



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
UNIVERSITY  
OF THESSALY



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Μελέτη του μεταβολισμού του μυκητοκτόνου iprodione από  
βακτήρια που προέρχονται από την φυλλόσφαιρα και τη ριζόσφαιρα  
φυτών πιπεριάς

Study of the metabolism of the fungicide iprodione by bacteria  
derived from the phyllosphere and the rhizosphere of pepper plants

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΜΕΛΙΝΑ ΣΑΠΟΥΝΤΖΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Καρπούζας Δ. (επιβλέπων), Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, ΤΒΒ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου Κ. (μέλος), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, ΤΒΒ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Καράς Π.(μέλος), Ακαδημαϊκός Υπότροφος , ΤΒΒ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας κ. Δημήτριο Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, και τις ουσιώδεις συμβουλές που μου παρείχε σε όλο αυτό το διάστημα της πειραματικής διαδικασίας καθώς και της συγγραφής της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου και το μεταδιδακτορικό ερευνητή Παναγίωτη Καρά για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Αθανασία Κατσούλα για την μεγάλη της βοήθεια στην εκμάθηση και οργάνωση των πειραματικών διαδικασιών, όπως επίσης και για την υπομονή της για όλη την περίοδο του πειράματος. Τέλος ευχαριστώ και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε, τη βοήθεια που μου προσέφεραν καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT .....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	7
1.1.Γεωργικά φάρμακα.....	7
1.2. Μυκητοκτόνα .....	8
1.3 Iprodione .....	9
1.4 Μικροοργανισμοί που διασπούν iprodione .....	10
1.5 Σκοπός .....	11
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	12
2.1 Μικροοργανισμοί και Θρεπτικά Μέσα.....	12
2.2 Χρωματογραφικός προσδιορισμός των συγκεντρώσεων του iprodione και των προϊόντων μεταβολισμού.....	14
2.3 Ανάλυση της κινητικής αποδόμησης του Iprodione.....	14
2.4 Προσδιορισμός της αφθονίας των στελεχών του <i>Paenarthrobacter</i> σε υγρές καλλιέργειες .....	15
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	18
3.1 Αποδόμηση και μεταβολισμός του iprodione από το βακτήριο <i>Paenarthrobacter</i> sp. ....	18
3.2. Αύξηση και ανάπτυξη των στελεχών <i>Paenarthrobacter</i> sp. κατά την πορεία αποδόμησης του iprodione .....	23
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	26
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	28

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν σημαντικό κομμάτι της σύγχρονης γεωργίας. Η συχνή χρήση τους μπορεί να οδηγήσει στην ρύπανση του περιβάλλοντος από την μια μεριά αλλά και στην ταχύτατη αποδόμηση τους από την άλλη μεριά. Το φαινόμενο αυτό έχει ονομαστεί επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση και έχει καταγραφεί για σημαντικό αριθμό γεωργικών φαρμάκων συμπεριλαμβανομένου και του μυκητοκτόνου iprodione. Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος οδήγησαν στην απομόνωση 3 βακτηριακών στελεχών (TA1.6, TA1.8 & LP13.7) από την ριζόσφαιρα και την φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς που είχαν δεχτεί επαναλαμβανόμενες εφαρμογές iprodione. Τα συγκεκριμένα στελέχη είχαν την ικανότητα να αποδομούν ταχύτατα το iprodione και ταυτοποιήθηκαν όλα μέσω αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA ως *Paenarthrobacter* sp.. Στη παρούσα διατριβή μελετήθηκε το μεταβολικό μονοπάτι αποδόμησης του μυκητοκτόνου iprodione από τα βακτηριακά στελέχη ενώ παράλληλα αξιολογήθηκε εάν τα 3 βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται κατά την πορεία αποδόμησης του iprodione χρησιμοποιώντας πιθανότατα παρα-προϊόντα που παράγονται από τον μεταβολισμό του μυκητοκτόνου ως πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους. Και τα τρία στελέχη αποδόμησαν ταχύτατα το iprodione με τιμές DT50 που κυμάνθηκαν από 15.2 ως 21.8 ώρες. Η αποδόμηση του iprodione σε όλες τις περιπτώσεις συνοδεύτηκε από την παραγωγή των ενδιάμεσων προϊόντων 3,5-dichlorophenyl-carboxiamide (metabolite I) και 3,5-dichlorophenylurea-acetate (metabolite II). Το τελευταίο στην συνέχεια μετατράπηκε σε 3,5-Dichloroaniline που διασπάστηκε περαιτέρω, αλλά όχι πλήρως, με αργούς ρυθμούς. Η αποδόμηση του iprodione συνοδεύτηκε από αύξηση της βακτηριακής βιομάζας όπως αυτή προσδιορίστηκε μέσω q-PCR ενίσχυσης του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι τα στελέχη *Paenarthrobacter* TA1.6, TA1.8 και LP13.7 έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν το iprodione ή προϊόντα που ελευθερώνονται στα διάφορα βήματα αποδόμησης του (isopropylamine και glycine) ως πηγή C και N για την αύξηση και ανάπτυξη του. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στον εντοπισμό του γενετικού οπλισμού των στελεχών *Paenarthrobacter* sp. που εμπλέκεται στην αποδόμηση του iprodione..

Λέξεις κλειδιά: γεωργικά φάρμακα, μυκητοκτόνο, iprodione, βακτήρια, αφθονία, αποδόμηση

## **ABSTRACT**

Pesticides constitute a major part of modern agriculture. Their frequent use on the one hand result in extensive contamination of natural resources but on the other hand could lead to their rapid biodegradation. This phenomenon is called enhanced biodegradation and has been reported for several pesticides including the fungicide iprodione. Recent studies in the Laboratory of Plant and Environmental Biotechnology led to the isolation of 3 bacterial strains (TA1.6, TA1.8 & LP13.7) from the rhizosphere and phyllosphere of pepper plants which had received repeated applications of iprodione. The specific strains had the capacity to degrade iprodione and they were all molecularly identified via sequencing of their 16S rRNA gene as members of the genus *Paenarthrobacter* sp. In the current thesis we studied the metabolic pathway of the fungicide iprodione by the three bacterial strains. In parallel we examined if the studied bacterial strains were able to grow on the pesticide or by-products released during the transformation of the parent compound when this is provided as a C and N or as just a N source. All three strains degraded rapidly iprodione with DT50 values ranging from 15.2 to 21.8 h. The transformation of iprodione proceeded with the intermediate formation of 3,5-dichlorophenyl-carboxiamide (metabolite I) and 3,5-dichlorophenylurea-acetate (metabolite II). The latter was further transformed to 3,5-dichloroaniline which degraded further at a slower rate. The degradation of iprodione was accompanied by the proliferation and growth of all three bacteria as shown by measurement of the copy numbers of the 16S rRNA gene of the strains along the degradation of iprodione. All these results dictate that strains *Paenarthrobacter* TA1.6, TA1.8 and LP13.7 have the capacity to utilize

iprodone or its transformation products which are released at the different transformation steps (isopropylamine and glycine) as growth substrates for the growth. Further studies will look into the genetic mechanism driving the transformation of iprodione by the three Paenarthrobacter strains.

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1. Γεωργικά Φάρμακα**

Γεωργικά φάρμακα ονομάζονται χημικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να θανατώσουν, να παρεμποδίσουν ή να επιβραδύνουν την ανάπτυξη οργανισμών, που μπορεί να είναι επιβλαβή για τις αγροτικές καλλιέργειες. Χρησιμοποιούνται κυρίως στη σύγχρονη γεωργία με απώτερο σκοπό την αύξηση της παραγωγικότητας και της απόδοσης των καλλιεργούμενων φυτών, στη βελτίωση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων, στην οικονομικότερη καλλιέργεια άρα και στην οικονομία του καταναλωτή, στη μείωση των απωλειών στα γεωργικά προϊόντα και στην διασφάλιση της επάρκειας τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα (Aktar et al, 2009, Taube et al., 2002, Παπαδοπούλου, 2013). Τα γεωργικά φάρμακα έχουν διάφορους τρόπους εφαρμογής. Μπορεί να γίνει υπέργειος ψεκασμός οργάνων των φυτών, επικάλυψη και προστασία των σπόρων και άλλων πολλαπλασιαστικών οργάνων (Van der Werf , 1996) αλλά σε όλες τις περιπτώσεις το μεγαλύτερο ποσοστό των γεωργικών φαρμάκων που εφαρμόζονται καταλήγουν στο έδαφος (Braschil. et al, 2011). Εκεί οι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να αποδομήσουν τα γεωργικά φάρμακα και να χρησιμοποιήσουν τα προϊόντα ως πηγή ενέργειας διευκολύνοντας την ταχεία απομάκρυνσή τους από το έδαφος και εμποδίζοντας τη διασπορά τους στο περιβάλλον (Karpouzas et al., 2016). Εναλλακτικά τα γεωργικά φάρμακα που καταλήγουν στο έδαφος εάν δεν αποδομηθούν μπορεί να έχουν ανεπιθύμητες επιδράσεις σε οργανισμούς μη-στοχούς συμπεριλαμβανομένων των μικροοργανισμών του εδάφους, όπως παρεμπόδιση των λειτουργιών τους (Puglisi et al., 2012) και μείωση ποικιλότητας (Feld et al 2015).

