



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΥΛΩΝΑ ΕΙΡΗΝΗ

Διπλωματική Εργασία

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΧΑΛΚΟΥ
ΣΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΦΥΛΛΟΣΦΑΙΡΑΣ
STUDY OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COPPER
NANOPARTICLES**

ΛΑΡΙΣΑ 2018

Η εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Γεωπονίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής είναι:

Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Καραμανώλη Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονίας, ΑΠΘ

Συνεπιβλέπων καθηγητής

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τρίτο μέλος

Μενκίσογλου – Σπυρούδη Ουρανία, Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονίας, ΑΠΘ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γεωργικής Χημείας, του τμήματος Γεωπονίας, ΑΠΘ, τα οποία με βοήθησαν στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Αικατερίνη Καραμανώλη καθώς και τον συνεπιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Καρπούζα, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμβολή, την καθοδήγηση και το χρόνο που αφιέρωσαν τόσο στη διεξαγωγή του πειράματος όσο και στη συγγραφή της εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Χριστίνα Γκανάτσιου από το εργαστήριο Ανόργανων Νανοϋλικών του τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ., η οποία παρασκεύασε τα νανοσωματίδια χαλκού.

Περιεχόμενα

1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1 ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	1
1.1.1 ΓΕΝΙΚΑ	1
1.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ.....	1
1.1.3 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΩΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ	2
1.1.4 PSEUDOMONAS SYRINGAE.....	3
1.1.5 ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ-ΤΡΟΠΟΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ	4
1.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	4
1.3 ΜΕΤΡΑ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗΣ Ή ΜΕΙΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ	5
1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ	8
1.4.1 Ορισμός-Γενικά.....	8
1.4.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ	9
1.5 ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ	10
1.5.1 ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ.....	10
1.5.2 ΝΑΝΟ-ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΟΥ ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΓΟΡΑ ΣΗΜΕΡΑ.....	11
1.5.3 Η ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ - ΘΡΕΨΗ - ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ.....	12
1.5.4 Το μέλλον της νανοτεχνολογίας	14
1.6 Ο ΧΑΛΚΟΣ: ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	14
1.6.1 ΧΑΛΚΟΣ.....	14
1.6.2 Χαλκός και φυτά	15
1.6.3 Χαλκός και έδαφος	16
1.6.4 Χαλκούχες ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην φυτοπροστασία	16
1.6.5 Επιπτώσεις του χαλκού σε είδη μη στόχους.....	18
1.7 Σκοπός της εργασίας.....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.1 Φυτικό υλικό	21
2.2 Θρεπτικά υποστρώματα	21
3. Εφαρμογή νανοσωματιδίων χαλκού	23
3.1 Μετρήσεις	24

3.1.1 Μέτρηση της ζώνης αναστολής των νανοσωματιδίων χαλκού στο <i>P. Syringae</i> (ποιοτική μέτρηση)	24
3.2 Μετρήσεις φυσιολογικών παραμέτρων.....	25
3.2.1 Δείκτης περιεχομένου χλωροφύλλης (CCI).....	25
3.2.2 Φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα.....	26
3.2.3 Καθαρή φωτοσύνθεση – Ενσωμάτωση άνθρακα σε οργανική ουσία.....	26
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
3.3.1 Αντιβακτηριακή δράση των νανοσωματιδίων χαλκού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις	27
3.3.2 Μετρήσεις στα φύλλα των φυτών.....	28
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΜΑΤΑ	29
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	30

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η προστατευτική δράση των νανοσωματιδίων χαλκού. Για να εξεταστεί η ιδιότητα αυτή, χρησιμοποιήθηκαν φυτοδοχεία με φυτά φασολιού τα οποία αρχικά ψεκάστηκαν με νανοσωματίδια χαλκού. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas Syringae*. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες φύλλων τα οποία μεταφέρθηκαν σε buffer. Ακολούθησαν αραιώσεις και επίστρωση του δείγματος σε άγαρ. Με τον τρόπο αυτό ελέγχθηκε η ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα νανοσωματίδια χαλκού είχαν την αναμενόμενη προστατευτική επίδραση. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν και μετρήσεις φυσιολογικών παραμέτρων προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα νανοσωματίδια χαλκού είναι επιβλαβή για τα φυτά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, με μία μικρή ποσότητα νανοσωματιδίων χαλκού επιτεύχθηκε μείωση του βακτηριακού πληθυσμού ενώ παράλληλα δεν διαπιστώθηκε καμία αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού.

ABSTRACT

In the current study the protective effect of copper nanoparticles was studied. To test this property, pots were planted with bean plants that were first sprayed with copper nanoparticles. Then, bacterial contamination was performed with the bacterium *Pseudomonas Syringae*. Sheets of leaves were then transferred to buffer. Dilutions and coating of the sample on agar followed. In this way the growth of the bacterial population was checked to see if the copper nanoparticles had the expected protective effect. Finally, physiological parameters were measured to determine whether copper nanoparticles are harmful to plants. According to the results with a small amount of copper nanoparticles a decrease in the bacterial population was achieved while no negative effect on the growth of the plant was observed.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια η νανοτεχνολογία χρησιμοποιείται σε πολλούς κλάδους μεταξύ των οποίων είναι και η γεωργία. Το υψηλό κόστος, ο μεγάλος χρόνος αλλά και οι επιπτώσεις των συμβατικών τεχνικών αντιμετώπισης ασθενειών στα φυτά έκανε επιτακτική την ανάγκη για ανακάλυψη νέων πιο αποτελεσματικών μεθόδων. Ένα σημαντικό εργαλείο είναι τα νανοσωματίδια χαλκού, τα οποία εμφανίζουν προστατευτική δράση χρησιμοποιώντας πολύ μικρές ποσότητες. Ωστόσο, οι τεχνικές που βασίζονται στη νανοτεχνολογία δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς. Έτσι, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν μελέτες προκειμένου να αποδειχτούν τα οφέλη των νέων αυτών μεθόδων έναντι των συμβατικών τεχνικών.

Το πείραμα που ακολουθεί πραγματοποιήθηκε ώστε να φανεί η αποτελεσματικότητα των νανοσωματιδίων χαλκού ως φυτοπροστατευτικό μέσο στην αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από βακτήρια. Επιπλέον, μελετήθηκαν και οι επιπτώσεις που ενδέχεται να εμφανίζουν τα νανοσωματίδια στην ανάπτυξη του φυτού προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να αντικαταστήσουν τις συμβατικές τεχνικές χωρίς να προκαλούν προβλήματα.

1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

1.1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Τα βακτήρια είναι ένα μεγάλο άθροισμα μικροοργανισμών. Είναι γνωστά από το 1882, και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην οικονομία της φύσης. Μερικά είναι σημαντικοί παράγοντες στον κύκλο του άνθρακα, δεδομένου ότι λαμβάνουν μέρος στην αποσύνθεση των οργανικών ουσιών και στη ζύμωση διαφόρων προϊόντων, στον κύκλο του αζώτου, με τη δυνατότητά τους να δεσμεύουν το άζωτο και να μετατρέπουν την αμμωνία σε νιτρικό άζωτο, στον κύκλο του θείου, στη δέσμευση της φωτεινής ενέργειας κ.α.. Πολλά βακτήρια χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, όπως στη παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, ξυδιού κ.α., στη βιομηχανία φαρμάκων, όπως στη παραγωγή αντιβιοτικών, στην επεξεργασία λυμάτων κ.α.. Παράλληλα πολλά βακτήρια είναι παθογόνα φυτικών και ζωικών οργανισμών.

Τα βακτήρια, που προκαλούν ασθένειες στα φυτά, είναι πολύ λιγότερα από τους μύκητες. Το αντίθετο συμβαίνει στα ζώα και στον άνθρωπο. Παρόλα αυτά, ορισμένα είδη, όπως το *Erwinia amylovora*, που είναι το παθογόνο αίτιο του βακτηριακού καψίματος των μηλοειδών, προκαλούν πολύ καταστρεπτικές ασθένειες στα φυτά. Άλλα είδη βακτηρίων προκαλούν μεγάλες ζημιές στα προϊόντα κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση.

1.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι, μικροσκοπικοί και κατά το πλείστον ετερότροφοι οργανισμοί. Κατ' εξαίρεση ορισμένα βακτήρια συνενώνονται σε ομάδες ή σε αλυσίδες. Τα μεμονωμένα βακτηριακά κύτταρα είναι αόρατα με το γυμνό μάτι και φαίνονται μόνο με μεγάλη μεγέθυνση στο μικροσκόπιο. Συνήθως, πάνω στα θρεπτικά υποστρώματα, τα βακτήρια είναι πολλά μαζί σε αποικίες, οι οποίες φαίνονται με γυμνό μάτι. Το σχήμα των βακτηριακών κυττάρων ποικίλλει, αλλά συνήθως είναι σφαιρικό (κόκκοι), ραβδοειδές (βάκιλοι), σπειροειδές (σπειρίλια). Οι διαστάσεις τους, ανάλογα με το σχήμα, κυμαίνονται από 1-10 μ. Όλα τα φυτοπαθογόνα βακτήρια είναι ραβδοειδή (κυλινδρικά) με μήκος 0,5 έως 3,5 μ και διάμετρο 0,3 έως 1μ. Μορφολογικά, τα βακτήρια, αποτελούνται από το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο είναι σταθερό και προσδίδει το σχήμα στο κύτταρο. Το κυτταρικό τοίχωμα περιβάλλεται από γλοιώδη ουσία, που η σύστασή της είναι διαφορετική για κάθε είδος. Όταν το γλοιώδες περίβλημα είναι παχύ, καλά αναπτυγμένο και έχει ζελατινώδη μορφή ονομάζεται έλυτρο (capsule). Τα περισσότερα γένη των φυτοπαθογόνων βακτηρίων φέρουν ένα ή περισσότερα μαστίγια. Αν τα μαστίγια βρίσκονται από ένα στους δύο πόλους ονομάζονται μονότριχα. Αν βρίσκονται πολλά μαζί στους πόλους ονομάζονται λοφιότριχα και αν είναι διάσπαρτα σε όλη την επιφάνεια περίτριχα. Τα

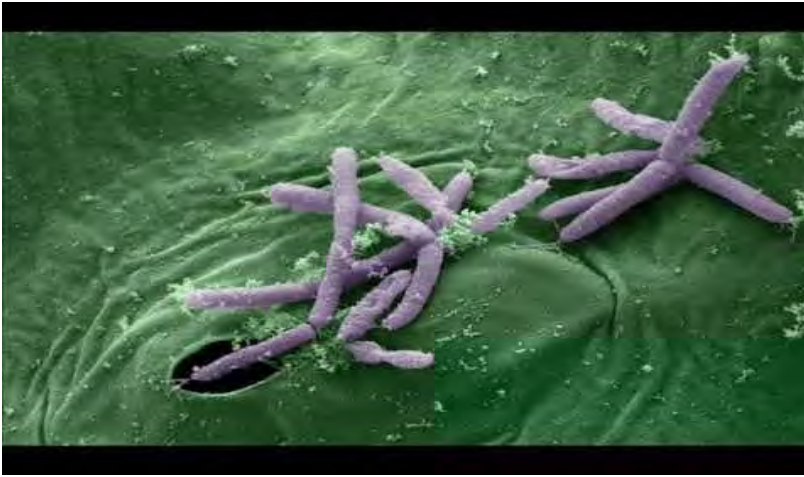
βακτήρια, που έχουν μαστίγια, έχουν αυτόνομη κίνηση σε υγρά υποστρώματα. Ο αριθμός και η θέση των μαστιγίων λαμβάνονται υπόψη στη συστηματική τους κατάταξη. Στο εσωτερικό του κυτταρικού τοιχώματος υπάρχει η κυττοπλασματική μεμβράνη, που περιβάλλει το κυττόπλασμα. Στο κυττόπλασμα διακρίνεται η περιοχή που είναι η χρωματίνη, τα χυμοτόπια, τα σταγονίδια θρεπτικών συστατικών κ.α.. Η χρωματίνη σχηματίζει ένα μεγάλο κυκλικό χρωμόσωμα από DNA στο οποίο συγκεντρώνεται το μεγαλύτερο μέρος του γενετικού κώδικα. Τα περισσότερα βακτήρια έχουν ένα ή περισσότερα στοιχεία με κυκλικό DNA διπλής αλυσίδας, τα πλασμίδια. Το DNA των πλασμιδίων, συνήθως αποτελεί το 2% του γονιδιώματος των βακτηριακών ξενιστών. Στις υποδιαιρέσεις αυτές κατατάσσονται είδη που έχουν μεν διαφορετικούς μηχανισμούς παθογένεσης, αλλά οι λοιπές τους διαφορές δεν είναι επαρκείς για να καταταγούν σε χωριστά είδη.

