



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ,
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη του μεταβολισμού του μυκητοκτόνου
iprodione από βακτηριακά στελέχη του γένους
Arthrobacter sp. και Achromobacter sp.**

**Study of the fungicide iprodione's metabolism
from bacterial strains of the genus
Arthrobacter sp. and Achromobacter sp.**

Διπλωματική Εργασία

Χρήστου Βασιλική
Λάρισα 2016

**Μελέτη του μεταβολισμού του μυκητοκτόνου
iprodione από βακτηριακά στελέχη του γένους
Arthrobacter sp. και Achromobacter sp.**

**Study of the fungicide iprodione's metabolism
from bacterial strains of the genus
Arthrobacter sp. and Achromobacter sp.**

Επιβλέπων : Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μόσιαλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την επιστημονική καθοδήγηση και τη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Marco Campos για την αστείρευτη υπομονή, την καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, χωρίς την αδιάκοπη προσοχή του οποίου δε θα μπορούσε να υλοποιηθεί η παρούσα εργασία.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και ειδικότερα την Chiara Perruchon, που με συνέδραμε στην προσπάθειά μου αυτή .

Ευχαριστώ την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Λιαδάκη Καλλιόπη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο για τη συμμετοχή τους στη τριμελή επιτροπή.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Μυκητοκτόνο iprodione.....	8
1.1.1 Φυσικοχημικές Ιδιότητες.....	8
1.1.2 Χρήσεις.....	8
1.1.3 Τρόπος Δράσης.....	9
1.1.4 Τοξικότητα.....	9
1.1.5 Περιβαλλοντική Τύχη και Συμπεριφορά.....	10
1.1.6 Μικροβιακός Μεταβολισμός.....	11
1.2 Γένη Βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	13
1.2.1 <i>Arthrobacter</i> spp.....	13
1.2.2 <i>Achromobacter</i> spp.....	14
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	15
2.1 Χημικά.....	15
2.2 Θρεπτικά Μέσα.....	15
2.3 Βακτηριακά Στελέχη.....	15
3. Πειραματικό Μέρος.....	16
3.1 Σύνθεση των μεταβολιτών του iprodione.....	16
3.2 Μικροβιακός μεταβολισμός του iprodione και των μεταβολιτών του.....	16
3.3 Ανάλυση iprodione και μεταβολιτών σε σύστημα HPLC- PDA	17
3.4 Επεξεργασία Δεδομένων.....	17
4. Αποτελέσματα.....	18
4.1 Αποδόμηση και μεταβολισμός iprodione.....	18
4.2 Αποδόμηση και μεταβολισμός μεταβολίτη I (met I).....	20
4.3 Αποδόμηση και μεταβολισμός μεταβολίτη II (met II).....	21
5. Συζήτηση.....	23
6. Βιβλιογραφία.....	25

Περίληψη

Η μικροβιακή αποδόμηση του iprodione είναι η βασική διαδικασία απομάκρυνσής του από το έδαφος. Πρόσφατες μελέτες μας οδήγησαν στην απομόνωση ενός consortium ικανό να αποικοδομεί το iprodione, αποτελούμενο από ένα *Arthrobacter sp.* στέλεχος C1 και *Achromobacter sp.* στέλεχος C2. Ωστόσο, τα μεταβολικά ενδιαμέσα και ο ρόλος των δύο στελεχών στο μεταβολικό μονοπάτι του iprodione παρέμεναν άγνωστα. Εξετάσαμε την αποικοδόμηση και το μεταβολισμό του iprodione και των πιθανών μεταβολικών προϊόντων του 3,5-dichlorophenyl-carboxamide (μεταβολίτη I) και 3,5-dichlorophenylurea-acetate (μεταβολίτη II) από στελέχη C1, C2, και το συνδυασμό τους σε εκλεκτικό (MSM) και πλούσιο θρεπτικό μέσο (LB). Το στέλεχος C1 ήταν σε θέση να χρησιμοποιεί το iprodione και το μεταβολίτη II ως τη μοναδική πηγή C και N και να τα υδρολύει ταχύτατα με $DT_{50} = 2.3$ h και 2.9 h αντίστοιχα. Αντίθετα, είναι ικανό να μεταβολίζει το μεταβολίτη I μόνο παρουσία επιπλέον θρεπτικών στοιχείων (LB) καταδεικνύοντας ότι το βήμα αυτό στο μεταβολικό μονοπάτι του iprodione, ήταν συμμεταβολικό. Από άλλη πλευρά, το στέλεχος C2 ήταν ικανό να αποδομεί το iprodione και τους μεταβολίτες του μόνο στο θρεπτικό μέσο LB, δηλαδή παρουσία και άλλων θρεπτικών στοιχείων. Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος C2 δεν είχε τη δυνατότητα να χρησιμοποιεί το iprodione και τα προϊόντα μεταβολισμού του ως πηγές C και N και πραγματοποιούσε το μεταβολικό μονοπάτι του iprodione μόνο συμμεταβολικά. Συνολικά το βακτηριακό στέλεχος *Arthrobacter* C1 φαίνεται ότι αποτελεί τον κύριο αποδομητή του iprodione με το βήμα μετατροπής του μεταβολίτη I στον μεταβολίτη II να αποτελεί το ρυθμο-καθοριστικό βήμα στο μονοπάτι μεταβολισμού του iprodione. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στον εντοπισμό των γονιδίων που εμπλέκονται στα διάφορα βήματα του μονοπατιού αποδόμησης του iprodione από το στέλεχος C1.

Abstract

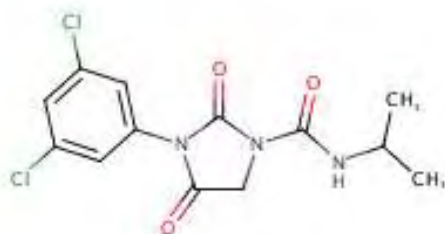
Microbial degradation of iprodione is the key process controlling its soil dissipation. Recent studies led us to the isolation of an iprodione-degrading consortium composed of an *Arthrobacter sp.* strain C1 and an *Achromobacter sp.* strain C2. However the metabolic intermediates and the role of the two strains in the metabolic steps of iprodione were unknown. We examined the degradation and metabolism of iprodione and its possible metabolic intermediates 3,5-dichlorophenyl-carboxamide (metabolite I) and 3,5dichlorophenylurea-acetate (metabolite II) by strains C1, C2, and their combination under selective (MSM) and nutrient rich conditions (LB). Furthermore the capacity of strain C1 to transform other pesticides, chemically related to iprodione was investigated. Strain C1 was able to use iprodione and metabolite II as the sole C and N source and to hydrolyses them rapidly with DT50=2.3h and 2.9h, respectively. On the contrary, it was able to metabolize only in the presence of extra nutrients (LB), suggesting that this step of iprodione's metabolic pathway was metabolic. On other hand, strain C2 was able to metabolize iprodione and its metabolites in LB medium, only in the presence of more nutrients. From the above, is it concluded that specific strain C2 was not able to use either iprodione or its metabolic products as C and N sources, so performed the metabolic pathway of iprodione only co-metabolically. In total, the bacterial strain *Arthrobacter* C1 seems to be the main degrader of iprodione with the transforming step of metabolite I to metabolite II, being the rate- limiting step in the metabolic pathway of iprodione. Further analysis, will focus in genes implicated into the various steps of the metabolic pathway of iprodione.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μυκητοκτόνο Iprodione

1.1.1 Φυσικοχημικές Ιδιότητες

Το iprodione (3-(3,5-dichlorophenyl)-N-isopropyl-2,4-dioxoimidazolidine-1-carboxamide) είναι ένα μυκητοκτόνο με μοριακό τύπο $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$. Με μοριακό βάρος 330,17 και σημείο τήξης τους 136 περίπου βαθμούς Κελσίου (Budavari, 1996), αποτελεί ένα μη διαβρωτικό υλικό για τα μέταλλα (Hartley and Kidd, 1987). Πρόκειται για έναν άχρωμο, άοσμο (Tomlin, 1997) και μη υγροσκοπικό κρύσταλλο (Farm Chemicals Handbook, 2001).



Εικόνα 1:
Συντακτικός Τύπος iprodione

1.1.2 Χρήσεις

Το iprodione ως ένα ευρύ φάσματος μυκητοκτόνο, χρησιμοποιείται για την πρόληψη της βλάστησης των σπορίων των μυκήτων σε ένα μεγάλο αριθμό καλλιεργειών (Miñambres, 2010). Πρόκειται για ένα συνθετικό μυκητοκτόνο που ανήκει στην οικογένεια των δικαρβοξαμιδίων, το οποίο παρασκευάστηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1990.

Χρησιμοποιείται ως προστατευτικό φυλλώματος και σπορίων, παρουσιάζοντας τόσο προληπτική όσο και θεραπευτική δράση. Η χρήση του iprodione ενδείκνυται έναντι μυκήτων *Botrytis spp.*, *Corticium spp.*, *Fusarium spp.*, *Helminthosporium spp.*, *Monilinia spp.*, *Phoma spp.*, *Pleiochaeta spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Sclerotinia spp.*, *Sclerotium spp.*, *Septoria spp.* and *Typhula spp.*

Το Iprodione χρησιμοποιείται με επιτυχία σε χλοοτάπητες αναψυχής, όπως γήπεδα γκολφ και μπόουλινγκ, αθλητικά στάδια, γήπεδα κρίκετ και γήπεδα τένις. Μπορεί επίσης, να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή καλλωπιστικών φυτών τόσο στη φάση της αύξησης όσο και αρχικά στο στάδιο του σπόρου. Εκτός των παραπάνω το iprodione χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση μυκήτων σε πλήθος καλλιεργειών όπως λαχανικά, μηλοειδή και πυρηνόκαρπα, βαμβάκι, ηλίανθο, λαχανάκια Βρυξελλών, βολβός κρεμμυδιού, κουνουπίδι, μαρούλι, ελαιοκράμβη, βατόμουρο, φράουλα, ντομάτα κ.α.