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν μια ομάδα οργανικών ρύπων στους οποίους εκτίθενται συστηματικά οι μικροοργανισμοί της φυλλόσφαιρας καλλιεργούμενων φυτών. Οι αλληλεπιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων με τους μικροοργανισμούς

τους εδάφους έχουν μελετηθεί επισταμένως (Bending *et al.*, 2007; Karpouzas *et al.*, 2014). Σε αρκετές περιπτώσεις η εκτεταμένη έκθεση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους σε γεωργικά φάρμακα έχει οδηγήσει στην επικράτηση μικροοργανισμών που έχουν αναπτύξει νέες καταβολικές ικανότητες ώστε να μεταβολίζουν ταχύτατα τα γεωργικά φάρμακα (Cheyins *et al.*, 2012; Rousidou *et al.*, 2017). Σε άλλες περιπτώσεις παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ποικιλότητας και της λειτουργίας σημαντικών μικροβιακών ομάδων (Feld *et al.*, 2015). Σειρά μελετών από τους Zhang *et al.* (2008; 2009; 2009b) και Gu *et al.*, (2010), έδειξαν ότι η εφαρμογή cypermethrin, abamectin, *Bacillus thuringiensis* και enostroburin στην φυλλόσφαιρα καλλιεργούμενων φυτών οδήγησαν σε μεταβολές στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας. Επίσης έχει βρεθεί ότι η εφαρμογή των metalaxyl και imidachlorpid δεν επηρέασαν σημαντικά την ποικιλότητα των επίφυτων μυκήτων (Moulas *et al.*, 2013). Αντίθετα μέχρι σήμερα μόνο μια μελέτη έχει διερευνήσει την ικανότητα των επίφυτων μικροοργανισμών να αποδομούν γεωργικά φάρμακα (Ning *et al.*, 2010) χωρίς όμως να έχει μελετηθεί ο μηχανισμός προσαρμογής των μικροοργανισμών στην αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων αλλά και ο γενετικός τους οπλισμός σε σχέση με αντίστοιχους εδαφογενείς μικροοργανισμούς.

## 1.2 Μυκητοκτόνα

Τα μυκητοκτόνα είναι χημικές ενώσεις ή οργανισμοί που χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν μύκητες ή σπόρους μυκήτων ή για να αναστείλουν την ανάπτυξη τους (Haverkte *et al.*, 1969). Αποτελούν σημαντικά εργαλεία για την προστασία της σοδειάς και κατ' επέκταση και για τη γεωργία λόγω της ιδιότητας τους να ελέγχουν τους ανεπιθύμητους παθογόνους μικροοργανισμούς. Η εφαρμογή των μυκητοκτόνων μπορεί να μειώσει τη μικροβιακή βιομάζα λόγω της τοξικότητας τους, αλλά μπορεί και να την αυξήσει λαμβάνοντας υπόψιν ότι μπορούν να δράσουν ως θρεπτικά συστατικά για την αύξηση τους όπως επίσης και να σκοτώσουν τους "θηρευτές" των μικροοργανισμών της φυλλόσφαιρας και της ριζόσφαιρας (Likun Gu *et al.*, 2009).

Τα μυκητοκτόνα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα μυκητοκτόνα επαφής, τα διασυστημικά ή τα διαφυλλικά μυκητοκτόνα. Τα μυκητοκτόνα επαφής παραμένουν στην επιφάνεια και δεν απορροφούνται από τον φυτικό ιστό, άρα παρέχουν προστασία στο σημείο που εφαρμόζονται. Τα διασυστημικά μυκητοκτόνα απορροφούνται και ανακατανέμονται στο ξύλωμα. Τα διαφυλλικά εφαρμόζονται στα φύλλα και ανακατανέμονται από την πάνω στην κάτω πλευρά του φύλλου. (Miñambres *et al.*, 2010; Grabke *et al.*, 2014)

Υπολείμματα μυκητοκτόνων έχουν βρεθεί σε γεωργικά προϊόντα, κυρίως ύστερα από εφαρμογές γεωργικών φαρμάκων λίγο πριν ή μετά την συγκομιδή (Gosselin *et al.*,



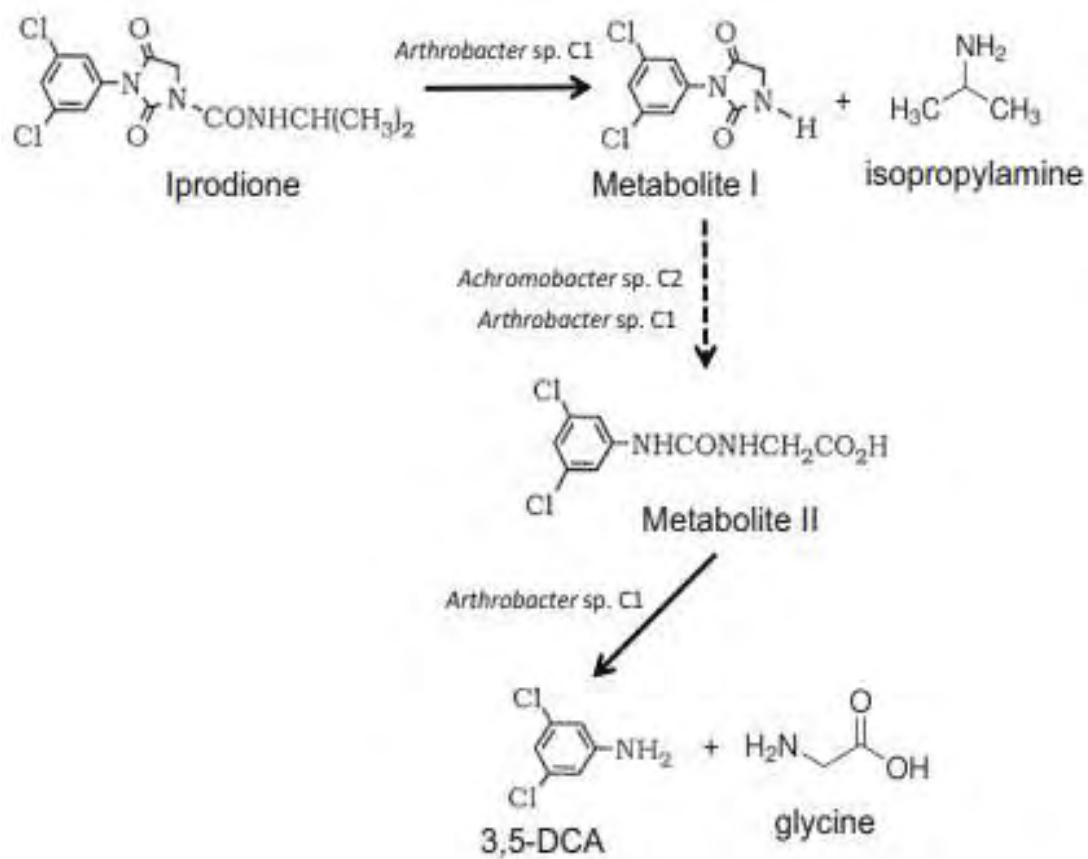
1984). Κάποια είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία, όπως το vinclozolin (Hrelia et al. 1996) και το ziram.

### 1.3. Iprodione

Το iprodione είναι ένα προστατευτικό δικαρβοξαμίδικό μυκηκτόνο, το οποίο αναστέλλει τη βλάστηση των σπορίων, των μυκήτων και γενικότερα της μυκηλιακής ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλει τη σύνθεση DNA και RNA, την κυτταρική διαίρεση και τον κυτταρικό μεταβολισμό των μυκήτων που χρησιμοποιούνται συνήθως σε μια ποικιλία θερμοκηπίου και σε καλλιέργειες πεδίου για τον έλεγχο της προσβολής από μύκητες όπως για παράδειγμα: *Botrytis cinerea*, *Alternaria* sp., *Monilinia fructigena*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Sclerotinia* sp (Cao, et al.2018). Το iprodione δρα σε όλες τις φάσεις των μυκήτων, ωστόσο μέσω του κύριου μεταβολίτη του που είναι η 3,5-διγλωροανιλίνη (3,5 DCA) μπορεί να δράσει και σε οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχους του (Mercadier C, et al., 1996).

Όσον αφορά την προσρόφηση του μυκητοκτόνου iprodione, είναι σχετικά κινητό στο έδαφος του περιβάλλοντος και μπορεί να διεισδύσει σε υπόγεια ύδατα και στην επιφάνεια του νερού, έτσι τα κατάλοιπά του έχουν ανιχνευθεί σε πολλά δείγματα περιβάλλοντος. Έχει χαρακτηριστεί ως πιθανό καρκινογόνο (EFSA 2016) και ορμονικός διαταράκτης εμφανίζοντας αντιανδρογονική δράση (Blystone et al. 2009). Επίσης εμφανίζει υψηλή οικοτοξικότητα σε υδρόβιους οργανισμούς (NOEC 34 ημέρες ψάρια: 0.26 mg a.s./l) (EFSA 2016). Ελάχιστα είναι γνωστά για την επίδραση του iprodione στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι υψηλές συγκεντρώσεις iprodione προκάλεσαν μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (PLFAs, DGGE), χωρίς όμως να διευκρινίζεται εάν οι επιδράσεις ήταν θετικές ή αρνητικές (Wang et al. 2004; Miñambres et al. 2010). Για όλους τους παραπάνω λόγους η παρουσία καταλοίπων iprodione προκαλεί σοβαρή ανησυχία.