1.1.3 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΩΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ

Πίνακας 1. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των γενών των φυτοπαθογόνων βακτηρίων και τυπικά συμπτώματα που προκαλούν		
<u>Γένος</u>	<u>Μορφολογικά χαρακτηριστικά</u>	<u>Συμπτώματα</u>
<i>Agrobacterium</i>	Βάκιλος αρνητικός κατά Gram με 1-4 περίτριχα μαστίγια.	Προκαλεί καρκίνους μεγάλο αριθμό καλλιεργούμενων φυτών.
<i>Clavibacter</i>	Βάκιλος θετικός κατά Gram. Συνήθως στερούνται μαστιγίων.	Προκαλούν έλκη στο στέλεχος (τομάτα), δακτυλιωτή σήψη (πατάτα) και δεσμίωση σε πολλά φυτά.
<i>Erwinia</i>	Βάκιλοι αρνητικοί κατά Gram με πολλά περίτριχα μαστίγια. Είναι προαιρετικά αναερόβια.	Προκαλούν μαλακή σήψη και μαύρο λαϊμό (πατάτα) και μαλακή σήψη με μάρανση σε πολλά φυτά.
<i>Pseudomonas</i>	Βάκιλοι αρνητικοί κατά Gram με ένα ή περισσότερα μαστίγια στα άκρα. Ορισμένα είδη παράγουν φθορίζουσα χρωστική.	Μάρανση, φυμάτια και κηλιδώσεις σε πολλά φυτά.
<i>Xanthomonas</i>	Βάκιλοι αρνητικοί κατά Gram με ένα μαστίγιο στον ένα πόλο. Παράγουν κίτρινη χρωστική.	Κηλιδώσεις, έλκη και σήψεις σε διάφορα φυτά.
<i>Streptomyces</i>	Αναπτύσσουν λεπτές διακλαδισμένες υφές. Είναι θετικά κατά Gram.	Προκαλεί την ακτινομύκωση της πατάτας και άλλων φυτών.
<i>Xylella</i>	Αρνητικοί κατά Gram βάκιλοι χωρίς μαστίγια. Ζουν στους ξυλώδεις ιστούς.	Είναι το παθογόνο αίτιο ορισμένων ασθενειών αγνώστου, μέχρι πρότινος αιτιολογίας, όπως η ασθένεια Pierce του αμπελιού.

1.1.4 PSEUDOMONAS SYRINGAE

Το *Pseudomonas syringae* είναι ένα ραβδωτό, Gram-αρνητικό βακτήριο. Αποτελεί μέλος του γένους *Pseudomonas* και βασίζεται στην ανάλυση 16S rRNA. Το *P. Syringae* εξετάζει αρνητικά τη δραστηριότητα της διυδρολάσης και της οξειδάσης της αργινίνης και σχηματίζει το πολυμερές σύμπλοκο φρουκτανών σε θρεπτικό άγαρ σακχαρόζης. Πολλά στελέχη, αλλά όχι όλα, εκκρίνουν μια τοξίνη στην οποία οφείλουν το κίτρινο φθορίζον χρώμα όταν καλλιεργούνται *in vitro*. Το *P. Syringae* παράγει, επίσης, δραστικές πρωτεΐνες πυρήνωσης πυρήνων (INA) που προκαλούν το πάγωμα νερού (σε φυτά) σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες (-4 έως -2 °C), με αποτέλεσμα τον τραυματισμό.



Pseudomonas Syringae

Το *Pseudomonas Syringae* είναι ένα από τα πιο κοινά φυτικά παθογόνα που μολύνουν τη φυλλόσφαιρα. Μπορεί να ζει στην επιφάνεια του φυτού ως επίφυτο. Για να προκαλέσει ασθένεια, εισέρχεται στο φυτό, μέσω τραυμάτων ή φυσικών ανοιγμάτων όπως τα στόματα, και πολλαπλασιάζεται εντός του αποπλάστη.

Το *P. Syringae* προσβάλλει τα φυτά χρησιμοποιώντας μια ποικιλία παραγόντων μολυσματικότητας, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών τελεστών που μεταφέρονται στο φυτικό κύτταρο μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III (T3SS), των τοξινών μικρού μορίου, των εξωπολυσακχαριτών, των ενζύμων αποικοδόμησης κυττάρων και των φυτικών ορμονών.

Τα φυτά έχουν αναπτύξει αμυντικό μηχανισμό (κλείσιμο στοματικών) για να μειώσουν την είσοδο των βακτηρίων μέσω των στομάτων με την ανίχνευση σχετιζόμενων με παθογόνα μοριακών μοτίβων (PAMPs). Για να νικήσει την οδοντική άμυνα, ο *P. Syringae* χρησιμοποιεί τις τοξίνες και τις πρωτεΐνες τελεστές T3SS ώστε να ξεπεράσει το στοματικό κλείσιμο που προκαλείται από το PAMP. Το κλείσιμο από το στόμα είναι ευαίσθητο στην υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία, γεγονός που θα μπορούσε να προάγει την είσοδο βακτηρίων στο φυτό.

Μετά την είσοδό του στο φυτό, ο *P. Syringae* συναντά τον αποπλάστη, έναν πλούσιο σε υδατάνθρακες αλλά ισχυρά υπερασπισμένο χώρο διαβίωσης για μικροοργανισμούς. Οι πρόσφατες εξελίξεις στην αναγνώριση ενός ελάχιστου ρεπερτορίου των τελεστών T3SS και των

πειραμάτων ανασύστασης ασθενειών που βασίζονται σε μετάλλαξη ξενιστή αποδεικνύουν ότι η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και η δημιουργία υδατικού αποπλάστη είναι δύο κύριες παθογόνες διεργασίες που απαιτούνται για την ανάπτυξη του *P. Syringae* εντός του αποπλάστη.

1.1.5 ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ -ΤΡΟΠΟΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ

Το βακτήριο επιτίθεται στο φυτό με χημικά όπλα (τοξίνες, πηκτινολυτικά ένζυμα, ουσίες με φυτοορμονική δράση). Ωστόσο, συνήθως, ένα μεμονωμένο βακτηριακό κύτταρο δεν έχει τη δύναμη να προκαλέσει ζημιά στο φυτό. Η σημασία τους σαν παθογόνα οφείλεται κυρίως στην ικανότητα ταχύτατης αναπαραγωγής και παραγωγής μεγάλου αριθμού κυττάρων σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Οι κυριότερες ασθένειες που προκαλούν τα βακτήρια είναι νεκρώσεις διαφόρων τμημάτων του φυτού, μάρανση, κηλιδώσεις φύλλων, μεταχρωματισμός αγγείων και έλκη. Επίσης, πολλά βακτήρια προκαλούν εξίδρωση ενώ είναι υπεύθυνα και για την εμφάνιση όγκων σε βλαστούς, στις ρίζες και στο λαιμό των φυτών.

Οι ασθένειες αυτές μεταδίδονται μέσω φυτικών υπολειμμάτων, εντόμων φορέων καθώς και μέσω μολυσμένου νερού. Επίσης η μετάδοση τους είναι δυνατή με διάφορα μηχανικά μέσα όπως για παράδειγμα κατά τη διάρκεια καλλιεργητικών εργασιών.

1.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Η ασθένεια είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης παθογόνου, ξενιστή και περιβάλλοντος (Goidanich, 1964). Έτσι κάθε μέσο περιορισμού της ασθένειας πρέπει να αποσκοπεί:

- Στη μείωση της παρουσίας του παθογόνου (όπως την καταστροφή των μολυσμάτων ή την παρεμπόδιση παραγωγής σπορίων, κ.α.)
- Στην αλλαγή του περιβάλλοντος, έτσι όμως ώστε να μην περιορίζει την ανάπτυξη του φυτού-ξενιστή (που είναι η καλλιέργεια). Οι ενέργειες κατά βάση είναι καλλιεργητικές, όπως η αμειψισπορά, η μεταβολή της εποχής ή διάρκειας ή βάθους σποράς, η κατεργασία του εδάφους, κ.α. Για παράδειγμα, η μείωση της υγρασίας στην επιφάνεια των φυτών παρεμποδίζει την βλάστηση των σπορίων του παθογόνου.
- Στον χειρισμό του φυτού-ξενιστή. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας ή η αλλαγή των φαινολογικών σταδίων της καλλιέργειας έτσι ώστε να μην προσελκύει ή να παρεμποδίζει το παθογόνο.

Είναι κατά τα ανωτέρω πολύ περίπλοκες οι σχέσεις μεταξύ παθογόνου, περιβάλλοντος και ξενιστή και απαιτείται λεπτομερής γνώση της βιολογίας του παθογόνου, της οικολογίας καθώς και της σχέσης όλων των βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων στο αγροοικοσύστημα. Για την

αντιμετώπιση επομένως των ασθενειών τα μέσα πρέπει να λαμβάνονται ολοκληρωμένα σε ένα ευέλικτο σύστημα που θα είναι συμβατό με την αντιμετώπιση και των άλλων φυτοπροστατευτικών προβλημάτων αλλά και παράλληλα να είναι οικονομικά αποδεκτά.

Στην αντιμετώπιση των φυτοάνοσων κατά γενικό κανόνα τα μέτρα αποσκοπούν στην προστασία του πληθυσμού των φυτών και δεν είναι ατομικά (όπως π.χ. στην περίπτωση ασθενειών του ανθρώπου ή των ζώων). Εξαιρέση ίσως αποτελούν τα δέντρα ή μερικά καλλωπιστικά στα οποία εφαρμόζονται ατομικά μέτρα προστασίας και υγιεινής (Agris, 1988).