1.1.3 Τρόπος Δράσης

Γενικά, το *iprodione* επηρεάζει όλα τα αναπτυξιακά στάδια των μυκήτων, όπως τη βλαστική ικανότητα του σπέρματος, την ανάπτυξη του μυκηλίου και την παραγωγή των σπορίων. Σε βιοχημικό επίπεδο, πρόσφατα δεδομένα αποκαλύπτουν ότι το *iprodione* μπορεί να αναστέλλει πρωτεϊνικές κινάσες, παρεμβαίνοντας, ως εκ τούτου, στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση που παίζει ελεγκτικό ρόλο σε πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου την ενσωμάτωση υδατανθράκων στα συστατικά των μυκητιακών κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα, δρα παρεμποδίζοντας τη σύνθεση DNA και RNA στα βλασάνοντα μυκητιακά σπόρια, όπως επίσης και αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου NADH αναγωγή του κυτοχρώματος c. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης λιπιδίων και μεμβρανών, οδηγώντας τελικά σε αναστολή της ανάπτυξης μυκηλίου και υφών. Ταυτόχρονα, επηρεάζεται με τον τρόπο αυτό τη μεταγωγή σήματος, που λαμβάνει χώρα σε επίπεδο μεμβρανών (Ochiai, 2002). Το μυκητοκτόνο είναι σε θέση να επηρεάζει τη δομή της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους, σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα (Miñambres, 2010). Αλληλεπιδρά μέσω μεταγωγής σήματος με το μυκητοκτόνο *vinclozolin* ((RS) -3- (3,5-διχλωροφαινυλ) -5-μεθυλ-5-βινυλο-1,3-οξαζολιδινο-2,4-διόνη) και προκαλεί χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης, ανωμαλίες και μεταβολές στην παραγωγή εξοζών και χιτίνης σε αγωγή με *B. cinerea* (Cabral and Cabral, 1997).

Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, το *iprodione*, έχει μια πολύ ειδική δράση, με ικανότητα να προκαλεί οξειδωτική βλάβη μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS). Η δράση του αυτή δεν φαίνεται να είναι ειδο-ειδική (Radice et al., 2001).

1.1.4 Τοξικότητα

Η έκθεση σε *iprodione* μπορεί να προκύψει μετά από δερματική επαφή και την εισπνοή του σπρέι, ειδικά για τους εργαζόμενους που κάνουν εφαρμογή της ένωσης ως παρασιτοκτόνο (Parmeggiani, 1983). Η έκθεση, ωστόσο, στον γενικό πληθυσμό μπορεί να συμβεί μέσω της κατανάλωσης τροφίμων που περιέχουν υπολείμματα του μυκητοκτόνου μέσω της χρήσης του σε κήπους, φρούτα και λαχανικά, καλλωπιστικά φυτά, γρασίδι, γήπεδα γκολφ, πάρκα και χώρους αναψυχής (USEPA, 2001).

Δηλητηριάσεις σε ανθρώπους δεν έχουν αναφερθεί (USEPA, 1999), αλλά πιθανώς να είναι καρκινογενές (USEPA, 2006). Όσον αφορά άλλα είδη δεν παρατηρήθηκαν τοξικά αποτελέσματα όταν εφαρμόστηκε δερματικά σε αρουραίους στα 2500 mg/kg ή κουνέλια στα 1000 mg/kg. Σε δοκιμές μετά από κατάποση των 1000 mg/kg και 2400 mg/kg ημερησίως σε δίαιτες αρουραίων και σκύλων, αντίστοιχα, δεν υπήρξαν αξιοσημείωτες συνέπειες (Gosselin, 1984). Δεν είναι τοξικό για τις μέλισσες (Hartley and Kidd, 1987). Έχει δειχθεί ότι είναι μη-φυτοτοξικό όταν χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες (Tomlin, 1994). Ωστόσο, είναι ελαφρώς τοξικό για υδρόβια πτηνά και παρουσιάζει δυσμενείς επιδράσεις σε υδρόβιους οργανισμούς καθώς είναι μετρίως τοξικό για κάποια είδη ψαριών.

Αναφέρθηκαν, επίσης, παράγοντες βιοσυσσώρευσης στον κυπρίνου και σε άλλα είδη ψαριών, υποδεικνύοντας χαμηλό δυναμικό βιοσυσσώρευσης (U.S. National Library of Medicine, 1995).

Η έκθεση στο μυκητοκτόνο προκαλεί ήπια οξεία στοματική και δερματική τοξικότητα σε πειραματόζωα (USEPA, 1999). Όσον αφορά την χρόνια τοξικότητα του *iprodione*, έχει παρατηρηθεί σε δόσεις που ξεκινούν από περίπου $1,5 \frac{mg/kg}{day}$ για περισσότερο από ένα έτος, ότι οι σκύλοι είχαν μειωμένο βάρος προστάτη και αλλαγές εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων (βλάβη στα μόρια της αιμοσφαιρίνης). Τα θηλυκά είχαν επίσης ελαφριές μειώσεις στο βάρος της μήτρας. Δεν παρατηρήθηκαν δυσμενείς επιδράσεις σε δόσεις χαμηλότερες από $0,5 \frac{mg/kg}{day}$ (USEPA, 1990). Τα όργανα-στόχοι του *iprodione*, λοιπόν, όπως προσδιορίζονται σε μελέτες σε ζώα περιλαμβάνουν το αναπαραγωγικό σύστημα (προστάτη και μήτρα), καθώς επίσης το ήπαρ και τους νεφρούς.

Με βάση τα τωρινά δεδομένα, το *iprodione* δεν είναι πιθανό να προκαλεί επιδράσεις στην αναπαραγωγή, καθώς, θηλυκοί αρουραίοι που τρέφονται με *iprodione* για περισσότερες από τρεις διαδοχικές γενιές δεν παρουσίασαν δυσμενείς επιδράσεις στην αναπαραγωγική τους ικανότητα ή/και τη γονιμότητα σε δόσεις μέχρι και $5 \frac{mg/kg}{day}$ (USEPA, 1990).

Επίσης, δεν υπήρξαν επιδράσεις στην ανάπτυξη (τερατογενέσεις) που σημειώνεται στους απογόνους των εγκύων αρουραίων που έλαβαν στη διατροφή τους δόσεις των περίπου $5,4 \frac{mg/kg}{day}$. Ωστόσο, η δοσολογία των $120 \frac{mg/kg}{day}$ προκάλεσε απροσδιόριστη αναπτυξιακή τοξικότητα σε αρουραίους. Τα κουνέλια δεν ανέπτυξαν καμία τοξικότητα σχετιζόμενη με τη δόση με δοσολογία μέχρι τα $2,7 \frac{mg/kg}{day}$ του *iprodione*, αλλά αύξηση της δόσης στα $6 \frac{mg/kg}{day}$ αποδείχθηκε τοξική (USEPA, 1990). Φαίνεται, επομένως, ότι το μυκητοκτόνο *iprodione* δεν είναι πιθανό να προκαλέσει τερατογόνο δράση σε αναμενόμενα επίπεδα έκθεσης.

Καρκινογόνες επιδράσεις σε ζώα αξιολογήθηκαν μετά από ένα διετές πείραμα τροφοδοσίας σε αρουραίους, όπου δεν παρατηρήθηκαν αυξήσεις στο σχηματισμό όγκων ή των προδρόμων του όγκου (νεοπλασματικές εστίες) σε δόσεις των περίπου $2,5 \frac{mg/kg}{day}$. Ενώ, μια μελέτη των 18 μηνών σε ποντίκια έδειξαν καρκινογένεση σε πολύ υψηλότερες δόσεις έως περίπου $22 \frac{mg/kg}{day}$ (USEPA, 1990).

1.1.5 Περιβαλλοντική Τύχη και Συμπεριφορά

Η χρήση του *iprodione* ως μυκητοκτόνου αναμένεται να οδηγήσει σε ρύπανση του περιβάλλοντος μέσω διαφόρων σημειακών πηγών ρύπανσης.

Κατανομή στο έδαφος και τα υπόγεια ύδατα: Ο χρόνος ημιζωής του *iprodione* σε περιοχές του εδάφους ποικίλει μεταξύ 7 και 60 ημερών (Kidd and James, 1991; Wauchore et al., 1992). Ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα χρόνου ημιζωής στα περισσότερα εδάφη υπολογίζεται στις 14 ημέρες (Martin et al., 1991). Οι ρυθμοί αποδόμησης ποικίλουν ανάλογα με την οξύτητα του εδάφους, τη περιεκτικότητά του σε άργιλο, και την προγενέστερη εφαρμογή μυκητοκτόνου. Σε εδάφη που είχε γίνει εφαρμογή *iprodione* για 10 ή περισσότερα χρόνια, συνέβη αργή ή λίγη διάσπαση της ένωσης *vinclozolin*, ενώ σε εδάφη που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με *vinclozolin*, η αποδόμηση των *vinclozolin* και *iprodione* υπήρξε ταχεία (U.S. National Library of Medicine, 1995). Το *iprodione* είναι ελαφρώς υδατοδιαλυτό αλλά προσροφάται μετρίως έως ισχυρά από τα περισσότερα εδάφη (Wauchore et al., 1992).

Κατανομή στο νερό: Η ένωση διασπάται πολύ γρήγορα στο νερό κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το ποσοστό αποδόμησης είναι χαμηλότερο, αλλά εξακολουθεί να είναι ταχεία η διάσπασή του υπό αναερόβιες συνθήκες (Martin, C. et al., 1991). Η ταχεία υδρόλυση που υφίσταται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, το μυκητοκτόνο, υποδεικνύει τη μειωμένη ικανότητά του να βιοσυσσωρεύεται. Η ένωση αποδομείται εύκολα στο υπεριώδες φως.