Εικόνα 1. Μονοπάτι αποδόμησης του Iprodione έτσι όπως καταγράφηκε από τους Campos *et al.* 2015



#### 1.4 Μικροοργανισμοί που διασπών iprodione

Το iprodione ως μυκητοκτόνο, αποδομείται σε εδάφη που εμφανίζουν ουδέτερο προς αλκαλικό pH και αποδόθηκε σε συνδυασμό βιοτικών και αβιοτικών μηχανισμών. Μελέτες έδειξαν ότι σε εδάφη στα οποία είχε χρησιμοποιηθεί το iprodione, το μυκητοκτόνο εμφάνιζε αρκετά γρήγορη αποδόμηση που οδηγούσε σε απώλεια της μυκητοκτόνου δράσης του (Entwistle *et al.*, 1986), φαινόμενο που ονομάστηκε επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση και αποδίδεται στην επικράτηση στο έδαφος βακτηρίων που χρησιμοποιούν το iprodione ή τα προϊόντα μεταβολισμού του ως πηγές ενέργειας (Martin *et al.*, 1990; Mitchell & Cain, 1996). Σε τέτοια εδάφη το μυκητοκτόνο υδρολύεται αρχικά σε 3,5-dichlorophenyl-carboxamide το οποίο στην συνέχεια μετατρέπεται σε 3,5-dichlorophenylurea-acetate και τελικά σε 3,5-dichloroaniline (Mercadier *et al.*, 1996) (Εικόνα 1). Οι Athiel *et al.*, (1995) απομόνωσαν ένα βακτήριο του γένους *Arthrobacter* sp., που αποδομούσε ταχύτατα το iprodione ακολουθώντας το μεταβολικό μονοπάτι που αναφέρθηκε παραπάνω. Πιο πρόσφατες μελέτες οδήγησαν στην απομόνωση, από έδαφος χωρίς πρότερη χρήση iprodione, μίας βακτηριακής κοινοπραξίας, που αποτελούνταν από ένα *Achromobacter* sp. και ένα στέλεχος που είχε την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το iprodione (Campos *et al.*, 2015). Ακόλουθες μελέτες έδειξαν ότι το *Arthrobacter* sp. ήταν υπεύθυνο για τον μεταβολισμό του iprodione ακολουθώντας το ίδιο μονοπάτι που αναφέρθηκε παραπάνω (Campos *et al.*, 2017). Σε όλες τις περιπτώσεις τα βακτήρια που απομονώθηκαν φαίνεται να χρησιμοποιούν προϊόντα που ελευθερώνονται στα διάφορα στάδια αποδόμησης του iprodione, όπως isopropylamine και glycine, ως πηγές ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους (Campos *et al.*, 2017).

## 1.5 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διασαφήνιση του μεταβολικού μονοπατιού διάσπασης του μυκητοκτόνου iprodione από μικροβιακές καλλιέργειες που απομονώθηκαν από έδαφος και φυλλόσφαιρα φυτών πιπερίας και περιέχουν στελέχη του γένους *Paenarthrobacter*. Οι μικροβιακές καλλιέργειες απομονώθηκαν από δείγματα εδάφους και φυλλόσφαιρας, που έχουν υποστεί τέσσερις διαδοχικές εφαρμογές του Iprodione και ονομάστηκαν TA1.6, TA1.8 (έδαφος) και LP13 (φυλλόσφαιρα). Η ανάλυση της αποδόμησης

του γεωργικού φαρμάκου πραγματοποιήθηκε μέσω HPLC-PDA. Παράλληλα μελετήθηκε και η ικανότητα του *Paenarthrobacter sp.* να αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του μυκητοκτόνου δείγμα της ικανότητα τους να χρησιμοποιεί το μυκητοκτόνο ή τα προϊόντα μεταβολισμού του ως πηγή C και/ή N.

## **2. Υλικά-Μέθοδοι**

### **2.1 Μικροοργανισμοί και Θρεπτικά Μέσα**

Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, οδήγησαν στην απομόνωση βακτηριακών καλλιεργειών από το έδαφος (TA1.6 , TA1.8) και από τα φύλλα (LP13.7) με την χρήση καλλιεργειών εμπλουτισμού όπως περιγράφεται από τους Campos et al., (2015).

Οι βακτηριακές καλλιέργειες που μελετήθηκαν καλλιεργήθηκαν σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MSM (Minimal Salt Medium) (Rousseaux, et al. 2001), τα συστατικά του οποίου παρουσιάζονται παρακάτω στον Πίνακα 1. Παράλληλα η καλλιέργεια LP13.7 εμβολιάστηκε επίσης και στο θρεπτικό μέσο MSM+SC (Κιτρικό Νάτριο ως πηγή άνθρακα). Στα θρεπτικά μέσα MSM και MSM+SC το iprodione (10 mg/l) αποτελούσε την μοναδική πηγή C. Για κάθε συνδυασμό θρεπτικού μέσου και βακτηριακής καλλιέργειας προετοιμάστηκαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Επίσης προετοιμάστηκαν και δύο βιολογικές επαναλήψεις από κάθε θρεπτικό μέσο (MSM & MSM+SC) οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν με βακτήρια και αποτέλεσαν τους μάρτυρες για την αβιοτική αποδόμηση του iprodione. Σε όλες τις περιπτώσεις τα θρεπτικά μέσα εμβολιάστηκαν με κατάλληλο όγκος φρέσκων καλλιεργειών των βακτηρίων που βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης (OD<sub>600 nm</sub> = 0.1) Η επώαση όλων των καλλιεργειών έγινε στους 28°C υπό ανάδευση στις 180 rpm (Εικόνα 2). Στη συνέχεια έλαβαν χώρα οι δειγματοληψίες όπου πάρθηκαν δείγματα από κάθε συνδυασμό θρεπτικού μέσου - βακτηρίου στις 4, 8, 12, 24, 36, 48, 69, 72, 93 & 117 ώρες. Τα

δείγματα χρησιμοποιήθηκαν (α) για τον προσδιορισμό του iprodione και των προϊόντων μεταβολισμού του σε σύστημα HPLC-PDA όπως περιγράφεται ακολούθως και (β) για την εξαγωγή DNA και τον προσδιορισμό της αφθονίας των βακτηρίων κατά την πορεία αποδόμησης του iprodione με την χρήση q-PCR όπως περιγράφεται παρακάτω.

Πίνακας 1. Πίνακας με τα συστατικά και τις αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή του θρεπτικού μέσου MSM

Συστατικά	Συγκέντρωση g/l
7MgSO <sub>4</sub> . -7H <sub>2</sub> O	5
0,1CaCl <sub>2</sub> .- 2H <sub>2</sub> O	0,1
015MnSO <sub>4</sub> .- 4H <sub>2</sub> O	0,2
0,46FeSO <sub>4</sub> . -7H <sub>2</sub> O	0,46
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22,7
NaHPO <sub>4</sub> . -12H <sub>2</sub> O	59,7
NaCl	10

Εικόνα 2. Φιαλίδια που περιέχουν τις απομονωμένες μικροβιακές συμπραξίες TA1.6 , TA1.8 & LP13.7 αντίστοιχα.



## 2.2 Χρωματογραφικός προσδιορισμός των συγκεντρώσεων του iprodione και των προϊόντων μεταβολισμού του

Ο προσδιορισμός του iprodione και των κυριότερων μεταβολικών προϊόντων του πραγματοποιήθηκε με την χρήση HPLC-PDA μοντέλο της εταιρείας UFLC SHIMADZU με ανιχνευτή φωτοδιόδων και στήλη Athena C18 120A, (4,6mm x 150mm, 5μm). Το iprodione και τα προϊόντα μεταβολισμού του εκχειλίσθηκαν από τις υγρές καλλιέργειες όπως περιγράφηκε από τους Campos et al., (2017). Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων σε σύστημα HPLC-PDA. Ο διαχωρισμός των iprodione και 3,5-DCA πραγματοποιήθηκε με κινητή φάση 70:30 Ακετονιτρίλιο:ddH<sub>2</sub>O (o/o) ενώ τα προϊόντα μεταβολισμού met I και met II αναλύθηκαν με την ίδια κινητική φάση με την μόνη διαφορά ότι το pH του ddH<sub>2</sub>O προσαρμόστηκε σε τιμή 2,6, με την προσθήκη φωσφορικού οξέος. Οι τελικές συγκεντρώσεις των Iprodione, 3,5-DCA, metI και metII προσδιορίστηκαν μέσω εξωτερικής πρότυπης καμπύλης που προετοιμάστηκε ύστερα από ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων των παραπάνω ουσιών σε μεθανόλη.

