/L) consisted the sole carbon source and soil extract medium (SEM) were used for the isolation of the degrading bacteria. Four pure and one axenic oxamyl-degrading bacterial cultures were isolated from MSMN + oxamyl. All four pure bacterial cultures showed highest similarity to the 16S rRNA genes of different *Pseudomonas* sp (*P. putida*, *P. jinjuensis*). The isolated bacteria were able to rapidly hydrolyze oxamyl to oxamyl oxime and use it as an energy source for their growth. Accordingly, two fenamiphos-degrading bacteria, one from each media, were isolated and characterized as *Acinetobacter rhizosphaerae* and *P. putida*. These isolates were able to rapidly hydrolyze fenamiphos and oxidation products, fenamiphos sulfoxide and sulfone, into their phenolic derivatives, while *P. putida* was also able to further transform fenamiphos phenol, a characteristic not reported before. DGGE fingerprinting of the bacterial community in the soil and the different successive enrichment cultures indicated that the oxamyl-degrading bacteria were visible members of the soil bacterial community from where they were isolated but where significantly favored during the enrichment procedure. On the other hand, fenamiphos-degrading isolates were not visible members of the soil bacterial community but were isolated as a result of their significant enrichment during the isolation process. Further analysis showed that other bacteria which were also present in the enrichment cultures were not isolated and this was attributed to deficiencies of the isolation method or their inability to grow actively in the media used.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο Πρώτο

| | |
|---|----|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 8 |
| 1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων | 8 |
| 1.2. Χημική δομή οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων | 9 |
| 1.3. Χημική δομή καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων | 10 |
| 1.4. Μηχανισμός δράσης των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων | 10 |
| 1.5. Μηχανισμός δράσης των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων | 10 |
| 1.6. Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων | 11 |
| 1.7. Απομόνωση μικροοργανισμών που αποδομούν γεωργικά φάρμακα | 12 |
| 1.8. Απομόνωση μικροοργανισμών που αποδομούν νηματωδοκτόνα | 13 |
| 1.9. Fenamiphos | 14 |
| 1.10. Απομόνωση μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην αποδόμηση του fenamiphos | 16 |
| 1.11. Oxamyl | 17 |
| 1.12. Απομόνωση μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην αποδόμηση του oxamyl | 18 |
| 1.13. Μοριακή αποτύπωση της μικροβιακής κοινότητας με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) | 18 |
| 1.14. Σκοπός του πειράματος | 19 |

Κεφάλαιο Δεύτερο

| | |
|--|----|
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 20 |
| 2.1. Δείγμα εδάφους | 20 |
| 2.2. Πρότυπες ουσίες και γεωργικά φάρμακα | 20 |
| 2.3. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης | 20 |
| 2.3.1. Παρασκευή θρεπτικού μέσου εκχυλίσματος εδάφους (<i>SEM</i>) | 21 |
| 2.3.2. Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (<i>MSM+N</i>) | 21 |
| 2.3.3. Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου <i>NBA</i> (<i>Nutrient Broth Agar</i>) | 22 |
| 2.3.4. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος <i>LB</i> (<i>Luria Bertani</i>) | 23 |
| 2.4. Μέθοδος ανάλυσης γεωργικών φαρμάκων σε σύστημα HPLC | 23 |

| | |
|---|----|
| 2.4.1. Διαλύτες και γεωργικά φάρμακα | 23 |
| 2.4.2. Καμπύλες αναφοράς | 23 |
| 2.4.3. Προσδιορισμός των fenamiphos, FSO, FSO ₂ , FEN-OH, FSO-OH και FSO ₂ -OH σε σύστημα HPLC | 24 |
| 2.4.4. Προσδιορισμός των oxamyl και oxamyl oxime σε σύστημα HPLC | 24 |
| 2.5. Εκχύλιση νηματωδοκτόνων από τα ενισχυμένα δείγματα εδάφους | 25 |
| 2.6. Εμπλουτισμένες καλλιέργειες για την απομόνωση αποδομητικών βακτηρίων | 25 |
| 2.6.1. Κύκλοι ανακαλλιέργειας στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες | 26 |
| 2.7. Απομόνωση μικροοργανισμών που αποδομούν τα νηματωδοκτόνα fenamiphos και oxamyl από το έδαφος | 27 |
| 2.7.1. Επιλογή αποικιών και έλεγχος της αποδομητικής τους ικανότητας | 28 |
| 2.7.2. Εξαγωγή DNA από τις αμιγείς αποικίες των βακτηρίων | 29 |
| 2.8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) | 30 |
| 2.9. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης | 32 |
| 2.10. Εξαγωγή ζώνης της πηκτής για καθαρισμό PCR προϊόντων (gel extraction) | 33 |
| 2.11. Ένθεση | 34 |
| 2.12. Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα E. Coli | 34 |
| 2.13. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA | 35 |
| 2.14. Εξαγωγή DNA από δείγματα εδάφους | 36 |
| 2.15. Εξαγωγή DNA από τους κύκλους ανακαλλιέργειας των καλλιεργειών | 38 |
| 2.16. PCR εσωτερικής ένθεσης | 40 |
| 2.17. Μέθοδος μοριακής αποτύπωσης της βακτηριακής κοινότητας DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) | 41 |
| 2.18. Δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων | 45 |
| 2.19. Μεταβολισμός των fenamiphos και oxamyl σε υγρές καλλιέργειες και παρακολούθηση της βακτηριακής ανάπτυξης | 47 |
| 2.20. Μεταβολισμός των FSO, FSO ₂ και FEN-OH | 48 |

Κεφάλαιο Τρίτο

| | |
|--|----|
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 50 |
| 3.1. Αποδόμηση των fenamiphos και oxamyl στο έδαφος | 50 |
| 3.2. Αποδόμηση των fenamiphos και oxamyl στις καλλιέργειες εμπλουτισμού | 51 |
| 3.3. Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν τα fenamiphos και oxamyl | 54 |

| | |
|--|----|
| 3.4. Ταυτοποίηση των βακτηρίων που αποδομούν τα fenamiphos και oxamyl | 55 |
| 3.5. PCR με το DNA των εδαφών και των εμπλουτισμένων καλλιεργειών | 57 |
| 3.6. Μοριακή αποτύπωση DGGE της βακτηριακής κοινότητας των εδαφών και των εμπλουτισμένων καλλιεργειών που αποδομούν το fenamiphos | 60 |
| 3.7. Μοριακή αποτύπωση DGGE της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος και στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες που αποδομούν το oxamyl | 64 |
| 3.8. Μεταβολισμός του fenamiphos και βακτηριακή ανάπτυξη | 66 |
| 3.9. Μεταβολισμός των FEN-OH, FSO και FSO ₂ από τα βακτήρια που αποδομούν το fenamiphos | 68 |
| 3.10. Μεταβολισμός του oxamyl και βακτηριακή ανάπτυξη | 73 |

Κεφάλαιο Τέταρτο

| | |
|--|----|
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 77 |
| 4.1. Απομόνωση βακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης του fenamiphos | 77 |
| 4.2. Απομόνωση βακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης του oxamyl | 81 |
| 4.3. Τελικά συμπεράσματα | 83 |
| 4.4. Μελλοντική ερευνητική κατεύθυνση | 84 |

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων

Η υπερβολική χρήση των φυσικών πόρων και η έντονη βιομηχανική δραστηριότητα έχει οδηγήσει στην παραγωγή ξενοβιοτικών ουσιών των οποίων η εκτεταμένη χρήση έχει προκαλέσει προβλήματα ρύπανσης και οικολογικής υποβάθμισης των υδατικών πόρων και των χερσαίων οικοσυστημάτων. Η περιβαλλοντική ρύπανση έχει επιφέρει σοβαρές μεταβολές στη χλωρίδα και πανίδα, καθώς και διατάραξη της ομαλής λειτουργίας των βιογεωχημικών κύκλων (1).

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν σημαντική ομάδα οργανικών ρύπων. Μεταξύ αυτών τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα αποτελούν σημαντικές και παραδοσιακές ομάδες εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται εδώ και 50 περίπου χρόνια. Πρωτοχρησιμοποιήθηκαν ως αντικαταστάτες των λιπόφιλων και ιδιαίτερα υπολειμματικών οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων όπως το DDT (2). Το πρώτο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο, ο πυροφωσφορικός τετρααιθυλαιθέρας, παρασκευάστηκε το 1937 (3). Αργότερα, πολλά άλλα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα παρασκευάστηκαν και έφτασαν στην αγορά, με τα chlorpyrifos και glyphosate (ζιζανιοκτόνο) να καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μερίδιο στην αγορά (4). Γενικά, τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα καταλαμβάνουν το 38% και τα καρβαμιδικά το 19% του συνόλου των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως (5). Μόνο στις Η.Π.Α., περισσότεροι από 40 χιλιάδες τόννοι οργανοφωσφορικών εφαρμόζονται ετησίως (6). Η εκτεταμένη χρήση τους, ειδικά σε αναπτυσσόμενες χώρες όπου οι παραγωγοί δε λαμβάνουν τα κατάλληλα μέτρα προστασίας κατά την εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων, έχει οδηγήσει στην συχνότατη αναφορά δηλητηριάσεων ή θανάτων. Στατιστικά, καταγράφονται ετησίως περίπου 3×10^6 δηλητηριάσεις και 2×10^5 θάνατοι λόγω έκθεσης σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (7).

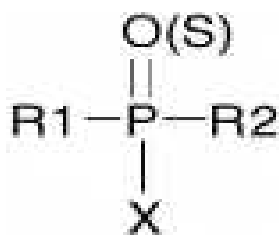
Εκτός των προβλημάτων υγείας που δημιουργεί η χρήση οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων, η συνεχιζόμενη χρήση τους έχει οδηγήσει και σε εκτεταμένη ρύπανση υπόγειων και επιφανειακών υδροφόρων συστημάτων αλλά και χερσαίων οικοσυστημάτων. Οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα όπως τα coumaphos,

diazinon χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο εκτοπαρασίτων στην κτηνοτροφία οδηγώντας στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων ιδιαίτερα επιβαρυνμένων με οργανοφωσφορικά, τα οποία χρίζουν επεξεργασίας πριν την ελευθέρωσή τους στο περιβάλλον. Επιπρόσθετα, λόγω των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα μπορούν να εισχωρήσουν διαμέσω του δέρματος των ζώων και ενδεχομένως να καταλήξουν στο κρέας και στο γάλα (8). Υπολείμματα οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων έχουν ανιχνευθεί σε λαχανικά και φρούτα καθώς και σε μεταποιημένα προϊόντα (9).

Συμπερασματικά, η εκτεταμένη χρήση οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων έχει δημιουργήσει σημαντικά προβλήματα στο περιβάλλον και στην ανθρώπινη υγεία. Έτσι κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων τόσο για την προστασία της υγείας των ανθρώπων αλλά και για την προστασία και αποκατάσταση του περιβάλλοντος από τη ρύπανση με οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα. Η χρήση βιολογικών μεθόδων για περιβαλλοντική εξυγίανση αποτελεί ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο. Έτσι η χρήση μικροοργανισμών ή των ενζύμων που παράγουν στην αποτοξικοποίηση των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων θεωρείται μία θεμιτή και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος απορρύπανσης (1).

1.2. Χημική δομή οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

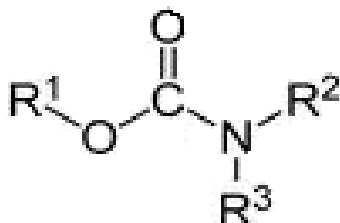
Τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα είναι εστέρες του φωσφορικού, του φωσφονικού ή του φωσφοραμιδικού οξέος (10). Η βασική δομή των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.1 και αποτελείται από ένα άτομο P που περιβάλλεται από τέσσερις υποκαταστάτες. Οι δύο πλευρικές αλυσίδες R1 και R2 μπορεί να είναι αρωματικές ή αλειφατικές ομάδες. Η τέταρτη ομάδα που αναφέρεται ως “X ομάδα” ή “leaving group”, αποτελεί το τμήμα του μορίου που απελευθερώνεται κατά την διάρκεια της υδρόλυσης και συνιστά τη βάση για την ταξινόμηση των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων (11).



Σχήμα 1.1: Χημική δομή οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

1.3. Χημική δομή καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων

Τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα είναι παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος HOC(O)NH_2 . Η γενική δομή των καρβαμιδικών συστατικών φαίνεται στο Σχήμα 1.2. Η ομάδα R^1 είναι συνήθως αλκοόλη, οξίμη, ή φαινόλη και οι ομάδες R^2 και R^3 είναι υδρογόνο ή αλκυλομάδες (12).



Σχήμα 1.2: Χημική δομή των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων

1.4. Μηχανισμός δράσης των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

Ο μηχανισμός δράσης των οργανοφωσφορικών περιλαμβάνει την αναστολή της υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης. Η ακετυλοχολίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση νευρικών ερεθισμάτων στις χολινεργικές συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων. Με την ολοκλήρωση της μετάδοσης τους μηνύματος, η ακετυλοχολίνη πρέπει να υδρολυθεί ώστε να αποφευχθεί η υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος. Η αντίδραση της υδρόλυσης πραγματοποιείται από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE) που οδηγεί στο σχηματισμό χολίνης και ακέτυλο-CoA. Τα οργανοφωσφορικά δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της AChE και κατόπιν η ομάδα X απελευθερώνεται οδηγώντας στην φωσφορυλίωση του ενζύμου. Η αντίδραση της υδρόλυσης της φωσφορυλιωμένης AChE είναι εξαιρετικά αργή κι έχει ως αποτέλεσμα την υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος κι εν τέλει το θάνατο σε έντομα και θηλαστικά (13).

1.5. Μηχανισμός δράσης των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων

Τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα, όπως και τα οργανοφωσφορικά, αναστέλλουν την AChE και προκαλούν χολινεργική υπερδιέγερση. Παρόλα αυτά, τα καρβαμιδικά προκαλούν μερικώς αντιστρεπτή αναστολή του ενζύμου. Έτσι, η αναστολή της AChE από τα καρβαμιδικά διαρκεί μόνο λίγα λεπτά ή ώρες σε αντίθεση με αυτή των οργανοφωσφορικών που μπορεί να διαρκέσει 3-4 μήνες (14).

1.6. Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων

Η τύχη και συμπεριφορά των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον καθορίζεται από μια σειρά παραγόντων που σχετίζονται είτε με το ίδιο γεωργικό φάρμακο και τις φυσικοχημικές του ιδιότητες είτε με το έδαφος και το περιβάλλον (15). Η μικροβιακή αποδόμηση θεωρείται η σημαντικότερη διαδικασία για τις περισσότερες σύγχρονες ομάδες γεωργικών φαρμάκων και ιδιαίτερα για τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα (16), και εμποδίζει τη συσσώρευση τους στο περιβάλλον. Η διαδικασία της βιοαποδόμησης συμβάλλει στη διάσπαση μιας ουσίας σε απλούστερα προϊόντα που δεν αποτελούν στις περισσότερες περιπτώσεις περιβαλλοντικούς ρύπους (17).

Κάτω από ειδικές συνθήκες όμως, η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή των ίδιων γεωργικών φαρμάκων στο ίδιο έδαφος μπορεί να οδηγήσει σε αυξανόμενους ρυθμούς αποδόμησης. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό με την ονομασία επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση. Θεωρείται γενικά ότι προκύπτει από τη σταδιακή μικροβιακή προσαρμογή στο εφαρμοζόμενο γεωργικό φάρμακο και στην ακραία του μορφή οδηγεί συνήθως σε σημαντική μείωση στην αποτελεσματικότητα του γεωργικού φαρμάκου (18). Το φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης έχει παρατηρηθεί για αρκετά οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα συμπεριλαμβανομένων των νηματωδοκτόνων fenamiphos και oxamyl (19).

Στα τέλη της δεκαετίας του 40 αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ότι η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του 2,4-D επιτάχυνε την αποδόμησης του. Έρευνες που έγιναν τις δεκαετίες του 70 και 80 αποκάλυψαν ότι πολλά γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιούνταν παρουσίαζαν ευαισθησία στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης. Επιπλέον έρευνες μέχρι σήμερα έχουν δείξει τη δυναμική φύση του φαινομένου καθώς γεωργικά φάρμακα που παλαιότερα φαινόταν να μην επηρεάζονται από το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης παρουσιάζουν πια ιδιαίτερη ευαισθησία. Παράδειγμα αποτελεί το chlorpyrifos που αν και αποτελούσε τη μοναδική εξαίρεση ανάμεσα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, σύγχρονες μελέτες έχουν δείξει ότι το συγκεκριμένο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο είναι πλέον ευπαθές στην επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση (20).

Η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος, χαρακτηρίζεται συνήθως από μία φάση αρχικής βραδείας αποδόμησης, η οποία παρατηρείται αμέσως μετά την εφαρμογή του στο έδαφος και είναι γνωστή ως φάση υστέρησης (lag phase) και ακολουθείται από τη φάση ταχείας αποδόμησης (21).

Γενικά, κάθε περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει τη μικροβιακή ανάπτυξη όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία, το pH, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών, οι αποδέκτες ηλεκτρονίων, η παρουσία ανταγωνιστών μπορεί να επηρεάσει τη διάρκεια της περιόδου προσαρμογής των μικροοργανισμών. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι τα βακτήρια αποτελούν τους κυρίαρχους παράγοντες της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης σε αντίθεση με τους μύκητες που έχουν περιορισμένο ρόλο στην εμφάνιση του φαινομένου (20, 22).

1.7. Απομόνωση μικροοργανισμών που αποδομούν γεωργικά φάρμακα

Σημαντικός αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί με την απομόνωση μικροοργανισμών υπεύθυνων για τη βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων (23). Η συντριπτική πλειοψηφία των μελετών αυτών έχουν χρησιμοποιήσει τη μέθοδο εμπλουτισμού καλλιεργειών για την απομόνωση αποδομητικών βακτηρίων. Ως πηγές απομόνωσης αποδομητικών βακτηρίων χρησιμοποιούνται συνήθως εδάφη με ιστορικό μεταχειρίσεων με το συγκεκριμένο γεωργικό φάρμακο (17). Για παράδειγμα, η μέθοδος των εμπλουτισμένων καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση βακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου-νηματοδοκτόνου ethoprophos (24). Επίσης, η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση βακτηρίων ικανών για την αποδόμηση του οργανοφωσφορικού νηματοδοκτόνου cadusafos (19), του καρβαμιδικού carbofuran (25), και των ζιζανιοκτόνων atrazine (26), linuron (27) και dichlobenil (28).

Μέχρι σήμερα πολλοί μικροοργανισμοί έχουν απομονωθεί οι οποίοι είναι ικανοί να χρησιμοποιούν γεωργικά φάρμακα ως πηγή ενέργειας. Υπάρχουν μερικά παραδείγματα μυκήτων όπως οι *Trametes hirsutus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete sordida* και *Cyathus bulleri* που είναι ικανοί να αποδομούν το οργανοχλωριωμένο εντομοκτόνο lindane και άλλα γεωργικά φάρμακα (29, 30, 31), αλλά τα περισσότερα στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα βακτήρια εδάφους είναι οι κύριοι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων (23). Αρκετά αμιγή βακτηριακά στελέχη με την ικανότητα να χρησιμοποιούν συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα ως μοναδική πηγή άνθρακα, αζώτου ή φωσφόρου έχουν απομονωθεί. Για παράδειγμα, το βακτήριο *Enterobacter* sp., που απομονώθηκε από έδαφος που εμφάνισε το φαινόμενο της επιταχυνόμενης αποδόμησης, ήταν ικανό να αποδομεί ταχύτατα το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο chlorpyrifos και μάλιστα να χρησιμοποιεί τους μεταβολίτες που προκύπτουν ως πηγή C και P (32, 33). Επίσης, απομονώθηκε βακτήριο του γένους *Pseudomonas* sp., το οποίο ήταν ικανό να υδρολύει το εντομοκτόνο parathion και να χρησιμοποιεί το προϊόν της υδρόλυσης ως μοναδική πηγή C και N (34). Ακόμη,

βακτήριο του γένους *Alcaligenes* sp., που απομονώθηκε από έδαφος ήταν ικανό να αποδομεί το ζιζανιοκτόνο glyphosate χρησιμοποιώντας το ως μοναδική πηγή P (35). Άλλο ένα βακτηριακό στέλεχος του γένους *Varionorax* sp. είχε την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το ζιζανιοκτόνο linuron και να χρησιμοποιήσει το τελευταίο ως μοναδική πηγή C, N και ενέργειας (36). Επίσης, απομονώθηκαν τρία βακτηριακά στελέχη του γένους *Pseudomonas* sp., με την ικανότητα να αποδομούν το καρβαμιδικό εντομοκτόνο carbaryl (37).

Σε πολλές περιπτώσεις η διαδικασία εμπλουτισμού οδήγησε στην απομόνωση αξениκών βακτηριακών καλλιεργειών με ικανότητα αποδόμησης διάφορων γεωργικών φαρμάκων, αλλά τα μεμονωμένα στελέχη τους δεν ήταν ικανά να χρησιμοποιήσουν το γεωργικό φάρμακο ως πηγή ενέργειας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πρώτη βακτηριακή κοινοπραξία που απομονώθηκε που ήταν σε θέση να αποδομεί το νηματωδοκτόνο fenamiphos και αποτελούνταν από έξι διαφορετικά βακτήρια (38). Ακολούθως, απομονώθηκαν άλλες δύο βακτηριακές κοινοπραξίες που αποτελούνταν από πέντε και τέσσερα βακτηριακά στελέχη αντίστοιχα και ήταν υπεύθυνες για την αποδόμηση του fenamiphos, χρησιμοποιώντας το ως μοναδική πηγή C και N (39). Ομοίως, απομονώθηκε μία μικτή βακτηριακή καλλιέργεια με την ικανότητα αποδόμησης του ζιζανιοκτόνου linuron, αλλά δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση ενός αμιγούς στελέχους με την ικανότητα αποδόμησης του εν λόγω ζιζανιοκτόνου (36).

Η απομόνωση μικροοργανισμών που παρουσιάζουν αποδομητικές ικανότητες έναντι γεωργικών φαρμάκων είναι σημαντική για τρεις κύριους λόγους:

- Τη διευκρίνιση του μηχανισμού της εγγενούς διαδικασίας του μικροβιακού μεταβολισμού
- Την κατανόηση των μηχανισμών εξέλιξης των γονιδίων/ενζύμων
- Τη χρήση αυτών των μικροοργανισμών για την αποτοξικοποίηση και την απορρύπανση ρυπασμένων υδάτινων και χερσαίων συστημάτων

1.8. Απομόνωση μικροοργανισμών που αποδομούν νηματωδοκτόνα

Τα νηματωδοκτόνα, παραμένουν ένα πολύ σημαντικό μέσο για τον έλεγχο των νηματώδων στην καλλιέργεια της πατάτας. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη εναλλακτικών γεωργικών φαρμάκων εξίσου αποτελεσματικών αλλά χαμηλότερης τοξικότητας. Η αυξημένη εμπιστοσύνη των παραγωγών στη χρήση νηματωδοκτόνων καθώς και η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή τους έχουν οδηγήσει σε σημαντική μείωση της βιολογικής τους αποτελεσματικότητας. Τα περισσότερα νηματωδοκτόνα που εφαρμόζονται στην

Ελλάδα είναι επιρρεπή στην επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση συμπεριλαμβανομένων των fenamiphos, oxamyl, ethoprophos, aldicarb και cadusafos (40).

Σημαντικός αριθμός μικροοργανισμών είτε σε αμιγείς είτε σε μικτές καλλιέργειες, έχουν απομονωθεί από εδάφη τα οποία παρουσιάζουν το φαινόμενο της επιταχυνόμενης αποδόμησης νηματωδοκτόνων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι Ou και Thomas (1994) απομόνωσαν την πρώτη αξενική καλλιέργεια που είχε την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο fenamiphos. Κανένα όμως από τα βακτήρια που αποτελούσαν την αξενική καλλιέργεια όταν απομονώθηκε σε αμιγή μορφή δεν κατάφερε να αποδομήσει αποτελεσματικά το fenamiphos (38). Σημαντικός αριθμός βακτηρίων ικανών να αποδομούν το καρβαμιδικό εντομοκτόνο-νηματωδοκτόνο carbofuran έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα. Παράδειγμα, αποτελεί το βακτηριακό στέλεχος *Arthrobacter* sp., το οποίο ήταν ικανό να αποδομεί πλήρως το carbofuran χρησιμοποιώντας το ως πηγή C και N μέσα σε 72-120 h. Το συγκεκριμένο βακτήριο ήταν ικανό να υδρολύει επίσης το εντομοκτόνο carbaryl (41). Ένα άλλο βακτηριακό στέλεχος του γένους *Achromobacter* sp., ήταν σε θέση να υδρολύει πλήρως το carbofuran σε διάστημα 42 h, χρησιμοποιώντας το ως μοναδική πηγή N. Το ίδιο βακτήριο μπορούσε να αποδομήσει ταχύτατα και το aldicarb (42). Άλλα βακτήρια που έχουν απομονωθεί από εδάφη που παρουσιάζαν επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση για το carbofuran βρέθηκε να ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Flavobacterium* (43) και *Sphingomonas* sp. (44). Βακτηριακά στελέχη των ειδών *Stenotrophomonas maltophilia* και *Methylosinus* sp. που απομονώθηκαν από έδαφος και ενεργοποιημένη βιομάζα αντίστοιχα ήταν ικανά για την ταχεία αποδόμηση του καρβαμιδικού νηματωδοκτόνου aldicarb (45,46). Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, βρέθηκε ότι δύο βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas putida* (epI και epII) ήταν ικανά να μεταβολίσουν υψηλές συγκεντρώσεις του οργανοφωσφορικού ethoprophos μέσα σε 48 ώρες (24). Τα βακτήρια αυτά, διατήρησαν την αποδομητική τους ικανότητα σε υγρές καλλιέργειες σε μεγάλο εύρος pH και θερμοκρασιών (18). Στη συνέχεια, απομονώθηκαν δύο αμιγείς βακτηριακές καλλιέργειες που ταυτοποιήθηκαν ως *Sphingomonas* και *Flavobacterium* με την ικανότητα να μεταβολίζουν ταχύτατα το οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο cadusafos (19). Τέλος, απομονώθηκε ένα νέο βακτηριακό στέλεχος του γένους *Stenotrophomonas* από δείγματα νερού στην Αίγυπτο, με την ικανότητα να αποδομεί το καρβαμιδικό νηματωδοκτόνο methomyl (47).

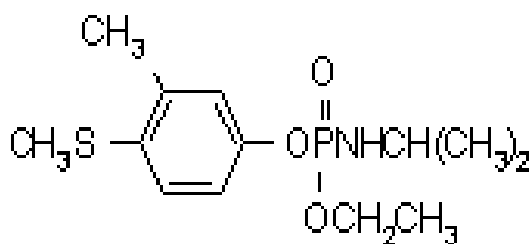
1.9. Fenamiphos

Το fenamiphos (*ethyl 4-methylthio-m-tolyl isopropylphosphoramidate*) είναι ένα οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο που κυκλοφορεί με τα εμπορικά ονόματα Nemacur και Phenamiphos. Είναι διαθέσιμο στην αγορά υπό τη μορφή γαλακτοματοποιήσιμου συμπυκνώματος και κόκκων (48).

Το fenamiphos χρησιμοποιείται εκτεταμένα για τον έλεγχο των κυστωδών (*Globodera* sp.) και ριζόκομβων (*Meloidogyne* sp) νηματωδών στο έδαφος. Η δράση του είναι διασυστηματική και δρα κατά των εκτο- και ενδοπαρασιτικών νηματωδών παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση στους νηματώδεις (49). Εφαρμόζεται σε ποικίλλα στάδια της καλλιέργειας όπως πριν την σπορά, κατά τη διάρκεια της σποράς, στις ήδη εγκατεστημένες καλλιέργειες, αλλά και σε φυτώρια και θερμοκήπια. Για αποτελεσματικό έλεγχο, συνιστάται το fenamiphos να ενσωματώνεται στο έδαφος σε ζώνες κατά μήκος της ριζικής ανάπτυξης, μιας και οι ρίζες είναι αυτές που εκτίθενται στους νηματώδεις (50). Χρησιμοποιείται σε ποικιλία φυτών συμπεριλαμβανομένων του καπνού, της μπανανιάς, του ανανά, των εσπεριδοειδών, κάποιων λαχανικών και σιτηρών (15).

Το fenamiphos παρουσιάζει σχετικά χαμηλή τάση ατμών (0,12 mPa). Η διαλυτότητά του στο νερό είναι 700 mg/L και η οξεία τοξικότητα LD₅₀ διαμέσω της στοματικής οδού σε αρουραίους κυμαίνεται μεταξύ 15,3-19,4 mg/kg. Το μοριακό του βάρος είναι 303,4 και η ADI (Acceptable Daily Intake) είναι 0,005 mg/kg, τιμή που το κατατάσσει στην κατηγορία I τοξικότητας κατά EPA. Το fenamiphos δεν προσροφάται ισχυρά στα εδαφικά κολλοειδή (51), ενώ προηγούμενες μελέτες καταδεικνύουν ότι κάτω από κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να εκπλυθεί στα υπόγεια ύδατα, όπου να παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα (52). Ο χημικός του τύπος δίνεται στο Σχήμα 1.3.

Συνήθως, το fenamiphos στο έδαφος οξειδώνεται ταχύτατα προς fenamiphos sulfoxide (FSO) και αυτό με τη σειρά του οξειδώνεται με πιο βραδύ ρυθμό σε fenamiphos sulphone (FSO₂) (53). Καθώς όμως τα FSO και FSO₂ έχουν νηματωδοκτόνο δράση και τοξικότητα παρόμοια με αυτή του fenamiphos, οι μελέτες αποδόμησης περιλαμβάνουν συνήθως μία εκτίμηση του συνόλου των τοξικών υπολειμμάτων που ονομάζονται συνολικά τοξικά υπολείμματα (TTR, Total Toxic Residues). Ο χρόνος ημιζώης του fenamiphos και των μεταβολιτών του στο έδαφος ποικίλλει από 30 έως 90 ημέρες (49). Το fenamiphos και τα αρχικά προϊόντα οξείδωσής του, μπορούν με τη σειρά τους να υδρολυθούν σταδιακά σε fenamiphos phenol (FEN-OH), fenamiphos sulfoxide phenol (FSO-OH) και fenamiphos sulphone phenol (FSO₂-OH) αντίστοιχα (54) που δεν παρουσιάζουν νηματωδοκτόνο δράση.