Οι αρχές που διέπουν την αντιμετώπιση των ασθενειών (Agris, 1988; Jarvis, 1992; Mehrotra, 1980; Ryenson, 1977) είναι:

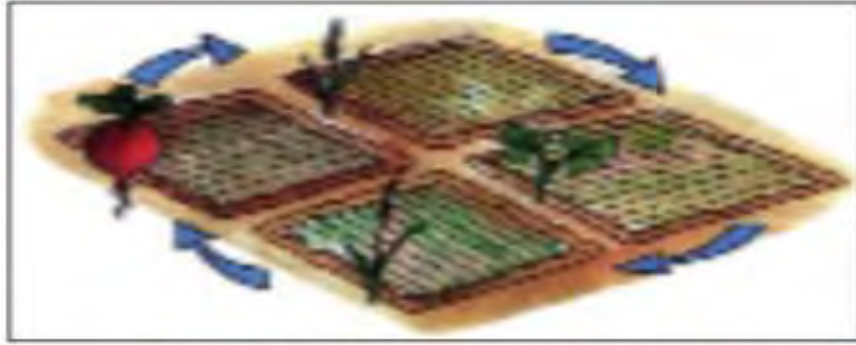
- **Αποφυγή:** Είναι η χρήση ή ο χειρισμός των περιβαλλοντικών παραγόντων κατά την άσκηση της φυτοπροστασίας με σκοπό να επωφεληθούμε από την απουσία, τη μη δυνατότητα μόλυνσης ή τη διακοπή του βιολογικού κύκλου του παθογόνου.
- **Αποκλεισμός:** Είναι η παρεμπόδιση διασποράς ενός παθογόνου σε μία αμόλυντη περιοχή ή η παρεμπόδιση της εγκατάστασής του.
- **Εκρίζωση:** Είναι η παρεμπόδιση πρόκλησης οικονομικής ζημιάς σε μία καλλιέργεια από κάποιο παθογόνο, με παράθεση ενός χημικού ή φυσικού φραγμού μεταξύ του μολύσματος και του φυτού. Τα προστατευτικά μέτρα πρέπει να λαμβάνονται είτε λίγο πριν την είσοδο του μολύσματος στα φυτά ή κατά την έναρξη της περιόδου επώασης.
- **Θεραπεία:** Είναι η εφαρμογή φυσικών ή χημικών μέσων με σκοπό την καταστροφή του παθογόνου μέσα στο φυτό.
- **Ανάπτυξη ανθεκτικότητας:** Είναι ο χειρισμός της μορφολογίας ή φυσιολογίας ενός καλλιεργούμενου φυτού με βελτιωτικές μεθόδους επιλογής ή υβριδισμού έτσι ώστε το παθογόνο να μην μπορεί να εγκατασταθεί σε αυτό.

1.3 ΜΕΤΡΑ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗΣ Η ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

Αμειψισπορά

Η αμειψισπορά είναι γεωργικό σύστημα, όπου, εφαρμόζεται η συστηματική εναλλαγή καλλιεργειών στο ίδιο χωράφι με διαφορετική ευαισθησία και αντοχή σε εχθρούς και ασθένειες, καλύπτοντας μια χρονική περίοδο δύο, τριών ή περισσότερων χρόνων. Η αμειψισπορά συμβάλλει επίσης στην καταπολέμηση εντόμων που προσβάλλουν μόνο μια καλλιέργεια και δεν μπορούν να μετακινηθούν σε μεγάλες αποστάσεις. Τέλος, η αμειψισπορά περιορίζει την εξάπλωση ζιζανίων τα οποία είναι δύσκολο να εξοντωθούν.



*Τετραετής αμειψιοπορά (πηγή:
www.objetoseducacionais2mec.gov.br)*

Αγρανάπαυση

Η αγρανάπαυση είναι επίσης γεωργικό σύστημα, όπου, το έδαφος παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς κάποια καλλιέργεια ξενιστή. Το σύστημα αυτό στοχεύει στη μείωση των πληθυσμών των παθογόνων εδάφους, καθώς στην απουσία ξενιστή δεν μπορούν να τραφούν και να πολλαπλασιαστούν. Η αγρανάπαυση σε συνδυασμό με το όργωμα του εδάφους το καλοκαίρι όπου εκτίθενται τα παθογόνα εδάφους σε υψηλές θερμοκρασίες και στην απουσία εδαφικής υγρασίας μπορεί να επιφέρει σημαντική μείωση του πληθυσμού τους.



*Χρυσονηματώδης πατάτας
(πηγή: www.old-padil.gov.au)*

Επιλογή αγροτεμαχίου

Ο τύπος, το βάθος, η δομή και το ιστορικό του εδάφους αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην ανάπτυξη των φυτών και στην ενίσχυση της άμυνάς τους στα διάφορα παθογόνα.

Τύπος εδάφους: Τα αμμώδη-αμμωπηλώδη εδάφη είναι κατάλληλα για πρώιμη παραγωγή, αερίζονται καλά, είναι ευκατέργαστα, στραγγίζουν και ζεσταίνονται γρήγορα το χειμώνα και την άνοιξη. Χάνουν εύκολα την υγρασία τους και απαιτούν συχνές και ελαφριές λιπάνσεις κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Βελτιώνονται με την προσθήκη οργανικής ουσίας. Τα βαριά-αργιλώδη εδάφη είναι πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία, συγκρατούν καλά την υγρασία, είναι κατάλληλα για όψιμες φυτεύσεις γιατί είναι δροσερά και υγρά, ενώ πρέπει να αποφεύγεται η καλλιέργειά τους όταν είναι πολύ υγρά.

Βάθος εδάφους: Το βάθος του εδάφους δεν πρέπει να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στην ελεύθερη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος. Βαθιά εδάφη χωρίς αδιαπέραστα στρώματα πρέπει να επιδιώκονται για όλα τα καλλιεργούμενα φυτά.

Δομή εδάφους: Επίπεδα και συνεκτικά εδάφη, παρουσιάζουν προβλήματα αποστράγγισης και ευνοούν την ανάπτυξη εδαφογενών ασθeneιών. Δημιουργούνται συνήθως λόγω συγκέντρωσης αλάτων που προέρχονται από την υπερβολική χρήση λιπασμάτων ή από την άρδευση με νερό υψηλής αλατότητας.

Ιστορικό εδάφους: Στην επιλογή του κατάλληλου αγροτεμαχίου πρέπει να ληφθεί υπόψη το ιστορικό του εδάφους όσον αφορά την ύπαρξη εντόμων και παθογόνων εδάφους, δυσκολοεξόντωτων ζιζανίων και άλλων παρασίτων (π.χ. οροβάγχη, κουσκούτα). Αυτό μπορεί να προσδιοριστεί σε κάποιο βαθμό από την εμφάνιση ανάλογων ζημιών σε προηγούμενες φυτεύσεις. Επίσης, προσοχή πρέπει να δίνεται στην ύπαρξη υπολειμμάτων ζιζανιοκτόνων στο έδαφος.

Γειτονικές φυτείες

Η ύπαρξη γειτονικών φυτειών με σοβαρές προσβολές από εχθρούς και ασθένειες (περονόσπορος, ιώσεις, κ.α.) αποτελούν εστίες μόλυνσης και για τις υπόλοιπες φυτείες της περιοχής. Για τον σκοπό αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται από τους παραγωγούς όλα τα απαραίτητα μέτρα φυτοπροστασίας όσο καιρό διατηρούν τις φυτείες τους παραγωγικές. Ταυτόχρονα θα πρέπει να απομακρύνονται ή να καταστρέφονται έγκαιρα, με βαθύ όργωμα τα υπολείμματα της καλλιέργειας. Σε αντίθετη περίπτωση, είναι προτιμότερο η καθυστέρηση νέων φυτεύσεων στις περιοχές αυτές.

Χρόνος και βάθος σποράς/φύτευσης

Ο κατάλληλος χρόνος και το βάθος σποράς/φύτευσης εξασφαλίζει γρήγορο και ανεμπόδιστο φύτερωμα, αποτρέποντας σε μεγάλο βαθμό ζημιές από ασθένειες εδάφους (π.χ. τήξεις σποριόφυτων) που αποτελούν αιτία απωλειών από την αρχή της εγκατάστασης μιας φυτείας. Η καθυστέρηση της βλάστησης που μπορεί να οφείλεται επίσης στη μειωμένη ζωτικότητα του σπόρου τον καθιστά πιο ευπρόσβλητο σε εχθρούς και ασθένειες. Σε μερικές περιπτώσεις, πρόωμη φύτευση μπορεί να αποτρέψει μια προσβολή όπως στην περίπτωση της ίωσης του κίτρινου καρουλιάσματος της ντομάτας και της ίωσης Ψ της πατάτας, λόγω της απουσίας ή της μειωμένης δραστηριότητας του εντόμου-φορέα.

1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

1.4.1 Ορισμός-Γενικά

Με τον όρο βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών, εννοείται η ποσοτική μείωση του μολύσματος ή της φυτοπαθογόνου δραστηριότητας ενός παθογόνου αιτίου, που επιτυγχάνεται με την χρήση ή τη μεσολάβηση ενός ή περισσότερων οργανισμών, εκτός του ανθρώπου (Cook&Baker, 1983).

Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στην περίπτωση των φυτοπαθογόνων με βιολογικό τρόπο, υπάρχει η ιδιαιτερότητα του χειρισμού ενός πλήθους άλλων παραγόντων (βιοτικών και αβιοτικών) που συνιστούν το οικολογικό περιβάλλον της φυτικής επιφάνειας και του επιφανειακού, καλλιεργούμενου εδάφους. Τα περιβάλλοντα αυτά και ειδικότερα το καλλιεργούμενο επιφανειακό έδαφος, είναι πλούσια σε μικροβιακή δραστηριότητα. Το έδαφος, μάλιστα, αποτελεί την πλουσιότερη εστία αλληλοεπηρεαζόμενων μικροοργανισμών και από πλευράς αριθμού και από πλευράς ειδών, παρέχοντας πλείστες όσες ευκαιρίες έκφρασης χρήσιμου ανταγωνισμού μεταξύ τους (Cook & Baker, 1983). Ίσως γι'αυτό είναι δυσκολότερη η αντιμετώπιση των εδαφογενών ασθενειών από τις φυτονόσους του υπέργειου τμήματος των φυτών. Η φυλλόσφαιρα αλλά κυρίως το έδαφος αποτελεί ένα οικοσύστημα. Ο μεγαλύτερος αριθμός μικροοργανισμών του εδάφους είναι σαπρόφυτοι, επιτελούντες επωφελέστατο έργο, με την διάσπαση των πολύπλοκων οργανικών ενώσεων και συμμετέχοντες στην ανακύκλωση πολλών χημικών στοιχείων. Πολλοί εξ' αυτών των μικροοργανισμών, δρουν ως ανταγωνιστές των φυτοπαθογόνων, περιορίζοντας την εκδήλωση σοβαρών φυτονόσων. Με τον χειρισμό αυτών των μικροοργανισμών ασκείται η βιολογική μέθοδος αντιμετώπισης των φυτοπαθογόνων εδάφους.

1.4.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

Οι τεχνικές που ακολουθούνται για τη βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών είναι οι εξής:

- Η τροποποίηση των καλλιεργητικών τεχνικών με σκοπό την ανάπτυξη υπαρχόντων μικροβιακών ανταγωνιστών.
- Η εφαρμογή ανταγωνιστών με την εισαγωγή τους στο περιβάλλον που αναπτύσσονται τα φυτά ή επάνω στα φυτά.
- Ο εμβολιασμός των φυτών με χαμηλής παθογένειας μικροοργανισμούς ή ιούς του ίδιου είδους με τους παθογόνους.
- Εισαγωγή οργανισμών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών. Μία άλλη προσέγγιση της βιολογικής αντιμετώπισης των εδαφογενών ασθενειών των φυτών, είναι το ορμονικό (φυτορρυθμιστικό) και θρεπτικό θετικό αποτέλεσμα, στην αύξηση και παραγωγή των καλλιεργούμενων φυτών. Το θετικό αυτό αποτέλεσμα προέρχεται από τη δράση ορισμένων βακτηρίων (*Bacillus Subtilis*, *Streptomyces spp.*), όταν αυτά προστίθενται στο περιβάλλον αυτών κατά των φυτοπαθογόνων εδάφους (Merrinametal., 1975; Schroth & Becker, 1990).
- Εφαρμογή φυτικών εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων ελέγχουν τα φυτοπαθογόνα. Τέλος, άλλη μία προοπτική στην βιολογική αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων, είναι η χρήση ουσιών που παράγονται από ανώτερα φυτά (εκχυλίσματα ή αιθέρια έλαια), οι οποίες επιδεικνύουν βιολογικές ιδιότητες. Αρκετές περιπτώσεις εμπειρισμού είναι γνωστές και συνιστώνται σε διάφορα εγχειρίδια βιολογικής καλλιέργειας (Αλκιμος, 1990).