## 2.3 Ανάλυση της κινητικής αποδόμησης του iprodione

Στα δεδομένα αποδόμησης του iprodione από τις βακτηριακές καλλιέργειες έγινε προσαρμογή του μοντέλου κινητικής πρώτης τάξης για τον υπολογισμό των παραμέτρων κινητικής αποδόμησης όπως  $DT_{50}$ . Η ανάλυση έγινε στο πρόγραμμα R χρησιμοποιώντας το πακέτο κινητικής ανάλυσης *mkIn* σύμφωνα με τους Karanasios *et al.* (2010).

## 2.4 Προσδιορισμός της αφθονίας των στελεχών του *Paenarthrobacter* σε υγρές καλλιέργειες

Παράλληλα με τη δειγματοληψία για την ανάλυση της αποδόμησης και μεταβολισμού του iprodione, μελετήθηκε και η αφθονία του *Paenarthrobacter* sp. κατά την πορεία αποδόμησης του iprodione. Έτσι σε κάθε δειγματοληψία συλλέχθηκαν 2ml από κάθε δείγμα, με σκοπό την εξαγωγή DNA. Τα δείγματα αυτά φυγοκεντρήθηκαν σε μέγιστη ταχύτητα 11000 rpm για 2 λεπτά. Η βακτηριακή βιομάζα που συλλέχθηκε χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή γενωμικού DNA χρησιμοποιώντας το εμπορικό kit Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel), εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή για θετικά κατά gram βακτήρια. Το DNA προσδιορίστηκε ποσοτικά σε φθορισμόμετρο Qubit και ακολούθησε ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου με το ζεύγος εκκινητών Paen Forward (5'-ACATGAACCGGAAAGACCTG-3') και Paen Reverse (-3'TGGGATTAGCTCCACCTCAC5') μεγέθους 292 bp. Η χρήση εξειδικευμένων εκκινητών για τον προσδιορισμό της αφθονίας του βακτηρίου *Paenarthrobacter* sp. επιλέχθηκε ως βέλτιστη λύση ώστε να αποφευχθεί η ενίσχυση του 16S rRNA λοιπών βακτηρίων που είναι πιθανό να περιέχονται στην καλλιέργεια ως επιμόλυνση. Τα

προϊόντα PCR που ενισχύθηκαν καθαρίστηκαν και ακολούθησε ένθεση σε πλασμιδιακό φορέα pGEM που χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων E.Coli DH5a. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB και ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα ο οποίος αφού ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία καμπύλης αναφοράς για τον προσδιορισμό της αφθονία του *Paenarthrobacter* sp στην q-PCR. Η q-PCR πραγματοποιήθηκε σε σύστημα CFX connect Real Time, της εταιρείας BIORAD. Για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA του *Paenarthrobacter* sp. στην q-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Arthro forward και Arthro reverse όπως αναφέρονται παραπάνω, και master mix SYBR GREEN της εταιρείας KAPABiosystems. Στους Πίνακες 2 και 3 παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου του βακτηρίου *Paenarthrobacter* sp. καθώς και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες στην q-PCR.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι πίνακες με τα συστατικά και τις αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR & Q-PCR.

Πίνακας 2. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη PCR ενίσχυσης ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου του βακτηρίου *Paenarthrobacter* sp.

PCR Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
10x buffer	2,5(1x)
dNTPs	0.5 (200μM έκαστος)
63F	0,5(0,4μM)
1087R	0,5(0,4μM)
KapaTaq	0,1
DNA	1
ddH <sub>2</sub> O	19,9
Σύνολο	25



Πίνακας 3. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rRNA του βακτηρίου *Paenarthobacter* sp

Στάδια PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (sec)	Αριθμός κύκλων
Αρχική Αποδιάταξη	95	2min	
Αποδιάταξη	95	30sec	30 κύκλοι
Υβριδοποίηση	55	30sec	
Επιμήκυνση	72	20sec	
Τελική επιμήκυνση	72	10min	

Πίνακας 4. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη q-PCR ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου του βακτηρίου *Paenarthobacter* sp.

PCR Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
qPCR master mix	5
ArthroF_772	0.5 (0,4 μM)
ArthroR_973	0.5(0,4μM)
ddH2O	2.8
DNA	1(0,1 ng/μl)
Σύνολο	10

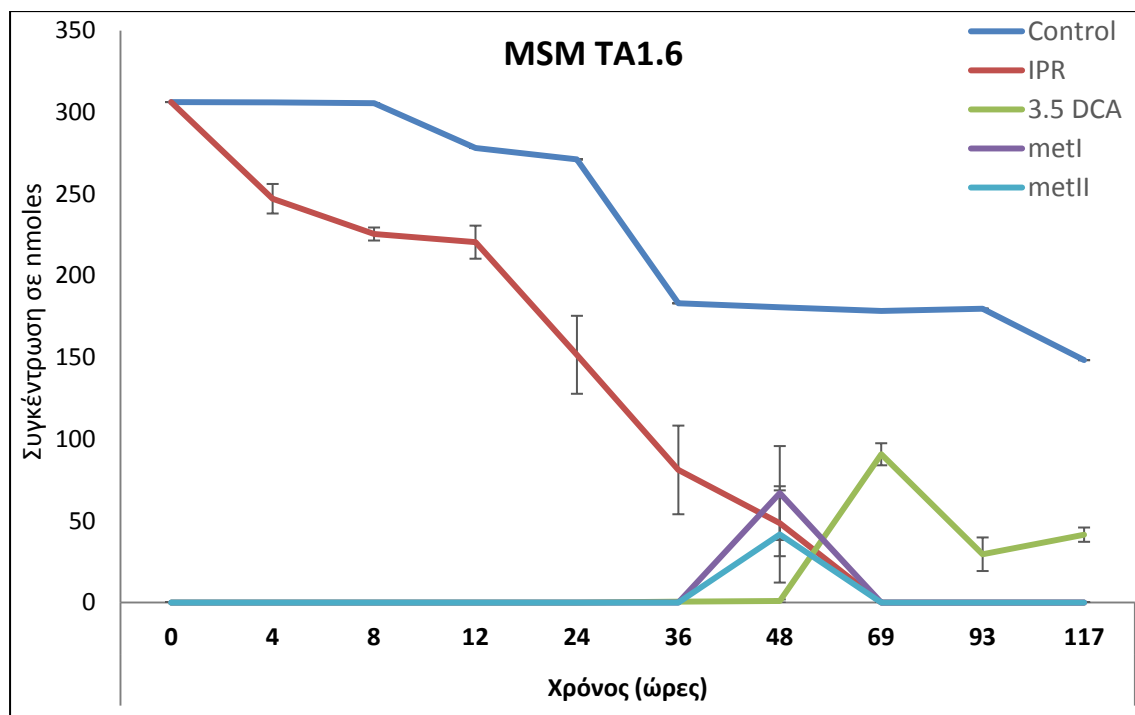
Πίνακας 5. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rRNA του βακτηρίου *Paenarthobacter* sp. και προσδιορισμό της αθφονίας του.

Στάδια PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (sec)	Αριθμός κύκλων
Αρχική Αποδιάταξη	95	3min	
Αποδιάταξη	95	10sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	55	30sec	
Επιμήκυνση	72	10sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	60	30	
	95	30	

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

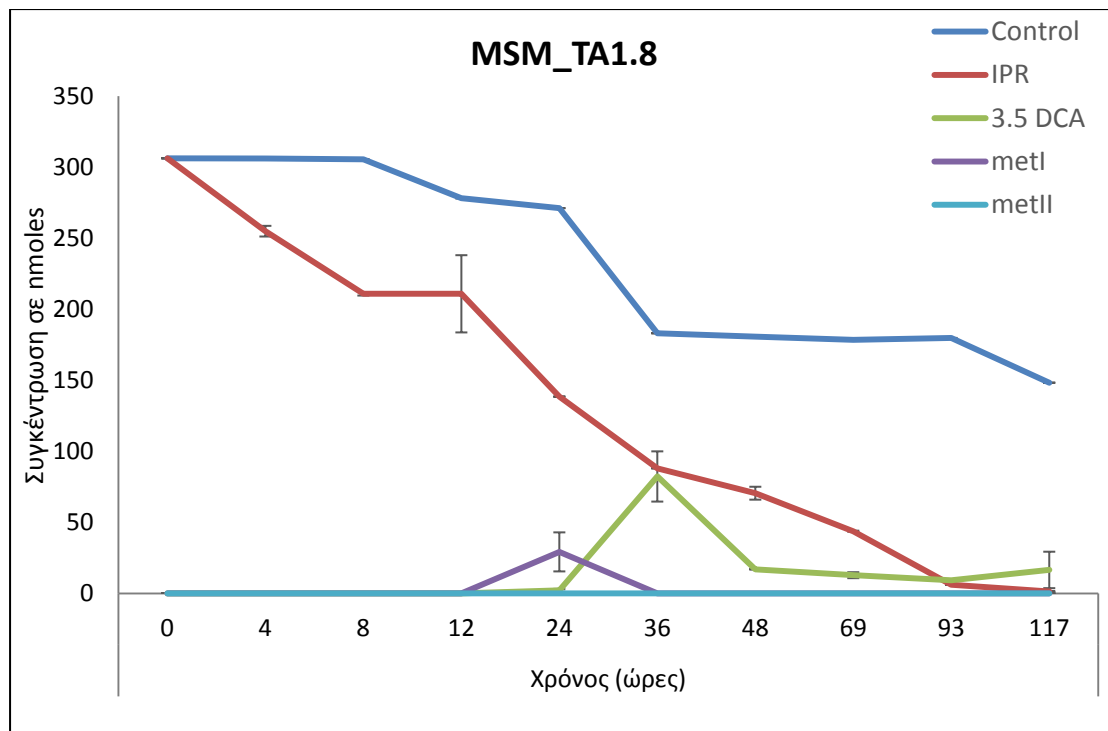
#### **3.1 Αποδόμηση και μεταβολισμός του iprodione από το βακτήριο *Raenarthrobacter* sp.**