Σχήμα 1.3: Χημικός τύπος του fenamiphos

1.10. Απομόνωση μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην αποδόμηση του fenamiphos

Η γνώση σχετικά με τους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στην αποδόμηση του fenamiphos είναι περιορισμένη σε σχέση με άλλα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα (55). Σε εδάφη τα οποία παρουσιάζουν το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης, το fenamiphos φαίνεται να μετατρέπεται αρχικά σε FSO, το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται ταχύτατα στο προϊόν υδρόλυσης FSO-OH (56, 57). Παρόλα αυτά, ένα διαφορετικό μονοπάτι μεταβολισμού παρατηρήθηκε σε έδαφος που συλλέχθηκε από αγρό στην Αυστραλία όπου το fenamiphos υδρολύθηκε αρχικά σε FEN-OH χωρίς προηγούμενο σχηματισμό FSO ή FSO2 (58).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η πρώτη βακτηριακή κοινότητα που είχε την ικανότητα να διασπά το fenamiphos αποτελούνταν από 6 διαφορετικά βακτήρια (38). Κατόπιν, απομονώθηκαν δύο διαφορετικές βακτηριακές κοινότητες από αυστραλιανό έδαφος που αποτελούνταν από πέντε και τέσσερα βακτηριακά στελέχη αντίστοιχα. Και οι δύο αυτές βακτηριακές κοινότητες μπορούσαν να χρησιμοποιούν το fenamiphos ως μοναδική πηγή C και N. Αυτές οι βακτηριακές κοινότητες είχαν την ικανότητα να ανοργανοποιούν το fenamiphos με ενδιάμεση υδρόλυση του μητρικού μορίου. Η μοριακή ταυτοποίηση των επιμέρους μελών έδειξε ότι τα βακτήρια που αποτελούσαν αυτή την κοινοπραξία ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, και *Caulobacter* (58).

Για πρώτη φορά απομονώθηκε μια αμιγής βακτηριακή καλλιέργεια που ταυτοποιήθηκε ως *Brevibacterium* sp. MM1 (54) που είχε την ικανότητα να υδρολύει το fenamiphos στο λιγότερο τοξικό προϊόν FEN-OH χωρίς όμως το ίδιο βακτήριο να έχει την ικανότητα να το μεταβολίσει περαιτέρω. Το συγκεκριμένο βακτήριο υδρολύει επίσης τα FSO και FSO2 στις αντίστοιχες φαινόλες τους. Πολύ πρόσφατα, απομονώθηκε ένα νέο βακτηριακό στέλεχος που ανήκει στο γένος *Microbacterium* με αυξημένη ικανότητα υδρόλυσης του fenamiphos και των προϊόντων οξειδωσής του χωρίς όμως και αυτό να έχει

τη δυνατότητα περαιτέρω αποδόμησης του FEN-OH που προκύπτει από την υδρόλυση του fenamiphos (55).

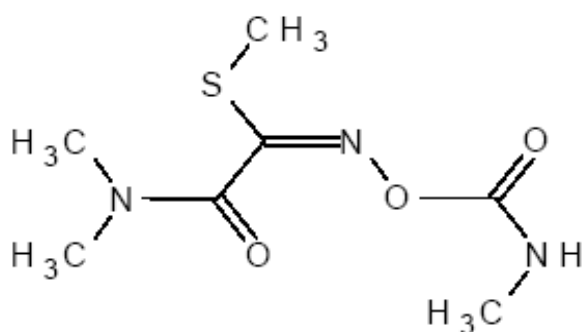
1.11. Oxamyl

Το oxamyl (*N,N*-dimethyl-2-methylcarbamoyloxyimino-2-(methylthio)- acetamide) είναι ένα καρβαμιδικό εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο και νηματωδοκτόνο που κυκλοφορεί με τα εμπορικά ονόματα Blade, Oxamil, Oxamimidic Acid, Pratt, Thioxamil, and Vydate. Στην αγορά είναι διαθέσιμο ως υδατικό διάλυμα και σε μορφή κόκκων (59).

Το oxamyl χρησιμοποιείται για τη καταπολέμηση ενός ευρέως φάσματος εντόμων και νηματωδών και η δράση του μπορεί να είναι διασυστηματική ή και επαφής. Η έκθεση στο oxamyl προκαλεί παρόμοιες επιδράσεις με τα άλλα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα αναστέλλοντας το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση αλλά με αντιστρεπτά αποτελέσματα μικρής διάρκειας. Εφαρμόζεται σε διάφορες καλλιέργειες όπως πατάτας και λαχανοκομικών ειδών στο θερμοκήπιο. Μετά τη σχετικά πρόσφατη απόσυρση των εναλλακτικών νηματωδοκτόνων aldicarb και cadusafos, καθώς και την περιορισμένη χρήση του fenamiphos, το oxamyl αποτελεί πλέον ένα από τα πιο δημοφιλή νηματωδοκτόνα μεταξύ των συνθετικών μη καπνιστικών νηματωδοκτόνων στην Ευρώπη.

Το oxamyl παρουσιάζει μέτρια πτητικότητα (31 mPa). Η διαλυτότητά του στο νερό είναι ιδιαίτερα υψηλή (280 g/L) και η οξεία τοξικότητα LD₅₀ διαμέσω της στοματικής οδού σε αρουραίους είναι υψηλή (5,4 mg/kg). Το μοριακό του βάρος είναι 219,4 και η ADI (Acceptable Daily Intake) είναι 0,03 mg/kg, τιμή που το κατατάσσει στην κατηγορία I τοξικότητας κατά EPA (60). Ο χημικός του τύπος δίνεται στο Σχήμα 1.4.

Το oxamyl παρουσιάζει σχετικά χαμηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος και ο χρόνος ημιζωής του κυμαίνεται από 4-20 ημέρες. Υδρολύεται ταχύτατα σε ουδέτερα και αλκαλικά εδάφη και με πιο αργό ρυθμό σε όξινα (61, 62). Δεν προσροφάται ιδιαίτερα στο έδαφος και είναι πιθανή η έκπλυση του στα υπόγεια ύδατα. Το oxamyl στο έδαφος αποδομείται μέσω υδρόλυσης σε μη τοξικούς μεταβολίτες όπως τα oxamyl oxime και oxamic acid (63).



Σχήμα 1.4: Χημικός τύπος του oxamyl

1.12. Απομόνωση μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην αποδόμηση του oxamyl

Για το νηματοδοκτόνο oxamyl μέχρι στιγμής, υπάρχει μόνο μία βιβλιογραφική αναφορά για την απομόνωση μικροοργανισμών υπεύθυνων για την επιταχυνόμενη αποδόμηση του στο έδαφος. Βακτήρια ικανά να χρησιμοποιούν το oxamyl ως τη μοναδική πηγή άνθρακα απομονώθηκαν από οκτώ διαφορετικά δείγματα γεωργικών εδαφών που είχαν εμφανίσει το φαινόμενο της επιταχυνόμενης αποδόμησης. Η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι 26 από τα 27 απομονωθέντα βακτήρια ανήκουν στο γένος *Aminobacter*, με το πιο κοινό είδος να αποτελεί το *Aminobacter aminovorans*. Το άλλο απομονωθέν βακτήριο ταυτοποιήθηκε ως *Mesorhizobium sp* (64).

1.13. Μοριακή αποτύπωση της μικροβιακής κοινότητας με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Παραδοσιακά, οι μέθοδοι εμπλουτισμού, έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση μικροοργανισμών που εμφανίζουν αποικοδομητική δράση έναντι των γεωργικών φαρμάκων. Οι τεχνικές εμπλουτισμού, έχουν κατακριθεί διότι ευνοούν την απομόνωση βακτηρίων τα οποία αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς στα μέσα ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται χωρίς απαραίτητα να αποτελούν σημαντικούς αποδομητές *in situ* στο έδαφος (65, 66). Έτσι, η πραγματική οικολογική σημασία των μικροοργανισμών που απομονώνονται θα πρέπει να μελετάται παράλληλα. Οι μοριακές τεχνικές που ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται στην περιβαλλοντική μικροβιολογία τα τελευταία 15 έτη, έχουν επιφέρει επανάσταση στη μελέτη της οικολογίας των μικροοργανισμών που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε συνθετικά μέσα και που συνιστούν την πλειοψηφία των μικροοργανισμών εδάφους (67). Μέθοδοι μοριακής αποτύπωσης όπως η μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών ή DGGE (Denaturing Gradient

Gel Electrophoresis), έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με μεθόδους καλλιέργειας για να απεικονίσει τη φυλογένεια αλλά και την οικολογική σημασία των στελεχών που εμφανίζουν αποδομητική δράση (68, 69, 70).

Έτσι λοιπόν, μία από τις πρώτες μεθόδους αποτύπωσης DNA που εφαρμόστηκε με επιτυχία στη μικροβιακή οικολογία ήταν η μέθοδος DGGE (71). Με την συγκεκριμένη μέθοδο μπορούμε να διαχωρίσουμε μικρού μεγέθους θραύσματα dsDNA (εώς 600 bp) που έχουν το ίδιο μέγεθος, αλλά διαφέρουν τουλάχιστον σε ένα νουκλεοτίδιο, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με αυξημένη βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών. Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς αποδιαταγμένου μορίου DNA σε πηκτή σε σύγκριση με τη κινητικότητα της πλήρως δίκλωνης μορφής του. Οι δύο αλυσίδες DNA αποδιατάσσονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, η οποία εξαρτάται από τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (αλληλουχίες πλούσιες σε GC αποδιατάσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες) και από το στίβαγμα μεταξύ των γειτονικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα (base stacking). Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμίδης, η κινητικότητα ενός μορίου επιβραδύνεται όταν μια περιοχή του αποδιαταχθεί. Η ολική αποδιάταξη του μορίου αποτρέπει από τη παρουσία μιας αλληλουχίας πλούσιας σε GC (GC clamp) στο ένα άκρο του. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός εκκινήτη που φέρει στο 5' άκρο ένα GC clamp. Το πρότυπο των ζωνών που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος αντανακλά τη γενετική του ποικιλότητα και ο αριθμός των ζωνών αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυρίαρχων ειδών (72).

Αρχικά το DGGE χρησιμοποιήθηκε για το καθορισμό της γενετικής ποικιλότητας βακτηριακών πληθυσμών (73). Ωστόσο, το DGGE χρησιμοποιείται και για άλλους σκοπούς στη μικροβιακή οικολογία όπως είναι η μελέτη μεταβολών που συμβαίνουν σε μια μικροβιακή κοινότητα εξαιτίας περιβαλλοντικών αλλαγών (74) και η σύγκριση διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης DNA (75).

1.14. Σκοπός του πειράματος

Οι βασικοί στόχοι της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν:

- Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός μικροοργανισμών με την ικανότητα της ταχείας αποδόμησης των νηματοδοκτόνων fenamiphos και oxamyl
- Η διερεύνηση της μεταβολικής οδού των fenamiphos και oxamyl από τα αποδομητικά βακτήρια που απομονώθηκαν
- Η αξιολόγηση του οικολογικού ρόλου των απομονωθέντων βακτηρίων στο έδαφος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Δείγμα εδάφους

Το δείγμα εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μικροοργανισμών συλλέχθηκε από θερμοκήπια μπανανοκαλλιέργειας στο νότιο τμήμα της Κρήτης που είχε δεχθεί επαναλαμβανόμενες μεταχειρίσεις με τα νηματωδοκτόνα fenamiphos και oxamyl. Πιο συγκεκριμένα, ο παραγωγός για τρία συνεχή έτη εφάρμοζε 2-4 L/στρέμμα Nematicur (Fenamiphos) την άνοιξη και 2-4 L/στρέμμα Vydate (Oxamyl) το φθινόπωρο. Τα επόμενα δύο χρόνια ακολούθησε μόνο εφαρμογή 4 L Vydate την άνοιξη και 4 L το φθινόπωρο. Τον τελευταίο χρόνο εφάρμοσε μόνο με 5 L Vydate την άνοιξη και 5 L το φθινόπωρο. Στο συγκεκριμένο έδαφος μπανανοκαλλιέργειας παρατηρήθηκε αυξημένη νηματωδολογική προσβολή παρά την εφαρμογή των νηματωδοκτόνων.

2.2. Πρότυπες ουσίες και γεωργικά φάρμακα

Για την προετοιμασία των θρεπτικών μέσων αλλά και για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των fenamiphos και oxamyl στα θρεπτικά μέσα, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ουσίες fenamiphos (99,6%, Fluka, Switzerland) και oxamyl (98%, Fluka, Switzerland). Για τον προσδιορισμό του μεταβολικού μονοπατιού του fenamiphos χρησιμοποιήθηκαν και πρότυπες ουσίες των fenamiphos sulfoxide (FSO) και fenamiphos sulfone (FSO₂) (99.6%, Fluka, Switzerland). Τα προϊόντα υδρόλυσης των fenamiphos, FSO και FSO₂, δηλαδή τα FEN-OH, FSO-OH και FSO₂-OH προέκυψαν με αλκαλική υδρόλυση των μητρικών μορίων (76). Αντίστοιχα για το oxamyl, αναλυτικό πρότυπο oxamyl oxime (99.9%, DuPont, USA) χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις.

2.3. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Δύο διαφορετικά υγρά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των βακτηρίων. Το πρώτο ήταν θρεπτικό μέσο από εκχύλισμα εδάφους (*SEM Soil Extract Medium*) και το οποίο αποτελεί φυσικό μη εκλεκτικό μέσο. Το δεύτερο ήταν θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (*MSM+N Mineral Salts Medium supplemented with Nitrogen*) το οποίο αποτελεί εκλεκτικό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Για την επιβεβαίωση της αμιγότητας των βακτηριακών καλλιεργειών

χρησιμοποιήθηκε επίσης στερεό θρεπτικό μέσο *NBA* (*Nutrient Broth + Agar*) ως γενικό και μη εκλεκτικό μέσο. Τέλος, για τη διαδικασία του μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο *LB* (*Luria Bertani*). Όλες οι προεργασίες έγιναν ασηπτικά σε θάλαμο νηματικής ροής και ακολούθησε αποστείρωση των διαλυμάτων στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min.

Η προετοιμασία θρεπτικών μέσων που να περιέχουν fenamiphos και oxamyl (10 mg/L) βασίστηκε στην παρασκευή υδατικών διαλυμάτων fenamiphos (200 mg/L) και oxamyl (500 mg/L) σε αποστειρωμένο νερό. Η περαιτέρω αποστείρωση των θερμικά ευαίσθητων υδατικών διαλυμάτων των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε με διήθηση από ειδικά φίλτρα (Acrodisc Syringe Filters, w/0.2μm HT Tuffryn Membrane).

2.3.1. Παρασκευή θρεπτικού μέσου εκχύλισματος εδάφους (SEM)

Για την προετοιμασία 1 L υγρού θρεπτικού μέσου *SEM*, αναμίχθηκαν 500 g εδάφους με 1 L απιονισμένο νερό. Το μίγμα αναδεύτηκε καλά και στη συνέχεια αποστειρώθηκε στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στις 10000 rpm και στους 19°C για 8 min και το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης διηθήθηκε και επαναποστειρώθηκε στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min.

Για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού διαλύματος *SEM* + fenamiphos (10 mg/L), 50 mL από το αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα fenamiphos (200 mg/L) προστέθηκαν σε 950 mL *SEM* υπό ασηπτικές συνθήκες. Με τον ίδιο τρόπο, για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού διαλύματος *SEM* + oxamyl (10 mg/L), 20 mL από το αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα oxamyl (500 mg/L) προστέθηκαν σε 980 mL *SEM*.

Για την προετοιμασία στερεού θρεπτικού υποστρώματος *SEM* + fenamiphos (10 mg/L), 7,5 g άγαρ προστέθηκαν σε 475 mL *SEM* και το διάλυμα αποστειρώθηκε. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 45 °C και όταν έφτασε στην επιθυμητή θερμοκρασία προστέθηκαν ασηπτικά 25 mL από το αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα fenamiphos (200 mg/L). Κατά αντίστοιχο τρόπο, προετοιμάστηκε και το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα *SEM* + oxamyl (10 mg/L), όπου τα 7,5 g άγαρ προστέθηκαν σε 490 mL *SEM*, το διάλυμα αποστειρώθηκε και στη συνέχεια προστέθηκαν ασηπτικά τα 10 mL από το αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα oxamyl (500 mg/L). Τέλος, τα παραπάνω διαλύματα επιστρώθηκαν σε τριβλία petri υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.3.2. Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (MSM+N)

Το θρεπτικό μέσο MSM+N περιείχε εκτός από C, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μακροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N). Αυτό έγινε ώστε τα δύο νηματωδοκτόνα να αποτελούν τη μοναδική πηγή C για τους αναπτυσσόμενους μικροοργανισμούς. Το θρεπτικό αυτό διάλυμα παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα (Stock) ανοργάνων αλάτων, τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες και έδωσαν το τελικό MSM+N (Πίνακας 2.1).

Τα Stock 1 και 2 προετοιμάστηκαν με διάλυση των συστατικών τους σε 1 L απεσταγμένο νερό και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Το Stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση από ειδικά φίλτρα επειδή ο FeSO_4 είναι θερμοευαίσθητος. Για την προετοιμασία 1 L MSM+N, 100 mL από το stock 1 διαλύθηκαν σε 780 mL αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε εκ νέου. Μόλις το διάλυμα έφτασε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκαν ασηπτικά 100 mL stock 2 και 20 mL stock 3.

Πίνακας 2.1: Συστατικά στοιχεία του θρεπτικού μέσου MSM+N

| | Συστατικά | g/L |
|----------------|--|------------|
| Stock 1 | KH_2PO_4 | 22,7 |
| | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 59,7 |
| | NH_4Cl | 10,0 |
| Stock 2 | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 5,0 |
| | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,1 |
| | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,2 |
| Stock 3 | FeSO_4 | 0,25 |

Η προετοιμασία θρεπτικών διαλυμάτων MSM+N + fenamiphos (10 mg/L) ή MSM+N + oxamyl (10 mg/L) καθώς και των αντίστοιχων στερέων θρεπτικών μέσων πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί παραπάνω (ενότητα 2.3.1.) για το SEM.

2.3.3. Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου NBA (*Nutrient Broth Agar*)

Για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού μέσου NBA, 13 g nutrient broth και 15 g άγαρ αραιώθηκαν σε 1 L απεσταγμένο νερό, αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα και στη

συνέχεια αποστειρώθηκαν στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Ακολούθησε η επίστρωση του διαλύματος σε τριβλία petri υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.3.4. Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB (*Luria Bertani*)

Για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού μέσου LB, 10 g NaCl, 10 g καζεΐνης και 5 g yeast extract αραιώθηκαν σε 1 L απεσταγμένο νερό, αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Ακολούθησε η προσθήκη 1000 µL αντιβιοτικού αμικικιλίνης από υδατικό διάλυμα stock (100 mg/mL) υπό ασηπτικές συνθήκες. Για την προετοιμασία στερεού θρεπτικού μέσου LB, απλά προστέθηκαν στο 1 L νερό και 15 g άγαρ (1,5 %) και τέλος ακολούθησε η επίστρωση τριβλίων.

2.4. Μέθοδος ανάλυσης γεωργικών φαρμάκων σε σύστημα HPLC

Για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων στις υγρές καλλιέργειες των βακτηριών χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σύστημα HPLC Marathon III, που ήταν εξοπλισμένο με σύστημα αντλιών βαθμιδωτής έκλουσης, όγκο έγχυσης 20 µL και ανιχνευτή UV, ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό Clarify® για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Ο διαχωρισμός των διαφόρων γεωργικών φαρμάκων και προϊόντων μεταβολισμού τους πραγματοποιήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης (RP) C18, Nucleosil (150 x 4.6 mm, 5 µm id) (Macherey – Nagel GmbH, Germany) με διάφορες κινητές φάσεις που περιγράφονται παρακάτω και ροή 1 mL/min εκτός αν αναφέρεται κάτι διαφορετικό.

2.4.1. Διαλύτες και γεωργικά φάρμακα

Για την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων νηματοδοκτόνων και κινητής φάσης για τη χρωματογραφική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη (MeOH), ακετονιτρίλιο (ACN) και νερό HPLC grade (Merck GmbH, Germany). Για την ανάλυση και τον περαιτέρω πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικά πρότυπα των γεωργικών φαρμάκων αλλά και των μεταβολιτών τους όπως έχουν αναφερθεί παραπάνω.

2.4.2. Καμπύλες αναφοράς

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των fenamiphos και oxamyl, καθώς και των προϊόντων μεταβολισμού τους FSO, FSO₂, FEN-OH, FSO-OH, FSO₂-OH και oxamyl oxime πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον

λόγο αυτό, αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 1000 µg/mL σε μεθανόλη για όλα τα γεωργικά φάρμακα και προϊόντα μεταβολισμού τους που μελετήθηκαν. Ακολούθως, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 10, 5, 2, 1, 0,5 και 0,1 µg/mL με διαδοχικές αραιώσεις σε μεθανόλη για τους μεταβολίτες FSO και FSO₂ και στο διάλυμα της κινητής του φάσης (70 % ACN:30 % H₂O κ.ο.) για το fenamiphos και το oxamyl (20 % ACN:80 % H₂O κ.ο.) και έγινε έγχυση 20 µl από κάθε ένα από τα πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC. Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών τους με την βοήθεια του λογισμικού Clarify®.

2.4.3. Προσδιορισμός των fenamiphos, FSO, FSO₂, FEN-OH, FSO-OH και FSO₂-OH σε σύστημα HPLC

Ο διαχωρισμός του fenamiphos και του FEN-OH έγινε με ισοκρατική έκλυση με κινητή φάση 70 % ACN: 30 % H₂O. Η ανίχνευσή τους πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 254 nm και ο χρόνος κατακράτησης των fenamiphos και FEN-OH ήταν 3,0 και 7,1 min αντίστοιχα. Ο διαχωρισμός των μεταβολιτών FSO, FSO₂ και των αντίστοιχων προϊόντων υδρόλυσης τους FSO-OH και FSO₂-OH πραγματοποιήθηκε με σύστημα βαθμιδωτής έκλυσης όπου οι αντλίες (A) και (B) περιείχαν διαλύματα 100 % H₂O και 100 % Ακετονιτρίλιο αντίστοιχα. Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης ξεκινούσε με κινητή φάση που αποτελούνταν από 80 % H₂O και 20 % Ακετονιτρίλιο για τα πρώτα 2 min. Ακολούθως, η κινητή φάση βαθμιαία μετατράπηκε σε 80 % Ακετονιτρίλιο και 20 % Νερό μέχρι τα 7 min. Η κινητή αυτή φάση διατηρήθηκε μέχρι τα 9 min και στην συνέχεια επανήλθε στην αρχική της σύσταση. Καθόλη τη διάρκεια της έκλυσης, η ροή της κινητής φάσης προσαρμόστηκε στα 0,7 mL/min. Η ανίχνευση των ουσιών πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 230 nm και οι χρόνοι κατακράτησης των FSO, FSO₂, FSO-OH και FSO₂-OH ήταν 12,0, 12,8, 6,2 και 9,2 min αντίστοιχα.

2.4.4. Προσδιορισμός των oxamyl και oxamyl oxime σε σύστημα HPLC

Ο διαχωρισμός των oxamyl και oxamyl oxime έγινε με ισοκρατική έκλυση σε κινητή φάση 20 % ACN: 80 % H₂O. Η ανίχνευσή τους πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 220 nm και οι χρόνοι κατακράτησης των oxamyl και oxamyl oxime ήταν 3,3 min και 2,3 min αντίστοιχα.

2.5. Εκχύλιση νηματωδοκτόνων από τα ενισχυμένα δείγματα εδάφους

Αρχικά, μελετήθηκε η ταχύτητα διάσπασης των fenamiphos και oxamyl στο έδαφος από την περιοχή της Ν. Κρήτης όπου παρατηρήθηκε μειωμένη αποτελεσματικότητα των παραπάνω νηματωδοκτόνων. Έξι δείγματα εδάφους (200 g) τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες με αεροστεγές κλείσιμο και δέχτηκαν εφαρμογή κατάλληλων ποσοτήτων υδατικών διαλυμάτων των fenamiphos (400 mg/L) και oxamyl (240 mg/L) ώστε στο έδαφος να υπάρξει συγκέντρωση 10 µg/g ξηρού βάρους εδάφους. Τρία από τα δείγματα εδάφους έλαβαν δόση fenamiphos και τρία oxamyl. Μετά την εφαρμογή τα δείγματα αφέθηκαν για μικρό χρονικό διάστημα (2 h) και ακολούθησε προσθήκη νερού ώστε η υγρασία του εδάφους να προσαρμοστεί στο 40 % της υδατοχωρητικότητας. Τα δύο δείγματα εδάφους αναμίχθηκαν καλά για να επέλθει ομοιόμορφη κατανομή του γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος, ζυγίστηκαν εκ νέου στις σακούλες τους και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25 °C. Οι σακούλες τρυπήθηκαν σε ένα σημείο ώστε να καταστούν αερόβιες συνθήκες για τα εδάφη και καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο για την απουσία φωτός. Αμέσως μετά την εφαρμογή και 1, 3 και 4 ημέρες αργότερα δύο επαναλήψεις των 10 g από κάθε δείγμα εδάφους απομακρύνθηκαν και ακολούθησε εκχύλιση των υπολειμμάτων των δύο νηματωδοκτόνων και ανάλυση τους σε σύστημα HPLC. Η εκχύλιση των fenamiphos και oxamyl από το έδαφος περιγράφεται παρακάτω:

- Ποσότητα 10 g εδάφους ζυγίστηκε σε κωνικές φιάλες των 100 mL και προστέθηκαν 20 mL μεθανόλης (pro analysis, Merck®). Οι φιάλες καλύφθηκαν με parafilm και ανακινήθηκαν για 1 ώρα και 30 min σε μέτρια ταχύτητα
- Οι φιάλες στη συνέχεια αφέθηκαν λίγη ώρα και 1 mL από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε eppendorf του 1,5 mL
- Τα eppendorfs φυγοκεντρήθηκαν για 3 min σε 13000 στροφές/min
- 0,5 mL από το υπερκείμενο των eppendorfs μεταφέρθηκε σε μικρό γυάλινο φυαλίδιο (1,8 mL) και αναμίχθηκε με 0,5 mL νερό HPLC grade
- Ακολούθησε ανάδευση σε vortex και κατόπιν έγκυση των δειγμάτων σε σύστημα HPLC

2.6. Εμπλουτισμένες καλλιέργειες για την απομόνωση αποδομητικών βακτηρίων

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος διάσπασης των νηματωδοκτόνων στο έδαφος, ξεκίνησε η διαδικασία εμπλουτισμού για την απομόνωση των αποδομητικών βακτηρίων. Έτσι, 1 g εδάφους από δείγμα που είχε ενισχυθεί με fenamiphos, μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα μπουκάλια DURAN (100 mL) (3 επαναλήψεις) που περιείχαν 20 mL

SEM + fenamiphos (10 mg/L). Ανάλογα, 1 g του ίδιου δείγματος εδάφους μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα μπουκάλια DURAN (100 mL) (3 επαναλήψεις) που περιείχαν 20 mL διαλύματος MSM+N + fenamiphos (10 mg/L). Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για το νηματωδοκτόνο oxamyl με τη μόνη διαφορά ότι για τον εμβολιασμό χρησιμοποιήθηκε έδαφος από δείγμα που είχε ενισχυθεί με oxamyl. Ταυτόχρονα προετοιμάστηκαν και τρία μπουκάλια για κάθε υπόστρωμα και γεωργικό φάρμακο, στα οποία δεν προστέθηκε έδαφος και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τέλος, όλα τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν για επώαση σε ψυχόμενο επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 25 °C υπό ανάδευση 150 στροφών/min. Η αποδόμηση των fenamiphos και oxamyl παρακολουθήθηκε με συνεχή λήψη δειγμάτων στις 0, 1 και 2 ημέρες (1^{ος} κύκλος ανακαλλιέργειας). Η διαδικασία που ακολούθησε ήταν η εξής:

- 1 mL από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε erpendorf
- Τα erpendorfs φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 13000 στροφές/min
- Για τις καλλιέργειες με fenamiphos ή oxamyl, 0,5 ή 0.8 mL από το υπερκείμενο αντίστοιχα μεταφέρθηκε σε γυάλινο φυαλίδιο και αναμίχθηκαν με 0.5 ή 0,2 mL ακετονιτριλίο αντίστοιχα
- Ακολούθησε σύντομη ανάδευση σε vortex και ανάλυση σε σύστημα HPLC

2.6.1. Κύκλοι ανακαλλιέργειας στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες

Μετά την επιβεβαίωση της ταχύτατης αποδόμησης των fenamiphos και oxamyl κατά τον πρώτο κύκλο εμπλουτισμού και όταν το ποσοστό αποδόμησής τους έφτασε το 80 % προετοιμάστηκε ο 2^{ος} κύκλος ανακαλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, 0,5 mL από τις καλλιέργειες μεταφέρθηκε ασηπτικά σε νέα σειρά των ιδίων θρεπτικών μέσων (20 mL). Στη συνέχεια, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο προετοιμάστηκε 3^{ος}, 4^{ος} και 5^{ος} κύκλος ανακαλλιέργειας για όλους τους συνδυασμούς γεωργικού φαρμάκου – θρεπτικού μέσου εκτός του MSM+N + Oxamyl που παρέμεινε στον 4^ο κύκλο ανακαλλιέργειας μιας και παρουσίαζε το βραδύτερο ρυθμό αποικοδόμησης. Κατά την διάρκεια των κύκλων ανακαλλιέργειας, η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων παρακολουθήθηκε με την ημερήσια σχεδόν απομάκρυνση δειγμάτων από τις υγρές καλλιέργειες και ανάλυση τους σε σύστημα HPLC. Σε κάθε κύκλο ανακαλλιέργειας υπήρχαν ταυτόχρονα και δείγματα – μάρτυρες για κάθε γεωργικό φάρμακο – θρεπτικό μέσο. Με την ολοκλήρωση κάθε βήματος εμπλουτισμού, οι καλλιέργειες που περνούσαν σε καινούριο κύκλο εμπλουτισμού, μεταφέρονταν σε αποστειρωμένα falcons των 50 mL και διατηρούνταν στους – 20 °C. Επίσης, δείγματα εδάφους (20 g) που είχαν ενισχυθεί με τα νηματωδοκτόνα

απομακρύνθηκαν από τα αρχικά δείγματα και αποθηκεύτηκαν στους -20°C . Αυτό έγινε ώστε αργότερα να μελετηθεί η βακτηριακή κοινότητα σε όλους τους κύκλους εμπλουτισμού καθώς και η αρχική σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος.