Μερικές βασικές διαπιστώσεις (Cook, 1990) που λαμβάνονται υπόψη στην βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων εδάφους είναι οι εξής:

- Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών είναι μεγαλύτερος πλησίον των ριζών των φυτών, παρά στο έδαφος σε κάποια απόσταση από τις ρίζες.
- Η ανάπτυξη ασθενειών των ριζών ευνοείται σε αποστειρωμένο έδαφος. Όχι όμως αν εισαχθούν στο έδαφος μικροοργανισμοί ή φυσικό έδαφος προ της επανεισαγωγής του φυτοπαθογόνου.
- Η ανάπτυξη ασθενειών των ριζών σε καταστρεπτικά επίπεδα, ευνοείται από την μονοκαλλιέργεια ευπαθών φυτών. Όχι όμως όταν εφαρμόζεται αμειψισπορά.
- Οι περισσότερες ασθένειες των ριζών των φυτών παρεμποδίζονται ή ακόμα αποτρέπονται όταν προστίθεται οργανική ουσία, στο κατά φυσικό τρόπο “μολυσμένο” έδαφος.
- Στα περισσότερα εδάφη, αν όχι σε όλα, τα σπόρια μυκήτων παραμένουν ανενεργά, μέχρις ότου διεγερθούν προς βλάστηση από μία εξωτερική πηγή θρεπτικών ουσιών και ενέργειας.

Το έδαφος αποτελεί ένα οικοσύστημα, πλούσιο σε μικροοργανισμούς, πολλοί των οποίων δρουν ως ανταγωνιστές των φυτοπαθογόνων, περιορίζοντας την εκδήλωση σοβαρών φυτονόσων και με

τον χειρισμό των οποίων ασκείται η βιολογική μέθοδος αντιμετώπισης των φυτοπαθογόνων εδάφους. Αυτό επιτυγχάνεται με καλλιεργητικές πρακτικές, όπως η αμειψισπορά, η ενσωμάτωση φυτικών υπολειμμάτων, κ.α., οι οποίες επιφέρουν αλλαγή του περιβάλλοντος προς όφελος μερικών μικροοργανισμών. Οι τελευταίοι, δρώντες ως ανταγωνιστές των φυτοπαθογόνων, ασκούν την βιολογική τους επίδραση.

1.5 NANOTEΧΝΟΛΟΓΙΑ

Η νανοτεχνολογία είναι η τεχνολογία ελέγχου και χειρισμού των υλικών σε διαστάσεις από 1-100 νανόμετρα, όπου η διαφορετική συμπεριφορά των υλικών σ' αυτές τις διαστάσεις ανοίγει το πεδίο για καινούριες εφαρμογές.

Η νανοτεχνολογία σαν επιστήμη είναι η τεχνολογία, που μπορούμε κατασκευάζουμε και να χειριζόμαστε διάφορα «μοντέλα» υλικών σε μέγεθος νανοκλίμακας. Τα νανοτεμάχια είναι μεγαλύτερα από τα άτομα και βρίσκονται γύρω μας καθημερινά. Είναι τόσο μικρά που περιέχουν μόνο λίγα άτομα, σε αντίθεση με τα χύδινα υλικά που περιέχουν δισεκατομμύρια άτομων. Η διαφορά αυτή είναι που κάνει τα νανοτεμάχια να έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά, όσον αφορά την αντίδρασή τους με άλλα υλικά, το χρώμα τους, τη σκληρότητά τους, την αντοχή τους στο σπάσιμο και τις υψηλές θερμοκρασίες, καθώς και νέους τρόπους εισόδου στα φυτά και στο περιβάλλον λόγω του υψηλού βαθμού κινητικότητας που διαθέτουν.

1.5.1 ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

Ανόργανα νανοϋλικά, (π.χ. κβαντικές κουκκίδες, νανοσύρματα και νανοράβδοι) λόγω των ενδιαφερουσών οπτικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην οπτικοηλεκτρονική. Επιπλέον, οι οπτικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες των νανοϋλικών που εξαρτώνται από το μέγεθός τους και το σχήμα τους μπορούν να ρυθμιστούν μέσω συνθετικών τεχνικών. Υπάρχουν οι δυνατότητες να χρησιμοποιηθούν τα νανοϋλικά σε άλλα οργανικά υλικά με βάση οπτικοηλεκτρονικές συσκευές όπως οργανικά φωτοβολταϊκά στοιχεία, οργανικές δίοδοι εκπομπής φωτός (OLEDs) κλπ. Οι αρχές λειτουργίας τέτοιων υλικών διακατέχονται από φωτοεπαγόμενες διεργασίες όπως φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίου και μεταφορά ενέργειας. Η απόδοση των συσκευών εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα της φωτοεπαγόμενης διεργασίας που είναι υπεύθυνη για τη λειτουργία τους. Συνεπώς, μια καλύτερη κατανόηση αυτών των φωτοεπαγόμενων διεργασιών σε οργανικά/άνοργανα συστήματα σύνθετων νανοϋλικών είναι απαραίτητη για να χρησιμοποιηθούν σε οργανικές οπτικοηλεκτρονικές συσκευές.

Νανοσωματίδια ή νανοκρύσταλλοι κατασκευασμένοι από μέταλλα, ημιαγωγούς, ή οξείδια παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον για τις μηχανικές, ηλεκτρικές, μαγνητικές, οπτικές, χημικές και άλλες ιδιότητές τους. Τα νανοσωματίδια έχουν χρησιμοποιηθεί ως κβαντικές κουκκίδες και ως χημικοί καταλύτες όπως σε νανοϋλικά με βάση καταλύτες.

Τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον επειδή είναι μια γέφυρα μεταξύ χύμα υλικών και ατομικών ή μοριακών δομών. Ένα χύμα υλικό πρέπει να έχει σταθερές φυσικές ιδιότητες ανεξάρτητα από το μέγεθός του, αλλά στην νανοκλίμακα αυτό συχνά δεν συμβαίνει. Παρατηρούνται ιδιότητες που εξαρτώνται από το μέγεθος όπως κβαντικοί περιορισμοί σε σωματίδια ημιαγωγού, διέγερση επιφανειακών πλασμονίων σε κάποια μεταλλικά σωματίδια και υπερπαραμαγνητισμός σε μαγνητικά υλικά.

Τα νανοσωματίδια εμφανίζουν έναν αριθμό ειδικών ιδιοτήτων σχετικά με τα χύμα υλικά. Παραδείγματος χάρη, η κάμψη του χύμα χαλκού (σύρματος, ταινίας, κλπ.) συμβαίνει με την κίνηση των ατόμων/συστάδων χαλκού στην κλίμακα των περίπου 50 nm. Τα νανοσωματίδια του χαλκού που είναι μικρότερα από 50 nm θεωρούνται πολύ σκληρά υλικά, που δεν εμφανίζουν την ίδια ελατότητα και ολκιμότητα όπως ο χύμα χαλκός. Η αλλαγή στις ιδιότητες δεν είναι πάντα επιθυμητή. Σιδηροηλεκτρικά υλικά μικρότερα από 10 nm μπορεί να αλλάξουν την κατεύθυνση μαγνήτισης τους χρησιμοποιώντας τη θερμική ενέργεια θερμοκρασίας δωματίου, κάνοντας τα συνεπώς άχρηστα για αποθήκευση μνήμης. Τα αιωρήματα των νανοσωματιδίων είναι δυνατά, επειδή η αλληλεπίδραση της επιφάνειας του σωματιδίου με τον διαλύτη είναι αρκετά ισχυρή, ώστε να ξεπεράσει διαφορές στην πυκνότητα, που συνήθως καταλήγει σε ένα υλικό που είτε βυθίζεται είτε επιπλέει σε ένα υγρό. Τα νανοσωματίδια έχουν συχνά αναπάντεχες οπτικές ιδιότητες επειδή είναι αρκετά μικρά για να περιορίσουν τα ηλεκτρόνια τους και να παράξουν κβαντικά φαινόμενα. Παραδείγματος χάρη, τα νανοσωματίδια χρυσού εμφανίζονται βαθιά κόκκινα προς μαύρα σε διάλυμα.

1.5.2 NANO-ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΟΥ ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΓΟΡΑ ΣΗΜΕΡΑ

Πολλές εταιρείες, όπως η **OCION, PLANET OF HEALTH, IOTA, VIVE-NANO, BASF, HENKEL, PROCTER and GAMBLE, DOW CHEMICAL, SYNGENTA**, έχουν πατέντες για νανοτεχνολογικές εφαρμογές στον τομέα των παρασιτοκτόνων και του τρόπου μεταφοράς τους στους ιστούς, και ειδικότερα η **BASF** έχει τις πιο πολλές πατέντες νανοτεχνολογίας, όσον αφορά τρόπους μεταφοράς και εισόδου των παρασιτοκτόνων.

Examples of Nano-pesticides



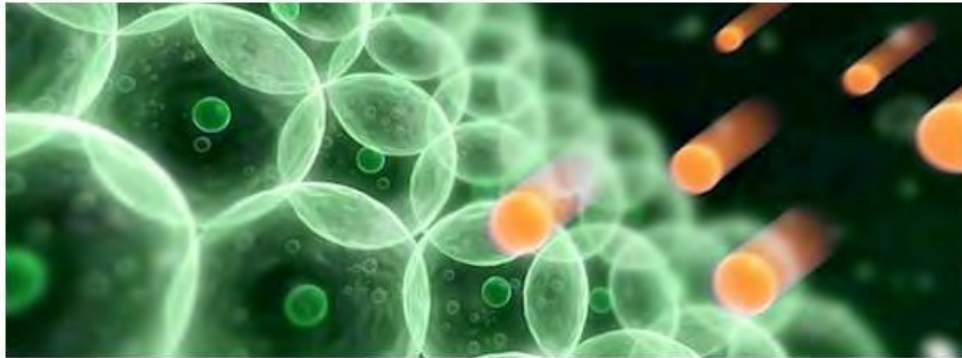
Σήμερα παράγονται από τις εταιρείες νάνο-σωματίδια μεγέθους 100-250 nm, τα οποία έχουν την δυνατότητα να διαλύονται πολύ πιο εύκολα στο νερό και έτσι να έχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Επίσης σήμερα παράγονται νάνο-γαλακτώματα εντομοκτόνων η ζιζανιοκτόνων, που περιέχουν νανοσωματίδια μεγέθους 200-400 nm διαλυμένα σε νερό ή λάδι και είναι απολύτως ομοιόμορφα.

Μεταξύ των εταιρειών που εξειδικεύονται στην νανοτεχνολογία της φυτοπροστασίας, ενδιαφέρον παρουσιάζουν η Βρετανική **IOTA Nanosolutions** και οι Καναδικές **VIVE-NANO** και **OCION**.

