

Μικροβιακή αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια εσπεριδοειδών: Δημιουργία νέων εξειδικευμένων μικροβιακών εμβολίων

Δημήτρης Καρπούζας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

dkarpouzas@uth.gr

<http://plantenvlab.bio.uth.gr>



DEPARTMENT OF
**Biochemistry &
Biotechnology**
UNIVERSITY OF THESSALY



UNIVERSITY OF
THESSALY

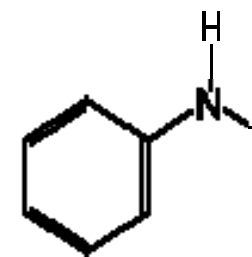
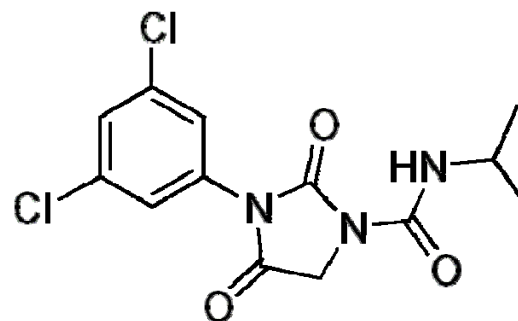
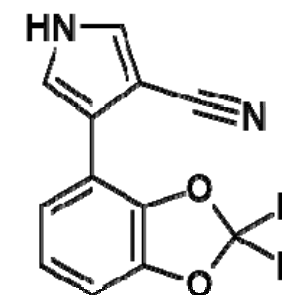
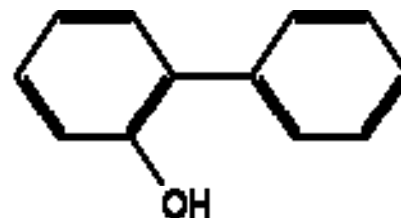
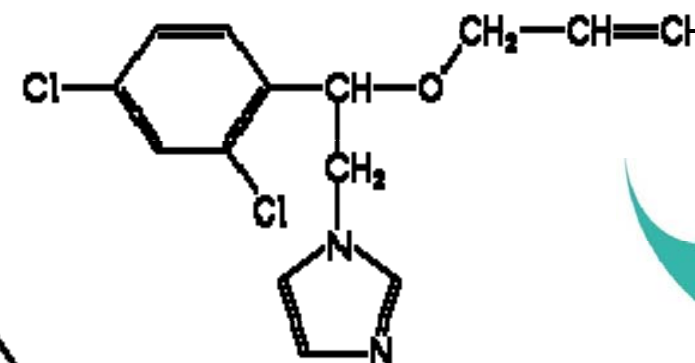
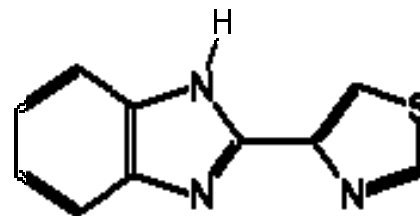
Υγρά απόβλητα από συσκευαστήρια φρούτων.....

- Εφαρμογή μυκητοκτόνων και συντηρητικών για την διατήρηση της ποιότητας των φρούτων κατά την αποθήκευση
- Μεγάλοι όγκοι υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων



Γεωργικά φάρμακα που έχουν έγκριση χρήσης στα συσκευαστήρια φρούτων στην ΕΕ

- Thiabendazole
- Imazalil
- Fludioxonil
- *Ortho*-phenylphenol
- Iprodione
- **Diphenylamine**