2.7. Απομόνωση μικροοργανισμών που αποδομούν τα νηματώδοκτόνα fenamiphos και oxamyl από το έδαφος

Όταν η αποδόμηση των fenamiphos και oxamyl στον τελευταίο κύκλο ανακαλλιέργειας έφτασε το 80 % προετοιμάστηκε σειρά διαδοχικών αραιώσεων ($10^{-1} - 10^{-8}$) για κάθε γεωργικό φάρμακο και θρεπτικό μέσο. Οι αραιώσεις έγιναν ως εξής:

- Προετοιμάστηκαν $4 \times 8 = 32$ αποστειρωμένα falcons των 15 mL που περιείχαν 9 mL αποστειρωμένο νερό
- Οι καλλιέργειες στον τελευταίο κύκλο εμπλουτισμό μεταφέρθηκαν στον θάλαμο νηματικής ροής
- Οι τρεις επαναλήψεις από κάθε καλλιέργεια (SEM ή MSMN + Fenamiphos, SEM ή MSMN + Oxamyl) αφού αναδεύτηκαν σε vortex, αναμίχθηκαν
- 1 mL από κάθε μπουκάλι DURAN μεταφέρθηκε στο πρώτο αποστειρωμένο falcon και αναδεύτηκε
- 1 mL από το πρώτο falcon μεταφέρθηκε στο δεύτερο κ.ο.κ., μέχρι και το τελευταίο falcon όπου είχε τελικά την υψηλότερη αραιώση 10^{-8}

Μέσω της διαδικασίας αυτής προέκυψαν οκτώ falcons για κάθε καλλιέργεια όπως αναφέρονται παρακάτω:

- Fenamiphos in SEM στον 5^ο κύκλο ανακαλλιέργειας
- Fenamiphos in MSM+N στον 5^ο κύκλο ανακαλλιέργειας
- Oxamyl in SEM στον 5^ο κύκλο ανακαλλιέργειας
- Oxamyl in MSM+N στον 4^ο κύκλο ανακαλλιέργειας

Στη συνέχεια, 0,1 mL από τα falcons των αραιώσεων $10^{-3} - 10^{-8}$ επιστρώθηκαν σε δύο τριβλία κάθε φορά που περιείχαν το αντίστοιχο στερεό θρεπτικό μέσο. Τα τριβλία διατηρήθηκαν στην επώαση στο σκοτάδι στους 25°C μέχρι να αναπτυχθούν οι αποικίες. Επίσης, οι καλλιέργειες που βρίσκονταν στον τελευταίο κύκλο ανακαλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα falcons και διατηρήθηκαν στους -20°C .

2.7.1. Επιλογή αποικιών και έλεγχος της αποδομητικής τους ικανότητας

Ύστερα από τρεις ημέρες επώασης, ικανοποιητικός αριθμός βακτηριακών αποικιών είχε αναπτυχθεί στα τριβλία. Ακολούθησε επιλογή αποικιών από τα τριβλία με βάση τρία κριτήρια 1) την εμφάνιση περιθωρίου (halo) γύρω από την αποικία που καταδεικνύει πιθανότατα την κατανάλωση του γεωργικού φαρμάκου από την αποικία, 2) μορφολογικά χαρακτηριστικά και 3) όσο το δυνατό καλύτερο διαχωρισμό από παρακείμενες αποικίες ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα απομόνωσης αξενικών καλλιέργειών. Τελικά, επιλέχθηκαν 25 αποικίες για κάθε νηματωδοκτόνο και θρεπτικό μέσο με τη βοήθεια αποστειρωμένων ακίδων. Οι συνολικά 100 αποικίες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά μπουκάλια (30 ml) μιας χρήσης που περιείχαν 5 mL από το ίδιο θρεπτικό μέσο (10 mg/L) με αυτό του τριβλίου από το οποίο επιλέχθηκαν. Ακολούθησε ανάδευση σε vortex και τοποθέτησή τους σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 25 °C και στις 150 στροφές/min. Παράλληλα, προετοιμάστηκαν και τρεις επαναλήψεις για κάθε γεωργικό φάρμακο και θρεπτικό μέσο τα οποία δεν εμβολιάστηκαν με βακτήρια ώστε να αξιολογηθεί η αβιοτική διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων στα θρεπτικά μέσα κατά την διάρκεια της επώασης.

Στη συνέχεια, παρακολουθήθηκε η αποδόμηση των fenamiphos και oxamyl από τις επιλεγμένες αποικίες στις 7 και 14 ημέρες όπως έχει ήδη περιγραφεί. Από τις καλλιέργειες που έδειξαν αποδόμηση έγινε εμβολιασμός και επίστρωση σε τριβλία NAB για την αξιολόγηση της αμιγότητας των καλλιέργειών. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν στην επώαση στους 25 °C. Οι καλλιέργειες που ήταν αμιγείς επιστρώθηκαν παραπέρα σε τριβλία με τα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα (SEM και MSMN + fenamiphos ή oxamyl). Στις καλλιέργειες που παρουσίασαν υψηλή αποδομητική ικανότητα και ήταν αμιγείς, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια με εμβολιασμό 0,5 mL σε νέα θρεπτικά μέσα (5 mL). Οι νέες καλλιέργειες καθώς και οι αντίστοιχες καλλιέργειες-μάρτυρες τοποθετήθηκαν σε αναδευόμενο επωαστικό θάλαμμο στους 25 °C στις 150 στροφές/min. Ακολούθησαν δειγματοληψίες στις 0, 3 και 6 ημέρες για την παρακολούθηση της αποδόμησης των fenamiphos και oxamyl.

Τέλος, στα τριβλία SEM και MSMN+fenamiphos ή oxamyl που είχαν επιστρωθεί με τις αποδομητικές καλλιέργειες προστέθηκε 0,8 mL αποστειρωμένο νερό και η βακτηριακή μάζα συγκομίστηκε και μεταφέρθηκε σε νέα αποστειρωμένα erpendorfs, όπου αναμίχθηκαν με 0,2 mL αποστειρωμένου υδατικού διαλύματος γλυκερόλης (80 %) και αποθηκεύτηκαν στους – 80 %.

2.7.2. Εξαγωγή DNA από τις αμιγείς αποικίες των βακτηρίων

Εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε από 8 βακτηριακές καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί σε τριβλία NAB. Η βακτηριακή ανάπτυξη συγκομίστηκε με 1 mL αποστειρωμένο νερό, φυγοκεντρήθηκε και ακολούθησε εξαγωγή DNA με τη χρήση του εμπορικού kit Nucleospin® Tissue της εταιρείας Macherey – Nagel. Τα βήματα του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Η βακτηριακή πελέτα επαναδιαλύθηκε με 180 μL Buffer T1 (Lysis Buffer) και το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνίδια
- Προστέθηκαν 25 μL πρωτεΐνης K από πρότυπο διάλυμα 20 mg/mL, ακολούθησε ανάδευση σε vortex και επώαση (1-3 ώρες) στους 56 $^{\circ}\text{C}$ έως ότου επέλθει πλήρης λύση των κυττάρων. Στο διάστημα αυτό, πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε vortex ανά τακτά χρονικά διαστήματα μιας και η διαδικασία αυτή μειώνει τον χρόνο λύσης των κυττάρων
- Μετά τη λύση των κυττάρων προστέθηκαν 200 μL από το Buffer B3, ακολούθησε vortex και επώαση των δειγμάτων στους 70 $^{\circ}\text{C}$ για 10 min.
- Προστέθηκαν 210 μL αιθανόλης (96-100 %) στα δείγματα και ακολούθησε αμέσως vortex
- Κατόπιν, οι στήλες Nucleospin τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια συλλογής των 2 mL, προστέθηκαν τα δείγματα και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε
- Προστέθηκαν 500 μL του Buffer BW (Wash Buffer) στην στήλη και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε
- Προστέθηκαν 600 μL του Buffer B5 (Concentrated Wash Buffer) στην στήλη και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε
- Ακολούθησε αμέσως μία δεύτερη φυγοκέντρωση στις 11,000 x g για 1 min ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα αιθανόλης του Buffer B5
- Τέλος, οι στήλες Nucleospin τοποθετήθηκαν σε νέα αποστειρωμένα eppendorfs και η έκλυση του DNA έγινε με την προσθήκη 100 μL του Buffer BE (Elution Buffer), το οποίο είχε προθερμανθεί στους 70 $^{\circ}\text{C}$. Οι στήλες αφέθηκαν με το Buffer BE για 1 min και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 11,000 x g για 1 min
- Τα δείγματα DNA διατηρήθηκαν στους – 20 $^{\circ}\text{C}$

2.8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση:

- Ειδικής DNA πολυμεράσης η οποία είναι θερμοσταθερή και διατηρεί τη δραστικότητα της σε θερμοκρασίες έως και 95 °C
- Ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 15 - 30 βάσεων), τα οποία ονομάζονται εκκινητές (primers)
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂
- Ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για την πολυμεράση
- Μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Στο πρώτο στάδιο, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 92-95 °C. Στο δεύτερο στάδιο, οι εκκινητές που βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στους δύο κλώνους του DNA στους 50-65 °C. Κατά το τρίτο στάδιο, το οποίο πραγματοποιείται στους 70-78 °C, συντίθεται DNA αρχίζοντας από τους δύο εκκινητές. Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές.

Υλικά

- Buffer A
- Buffer για colony-PCR
- DyNAzyme EXT Buffer (Finnzymes)
- Kapa Taq πολυμεράση
- DyNAzyme EXT DNA πολυμεράση (Finnzymes)
- Νουκλεοτίδια (dNTPs) (HT BIOTECHNOLOGY LTD)
- BSA (Bovine Serum Albumin) 10 µg/µL
- MgCl₂ (25 mM)

- Εκκινητές
- dd H₂O

Πίνακας 2.2: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων (63f-1087r ή Muiyzer F- Muiyzer R) ή ολόκληρου του 16S rDNA γονίδιου των βακτηρίων

| Εκκινητής | Αλληλουχία | Tm (°C) |
|---------------------------|--|---------|
| 63f | 5' – AGG CCT AAC ACA TGC AAG TC – 3' | 49,2 |
| 1087r | 5' – CTC GTT GCG GGA CTT AAC CC – 3' | 56,0 |
| MuiyzerF (357f-GC) | 5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG – 3' | 103,2 |
| MuiyzerR (534r) | 5' – ATT ACC GCG GCT GCT GG – 3' | 54,4 |
| 8f | 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTT AG-3' | 52 |
| 1512r | 5'-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3' | 52 |

Ενίσχυση τμήματος του 16S rDNA βακτηρίων με την τεχνική της PCR: Στην αντίδραση της PCR ενισχύθηκε όλο το 16S rRNA γονίδιο (1500 bp) των βακτηρίων με τους εκκινητές 8f - 1512r χρησιμοποιώντας ως μήτρα το DNA που εκχυλίστηκε από τις αμιγείς καλλιέργειες. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε παρουσιάζονται στους πίνακες 2.3. και 2.4. αντίστοιχα.

Πίνακας 2.3: Αντίδραση PCR για τα βακτήρια που εμφάνισαν αποδομητική ικανότητα

| Αντιδραστήρια | Όγκος | Τελική συγκέντρωση |
|-----------------------------------|--------|--------------------------------|
| Buffer A (10x optimized) | 2,5 µL | 1x (1.5 mM MgCl ₂) |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 µL | 200 µM από το καθένα |
| Forward primer 8f (20 pmol/µL) | 1 µL | 0,2 µM |
| Reverse primer 1512r (20 pmol/µL) | 1 µL | 0,2 µM |
| Kapa Taq πολυμεράση (1 U/µL) | 0,1 µL | 1 U/25 µL |
| DNA | 1 µL | 10-50 ng |

| | | |
|--------------------|---------|--|
| ddH ₂ O | 18,9 µL | |
| Συνολικός όγκος | 25 µL | |

Πίνακας 2.4: Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες PCR με τους εκκινητές 8f-1512r

| | | | |
|-------------------|-------|--------|-----------|
| Αρχική αποδιάταξη | 95 °C | 5 min | |
| Αποδιάταξη | 95 °C | 1 min | 30 κύκλοι |
| Υβριδοποίηση | 55 °C | 1 min | |
| Επιμήκυνση | 72 °C | 2 min | |
| Τελική επιμήκυνση | 72 °C | 10 min | |

2.9. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA. Στην εργασία αυτή, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 1) στα δείγματα DNA που εξήχθησαν από τις αμιγείς καλλιέργειες των βακτηρίων, 2) στα δείγματα του πλασμιδιακού DNA των βακτηρίων που απομονώθηκαν, 3) στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από το έδαφος για τον έλεγχο της απόδοσης της εκχύλισης και 4) στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τους κύκλους ανακαλλιέργειας των βακτηρίων. Επίσης, ηλεκτροφορήθηκαν και όλα τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού προϊόντος.

Πίνακας 2.5: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

| 50x TAE Buffer (Tris-Acetate-EDTA) | | 6x loading buffer | |
|---|---------|---------------------|--------|
| Tris Base | 242 g | Γλυκερόλη | 5 mL |
| Glacial Acetic Acid | 57,1 mL | Bromophenol blue | 25 mg |
| 0,5 M EDTA (pH 8) | 100 mL | 50x TAE | 200 µL |
| Προσαρμογή του όγκου στο 1L με απεσταγμένο νερό | | dd H ₂ O | 4,8 mL |

Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA από τις αμιγείς αποικίες των βακτηρίων και των προϊόντων της PCR: Χρησιμοποιήθηκε πηκτή 0,8 % (0,56 g αγαρόζης σε 70 mL TAE 1x) και 2 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 5 μ L DNA αναμεμειγμένα με 1 μ L loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 90 V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές αφού τοποθετήθηκαν σε τράπεζα UV.

2.10. Εξαγωγή ζώνης της πηκτής για καθαρισμό PCR προϊόντων (gel extraction)

Από τα προϊόντα της PCR, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή ζώνης από πηκτή αγαρόζης στα 9 δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, σε πηκτή αγαρόζης 0,8 % φορτώθηκαν 10 μ L DNA αυτή τη φορά, και μετά την ηλεκτροφόρηση επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ζωνών του σωστού μεγέθους σε τράπεζα UV. Κατόπιν, ακολουθήθηκαν τα βήματα του πρωτοκόλλου του QIAquick Gel Extraction Kit της εταιρείας QIAGEN.

- Με αποστειρωμένο νυστέρι αποκόπηκαν προσεκτικά οι επιλεγμένες ζώνες και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα eppendorfs
- Τα eppendorfs ζυγίστηκαν και προστέθηκε Buffer QG σε αναλογία 3 φορές το βάρος της ζώνης πηκτής που κόπηκε (στα 100 mg προστέθηκαν 300 μ L)
- Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 50 °C για 10 min μέχρι να διαλυθεί πλήρως η πηκτή. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα δείγματα αναδεύονταν σε vortex για να διευκολυνθεί η διάλυση και στο τέλος το χρώμα των δειγμάτων ήταν κίτρινο που υποδηλώνει τιμή pH<7.5
- Οι στήλες QIAquick spin τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια των 2 mL. Τα δείγματα των eppendorfs μεταφέρθηκαν σε αυτά και φυγοκεντρήθηκαν για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε
- Προστέθηκε 0,5 mL από το Buffer QG και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε
- Προστέθηκε 0,75 mL από το Buffer PE στις στήλες των δειγμάτων και αφέθηκαν για 2-5 min πριν ακολουθήσει φυγοκέντρηση για 1 min. Το Buffer PE που περιέχει αιθανόλη χρησιμοποιείται για να ξεπλυθούν όλα τα άλατα. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 1 min στις 13000 rpm
- Τέλος, οι στήλες τοποθετήθηκαν σε καινούρια eppendorfs και η έκλυση του DNA έγινε με την προσθήκη 30 μ L dd H₂O.
- Τα δείγματα DNA διατηρήθηκαν στους – 20 °C

2.11. Ένθεση

Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των δειγμάτων του dsDNA με φωτόμετρο στα 260 nm με χρήση κυψελίδας. Με βάση τις τιμές απορρόφησης και βάση του τύπου $[25 \text{ ng vector} \times 1,5 \text{ kb (μήκος DNA)} / 3] \times (3 / 1)$ υπολογίστηκαν τα μL DNA κάθε δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση ένθεσης σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα pGEM®-T easy (Promega). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση ένθεσης παρουσιάζονται στον πίνακα 2.6. Μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων τα δείγματα επωάστηκαν στους 4°C για 16 h.

Πίνακας 2.6: Οι όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση ένθεσης των διαφόρων PCR προϊόντων

| Αντιδραστήρια | Δείγματα DNA |
|---------------------|-------------------------|
| 2x Buffer | 5 μL |
| Vector pGem | 0,5 μL |
| PCR product | 1,6 - 4,3 μL |
| Λιγάση | 1 μL |
| dd H ₂ O | X μL |
| Συνολικός όγκος | 10 μL |

Πίνακας 2.7: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό του φορέα σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*

| <u>10 mL X Gal (2 %)</u> | | <u>10 mL IPTG (0,1 M)</u> | |
|---|-------|---|---------|
| X Gal (- 20 ⁰ C) | 0,2 g | IPTG (- 20 ⁰ C) | 0,238 g |
| dimethyl formamide (DMF) | 10 mL | Προσαρμογή όγκου σε 10 mL νερού Αποστείρωση με φίλτρο Αποθήκευση στους 4 ⁰ C | |
| Αποστείρωση με φίλτρο και σύριγγα και αποθήκευση στους – 20 ⁰ C τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο | | | |

2.12. Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*

Με την ολοκλήρωση της ένθεσης ακολούθησε ο μετασχηματισμός των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε δεκτικά κυττάρα *E. coli* (DH5a Competent Cells, Invitrogen, USA) Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη διαδικασία του μετασχηματισμού ήταν τα εξής:

- Σε αποστειρωμένα erppendorfs μεταφέρθηκαν 2 μ L ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και προστέθηκαν 80 μ L δεκτικών κυττάρων. Τα erppendorfs τοποθετήθηκαν για 30 min στον πάγο
- Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν για 42-50 sec στους 42 $^{\circ}$ C και για 2 min σε πάγο
- Προστέθηκαν 200 μ L LB υπό φλόγα και τα δείγματα επώαστηκαν για 50 min στους 37 $^{\circ}$ C
- Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής και ασηπτικά προστέθηκαν 50 μ L X GAL (2 %) που φυλασσόταν στους - 20 $^{\circ}$ C και 10 μ L IPTG που φυλασσόταν στους 4 $^{\circ}$ C
- Τέλος, τα δείγματα επιστρώθηκαν σε τριβλία LB + Ampicillin και ακολούθησε επώαση στους 37 $^{\circ}$ C για 16 h

Επιλογή θετικών κλώνων από τα τριβλία LB: Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε επιλογή πέντε λευκών αποικιών από κάθε τριβλίο με τη χρήση αποστειρωμένων ακίδων και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκάλια (25 mL) που περιείχαν 5 mL LB + ampicillin. Ακολούθως, τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με ανάδευση στους 37 $^{\circ}$ C στις 200 στροφές/min για 16 h.

2.13. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Από τις παραπάνω καλλιέργειες με την ολοκλήρωση της επώασης πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις κλώνοι για κάθε βακτήριο (24 δείγματα). Η εξαγωγή πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό κιτ Nucleospin® Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel και τα βήματα του πρωτοκόλου που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- 1 mL από τις καλλιέργειες μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο erppendorf και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 11,000 x g για 30 sec. Τα κύτταρα ιζηματοποιήθηκαν και το υπερκείμενο απορρίφθηκε
- Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε προσεκτικά σε 250 μ L του Buffer A1 που περιέχει λυσοζύμη

- Προστέθηκαν 250 μL του Buffer A2 που περιέχει SDS και τα eppendorfs ανακινήθηκαν 6 - 8 φορές και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
- Προστέθηκαν 300 μL Buffer A3 και τα eppendorfs ανακινήθηκαν πάλι 6 - 8 φορές
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 10 min
- Στη συνέχεια, οι στήλες NucleoSpin Plus που παρέχονται στο κιτ τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια συλλογής των 2 mL και φορτώθηκε σε αυτά το υπερκείμενο
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min και το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη της στήλης απορρίφθηκε
- Προστέθηκαν στην στήλη 500 μL του Buffer AW το οποίο είχε προθερμανθεί στους 50 $^{\circ}\text{C}$ και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη της στήλης απορρίφθηκε
- Προστέθηκαν στην στήλη 600 μL του Buffer A4 που περιέχει αιθανόλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη της στήλης απορρίφθηκε
- Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 2 min ώστε να απομακρυνθεί κάθε υπόλειμμα αιθανόλης από τη μεμβράνη της στήλης
- Στην συνέχεια οι στήλες μεταφέρθηκαν σε καινούρια αποστειρωμένα eppendorfs και η έκλυση του DNA πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 50 μL του Buffer AE (5 mM Tris-HCl, pH 8,5). Ακολούθησε επώση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και κατόπιν φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min
- Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους - 20 $^{\circ}\text{C}$

Το πλασμιδιακό DNA απεστάλη για αλληλούχιση στην εταιρεία MACROGEN στην Κορέα. Οι αλληλουχίες αναγνώστηκαν και προς τις δύο κατευθύνσεις ώστε να παραλάβουμε την πλήρη αλλουχία (1500 bp) του γονιδίου 16S rRNA των απομονωθέντων βακτηρίων. Οι αλληλουχίες κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων του European Molecular Biology Laboratory (EMBL) και με κωδικούς πρόσβασης FN600408 ως FN600413.

Οι μετασχηματισμένες με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο καλλιέργειες *E. coli* από τις οποίες πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA ανακαλλιιεργήθηκαν σε νέο θρεπτικό μέσο (LB+ampicillin) και ακολούθησε ανάμιξη με γλυκερόλη και αποθήκευση στους - 80 $^{\circ}\text{C}$.

2.14. Εξαγωγή DNA από δείγματα εδάφους

Δείγματα εδάφους (3 δείγματα ανά γεωργικό φάρμακο) που είχαν λάβει δόσεις fenamiphos ή oxamyl και είχαν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση των αποδομητικών βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή DNA που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού κιτ PowerSoil™ DNA (MO BIO Laboratories, Inc.). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

- Αρχικά, προστέθηκαν 0,5 g από κάθε δείγμα εδάφους σε ξεχωριστά bead tubes τα οποία περιείχαν bead solution. Το bead solution είναι ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο βοηθάει στο να διασκορπιστούν τα σωματίδια εδάφους και διαλυτοποιεί τα χουμικά οξέα που περιέχονται στο έδαφος
- Ακολούθησε ήπια ανάδευση σε vortex
- Προστέθηκαν 60 μ L από το διάλυμα C1 και τα bead tubes αναδεύτηκαν σύντομα στο vortex. Το διάλυμα C1 περιέχει SDS το οποίο διασπά τα λιπαρά οξέα και τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών
- Στη συνέχεια, τα bead tubes τοποθετήθηκαν στο vortex και αναδεύτηκαν στη μέγιστη ταχύτητα για 10 min. Κατά την ανάδευση, τα σφαιρίδια συγκρούονται μεταξύ τους και με τα κύτταρα προκαλώντας έτσι τη λύση τους
- Τα bead tubes φυγοκεντρήθηκαν στις 10,000 x g για 30 sec. Στο σημείο αυτό, τα κυτταρικά υπολείμματα, το έδαφος, τα σφαιρίδια και τα χουμικά οξέα δημιουργούν ένα ίζημα ενώ το DNA βρίσκεται στο υπερκείμενο
- Μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε καθαρά σωληνάρια eppendorfs
- Προστέθηκαν 250 μ L από το διάλυμα C2, τα eppendorfs αναδεύτηκαν για 5 sec και επώαστηκαν στους 4 °C για 5 min. Το διάλυμα C2 περιέχει ένα αντιδραστήριο το οποίο προκαλεί κατακρήμνιση πρωτεϊνών
- Τα eppendorfs φυγοκεντρήθηκαν για 1 min στις 10,000 x g
- Αποφεύγοντας το ίζημα, μεταφέρθηκαν μέχρι και 600 μ L σε καθαρά σωληνάρια eppendorfs
- Προστέθηκαν 200 μ L από το διάλυμα C3 (διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων) και τα eppendorfs αναδεύτηκαν στο vortex για 5 sec. Μετά, επώαστηκαν στους 4 °C για 5 min. Το DNA προσδένεται στη μεμβράνη πυριτίου παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων
- Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 10,000 x g για 1 min
- Μεταφέρθηκαν έως και 750 μ L του υπερκειμένου σε καθαρά eppendorfs
- Προστέθηκε 1,2 mL από το διάλυμα C4 το οποίο είναι διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων

- Προστέθηκαν περίπου 675 μL από το υπερκείμενο σε spin filter και φυγοκεντρήθηκαν στις 10,000 x g για 1 min. Απορρίφθηκε το διάλυμα που διήλθε από τη μεμβράνη και προστέθηκαν άλλα 675 μL από το υπερκείμενο σε spin filter. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 10,000 x g για 1 min. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι να περάσει όλο το υπερκείμενο από το spin filter. Το DNA προσδένεται στη μεμβράνη πυριτίου στο spin filter και σχεδόν όλες οι άλλες ουσίες (αναστολείς) διέρχονται από τη μεμβράνη
- Προστέθηκαν 500 μL από το διάλυμα C5 και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 30 sec στις 10,000 x g. Το διάλυμα C5 περιέχει αιθανόλη η οποία απομακρύνει κατάλοιπα άλατος, χουμικών οξέων και άλλων ουσιών ενώ αφήνει το DNA προσδεμένο στη μεμβράνη
- Απορρίφθηκε το διάλυμα που διήλθε από τη μεμβράνη
- Φυγοκεντρήθηκαν ξανά για 1 min. Στο βήμα αυτό απομακρύνονται υπολείμματα αιθανόλης
- Τοποθετήθηκε το spin filter σε καινούριο σωληνάριο eppendorf
- Προστέθηκαν 100 μL από το διάλυμα C6 (διάλυμα έκλουσης, 10 mM Tris pH 8) στο κέντρο της άσπρης μεμβράνης
- Φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 x g για 30 sec και απορρίφθηκε το spin filter
- Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C
- Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πηκτή αгарόζης 0,8 %

2.15. Εξαγωγή DNA από τους κύκλους ανακαλλιέργειας των καλλιιεργειών

Εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε και από τις καλλιέργειες εμπλουτισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των βακτηρίων. Έτσι, DNA εκχυλίστηκε από τις καλλιέργειες SEM + Fenamiphos, MSM+N+Fenamiphos στον 2^ο, 3^ο, 4^ο και 5^ο κύκλο εμπλουτισμού και από τις καλλιέργειες MSM+N+oxamyl στον 2^ο, 3^ο και 4^ο κύκλο εμπλουτισμού. Δεν πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από τις καλλιέργειες SEM+oxamyl καθώς μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια του εμπλουτισμού έδειξαν ότι το oxamyl ήταν ασταθές στο συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ βιοτικής και αβιοτικής διάσπασης και συνεπώς η απομόνωση αποδομητικών βακτηρίων. Η προκαταρκτική μεταχείριση των δειγμάτων πριν την εξαγωγή DNA περιγράφεται παρακάτω:

- Τα δείγματα αφού τοποθετήθηκαν σε πάγο φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C για 25 min στις 14000 στροφές/min

- Ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρωση στους 15 °C για 25 min στις 14000 στροφές/min
- Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με την προσθήκη 600 µL dd H₂O
- Τα 600 µL μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα eppendorfs και ακολούθησε εξαγωγή DNA με τη χρήση του Nucleospin® Tissue Kit της εταιρείας Macherey – Nagel όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. (ενότητα 2.7.2.) Μετά την εξαγωγή τους, τα δείγματα DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 0,8 % για επιβεβαίωση της επιτυχημένης εξαγωγής του DNA και ακολούθως διατηρήθηκαν στους -20°C

PCR για α) τα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από το έδαφος και β) τα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τις καλλιέργειες εμπλουτισμού: Για την ενίσχυση

τμήματος του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων που περιέχονται στο έδαφος αλλά και στα διάφορα στάδια εμπλουτισμού ακολουθήθηκε η μέθοδος της PCR εσωτερικής ένθεσης. Έτσι με την αρχική PCR ενισχύθηκε από το ολικό DNA του εδάφους και των καλλιεργειών εμπλουτισμού, ένα τμήμα (1000 bp) του 16S rDNA των βακτηρίων με τους εκκινητές 63f και 1087r. Οι συνθήκες των αντιδράσεων είναι ίδιες με αυτές του πίνακα 2.4 και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.9.

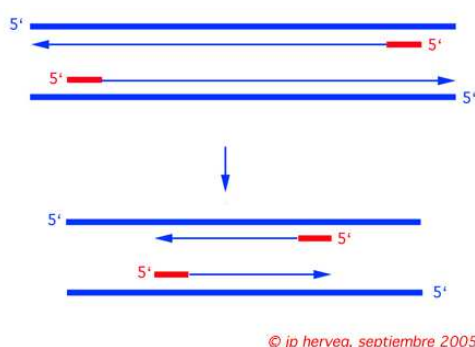
Πίνακας 2.9: Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR με τους εκκινητές 63f-1087r και μήτρα το DNA που εκχυλίστηκε από το έδαφος και τις εμπλουτισμένες καλλιέργειες που δημιουργήθηκαν κατά την απομόνωση των βακτηρίων

| Αντιδραστήρια | Όγκος | Τελική συγκέντρωση |
|-----------------------------------|--------|--------------------------------|
| Buffer (10x optimized) | 5 µL | 1x (1,5 mM MgCl ₂) |
| dNTPs (10 mM) | 1 µL | 200 µM από το καθένα |
| Forward primer 63f (20 pmol/µL) | 0,5 µL | 0,2 µM |
| Reverse primer 1087r (20 pmol/µL) | 0,5 µL | 0,2 µM |
| Πολυμεράση Extend (1 U/µL) | 1 µL | 1 U/25µL |
| BSA (10 µg/µL) | 2 µL | 400 ng/mL |
| DNA | 1 µL | 10-50 ng |
| ddH ₂ O | 39 µL | |

| | | |
|-----------------|------------|--|
| Συνολικός όγκος | 50 μ L | |
|-----------------|------------|--|

2.16. PCR εσωτερικής ένθεσης

Μία τροποποιημένη μέθοδος PCR είναι η PCR εσωτερικής ένθεσης ή nested PCR όπου το προϊόν PCR από αρχική αντίδραση χρησιμοποιείται ως μήτρα σε δεύτερη PCR όπου χρησιμοποιείται ένα νέο ζευγάρι εκκινητών, εσωτερικό των αρχικών (Εικόνα 2.1.).