Κατανομή στον αέρα: Αν απελευθερωθεί στον αέρα, η πίεση ατμών 3.75×10^{-9} mm Hg στους 25° C, υποδηλώνει ότι το *iprodione* θα υπάρχει μόνο στη σωματιδιακή φάση στην περιβάλλουσα ατμόσφαιρα. Το μυκητοκτόνο που βρίσκεται στη σωματιδιακή αυτή μορφή, αναμένεται να μπορεί να αφαιρεθεί από την ατμόσφαιρα μέσω υγρής ή ξηρής εναπόθεσης.

Κατανομή σε φυτικούς οργανισμούς: Η ένωση διασπάται γρήγορα στα φυτά μετά την πρόσληψή της από τις ρίζες και τη μετακίνησή της. Ο κύριος μεταβολίτης στα φυτά είναι η 3,5-διχλωροανιλίνη (Kidd and James, 1991). Το *iprodione* μόνο ή σε συνδυασμούς με διάφορα άλλα μυκητοκτόνα δεν ήταν τοξικό για τα φυτά (Suta et al., 1979).

1.1.6 Μικροβιακός Μεταβολισμός

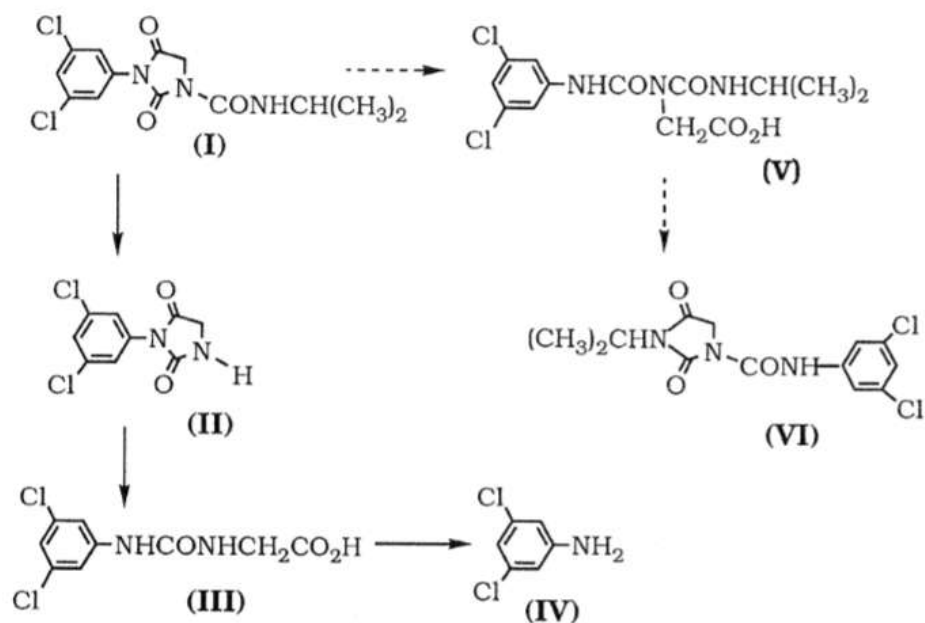
Όλα, σχεδόν, τα παρασιτοκτόνα, συμπεριλαμβανομένων των μυκητοκτόνων που μελετώνται στην παρούσα εργασία, από τη στιγμή που εφαρμόζονται στο έδαφος πρόκειται να υποστούν αποδόμηση, άλλα σε μικρότερο και άλλα σε μεγαλύτερο βαθμό. Τόσο οι φυσικοχημικές αντιδράσεις όσο και οι μικροβιακές επιδράσεις που εμπλέκονται, οδηγούν προς αυτήν την κατεύθυνση. Όταν η μικροβιακή αποδόμηση είναι η κύρια διαδικασία απομάκρυνσης των γεωργικών φαρμάκων από το περιβάλλον, τότε οι επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του ίδιου γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος συχνά οδηγούν σε αύξηση των μικροβιακών πληθυσμών που έχουν την ικανότητα να αποδομούν ταχύτατα το εν λόγω γεωργικό φάρμακο.

Το γεγονός αυτό οδηγεί τελικά σε επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου και συχνά σε μειωμένη αποτελεσματικότητα. (Athiel, 1995).

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε Γαλλία, Ηνωμένο Βασίλειο και Νέα Ζηλανδία έδειξαν, σε δείγματα εδάφους, αυξημένο ρυθμό αποδόμησης των μυκητοκτόνων *iprodione* και *vinclozolin*, μετά από τρεις διαδοχικές εφαρμογές των συγκεκριμένων μυκητοκτόνων. Η αποδόμηση, ωστόσο, του *iprodione* ήταν ταχεία σε μη αποστειρωμένο έδαφος, ενώ εμφάνιζε σημαντική υστέρηση σε μη αποστειρωμένο έδαφος. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ο ρόλος των μικροοργανισμών στην αποδόμηση των *iprodione* και *vinclozolin* στο έδαφος είναι ιδιαίτερα σημαντική, ειδικότερα κυμαίνεται από ουδέτερο έως αλκαλικό pH στο έδαφος (Slade et al., 1992).

Σε παλαιότερες μελέτες απομονώθηκε ένα βακτηριακό στέλεχος που ανήκει στο γένος *Arthrobacter*, που ήταν σε θέση να αποδομήσει το *iprodione*, αρχικά, στον μεταβολίτη II: *N*-(3,5-dichlorophenyl)-2,4-dioxoimidazolidine που, στη συνέχεια, μετατρέπεται στον μεταβολίτη III: 3,5-dichlorophenylurea acetic acid. Η υδρόλυση του τελευταίου, οδηγούσε σε παραγωγή του 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA), όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 2. Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως μόνο ένα μικρό ποσοστό 3,5-DCA σχηματίστηκε σε υγρή καλλιέργεια του *Arthrobacter*, ενώ το βασικό προϊόν αποδόμησης που βρέθηκε σε δείγματα εδάφους, στα οποία είχε ξαναγίνει προσθήκη του μυκητοκτόνου, ήταν το 3,5-DCA. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως υπάρχουν και άλλα βακτηριακά στελέχη ικανά να καταλύσουν τη μετατροπή του *iprodione* ή του μεταβολίτη III σε 3,5-DCA στο έδαφος. Αποδείχθηκε, πως τρία στελέχη *Pseudomonas* ήταν σε θέση να καταλύσουν συνεργατικά αυτή τη μετατροπή μέσω σχηματισμού ισοπροπυλαμίνης και δύο ακόμη μεταβολικών ενδιάμεσων (Mercadier et al., 1997).

Από την άλλη μεριά, υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με τη μικροβιακή αποδόμηση μυκητοκτόνων, όπως το *iprodione*, σε παρθένα εδάφη, όπου δηλαδή δεν έχει γίνει προγενέστερη χρήση του μυκητοκτόνου. Σε αυτήν την περίπτωση η ικανότητα του μικροοργανισμού να αποδομή την προς μελέτη ουσία, έγκειται στην δομική ομοιότητά της με τα φυσικά συστατικά του εδάφους, που υπό φυσιολογικές συνθήκες χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για την ανάπτυξη των βακτηρίων του εδάφους (Bollag and Liu, 1990). Τέτοια βακτήρια είναι σπάνιο να βρεθούν, αλλά αποτελούν μια ιδιαίτερα χρήσιμη γονιδιακή δεξαμενή καθώς μπορεί να αποκαλύψουν καινοφανή καταβολικά μονοπάτια στην βιοαποικοδόμηση οργανικών ρυπαντών, όπως το *iprodione*, ή άγνωστα προγονικά μεταβολικά μονοπάτια.



Εικόνα 2:

Το μικροβιακό μεταβολικό μονοπάτι του iprodione, όπως προτάθηκε από τους Mercadier et al., 1997.

1.2 Γένη βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

1.2.1 *Arthrobacter* spp.

Τα βακτήρια του γένους *Arthrobacter* ανήκουν σε μία ετερογενή ομάδα βακτηρίων, τα οποία δεν είχε αναφερθεί ότι έχουν απομονωθεί από ανθρώπινα κλινικά δείγματα μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1990. Αυτό ήταν κάπως περίεργο, γιατί τα *Arthrobacter* είναι τα πιο συχνά απομονωμένα ραβδόμορφα βακτήρια, όταν τα δείγματα εδάφους επωάζονται σε αερόβιες συνθήκες, υποδεικνύοντας ότι οι άνθρωποι αδιάκοπα εκτίθενται σε αυτά τα βακτήρια (Mages et al., 2008).

Συνήθως, νέα είδη έχουν περιγραφεί ως μέλη του γένους μόνο όταν ένα καθιερωμένο είδος του γένους *Arthrobacter* ταυτοποιείται ως το πλησιέστερο συγγενικά, η πεπτιδογλυκάνη δείχθηκε να περιέχει ένα χαρακτηριστικό δι-αμινοξύ

που είναι η λυσίνη, το οποίο αποτελεί διαγνωστικό δείκτη και, τέλος, παρατηρείται ένας κύκλος ζωής με εναλλαγή μορφολογικά ράβδων- κόκκων.

Μορφολογία: Ποικίλει, με χαρακτηριστικά στοιχεία τα Gram-αρνητικά ραβδία σε νέες καλλιέργειες και τις Gram-θετικές κοκκοειδείς μορφές σε παλαιότερες καλλιέργειες. Στα ενδιάμεσα στάδια μπορεί να δημιουργούν συναθροίσματα ή διακλαδισμένες μορφές, ή κοντά μη διακλαδισμένα νήματα. Κάποιες φορές μπορεί να παρατηρηθούν και μεγάλα σφαιρικά σωματίδια.

Χαρακτηριστικά των καλλιεργειών: Η ανάπτυξη τους στην επιφάνεια στερεού μέσου είναι συνήθως οπτικά λεία και απαλή με τις αποικίες που δημιουργούν στα τριβλία να είναι μικρές και σημειακές. Η ανάπτυξή του σε υγρό θρεπτικό μέσο είναι συνήθως αργή.

Περιβάλλον: Κυρίως έδαφος.