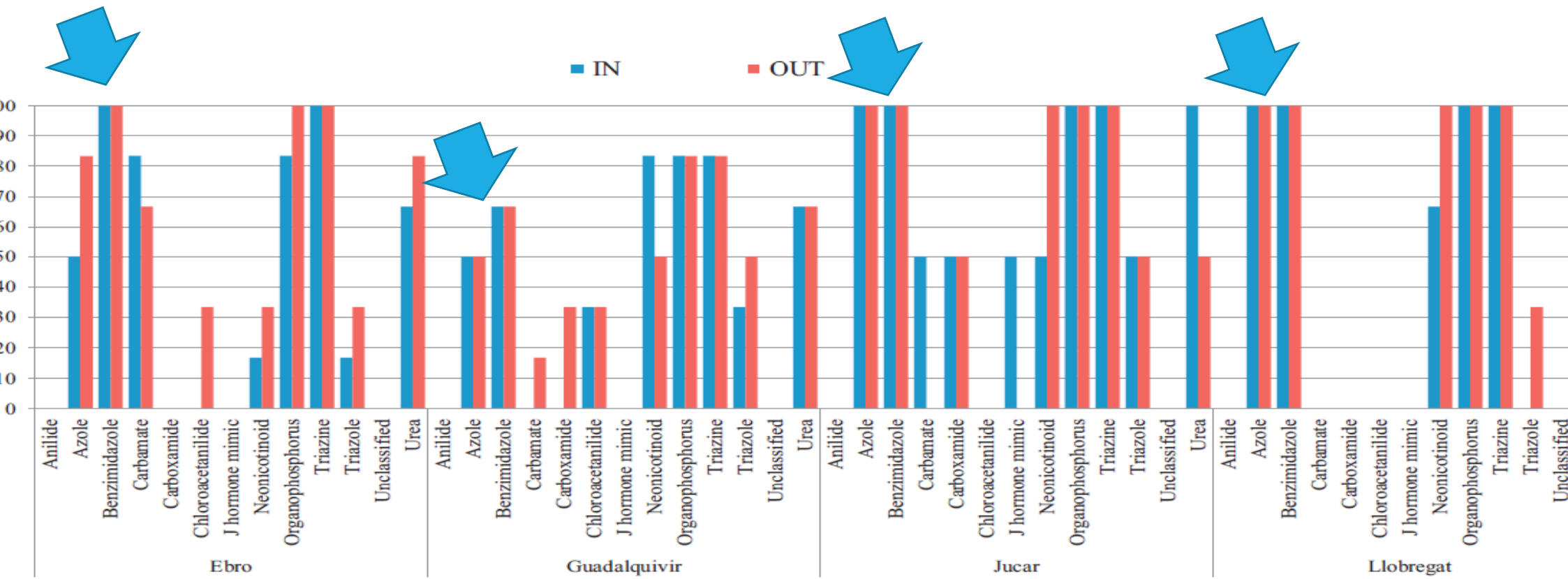


α τα παραπάνω γεωργικά φάρμακα περιέχουν στα έγγραφα
κρισης χρήσης τους στην ΕΕ την παρακάτω παράγραφο..... ..

Member States should pay particular attention *to ensure that appropriate waste management practices to handle the waste solution remaining after application, including for instance the cleaning water of the drenching system and the discharge of the processing waste are put in place*

Πως χειριζόμαστε τα συγκεκριμένα απόβλητα σήμερα?

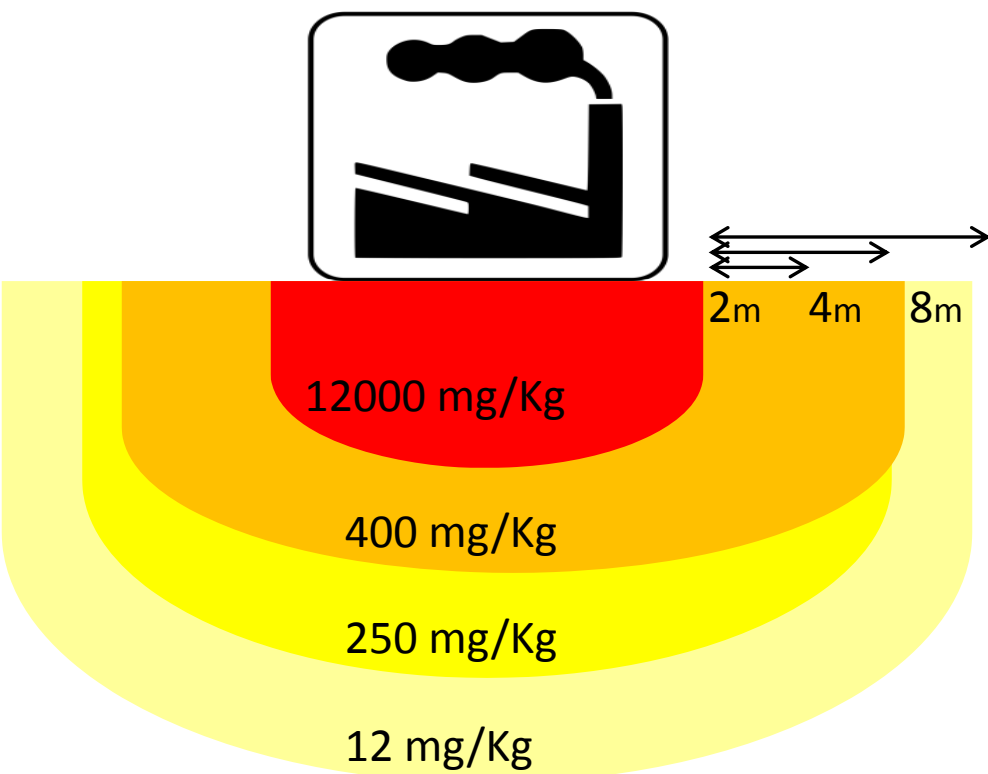
Περιορισμένη απορριψη στις μονάδες επεξεργασίας αστικών αποβλήτων