© jp herveg, septembre 2005

Εικόνα 2.1: PCR εσωτερικής ένθεσης

Έτσι, τα προϊόντα PCR που προέκυψαν από την αρχική PCR με τους εκκινητές 63f-1087r χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα σε PCR εσωτερικής ένθεσης με τους εκκινητές 357f + GC και 534r (194 bp). Το πρόσθιο εκκινητικό μόριο έχει στο 5 άκρο του μια ακολουθία 40 βάσεων εμπλουτισμένη σε G+C που αποτρέπει την πλήρη αποδιάταξη του προϊόντος κατά την ηλεκτροφόρηση του σε σύστημα DGGE. Τα προϊόντα που παραλήφθηκαν από αυτή την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας σε σύστημα DGGE. Εκτός των παραπάνω, πραγματοποιήθηκε και PCR εσωτερικής ένθεσης με τους ίδιους εκκινητές στα προϊόντα PCR (8f-1512r) των απομονωθέντων βακτηρίων. Αυτό έγινε ώστε να δημιουργηθεί κατάλληλος marker για την ηλεκτροφόρηση DGGE και να καταστεί δυνατή η αξιολόγηση του οικολογικού ρόλου των βακτηρίων που απομονώθηκαν τόσο στο έδαφος όσο και στις επιμέρους καλλιέργειες εμπλουτισμού. Οι συνθήκες των αντιδράσεων είναι ίδιες με αυτές του πίνακα 2.4 και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 2.10. Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,2 % αυτή τη φορά αφού το τμήμα του DNA προς ανίχνευση ήταν μικρούς μεγέθους.

Πίνακας 2.10: Αντίδραση PCR εσωτερική ένθεσης στα προϊόντα που προέκυψαν από προηγούμενη PCR με τους εκκινητές 63f-1087r ή 8f-1512r

| Αντιδραστήρια | Όγκος | Τελική συγκέντρωση |
|--------------------------------------|--------|--------------------------------|
| Buffer (1,5 mM MgCl ₂) | 2,5 µL | 1x (1,5 mM MgCl ₂) |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 µL | 200 µM από το καθένα |
| 357f + GC (20 pmol/µL) | 0,5 µL | 0,2 µM |
| 534r (20 pmol/µL) | 0,5 µL | 0,2 µM |
| Πολυμεράση Finnzymes Extend (1 U/µL) | 1 µL | 1 U/25µL |
| DNA | 1 µL | 10-50 ng |
| ddH ₂ O | 19 µL | |
| Συνολικός όγκος | 25 µL | |

2.17. Μέθοδος μοριακής αποτύπωσης της βακτηριακής κοινότητας DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Η μέθοδος μοριακής αποτύπωσης DGGE χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό δίκλωνων τμημάτων DNA που έχουν ίδιο μέγεθος αλλά διαφορετική αλληλουχία βάσεων. Γενικότερα, τμήματα DNA που παρουσιάζουν στην αλληλουχία τους υψηλό ποσοστό GC αποδιατάσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις αποδιατακτικών ουσιών. Το DGGE μπορεί να διαχωρίσει τμήματα DNA που διαφέρουν ακόμα και σε μία βάση.

Υλικά και Διαλύματα

- Πλήρες σύστημα DGGE (INGENYphorU-2x2)
- Αντλία ανάμιξης διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών
- Γράσο σιλικόνης
- Ακρυλαμίδα (Acrylamide-Bisacrylamide 40 % solution 37.5:1)
- Φορμαμίδα (Deinized formamide)
- Ουρία
- TEMED (N,N,N',N' – tetramethylenediamine)
- 10 % Ammonium Persulphate Solution (APS, 100mg σε 1 mL ddH₂O)
- 50x TAE

Πίνακας 2.11: Διαλύματα 0% και 100% αποδιατακτικών ουσιών

| | 0 % | 100 % |
|------------------|------------|------------|
| Ακρυλαμίδη | 20 mL | 20 mL |
| Φορμαμίδη | - | 40 mL |
| Ουρία | - | 42 gr |
| 50x TAE | 2 mL | 2 mL |
| H ₂ O | στα 100 mL | στα 100 mL |

Για την εφαρμογή της μεθόδου DGGE χρησιμοποιήθηκε σύστημα INGENYphorU-2x2 (Εικόνα 2.2). Στην παρούσα εργασία η μέθοδος DGGE χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των προϊόντων που προέκυψαν από PCR εσωτερικής ένθεσης. Χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 8 % (w/v) με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών που κυμάνθηκε από 45 – 65 %. Παρακάτω παρατίθεται περιληπτικά το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέθοδο DGGE:



Εικόνα 2.2: INGENYphorU-2x2 σύστημα

- Αρχικά, τοποθετήθηκε η κασέτα ηλεκτροφόρησης INGENY στον πάγκο του εργαστηρίου και τοποθετήθηκε εντός αυτής η μονάδας πίεσης (U-shaped). Η μονάδα πίεσης έρχεται σε επαφή με τη μικρή γυάλινη πλάκα του σάντουιτς ηλεκτροφόρησης
- Καθαρίστηκαν οι γυάλινες πλάκες με αιθανόλη και τοποθετήθηκε μία στρώση από γράσο σιλικόνης στη δεξιά, αριστερή και κάτω πλευρά του spacer ώστε να περιοριστούν οι διαρροές

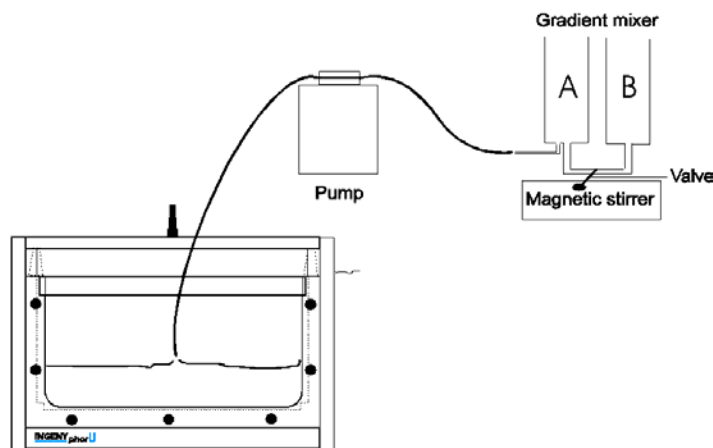
- Τοποθετήθηκε επάνω στο spacer και στη μεγάλη γυάλινη πλάκα η μικρότερη γυάλινη πλάκα. Πιέστηκε το σάντουιτς ώστε να δημιουργηθεί καλή εφαρμογή μεταξύ spacer και πλακών
- Με προσοχή ανασηκώθηκε το σάντουιτς και τοποθετήθηκε μέσα στην κασέτα ηλεκτροφόρησης. Τραβήχτηκε το spacer προς τα επάνω μέχρι το σημείο που μπορεί να πάει χωρίς όμως να ανασηκωθούν οι γυάλινες πλάκες
- Σφίχτηκαν οι κάτω βίδες της κασέτας ηλεκτροφόρησης INGENY, τοποθετήθηκαν τα χτενάκια και σφίχτηκαν και οι υπόλοιπες βίδες του συστήματος

Παρασκευή της πηκτής ακρυλαμίδης: Στη συνέχεια, αναμίχτηκαν τα διαλύματα των αποδιατακτικών ουσιών 0 % και 100 % σε κατάλληλες αναλογίες για την προετοιμασία διαλυμάτων με υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών στο επιθυμητό εύρος. (Πίνακας 2.12)

Πίνακας 2.12: Αναλογία όγκων των διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών 0 και 100 % που πρέπει να αναμειχθούν σε κατάλληλες αναλογίες για την δημιουργία της επιθυμητής βαθμίδωσης αποδιατακτικών ουσιών στο DGGE

| Συγκέντρωση αποδιατακτικών | 100 % | 0 % |
|-------------------------------|----------|----------|
| 45 % | 11,25 mL | 13,75 mL |
| 65 % | 16,25 mL | 8,75 mL |

- Τοποθετήθηκε το διάλυμα με την υψηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών στο αριστερό δοχείο του συστήματος ανάμιξης (Α) και το διάλυμα με τη χαμηλή συγκέντρωση στο δεξί δοχείο (Β) ενώ η βαλβίδα επικοινωνίας μεταξύ των δύο δοχείων ήταν κλειστή (Εικόνα 2.2). Τοποθετήθηκαν μαγνητάκια σε κάθε δοχείο
- Αφού ξεκίνησε η ανάδευση, προστέθηκαν 100 μ L APS (10 %) και 10 μ L TEMED και στα δύο διαλύματα και μετά άνοιξε η αντλία και η βαλβίδα επικοινωνίας μεταξύ των δοχείων. Μόλις προστέθηκαν αυτά τα δύο συστατικά ξεκίνησε ουσιαστικά ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης
- Το διάλυμα άρχισε να φτάνει μέσω του σωλήνα της αντλίας στο εσωτερικό μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Παρασκευή της πηκτής με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών

- Όταν η πηκτή έφτασε λίγο κάτω από τα χτενάκια διακόπηκε η λειτουργία της περισταλτικής αντλίας και η πηκτή αφέθηκε να πολυμεριστεί για περίπου 30 min
- Ακολούθως προστέθηκε το stacker (4 mL/gel από διάλυμα 0 % denaturants, 40 μ L APS, 4 μ L TEMED) για την δημιουργία των κελιών
- Η πηκτή αφέθηκε για τουλάχιστον μία ώρα ώστε να πολυμεριστεί πλήρως η ακρυλαμίδα
- Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, ρυθμίστηκε η θέρμανση στη δεξαμενή του συστήματος με το ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE στους 60 °C

Ηλεκτροφόρηση της πηκτής

- Μόλις ολοκληρώθηκε ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, τοποθετήθηκε η κασέτα INGENY εντός του δοχείου
- Γεμίστηκε η άνω δεξαμενή του συστήματος INGENY με το ρυθμιστό διάλυμα 1X TAE. Απομακρύνθηκαν προσεκτικά τα χτενάκια και πιάστηκε το spacer προς τα κάτω.
- Συνδέθηκαν τα ηλεκτρόδια και έκλεισε η βαλβίδα που ελέγχει την κίνηση του TAE στο άνω τμήμα της δεξαμενής
- Φορτώθηκαν τα προϊόντα PCR (1 μ L DNA με 5 μ L loading buffer). Για τη δημιουργία ladder αναμίχθηκαν 5 μ L από το DNA κάθε βακτηρίου που εμφάνισε αποικοδομητική δράση με dd H₂O και ακολούθησε vortex. Στο DGGE φορτώθηκαν 5 μ L από το μίγμα των βακτηρίων και 5 μ L loading buffer. Συνδέθηκε η συσκευή INGENY με εξωτερική πηγή ισχύος και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 75 V για 16 h.

Βαφή της πηκτής με τη μέθοδο του νιτρικού αργύρου (AgNO_3)

Διαλύματα

| | |
|-----------------------------|---|
| Fixing Solution I: | 10 % αιθανόλη 0,5 % οξικό οξύ |
| Staining Solution: | 1 g AgNO_3 σε 1 L απεσταγμένο νερό Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του |
| Developing Solution: | 0,1 g NaBH_4 1L NaOH 1,5 % 4 mL φορμαλδεΐδη |

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολούθησε η βαφή της πηκτής με τα παραπάνω διαλύματα όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Η πηκτή ξεπλύθηκε ελαφρώς με νερό
- Τοποθετήθηκε σε πλαστικό δοχείο που περιείχε 500 mL Fixing Solution I
- Ακολούθησε ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα για 2 h
- Απομακρύνθηκε το Fixing Solution I, η πηκτή ξεπλύθηκε με νερό και προστέθηκαν στο ίδιο δοχείο 500 mL Staining Solution
- Ακολούθησε ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα για 20 min
- Απομακρύνθηκε το Staining Solution στη βρύση με ροή νερού, η πηκτή ξεπλύθηκε με νερό και προστέθηκαν 500 mL Developing Solution
- Ακολούθησε ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα μέχρι να αρχίσουν να φαίνονται οι ζώνες DNA στην πηκτή
- Όταν ολοκληρώθηκε η εμφάνιση των μπαντών του DNA, απομακρύνθηκε το Developing Solution στη βρύση με ροή νερού και η πηκτή ξεπλύθηκε με νερό
- Τέλος, ακολούθησε η φωτογράφιση της πηκτής

2.18. Δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων

Σε συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, δημιουργήθηκαν βιβλιοθήκες κλώνων από τον 2^ο και 5^ο κύκλο εμπλουτισμού των καλλιιεργειών του SEM και MSMN+ fenamiphos καθώς και από τον 2^ο και 4^ο κύκλο εμπλουτισμού MSMN+oxamyl. Λόγω της σχετικά μακροχρόνιας αποθήκευσης των προϊόντων PCR στους -20 °C πραγματοποιήθηκε προσθήκη πολυ-A ουράς ώστε να βελτιστοποιήσουμε τη διαδικασία ένθεσης στον πλασμιδιακό φορέα. Η προσθήκη πολυ-A ουράς πραγματοποιήθηκε με τον εξής τρόπο:

- Σε 20 μL από το προϊόν PCR προστέθηκαν 1 μL dATP (100 μM) και 0,24 μL Kapa TaqPolymerase
- Τα δείγματα επωάστηκαν στους 72 $^{\circ}\text{C}$ για 15 min

Στην πορεία, ακολούθησε PCR Cleanup με το kit της εταιρείας Macherey – Nagel σύμφωνα με το πρωτόκολλο των κατασκευαστών και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1,2 %. Ακολούθησε ένθεση των προϊόντων σε πλασμιδιακό φορέα pGEM όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω και μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*. Τα δείγματα επιστρώθηκαν σε τριβλία LB + Ampicillin και επωάστηκαν στους 25 $^{\circ}\text{C}$, μέχρι να παρατηρηθεί ανάπτυξη αποικιών. Ακολούθησε επιλογή λευκών αποικιών και εφαρμογή colony-PCR ώστε να διαπιστωθεί η παρουσία του σωστού ενθέματος και παράλληλα η παραλαβή προϊόντων PCR καταλλήλων για αξιολόγηση τους σε σύστημα DGGE. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την colony-PCR καθώς και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες παρουσιάζονται στους Πίνακες 2.12 και 2.13 αντίστοιχα.

Πίνακας 2.12: Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της colony-PCR στα δείγματα DNA από τις καλλιέργειες εμπλουτισμού

| Αντιδραστήρια | Όγκος | Τελική συγκέντρωση |
|---|---------------------|---------------------------------|
| Buffer για Colony PCR (10x) | 1,5 μL | 1x |
| dNTPs (10 mM) | 0,3 μL | 200 μM από το καθένα |
| 357f + GC (20 pmol/ μL) | 0,3 μL | 0,2 μM |
| 534r (20 pmol/ μL) | 0,3 μL | 0,2 μM |
| Πολυμεράση Kapa Taq (1 U/ μL) | 0,06 μL | 1 U/25 μL |
| MgCl ₂ (25 mM) | 0,9 μL | 1,5 mM |
| DNA | Αποικία | 10-50 ng |
| dd H ₂ O | 11,64 μL | |
| Συνολικός Όγκος | 15 μL | |

Πίνακας 2.13: Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες colony-PCR

| | | | |
|-------------------|-------|--------|-----------|
| Αρχική αποδιάταξη | 95 °C | 5 min | |
| Αποδιάταξη | 95 °C | 30 sec | 30 κύκλοι |
| Υβριδοποίηση | 55 °C | 30 sec | |
| Επιμήκυνση | 72 °C | 30 sec | |
| Τελική επιμήκυνση | 72 °C | 5 min | |

Παράλληλα με την colony-PCR, οι επιλεγμένες αποικίες μεταφέρθηκαν σε microtitre plate που περιείχε θρεπτικό μέσο LB + Ampicillin. Το plate επωάστηκε στους 37 °C για 16 h και ακολούθως αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

Τα προϊόντα της colony-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,2 % για την επιβεβαίωση της επιτυχούς ένθεσης. Ακολούθησε, ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της colony-PCR σε σύστημα DGGE, (0,8 µL DNA από κάθε κλώνο + 5 µL loading buffer) σε αντιπαραβολή με το αποτύπωμα των περιβαλλοντικών δειγμάτων από τα οποία λήφθηκαν οι κλώνοι ώστε να διαπιστωθεί σε ποιά ζώνη αντιστοιχεί ο κάθε κλώνος. Ακολούθησε βαφή της πηκτής και σύγκριση της κινητικότητας των κλώνων με το μοριακό αποτύπωμα του δείγματος από το οποίο προήλθαν. Κλώνοι που παρουσίασαν πανομοιότυπη κινητικότητα με ζώνες στο μοριακό αποτύπωμα του εδάφους ή των εμπλουτισμένων καλλιεργειών από τις οποίες προήλθαν, επιλέχθηκαν για να αποσταλούν για αλληλούχιση. Συνήθως τρεις κλώνοι ανά ζώνη απεστάλλησαν προς αλληλούχιση.

Οι κλώνοι που απεστάλλησαν για αλληλούχιση ανακαλλιεργήθηκαν και έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οι αλληλουχίες των επιλεγμένων κλώνων κατατέθηκαν στο Ευρωπαϊκό Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας (EMBL) με τους κωδικούς πρόσβασης FN868333 – FN868374 (fenamiphos) και FN811271-FN811277 (oxamyl).

2.19. Μεταβολισμός των fenamiphos και oxamyl σε υγρές καλλιέργειες και παρακολούθηση της βακτηριακής ανάπτυξης

Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να διαπιστωθεί αν τα βακτήρια που απομονώθηκαν χρησιμοποιούσαν τα δύο νηματοδοκτόνα ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια στις παλιές καλλιέργειες των βακτηρίων με τη μεταφορά 0,5 mL σε νέα θρεπτικά μέσα SEM ή MSMN + Fenamiphos

(10 mg/L) και MSM+N + Oxamyl (10 mg/L). Οι νέες καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα στους 25 °C και στις 150 στροφές/min και η αποδομητική τους ικανότητα επιβεβαιώθηκε με λήψη δειγμάτων στις 2 και 4 ημέρες και ανάλυση σε σύστημα HPLC. Απο αυτή την προκαταρκτική αξιολόγηση παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια παρουσιάζουν το μέγιστο αποδομητικό ρυθμό στις 72 ώρες μετά τον εμβολιασμό των καλλιεργειών.

Ακολούθησε εκ νέου ανακαλλιέργεια των παραπάνω βακτηριακών καλλιεργειών και σε χρόνο 72 ώρες παραλήφθησαν 0,1 mL και εμβολιάστηκαν σε νέες καλλιέργειες SEM+, MSMN+fenamiphos (10 mg/L), MSMN+oxamyl (10 mg/L). Υπήρχαν τρεις επαναλήψεις για κάθε βακτήριο και μέσο ανάπτυξης. Παράλληλα, προετοιμάστηκαν και τρεις επαναλήψεις από κάθε μέσο ανάπτυξης και γεωργικό φάρμακο που δέχτηκαν 0,1 mL από το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο χωρίς βακτηριακά κύτταρα και χρησιμοποιήθηκαν ως αβιοτικοί μάρτυρες. Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε αναδευόμενο επωαστικό θάλαμο στους 25 °C στις 150 στροφές/min. Η διάσπαση των fenamiphos, oxamyl και ο σχηματισμός των αντίστοιχων προϊόντων υδρόλυσής τους (fenamiphos phenol και oxamyl oxime αντίστοιχα) προσδιορίστηκε με την απομάκρυνση δειγμάτων (0,5 mL) από τις υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων στις 4, 8, 12, 24, 32, 48, 72, 96 και 192 h μετά τον εμβολιασμό και προσδιορισμό των υπολειμμάτων σε σύστημα HPLC όπως έχει ήδη περιγραφεί.

Παράλληλα, παρακολουθήθηκε η μεταβολή του βακτηριακού πληθυσμού σε κάθε καλλιέργεια στους ίδους χρόνους με παραπάνω. Έτσι 0,1 mL από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα erpendorfs και αναμίχθηκαν με 900 μ L αποστειρωμένο νερό. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις που οδήγησαν στην δημιουργία διαλυμάτων 10^{-1} - 10^{-7} . Τρεις επαναλήψεις των 200 μ L από τις αραιώσεις των 10^{-4} - 10^{-7} επιστρώθηκαν σε τριβλία NAB που επώαστηκαν στους 25 °C. Ακολούθησε καταμέτρηση των αποικιών τους και υπολογίστηκε ο βακτηριακός πληθυσμός σε colony forming unit/mL καλλιέργειας. Με τον ίδιο τρόπο υπολογίστηκε κάθε φορά ο βακτηριακός πληθυσμός που εμβολιάστηκε στην αρχή της καλλιέργειας.

2.20. Μεταβολισμός των FSO, FSO₂ και FEN-OH

Από διαλύματα FSO, FSO₂ και FEN-OH σε μεθανόλη (1000 mg/L) μεταφέρθηκαν 0,5 mL σε αποστειρωμένα μπουκάλια υπό ασηπτικές συνθήκες και αφέθηκαν να εξατμιστούν εντός τους θαλάμου νηματικής ροής. Με την ολοκλήρωση της εξάτμισης, τα υπολείμματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 50 mL θρεπτικών μέσων SEM και MSM+N ανάλογα με το γεωργικό φάρμακο. Τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα με τα γεωργικά

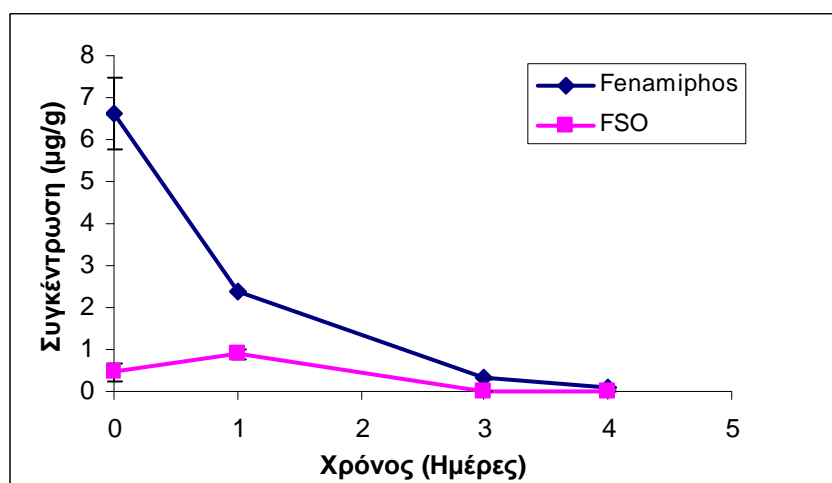
φάρμακα που προέκυψαν (10 mg/L) αφού αναδεύτηκαν, τοποθετήθηκαν για 30 min σε λουτρό υπερήχων (Ultrasonic bath, Elmasonic S30, ELMA) ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατό καλύτερη διαλυτοποίηση των ουσιών. Στη συνέχεια, 10 mL από κάθε θεραπευτικό μέσο τοποθετήθηκαν σε πέντε αποστειρωμένα μπουκάλια (25 mL) μιας χρήσης ώστε να υπάρξουν τρεις επαναλήψεις για κάθε βακτήριο και δύο μάρτυρες χωρίς βακτήρια. Ακολούθησε εμβολιασμός των καλλιιεργειών με τα βακτήρια όπως παραπάνω και ακολούθησε συνεχής λήψη δειγμάτων (0,5 mL) στις 0, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 168 και 240 h για τον έλεγχο της αποδόμησης των FSO, FSO2 και FEN-OH και προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των αντίστοιχων προϊόντων μεταβολισμού τους εάν υπήρχαν. Επίστρωση τριβλίων NAB για τον έλεγχο του βακτηριακού πληθυσμού που εμβολιάστηκε πραγματοποιήθηκε μόνο για τον χρόνο 0.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

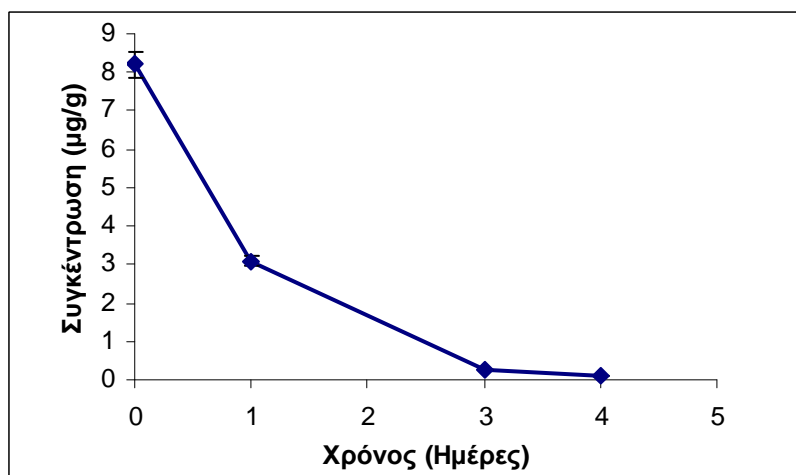
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποδόμηση των fenamiphos και oxamyl στο έδαφος

Τα δύο νηματοδοκτόνα αποδομήθηκαν ταχύτατα στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από αγρό μπανανοκαλλιέργειας με ιστορικό χρήσης των δύο γεωργικών φαρμάκων κατά τα τελευταία έξι έτη. Έτσι, τέσσερις ημέρες μετά την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων (10 $\mu\text{g/g}$) είχε ολοκληρωθεί η διάσπαση των fenamiphos (Διαγράμματα 3.1) και oxamyl (Διάγραμμα 3.2). Η διάσπαση του fenamiphos συνοδεύτηκε από παραγωγή χαμηλών συγκεντρώσεων του FSO με μέγιστη συγκέντρωση $< 1 \mu\text{g/g}$ μία ημέρα μετά την εφαρμογή του fenamiphos (Διάγραμμα 3.1). Ακολούθως το FSO αποδομήθηκε πλήρως εντός 3 ημερών. Ανίχνευση του μεταβολίτη FSO₂ δεν παρατηρήθηκε.



Διάγραμμα 3.1: Η αποδόμηση του fenamiphos σε δείγμα εδάφους που είχε ιστορικό επαναλαμβανόμενων εφαρμογών και σχηματισμός του οξειδωμένου μεταβολίτη FSO.



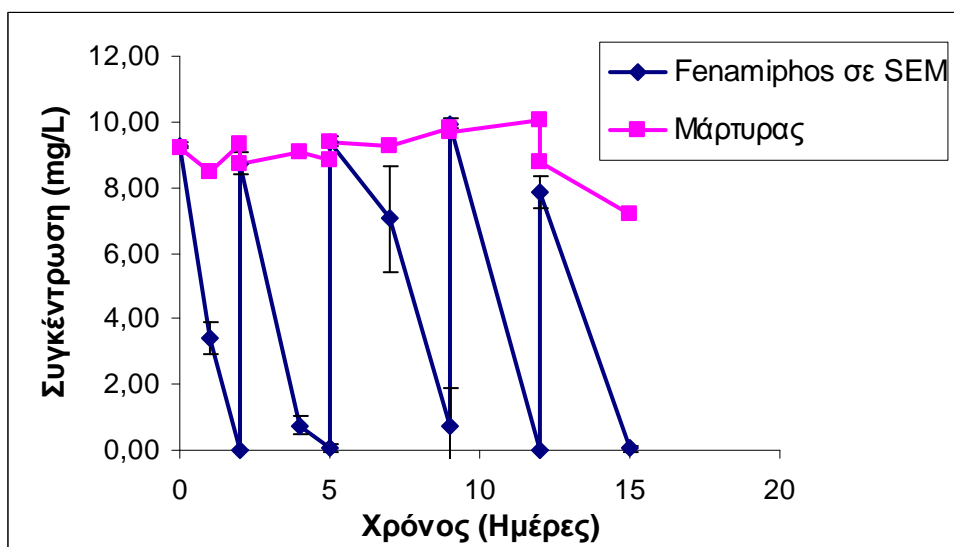
Διάγραμμα 3.2: Η αποδόμηση του oxamyl σε δείγμα εδάφους που είχε ιστορικό επαναλαμβανόμενων εφαρμογών.

3.2. Αποδόμηση των fenamiphos και oxamyl στις καλλιέργειες εμπλουτισμού

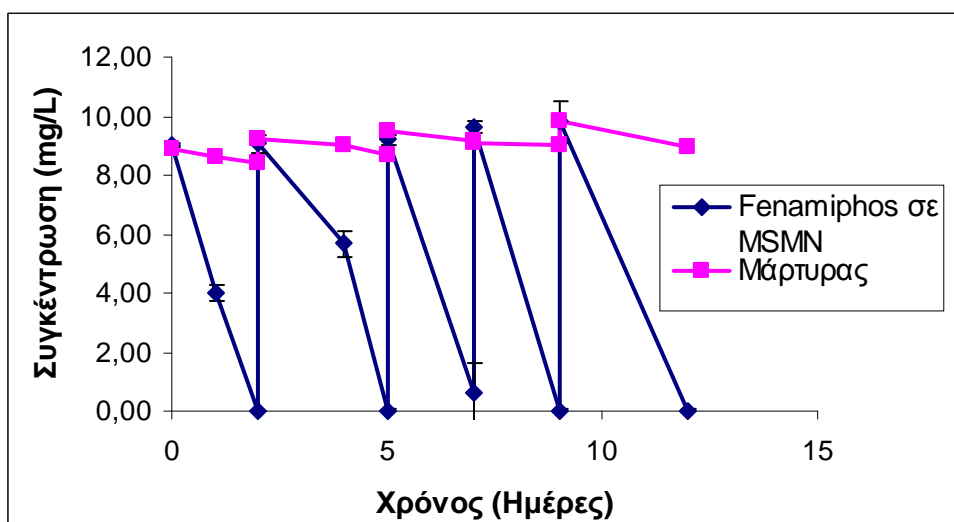
Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος αποδόμησης των νηματωδοκτόνων στο έδαφος, ξεκίνησε η διαδικασία εμπλουτισμού, για την απομόνωση των αποδομητικών βακτηρίων. Έτσι λοιπόν, μελετήθηκε η αποδόμηση των νηματωδοκτόνων στα θρεπτικά μέσα SEM και MSM+N (10 mg/L) σε όλους τους κύκλους εμπλουτισμού. Η αποδόμηση των fenamiphos και oxamyl στα δύο υγρά θρεπτικά μέσα μετά τον εμβολιασμό τους με έδαφος ήταν ταχεία και όταν η αποδόμηση έφτασε στο 80 % περίπου, οι καλλιέργειες περνούσαν στον επόμενο κύκλο εμπλουτισμού (Διαγράμματα 3.3, 3.4, 3.5, και 3.6).