1.5.3 Η ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ - ΘΡΕΨΗ

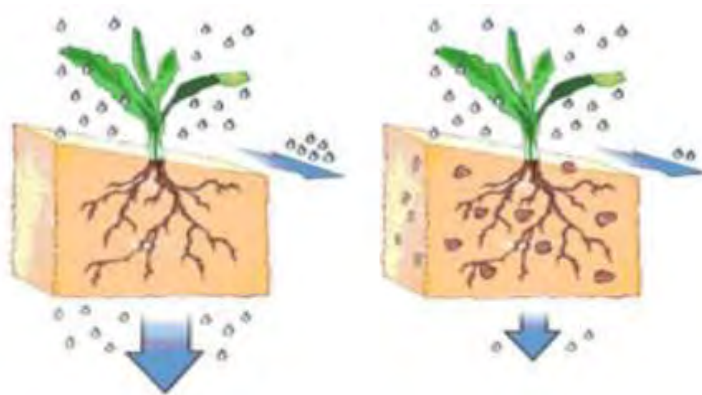
Τα κυριότερα προϊόντα νανοτεχνολογίας που χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή στη βιολογική γεωργία για θρέψη και φυτοπροστασία είναι τα βιολογικά λιπάσματα **MINERAL**, της Σλοβένικης εταιρείας **PLANET OF HEALTH**. Τα προϊόντα αυτά είναι θρεπτικά στοιχεία σε μορφή ιόντων, αιωρούμενα σε νερό, χωρίς να έχουν τη δυνατότητα συσσωμάτωσης ή καθίζησης. Αυτό συμβαίνει διότι η επεξεργασία τους με μεθόδους νανοτεχνολογίας απομακρύνει ηλεκτρόνια και προσδίδει στο κάθε νάνο-στοιχείο θετικό φορτίο, χωρίς τη δυνατότητα να προσλάβει άλλο ηλεκτρόνιο, ώστε να συσσωματωθεί με άλλα. Με τον τρόπο αυτό έχουμε όλα τα θρεπτικά στοιχεία βιο-ενεργά και άμεσα αφομοιώσιμα από όλα τα μέρη του φυτού χωρίς καμία δέσμευση ή απώλεια. Η προσθήκη τέτοιας μορφής θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος δίνει τη δυνατότητα ολοκληρωμένης θρέψης, χρησιμοποιώντας ελάχιστες ποσότητες, χωρίς να μένουν υπολείμματα χημικών στο έδαφος και τα υπόγεια νερά. Αρκεί να σκεφτεί κανείς ότι τα **MINERAL** περιέχουν σε ιοντική μορφή 75 στοιχεία, απαραίτητα για την υγιή ανάπτυξη των φυτών, από τα 112 γνωστά στοιχεία του περιοδικού συστήματος.

Ένα άλλο προϊόν που προέρχεται από την νανοτεχνολογική έρευνα είναι ο ιοντικός χαλκός (**ION-COOPER**) της Καναδικής εταιρείας **OCION**. Ο χαλκός αυτός βρίσκεται στο διάλυμα σε μορφή θετικά φορτισμένων ιόντων, τα οποία είναι όλα **βιο-ενεργά** και όπως είπαμε και για τ' άλλα παρόμοια προϊόντα, δεν καθιζάνει, δεν συσσωματώνεται, δεν χρειάζεται ανάδευση και παραμένει βιο-ενεργός για χρόνια. Η δραστηριότητά του στα βακτήρια είναι σημαντικά πιο μεγάλη από τους κοινούς χαλκούς και είναι χαρακτηριστικό, ότι στο σώμα του μικρότερου βακτηρίου εισέρχονται δυο ιόντα (ιοντικού χαλκού) καθιστώντας τον χαλκό αυτόν ένα από τα αποτελεσματικότερα βακτηριοκτόνα.



Σύμφωνα με έρευνες ο ψεκασμός φρούτων και λαχανικών με τον χαλκό αυτόν, αυξάνει τη μετασυλλεκτική διάρκεια ζωής τους, διατηρώντας τα, φρέσκα και υγιή για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Μία άλλη εφαρμογή νανοτεχνολογίας είναι το γερμανικό προϊόν **GEOHUMUS**, ένα προσθετικό εδάφους, με ικανότητα απορρόφησης νερού και στη συνέχεια απελευθέρωσής του. Το υλικό αυτό, βοηθά στην βελτίωση της δομής του εδάφους. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά του να απελευθερώνει νερό στα φυτά, για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, μεγαλύτερο από ό, τι σε εδάφη που δεν είναι εμπλουτισμένα με **GEOHUMUS**.



1.5.4 Το μέλλον της νανοτεχνολογίας

Η νανοτεχνολογία είναι ένα **πολλά υποσχόμενο εργαλείο** για τη γεωργία και την παραγωγή τροφίμων. Οι εταιρείες που ασχολούνται σήμερα με τη δημιουργία τέτοιων προϊόντων, κατόρθωσαν να πετύχουν αρκετά νάνο-προϊόντα, που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη γεωργία. Παράλληλα όμως, γίνονται από διάφορα ινστιτούτα εκτεταμένες έρευνες, σχετικά με την ασφάλεια των προϊόντων νανοτεχνολογίας και τις πιθανές επιπτώσεις τους στη υγεία των καταναλωτών. Οι έρευνες είναι εκτεταμένες και πολυδάπανες, γιατί οι καταναλωτές παρουσιάζουν υψηλή ανοχή στους κινδύνους, που προέρχονται από τη χρήση φαρμάκων και ιατρικών θεραπειών, που αφορούν την ζωή τους. Ωστόσο, η ανοχή τους είναι σημαντικά μειωμένη, όταν οι κίνδυνοι προέρχονται από τα τρόφιμα και ειδικά, όταν οι ίδιοι δεν έχουν άμεσο όφελος.

Η χρήση προϊόντων νανοτεχνολογίας στη γεωργία και το περιβάλλον είναι επωφελής. Αυτό οφείλεται στη σημαντικά μειωμένη χρήση δραστικών ουσιών αλλά και στην αυξημένη αποτελεσματικότητα που παρουσιάζουν αυτά τα προϊόντα στην θρέψη και αποτελεσματική αντιμετώπιση πολλών ασθενειών των φυτών.

Σημαντικά είναι για τους λόγους αυτούς και τα περιβαλλοντικά οφέλη, λόγω μείωσης των τοξικών υπολειμμάτων που αφήνουν τα προϊόντα νανοτεχνολογίας. Η χρήση όμως προϊόντων νανοτεχνολογίας πρέπει να γίνεται με αυξημένη προσοχή και να είναι πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, γιατί όπως είπαμε πολλές φορές οι ιδιότητες αυτού του τύπου προϊόντων παρουσιάζουν ιδιαίτερη συμπεριφορά σε σύγκριση με το συμβατικό προϊόν.

1.6 Ο ΧΑΛΚΟΣ: ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

1.6.1 ΧΑΛΚΟΣ

Ο χαλκός δρα στην κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας μεταβολές στην περατότητα. Η είσοδος ιόντων χαλκού στο εσωτερικό του κυττάρου, έχει ως συνέπεια την παρεμπόδιση ορισμένων ενζύμων του αναπνευστικού κύκλου (λόγω αντίδρασής του με σουλφυδρικές ομάδες) και του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Στη Βιολογική Γεωργία ο χαλκός και όλα τα σκευάσματά του χρησιμοποιούνται ως μυκητοκτόνα. Η χρήση τους πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τον Κανονισμό 2091/92. Οι μορφές του χαλκού που χρησιμοποιούνται στη Βιολογική Γεωργία είναι: Α) Βορδιγάλειος πολτός: Είναι το κλασσικό χαλκούχο φάρμακο, το οποίο είναι μυκητοξικό σε μύκητες των γενών *Peronospora*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Septoria*, *Monilia*, *Exoascus*, *Venturia*, *Coryneum*, *Colletotrichum*, *Glomerella*, *Gnomonia*, *Cycloconium*, *Cladosporium*, *Cercospora* και σε σκωριάσεις που οφείλονται στα γένη *Uromyces*, *Gymnosporangium*, *Puccinia*

και σήψεις των ριζών που οφείλονται στα είδη των γενών Pythium, Verticillium και Sclerotinia. Ο βορδιγάλειος πολτός πρωτοπαρασκευάστηκε ως μείγμα θειικού χαλκού (γαλαζόπετρα) με υδροξείδιο του ασβεστίου («σβησμένη άσβεστος») σε αναλογία 1:2 περίπου. Όσον αφορά στην φυτοτοξικότητα του βορδιγάλειου πολτού, ακόμα και όταν είναι αλκαλικός και με μικρή περιεκτικότητα σε χαλκό, βλάπτει την βλάστηση πολλών φυτών (οπωρώνες, αμπέλι, τομάτα, πατάτα). Η φυτοτοξικότητα εκδηλώνεται με τη μορφή εγκαυμάτων, φυλλοπτώσεων, καρποπτώσεων και περιορισμού της βλάστησης και της παραγωγής. Η παρασκευή του βορδιγάλειου πολτού πρέπει να γίνεται λίγο πριν από την χρησιμοποίησή του, γιατί παραμονή του πολτού αυξάνει τον κίνδυνο φυτοτοξικότητας. Β) Βουργούνδιος πολτός: Ο πολτός αυτός έχει το πλεονέκτημα έναντι του βορδιγάλειου, γιατί είναι περισσότερο ομοιογενής, παρουσιάζει όμως το μειονέκτημα να είναι φυτοτοξικός (παρουσία θειικού νατρίου) και έχει αρκετά μειωμένη προσκολλητικότητα. Το τελευταίο μειονέκτημα μπορεί να διορθωθεί με την προσθήκη ειδικών προσκολλητικών. Η χρήση του σε ορισμένες καλλιέργειες πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή, καθώς είναι φυτοτοξικός στα κολοκυνθοειδή και στα μηλοειδή. Γ) Οξυχλωριούχος χαλκός: Οι πρώτες διαπιστώσεις για τις ιδιότητες του οξυχλωριούχου χαλκού ήταν για την καταπολέμηση του περονόσπορου. Οι διάφορες μέθοδοι βιομηχανικής παρασκευής δίνουν σκευάσματα, στα οποία ο χαλκός βρίσκεται με τη μορφή οξυχλωριούχου χαλκού και ασβεστίου ή οξυχλωριούχου τετραχαλκού ή και με τριβασικό θειικό χαλκό. Όλοι οι οξυχλωριούχοι χαλκοί έχουν γενικά μικρότερη προσκολλητικότητα από εκείνη του βορδιγάλειου πολτού και γι' αυτό η διάμετρος των κόκκων του είναι μικρότερη. Ο οξυχλωριούχος χαλκός εφαρμόζεται με ψεκάσμούς μέχρι απορροής, ενώ γενικά αποφεύγεται η χρήση του κατά την άνθιση. Είναι σχετικά μη τοξικός για τις μέλισσες, τοξικός για τα ψάρια και επικίνδυνος για τα παραγωγικά ζώα. Χρησιμοποιείται ενάντια του περονόσπορου και την ανθράκωση στο αμπέλι, ενάντια στην κορυφοξήρα και της σεπτόρια στα εσπεριδοειδή, ενάντια στο κορύννεο, κλαδοσπόριο, εξώασκος, μονίλια στα πυρηνόκαρπα και ενάντια του περονόσπορου στα κηπευτικές καλλιέργειες.