Προβλεπόμενη κοινότητα των συστημάτων αυτών δεν
είναι να απομακρύνει τα συγκεκριμένα γ.φ.

Πώς χειριζόμαστε αυτά τα απόβλητα σήμερα?

φαρμογή σε παρακείμενους αγρούς



Κίνδυνος σοβαρής ρύπανσης του εδαφικού ορίζοντα με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων με υψηλή υπολειμματικότητα (πχ. Thiabendazole)

πως επεξεργαζόμαστε αυτά τα απόβλητα σήμερα?

επεξεργασία στο σύστημα CONTROL TecEco® (Technidex) μέσω διήθηση από φίλτρο ενεργού άνθρακα



*Υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι μυκητοκτόνων όπως το thiabendazole
Ελάχιστη διείσδυση στην αγορά και χρήση από τα συσκευαστήρια φρούτων*

πως επεξεργαζόμαστε αυτά τα απόβλητα σήμερα?

διαχείριση από πιστοποιημένες εταιρείες διαχείρισης τοξικών αποβλήτων *ex situ*

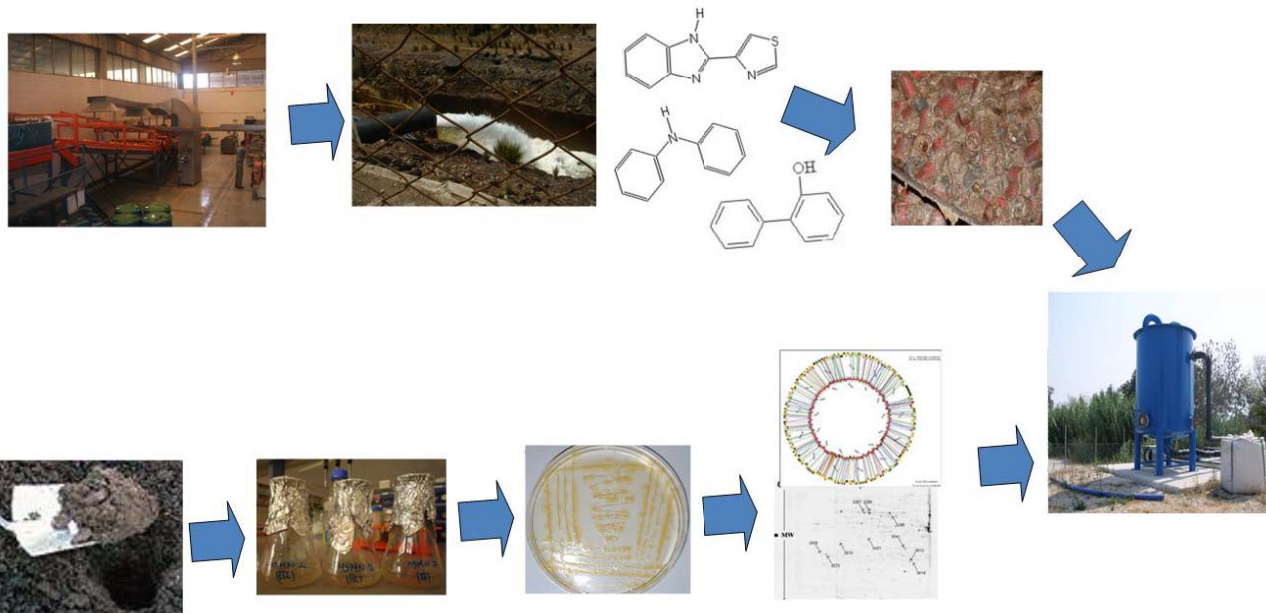