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η αποδόμηση του iprodione και ο σχηματισμός των μεταβολικών προϊόντων met I, met II και 3,5-DCA από το βακτηριακό στέλεχος *Raenarthrobacter* sp. TA1.6, το οποίο είχε απομονωθεί από το έδαφος, σε θρεπτικό μέσο MSM. Το συγκεκριμένο στέλεχος αποδόμησε το iprodione ταχύτατα, εντός 69 ωρών. Η αποδόμηση του iprodione συνοδεύτηκε από παραγωγή των δύο ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων met I και met II τα οποία τελικά μετατράπηκαν περαιτέρω σε 3,5-DCA το οποίο αποδομήθηκε περαιτέρω αλλά όχι πλήρως στις 117 ώρες που διήρκησε το πείραμα.



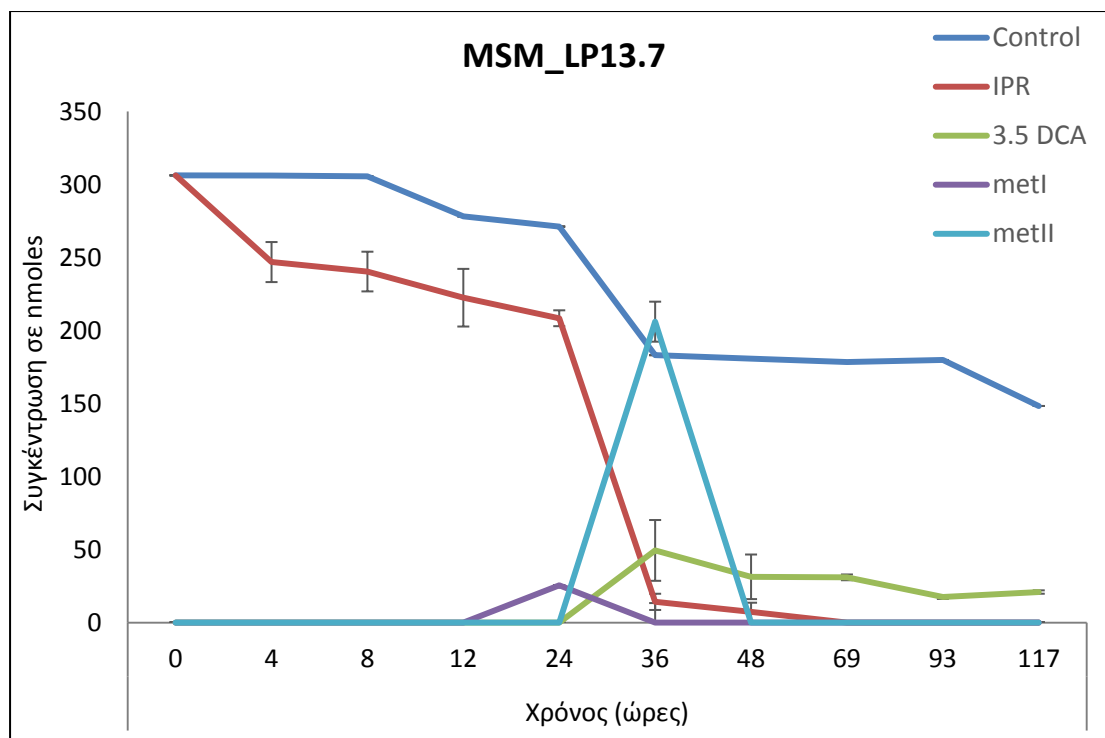
**Διάγραμμα 1.** Η αποδόμηση του iprodione και ο σχηματισμός των μεταβολικών προϊόντων metI, metII και 3,5-DCA από το βακτηριακό στέλεχος *Paenarthrobacter* sp. TA1.6 σε θρεπτικό μέσο MSM. Στο διάγραμμα περιλαμβάνεται και η αποδόμηση του iprodione σε MSM απουσία του βακτηρίου (control). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.

Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζεται η αποδόμηση του iprodione και ο σχηματισμός των μεταβολικών προϊόντων met I, met II και 3,5-DCA από το βακτηριακό στέλεχος *Paenarthrobacter* sp. TA1.8, το οποίο είχε απομονωθεί από το έδαφος, σε θρεπτικό μέσο MSM. Όπως και προηγούμενων το στέλεχος TA1.8 αποδόμησε το iprodione ταχύτατα, εντός 93 ωρών. Η αποδόμηση του iprodione συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό του ενδιάμεσου προϊόντος met I το οποίο στη συνέχεια (πιθανότατα μέσω του έτερου ενδιάμεσου προϊόντος metII το οποίο δεν ανιχνεύθηκε αυτή την φορά) μετατράπηκε σε 3,5-DCA το οποίο αποδομήθηκε περαιτέρω αλλά όχι πλήρως στις 117 ώρες που διήρκησε το πείραμα



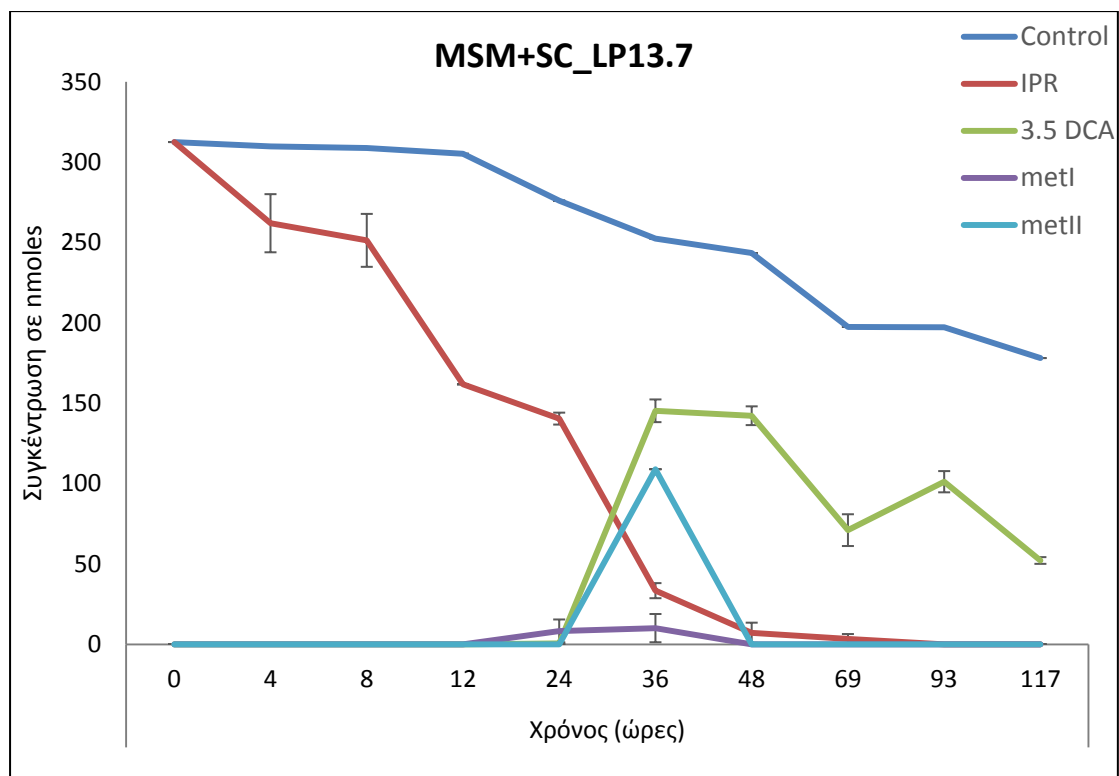
**Διάγραμμα 2.** Η αποδόμηση του iprodione και ο σχηματισμός των μεταβολικών προϊόντων metI, metII και 3,5-DCA από το βακτηριακό στέλεχος *Paenarthrobacter* sp. TA1.8 σε θρεπτικό μέσο MSM. Στο διάγραμμα περιλαμβάνεται και η αποδόμηση του iprodione σε MSM απουσία του βακτηρίου (control). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η αποδόμηση του iprodione και ο σχηματισμός των μεταβολικών προϊόντων met I, met II και 3,5-DCA από το βακτηριακό στέλεχος *Paenarthrobacter* sp. LP13.7, το οποίο είχε απομονωθεί από την φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς, σε θρεπτικό μέσο MSM. Όπως και τα προηγούμενα στελέχη, το στέλεχος LP13.7 αποδόμησε το iprodione ταχύτατα, εντός 36 ωρών. Η αποδόμηση του iprodione συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό του ενδιάμεσου προϊόντος met I το οποίο στη συνέχεια μετατράπηκε σε met II. Το τελευταίο μετατράπηκε σε 3,5-DCA το οποίο αποδομήθηκε περαιτέρω αλλά όχι πλήρως στις 117 ώρες που διήρκησε το πείραμα.