Φυσιολογία: Συνήθως χρησιμοποιούν είτε τα αμμωνιακά είτε νιτρικά άλατα ως μοναδική πηγή αζώτου. Μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη γλυκόζη και μερικές φορές άλλα σάκχαρα ως πηγές άνθρακα και ενέργειας, αλλά συνήθως χωρίς να παράγουν επαρκείς ποσότητες οξέος ώστε να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στο pH του μέσου (Busse, 2016)

1.2.2 *Achromobacter spp.*

Τα βακτήρια του γένους *Achromobacter* ανήκουν στην οικογένεια των *Alcaligenaceae*. Περιλαμβάνει Gram-αρνητικά κύτταρα με ραβδοειδές σχήμα και την ικανότητα μετακίνησης υπό τη βοήθεια μαστιγίων (Igra-Siegman, 1980). Πρόκειται για αερόβιους μικροοργανισμούς που συναντώνται τόσο στο έδαφος όσο και σε υδάτινο περιβάλλον. Έχουν επίσης, εντοπιστεί συχνά ως μολυσματικοί παράγοντες σε εργαστηριακές καλλιέργειες κυττάρων. Τα βακτήρια του γένους *Achromobacter* έχουν φυσική αντοχή σε όλες τις κεφαλοσπορίνες και συχνά στις αμινογλυκοσίδες και την αζτρεονάμη.

Έχουν χαρακτηριστεί ως ανθρώπινα παθογόνα, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου έχουμε ανοσοκατεσταλμένα συστήματα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της κυστικής ίνωσης (Amougeux et al., 2016), του καρκίνου και της νεφρικής ανεπάρκειας. Τα βακτήρια μπορεί να προκαλέσουν λοίμωξη, περιτονίτιδα και μηνιγγίτιδα σε ανοσοκατεσταλμένους ανθρώπους. Η μετάδοση γίνεται κυρίως μέσω άμεσης ή έμμεσης επαφής και σταγονιδίων, π.χ. μέσω μολυσμένων νεφρολοποιητών και συστημάτων αερισμού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Χημικά

Iprodione, *3,5-DCA*, (καθαρότητα $\geq 97\%$), *para-nitrophenyl-isothiocyanate* και *3,5-dichlorophenyl isocyanate* (καθαρότητα 96%), αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich, ΗΠΑ. Πρότυπα διαλύματα όλων των παραπάνω ουσιών σε μεθανόλη ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$) παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για αναλυτικούς σκοπούς. Διαλύματα των ανωτέρω χημικών ουσιών σε DMSO ($10.000 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Merck, Γερμανία) παρασκευάστηκαν, αποστειρώθηκαν με διήθηση (φίλτρο με μέγεθος πόρου $0.22 \mu\text{m}$: Millipore) και χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των θρεπτικών μέσων, τα οποία τροποποιήθηκαν με αυτές τις χημικές ουσίες.

2.2 Θρεπτικά μέσα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά μέσα, ένα πλούσιο σε θρεπτικά μέσο Luria Bertani (LB) και ένα εκλεκτικό θρεπτικό μέσο (MSM). Το MSM μέσο παρασκευάστηκε όπως περιγράφηκε από Rousseaux et al., (2001), αλλά χωρίς την προσθήκη κιτρικού νατρίου ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Το pH των δύο μέσων ρυθμίστηκε στο 5,0 με προσθήκη HCl για να ελαχιστοποιηθεί η αβιοτική αλκαλική υδρόλυση του *iprodione*. Στα παραπάνω θρεπτικά μέσα έγινε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας των πρότυπων διαλυμάτων των χημικών ουσιών σε DMSO ($10.000 \mu\text{g ml}^{-1}$) ώστε να δημιουργηθούν θρεπτικά μέσα που παρέχουν κατάλληλες συγκεντρώσεις *iprodione* και των άλλων χημικών ουσιών.

2.3 Βακτηριακά Στελέχη

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο βακτηριακά στελέχη *Arthrobacter sp. C1* (CCCT_16.01) και *Achromobacter sp. C2* (CCCT_16.02). Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν σε αξενικές καλλιέργειες από ένα consortium που ήταν σε θέση να αποδομεί το *iprodione*. Το συγκεκριμένο consortium απομονώθηκε από δείγμα εδάφους από βοσκότοπο στη Χιλή, στο οποίο δεν είχε γίνει προγενέστερη εφαρμογή του μυκητοκτόνου (Campos et al., 2015). Τα στελέχη κατατέθηκαν στην τράπεζα βακτηρίων Colección Chilena de Cultivos Tipo-CCCT/UFRO (CCCT) του Πανεπιστημίου Univerita de la Frontera, Tumeco, Χιλή. Τα βακτήρια, αρχικά, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB με 60 mm L^{-1} *iprodione*. Επώαστηκαν με ανάδευση για 48 h στους 28°C έτσι ώστε να παραχθεί αρκετή βακτηριακή βιομάζα, η οποία χρησιμοποιήθηκε μετέπειτα για τον εμβολιασμό των καλλιεργειών. Το βακτηριακό ίζημα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 10 λεπτά, πλύθηκε 3 φορές με αποστειρωμένο ddH₂O και επαναδιαλύθηκε σε ένα αποστειρωμένο διάλυμα 0,9% NaCl. Κλάσματα από το κυτταρικό εναίωρημα χρησιμοποιήθηκαν για να εμβολιαστούν φιάλες (εις τριπλούν) MSM ή LB, που περιείχαν *iprodione* ή άλλες προς μελέτη ουσίες (60 mmol L^{-1}) σε οπτική πυκνότητα OD₆₀₀ 0.2.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Σύνθεση των μεταβολιτών του *iprodione*

Η σύνθεση των μεταβολιτών I και II έγινε όπως περιγράφεται από Athiel et al., (1995) με τροποποιήσεις στη μέθοδο παρασκευής του μεταβολίτη II. Πιο συγκεκριμένα, ο μεταβολίτης II συντέθηκε ως εξής: προστέθηκε στάγδην 3,5-dichlorophenylisocyanate (1.880 mg) υπό ανάδευση σε ένα διάλυμα από 750 mg γλυκίνης (0,01 M) σε 7 mL NaOH (0.75 M). Το μίγμα θερμάνθηκε στους 30° C υπό ανάδευση για 4 ώρες, μέχρι τον πλήρη σχηματισμό ενός λευκού ιζήματος, το οποίο παρέμεινε στους 4° C όλη τη νύχτα. Το ίζημα, εν συνεχεία, διηθήθηκε μέσω μιας χοάνης Gooch και πλύθηκε με H₂O (3 ml). Στο διάλυμα προστέθηκαν 5ml HCl (1 N) στους 0 ° C. Τέλος, το στερεό ίζημα συλλέχθηκε με διήθηση και ξηράνθηκε υπό κενό όλη την νύχτα για να ληφθούν 865 mg του μεταβολίτη II (απόδοση σύνθεσης 36%), ενώ το σημείο τήξεως ήταν 199-201° C. Η καθαρότητα του μορίου που συντέθηκε επιβεβαιώθηκε με HNMR, το οποίο έδειξε: (CDCl₃, DMSO d₆): δ 3.92 (2H, d, CH₂); 5.41 (2H, s, NH); 6.88 (1H, s, arom); 7.41 (2H, s, arom); and 8.89 (1H, s, COOH) ppm. Ένα ποσοστό του μεταβολίτη II (350 mg) διαλύθηκε σε 10 ml HCl (4 N) και ανέρρευσε υπό ανάδευση για 2 ώρες για να συνθέσει μεταβολίτη I. Μετά από ψύξη το διάλυμα διηθήθηκε και το στερεό ίζημα (260 mg), ήταν ο μεταβολίτης I (80% απόδοση σύνθεσης), με σημείο τήξης 197-199° C. Η ανάλυση NMR επαλήθευσε την καθαρότητα του νεοσυντιθέμενου μορίου: ¹HNMR (CDCl₃, DMSO d₆): δ 4.16 (2H, s, CH₂); 7.38 (2H, s, arom); and 7.43 (1H, s, arom) ppm.

3.2 Μικροβιακός μεταβολισμός του *iprodione* και των μεταβολιτών του

Η ικανότητα των στελεχών C₁ και C₂, και του συνδυασμού τους (σε αναλογία 1: 1) να μεταβολίζουν το *iprodione* και τους μεταβολίτες του, I και II, διερευνήθηκε σε MSM και LB θρεπτικό μέσο. Χρησιμοποιήθηκαν εις τριπλούν κωνικές φιάλες τόσο LB όσο και MSM με 60 mmol L⁻¹ *iprodione*, όπως ήδη αναφέρθηκε. Οι φιάλες εμβολιάστηκαν με τα στελέχη C₁, C₂ και τον συνδυασμό τους (C₁+C₂). Παρασκευάστηκαν, επίσης, και φιάλες εις τριπλούν για κάθε θρεπτικό, οι οποίες δεν είχαν εμβολιαστεί, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες αβιοτικής αποδόμησης του μυκητοκτόνου. Όλα τα δείγματα επωάστηκαν σε πλατφόρμα ανακίνησης στους 28° C για 240 ώρες. Η αποδόμηση του *iprodione* και ο σχηματισμός ισοπροπυλαμίνης, μεταβολίτη I, μεταβολίτη II και 3,5-DCA μετρήθηκαν αμέσως μετά τον εμβολιασμό και στις 4, 8, 12, 24, 48, 168 και 240 ώρες με HPLC-PDA.

Η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε και για τους μεταβολίτες I (100 mmol L⁻¹) και II (110 mmol L⁻¹). Στόχος μας ήταν να επαληθεύσουμε εάν τα ίδια βακτηριακά στελέχη είχαν την ικανότητα να μεταβολίζουν, πλήρως ή μερικώς, και τους ενδιάμεσους μεταβολίτες του *iprodione*, αλλά επίσης να ταυτοποιήσουμε και την ίδια την διαδικασία μετασχηματισμού ως καταβολισμό ή συν-μεταβολισμό. Έτσι, μελετήθηκε γενικά η αποδόμηση του μεταβολίτη I και ο μετασχηματισμός του

σε μεταβολίτη II και 3,5- DCA (πείραμα μεταβολίτη I) και η αποδόμηση του μεταβολίτη II και η μετατροπή του σε 3,5- DCA (πείραμα μεταβολίτη II). Η αποικοδόμηση αυτή μετρήθηκε και στα δυο πειράματα στις 0, 4, 8, 12, 24, 48, 120, 192 και 288 h.