Ιδιαίτερα Υψηλός Κόστος για τα Συσκευαστήρια (0.70 – 3 € / λ)

...είναι η ιδέα μας.....

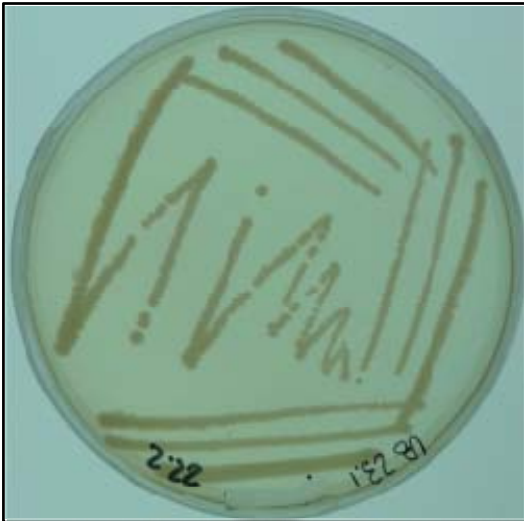
απομόνωση μικροοργανισμών με εξειδικευμένη αποδομητική δράση
ναντι των γεωργικών φαρμάκων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα
από τα συσκευαστήρια φρούτων

αυτοποίηση, γενετικός χαρακτηρισμός και μεταβολικό μονοπάτι
ανάπτυξη εμβολίων για την εφαρμογή στην επεξεργασία υγρών
αποβλήτων ή στην βιοεξυγίανση ρυπασμένων εδαφών



Τι έχουμε στα χέρια μας σήμερα.....

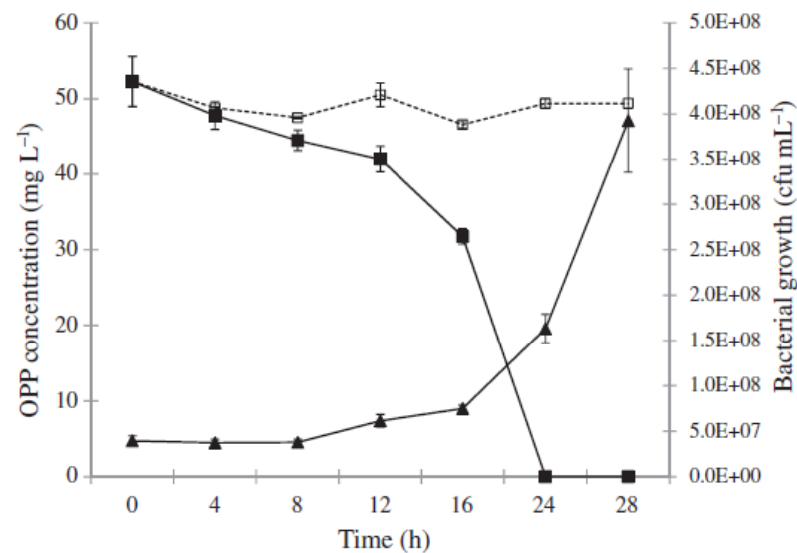
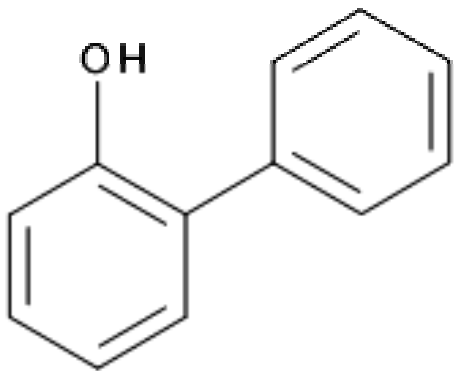
- Thiabendazole – Κοινοπραξία proteobacteria
- Imazalil – *Streptomyces* (μόλις απομονώθηκε)
- Fludioxonil
- Ortho-phenylphenol - *Sphingomonas haloaromaticamans*
- Iprodione – *Paenarthrobacter* sp.
- Diphenylamine - *Pseudomonas putida*