1.6.2 Χαλκός και φυτά

Ο χαλκός ενεργοποιεί ορισμένα ένζυμα στα φυτά εμπλεκόμενα στη σύνθεση της λιγνίνης και είναι απαραίτητος σε πολλά συστήματα ενζύμων. Απαιτείται επίσης στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, είναι απαραίτητος για την αναπνοή των φυτών και βοηθά στο φυτικό μεταβολισμό των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών. Ο χαλκός χρησιμεύει επίσης για την ενίσχυση της γεύσης και του χρώματος στα λαχανικά και του χρώματος στα άνθη.

Στην περίπτωση ανεπάρκειας χαλκού, επειδή είναι ένα στοιχείο μη ευκίνητο, τα συμπτώματα έλλειψης εμφανίζονται στα νεότερα φύλλα. Τα συμπτώματα ποικίλλουν ανάλογα με την καλλιέργεια. Συνήθως, ξεκινούν με μια ελαφρά χλώρωση ολόκληρου του φύλλου ή μεταξύ των νευρών των νέων φύλλων. Εντός των χλωρωτικών περιοχών του φύλλου, μπορούν να σχηματιστούν μικρές νεκρωτικές κηλίδες, ειδικά στα περιθώρια των φύλλων. Καθώς τα συμπτώματα προχωρούν, τα νεότερα φύλλα είναι μικρότερα σε μέγεθος, χάνουν τη λάμψη τους

και σε μερικές περιπτώσεις τα φύλλα μπορεί να μαραίνονται. Τα κορυφαία μεριστώματα μπορεί να γίνουν νεκρωτικά και να πεθάνουν, αναστέλλοντας την ανάπτυξη των πλευρικών κλαδιών. Τα φυτά έχουν συνήθως συμπαγή εμφάνιση καθώς το μήκος του στελέχους μεταξύ των φύλλων μειώνεται. Το χρώμα των ανθέων είναι συχνά πιο ανοιχτό από το κανονικό.

Η τοξικότητα χαλκού συνήθως εμφανίζεται μετά από υπερβολική χρήση του στοιχείου. Τα συνηθέστερα συμπτώματα είναι η μείωση της ζωηρότητας των δένδρων, μικρότερα και μερικές φορές χλωρωτικά φύλλα, ανωμαλίες ανάπτυξης (παραμορφώσεις, μεταχρωματισμοί, πτωχή διακλάδωση και πλευρική ανάπτυξη) και νεκρώσεις ριζών, καθυστέρηση ωρίμανσης και τελικά μειωμένη παραγωγή. Επίσης, η τοξικότητα του χαλκού πολλές φορές προκαλεί τροφοπενία σιδήρου.

1.6.3 Χαλκός και έδαφος

Στο έδαφος, το pH του εδάφους και η οργανική ύλη είναι από τα κυρίαρχα στοιχεία που επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα του χαλκού. Η συγκέντρωση της οργανικής ύλης μειώνει την διαθεσιμότητα του χαλκού και την διαθεσιμότητα στις καλλιέργειες.

1.6.4 Χαλκούχες ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην φυτοπροστασία

1.6.4.1 Τρόπος δράσης

Ο χαλκός ως μυκητοκτόνο δραστηριοποιείται σε πολλαπλούς στόχους, για αυτό τον λόγο είναι μικρότερος ο κινδύνος ανθεκτικότητας. Τα ιόντα χαλκού (Cu^{2+}) δρουν μυκοτοξικά, μπλοκάρουν στα κύτταρα των μυκήτων τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αναπνοή, αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση, μειώνουν την δραστηριότητα της κυτταρικής μεμβράνης και τα κυτταρικά οργανίδια και επηρεάζουν την μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων (El Bilali, 2005).

Αναφορές υπάρχουν για ανθεκτικότητες που έχουν αναπτύξει κάποια βακτήρια όπως η *Pseudomonas syringae* L. (Vanneste και Voyle, 2003).

Ο κύριος στόχος είναι να αναπτυχθεί ένα σκεύασμα με την 'αποδεκτή' διαλυτότητα και μεγαλύτερη εμμονή.

Η αυξημένη είσοδος των ενώσεων χαλκού στα κύτταρα του φυτού οδηγεί σε φυτοτοξικότητες. Οι εναλλακτικές τυποποιήσεις με μειωμένο το μέγεθος των σωματιδίων (nano-συνθέσεις) αυξάνουν την διαλυτότητα επομένως και την δραστικότητα. (Kovacic et al, 2013).

Η τρέχουσα στρατηγική για την ανάπτυξη νέων σκευασμάτων είναι να αναπτύξει σύνθετες ενώσεις με βάση τον χαλκό, σε χαμηλά επίπεδα χαλκού από 2 έως 8% και τη βελτίωση της βιολογικής αποδοτικότητας (αύξηση της αποτελεσματικότητας έως 85%) (Gomez et al, 2007).

Σύγχρονα σκευάσματα περιέχουν σύμπλοκα του χαλκού με αμινοξέα, πεπτίδια, λιπαρά οξέα, πηκτίνες, σάκχαρα και άλλες οργανικές ενώσεις (Lešnik et al., 2009). Πολλοί αναφέρουν και έχει παρατηρηθεί ότι αυτά τα σκευάσματα δεν έχουν τα έντονα φαινόμενα φυτοτοξικότητας στην περίοδο ακόμα και της ανθοφορίας σε μερικές καλλιέργειες.



1.6.4.2 Πλεονεκτήματα του Χαλκού

Τα πλεονεκτήματα του χαλκού είναι η μεγάλη προσκολλητικότητα και εξάπλωσή του στα φύλλα όπου εφαρμόζεται, η μεγάλη περίοδος δράσης και το μικρό κόστος.

1.6.4.3 Μειονεκτήματα του Χαλκού

Τα μειονεκτήματα του χαλκού είναι σίγουρα η πιθανή φυτοτοξικότητα και η μεγάλη υπολειμματική διάρκεια στην ανίχνευση των φυτοφαρμάκων. Επίσης, ο χαλκός έχει μια σειρά δυσμενών επιπτώσεων σε μη στόχους (μικροοργανισμούς και γαιοσκώληκες) και τελικά την επακόλουθη απώλεια της γονιμότητας του εδάφους.

1.6.5 Επιπτώσεις του χαλκού σε είδη μη στόχους

Ο χαλκός είναι ο χαλκός ανήκει στα λεγόμενα ιχνοστοιχεία, ουσίες δηλαδή απαραίτητες σε ελάχιστες ποσότητες και με βασικό προορισμό να κινητοποιούν διάφορα βιολογικά συστήματα. Η ανεπάρκεια σε χαλκό μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της βιολογικής λειτουργίας και ενδεχομένως στο θάνατο. Ωστόσο, υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού είναι τοξικές και όταν βρεθούν σε εδάφη μπορεί να οδηγήσουν σε μια σειρά αποτελεσμάτων όπως είναι η μειωμένη βιολογική δραστηριότητα (μικροοργανισμούς και γαιοσκώληκες) και η επακόλουθη απώλεια γονιμότητας (Dumestre et al. 1999).

Τα εδάφη που περιέχουν σημαντικά υπολείμματα χαλκού έχει παρατηρηθεί ότι έχουν μικρότερες ποσότητες γαιοσκωλήκων (Van Rhee 1967). Έχει παρατηρηθεί ότι οι γαιοσκώληκες εμφανίζουν τοξικότητα σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις χαλκού (Helling et al 2000).

1.6.5.1 Επιπτώσεις στα φυτά και αποφυγή φυτοτοξικότητας

Το διάλυμα ψεκασμού είναι ένα εναιώρημα σωματιδίων χαλκού όπου απελευθερώνονται ιόντα χαλκού στα ψεκασμένα σημεία, απαραίτητα να υπάρχει υγρασία (η βραδινή υγρασία πολλές φορές φθάνει). Αυτή η σταδιακή απελευθέρωση ιόντων χαλκού μας δίνει υπολειμματική διάρκεια και μειώνει τον κίνδυνο φυτοτοξικότητας.

Προβλήματα φυτοτοξικότητας μπορεί να προκύψουν αν έχουμε επανειλημμένους ψεκασμούς ανά βδομάδα και δεν ποτίσουμε ή δεν βρέξει, οι συγκεντρώσεις του χαλκού θα είναι υψηλές με το που θα βρέξει θα διαλυτοποιηθεί μεγάλη ποσότητα χαλκού και μπορεί να δημιουργήσει φυτοτοξικότητες.

Αν το ψεκαστικό διάλυμα είναι πολύ όξινο έχουμε υψηλή διαλυτοποίηση του χαλκού, δηλαδή μεγάλες ποσότητες ιόντων του χαλκού θα παράγονται και θα διεισδύσουν στα φυτά μας με φαινόμενα φυτοτοξικότητας. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να πραγματοποιείται έλεγχος στις πηγές από τις οποίες λαμβάνεται το νερό.

1.6.5.2 Επιπτώσεις του χαλκού για την υγεία του εδάφους

Στο έδαφος ο χαλκός μπορεί να είναι ταυτοχρόνως ένα μικροθρεπτικό και ένα τοξικό στοιχείο, ανάλογα με τη συγκέντρωση του στο έδαφος.

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να έχουν κακές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των φυτών. Συσσώρευση του χαλκού στο έδαφος μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνιες επιπτώσεις, όπως

είναι η μείωση της δραστηριότητας των μικροβίων και των γαιοσκωλήκων και η επακόλουθη απώλεια της γονιμότητας.

Ο ρόλος των γαιοσκωλήκων στο έδαφος είναι σπουδαίος καθώς βοηθούν στη μείωση των παθογόνων των φυτών που βρίσκονται στο έδαφος μέσω της πέψης τους (Makeschin 1997). Επομένως η μείωση των πληθυσμών των γαιοσκωλήκων μειώνει την υγεία του εδάφους.

1.6.5.3 Επιπτώσεις του χαλκού στον άνθρωπο

Ο χαλκός είναι απαραίτητος για την καλή υγεία του ανθρώπου.

Ο άνθρωπος μπορεί να εκτεθεί στο χαλκό με την αναπνοή, το φαγητό, ή πίνοντας, ή με την επαφή με το δέρμα. Εάν είστε εκτεθειμένοι σε χαλκό, πολλοί παράγοντες θα καθορίσουν αν θα ζημιωθείτε. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τη δόση (ποσότητα), την διάρκεια (πόσο καιρό), και πώς θα γίνει η επαφή με τον χαλκό.

Η ευρωπαϊκή νομοθεσία έχει ορίσει τη ορθή χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών και επίσης έχει αναρτήσει τα όρια ημερήσιας πρόσληψης. Ωστόσο, η έκθεση σε υψηλότερες δόσεις μπορεί να είναι επιβλαβής.

Μακροπρόθεσμα έκθεση στη σκόνη χαλκού μπορεί να ερεθίσει τη μύτη σας, το στόμα και τα μάτια, και να προκαλέσει πονοκεφάλους, ζάλη, ναυτία και διάρροια. Αν πίνετε νερό που περιέχει υψηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα χαλκού, ενδέχεται να αντιμετωπίσετε ναυτία, εμετό, κράμπες στο στομάχι, ή διάρροια. Η σκόπιμη υψηλή πρόσληψη του χαλκού μπορεί να προκαλέσει ηπατική και νεφρική βλάβη, ακόμα και θάνατο.