**Διάγραμμα 3.** Η αποδόμηση του iprodione και ο σχηματισμός των μεταβολικών προϊόντων metI, metII και 3,5-DCA από το βακτηριακό στέλεχος *Paenarthrobacter* sp. LP13.7 σε θρεπτικό μέσο MSM. Στο διάγραμμα περιλαμβάνεται και η αποδόμηση του iprodione σε MSM απουσία του βακτηρίου (control). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.

Στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζεται η αποδόμηση του iprodione και ο σχηματισμός των μεταβολικών προϊόντων met I, met II και 3,5-DCA από το βακτηριακό στέλεχος *Paenarthrobacter* sp. LP13.7, αυτή τη φορά σε θρεπτικό μέσο MSM+SC. Όπως και παραπάνω, το στέλεχος LP13.7 αποδόμησε το iprodione ταχύτατα, εντός 69 ωρών. Η αποδόμηση του iprodione συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό του ενδιάμεσου προϊόντος met I το οποίο στη συνέχεια μετατράπηκε σε met II. Το τελευταίο μετατράπηκε σε 3,5-DCA το οποίο αποδομήθηκε περαιτέρω αλλά όχι πλήρως στις 117 ώρες που διήρκησε το πείραμα



**Διάγραμμα 4.** Η αποδόμηση του iprodione και ο σχηματισμός των μεταβολικών προϊόντων metI, metII και 3,5-DCA από το βακτηριακό στέλεχος *Paenarthrobacter* sp. LP13.7 σε θρεπτικό μέσο MSM+SC. Στο διάγραμμα περιλαμβάνεται και η αποδόμηση του iprodione σε MSM απουσία του βακτηρίου (control). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις η αποδόμηση του iprodione στα μη εμβολιασμένα με βακτήρια δείγματα κυμάνθηκε μεταξύ 25-40% της αρχικής ποσότητας του iprodione χωρίς όμως σε καμία περίπτωση να σχηματιστούν κάποια από τα μεταβολικά προϊόντα που ανιχνεύθηκαν στις εμβολιασμένες καλλιέργειες.

Η ανάλυση της διάσπασης του μυκητοκτόνου Iprodione ολοκληρώθηκε με τη κινητική ανάλυση της διάσπασης του καθώς και τη διάσπαση του κύριου μεταβολίτη του 3,5 Dichloraniline.

Με βάση τα δεδομένα αποδόμησης του iprodione από τα διάφορα βακτηριακά στελέχη, όλα του γένους *Paenarthrobacter* sp. υπολογίστηκαν με την χρήση του μοντέλου κινητικής πρώτης τάξης οι τιμές DT50 και ο ρυθμός αποδόμησης  $K_{deg}$  για το μυκητοκτόνο (Πίνακας 4). Συνολικά τα βακτηριακά στελέχη *Paenarthrobacter* sp. αποδομούν το iprodione ταχύτατα με τιμές DT<sub>50</sub> που κυμάνθηκαν από 15,2 ώρες για το

LP13.7 σε MSM+SC ως 21.8 ώρες για το TA1.8. Αντίστοιχα οι τιμές DT50 στα μη εμβολιασμένα δείγματα ήταν 94.3-127,6 ώρες.

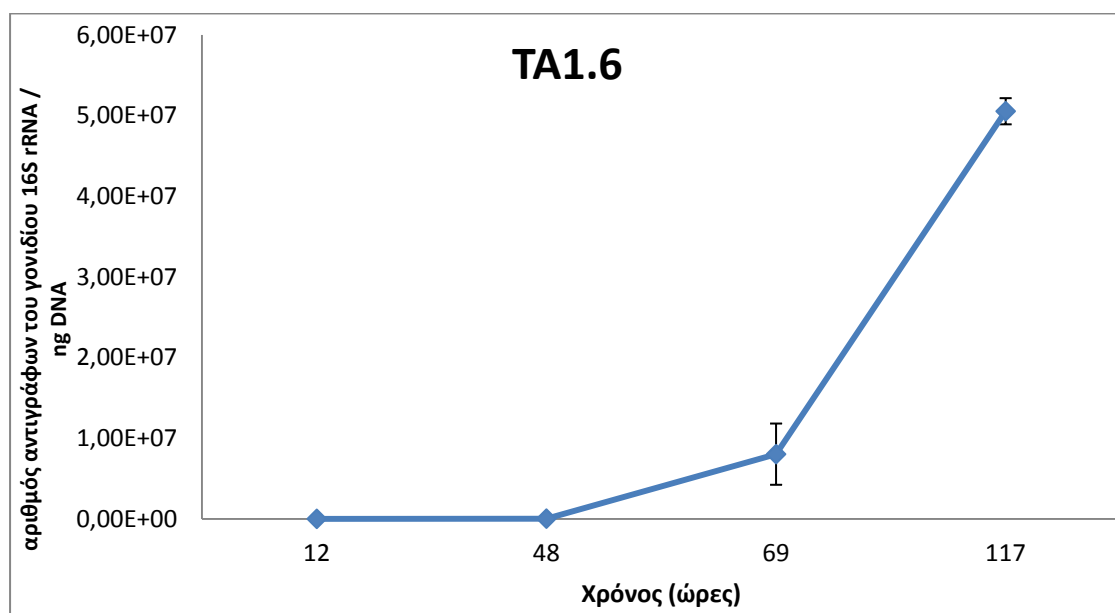
**Πίνακας 4.** Οι τιμές DT<sub>50</sub> και k<sub>deg</sub> για το iprodione στις διάφορες καλλιέργειες που εμβολιάστηκαν ή όχι (control) με τα βακτηριακά στελέχη TA1.6, TA1.8 και LP13.7. Οι τιμές χ<sup>2</sup> αποδίδουν την επιτυχία με την οποία το μοντέλο κινητικής που χρησιμοποιήθηκε περιγράφει την κινητική αποδόμησης (τιμές <15% καταδεικνύουν ικανοποιητική προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα αποδόμησης).

Μεταχειρίσεις	K <sub>deg</sub> (hours <sup>-1</sup> )	DT <sub>50</sub> (hours)	x <sup>2</sup> (%)
Control MSM	0,01	94,3	8,4
TA1.6	0,00	19,8	9,7
TA1.8	0,01	21,8	5,9
LP13.7	0,00	17,6	25,9
Control MSM+SC	0,00	127,6	2,8
LP13.7 MSM+SC	0,02	15,2	14,9

### **3.2. Αύξηση και ανάπτυξη των στελεχών *Raenarthobacter* sp. κατά την πορεία αποδόμησης του iprodione**

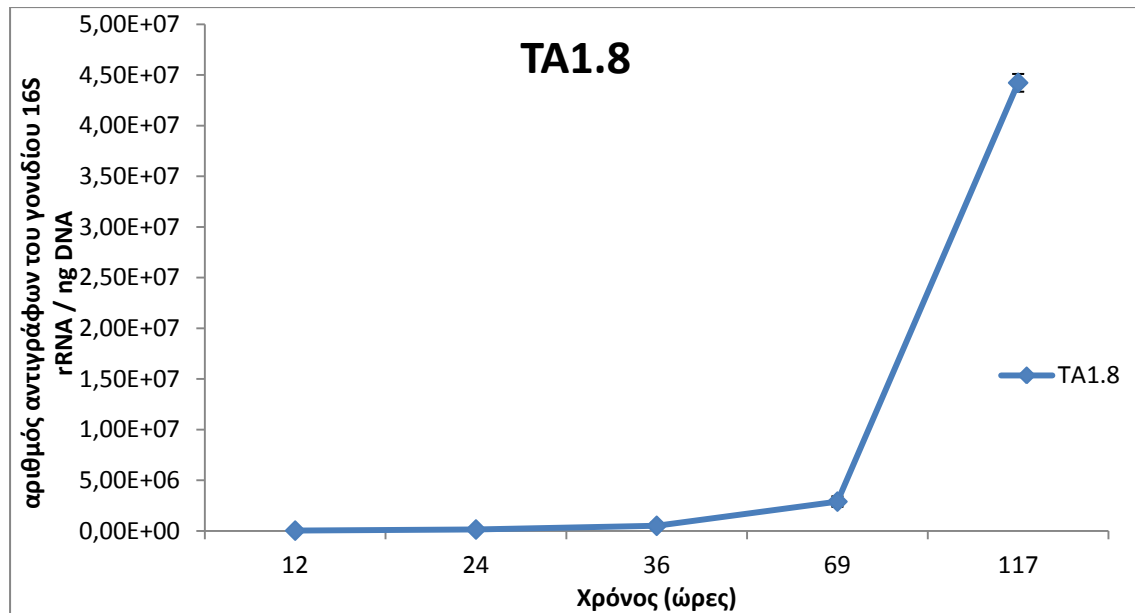
Στα Διαγράμματα 5 ως 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού της αφθονίας των βακτηριακών στελεχών *Raenarthobacter* sp. κατά την πορεία αποδόμησης του μυκητοκτόνου μέσω q-PCR. Όπως προκύπτει από τα Διαγράμματα

σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας των βακτηριακών στελεχών που γίνεται ορατή και έντονη ύστερα από μια περίοδο υστέρησης που κυμαίνεται από 24 ώρες για το στέλεχος LP13.7 ως και 69 ώρες για το στέλεχος TA1.8. Ακολούθως η αφθονία όλων των βακτηριακών στελεχών ακολουθεί μια εκθετική φάση ανάπτυξης που φθάνει στα  $2-5 \times 10^7$  αντίγραφα του γονιδίου 16S rRNA ανά ng DNA.