Μικροβιακή αποδόμηση ortho-phenyl phenol

Sphingomonas haloaromaticans στέλεχος OPP

- Αποδομεί ταχύτατα το *ortho*-phenylphenol (OPP) και το χρησιμοποιεί ως πηγή C
- Απομονώθηκε από έδαφος που συλλέχθηκε από περιοχή όπου συσκευαστήριο απέρριπτε τα υγρά του απόβλητα



Μεταβολικό μονοπάτι του OPP από το βακτήριο

- Γονιδιωματική ανάλυση

Το βακτήριο αναπτύχθηκε παρουσία OPP, benzoic acid ή ηλεκτρικού οξέος (εναλλακτική πηγή C)

- Πρωτεομική ανάλυση
- Ανάλυση έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων με πιθανό καταβολικό ρόλο στο μονοπάτι μεταβολισμού το OPP
- Απομόνωση του ενζύμου-κλειδί στο μεταβολικό μονοπάτι του OPP από το βακτήριο *Sphingomonas haloaromaticamans*

Γονιδιωματική ανάλυση

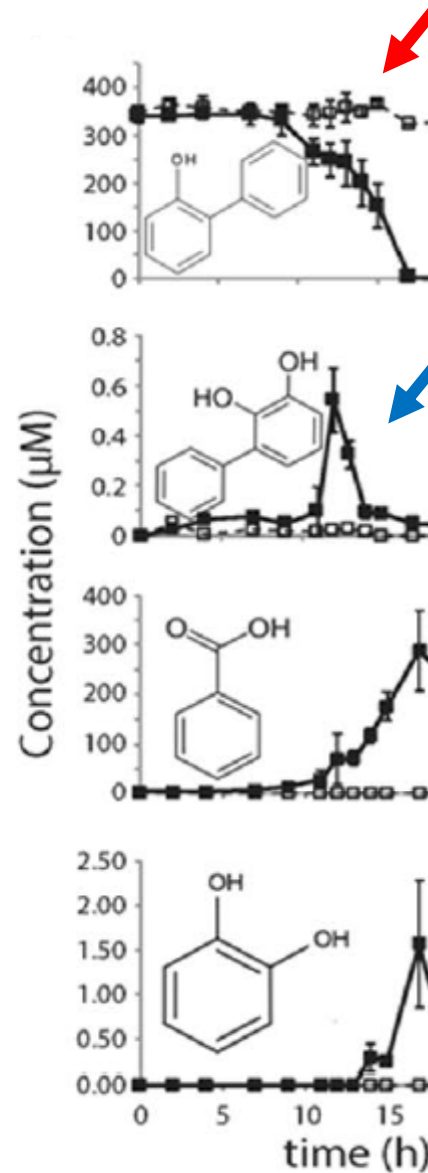
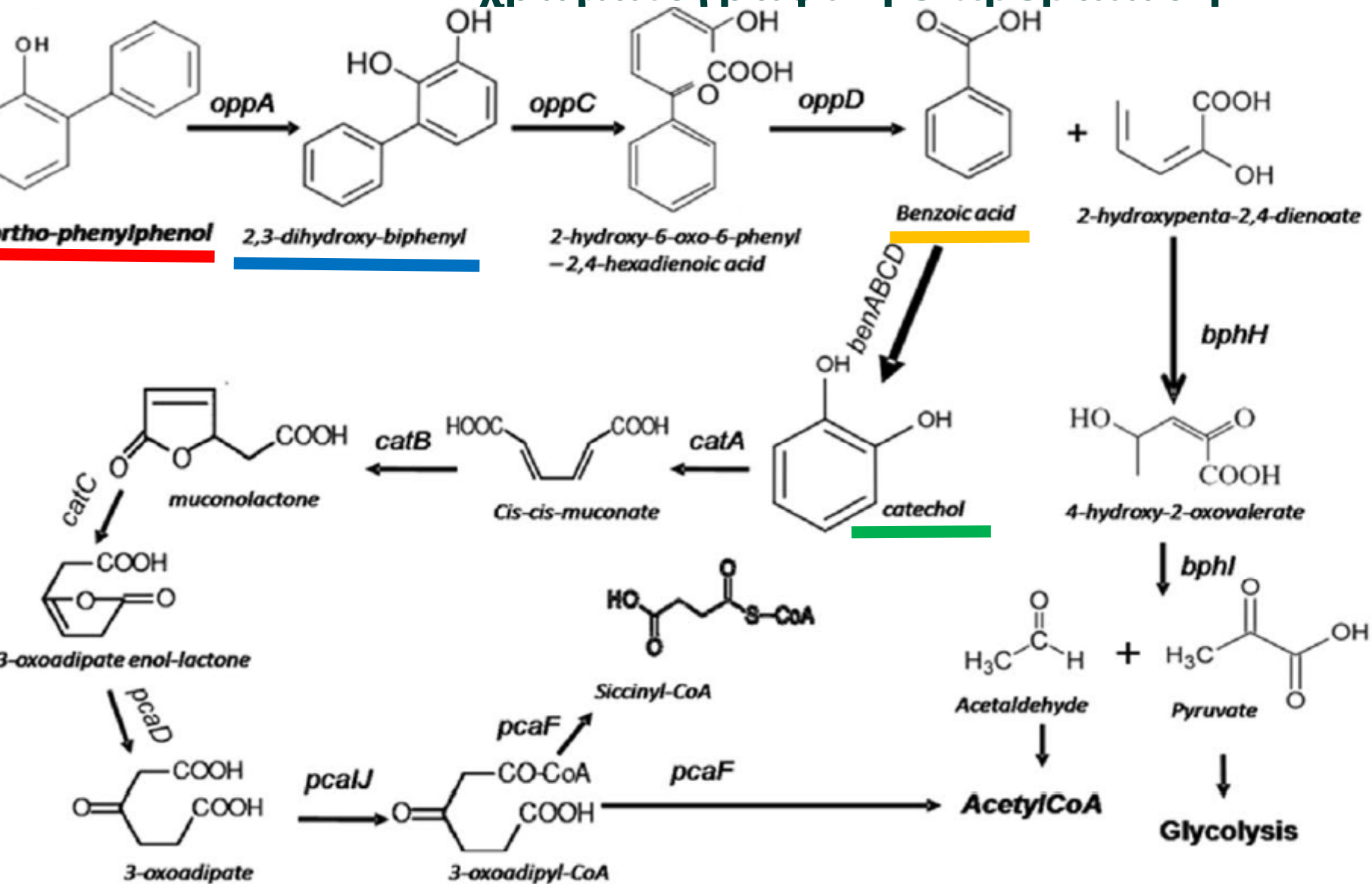
- Illumina Miseq 2x300 bp paired-end and mate-pair
- Συνολικό μέγεθος γονιδιώματος 4.8 Mb, συναρμολογήθηκε σε ένα βασικό κρίωμα μεγέθους 4.5 Mb (Scaffold 0) και δύο άλλα κριώματα μεγέθους 191 and 90.7 kb
- 4 οπερόνια με πιθανό καταβολικό ρόλο