ακολουθείται για το σύνολο των δειγμάτων σε όλους τους χρόνους δειγματοληψίας που ακολουθούν (T_4 , T_8 κλπ).

3.3 Ανάλυση iprodione και μεταβολιτών σε σύστημα HPLC-PDA

Ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων του iprodione και των μεταβολικών προϊόντων που πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Shimadzu HPLC-PDA που ήταν εξοπλισμένο με μία στήλη Shimadzu, VP- ODS, αντίστροφης φάσης C18 (4.6 mm × 150 mm). Ο προσδιορισμός του isopropylamine ήταν έμμεσος και πραγματοποιήθηκε μέσω μέτρησης του N-isopropyl-(4-nitrophenyl-thiourea), το οποίο σχηματίζεται μετά από αντίδραση της isopropylamine με para-nitrophenyl-isothiocyanate. Η κινητή φάση του συστήματος αποτελείται από 70 % ACN και 30 % νερό. Μέσα από τη φάση αυτή εκλούστηκαν: *iprodione*, (παραγοντοποιημένη) isopropylamine και 3,5-DCA. Οι χρόνοι κατακράτησής τους ήταν 4.8, 2.8 και 3.8 min, αντιστοίχως. Όσον αφορά τους μεταβολίτες I και II, χρησιμοποιήθηκε μία κινητή φάση με 32 % ACN και 68% νερό, που οξινίστηκε με οξικό οξύ μέχρι το επιθυμητό pH= 2.6. Αυτό υπήρξε επιτακτικής σημασίας για να επιτύχουμε ικανοποιητικό διαχωρισμό με χρόνους κατακράτησης 11.1 και 12 min, αντίστοιχα. Καθ' όλη τη διάρκεια των αναλύσεων ο ρυθμός ροής υπήρξε σταθερός στο 1 ml min⁻¹ και η θερμοκρασία της στήλης στους 30° C. Δοκιμές ανάκτησης για όλες τις ουσίες που μελετήθηκαν έδειξαν ποσοστά που κυμαίνονταν από 98.5 % έως 102.7 %.

3.4 Επεξεργασία Δεδομένων

Για τον υπολογισμό του χρόνου ημιζωής του *iprodione* και των προϊόντων μεταβολισμού του χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO). Σε περίπτωση που το συγκεκριμένο μοντέλο δε μπορούσε να περιγράψει ικανοποιητικά την κινητική αποδόμησης, χρησιμοποιήθηκε το διφασικό μοντέλο Hockey- Stick (HS).

Η δοκιμασία χ^2 , η οπτική επιθεώρηση και η κατανομή των καταλοίπων χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήρια για την αξιολόγηση της προσαρμογής του μοντέλου κινητικής στα δεδομένα. Όλοι οι υπολογισμοί έγιναν με το στατιστικό πακέτο R 3.0.2v.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

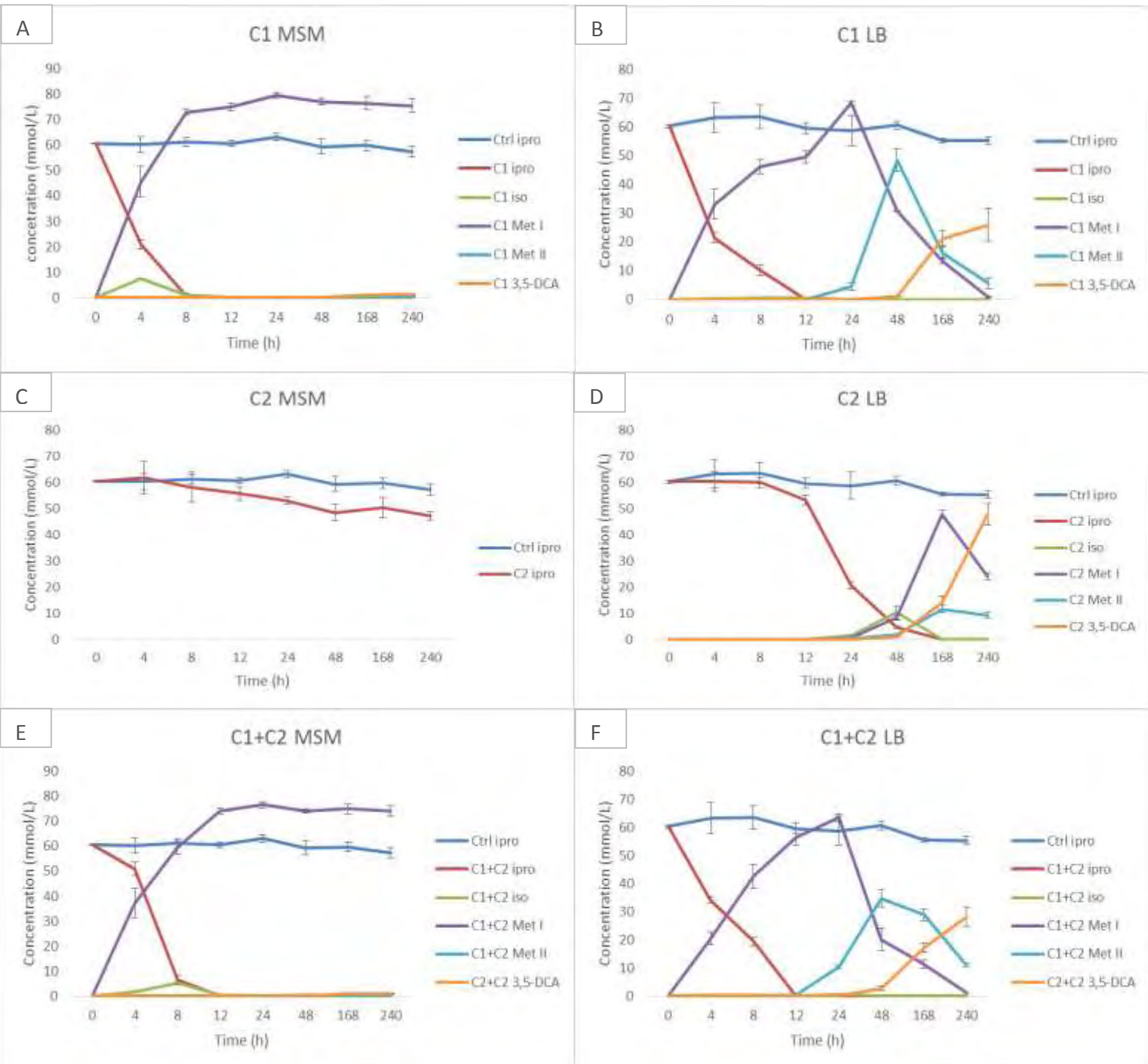
4.1 Αποδόμηση και μεταβολισμός του *iprodione*

Η αποδόμηση του μυκητοκτόνου *iprodione* τόσο σε θρεπτικό MSM όσο και σε LB, ακολούθησε κινητική πρώτης τάξης και περιγράφηκε ικανοποιητικά από SFO μοντέλο. Εξαίρεση αποτέλεσε η αποδόμηση του *iprodione* από το στέλεχος C₂ σε LB που ήταν διφασική, με αποτέλεσμα να περιγράφεται ικανοποιητικά μόνο από το μοντέλο HS.

Σε γενικές γραμμές, παρατηρήθηκαν αποκλίσεις όσον αφορά την αποδόμηση του *iprodione* από τα δύο βακτηριακά στελέχη, αλλά και στα δυο διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Πιο συγκεκριμένα, η αποδόμηση του *iprodione* από το στέλεχος C₁ ήταν εμφανώς ταχύτερη, γεγονός που υποστηρίζεται και από τις χαμηλότερες τιμές DT₅₀ (2.3h και 3.8h στα θρεπτικά μέσα MSM και LB, αντίστοιχα). Σε καλλιέργειες που εμβολιάστηκαν με το μίγμα των δύο βακτηριακών στελεχών C₁ και C₂ παρατηρήσαμε επίσης ταχεία αποδόμηση του *iprodione* με τιμές DT₅₀= 4.1 h (και στα δύο θρεπτικά), ενώ σε καλλιέργειες που έγινε εμβολιασμός μόνο με το C₂ στέλεχος, παρατηρήθηκε η χαμηλότερη αποδόμηση με την υψηλότερη τιμή DT₅₀= 19.5 h και μόνο στο LB θρεπτικό μέσο (δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση στο θρεπτικό μέσο MSM που εμβολιάστηκε με το στέλεχος C₁).

Εν συνεχεία, μελετήθηκε ο μεταβολισμός του *iprodione* στα δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Πιο αναλυτικά, όσον αφορά το MSM, παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση του C₁ στελέχους ή του συνδυασμού C₁ + C₂, το *iprodione* μεταβολίστηκε μέσω ενός παροδικού μεταβολικού ενδιάμεσου, isopropylamine, πριν τον σχηματισμό του μεταβολίτη I, ο οποίος δε διασπάστηκε περαιτέρω και συσσωρεύτηκε (Διαγράμματα 1A και 1E). Από την άλλη πλευρά, σε LB θρεπτικό μέσο το στέλεχος C₁ μόνο του, αλλά και ο συνδυασμός C₁ + C₂ οδηγεί σε υδρόλυση του μυκητοκτόνου προς το μεταβολίτη I χωρίς ενδιάμεσο σχηματισμό isopropylamine. Σε αντίθεση όμως, με το MSM ο μεταβολίτης I μετασχηματίστηκε περαιτέρω σε μεταβολίτη II και τελικά σε 3,5-DCA (Διαγράμματα 1B και 1F). Αντιθέτως, το βακτηριακό στέλεχος C₂ ήταν σε θέση να μεταβολίζει το *iprodione* μόνο σε LB (Διάγραμμα 1D), αλλά όχι σε MSM (Διάγραμμα 1C). Το *iprodione* σε αυτή την περίπτωση μετασχηματίζεται αρχικά σε μεταβολίτη I και μεταβολίτη II, πριν μετατραπεί τελικά σε 3,5-DCA (Διάγραμμα 1D).