1.7 Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η προστατευτική δράση των νανοσωματιδίων χαλκού. Συγκεκριμένα, από φυτοδοχεία με φυτά φασολιού έγινε λήψη φύλλων, τα οποία ψεκάστηκαν με νανοσωματίδια χαλκού και μετά το πέρας 24 ωρών εφαρμόστηκε το βακτήριο *Pseudomonas*. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις προκειμένου να διαπιστωθεί πόσο αναπτύχθηκε το βακτήριο αλλά και μετρήσεις που αφορούσαν φυσιολογικές παραμέτρους. Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν ναδειχθεί η φυτοπροστατευτική δράση των CuNPs έναντι φυτοπαθογόνων βακτηρίων της φυλλόσφαιρας καθώς και η διερεύνηση τυχόν δυσμενών επιπτώσεων στα φυτά που εφαρμόζονται..

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν φυτά του γένους *Phaseolus vulgaris* (φασολιά) το οποίο είναι ποώδες δικοτυλήδονο φυτό. Ανήκει στο γένος *Φασόλιος* (*Phaseolus*), που υπάγεται στην υποοικογένεια των ψυχανθών και στην οικογένεια των χεδρωπών. Κατάγεται από τη Νότια Αμερική και απαντάται σε αρκετές ποικιλίες. Είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στο κρύο και καταστρέφεται εύκολα σε θερμοκρασίες κάτω του μηδενός. Προσβάλλεται από μύκητες, ιούς και βακτήρια, όπως επίσης και από ζωικά παράσιτα (μελίγκρα, βρούχος).

Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι φασολιού οι οποίοι φυτεύτηκαν σε φυτοδοχεία. Τα φυτά αυτά διατηρήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης και μετά το πέρας 15 περίπου ημερών ψεκάστηκαν με τα νανοσωματίδια χαλκού και στη συνέχεια με το βακτήριο *Pseudomonas*.

2.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Nutrient agar Glykerin (NAG) + Rifampicin

Για την απομόνωση και τη διατήρηση των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα NAG με τα εξής συστατικά:

- peptone proteoze No 3 (20gr)
- glykezole (10ml)
- K₂HPO₄ (1.5gr)
- MgSO₄ H₂O (1.5gr)
- Bacto-agar (15gr)
- D.D H₂O (1lt)

Όλα τα παραπάνω, εκτός από το άγαρ, τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 2lt όπου αναδεύονται. Το άγαρ προστίθεται μετά τη διαλυτοποίηση των υπόλοιπων συστατικών και ακολουθεί αποστείρωση (121°C, 20 λεπτά). Έπειτα, η κωνική φιάλη που περιέχει το υπόστρωμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 48-50°C για να μειωθεί η θερμοκρασία του και στη συνέχεια προστίθεται 1 ml natamycin (300 mg / 10 ml CH₃OH) για να αποκλειστεί η ανάπτυξη μυκήτων. Τέλος, υπό ασηπτικές συνθήκες το υπόστρωμα τοποθετείται σε τρυβλία petri, τα οποία παραμένουν για διάστημα 48 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ώστε το υπόστρωμα να στερεοποιηθεί και να ελεγχθεί για τυχόν επιμολύνσεις. Στο υπόστρωμα προστίθενται 5 ml διαλύματος του αντιβιοτικού Rifampicin (20 mg Rifampicin / 1 ml H) προτού το υπόστρωμα τοποθετηθεί στα τρυβλία.

Η προσθήκη του αντιβιοτικού Rifampicin στο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη σημασμένων-ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων.

Nutrient Broth (NB)

Πρόκειται για υγρό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για ανάπτυξη βακτηρίων. Τα συστατικά του είναι:

- 3,3 gr bacto peptone
- 2,7 gr nutrient broth
- 2 gr yeast extract
- 25 ml glycerol
- 1 lt ddH₂O

Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση των συστατικών με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, το μίγμα τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με τη βοήθεια ρυθμιζόμενης χειροκίνητης αντλίας. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκαν 10 ml υγρού υποστρώματος και οι δοκιμαστικοί σωλήνες σφραγίζονταν. Ακολούθησε αποστείρωση (121 °C, 20 min).

Wasting buffer for dilution plating (Μπάφερ, διάλυμα για αραιώσεις)

- 17,5 gr K₂HPO₄
- 12,5 gr KH₂PO₄
- 2 lt b.b (απεσταγμένο) H₂O

Σε 1lt απεσταγμένου νερού, το οποίο αναδεύεται με μαγνήτη, διαλύονται τα υλικά. Η ανάδευση συνεχίζεται μέχρι να διαλυθούν όλα τα υλικά καλά και στη συνέχεια προστίθεται το υπόλοιπο H₂O (1 lt).

- 100 ml 0,1 M phosphate
- 900 ml H₂O DD

Αναδεύονται σε ένα ποτήρι και στη συνέχεια μπαίνουν σε σωληνάκια 9 ml από το διάλυμα (0,01 M Phosphate)

Τα σωληνάκια αποστειρώνονται στους 121 °C επί 20 λεπτά. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στο παγόλουτρο στους -10 °C για μισή ώρα.

3. Εφαρμογή νανοσωματιδίων χαλκού

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια χαλκού (CuNPs), 40nm. Τα νανοσωματίδια διαλύθηκαν σε H₂O και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ψεκασμός στα φύλλα του φασιολιού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Προκειμένου να μελετηθεί η προστατευτική δράση των CuNPs τα νανοσωματίδια ψεκάστηκαν 24 ώρες πριν την εφαρμογή του βακτηρίου. Μετά το πέρασμα 24 ωρών πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas*.



Εικόνα 1



Εικόνα 2

Αφού τα φυτά επιμολύνθηκαν με το βακτήριο πραγματοποιήθηκε λήψη φύλλων, τα οποία μεταφέρθηκαν σε buffer. Έπειτα ακολούθησε sonication για 15 λεπτά, έτσι ώστε να αποδεσμευτούν τα βακτήρια από τα φύλλα, και vortex. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων, προκειμένου να υπάρχουν αποτελέσματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, και επίστρωση σε άγαρ ώστε να ελεγχθεί ο βακτηριακός πληθυσμός. Τέλος, μετρήθηκαν οι βακτηριακές αποικίες.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 4 δειγματοληψίες φύλλων και οι μετρήσεις του βακτηριακού πληθυσμού έγιναν σε διάστημα 0h, 24h, 48h και 96h.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φυσιολογικών παραμέτρων. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε ο δείκτης περιεχομένου χλωροφύλλης (CCI), η καθαρή φωτοσύνθεση (ενσωμάτωση άνθρακα σε οργανική ουσία), η φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα, καθώς και το ύψος των φυτών προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα νανοσωματίδια χαλκού εμφανίζουν δυσμενή επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών.

3.1 Μετρήσεις

Οι μετρήσεις αυτές έγιναν με σκοπό τη μελέτη της δράσης των νανοσωματιδίων χαλκού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις καθώς και της επίδρασης των νανοσωματιδίων στην ανάπτυξη του φυτού.

Τα αποτελέσματα προέκυψαν ύστερα από στατιστική ανάλυση.

3.1.1 Μέτρηση της ζώνης αναστολής των νανοσωματιδίων χαλκού στο *P. Syringae* (ποιοτική μέτρηση)

Η μέτρηση της ζώνης αναστολής πραγματοποιείται προκειμένου να ελέγξουμε ποιοτικά την αντιβακτηριακή δράση των νανοσωματιδίων χαλκού. Η ζώνη αναστολής δημιουργείται με διάχυση της ουσίας (πχ. νανοσωματίδια χαλκού) στο θρεπτικό υλικό, το οποίο έχει ενοφθαλμιστεί το εξεταζόμενο μικρόβιο, από περιοχή μεγαλύτερης πυκνότητας σε περιοχή μικρότερης πυκνότητας.

Δοκιμάστηκαν δύο συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων χαλκού (10, 100 µg/ml).

Πίνακας 2. Ζώνη αναστολής των CuNPs στο *P. Syringae*

Sample	<i>Pseudomonas syringae</i> B728a (cm)	
	10 µg/ml	100 µg/ml
Cu@TWEEN20	1.2	2.3
Kocide 2000 (1000µg/ml)	3	



3.2 Μετρήσεις φυσιολογικών παραμέτρων

Οι φυσιολογικές παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν ο δείκτης περιεχομένου χλωροφύλλης (CCI), η καθαρή φωτοσύνθεση (ενσωμάτωση άνθρακα σε οργανική ουσία), η φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα, καθώς και το ύψος των φυτών.

3.2.1 Δείκτης περιεχομένου χλωροφύλλης (CCI)

Η φωτοσυνθετική λειτουργία γίνεται μέσα σε ειδικά οργανίδια, τους χλωροπλάστες. Οι εσωτερικές μεμβράνες των χλωροπλαστών αναδιπλώνονται και δημιουργούν πεπλατυσμένα σακκίδια που ονομάζονται θυλακοειδή. Οι φωτοσυνθετικές μονάδες βρίσκονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών και αποτελούνται από πρωτεΐνες και φωτοσυνθετικές χρωστικές, οργανωμένες σε σύμπλοκα χρωστικών-πρωτεϊνών.

Οι μέθοδοι μέτρησης της χλωροφύλλης μπορούν να διαχωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες, στις 'καταστρεπτικές' μεθόδους και στις μη 'καταστρεπτικές'. Στην πρώτη κατηγορία το δείγμα στο οποίο θα μετρηθεί η χλωροφύλλη καταστρέφεται και ακολουθεί εκχύλιση και φωτομέτρηση στο φασματοφωτόμετρο, ενώ στις μη καταστρεπτικές μεθόδους οι μετρήσεις γίνονται κατευθείαν στο φυτό χωρίς να αποκοπούν τα φύλλα. Στο συγκεκριμένο πείραμα εφαρμόστηκε μη καταστρεπτική μέθοδος με τη χρήση της φορητής συσκευής μέτρησης χλωροφύλλης CCM-200. Το περιεχόμενο της χλωροφύλλης αποτελεί ένα καλό δείκτη της κατάστασης και της ζωτικότητας του φυτού. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση των νανοσωματιδίων χαλκού. Οι μετρήσεις πάρθηκαν από το άνω μέρος των πιο εύρωστων φύλλων.



Εικόνα 3. Φορητή συσκευή μέτρησης χλωροφύλλης CCM-200

3.2.2 Φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα

Κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης τα μόρια της χλωροφύλλης απορροφούν φωτόνια με αποτέλεσμα να διεγείρονται τα ηλεκτρόνια και να μεταφέρονται σε εξωτερική ηλεκτρονική στοιβάδα. Καθώς αποδιεγείρονται τα ηλεκτρόνια από το υψηλό ενεργειακό επίπεδο (S1) σε χαμηλό (S0) εκπέμπουν ακτινοβολία, η οποία ονομάζεται φθορισμός. Όταν η διοχετευόμενη φωτονιακή ενέργεια χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στη φωτοχημική διαδικασία της φωτοσύνθεσης παρατηρείται μειωμένο φθορισμό.

Το όργανο μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε λαμβάνει μετρήσεις της μεταβολής του φθορισμού, και υπολογίζει τη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα:

$$\text{Φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα} = (F_m - F) / F_m$$

Όπου, F_m η μέγιστη τιμή φθορισμού κατά τη διάρκεια εφαρμογής παλμού κορεσμένου φωτός

F , η τιμή φθορισμού που μετρείται αρχικά.