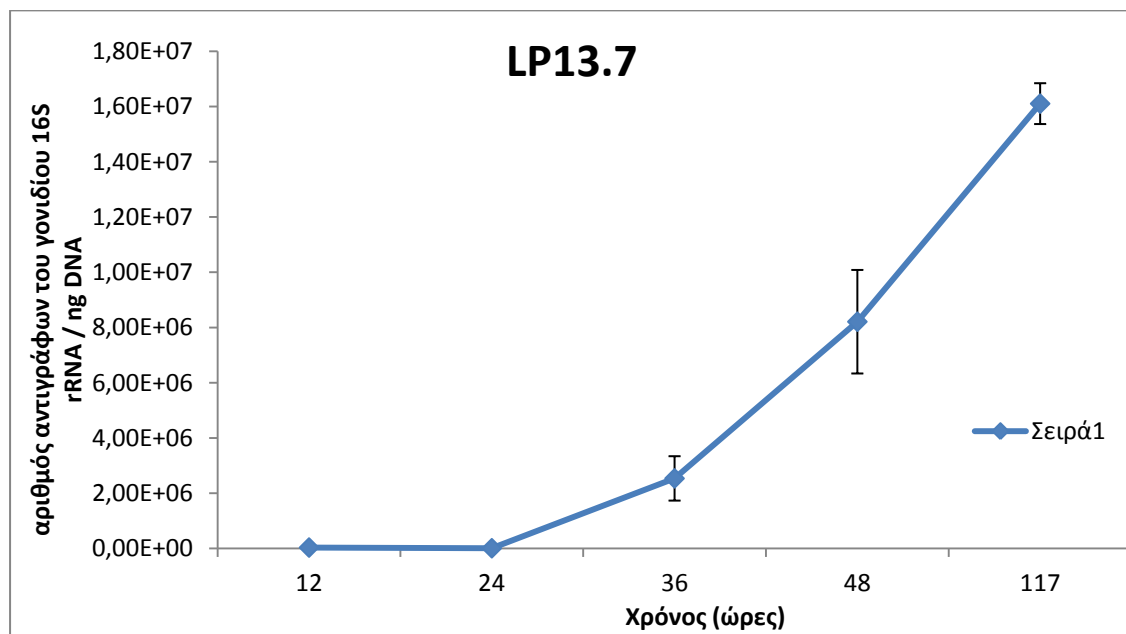


**Διάγραμμα 5.** Η αφθονία του στελέχους *Raenarthrobacter sp.* TA1.6, όπως προσδιορίστηκε με βάση τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου 16S rRNA, κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του Iprodione σε θρεπτικό μέσο MSM. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.

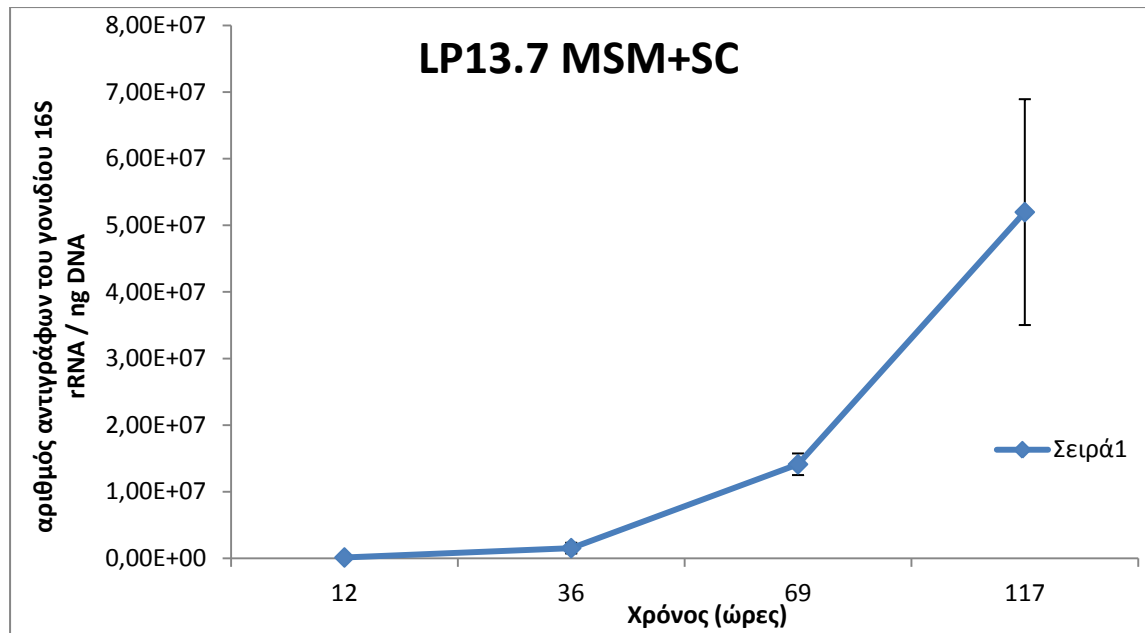




**Διάγραμμα 6.** Η αφθονία του στελέχους *Paenarthrobacter sp.* TA1.8 όπως προσδιορίστηκε με βάση τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου 16S rRNA, κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του Iprodione σε θρεπτικό μέσο MSM. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση



**Διάγραμμα 7.** Η αφθονία του στελέχους *Paenarthrobacter sp.* LP13.7, όπως προσδιορίστηκε με βάση τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου 16S rRNA, κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του Iprodione σε θρεπτικό μέσο MSM. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



**Διάγραμμα 8.** Η αφθονία του στελέχους *Paenarthrobacter* sp. LP13.7, όπως προσδιορίστηκε με βάση τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου 16S rRNA, κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του Iprodione σε θρεπτικό μέσο MSM+SC. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το μεταβολικό μονοπάτι αποδόμησης του μυκητοκτόνου iprodione από βακτήρια που απομονώθηκαν από το έδαφος και φύλλα πιπεριάς. Από αυτά τα δείγματα απομονώθηκαν 3 βακτηριακές καλλιέργειες TA1.6, TA1.8 & LP13.7 οι οποίες ταυτοποιήθηκαν ως διαφορετικά στελέχη του γένους *Paenarthrobacter* sp. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή θα πρέπει η αφθονία του να αυξάνεται καθώς διασπάται το γεωργικό φάρμακό (Lim et al. 2011; Perruchon 2014). Για τον λόγο αυτό, μετά την καταγραφή του μεταβολικού μονοπατιού ακολούθησε ανάλυση της αφθονίας του *Paenarthrobacter* sp., κατά τη διάρκεια των 117 ωρών καταγραφής της αποδόμησης του Iprodione.

Τα αποτελέσματα έδειξαν την ταχύτερη αποδόμηση του μυκητοκτόνου και από τις τρεις μικροβιακές κοινοπραξίες, με ταχύτερη αυτή της LP13.7. Παράλληλα μετρήθηκε η αφθονία του *Paenarthrobacter* sp., η οποία αυξάνεται καθώς αποδομείται το μυκητοκτόνο. Προηγούμενες μελέτες με βακτήρια που αποδομούν το iprodione, τα οποία μάλιστα ανήκουν στο γένος *Arthrobacter* (συγγενικό γένος του *Paenarthrobacter*) έδειξαν ότι το iprodione υδρολύεται αρχικά σε 3,5-dichlorophenyl-carboxamide το οποίο στην συνέχεια μετατρέπεται σε 3,5-dichlorophenylurea-acetate και τελικά σε 3,5-dichloroaniline (Mercadier et al. 1996; Athiel et al. 1995). Το ίδιο μεταβολικό μονοπάτι καταγράφηκε και στην παρούσα μελέτη καταδεικνύοντας ότι το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι είναι διαδεδομένο σε εδαφικά βακτήρια που ανήκουν στα συγγενικά γένη *Arthrobacter*-*Paenarthrobacter* αλλά αναφέρεται για πρώτη φορά σε βακτήρια που προέρχονται από την φυλλόσφαιρα φυτών.