Διάγραμμα 1 : Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του *iprodiolone* σε θρεπτικά μέσα MSM και LB, που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη C₁ (A, B), C₂ (C, D) στελέχη και τον συνδυασμό τους C₁+C₂ (E, F).

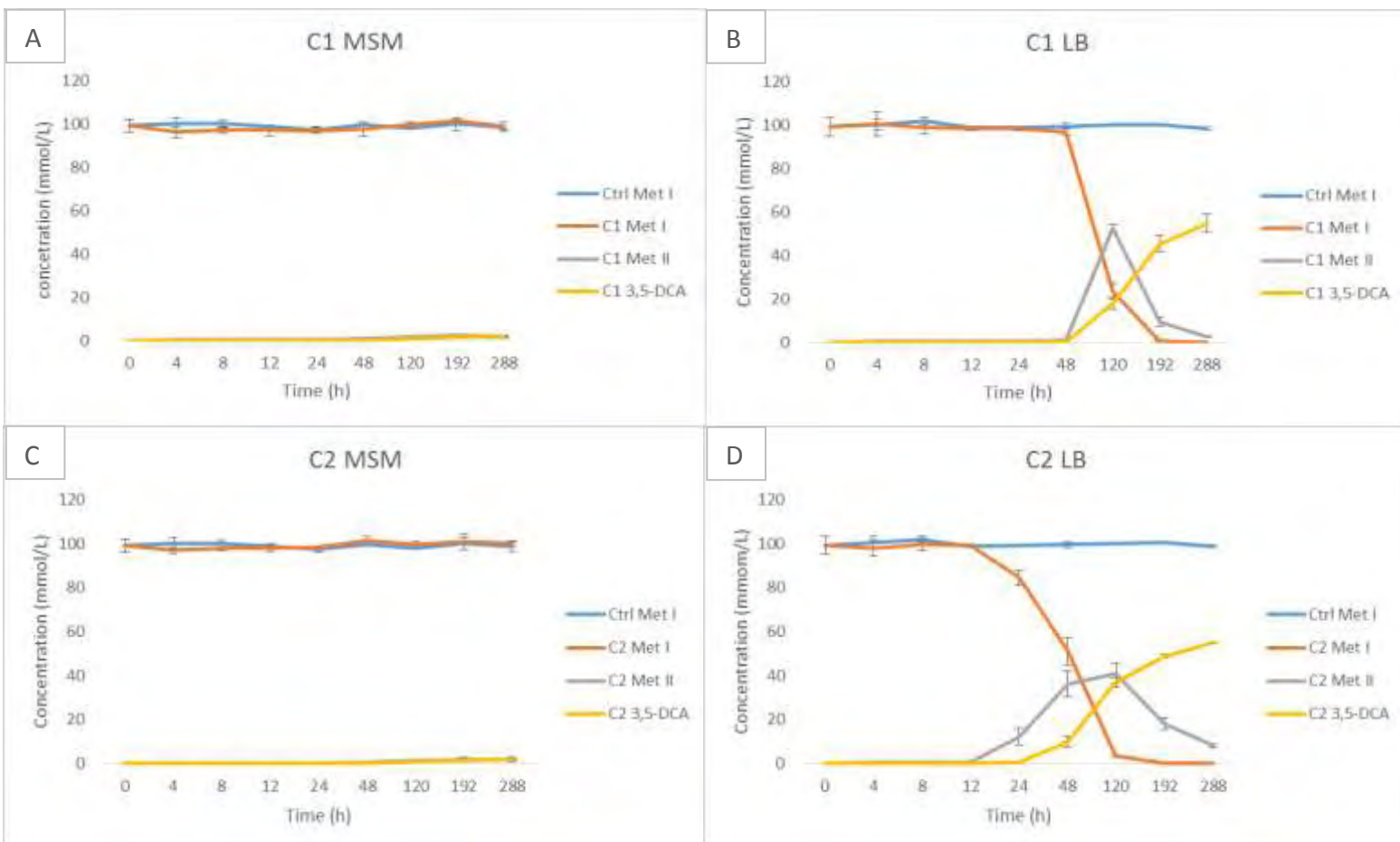


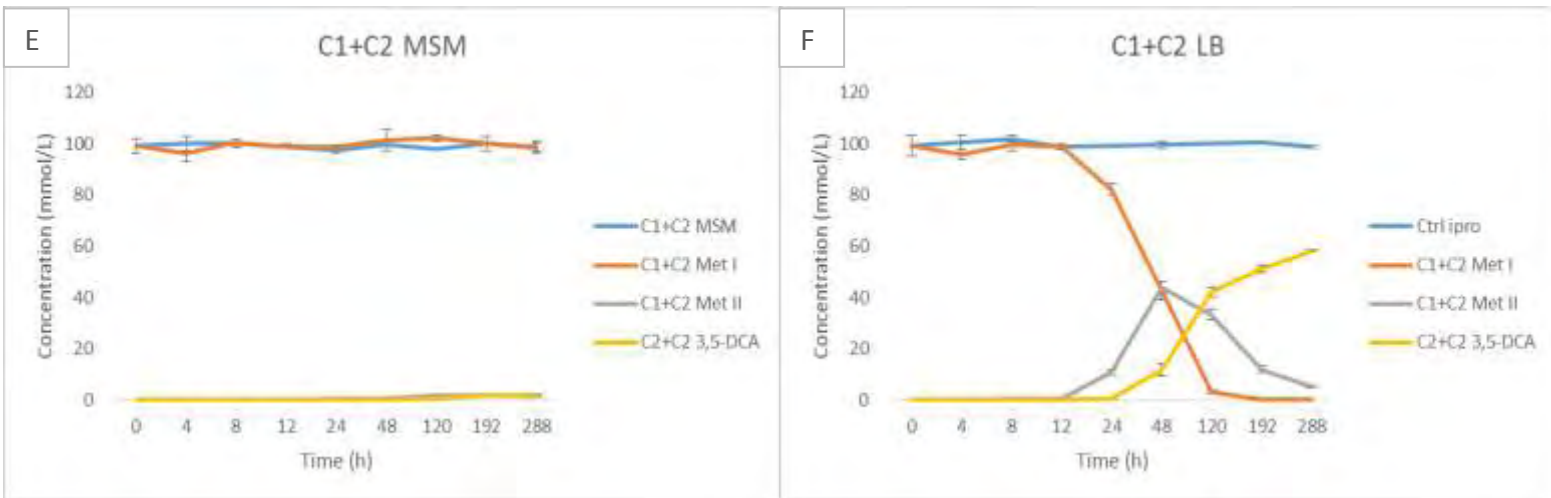
4.2 Αποδόμηση και μεταβολισμός του μεταβολίτη I (met I)

Σε αυτό το μέρος του πειράματος μελετήθηκε η αποικοδόμηση του μεταβολίτη I από τα στελέχη C_1 και C_2 και το συνδυασμό τους, τόσο σε MSM όσο και σε LB θρεπτικό μέσο. Σε θρεπτικό μέσο MSM, παρατηρήσαμε πως και τα δύο βακτηριακά στελέχη δεν ήταν σε θέση να αποδομήσουν το μεταβολίτη I (Διαγράμματα 2A, 2C, 2E). Αντιθέτως, σε θρεπτικό LB παρατηρήθηκε αποδόμηση και από τα δυο βακτηριακά στελέχη που περιγράφηκε ικανοποιητικά από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Διαγράμματα 2B, 2D, 2F). Το C_2 στέλεχος, όπως και συνδυαστικά τα δύο στελέχη, παρουσίασαν ταχύτερη αποικοδόμηση με $DT_{50(C_2)} = 39.7$ h και $DT_{50(C_1+C_2)} = 43.1$ h. Από την άλλη μεριά το στέλεχος C_1 αποδόμησε το μεταβολίτη I με βραδύτερο ρυθμό ($DT_{50} = 71$ h). Δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη αποδόμηση του μεταβολίτη I παρατηρήθηκε στα δείγματα μάρτυρες και των δύο μέσων.

Σε κάθε περίπτωση που μελετήθηκε, ο μεταβολίτης I μετασχηματίστηκε σε μεταβολίτη II, ο οποίος στη συνέχεια υδρολύθηκε περαιτέρω προς 3,5- DCA, που συσσωρεύτηκε στο θρεπτικό μέσο, όπως φαίνεται και στο Διαγράμματα 2B, 2D, 2F.

Διάγραμμα 2: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του μεταβολίτη I σε θρεπτικά μέσα MSM και LB, που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη C_1 (A, B), C_2 (C, D) στελέχη και τον συνδυασμό τους $C_1 + C_2$ (E, F).