Με βάση την παραπάνω εξίσωση προκύπτει ότι όσο μεγαλύτερη επίδραση έχουν τα νανοσωματίδια στο φυτό τόσο μικρότερη θα είναι η φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα.



Εικόνα 4. Όργανο μέτρησης φωτοσυνθετικής αποτελεσματικότητας

3.2.3 Καθαρή φωτοσύνθεση – Ενσωμάτωση άνθρακα σε οργανική ουσία

Ως καθαρή φωτοσύνθεση ορίζουμε το ποσό του CO_2 που μένει όταν αφαιρεθεί από το ολικό προϊόν της φωτοσύνθεσης το προϊόν που καταναλώθηκε από τη μιτοχονδριακή αναπνοή και τη φωτοαναπνοή. Με άλλα λόγια, καθαρή φωτοσύνθεση είναι το ποσοστό του άνθρακα που δεσμεύτηκε μείον το διοξείδιο του άνθρακα που αποβάλλεται κατά την αναπνοή.

Το όργανο μέτρησης LI-6200 που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από ένα κλειστό θάλαμο, έναν αναλυτή αερίων και μια κονσόλα χειρισμών. Ο θάλαμος στον οποίο εγκλωβίζεται το φύλλο είναι αδιαπέραστος στην εισροή και εκροή αέρα και περιλαμβάνει αισθητήρες προσδιορισμού θερμοκρασίας και υγρασίας φύλλου. Κατά την τοποθέτηση του φύλλου στο θάλαμο καταγράφεται η μεταβολή της συγκέντρωσης CO_2 για μικρό χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια, γίνεται υπολογισμός της καθαρής φωτοσύνθεσης, ως συγκέντρωση CO_2 που ενσωματώνεται

στην οργανική ουσία ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Παράλληλα υπολογίζεται ο ρυθμός διαπνοής άρα και η στοματική αγωγιμότητα.



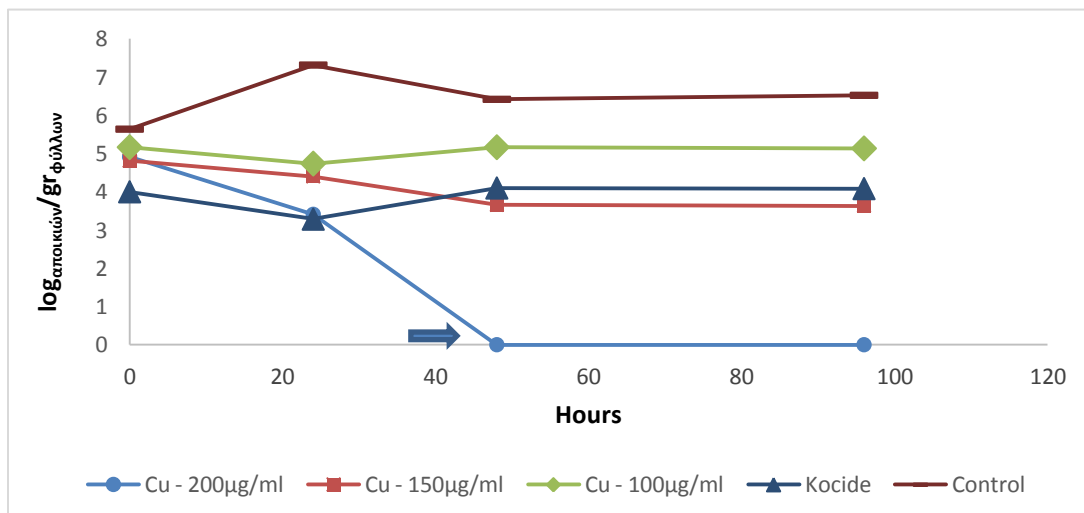
Εικόνα 5. Όργανο μέτρησης του ρυθμού καθαρής φωτοσύνθεσης LI-6200

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.3.1 Αντιβακτηριακή δράση των νανοσωματιδίων χαλκού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

Όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα, τα νανοσωματίδια χαλκού εμφανίζουν βακτηριοκτόνο δράση στην μεγαλύτερη συγκέντρωση εφαρμογής $200\mu\text{g}/\text{ml}$. Η συγκέντρωση του βακτηρίου είναι μηδενική ακόμα και μετά το πέρας 96h. Αυτό σημαίνει ότι μειώνεται σημαντικά η πιθανότητα επανάπτυξης του βακτηρίου. Αντίθετα, στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις η δράση τους είναι βακτηριοστατική, πάντα όμως χαμηλότερη από αυτή του χημικού μάρτυρα Kocide 2000 ($1000\mu\text{g}/\text{ml}$).

Διάγραμμα. Δράση των νανοσωματιδίων χαλκού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις



3.3.2 Μετρήσεις στα φύλλα των φυτών

Σύμφωνα με μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα φύλλα των φυτών παρατηρήθηκε ότι τα νανοσωματίδια χαλκού δεν έχουν καμία αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3, δεν έχει επηρεαστεί καμία λειτουργία των φασολιών. Ούτε η περιεκτικότητα της χλωροφύλλης, ούτε η αφομοίωση CO₂. Το ίδιο παρατηρείται και με την κβαντική απόδοση. Όσον αφορά το ύψος του φυτού παρατηρήθηκε μια μεγαλύτερη ανάπτυξη στη δόση των 150 µg/ml. Ωστόσο, χρειάζονται επιπλέον μελέτες προκειμένου να διαπιστωθεί γιατί συνέβη αυτό.

Τέλος, όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3 τα νανοσωματίδια χαλκού εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα σε μικρότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με το φυτοφάρμακο Kocide2000.

Πίνακας 3. Μετρήσεις στα φύλλα

Treatment	Chlorophyll content index	Quantum Yield	CO ₂ assimilation	Plant height increase
Control - Bacteria	22.3±1.70 ^d	0.7±0.01	5.04±0.47	1.8±0.19
Control - H ₂ O	19.6±0.57	0.7±0.01	4.82±0.29	1.5±0.19
Cu -200µg/ml	22.5±3.12	0.7±0.01	4.55±0.37	2.7±0.33
Cu -150µg/ml	22.0±2.08	0.7±0.01	4.11±0.21	4.3±0.23
Cu -100µg/ml	22.5±2.29	0.7±0.01	4.34±0.67	1.5±0.23
Kocide2000	16.2±0.64	0.7±0.01	4.10±0.32	2.2±0.16

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΜΑΤΑ

Τόσο το περιβάλλον όσο και η ανθρώπινη υγεία έχουν δεχτεί ιδιαίτερη επιβάρυνση από την χρήση χημικών λιπασμάτων, ζιζανιοκτόνων και λοιπών γεωργικών φαρμάκων, τα οποία χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες. Επιπλέον πολλές από τα συμβατικές τεχνικές αντιμετώπισης των φυτοπαθογόνων βακτηρίων είναι ακριβές ενώ άλλες χρονοβόρες. Για αυτούς τους λόγους γίνονται τα τελευταία χρόνια προσπάθειες ανάπτυξης εναλλακτικών τεχνικών. Μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος είναι η χρήση νανοσωματιδίων.

Στην παρούσα εργασία ερευνήθηκε η προστατευτική δράση των νανοσωματιδίων χαλκού έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas* καθώς και η επίδραση που έχει στα φύλλα του φυτού φασολιού στα οποία εφαρμόστηκε.

Αναλυτικότερα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φυσιολογικών παραμέτρων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο δείκτης περιεχομένου της χλωροφύλλης (CCI), η καθαρή φωτοσύνθεση, η φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα καθώς και το ύψος των φυτών προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα νανοσωματίδια χαλκού είναι τοξικά για τα φυτά.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρατηρήθηκε ότι τα νανοσωματίδια δεν προκαλούν αλλαγές στην ανάπτυξη του φυτού. Δηλαδή δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα των νανοσωματιδίων και πρόκληση βλαβών στα φυτά.

Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι τα νανοσωματίδια χαλκού εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε μικρότερες συγκεντρώσεις από το χημικό μάρτυρα Kocide 2000.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα νανοσωματίδια χαλκού θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία εναλλακτική λύση στην αντιμετώπιση ασθενειών οι οποίες προκαλούνται από βακτήρια. Η χρήση της νανοτεχνολογίας στον κλάδο της γεωργίας θα μπορούσε να αποδειχτεί εξαιρετικά επωφελής. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη σημαντικά μειωμένη χρήση δραστικών ουσιών αλλά και στην αυξημένη αποτελεσματικότητα που παρουσιάζουν αυτά τα προϊόντα στην θρέψη και αποτελεσματική αντιμετώπιση πολλών ασθενειών των φυτών. Συνεπώς, το έδαφος δεν θα επιβαρύνεται με παραπάνω ποσότητες χημικών φαρμάκων, τα οποία μεταξύ άλλων είναι και επιβλαβή για την υγεία του ανθρώπου.

Ωστόσο, είναι απαραίτητο να γίνουν και άλλες μελέτες σχετικά με την χρήση των νανοσωματιδίων χαλκού ως φυτοπροστατευτικό μέσο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Young, J. M. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* van Hall 1902. *Ann. Appl. Biol.* 118, 283–298 (1991).
- Hirano, S. S. & Upper, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 624–653 (2000).
- Bull, C. T. *et al.* Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007. *J. Plant Pathol.* 92, 551–592 (2010).
- McCann, H. C. *et al.* Genomic analysis of the Kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease. *PLoS Pathog.* 9, e1003503 (2013).
- Lindow, S. E., Arny, D. C. & Upper, C. D. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. *Plant Physiol.* 70, 1084–1089 (1982).
- Anzai, Y; Kim, H; Park, JY; Wakabayashi, H; Oyaizu, H (2000). "Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 50 (4): 1563–89.
- Kreig, N. R.; Holt, J. G., eds. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Biology*. Baltimore: Williams and Wilkins. pp. 141–99.
- Scholz-Schroeder, Brenda K.; Soule, Jonathan D.; Gross, Dennis C. (2003). "The *sypA*, *sypB*, and *sypC* Synthetase Genes Encode Twenty-Two Modules Involved in the Nonribosomal Peptide Synthesis of Syringopeptin by *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* B301D". *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 16 (4): 271–280.
- Γενικές αρχές φυτοπαθολογίας, Ν.Ε . Μαλαθράκης, 2001
- Μέτρα πρόληψης κατά εχθρών και ασθενειών, Γιώργος Παρασκευάς, 3/2013
- Γεωργόπουλος 1979. Καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών, ΑΘΗΝΑ
- Γεωργόπουλος, 1984. Βασικές γνώσεις φυτοπαθολογίας. ΑΘΗΝΑ

- Τζάμος Ελευθέριος Κ., 2007, Φυτοπαθολογία Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης
- Role of Copper in Plant Culture, <http://www.pthorticulture.com/en/training-center/role-of-copper-in-plant-culture/>
- Nutri-facts, http://www.fritind.com/pdf/COPPER_nutri.PDF
- Zeng, S.; Baillargeat, Dominique; Ho, Ho-Pui; Yong, Ken-Tye (2014). «Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications». *Chemical Society Reviews*
- Feynman Richard, *There is plenty of room at the bottom*
- Nanomaterials. European Commission. Last updated 18 October 2011
- «Safety of Manufactured Nanomaterials: About, OECD Environment Directorate». OECD.org. 18 July 2007.
- Lauterwasser, C. (18 July 2007). [<http://www.oecd.org/dataoecd/37/19/37770473.pdf> «Opportunities and risks of Nanotechnologies»]. OECD.org.