Η αποδόμηση του fenamiphos και στα δύο θρεπτικά μέσα ήταν ελαφρώς ταχύτερη από αυτή του oxamyl. Έτσι η αποδόμηση του fenamiphos ολοκληρώθηκε εντός 48 h στον πρώτο κύκλο εμπλουτισμού (Διαγράμματα 3.3 & 3.4) ενώ αντίθετα στο ίδιο χρόνο είχε αποδομηθεί το 80 % του oxamyl (Διαγράμματα 3.5 & 3.6). Ο δεύτερος κύκλος εμπλουτισμού εμφάνισε πιο αργό ρυθμό αποδόμησης εκτός από την καλλιέργεια SEM + fenamiphos όπου η αποδόμηση του fenamiphos ολοκληρώθηκε και πάλι εντός 48 h. Στον τρίτο κύκλο εμπλουτισμού τον πιο ταχύ ρυθμό αποδόμησης εμφάνισε η καλλιέργεια του MSM+N + fenamiphos όπου και πάλι η αποδόμηση του νηματωδοκτόνου είχε ολοκληρωθεί σε 48 h. Αντίθετα, στις υπόλοιπες καλλιέργειες το 80 % της αρχικής ποσότητας fenamiphos αποδόμηθηκε σε 72 h. Τους ίδιους ακριβώς ρυθμούς αποδόμησης εμφάνισε και ο τέταρτος κύκλος εμπλουτισμού. Στον πέμπτο κύκλο εμπλουτισμού η αποδόμηση του fenamiphos και στα δύο θρεπτικά μέσα ήταν σχεδόν πλήρης στις 72 h, ενώ την ίδια χρονική στιγμή η καλλιέργεια SEM + Oxamyl εμφάνισε αποδόμηση της τάξης του

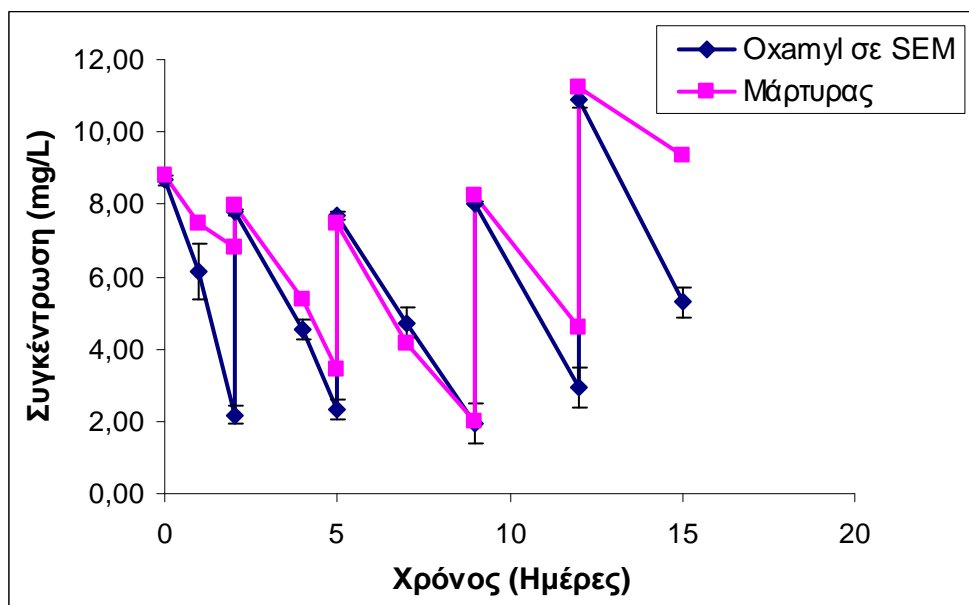
50 %. Η καλλιέργεια MSM+N + Oxamyl παρέμεινε στον 4^ο κύκλο εμπλουτισμού μιας και παρουσίαζε το βραδύτερο ρυθμό αποδόμησης σε σχέση με τις υπόλοιπες. Σημαντική αποδόμηση παρατηρήθηκε και στις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες (μάρτυρες) SEM + Oxamyl. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το νηματωδοκτόνο oxamyl είναι ασταθές στο θρεπτικό μέσο SEM.



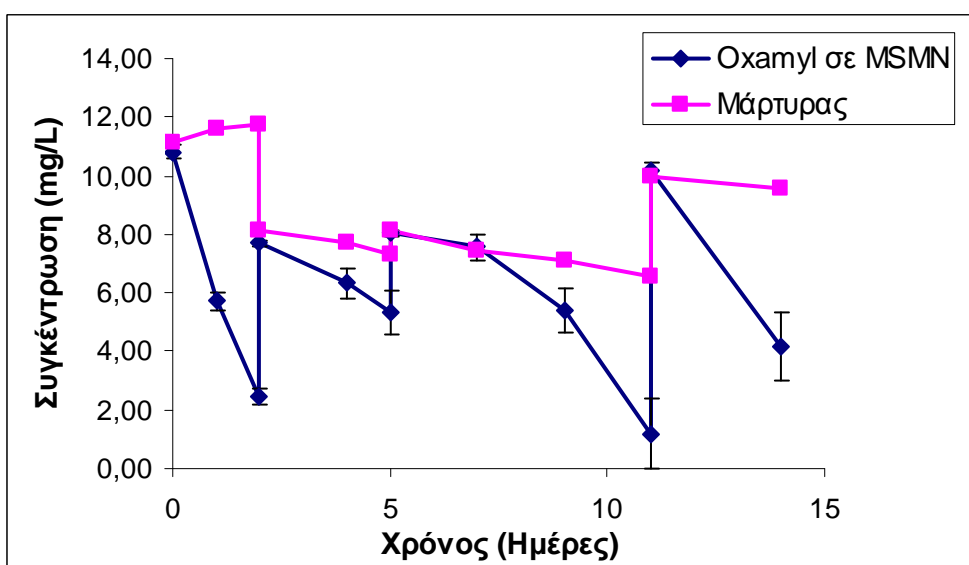
Διάγραμμα 3.3: Η αποδόμηση του fenamiphos στους πέντε κύκλους εμπλουτισμού στο θρεπτικό μέσο SEM καθώς και σε μη εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο SEM (Μάρτυρας) . Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.4: Η αποδόμηση του fenamiphos στους πέντε κύκλους εμπλουτισμού σε θρεπτικό μέσο MSM+N καθώς και σε μη εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο MSM+N (Μάρτυρας). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.5: Η αποδόμηση του oxamyl στους πέντε κύκλους εμπλουτισμού στο θρεπτικό μέσο SEM καθώς και σε μη εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο SEM (Μάρτυρας). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.6: Η αποδόμηση του oxamyl στους τέσσερις κύκλους εμπλουτισμού στο θρεπτικό μέσο MSM+N καθώς και σε μη εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο MSM+N (Μάρτυρας). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

3.3. Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν τα fenamiphos και oxamyl

Από τις 100 αποικίες που επιλέχθηκαν συνολικά από τα τριβλία SEM + Fenamiphos/Oxamyl και MSM+N + Fenamiphos/Oxamyl μόνο επτά παρουσίασαν υψηλή αποδομητική ικανότητα για τα γεωργικά φάρμακα και τα αποδόμησαν πλήρως εντός 17 ημερών. Πιο συγκεκριμένα, το ένα βακτηριακό στέλεχος προερχόταν από την καλλιέργεια SEM + Fenamiphos (στέλεχος 1), το άλλο βακτηριακό στέλεχος προερχόταν από την καλλιέργεια MSM+N + Fenamiphos (στέλεχος 21) και τα άλλα πέντε βακτηριακά στελέχη προέρχονταν από την καλλιέργεια MSM+N + Oxamyl (στελέχη 3, 17, 18, 20 και 25) (Πίνακας 3.1). Στις υπόλοιπες καλλιέργειες αλλά και στους μη εμβολιασμένους μάρτυρες δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση των δύο γεωργικών φαρμάκων εντός των 17 ημερών. Εξαίρεση αποτέλεσαν όλες οι καλλιέργειες SEM + Oxamyl (εμβολιασμένες και μάρτυρες) που εμφάνισαν πλήρη αποδόμηση. Για το λόγο αυτό, δεν έγινε επιλογή αποικιών από το υπόστρωμα SEM + oxamyl.

Πίνακας 3.1: Αποδόμηση των fenamiphos και oxamyl από τα απομονωθέντα βακτήρια σε SEM +/ή MSM+N + Fenamiphos και MSM+N + Oxamyl * Δ.Α. = Δεν Ανιχνεύθηκε

| Χρόνος (ημέρες) | SEM | MSM+N | MSM+N | | | | |
|--------------------|----------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Συγκέντρωση fenamiphos (mg/L) | | Συγκέντρωση oxamyl (mg/L) | | | | |
| | Στέλεχος 1 | Στέλεχος 21 | Στέλεχος 3 | Στέλεχος 17 | Στέλεχος 18 | Στέλεχος 20 | Στέλεχος 25 |
| 0 | 7,05 | 9,28 | 9,94 | 9,94 | 9,94 | 9,94 | 9,94 |
| 7 | 2,22 | 8,33 | 5,50 | 7,53 | 5,14 | 7,73 | 0,83 |
| 17 | Δ.Α.* | Δ.Α. * | Δ.Α. * | 0,57 | 0,58 | 0,33 | Δ.Α. * |

Από την ανάπτυξη των επτά στελεχών σε θρεπτικό μέσο NAB, παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος 3 δεν ήταν αμιγές αλλά μίγμα δύο μορφολογικά διαφορετικών αποικιών. Τα υπόλοιπα στελέχη ήταν αμιγή και η μορφολογική τους περιγραφή παρουσιάζεται στον

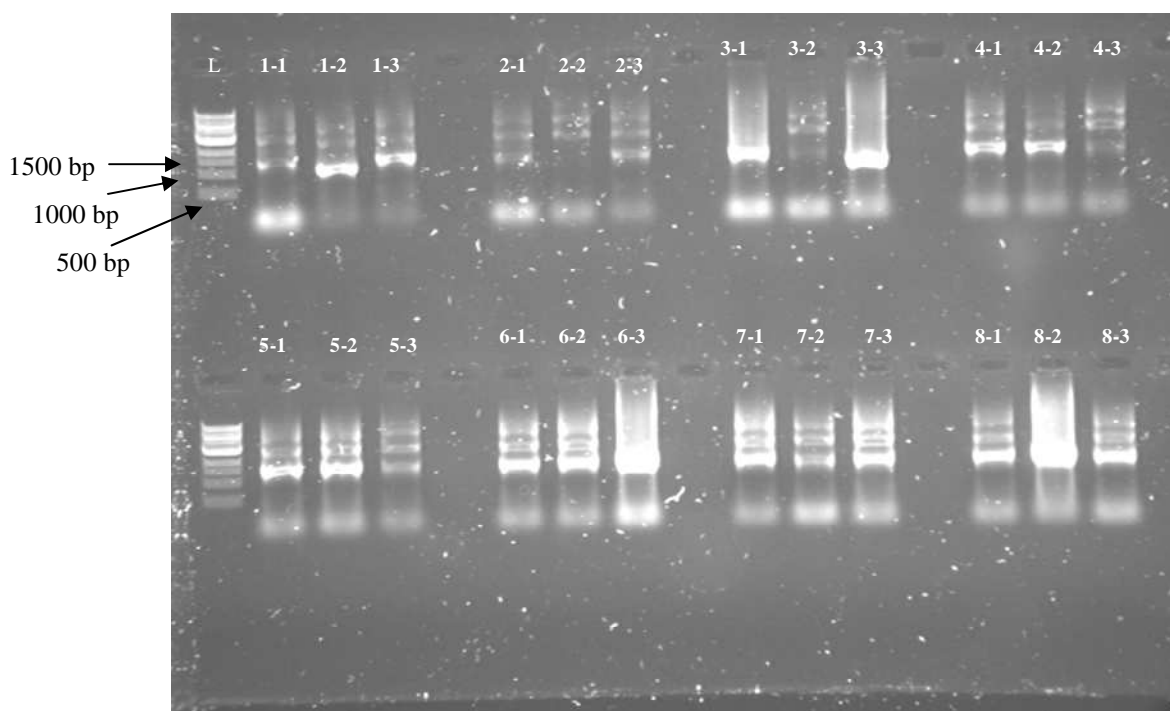
Πίνακα 3.2. Οι διακριτές αποικίες από κάθε στέλεχος διαχωρίστηκαν και η αποδομητική τους δραστηριότητα μελετήθηκε σε νέες υγρές καλλιέργειες των θρεπτικών μέσων SEM και MSM+N. Όλες τα βακτηριακά στελέχη κατάφεραν να αποδομήσουν πλήρως τα δύο νηματώδοκτόνα σε διάστημα επτά ημερών.

Πίνακας 3.2: Μορφολογία των βακτηρίων που απομονώθηκαν και αποδομούν τα fenamiphos και oxamyl

| Απομονώσεις | Μορφολογία σε NAB |
|-------------|---|
| Στέλεχος 1 | κρεμώδης, θαμπή, στρογγυλή, μεγάλη |
| Στέλεχος 21 | κρεμώδης, θαμπή, στρογγυλή, μέτριο μέγεθος |
| Στέλεχος 3α | διαφανής, μικρή |
| Στέλεχος 3β | θαμπή, θολή |
| Στέλεχος 17 | κρεμώδης, θαμπή, θολή, στρογγυλή, μεγάλη |
| Στέλεχος 18 | θαμπή, οδοντωτή στις άκρες, απροσδιόριστο σχήμα |
| Στέλεχος 20 | θαμπή, οδοντωτή στις άκρες, απροσδιόριστο σχήμα |
| Στέλεχος 25 | κρεμώδης, θαμπή, θολή, στρογγυλή |

3.4. Ταυτοποίηση των βακτηρίων που αποδομούν τα fenamiphos και oxamyl

Ακολούθησε εξαγωγή DNA από τις αμιγείς καλλιέργειες των βακτηρίων, PCR ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA (1500 bp), καθαρισμός των PCR προϊόντων, ένθεση σε πλασμιδιακό φορέα, μετασχηματισμός σε δεκτικά βακτήρια *E. coli* και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε επίσης και για τη μική καλλιέργεια που εμφάνισε αποδομητική δράση του oxamyl (στέλεχος 3) αφού διαχωρίστηκαν πρώτα οι δύο διαφορετικές αποικίες, χωρίς προηγουμένως να αξιολογηθεί η αποδομητική ικανότητα των επιμέρους στελεχών (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 0,8 % δειγμάτων πλασμιδιακού DNA από τρεις επαναλήψεις των απομονώσεων. Στέλεχος 3α (1-1,1-2,1-3), 3β (2-1,2-2,2-3), 17 (3-1,3-2,3-3), 18 (4-1,4-2,4-3), 20 (5-1,5-2,5-3), 25 (6-1,6-2,6-3), 1 (7-1,7-2,7-3) και 21 (8-1,8-2,8-3). Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μ L DNA. Τα παραπάνω δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση.

Ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδίου 16S rRNA των δύο βακτηρίων που αποδομούσαν το fenamiphos και ομοπαράθεσή τους στη βάση δεδομένων EMBL έδειξε ότι το στέλεχος 1 ανήκε στο γένος *Pseudomonas* και παρουσίασε υψηλή ομολογία (99,5 %) με το στέλεχος *P. putida* F1 (Accession No. CP000712), ενώ το στέλεχος 21 ανήκε στο γένος *Acinetobacter* και παρουσίασε υψηλότερη ομολογία (99,7 %) με το στέλεχος *A. rhizosphaerae* BIHB723 (Accession No. DQ536511).

Από την άλλη μεριά, ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA των τεσσάρων βακτηρίων (σε αμιγή καλλιέργεια) που αποδομούσαν το oxamyl και ομοπαράθεσή τους με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων EMBL, έδειξε ότι τα απομονωθέντα βακτήρια παρουσίασαν υψηλή ομολογία (>99 %) με το 16S rRNA γονίδιο διαφορετικών στελεχών του γένους *Pseudomonas*. Επιπρόσθετα ομοπαράθεση των αλληλουχιών του 16S rRNA γονιδίου των τεσσάρων βακτηριακών στελεχών μέσω του ClustalW, έδειξε ότι τα στελέχη 18 και 25 που και τα δύο παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία με στελέχη του είδους *P. putida*, παρουσίαζαν διαφορές μόνο σε 3 bp στο

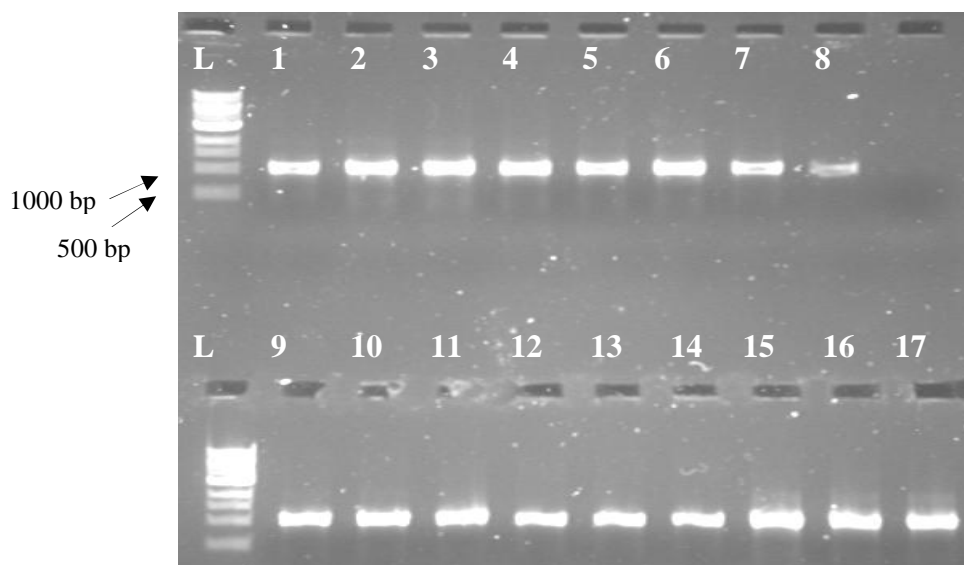
σύνολο της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA. Αντιθέτως, το στέλεχος 17 δεν παρουσίασε εκτεταμένη ομολογία με τα στελέχη 18 και 25. Ομοίως, το στέλεχος 20 έδειξε υψηλότερη ομολογία με την αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου ενός στελέχους του είδους *P. jinjuensis* και διέφερε εμφανώς στην αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA από τα υπόλοιπα στελέχη. Τέλος, τα στελέχη που αποτελούσαν την μικτή καλλιέργεια 3, 3α και 3β, παρουσίασαν υψηλή ομολογία με βακτηριακά στελέχη των γένων *Pseudomonas* sp. και *Arthrobacter* sp. αντίστοιχα (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3: Ταυτοποίηση των απομονωθέντων βακτηρίων που εμφάνισαν αποδομητική δράση για τα γεωργικά φάρμακα fenamiphos και oxamyl

| Αποδομητικά βακτήρια Fenamiphos | Υψηλότερη ομολογία αλληλουχίας (%) | Accession No. |
|--|---|--------------------------|
| Στέλεχος 1 (SEM) | <i>Pseudomonas putida</i> σειρά F1 (99,4) | CP000712 |
| Στέλεχος 21 (MSM+N) | <i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> BIHB723 (99,7) | DQ536511 |
| Αποδομομητικά βακτήρια Oxamyl | | |
| Στέλεχος 3α | <i>Pseudomonas</i> sp. σειρά S-JS-8 (99,6) | FJ529034 |
| Στέλεχος 3β | <i>Arthrobacter</i> sp. σειρά AD26 (98,7) | EF623831 |
| Στέλεχος 17 | <i>Pseudomonas</i> sp. σειρά BFXJ-8 (99,4) | EU013945 |
| Στέλεχος 18 | <i>Pseudomonas putida</i> σειρά GB-1 (99,6) | CP000926 |
| Στέλεχος 20 | <i>Pseudomonas jinjuensis</i> σειρά Pss26 (99,7) | AF468448 |
| Στέλεχος 25 | <i>Pseudomonas putida</i> σειρά Ostw3 (99,6) | EU439422 |

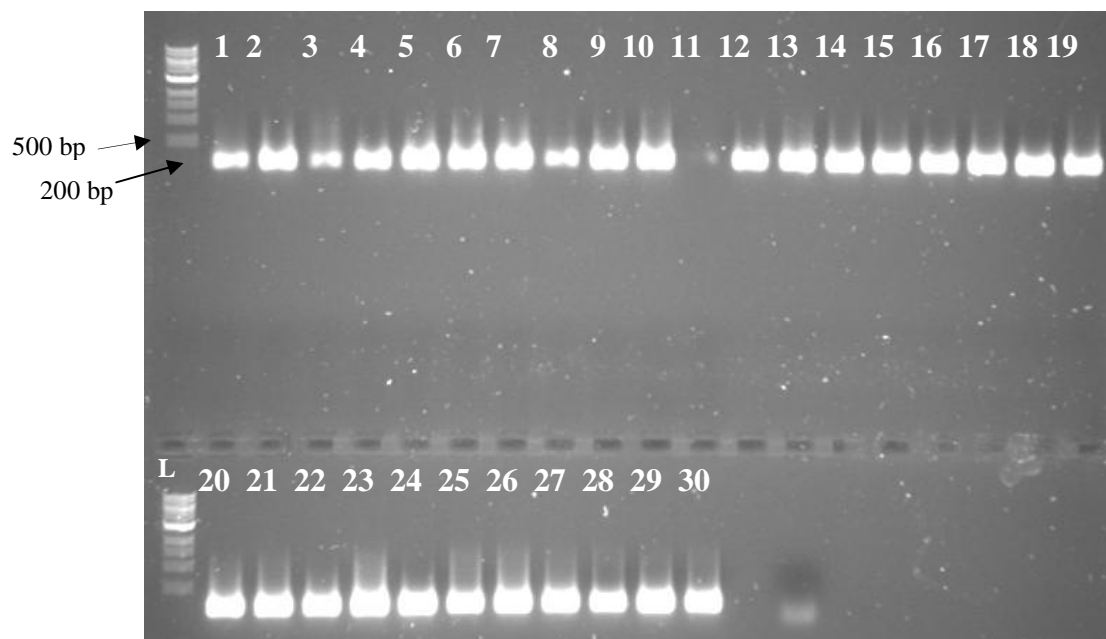
3.5. PCR με το DNA των εδαφών και των εμπλουτισμένων καλλιεργειών

PCR ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου των βακτηρίων που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδάφους καθώς και από τους κύκλους των εμπλουτισμένων καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές 63f και 1087r και οδήγησαν στην ενίσχυση ενός τμήματος DNA μεγέθους 1000 bp (Εικόνα 3.2).

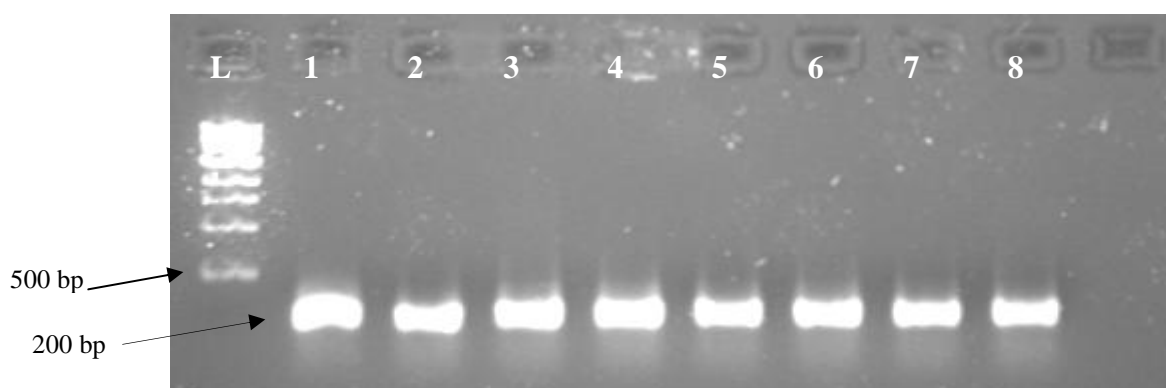


Εικόνα 3.2: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1 % PCR προϊόντων που προήλθαν από την ενίσχυση του 16S rRNA γονίδιο της βακτηριακής κοινότητας των κύκλων ανακαλλιέργειας των εμπλουτισμένων καλλιιεργειών MSM+N + Fenamiphos και MSM+N + Oxamyl με τους εκκινητές 63f-1087r. L: λ 1000 bp DNA Ladder, Γραμμές 1-2: δείγματα καλλιέργειας fenamiphos (2^{ος} κύκλος), 3-4: δείγματα καλλιέργειας fenamiphos (3^{ος} κύκλος), 5-6: δείγματα καλλιέργειας fenamiphos (4^{ος} κύκλος), 7-8 δείγματα καλλιέργειας fenamiphos (5^{ος} κύκλος), 9-11: δείγματα καλλιέργειας oxamyl (2^{ος} κύκλος), 12-14: δείγματα καλλιέργειας oxamyl (3^{ος} κύκλος), 15-17: δείγματα καλλιέργειας oxamyl (4^{ος} κύκλος). Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μL προϊόντος PCR.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR εσωτερικής ένθεσης σε όλα τα δείγματα DNA για την ενίσχυση της V3 μεταβλητής περιοχής του 16S rDNA των βακτηρίων. Τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση DGGE. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι Muzer F (357f-GC) και Muzer R (534r) οι οποίοι είναι εσωτερικοί των 63f-1087r και το προϊόν της αντίδρασης είναι περίπου 194 bp (Εικόνες 3.3, 3.4).



Εικόνα 3.3: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1,2 % PCR προϊόντων που προήλθαν από την ενίσχυση της V3 περιοχής του 16S rRNA γονιδίου της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους και των κύκλων ανακαλλιέργειας των εμπλουτισμένων καλλιιεργειών SEM + και MSM+N + Fenamiphos. L: λ 1000 bp DNA Ladder, Γραμμές 1-3: δείγματα εδάφους ενισχυμένου με fenamiphos, 4-6: δείγματα εδάφους ενισχυμένου με oxamyl, 7-9: δείγματα καλλιέργειας SEM + Fenamiphos (2^{ος}), 10-12: δείγματα καλλιέργειας SEM + Fenamiphos (3^{ος}), 13-15: δείγματα καλλιέργειας SEM + Fenamiphos (4^{ος}), 16-18: δείγματα καλλιέργειας SEM + Fenamiphos (5^{ος}), 19-21: δείγματα καλλιέργειας MSMN + Fenamiphos (2^{ος}), 22-24: δείγματα καλλιέργειας MSMN + Fenamiphos (3^{ος}), 25-27 δείγματα καλλιέργειας MSMN + Fenamiphos (4^{ος}), 28-30: δείγματα καλλιέργειας MSMN + Fenamiphos (5^{ος}). Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μL προϊόντος PCR.



Εικόνα 3.4: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1,2 % PCR προϊόντων που προήλθαν από την ενίσχυση της V3 περιοχής του 16S rRNA γονιδίου των αρχικά απομονωθέντων βακτηρίων με την αποδομητική ικανότητα. L: λ 1000 bp DNA Ladder, Γραμμές 1: Στέλεχος 3α (*Pseudomonas* sp.), 2: Στέλεχος 3β (*Arthrobacter* sp.), 3: Στέλεχος 17 (*Pseudomonas* sp.), 4: Στέλεχος 18 (*Pseudomonas putida*), 5: Στέλεχος 20

(*Pseudomonas jinjuensis*), 6: Στέλεχος 25 (*Pseudomonas putida*), 7: Στέλεχος 1 (*Pseudomonas putida*), 8: Στέλεχος 21 (*Acinetobacter rhizosphaerae*). Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μ L προϊόντος PCR.

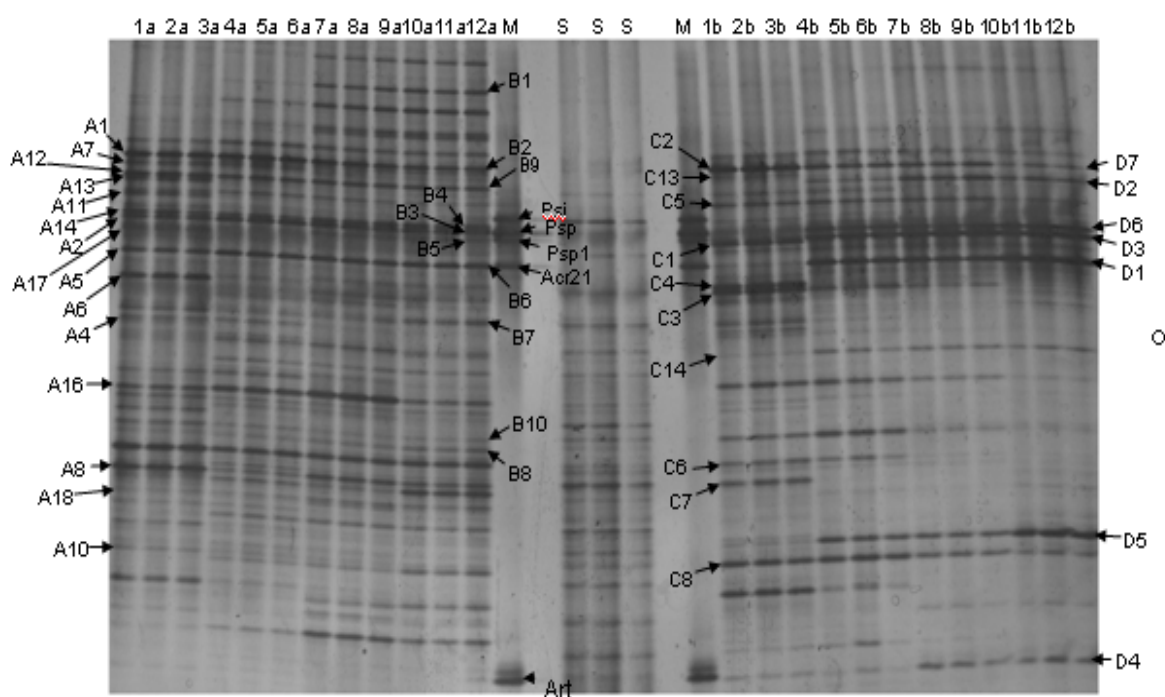
3.6. Μοριακή αποτύπωση DGGE της βακτηριακής κοινότητας των εδαφών και των εμπλουτισμένων καλλιεργειών που αποδοθούν το fenamiphos

Μοριακή αποτύπωση DGGE της βακτηριακής κοινότητας έδειξε σημαντικές μεταβολές στη δομή της κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εμπλουτισμού. Αρκετές ζώνες που ήταν εμφανείς και στο αποτύπωμα της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους ή στους πρώτους κύκλους εμπλουτισμού, έγιναν λιγότερο κυρίαρχες ή εξαφανίστηκαν πλήρως κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού και αυτό ήταν εμφανές και στα δύο θρεπτικά μέσα (Εικόνα 3.5). Πράγματι, οι ζώνες A4, A6, A7, A8, A10, A11, A13 και A16 οι οποίες ήταν κυρίαρχες στο αποτύπωμα του 2^{ου} κύκλου εμπλουτισμού στο SEM έγιναν λιγότερο έντονες και εντέλει εξαφανίστηκαν από το αποτύπωμα στον τελευταίο κύκλο εμπλουτισμού, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε και για την απόμονωση των βακτηρίων. Ανάμεσα σε αυτές, οι ζώνες A8, A13 και A16 ήταν επίσης παρούσες στο αποτύπωμα της εδαφικής βακτηριακής κοινότητας. Σύμφωνα με τις βιβλιοθήκες κλώνων που δημιουργήθηκαν, οι κλώνοι που είχαν ταυτόσημη DGGE κινητικότητα με τις προηγουμένως αναφερθείσες ζώνες έδειξαν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία τους με διαφορετικά είδη του γένους *Pseudomonas* (A4, A6, A7, A13), α-πρωτεοβακτήρια (A8, A16), b-πρωτεοβακτήρια (A10) και *Bacteroidetes* (A11) (Πίνακας 3.4). Οι ζώνες C1-C8 και C13 που ήταν κυρίαρχες στο αποτύπωμα της βακτηριακής κοινότητας στον 2^ο κύκλο εμπλουτισμού στο θρεπτικό μέσο MSM+N εξαφανίστηκαν κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού (Εικόνα 3.6). Ανάμεσα σε αυτές, οι ζώνες C3, C6, C7 και C8 ήταν επίσης ορατές στο αποτύπωμα της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους. Οι κλώνοι που σχετίζονται με τις προαναφερθείσες ζώνες έδειξαν υψηλότερη ομολογία με στελέχη του γένους *Pseudomonas* (C1, C2, C3 και C5), α-πρωτεοβακτήρια (C6, C7) και b-πρωτεοβακτήρια της τάξης *Burkholderiales* (C4, C8 και C13) (Πίνακας 3.4).