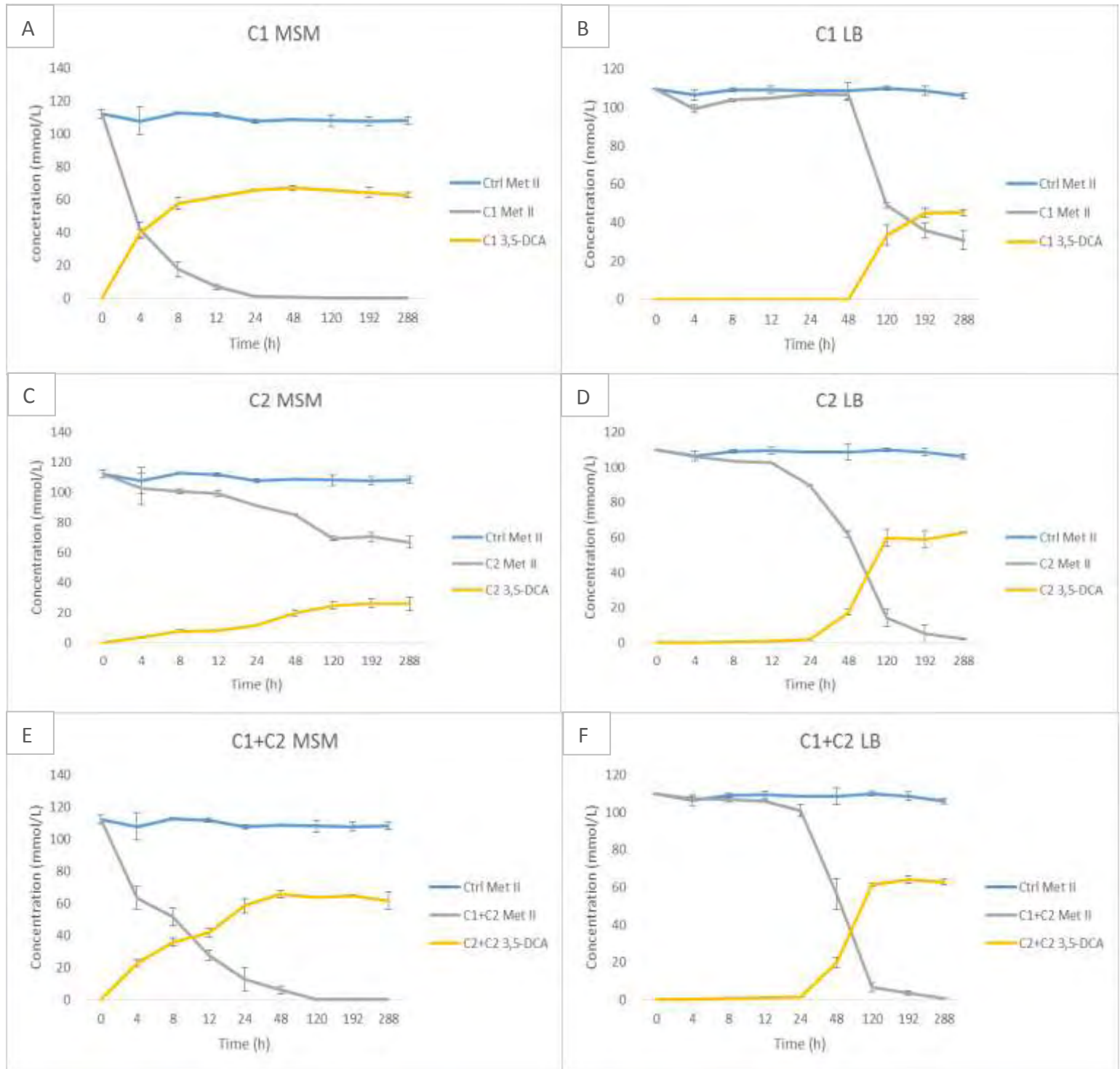


4.3 Αποδόμηση και μεταβολισμός μεταβολίτη II (met II)

Τέλος, μελετήθηκε και η αποδόμηση του μεταβολίτη II από τα βακτηριακά στελέχη C_1 και C_2 , τόσο σε MSM όσο και σε LB θρεπτικό μέσο. Και στα δύο μέσα, η αποδόμηση του μεταβολίτη II περιγράφηκε ικανοποιητικά από το μοντέλο κινητικής πρώτης φάσης.

Σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε πως ο μεταβολίτης II υδρολύθηκε προς 3,5-DCA, ανεξάρτητα από το ποιο βακτηριακό στέλεχος εξετάζαμε είτε μεμονωμένα είτε συνδυαστικά. Αυτό που διέφερε σε κάθε περίπτωση ήταν οι ρυθμοί της αποδόμησης. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος C_1 , αλλά και συνδυαστικά τα $C_1 + C_2$, παρουσίαζαν πολλοί πιο αυξημένους ρυθμούς αποικοδόμησης στο MSM με $DT_{50(C_1)} = 2.9$ h και $DT_{50(C_1+C_2)} = 6.5$ h, συγκριτικά με το LB θρεπτικό μέσο, όπου είχαν $DT_{50(C_1)} = 135.6$ h και $DT_{50(C_1+C_2)} = 46.24$ h. Από την άλλη μεριά, το στέλεχος C_2 ήταν σε θέση να αποικοδομεί μόνο μερικώς τον μεταβολίτη II σε MSM ($DT_{50} = 363.9$ h), αλλά πλήρως στο LB ($DT_{50} = 50.3$ h). Γενικότερα, δεν παρατηρήθηκε αβιοτική αποδόμηση του μεταβολίτη II στους μη εμβολιασμένους μάρτυρες και στα δύο θρεπτικά μέσα.

Διάγραμμα 3: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του μεταβολίτη II σε θρεπτικά μέσα MSM και LB, που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη C_1 (A, B), C_2 (C, D) στελέχη και τον συνδυασμό τους $C_1 + C_2$ (E, F).



5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

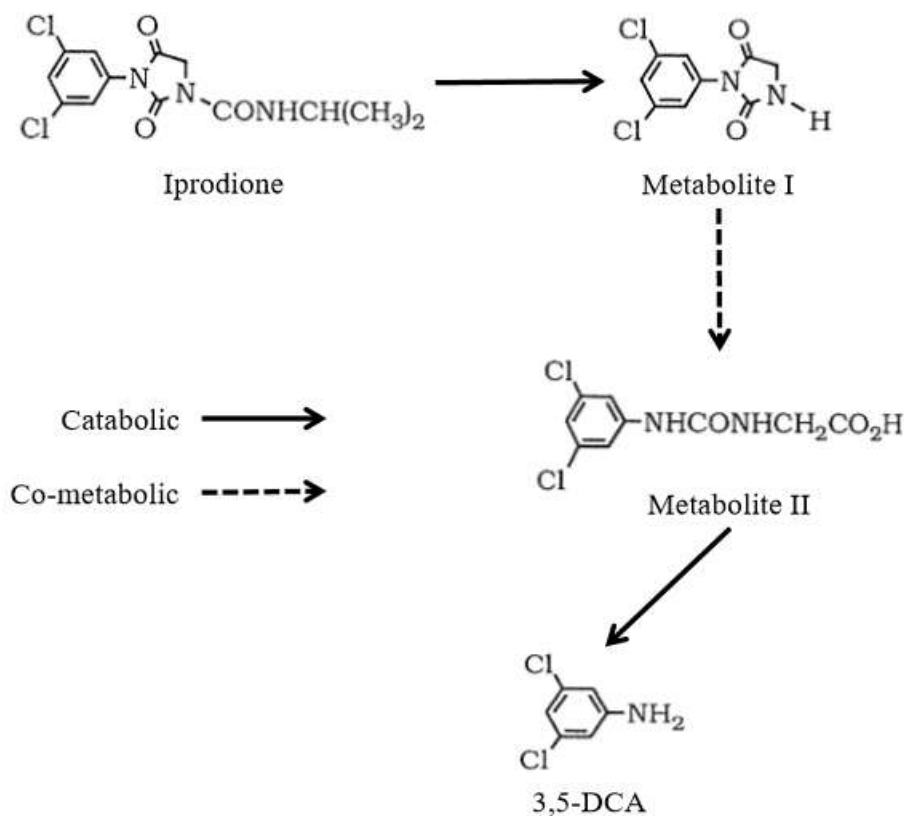
Στην συγκεκριμένη εργασία ασχοληθήκαμε με ένα πείραμα αποτελούμενο από τρία διαφορετικά μέρη, που συνάδουν, όμως, μεταξύ τους απαρτίζοντας επιμέρους τμήματα μιας πληρέστερης και συνεκτικής μελέτης. Αναλυτικότερα, ασχοληθήκαμε με την αποδόμηση ενός μυκητοκτόνου, που καλείται *iprodione*, αλλά και δύο ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων του, μεταβολίτες I και II. Στόχος μας ήταν η διερεύνηση του μεταβολικού μονοπατιού του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου από δύο βακτηριακά στελέχη, τα *Arthrobacter C₁* και *Achromobacter C₂*, τα οποία συμμετείχαν σε ένα βακτηριακό consortium που είχε την ικανότητα να αποδομεί το *iprodione* (Campos et al., 2015).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητά τους να αποδομούν το *iprodione* μέσω υδρόλυσής του, αρχικά, σε ισοπροπυλαμίνη και εν συνεχεία, σε 3,5-dichlorophenylcarboxamide (met I), που με τη σειρά του μετασχηματίζεται σε 3,5-dichlorophenylurea acetate (met II) και καταλήγει τελικά σε 3,5-DCA (Εικόνα 3). Στην προσπάθειά μας να κατανοήσουμε πλήρως το μεταβολικό αυτό μονοπάτι αλλά και το ρόλο του εκάστοτε βακτηριακού στελέχους στα διάδοχα βήματα της διαδικασίας, σημαντικές πληροφορίες παρείχαν προγενέστερα πειράματα, όπως περιγράφονταν από τους Athiel et al. (1995) και Mercadier et al. (1997).

Η μεταβολική ικανότητα των δύο αυτών στελεχών μελετήθηκε κάτω από διαφορετικές θρεπτικές συνθήκες μέσω της χρήσης δύο ανεξάρτητων θρεπτικών υποστρωμάτων. Το πρώτο αποτελεί ένα «φτωχό» εκλεκτικό θρεπτικό μέσο (MSM), όπου το *iprodione* και οι άλλες ουσίες αποτελούσαν την μοναδική πηγή C και N για τα βακτήρια. Αντίθετα, το δεύτερο (LB) αποτελεί ένα πλούσιο θρεπτικό μέσο, όπου το *iprodione* και τα προϊόντα μεταβολισμού προσφέρονται στα βακτήρια ως επιπρόσθετες πηγές άνθρακα (C) και αζώτου (N), πέραν των ήδη υπάρχοντων στο θρεπτικό μέσο. Παράλληλα, το pH στα μέσα ρυθμίστηκε στο 5.0 με στόχο να ελαχιστοποιηθεί η αβιοτική αποδόμηση του *iprodione*, προς όφελος του μικροβιακού μεταβολισμού.