Πιο πρόσφατες μελέτες οδήγησαν στην απομόνωση, μίας μικροβιακής κοινοπραξίας, που αποτελούνταν από *Arthrobacter* sp. και *Achromobacter* sp. στελέχη, που είχαν την ικανότητα να αποδομούν ταχύτερα το iprodione (Campos et al. 2015). Οι Campos et al, (2015) χρησιμοποιώντας τα ίδια θρεπτικά μέσα με την παρούσα εργασία, (MSM & MSM+SC) παρατήρησαν μια ελαφρώς ταχύτερη αποδόμηση του iprodione στο θρεπτικό μέσο MSM+SC, σε συμφωνία με τα δικά μας ευρήματα. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι το *Arthrobacter* sp. ήταν υπεύθυνο για τον μεταβολισμό του iprodione (Campos et al. 2017) ακολουθώντας το μεταβολικό μονοπάτι που οι Athiel et al. (1995) ανέφεραν. Πιο πρόσφατες μελέτες από τους Yang et al. (2018) αναφέρθηκε η απομόνωση ενός νέου στελέχους *Paenarthrobacter* sp. που αποδόμησε το iprodione ακολουθώντας το ίδιο μονοπάτι με παραπάνω, ενώ εντόπισαν και ταυτοποίησαν το γονίδιο που κωδικεύει μια καρβοξαμιδάση υπεύθυνη για την υδρόλυση του iprodione.

Στην παρούσα μελέτη τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν έδειξαν να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται παράλληλα με την αποδόμηση του iprodione καταδεικνύοντας ότι έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν προϊόντα που

παράγονται κατά την πορεία αποδόμησης του iprodione ως πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξης τους. Οι Campos et al., (2017) πράγματι ανέφεραν τον σχηματισμό isopropylamine και glycine στο πρώτο και τρίτο βήμα μεταβολισμού του iprodione αντίστοιχα και πρότειναν ότι τα συγκεκριμένα μόρια χρησιμοποιούνται από βακτήρια του γένους *Arthrobacter* sp. ως πηγή C και N. Παρολα αυτά τα αποτελέσματα μας έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες των Campos et al., (2017) και Athiel et al., (1995) που έδειξαν ότι η αποδόμηση του iprodione δεν φαίνεται να συνοδεύεται από μετρήσιμη αύξηση της βακτηριακής βιομάζας.

Τα συγκεκριμένα βακτήρια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την απορρύπανση εδαφών ρυπασμένων με iprodione αλλά κυρίως για την απομάκρυνση υπολειμμάτων iprodione από φρούτα στα οποία εφαρμόστηκε το μυκητοκτόνο ώστε αυτά να φτάσουν στην αγορά ελεύθερα υπολειμμάτων. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στον εντοπισμού του γενετικού οπλισμού των στελεχών *Paenarthrobacter* sp. που εμπλέκεται στην αποδόμηση του iprodione.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Aktar, M. W., Sengupta, D. & Chowdhury, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol*2, 1–12 (2009)
- Athiel, P. et al., 1995. Degradation of iprodione by a soil *Arthrobacter*-like strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), pp.3216–3220.
- Blystone, C.R. et al., 2009. Cumulative and antagonistic effects of a mixture of the antiandrogens vinclozolin and iprodione in the pubertal male rat. *Toxicological Sciences*, 111(1), pp.179–188.
- Braschil, I., Gessa, C. E. & Blasioli, S. The Fate of Herbicides in Soil. (2011). doi:10.5772/13056
- Campos, M. et al., 2015. Isolation and characterization of bacteria from acidic pristine soil environment able to transform iprodione and 3,5-dichloraniline. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104, pp.201–211.
- Campos, M. et al., 2017. Bioaugmentation and rhizosphere-assisted biodegradation as strategies for optimization of the dissipation capacity of biobeds. *Journal of Environmental Management*, 187, pp.103–110.
- Campos, Marco, Panagiotis S. Karas, C. Perruchon, Evangelia S. Papadopoulou, Vasiliki Christou, Urania Menkissoglou-Spiroudi, Maria Christina Diez, et al. 2016. “Novel Insights into the Metabolic Pathway of Iprodione by Soil Bacteria.” *Environmental Science and Pollution Research* 24: 152–63.
- Cheyns, K. et al., 2012. Long-term dynamics of the atrazine mineralization potential in surface and subsurface soil in an agricultural field as a response to atrazine applications. *Chemosphere*, 86(10), pp.1028–1034.
- Constantina Rousidou et al., 2017. Distribution and function of carbamate hydrolase genes *cehA* and *mcd* in soils: the distinct role of soil pH. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(1).
- Entwistle, N. et al., 1986. The Occurrence of Chlordiazepoxide Degradation Products in Sudden Deaths Associated with Chlordiazepoxide Overdosage. *Journal of Forensic Science Society*, 26, pp.45–54
- Feld, L., Hjelmsø, M. H., Nielsen, M. S., Jacobsen, A. D., Rønn, R., Ekelund, F., ... Jacobsen, C. S. (2015). Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by *amoA* expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS ONE*, 10(5), 1– 20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126080>
- Gosselin, R.E., R.P. Smith, H.C. Hodge. *Clinical Toxicology of Commercial Products*. 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984., p. II-338]
- Grabke, a et al., 2014. Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. *Phytopathology*, First, pp.396–402.
- Gu, L. et al., 2010. Assessing the impact of fungicide enostroburin application on

- bacterial community in wheat phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, 22(1), pp.134–141
- Haverkate, F., Tempel, A. & Held, A. J. D. Interaction of 2,4,5-trichlorophenylsulphonylmethyl thiocyanate with fungal spores. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 75, 308–315 (1969).
- Hrelia, P. et al. The genetic and non-genetic toxicity of the fungicide Vinclozolin. *Mutagenesis* 11, 445–453 (1996).
- Karanasios, E. et al., 2010. Degradation and adsorption of pesticides in compost-based biomixtures as potential substrates for biobeds in southern Europe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), pp.9147–9156.
- Karpouzas, D. G., Tsiamis, G., Trevisan, M., Ferrari, F., Malandain, C., Sibourg, O., & Martin-Laurent, F. (2016). "LOVE TO HATE" pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18947–18951. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7319-4>
- Karpouzas, D.G. et al., 2014. A tiered assessment approach based on standardized methods to estimate the impact of nicosulfuron on the abundance and function of the soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry*, 75, pp.282–291.
- Li Cao et al. 2018. Isolation and characterization of a bacterium able to degrade high concentrations of iprodione. *NRC Research Press*, pp49-56
- Martin, C. et al., 1990. Enhanced degradation of iprodione in soil after repeated treatments for controlling *Sclerotinia minor*. *Plant and Soil*, 127, pp.140–142.
- Mercadier, C. et al., 1996. Metabolism of iprodione in adapted and non-adapted soils; effect of soil inoculation with an iprodione-degrading *Arthrobacter* strain. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(12), pp.1791–1796.
- Miñambres, G.G. et al., 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*, 26(1), pp.161–170.
- Mitchell, J.A. & Cain, R.B., 1996. Rapid onset of the accelerated degradation of dicarboximide fungicides in a UK soil with a long history of agrochemical exclusion. *Pesticide Science*, 48, pp.1–11.
- Moulas, C. et al., 2013. Effects of systemic pesticides imidacloprid and metalaxyl on the phyllosphere of pepper plants. *BioMed Research International*, 2013.
- Ning, J. et al., 2010. Functional assembly of bacterial communities with activity for the biodegradation of an organophosphorus pesticide in the rape phyllosphere. *FEMS Microbiology Letters*, 306(2), pp.135–143
- Puglisi, E., Vasileiadis, S., Demiris, K., Bassi, D., Karpouzas, D. G., Capri, E., ... Trevisan, M. (2012). Impact of Fungicides on the Diversity and Function of Non-target Ammonia-Oxidizing Microorganisms Residing in a Litter Soil Cover. *Microbial Ecology*, 64(3), 692–701. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0064>

- Rousidou, K. et al., 2016. Isolation of oxamyl-degrading bacteria and identification of *cehA* as a novel oxamyl hydrolase gene. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), pp.1–12.
- Rousseaux, S., Hartmann, A. and Soulas, G. (2001) ‘Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine-degrading bacteria from different French soils’, *Fems Microbiology Ecology*, 36(2–3), pp. 211–222.
- Taube, J., Vorkamp, K., Förster, M. & Herrmann, R. Pesticide residues in biological waste. *Chemosphere* 49, 1357–1365 (2002)
- Van der Werf , 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems & Environment Volume 60, Issues 2–3*, December 1996, Pages 81-96
- Wang, Y.S. et al., 2004. Effect of fungicide iprodione on soil bacterial community. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(1), pp.127–132.
- Zhang, B. et al., 2008. Assessing the impact of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere. *FEMS Microbiology Letters*, 284(1), pp.102–108.
- Zhang, B. et al., 2009. The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *Science of the Total Environment*, 407(6), pp.1915–1922. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.049>.
- Zhang, B.-G. et al., 2009. [Effect of abamectin insecticide on the microbial community in broccoli phyllosphere]. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue*, 30(5), p.1292—1297. Available at: <http://europemc.org/abstract/MED/19558092>.
- Zhangong Yang, et al. 2018. An amidase gene *ipaH* is responsible for the initial degradation step of iprodione in strain *Paenarthrobacter* sp. YJN-5. *AEM Accepted Manuscript Posted Online 27 July 2018*,
- Παπαδοπούλου Ευαγγελία, Μελέτη της συμπεριφοράς βιολογικών και συνθετικών γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος και των επιπτώσεών τους στη μικροβιακή κοινότητα. (2013)