Από την άλλη πλευρά, οι ζώνες B1 και B8 στο SEM και C14, D1-D6 στο MSM+N, ενισχύθηκαν κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού (Εικόνα 3.5). Από τις παραπάνω ζώνες, οι C14 και D5 ήταν επίσης παρούσες στο αποτύπωμα της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους. Οι κλώνοι που σχετίζονται με τις ζώνες B1 και B8 έδειξαν υψηλή ομολογία με στελέχη των γενών *Pedobacter* sp. (97.3%) και *Brevundimonas* sp. (99.9%) αντίστοιχα (Πίνακας 3.4). Επιπλέον, οι ζώνες C14 και D1-D6 έδειξαν υψηλή ομολογία με βακτήρια

των γενών *Hydrogenophaga* (C14), *Acinetobacter* (D1 και D2), *Pseudomonas* (D3 και D6) και *Hyphomicrobium* (D5).

Από τις ζώνες που ενισχύθηκαν κατά τον εμπλουτισμό, οι D1 στο MSM+N και B5 στο SEM έδειξαν ταυτόσημη DGGE κινητικότητα με τα απομονωθέντα βακτήρια *A. rhizosphaerae* στέλεχος 21 and *P. putida* στέλεχος 1 στα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα (Εικόνα 3.5). Η αλληλούχιση των κλώνων που εμφάνισαν τη ίδια κινητικότητα με αυτές τις ζώνες έδειξαν υψηλή ομολογία με στελέχη που ανήκουν στα γένη *Acinetobacter* (100%) και *Pseudomonas* (99.6%) (Πίνακας 3.4). Σύγκριση του αποτυπώματος DGGE της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους και των εμπλουτισμένων καλλιεργειών με την κινητικότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν καταδεικνύει ότι οι ζώνες DGGE των απομονωθέντων βακτηρίων δεν είναι παρούσες στο αποτύπωμα της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους αλλά ενισχύονται κατά την διάρκεια του εμπλουτισμού (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Ανάλυση DGGE της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος (Γραμμές S), και στα θρεπτικά μέσα SEM (Γραμμές 1a – 12a) και MSMN (Γραμμές 1b -12b). Γραμμές 1-3, 4-6, 7-9 και 10-12: 2^{ος}, 3^{ος}, 4^{ος} και 5^{ος} κύκλος εμπλουτισμού αντίστοιχα. Γραμμές M : βακτηριακός μάρτυρας που περιείχε 20 ng/mL των PCR προϊόντων του 16S rRNA των βακτηρίων όπως παρουσιάζονται από πάνω προς τα κάτω: *Pseudomonas jinjuensis* (Psj), *P. putida* (Psp), *P. putida* στέλεχος 1 (Psp1), *A. rhizosphaerae* στέλεχος 21 (Acr21) και *Arthrobacter* sp (Art). Τα βέλη δείχνουν τις ζώνες για τις οποίες αντίστοιχοι κλώνοι αλληλουχήθηκαν και η ομολογία τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4: Ταυτοποίηση των επιλεγμένων DGGE ζωνών όπως αυτές αναφέρονται στην Εικόνα 3.5. Οι ομολογία βασίζεται σε αλληλουχίες συνολικού μεγέθους 800 bp του 16S rRNA γονιδίου.

| DGGE ζώνη | Βιβλιοθήκη κλώνων | Υψηλότερη ομολογία αλληλουχίας (%) ^a | Accession no. |
|--------------|----------------------|--|------------------|
| A1 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas mendocina</i> (98.9) | FJ607998 |
| A2 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas</i> sp. strain 1-7 (99.4) | EF675623 |
| A4 | SEM 2 ⁰⁵ | Uncultured α -proteobacterium clone (98.1) | AY921775 |
| A5 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas plecoglossida</i> N1 (99.9) | FM992407 |
| A6 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas resinovorans</i> P1 (99.1) | EU497964 |
| A7 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas</i> sp. LPPA (93.2) | FM865870 |
| A8 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Novosphingobium tardaugens</i> (95.9) | NR028630 |
| A10 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Cupriavidus</i> sp. (99.8) | EU580710 |
| A11 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Pedobacter ginsengisoli</i> (94.2) | AB245371 |
| A12 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Brevundimonas</i> sp. (99.9) | DQ825664 |
| A13 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas</i> sp. HRB9 (97.3) | DQ973489 |
| A14 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas bombori</i> (99.0) | AM114531 |
| A16 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Bosea thiooxidans</i> (99.4) | FN392632 |
| A17 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Bdelovibrio stolpii</i> (97.5) | AJ288899 |
| A18 | SEM 2 ⁰⁵ | <i>Lysobacter cookii</i> (97.6) | AB485771 |
| B1 | SEM 5 ⁰⁵ | <i>Pedobacter nyackensis</i> (97.3) | EU030686 |
| B2 | SEM 5 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas</i> sp. FY1 (99.2) | FJ534637 |
| B3 | SEM 5 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas</i> sp. W15Feb18 (96.8) | EU681002 |
| B4 | SEM 5 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas putida</i> PL2 (100) | FJ204928 |
| B5 | SEM 5 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas putida</i> PL2 (99.6) | FJ204928 |

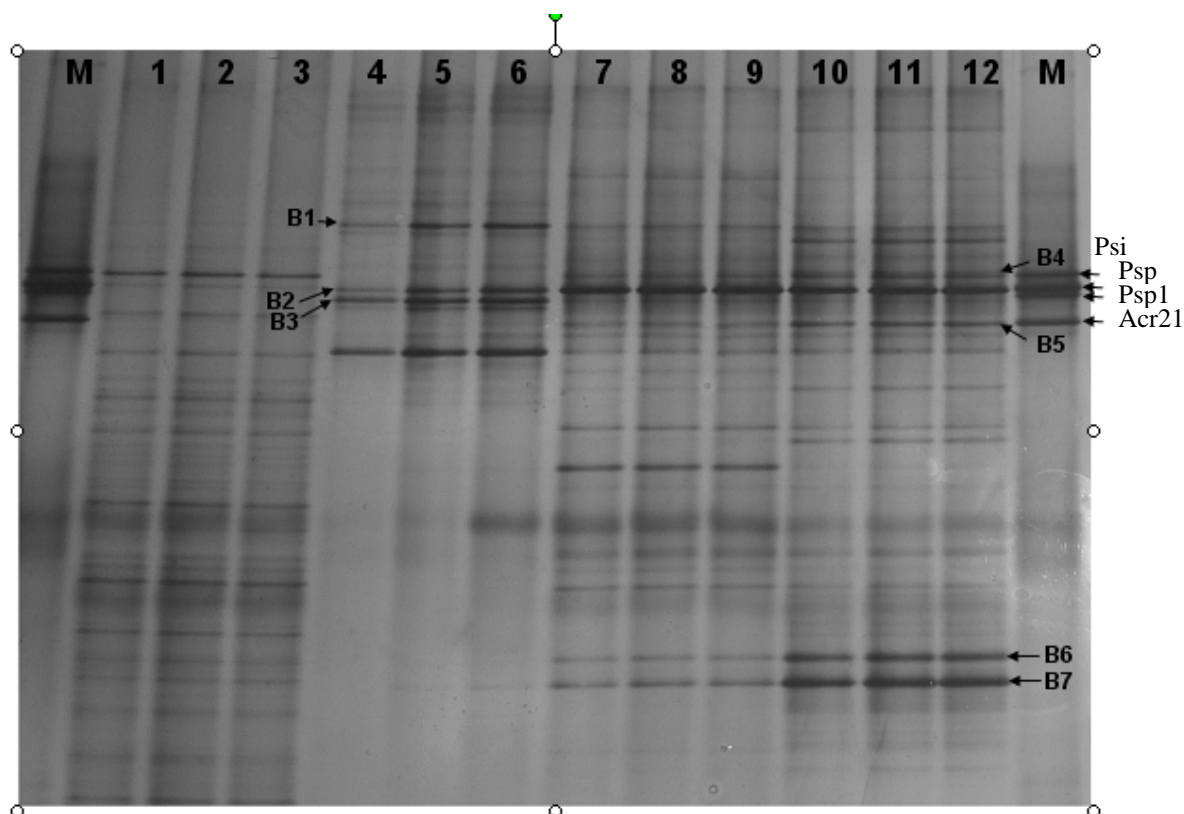
| | | | |
|-----|----------------------|---|----------|
| B6 | SEM 5 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas</i> sp. JPM-2009-2 (100) | FM992407 |
| B7 | SEM 5 ⁰⁵ | Uncultured bacterium clone (93.5) | AY050590 |
| B8 | SEM 5 ⁰⁵ | <i>Brevundimonas</i> sp. R2A20-7 (99.9) | DQ825664 |
| B9 | SEM 5 ⁰⁵ | Marine proteobacterium (99.8) | AM423076 |
| B10 | SEM 5 ⁰⁵ | Uncultured γ -proteobacterium (98.0) | EF650928 |
| C1 | MSMN 2 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas</i> sp. K2-OAIF3 (99.6) | FJ688378 |
| C2 | MSMN 2 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas</i> sp. FY1 (99.3) | FJ534637 |
| C3 | MSMN 2 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas resinovorans</i> LAM9 (98.9) | EU019983 |
| C4 | MSMN 2 ⁰⁵ | <i>Acidovorax</i> 'smarlab 133815' (99.7) | AY093698 |
| C5 | MSMN 2 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas</i> sp. T10(2009) (100) | FJ765354 |
| C6 | MSMN 2 ⁰⁵ | <i>Brevundimonas</i> sp. AbaT2 (99.8) | FJ605405 |
| C7 | MSMN 2 ⁰⁵ | <i>Sphingomonas</i> sp. SIA181-1A1 (98.4) | EF663967 |
| C8 | MSMN 2 ⁰⁵ | <i>Cupriavidus</i> sp. NP213b (99.9) | EU580710 |
| C13 | MSMN 2 ⁰⁵ | <i>Variovorax</i> sp. (98.7) | DQ118732 |
| C14 | MSMN 2 ⁰⁵ | <i>Hydrogenophaga</i> sp. Gsoil1545 (99.6) | AB271047 |
| D1 | MSMN 5 ⁰⁵ | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> LVH5820 (100) | FJ867364 |
| D2 | MSMN 5 ⁰⁵ | <i>Acinetobacter</i> sp. 2CGa-13 (100) | GU138160 |
| D3 | MSMN 5 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas</i> sp. NyZ402 (95) | GU136734 |
| D4 | MSMN 5 ⁰⁵ | Bacterium SBOSA-1 (90.2) | EU476062 |
| D5 | MSMN 5 ⁰⁵ | <i>Hyphomicrobium vulgare</i> (98.1) | Y14302 |
| D6 | MSMN 5 ⁰⁵ | <i>Pseudomonas putida</i> 511ANH | AF307869 |
| D7 | MSMN 5 ⁰⁵ | Uncultured γ -proteobacterium clone (95.4) | GQ984311 |

3.7. Μοριακή αποτύπωση DGGE της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος και στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες που αποδομούν το oxamyl

Μοριακή αποτύπωση DGGE της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των βακτηρίων που αποδομούν το oxamyl καθώς και των διαφορετικών κύκλων ανακαλλιέργειας, έδειξε σημαντικές μεταβολές στη δομή της κοινότητας κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού (Εικόνα 3.6). Η σύγκριση της κινητικότητας των ζωνών των απομονωθέντων βακτηρίων στην πηκτή DGGE με το αποτύπωμα της εδαφικής βακτηριακής κοινότητας και το αποτύπωμα των διαφορετικών κύκλων εμπλουτισμού έδειξε ότι στο αποτύπωμα της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους εμφανίζονται ζώνες με ταυτόσημη κινητικότητα με τις ζώνες των απομονωθέντων βακτηρίων και οι οποίες ζώνες ενισχύονται σημαντικά κατά την διάρκεια του εμπλουτισμού. Πράγματι, η ζώνη που αντιστοιχεί στο στέλεχος 20 του *P. jinjuensis*, έδειξε ταυτόσημη κινητικότητα με μία ζώνη από το αποτύπωμα της εδαφικής βακτηριακής κοινότητας. Η συγκεκριμένη ζώνη εξαφανίστηκε από το προφίλ στον 1^ο κύκλο, αλλά ενισχύθηκε σημαντικά στους κύκλους εμπλουτισμού που ακολούθησαν. Τα στελέχη 17 (*Pseudomonas* sp.), 18 και 25 (*P. putida*), έδωσαν ζώνες που δεν μπορούσαν να διαχωριστούν μεταξύ τους στις συνθήκες ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 3.6). Η ζώνη που έδωσαν στο DGGE τα παραπάνω αποδομητικά βακτήρια εμφάνισε ταυτόσημη κινητικότητα με μία ασθενή ζώνη στο αποτύπωμα της εδαφικής βακτηριακής κοινότητας η οποία ενισχύθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού.

Οι βιβλιοθήκες κλώνων του 2^{ου} και 4^{ου} κύκλου εμπλουτισμού δημιουργήθηκαν για τον έλεγχο της ταυτοποίησης βακτηρίων που ενισχύθηκαν ή εξαφανίστηκαν από το αποτύπωμα κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού. Έτσι, οι ζώνες B1 και B3 που ήταν κυρίαρχες στη βακτηριακή κοινότητα στον 2^ο κύκλο εμπλουτισμού και απύσες στο αρχικά ενισχυμένο έδαφος, εξαφανίστηκαν ή έγιναν λιγότερο έντονες κατά τη διαδικασία του εμπλουτισμού (Εικόνα 3.6). Οι κλώνοι που παρουσίασαν ταυτόσημη κινητικότητα με τις δύο αυτές ζώνες έδειξαν υψηλή ομολογία με δύο διαφορετικά στελέχη του γένους *Pseudomonas* sp. (Πίνακας 3.5). Από την άλλη πλευρά, οι ζώνες B2, B4, B5, B6 και B7 ενισχύθηκαν κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού. Θα έπρεπε να τονιστεί ότι όλες οι παραπάνω ζώνες με εξαίρεση τη B5, ήταν επίσης παρούσες στο αποτύπωμα της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους. Πιο συγκεκριμένα, οι κλώνοι που παρουσίασαν ταυτόσημη κινητικότητα με τις ζώνες B6 και B7 έδειξαν υψηλή ομολογία με στελέχη των γενών *Hyphomicrobium* sp. και *Aminobacter* sp. αντίστοιχα και παρόλο που ενισχύθηκαν στον 4^ο κύκλο εμπλουτισμού δεν επιτεύχθηκε η απομόνωσή τους κατά την διάρκεια

επιλογής από τα τριβλία (Πίνακας 3.5). Επίσης, οι ζώνες B4 και B2 οι κλώνοι των οποίων έδειξαν υψηλή ομολογία με στελέχη του γένους *Pseudomonas* sp., παρουσίασαν ταυτόσημη κινητικότητα στο DGGE με τα απομονωθέντα στελέχη 17,18 20 και 25 (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Ανάλυση DGGE της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος και στους κύκλους εμπλουτισμού στο θρεπτικό μέσο MSM+N. Γραμμές 1-3: δείγματα εδάφους. Γραμμές 4-6, 7-9, 10-12: 2^{ος}, 3^{ος} και 4^{ος} κύκλος εμπλουτισμού αντίστοιχα. Γραμμές M: περιέχει 20 ng/mL των PCR προϊόντων του 16S rRNA βακτηρίων όπως παρουσιάζονται από πάνω προς τα κάτω: *Pseudomonas jinjuensis* στέλεχος 20, *Pseudomonas* sp. στέλεχος 17 – *P. putida* στελέχη 18 και 25 (παρουσιάζεται μία μοναδική ζώνη για τα στελέχη 17, 18 και 25), *P. putida* στέλεχος 1 and *A. rhizosphaerae* στέλεχος 21. Τα βέλη δείχνουν τις ζώνες για τις οποίες αντίστοιχοι κλώνοι αλληλουχήθηκαν και η ομολογία τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5: Ταυτοποίηση των επιλεγμένων DGGE ζωνών όπως αυτές αναφέρονται στην Εικόνα 3.6. Οι ομολογίες βασίζονται σε αλληλουχίες συνολικού μεγέθους 800 bp του 16S rRNA γονιδίου.

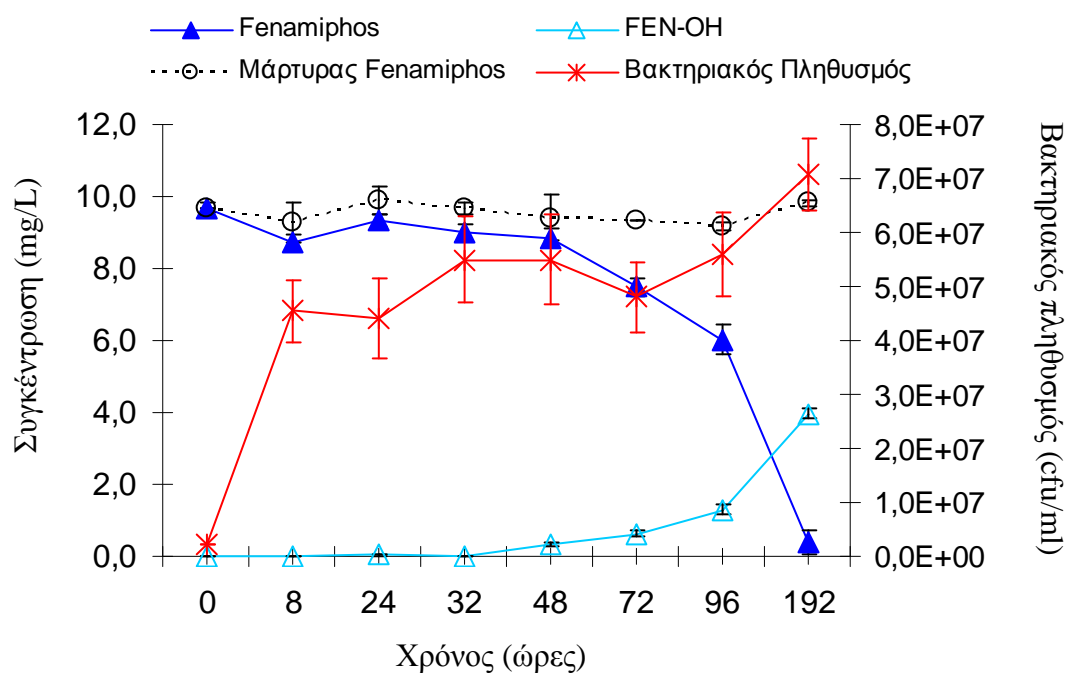
| DGGE ζώνη | Υψηλότερη ομολογία αλληλουχίας (%) ^a | Accession no. |
|-----------|---|---------------|
| B1 | <i>Pseudomonas</i> sp. strain KZ-OAIF3 (99.3) | FJ688378 |

| | | |
|----|--|----------|
| B2 | <i>Pseudomonas</i> sp. strain PT (99.8) | FJ169494 |
| B3 | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> strain Y34 (99.6) | FJ830845 |
| B4 | <i>Pseudomonas</i> sp. NyZ402 | GU126734 |
| B5 | <i>Pseudomonas</i> sp. strain N54.28.003 (99.2) | GQ214548 |
| B6 | <i>Hyphomicrobium vulgare</i> (99.1) | Y14302 |
| B7 | <i>Aminobacter</i> sp. MSH1 (100) | DQ401867 |

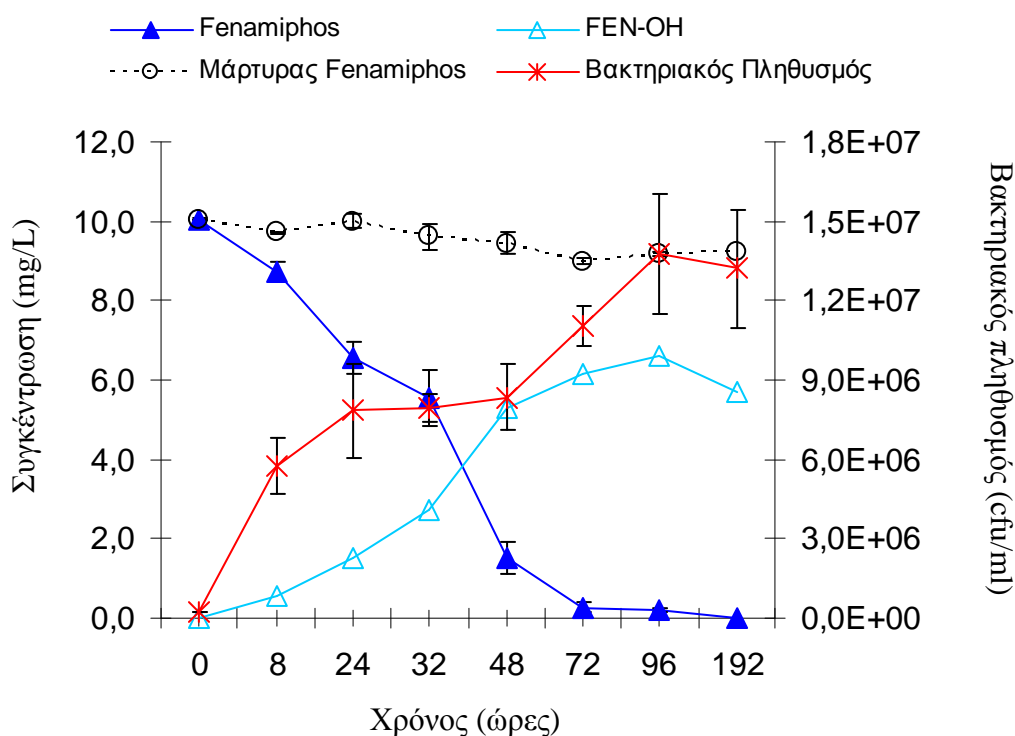
3.8. Μεταβολισμός του fenamiphos και βακτηριακή ανάπτυξη

Ο μεταβολισμός του fenamiphos από τα δύο βακτήρια μελετήθηκε σε υγρά θρεπτικά μέσα SEM και MSM+N. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος 1, *P. putida*, ήταν ικανό να υδρολύει πλήρως το fenamiphos, στο θρεπτικό μέσο SEM από το οποίο και απομονώθηκε, εντός 192 h με τον παράλληλο σχηματισμό του προϊόντος υδρόλυσης FEN-OH, το οποίο στο τέλος της επώασης είχε φτάσει σε συγκέντρωση 4 mg/L (Διάγραμμα 3.7). Ομοίως, το στέλεχος 21, *A. rhizosphaerae*, αποδόμησε το fenamiphos στο θρεπτικό μέσο MSM+N, από το οποίο και απομονώθηκε, εντός 96 h, με τον ταυτόχρονο σχηματισμό FEN-OH, το οποίο έφτασε στη μέγιστη συγκέντρωση των 6 mg/L την ίδια χρονική στιγμή (Διάγραμμα 3.8).

Η αποδόμηση του fenamiphos συνέπεσε με την στοιχειομετρική αύξηση της βακτηριακής βιομάζας, καταδεικνύοντας την ενεργή ανάπτυξη των δύο βακτηρίων κατά τη διάρκεια της αποδόμησής του. Στο χρονικό διάστημα της επώασης δεν ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις των FSO και FSO₂. Επιπροσθέτως, στις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες (Μάρτυρες) παρατηρήθηκε αμελητέα αποδόμηση του fenamiphos και καθόλου ανίχνευση FEN-OH και στα δύο θρεπτικά μέσα.



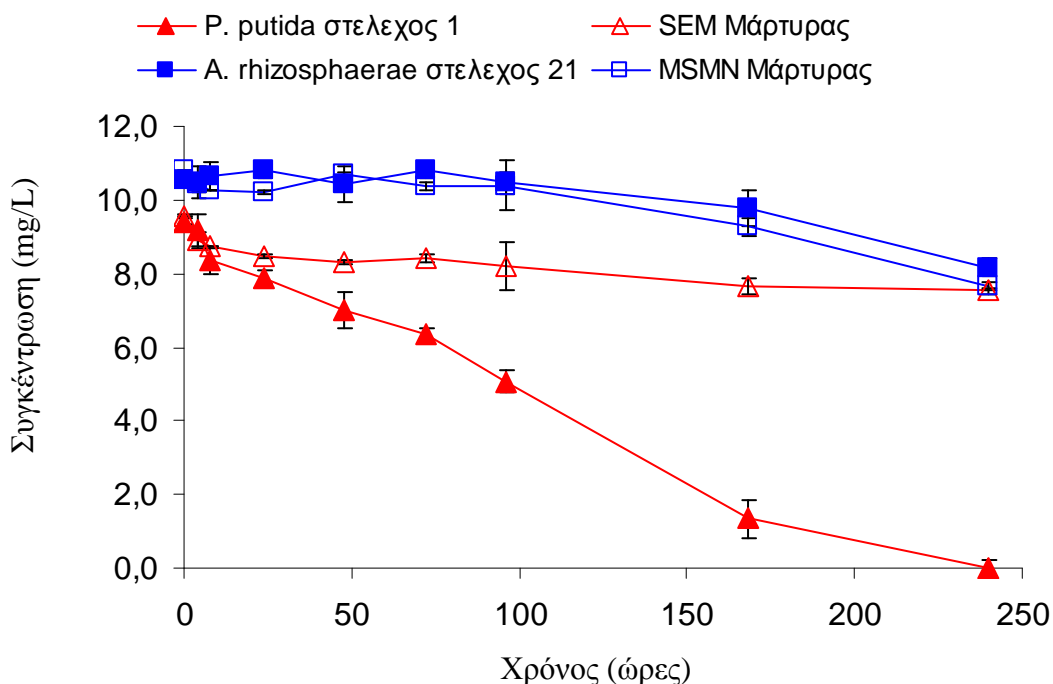
Διάγραμμα 3.7: Αποδόμηση του fenamiphos από το βακτήριο *P. putida* στέλεχος 1 στο θρεπτικό μέσο SEM, οι μεταβολές στον βακτηριακό πληθυσμό και ο σχηματισμός του fenamiphos phenol (FEN-OH). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.8: Αποδόμηση του fenamiphos από το βακτήριο *A. rhizosphaerae* στέλεχος 21 σε θρεπτικό μέσο MSM+N, οι μεταβολές του βακτηριακού πληθυσμού και ο σχηματισμός fenamiphos phenol (FEN-OH). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

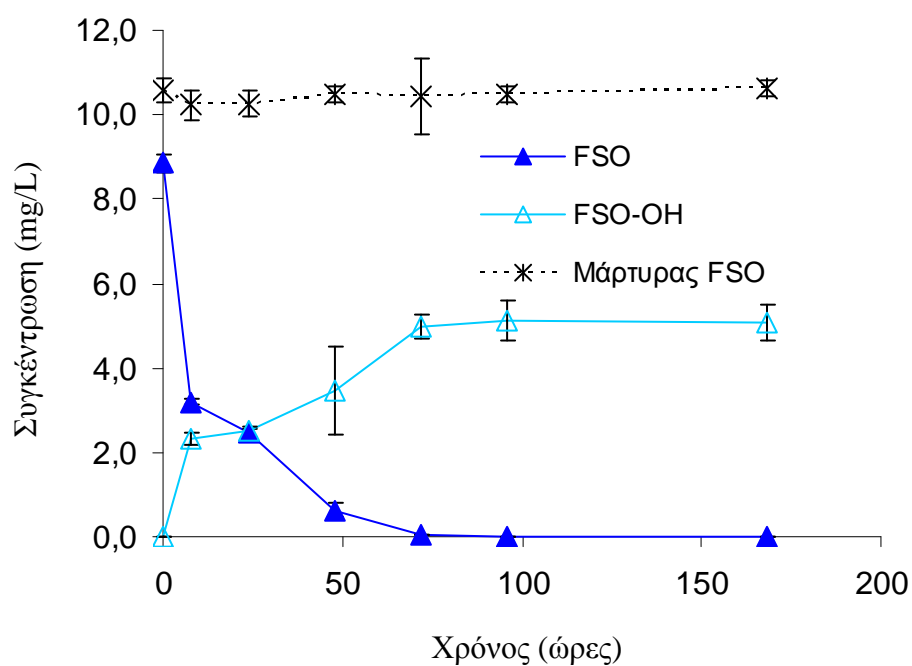
3.9. Μεταβολισμός των FEN-OH, FSO και FSO₂ από τα βακτήρια που αποδομούν το fenamiphos

Περαιτέρω πειράματα διερεύνησαν την ικανότητα των βακτηρίων να αποδομούν εκτός του fenamiphos και τα προϊόντα μεταβολισμού του όπως τα FEN-OH, FSO και FSO₂. Έτσι το *P. putida* στέλεχος 1, ήταν ικανό να αποδομεί πλήρως το FEN-OH στο θρεπτικό μέσο SEM σε λιγότερο από 250 h. Η αποδόμηση του FEN-OH στις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες ήταν αμελητέα, καθώς και σε MSM+N που εμβολιάστηκε με το *A. rhizosphaerae* στέλεχος 21 (Διάγραμμα 3.9).