Τα δύο βακτηριακά στελέχη παρουσιάζουν διαφορές ως προς τη μεταβολική τους ικανότητα, γεγονός που συνδέεται άρρηκτα με το θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύσσονται. Έτσι, το *C₁* στέλεχος υπήρξε το μοναδικό από τα δύο βακτήρια, που μπορούσε να διασπάσει ταχύτατα τόσο το *iprodione* όσο και το μεταβολίτη II, όταν αυτό προσφερόταν ως μοναδική πηγή C και N στο θρεπτικό μέσο MSM. Ωστόσο, δε φάνηκε να είναι σε θέση να κάνει αποτελεσματική χρήση του μεταβολίτη I (συμμεταβολισμός met I), τον οποίο μπόρεσε να αποδομήσει περαιτέρω μόνο υπό την παρουσία επιπρόσθετων θρεπτικών στο μέσο (LB). Όσον αφορά στο στέλεχος *C₂*, η παρουσία επιπρόσθετων πηγών C και N (LB μέσο) ήταν απαραίτητη για την αποδόμηση τόσο του *iprodione* όσο και των μεταβολιτών του. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το βακτηριακό στέλεχος *C₁* πραγματοποιεί τα δύο από τα τρία βήματα του μεταβολικού μονοπατιού του *iprodione* αποκομίζοντας ενεργειακό όφελος, σε αντίθεση με τη μετατροπή του μεταβολίτη I προς II, που είναι καθαρά συμμεταβολική διεργασία. Αντίθετα, το βακτηριακό στέλεχος *C₂* έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί όλα τα βήματα του μεταβολικού μονοπατιού μόνο συμμεταβολικά.

Θα πρέπει να τονιστεί, σύμφωνα με όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, πως η βακτηριακή αποικοδόμηση του μεταβολίτη I αποτελεί το ρυθμο-καθοριστικό βήμα στο μεταβολικό μονοπάτι του *iprodione*. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι είναι το μοναδικό βήμα στο μεταβολικό μονοπάτι του *iprodione* από το οποίο δεν προκύπτει κάποιο προϊόν που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή C και N. Αντίθετα, η υδρόλυση των *iprodione* και μεταβολίτη II συνοδεύεται από την παραγωγή isopropylamine και glycine που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα βακτήρια ως πηγές C και N. Η isopropylamine αποτελεί κοινό προϊόν μεταβολισμού και άλλων γεωργικών φαρμάκων, όπως οι τριαζίνες, και χρησιμοποιείται από τα βακτήρια ως κύρια πηγή C και N. (Topp et al., 2000). Αντίστοιχες μελέτες έχουν δείξει ότι η glycine αποτελεί επιθυμητή πηγή C και N για τα βακτήρια του εδάφους (Rinnan and Baath, 2009).



Εικόνα 5:

Το μονοπάτι αποδόμησης του *iprodione* από το στέλεχος C1.

Συνολικά τα αποτελέσματά μας, καταδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο του στελέχους *Arthrobacter* C₁ στην αποδόμηση του *iprodione* σε αντίθεση με το έτερο βακτηριακό στέλεχος *Achromobacter* C₂ που έχει συμπληρωματικό ρόλο στην αποδόμηση του *iprodione* και μόνο υπό συνθήκες παροχής επιπλέον πηγών C και N.

Ως συνέχεια της παρούσας μελέτης θα μπορούσε να αναλυθεί περαιτέρω σε επίπεδο γονιδιώματος ή/ και τρανσκριπτόματος το βακτηριακό στέλεχος C₁, έτσι ώστε να διαλευκανθούν οι γενετικοί και οι ενζυμικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στα διάφορα στάδια του μεταβολικού μονοπατιού του μυκητοκτόνου *iprodione* από το στέλεχος αυτό.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Amoureux, L., Bador, J., Bounoua, Zouak, F., Chapuis, A., de Curraize C., Neuwirth, C., 2016. Distribution of the species of *Achromobacter* in a French Cystic Fibrosis Center and multilocus sequence typing analysis reveal the predominance of *A. xylooxidans* and clonal relationships between some clinical and environmental isolates. *J Cyst Fibros.*, Jul;15(4):486-94.

Athiel, C., Mercandier, D., Vega, J., Bastide, P., Davet, B., Brunel and Cleyet-Marel, 1995. Degradation of iprodione by a soil *Arthrobacter*-like strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 61,3216-3220.

Bollag, J.M., Liu, S.-Y., 1990. Biological transformation processes of pesticides. In: Cheng, H.H. (Ed.), *Pesticides in the soil environment: Processes, Impacts and Modeling*, SSSA Book Series 2.

Budavari, S., 1996. *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., p. 871.

Busse, H.-J., 2016. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter gen. nov.*, *Paeniglutamicibacter gen. nov.*, *Pseudoglutamicibacter gen. nov.*, *Paenarthrobacter gen. nov.* and *Pseudarthrobacter gen. nov.*, and emended description of *Arthrobacter roseus*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 9–37

Cabral, S. M. J. C. S. and Cabral, J. P. S., 1997. Morphological and chemical alterations in *Botrytis cinerea* exposed to the dicarboximide fungicide vinclozolin. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 43, no. 6, pp. 552–560.

Campos, M., Perruchon, C., Vasilieiadis S., Menkissoglu-Spiroudi U., Karpouzas, D., Diez, M.C., 2015. Isolation and characterization of bacteria from acidic pristine soil environment able to transform iprodione and 3,5-dichloroaniline. *International Biodeterioration & Biodegradation* 104, 201-211.

Farm Chemicals Handbook, 2001. Willoughby, Ohio: Meister, p. C 228.

Gosselin, R.E., Smith, R.P., Hodge, H.C., 1984. *Clinical Toxicology of Commercial Products*. 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, p. II-320

Hartley, D. and Kidd, H., 1987. *The Agrochemicals Handbook*. 2nd ed. Lechworth, Herts, England: The Royal Society of Chemistry, p. A234/AUG 87.

Igra-Siegman, Y., Chmel, H. and Cobbs, C., 1980. Clinical and Laboratory Characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 141-145, vol.11, no. 2.

Kidd, H. and James, D. R., 1991. *The Agrochemicals Handbook*, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 10-2.

Martin, C., Davet, P., Vega, D. and Cosste, C., 1991. Field effectiveness and biodegradation of cyclic imides in lettuce field soils. *Pestic. Sci.* 32(4): 427-45.

Mages, I.S., Frod, R., Bernard K.A. and Funke, G, 2008. Identities of *Arthrobacter* spp. and *Arthrobacter* – Like Bacteria Encountered in Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.46 no.9

Mercadier, C., Vega, D., Bastide, J., 1997. Iprodione degradation by isolated soil microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 207-215.

Miñambres, G. G., Conles, M. Y., Lucini, E. I., Verdenelli, R. A., Meriles, J. M. and Zygadlo, J. A., 2010. Application of thymol and iprodione to control garlic white rot (*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial communities, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, no. 1, pp. 161–170.

Ochiai, N., Fujimura, M., Oshima, M., 2002. Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 66, no. 10, pp. 2209–2215.

Parmeggiani, L., 1983. *Encycl. Occup. Health Safety* 3rd ed. Geneva, Switzerland: Inter Labour Office pp. 1616-46.

Radice, S., Ferraris, M., Marabini, L., Grande, S., Chiesara, E., 2001. Effect of iprodione, a dicarboximide fungicide, on primary cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol.*, 54(1-2):51-8.

Rinnan, R., Baath, E., 2009. Differential utilization of carbon substrates by bacteria and fungi in tundra soil. *Appl Environ Microbiol.*, 75: 3611- 20.

Slade, E., Fullerton, R., Stewart, A., Young, H., 1992. Degradation of the dicarboximide fungicides iprodione, vinclozolin and procymidone in Patumahoe clay loam soil. *New Zealand. Pesticide sci.* 35, 95-100.

Suta, V., Trandafirescu, M., Popescu, V., Voica, E. and Fugel, S., 1979. Proceedings of the British Crop Protection Conference Pests and Diseases. British Crop Protection Council, Croydon, England.10-46

Tomlin, C.D.S., 1997. *The Pesticide Manual - World Compendium*, 11 th ed. British Crop Protection Council, Surrey, England, p. 724.

Topp, E., Zhu, H., Nour, SM., Houot, S., Lewis, M., Cuppels, D., 2000. Characterization of an atrazine- degrading Pseudaminobacter sp. Isolated from Canadian and French agricultural soils. *Appl Environ Microbiol* 66: 2773-82.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 1990. Final Rule: Pesticide Tolerance for Iprodione. *Fed. Regist.* 55: 2834-5,10-44

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) /Office of Prevention, 1999. Pesticides, and Toxic Substances. Reigart, J.R., Roberts, J.R. Recognition and Management of Pesticide Poisonings. 5th ed. EPA Document No. EPA 735-R-98-003, and available in electronic format at: <http://www.epa.gov/pesticides/safety/healthcare> p. 153

USEPA, 2001. Reregistration Eligibility Decisions (REDs) Database on iprodione (36734-19-7). USEPA738-R-98-019. Available from the Database Query page at <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/2335.pdf>

USEPA, 2006. Office of Pesticide Programs, Health Effects Division, Science Information Management Branch: Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential.

U.S. National Library of Medicine. Hazardous Substances Databank. Bethesda, MD, 1995.10-9

Villedieu, J.C., Calmon, M., Calmon, J.P., 1994. Mechanisms of dicarboximide ring opening in aqueous media: Procymidone, vinclozolin and chlozolate. *Pesticide Science* 41, 105–15.

Wauchope, R. D., Buttler, T. M., Hornsby A. G., Augustijn Beckers, P. W. M. and Burt, J. P., 1992. SCS/ARS/CES Pesticide properties database for environmental decisionmaking. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 123: 1-157, 10-12.