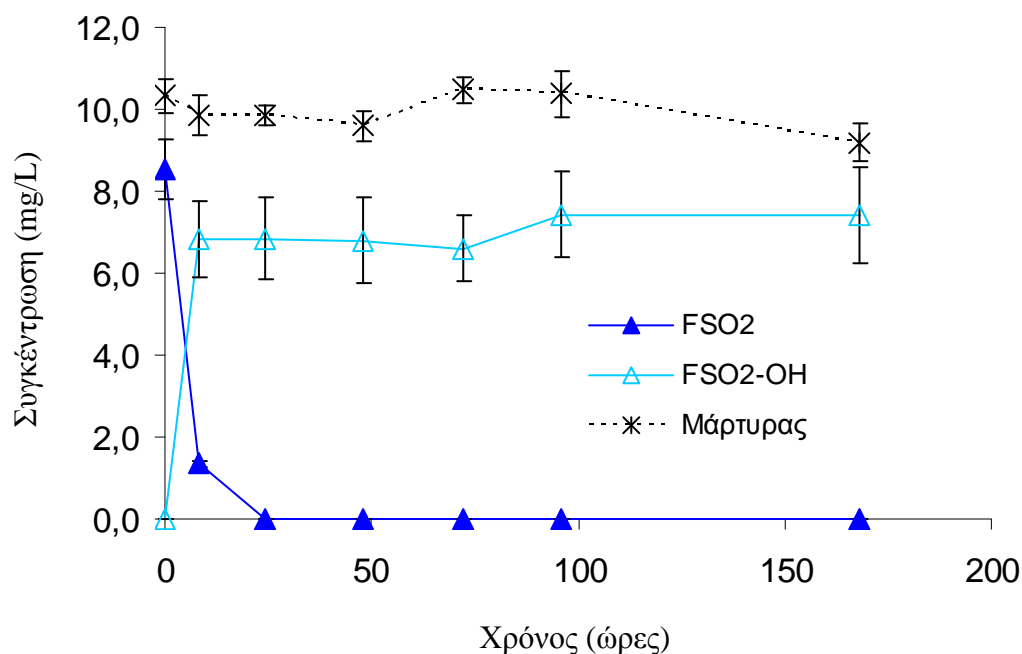


Διάγραμμα 3.9: Αποδόμηση του fenamiphos phenol (FEN-OH) στα θρεπτικά μέσα SEM και MSM+N εμβολισμένα με τα *P. putida* στέλεχος 1 και *A. rhizosphaerae* στέλεχος 21 αντίστοιχα, καθώς και σε μη εμβολιασμένες καλλιέργειες (Μάρτυρας). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

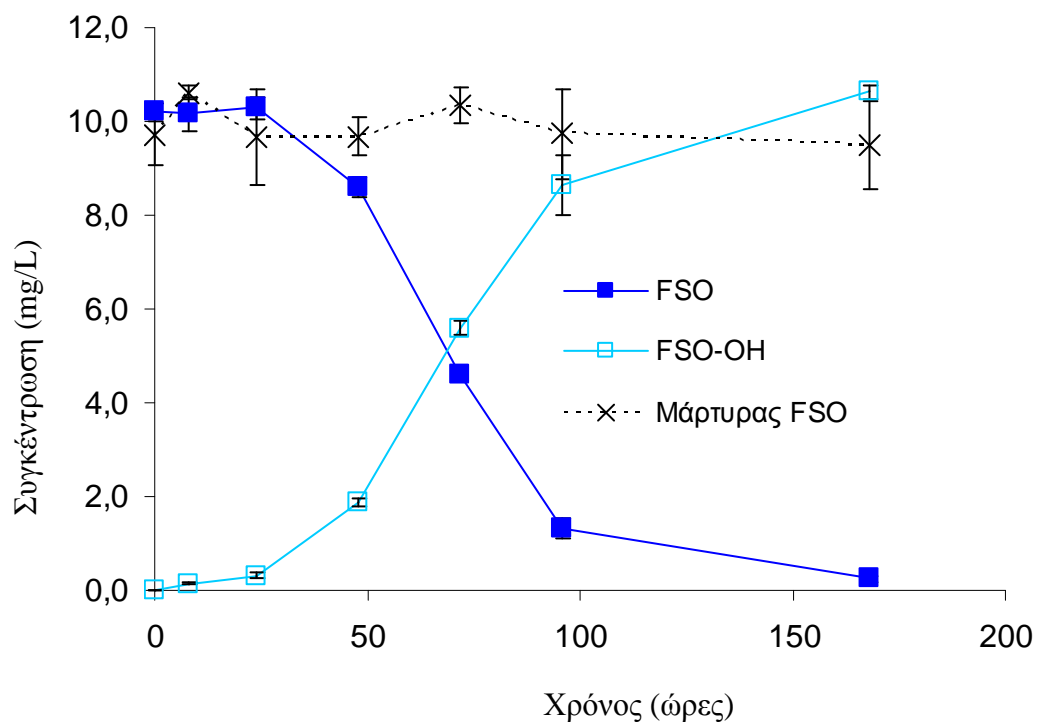
Ακολούθως μελετήθηκε η αποδομητική ικανότητα των δύο βακτηριακών στελεχών έναντι των προϊόντων οξείδωσης του fenamiphos, FSO και FSO₂. Και τα δύο βακτηριακά στελέχη ήταν ικανά να αποδομούν πλήρως τα FSO και FSO₂ με τον επακόλουθο σχηματισμό των FSO-OH και FSO₂-OH αντίστοιχα (Διαγράμματα 3.10 ως 3.13). Παρόλα αυτά, και για τα δύο προϊόντα μεταβολισμού η αποδόμηση ήταν ταχύτερη και μικρότερες ποσότητες των υδρολυμένων προϊόντων FSO-OH (Διαγράμματα 3.10 και 3.12) και FSO₂-OH (Διαγράμματα 3.11 και 3.13) ανιχνεύτηκαν στις καλλιέργειες που εμβολιάστηκαν με το *P. putida* στέλεχος 1,. Η αποδόμηση των FSO και FSO₂ ήταν περιορισμένη στις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες και στα δύο θρεπτικά μέσα.



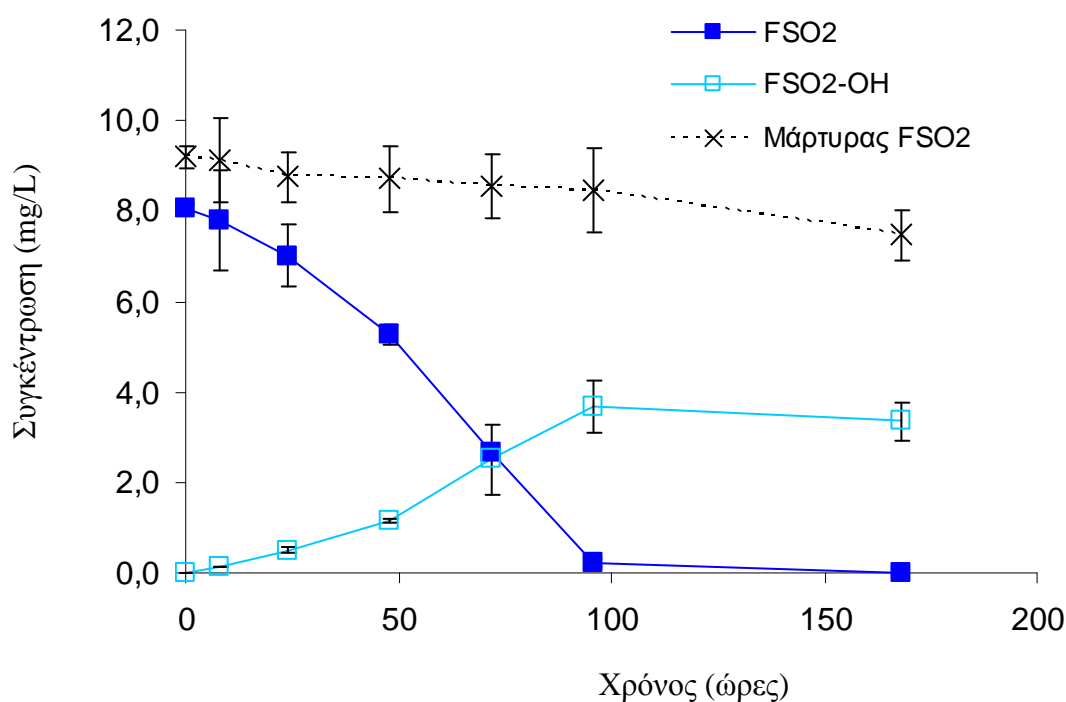
Διάγραμμα 3.10: Αποδόμηση του fenamiphos sulfoxide (FSO) στο θρεπτικό μέσο SEM από το *P. putida* στέλεχος 1 και σχηματισμός του fenamiphos sulfoxide phenol (FSO-OH). Παρουσιάζεται επίσης η αποδόμηση του FSO σε μη εμβολιασμένες καλλιέργειες SEM (Μάρτυρας). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.11: Αποδόμηση του fenamiphos sulfone (FSO2) στο θρεπτικό μέσο SEM από το *P. putida* στέλεχος 1 και σχηματισμός του fenamiphos sulfone phenol (FSO2-OH). Παρουσιάζεται επίσης η αποδόμηση του FSO2 σε μη εμβολιάσμενες καλλιέργειες (Μάρτυρας). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.12: Αποδόμηση του fenamiphos sulfoxide (FSO) σε θρεπτικό μέσο MSM+N από το *A. rhizosphaerae* στέλεχος 21, και σχηματισμός του fenamiphos sulfoxide phenol (FSO-OH). Παρουσιάζεται επίσης η αποδόμηση του FSO στις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες (Μάρτυρας). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



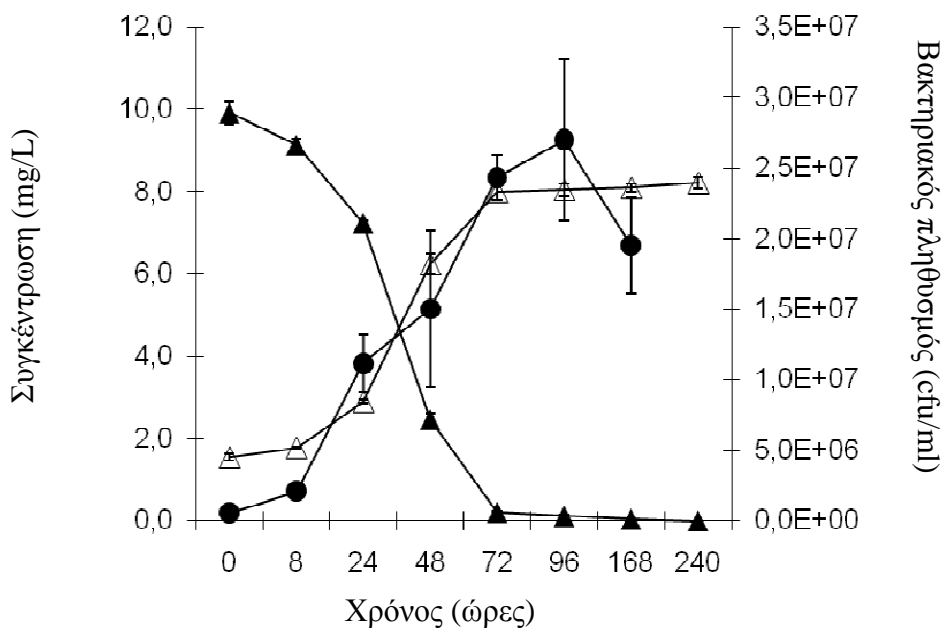
Διάγραμμα 3.13: Αποδόμηση του fenamiphos sulfone (FSO2) στο θρεπτικό μέσο MSM+N από το *A. rhizosphaerae* στέλεχος 21, και σχηματισμός του fenamiphos sulfone phenol (FSO2-OH). Παρουσιάζεται επίσης η αποδόμηση του FSO2 στις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες (Μάρτυρας). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

3.10. Μεταβολισμός του oxamyl και βακτηριακή ανάπτυξη

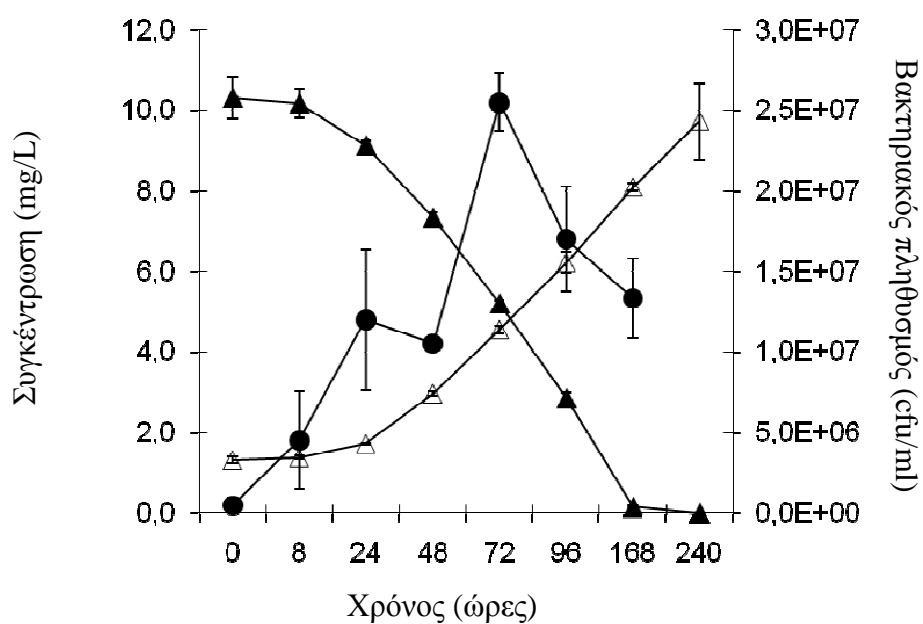
Η αποδόμηση του oxamyl ακολούθησε μία αρχική φάση υστέρησης που διήρκεσε περίπου 24 h. Αυτή η φάση υστέρησης συνέπεσε με τη σταδιακή αύξηση στη βακτηριακή βιομάζα, η οποία έφτασε σε επίπεδα υψηλότερα των 10^7 κύτταρα/mL για όλα τα βακτήρια στις 24 h. Η αποδόμηση του oxamyl από τα στελέχη 17 και 20 ολοκληρώθηκε εντός 96 h (Διάγραμμα 3.14, 3.16), ενώ χρειάστηκαν 7 ημέρες για την πλήρη αποδόμηση του oxamyl από το στέλεχος 18 (Διάγραμμα 3.15).

Η αποδόμηση του oxamyl συνέπεσε με τον στοιχειομετρικό σχηματισμό του οξιμικού παραγώγου oxamyl oxime, το οποίο συσσωρεύτηκε στις υγρές καλλιέργειες όλων των βακτηρίων σε συγκεντρώσεις που υπερέβησαν τα 8 mg/L με το τέλος της επώασης. Διατήρηση της επώασης συνολικά για 21 ημέρες δεν οδήγησε σε περαιτέρω αποδόμηση του oxamyl oxime που είχε σχηματιστεί. Από την άλλη μεριά, περιορισμένη αποδόμηση

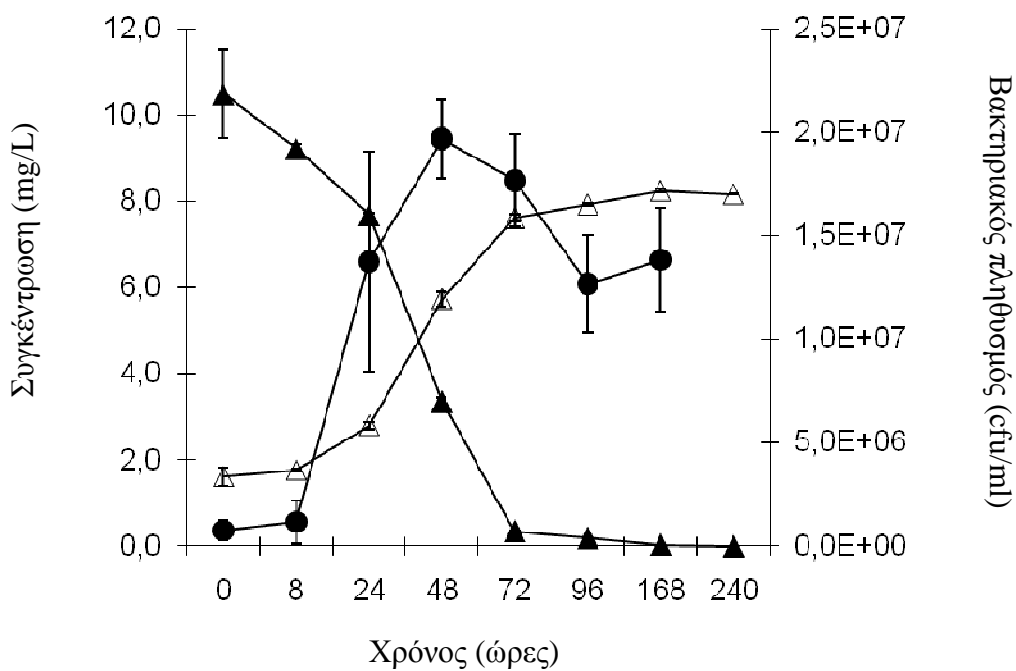
του oxamyl παρατηρήθηκε σε MSM+N που δεν εμβολιάστηκε με βακτήρια (μάρτυρες) χωρίς συσσώρευση oxamyl oxime.



Διάγραμμα 3.14: Αποδόμηση του oxamyl (▲) από το *Pseudomonas* sp. στέλεχος 17, η μεταβολή του βακτηριακού πληθυσμού (●) και σχηματισμός του προϊόντος μεταβολισμού oxamyl oxime (△). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.15: Αποδόμηση του oxamyl (▲) από το *P. putida* στέλεχος 18, η μεταβολή του βακτηριακού πληθυσμού (●) και σχηματισμός του προϊόντος μεταβολισμού oxamyl oxime (△). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.16: Αποδόμηση του oxamyl (▲) από το *P. jinjuensis* στέλεχος 20, μεταβολές του βακτηριακού πληθυσμού (●) και σχηματισμός του προϊόντος μεταβολισμού oxamyl oxime (△). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Απομόνωση βακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης του fenamiphos

Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκαν με τη μέθοδο των εμπλουτισμένων καλλιεργειών δύο βακτήρια εδάφους με την ικανότητα ταχείας αποδόμησης του fenamiphos και ταυτοποιήθηκαν μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας του 16S rRNA ως *P. putida* (στέλεχος 1) και *A. rhizosphaerae* (στέλεχος 21). Βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* είναι κατεξοχήν κυρίαρχα στο εδαφικό περιβάλλον και υπεύθυνα για την αποδόμηση πλήθους οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων των ethoprophos (24), methyl parathion (77), dimethoate (78), isofenphos (79), και monocrotophos (80). Ομοίως στελέχη του γένους *Acinetobacter* έχουν απομονωθεί ως υπεύθυνα για την αποδόμηση οργανοφωσφορικών όπως methyl parathion (81), malathion (82) και methamidophos (83).

Μέχρι στιγμής υπάρχουν μόνο δύο προηγούμενες αναφορές για την απομόνωση αμιγών βακτηρίων ικανών για ταχεία αποδόμηση του fenamiphos. Αρχικά, απομονώθηκε βακτηριακό στέλεχος τους γένους *Brevibacterium* sp. (22) και στη συνέχεια βακτηριακό στέλεχος του γένους *Microbacterium* sp. (19). Τα δύο αυτά βακτήρια ήταν ικανά να μεταβολίζουν τα FEN, FSO και FSO₂ προς αντίστοιχες φαινόλες οι οποίες δεν μεταβολίζονταν παραπέρα. Τα δύο βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν επίσης ικανά να υδrolύνουν ταχύτατα τα FEN, FSO και FSO₂ σε FEN-OH, FSO-OH και FSO₂-OH αντίστοιχα. Το αρχικό βήμα της υδρόλυσης συνοδευόταν από στοιχειομετρική βακτηριακή ανάπτυξη καταδεικνύοντας ότι τα αποδομητικά βακτήρια που απομονώθηκαν αποδομούν το FEN και το χρησιμοποιούν τουλάχιστον ως πηγή C για την ανάπτυξή τους. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες απομονωθείσες αποδομητικές αξενικές καλλιέργειες του FEN (19, 22), το *P. putida* στέλεχος 1, ήταν ικανό να μεταβολίζει πλήρως και το FEN-OH που σχηματίζεται από την υδρόλυση του FEN. Σε παρόμοια μελέτη από τους Singh et al. (39), απομονώθηκε μικροβιακή κοινότητα που αποτελούνταν από τέσσερα βακτηριακά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *Pseudomonas* spp., *Bacteroidetes/Cytophaga* και *Caulobacter*, και η οποία ήταν σε θέση να μεταβολίζει ταχύτατα το FEN προς FEN-OH, το οποίο στη συνέχεια αποδομούνταν περαιτέρω.

The diagram illustrates the metabolic pathways of fenamiphos and IPEPAA. Fenamiphos is converted to FSO and then to FSO2. IPEPAA is converted to F-Phenol, which is then converted to FSO and FSO2. Both FSO and FSO2 are converted to FSO2-OH, which enters the Krebs cycle.

Fenamiphos pathway:

- Fenamiphos (a phosphonate ester) is converted to FSO (a sulfonate ester) via a dashed arrow.
- FSO is converted to FSO2 (a sulfonate ester) via a dashed arrow.

IPEPAA pathway:

- IPEPAA (a phosphonate ester) is converted to F-Phenol (a phenol derivative) via a solid arrow.
- F-Phenol is converted to FSO (a sulfonate ester) via a solid arrow.
- FSO is converted to FSO2 (a sulfonate ester) via a solid arrow.

Common pathway:

- Both FSO and FSO2 are converted to FSO2-OH (a sulfonate ester) via dashed arrows.
- FSO2-OH enters the Krebs cycle (Κύκλος του Krebs).

Microbial sources:

- P. putida* απομόνωση 1 and *A. rhizosphaerae* απομόνωση 21 are associated with the conversion of fenamiphos to FSO.
- P. putida* απομόνωση 1 is associated with the conversion of IPEPAA to F-Phenol.

Η ανάλυση του μοριακού αποτυπώματος της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος από το οποίο απομονώθηκαν τα βακτήρια, αλλά και της βακτηριακής κοινότητας στις διαδοχικές καλλιέργειες εμπλουτισμού έδειξαν ότι τα βακτήρια που απομονώθηκαν δεν αποτελούσαν κυρίαρχα μέλη της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος αλλά ενισχύονταν στους κύκλους εμπλουτισμού. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε αντίστοιχες μελέτες με άλλα γεωργικά φάρμακα. Έτσι οι Simonsen et al (38) έδειξαν ότι

βακτηριακό στέλεχος του γένους *Aminobacter* που αποδομούσε το 2,6-διχλωροβενζαμίδιο, υπολειμματικό μεταβολίτη του γεωργικού φαρμάκου dichlobenil, δεν αποτελούσε κυρίαρχο μέλος της καλλιέργειας εμπλουτισμού από όπου και απομονώθηκε (68). Αντιθέτως, αρκετά αποδομητικά βακτήρια του ζιζανιοκτόνου linuron που ανήκαν στο γένος *Variovorax* και απομονώθηκαν από το ίδιο έδαφος από δύο διαφορετικές μελέτες (84, 69), ήταν κυρίαρχα μέλη της βακτηριακής κοινότητας στις καλλιέργειες εμπλουτισμού παρόλο που η παρουσία τους στην κοινότητα του εδάφους δεν διερευνήθηκε. Θεωρώντας ότι μόνο βακτήρια των οποίων ο πληθυσμός αποτελεί $> 1 \%$ του συνολικού βακτηριακού πληθυσμού στο έδαφος μπορούν να ανιχνευθούν μέσω PCR-DGGE (73), φαίνεται ότι τα απομονωθέντα στελέχη ήταν πιθανότατα παρόντα στο έδαφος σε πυκνότητες πληθυσμών χαμηλότερες από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου DGGE που χρησιμοποιήθηκε.

Η ενίσχυση των απομονωθέντων βακτηρίων κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού ήταν αναμενόμενη μιας και βακτήρια των γενών *Pseudomonas* και *Acinetobacter* αποτελούν τυπικά ταχέως αναπτυσσόμενα γ-πρωτεοβακτήρια που ευνοούνται υπό συνθήκες ανάπτυξης σε πλούσια θρεπτικά μέσα (85). Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν την θεωρία ότι οι τεχνικές εμπλουτισμού δεν οδηγούν απαραίτητα στην απομόνωση βακτηρίων τα οποία είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά για την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων *in situ* στο έδαφος. Η βακτηριακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων σχετίζεται συχνά με μεταθετά γενετικά στοιχεία τα οποία μεταφέρονται μεταξύ βακτηριακών στελεχών, ιδίως κάτω από την επιλεκτική πίεση που συνοδεύει τους εμπλουτισμούς (86). Έτσι, η απόκτηση των μεταθετών γενετικών στοιχείων από τα απομονωθέντα βακτήρια και ο επακόλουθος γρήγορος πολλαπλασιασμός τους στις καλλιέργειες εμπλουτισμού δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Η διαδικασία εμπλουτισμού, άλλαξε τη δομή της βακτηριακής κοινότητας συγκρινόμενης με το αποτύπωμα της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους και η μεταβολή αυτή ήταν πιο έντονη στο μέσο MSM+N από ότι στο SEM. Πράγματι, η βακτηριακή κοινότητα ήταν περισσότερο σύνθετη στις καλλιέργειες εμπλουτισμού στο θρεπτικό μέσο SEM σε σύγκριση με το MSM+N, όπου η πολυπλοκότητα της βακτηριακής κοινότητας περιορίστηκε σημαντικά στους τελευταίους κύκλους εμπλουτισμού. Για το SEM, το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τη μη επιλεκτική του φύση (περιέχει επιπλέον πηγές C και N εκτός του fenamiphos), που επιτρέπει την ανάπτυξη και μη αποδομητικών βακτηρίων. Αντιθέτως, το MSM+N είναι ένα φτωχό εκλεκτικό μέσο και η διαδικασία εμπλουτισμού σε αυτό οδηγεί σε μία λιγότερο πολύπλοκη βακτηριακή κοινότητα, τα μέλη της οποίας είναι ικανά να χρησιμοποιήσουν το fenamiphos ως πηγή

άνθρακα. Οι περισσότερες ζώνες του μοριακού αποτυπώματος των εμπλουτισμένων καλλιεργειών στα πρώτα στάδια του εμπλουτισμού βρέθηκε ότι ανήκουν σε διαφορετικά α-, β- πρωτεοβακτήρια, *Pseudomonas* και *Bacteroidetes* αλλά η αφθονία τους περιορίστηκε ή εξαφανίστηκαν τελείως στα τελευταία στάδια εμπλουτισμού. Είναι πιθανό ότι αυτά τα βακτήρια ήταν σε θέση να αναπτυχθούν σε εναλλακτικές πηγές C (στο SEM), ή σε μη επιθυμητές πηγές C (κολλοειδή εδάφους) οι οποίες ήταν παρούσες στο μέσο στα αρχικά στάδια του εμπλουτισμού (MSM+N). Παρόλα αυτά, καθώς η επιλογή για το φαινότυπο των βακτηρίων αποδομητών διατηρήθηκε και καθώς η εναλλακτική πηγή άνθρακα μειώθηκε (MSM+N) με την πρόοδο του εμπλουτισμού, αυτά τα βακτήρια αντικαταστάθηκαν από άλλα βακτήρια ικανά για αποδόμηση του fenamiphos. Εναλλακτικά, αυτά τα βακτήρια ίσως να απαιτούν την παρουσία μίας συμπαγούς δομής (μόρια εδάφους) ως επιφάνεια στην οποία αργά-αναπτυσσόμενα βακτήρια προσκολλώνται και παραμένουν στο σύστημα (87). Αυτή η πρόταση έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα (69), στα οποία παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση των εμπλουτισμένων καλλιεργειών που προήλθαν από το ίδιο έδαφος με την παρουσία ή την απουσία μορίων εδάφους.

Από την άλλη πλευρά, αρκετές ζώνες στο DGGE μετατράπηκαν σε κυρίαρχες μέσω του εμπλουτισμού. Αυτές οι ζώνες αντιπροσωπεύουν βακτήρια που ανήκουν σε διάφορα α- (*Hyphomicrobium*, *Brevundimonas*), β- (*Hydrogenophaga*) και γ- (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*) πρωτεοβακτήρια ή *Bacteroidetes*. Η αποτυχία της απομόνωσης αυτών των βακτηρίων αν και ήταν παρόντα στη βακτηριακή κοινότητα του τελευταίου σταδίου εμπλουτισμού πιθανώς να οφείλεται σε περιορισμούς της μεθόδου επιλογής, που απέτυχε να καλύψει επαρκώς τη βακτηριακή ποικιλότητα. Βακτήρια που έχουν την ικανότητα να αποδομούν γεωργικά φάρμακα και ανήκουν στα παραπάνω βακτηριακά είδη, έχουν απομονωθεί στο παρελθόν μέσω εμπλουτισμένων καλλιεργειών σε παρόμοια θρεπτικά μέσα. Για παράδειγμα, στέλεχος του είδους *Brevundimonas diminuta* απομονώθηκε με εμπλουτισμό από έδαφος και κατείχε το πλασμιδιακό γονίδιο *opd* που εμπλέκεται στην υδρόλυση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων (88). Αντίστοιχα βακτήρια των γενών *Sphingobacterium*/*Pedobacter* έχουν απομονωθεί μέσω εμπλουτισμού (25) αλλά λιγότερο συχνά. Μια άλλη πιθανή εξήγηση για την αποτυχία απομόνωσης βακτηρίων τα οποία φαίνονται να εμπλουτίζονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απομόνωσης είναι πιθανό να οφείλεται στην περιορισμένη ικανότητά τους να αναπτυχθούν ενεργά και σε επαρκή χρόνο στα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό μπορεί να ισχύει στην περίπτωση της ζώνης/κλώνου D4 που έδειξε μικρή χαμηλή ομολογία (90 %) με μέχρι

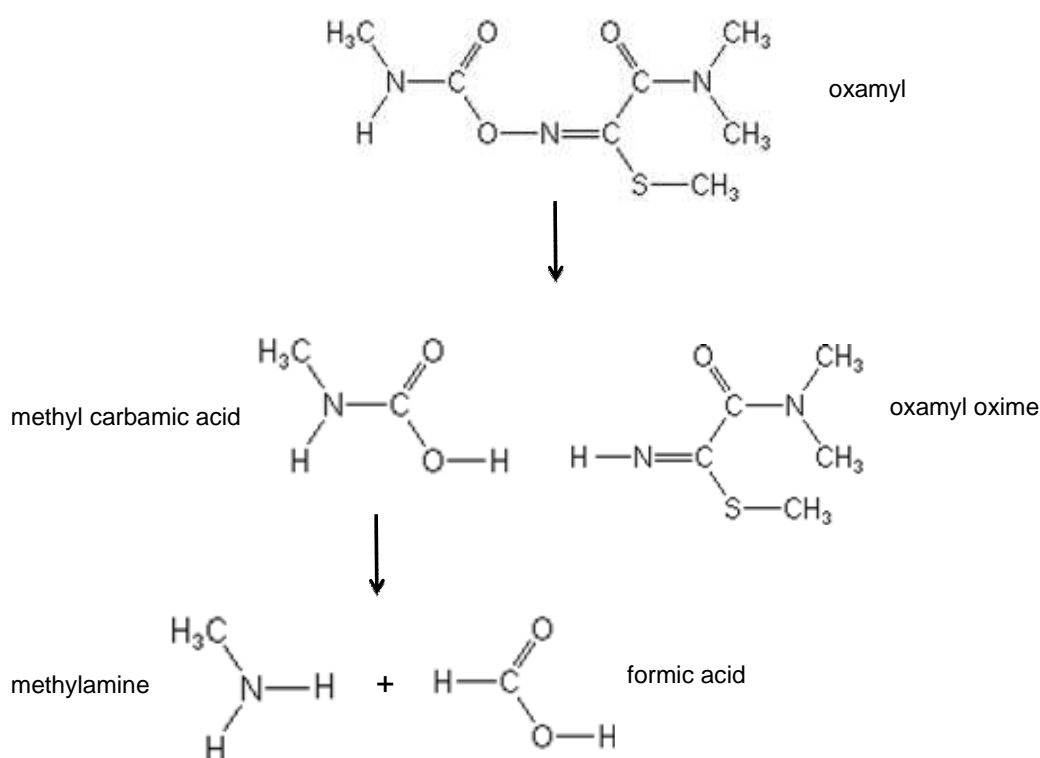
σήμερα γνωστά βακτήρια που περιέχονταν στη βάση δεδομένων του EMBL, καθώς και των *Hyphomicrobium* sp. και *Hydrogenophaga*, ζωνών/κλώνων D5 και C14 αντίστοιχα. Στελέχη που ανήκουν στα παραπάνω γένη είναι γνωστά ως αργά αναπτυσσόμενα, ολιγοτροφικά και ευαίσθητα σε κοινά θρεπτικά συστατικά (89, 90). Ανάλογη έρευνα οδήγησε στην απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το linuron και τα προϊόντα μεταβολισμού αυτού και τα οποία ανήκουν στα γένη *Hyphomicrobium* και *Hydrogenophaga* αλλά μόνο μετά από μεγάλης διάρκειας καλλιεργειών εμπλουτισμού (69). Εκτός από τις παραπάνω πιθανές εξηγήσεις, η εμπλοκή αυτών των βακτηρίων στη χρήση των μεταβολιτών που παρήχθησαν κατά την αποδόμηση του fenamiphos δεν μπορεί να αποκλειστεί. Πράγματι, σε προηγούμενη μελέτη, απομονώθηκε ένα στέλεχος του γένους *Arthrobacter*, από μία αξενική βακτηριακή κοινότητα που αποδομούσε το fenamiphos, το οποίο αδυνατούσε να αποδομήσει τα fenamiphos και FEN-OH αλλά μπορούσε να χρησιμοποιήσει μόνο το IPEPAA (Εικόνα 4.1) που προκύπτει από την υδρόλυση του fenamiphos (38).

4.2. Απομόνωση βακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης του oxamyl

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν φυλογενετικά τέσσερα βακτηριακά στελέχη ικανά να υδρολύουν ταχύτατα το καρβαμιδικό νηματωδοκτόνο oxamyl προς παραγωγή του οξιμικού παραγώγου του oxamyl oxime. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν βασιζόμενα στην πλήρη αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου ως *Pseudomonas* spp. Τα δύο από τα τέσσερα βακτηριακά στελέχη σχετίζονται πολύ στενά, γεγονός που ταυτοποιήθηκε από τις περιορισμένες διαφορές στην αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου (*Pseudomonas putida* στελέχη 18 & 25), ενώ τα άλλα δύο στελέχη ήταν διαφορετικά και ταυτοποιήθηκαν ως *Pseudomonas* sp. και *P. jinjuensis*. Σημαντικός αριθμός προηγούμενων μελετών έχουν αναφερθεί στην απομόνωση βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* ικανών να αποδομούν ταχύτατα ποικιλία γεωργικών φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων καρβαμιδικών, (91), πυρεθροειδών (92), τριαζινών (93) και οργανοχλωριωμένων (94). Η παρούσα μελέτη αποτελεί τη δεύτερη μόνο αναφορά σε βακτήρια ικανά για την αποδόμηση του oxamyl. Πολυ πρόσφατα, απομονώθηκαν βακτήρια από εδάφη που εμφάνισαν το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης και τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως *Aminobacter* sp. (64).

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ήταν σε θέση να χρησιμοποιούν το oxamyl ως μοναδική πηγή C, καθώς αυτό επιβεβαιώνεται από την στοιχειομετρική ανάπτυξή τους κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του oxamyl. Η αποδόμηση του oxamyl

πραγματοποιήθηκε μέσω υδρόλυσης του καρβαμιδικού δεσμού για να σχηματιστεί το oxamyl oxime το οποίο δεν διασπάστηκε μετέπειτα από τα βακτήρια αλλά συσσωρεύτηκε στις καλλιέργειες (Εικόνα 4.2). Προηγούμενες μελέτες μεταβολισμού του oxamyl στο έδαφος έδειξαν ότι το oxamyl oxime αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη στο έδαφος (95). Επιπρόσθετα, σε μία άλλη έρευνα αναφέρθηκε ότι η υδρόλυση του oxamyl μπορεί να συμβεί ως αποτέλεσμα αβιοτικής και/ή βιοτικής δράσης και ότι ευνοείται υπό αλκαλικές συνθήκες. Παρόλα αυτά, το oxamyl όπως και τα περισσότερα καρβαμικά, κυρίως αποδομείται μικροβιακά στο έδαφος (96) και είναι ευπαθές στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης (97, 98). Σε παρόμοια μελέτη απομονώθηκε ένα στέλεχος του γένους *Paracoccus* που ήταν σε θέση να αποδομεί ταχύτατα το εντομοκτόνο methomyl, ένα καρβαμικό παρόμοιας χημικής δομής με το oxamyl, προς methomyl oxime (99).



Εικόνα 4.2: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μεταβολικού μονοπατιού του oxamyl από τα βακτήρια που απομονώθηκαν

Η συσσώρευση του oxamyl oxime στο θρεπτικό μέσο καταδεικνύει ότι το μέθυλο-καρβαμικό οξύ (methyl carbamic acid) που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης του oxamyl πιθανώς χρησιμοποιείται από τα βακτήρια ως πηγή C και N. Αυτό

έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει ότι η βακτηριακή αποδόμηση του carbofuran, ενός αρυλμεθυλο-καρβαμιδικού εντομοκτόνου, οδηγεί συνήθως στην απελευθέρωση του ιδίου μέθυλο καρβαμιδικού οξέος, το οποίο στη συνέχεια διασπάται προς μεθυλαμίνη και μυρμηγκικό οξύ που χρησιμοποιούνται από τα βακτήρια ως πηγές N και C αντίστοιχα (42, 44, 100).

Η ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος και στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες με την μέθοδο DGGE έδειξε ότι τα βακτήρια που απομονώθηκαν αποτελούσαν αρχικά μέλη της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος, αλλά εμφανώς ενισχύθηκαν κατά τη διαδικασία του εμπλουτισμού (*Pseudomonas*). Από την άλλη μεριά, κάποιες ζώνες που αντιπροσώπευαν ριβοτύπους του γένους *Pseudomonas* φαίνεται να εξαφανίζονται ή να περιορίζονται σε σημαντικό βαθμό κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού. Η αντικατάσταση αυτών των ριβοτύπων *Pseudomonas* κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι τα συγκεκριμένα βακτήρια δεν αποτελούσαν πραγματικούς αποδομητές του oxamyl αλλά συνέχισαν να αναπτύσσονται σε εναλλακτικές πηγές C (εδafικά συστατικά) που ήταν άφθονες στα πρώτα βήματα του εμπλουτισμού στο MSM+N αλλά εξαλείφθηκαν με το πέρασμα στα τελευταία στάδια εμπλουτισμού κι έτσι περιορίστηκε η ανάπτυξή τους.

Από την άλλη πλευρά, αρκετές ζώνες που παρουσιάζονται να ευνοούνται κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού, δεν απομονώθηκαν από τα τριβλία. Πράγματι, η ζώνη/κλώνος B7 παρουσίασε υψηλή ομολογία (100 %) με ένα στελέχος του γένους *Aminobacter* το οποίο ήταν σε θέση να αποδομεί το ζιζανιοκτόνο dichlobenil και τον μεταβολίτη του 2,6-dichlorobenzamide (101). Επιπλέον, πρόσφατα αναφέρθηκε η απομόνωση 27 βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να αποδομούν το oxamyl, εκ των οποίων τα 26 βρέθηκε ότι ανήκουν στο γένος *Aminobacter* (64). Η ζώνη/κλώνος 6 παρουσίασε υψηλή ομολογία με βακτήρια του γένους *Hyphomicrobium* sp. Πρόσφατα, αναφέρθηκε η απομόνωση ενός στελέχους του γένους *Hyphomicrobium* που είχε την ικανότητα να αποδομεί το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο methamidophos. Η αποτυχία απομόνωσης αυτών των βακτηρίων μπορεί να οφείλεται στη διαδικασία επιλογής η οποία πιθανώς δεν κάλυψε πλήρως την ποικιλότητα των βακτηρίων που περιέχονταν στον τελικό κύκλο εμπλουτισμού. Εναλλακτικά, αυτά τα βακτήρια πιθανώς να μην είχαν αναπτυχθεί επαρκώς στο θρεπτικό μέσο στην παρούσα πειραματική μελέτη.

4.3. Τελικά συμπεράσματα

Έχοντας λάβει υπόψη όλα τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, μπορούμε να καταλήξουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Απομονώθηκαν δύο βακτηριακά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *Pseudomonas putida* και *Acinetobacter rhizosphaerae* τα οποία είχαν τη δυνατότητα να υδρολύουν ταχύτατα το fenamiphos προς fenamiphos phenol (FEN-OH), το οποίο στη συνέχεια μεταβολιζόταν περαιτέρω μόνο από το *P. putida*, με αποτέλεσμα την πλήρη αποτοξικοποίηση του
- Απομονώθηκαν τέσσερα βακτηριακά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν όλα ως *Pseudomonas* και είχαν την ικανότητα να υδρολύουν ταχύτατα το oxamyl προς oxamyl oxime με αποτέλεσμα την πλήρη αποτοξικοποίηση του νηματωδοκτόνου
- Ανάλυση DGGE έδειξε ότι αυτά τα δύο απομονωθέντα βακτήρια που διασπούσαν το fenamiphos δεν αποτελούσαν κυρίαρχα μέλη της εδαφικής βακτηριακής κοινότητας αλλά αναπτύχθηκαν αποκλειστικά κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού σε αντίθεση με τα απομονωθέντα βακτήρια που διασπούσαν το oxamyl τα οποία αποτελούσαν εμφανή μέλη της εδαφικής βακτηριακής κοινότητας αλλά ενισχύθηκαν σε σημαντικό βαθμό κατά τη διάρκεια του εμπλουτισμού

4.4. Μελλοντική ερευνητική κατεύθυνση

Ακόλουθες μελέτες που έχουν ήδη ολοκληρωθεί από μέλη της ερευνητικής ομάδας Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας μελέτησαν την ικανότητα των απομονωθέντων βακτηρίων να διασπούν άλλα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα, την σταθερότητα του φαινότυπου τους σε μη εκλεκτικά υποστρώματα παρουσία ή απουσία των γεωργικών φαρμάκων καθώς και την ικανότητά τους να αποδομούν υψηλότερες συγκεντρώσεις των δύο γεωργικών φαρμάκων που απαντώνται συνήθως σε περιπτώσεις περιβαλλοντικής ρύπανσης λόγω ατυχήματος. Τα αποτελέσματα αυτά περιέχονται σε πτυχιακές διατριβές των Ευτυχία Σουερέφ και Δάφνη Γεωργιάδου και θα παρουσιαστούν στο αμέσως επόμενο χρονικό διάστημα. Νέες μελέτες που πραγματοποιούνται τώρα σκοπεύουν στην απομόνωση των γονιδίων/ενζύμων που εμπλέκονται στην υδρόλυση και μεταβολισμό των fenamiphos και oxamyl από τα απομονωθέντα βακτήρια.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Singh B. K., Walker A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 428-471.
2. Tagusawava F., Jacobson R. A. (1977). Crystal and Molecular Structure of Carbamate Insecticides. 1. Mesurol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 329.
3. Dragun J., Kuffner A.C., Schneider R.W. (1984). Groundwater contamination. 1. Transport and transformation of organic chemicals. *Chemical Engineering*, 91, 65-70.
4. EPA (2004) <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets>.
5. Post. (1998) Organophosphate (Post note 12). Parliamentary Office of science and Technology, London, UK.
6. Mulchandani A., Kaneva I., Chen W. (1999a). Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 216-223.
7. Karalliedde L., Senanayake N. (1999). Organophosphorus insecticide poisoning. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry* 11, 4-9.
8. MAFF/HSE. (1995). Annual report of the working party on pesticide residue. HMSO.
9. Pesticide Trust. (1996). Pesticide Trust Review. Pesticide Trust, London
10. Sogorb, M.A., Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128, 215-228.
11. Leibson T. MD, Lifshitz M. MD. (2008). Organophosphate and Carbamate Poisoning: Review of the Current literature and Summary of Clinical and laboratory Experience in Southern Israel. *Toxicology*, 10, 767-770.
12. Fact Sheet Population Health Branch. (2002). Carbamate Insecticides. Queensland Government.
13. Ragnarsdottir, K.V. (2000). Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *Journal of the Geological Society*, 157, 859-876.

14. Bjørling-Poulsen M., Raun Andersen H. & Grandjean P. (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *BioMed Central*, 7, 50.
15. Cátheres T., Megharaj M., Naidu R. (2008). Degradation of fenamiphos in soils collected from different geographical regions: The influence of soil properties and climatic conditions. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 43, 314-322.
16. MacRae, I.C. (1989). Microbial metabolism of pesticides and structurally related compounds. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 109, 1-87.
17. Aislabie J., Loyd-Jones G. (1995). A Review of Bacterial Degradation of Pesticides, *Australian Journal of Soil Research*, 33, 925-942.
18. Karpouzas D.G., Walker A. (2000). Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* strains epI and II to degrade the organophosphate ethoprophos. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 40-48.
19. Karpouzas D.G., Fotopoulou A., Menkissoglu Spiroudi O., Singh B.K. (2005). Non-specific biodegradation of the organophosphorus pesticides, cadusafos and ethoprophos, by two bacterial isolates. *FEMS Microbiology Ecology*, 53, 369-378.
20. Arbeli Z., Fuentes C.L. (2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions: and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*, 26, 1733-1746.
21. Φωτοπούλου Δ. Α. (2004). Απομόνωση και χαρακτηρισμός βακτηρίων που αποδομούν το νηματωδοκτόνο cadusafos στο έδαφος. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Γεωπονίας, Τομέας Φυτοπροστασίας
22. Chapman, R.A., Harris, C.R. (1990). Enhanced degradation of insecticides in soil: Factors influencing the development and effects of enhanced microbial activity. In: Racke, K.D., Coats, J.R. (Eds.), *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 82-96.
23. Walker A., Roberts S.J. (1993). Degradation biodegradation and enhanced biodegradation. *Proceedings IX Symposium Pesticide Chemistry, Mobility and Degradation of Xenobiotics*, Piacenza, Italy, 357-370.

24. Karpouzas D.G., Morgan J.A.W., Walker A. (2000a). Isolation and characterisation of ethoprophos-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 33, 209-218.
25. Karpouzas D.G., Morgan J.A.W., Walker A. (2000). Isolation and characterization of 23 carbofuran-degrading bacteria from soils from distant geographical areas. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 353-358.
26. Smith D., Alvey S., Crowley D.E. (2005). Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolates from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 53, 265-273.
27. Breugelmans P., D'Huys P.J, De Mot R., Springael D. (2007). Characterization of novel linuron-minerilizing bacterial consortia enriched from long-term linuron-treated agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 62, 374-385.
28. Maria S. Holtze, Sebastian R. Sørensen, Jan Sørensen, Hans Christian B. Hansen, Jens Aamand. (2006). Biostimulation and enrichment of 2,6-dichlorobenzamide-mineralising soil bacterial communities from dichlobenil-exposed soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 216-223.
29. Singh B.K., Kuhad R.C. (1999). Biodegradation of lindane by the white-rot fungus *Trametes hirsutus*. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 238-241.
30. Singh B.K., Kuhad R.C. (2000). Degradation of the pesticide lindane by white-rot fungi *Cyathus bulleri* and *Phanerochaete sordida*. *Pest Management Science*, 56, 142-146.
31. Singh B.K, Kuhad R.C., Singh A., Lal R., Triapthi K.K. (1999). Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 19, 197-225.
32. Singh B.K., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D.J. (2003b). Role of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5198-5206.
33. Singh B.K., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D.J. (2004). Biodegradation of Chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in the bioremediation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4855-4863.
34. Siddaramappa R., Rajaram K.P., Sethunathan N.N. (1973). Degradation of parathion by bacteria isolated from flooded soil. *Applied Microbiology*, 26, 846-849.

35. Tolbot H.W., Johnson L.M., Munneck D.M. (1984). Glyphosate utilization by *Pseudomonas* sp. and *Alcaligenes* sp. isolated from environmental sources. *Current Microbiology*, 10, 255-259.
36. Dejonghe W., Berteloot E., Goris J., Boon N., Crul K., Maertens S., Höfte M., De Vos P., Verstraete W., Top E.M. (2002). *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1532-1541.
37. Swetha V.P., Phale P.S. (2005). Metabolism of Carbaryl via 1,2-Dihydroxynaphthalene by Soil Isolates *Pseudomonas* sp. Strains C4, C5 and C6. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5951-5956.
38. Ou L.T., Thomas J.E. (1994). Influence of soil organic matter and soil surfaces on a bacterial consortium that mineralises fenamiphos. *Soil Science Society of America Journal*, 58, 1148-1153.
39. Singh, B.K., Walker, A., Alum, J., Morgan, W., Wright, D. (2003). Role of soil pH in the development of enhanced biodegradation of fenamiphos. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7035-7043.
40. Karpouzas D.G., Karanasios E., Menkissoglu-Spiroudi U. (2003). Enhanced microbial degradation of cadusafos in soils from potato monoculture: demonstration and characterization. *Chemosphere*, 56, 549-559.
41. Ramanand K., Sharmila M., Sethunathan N. (1988). Mineralization of Carbofuran by a Soil Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2129-2133.
42. Karns, J.S., Mulbry W.W., Nelson J.O., Kerney P.C. (1986). Metabolism of carbofuran by a pure bacterial culture. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 25, 211-217.
43. Chauldry G.R., Ali H.D. (1988). Bacterial metabolism of carbofuran. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1414-1419.
44. Feng X., Ou L.T., Ogram A. (1997). Plasmid mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. Strain CF06. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1332-1337.
45. Karayilanoglu T., Kenar L., Serdar M., Kose S., Aydin A. (2008). Bacterial biodegradation of aldricarb and determination of bacterium which has the most biodegradable effect. *Turkish Journal of Biochemistry*, 33, 209-214.

46. Kok F.N., Arica M.Y., Hahcigil C., Alaeddinoglu G., Hasirci V. (1999). Biodegradation of aldicarb in a packed-bed reactor by immobilized *Methylosinus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 291-296.
47. Mervat S. M. (2009). Degradation of methomyl by a novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* M1. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12, 0717-3458.
48. <http://extoxnet.orst.edu/pips/fenamiph.htm>
49. Singh B.K., Walker A., Wright D.J. (2006). Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: Influence of different environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 2682-2693.
50. Cáceres T., Wenxiang H., Megharaj M., Naidu R. (2009). Effect of insecticide fenamiphos on soil microbial activities in Australian and Ecuadorean soils. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 44, 13-17.
51. Cáceres T., Ying G.C., Kookana R. (2002). Sorption of pesticides in banana production on soils of Ecuador. *Australian Journal of Soil Research*, 40, 1085-1094.
52. Franzmann P.D., Zappia L.R., Tilbury A.L., Patterson B.M., Davis G.B., Mandelbaum R.T. (2000). Bioaugmentation of atrazine and fenamiphos impacted groundwater: laboratory evaluation. *Bioremediation Journal*, 24, 48-68.
53. Ou L.T., Thomas J.E., Dickson D. W. (1994). Degradation of fenamiphos in soil with a history of continuous fenamiphos applications. *Soil Science Society of America Journal*, 58, 1139-1147.
54. Megharaj M., Singh, N., Kookana R., Naidu R. (2003). Hydrolysis of fenamiphos and its oxidation products by a soil bacterium in pure culture, soil and water. *Applied Microbiology Biotechnology*, 61, 252-256.
55. Cáceres T.P., Megharaj M., Malik S., Beer M., Naidu R. (2009). Hydrolysis of fenamiphos and its toxic oxidation products by *Microbacterium* sp. in pure cultures and groundwater. *Biosource Technology*, 100, 2732-2736.
56. Chung K.Y., Ou L.T. (1986). Degradation of fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulphone in soil with a previous history of continuous applications of fenamiphos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 30, 452-458.

57. Karpouzas D.G., Hatziapostolou P., Papadopoulou Mourkidou E., Giannakou I.O., Georgiadou A. (2004). The enhanced biodegradation of fenamiphos in soils from previously-treated and the effect of soil fumigants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 2009-2107.
58. Singh B.K., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D.J. (2003). Role of soil pH in the development of enhanced biodegradation of fenamiphos. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7035-7043.
59. <http://extoxnet.orst.edu/pips/oxamyl.htm>
60. Gerstl Z. (1984). Adsorption, decomposition and movement of oxamyl in soil. *Pesticide Science*, 15, 9-17.
61. Bromilow R.H., Baker R.J., Freeman M.A.H., Corog K. (1980). The degradation of aldicarb and oxamyl in soil. *Pesticide Science*, 11, 371-378.
62. Smelt J.H., Dekker A., Leistra M., Houx N.W.H. (1983). Conversion of four carbamoyloximes in soil samples from above and below the soil water table. *Pesticide Science*, 14, 173-181.
63. Registration Eligibility Decision for Oxamyl. US Environmental Protection Agency Office of Pesticides Programs
64. Osborn R.K., Haydock P.P.J., Edwards S.G. (2010). Isolation and identification of oxamyl-degrading bacteria from UK agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1-3.
65. Dunbar J., White S., Forney L. (1997). Genetic diversity through the looking glass: effect of environmental bias. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1326-1331.
66. McRae, B.M., Lapara T.M., Hozalski R.M. (2004). Biodegradation of haloacetic acids by bacterial enrichment cultures. *Chemosphere*, 55, 915-925.
67. Torsvik V., Ovreas L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 240-245.
68. Simonsen A., Holtze M.S., Sorensen S.R., Sorensen S.J., Aamand J. (2006). Mineralization of 2,6-dichlorobenzamide (BAM) in dichlobenil-exposed soils and isolation of a BAM-mineralizing *Aminobacter* sp. *Environmental Pollution*, 144, 289-295.
69. Breugelmans P., D'Huys P.J., Mot R.D., Springael D. (2007). Characterization of novel linuron-mineralizing bacterial consortia enriched from long-term linuron-treated agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 62, 374-385.

70. Shi S., Bending G.D. (2007). Changes to the structure of *Sphingomonas* spp. Communities associated with biodegradation of herbicide isoproturon in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 269, 110-116.
71. Liesac W., Weyland H., Stackebrandt E. (1991). Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rRNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbial Ecology*, 21, 191-198.
72. Ρουσίδου Κωνσταντίνα. (2007). Η επίδραση υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (κατσίγαρος) στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
73. Muyzer G., De Waal C., Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
74. Donner G., Schwarz K., Hoppe H.G., Muyzer G. (1996). Profiling the succession of bacterial populations in pelagic chemoclines. *Archives of Hydrobiology. Special Issues Advanced Limnology*, 48, 7-14.
75. Kojdrój J., Van Elsas J.D. (2000). Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil DNA used for microbial community fingerprinting. *Biology and Fertility of Soils*. 31, 372-378.
76. Ou L.T. (1991). Interactions of microorganisms and soil during fenamiphos degradation. *Soil Science Society of America Journal*, 55, 716-722.
77. Zhongli C., Shunpeng L., Guoping F. (2001). Isolation of methyl parathion degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4922-4925.
78. Nazarian A. (2007). Utilization of dimethoate by wild type *Pseudomonas putida* from polluted sites in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 664-667.
79. Racke K.D., Coats R.J. (1987). Enhanced degradation of isofenphos by soil microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 94-99.
80. Bhadhabe B.J., Dhakephalkar P.K., Sarnik S.S., Kanekar P.P. (2002). Plasmid-associated biodegradation of an organophosphorus pesticide, monocrotophos, by *Pseudomonas mendocina*. *Biotechnology Letters*, 24, 647-650.

81. Liu F.Y., Hong M.Z., Liu D.M., Li Y.W., Shou P.S., Hai Y., Shi G.Q. (2007). Biodegradation of methyl parathion by *Acinetobacter radioresistens* USTB-04. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 1257-1260.
82. Xie S., Liu J., Li L., Qiao C. (2009). Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates. *Journal of Environmental Science*, 21, 76-82.
83. Zheng Y.L., Liu D.L., Gao Q., Wang W., Shi X.S. (2006). Isolation and characterization of a bacterium HS-A32 capable of degrading methamidophos. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 12, 399-403.
84. Sorensen S.R., Rasmussen J., Jackobsen C.S., Jacobsen O.S., Juhler R.K., Aamand J. (2005). Elucidating the key member of a linuron-mineralizing bacterial community by PCR and reverse transcription-PCR denaturing gradient gel electrophoresis 16S rRNA gene fingerprinting and cultivation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4144-4148.
85. Smalla K., Wachtendorf U., Heuer H., Liu W.T., Forney L. (1998). Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1220-1225.
86. Newby D.T., Gentry T.J., Pepper I.T. (2000). Comparison of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pJP4 donors. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3399-3407.
87. Bastiaens L., Springael D., Wattiau P., Harms H., De Wachter R., Verachtert H., Diels L. (2000). Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1834-1843.
88. Mulbry W.W., P.C. Kearney, J.O. Nelson, J.S. Karns. (1987). Physical comparison of parathion hydrolase plasmids from *Pseudomonas diminuta* and *Flavobacterium* sp. *Plasmid*, 18, 173-177.
89. Attwood M.M., Harder W. (1972). A rapid and specific enrichment procedure for *Hyphomicrobium* spp., *Antonie Van Leeuwenhoek*, 38, 369-377.
90. Nikitin D.I., Vishnewetskaya O.Y., Chumakov K.M., Zlatkin I.V. (1990). Evolution relationship of some stalked and budding bacteria (genera *Caulobacter*, 'Hyphobacter', *Hyphomonas* and *Hyphomicrobium*) as studied by the new integral taxonomical method. *Archives in Microbiology*, 153, 123-128.

91. Bano N., Musarrat J. (2006). Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral biocontrol and plant growth promoting potential. *FEMS Microbiology Letters*, 231, 13-17.
92. Malik D., Singh M., Bhatia P. (2009). Biodegradation of cypermethrin by a *Pseudomonas* strain Cyp19 and its use in bioremediation of contaminated soil. *The Internet Journal of Microbiology* 6.
93. De Souza M.L., Wackett L.P., Sadowsky M.J. (1998). The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2323-2326.
94. Sarkar S., Satheskumar A., Premkumar R. (2009). Biodegradation of dicofol by *Pseudomonas* strains isolated from tea rhizosphere microflora. *International Journal of Integrative Biology*, 5, 164-166.
95. Ou L.T., Rao P.S.C. (1986). Degradation and metabolism of oxamyl and phenamiphos in soil. *Journal of Environmental Science and Health PartB*, 21, 25-40.
96. Osman K.A., Al-Rehiayani S.M., Al-Deghairi M.A., Salama A.K. (2009). Bioremediation of oxamyl in sandy soil using animal manures. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63, 341-346.
97. Smelt J.H., Crum S.J.H., Teunissen W., Leistra M. (1987). Accelerated transformation of aldicarb, oxamyl and ethoprophos after repeated soil treatments. *Crop Protection*, 6, 253-261.
98. Osborn R.K., Edwards S.G., Wilcox A., Haydock P.P.J. (2010a). Potential enhancement of degradation of the nematicides aldicarb, oxamyl and fosthiazate in UK agricultural soils through repeated applications. *Pest Management Science*, 66, 253-261.
99. Xu J.L., Wu J., Wang Z.C., Wang K., Li M.Y., Jiang J.D., He J., Li S.P. (2009). Isolation and characterization of a methomyl-degrading *Paracoccus* sp. Msw-1. *Pedosphere*, 19, 238-243.
100. Peng X., Zhang J.S., Li Y.Y., Li W., Xu G.M. Yan Y.C. (2008). Biodegradation of insecticide carbofuran by *Paracoccus* sp. YM3. *Journal of Environmental Science and Health PartB*, 43, 588-594.
101. Sorensen S.R., Holtze M.S., Simonsen A., Aamand J. (2007). Degradation and mineralization of nanomolar concentrations of the herbicide dichlobenil and its

persistent metabolite 2,6-dichlorobenzamide by *Aminobacter* spp. isolated from dichlobenil-treated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 399-406.