Ονιδιωματική Ανάλυση

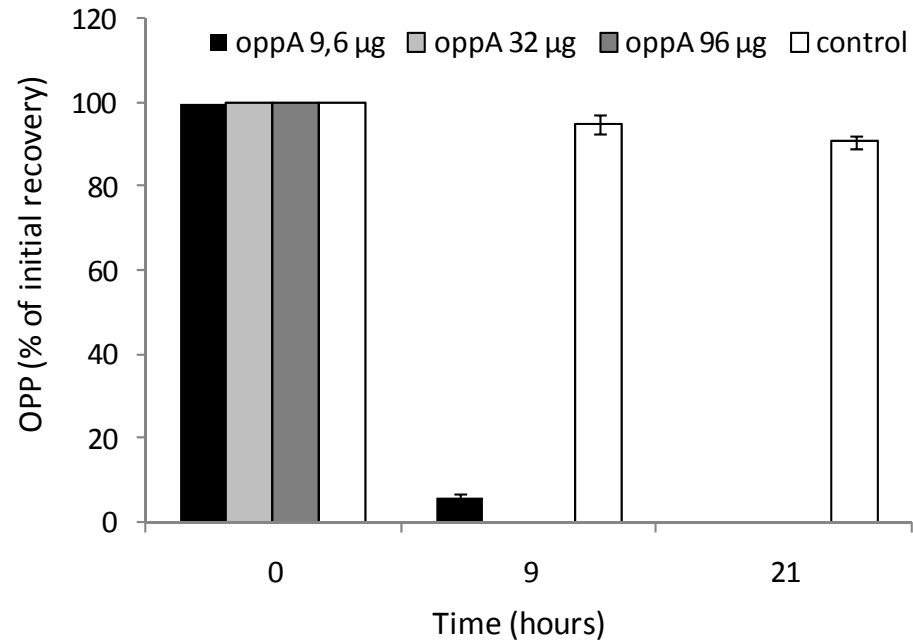
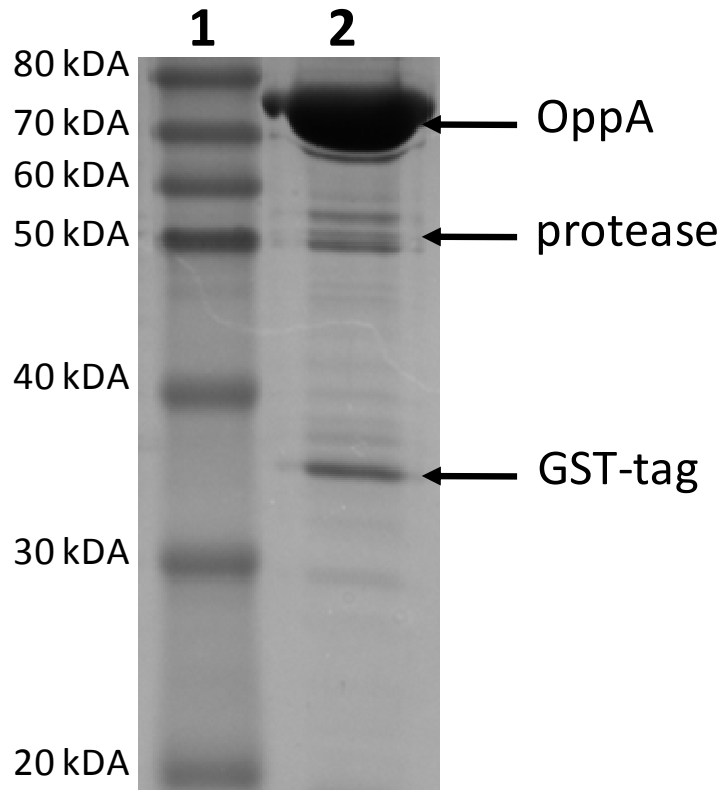


- **Operon 1 and 2** : *ben/cat* pathways
- **Operon 3**: upper OPP pathway (?) and lower *bph* pathway
- **Operon 4**: upper *bph* pathway

Μεταβολικό μονοπάτι βασισμένο στη γονιδιωματική ανάλυση και χρωματογραφική επιβεβαίωση



Απομόνωση, υπερέκφραση και εκτίμηση της δράσης του σε *in vitro* δοκιμές OppA1 (Flavin-dependent Monooxygenase)



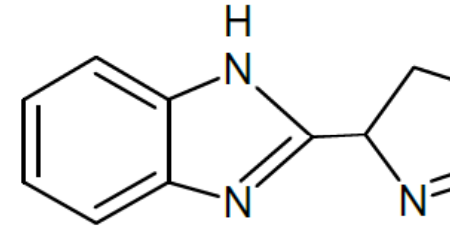


Μικροβιακή αποδόμηση thiabendazole

Κοινοπραξία πρωτεοβακτηρίων

Thiabendazole

Ιδιαίτερα υπολειμματικό στο έδαφος ($DT_{50soil} > 1 \text{ y}$)
χρησιμοποιείται και ως αντιπαρασιτικό στην
κτηνοτροφία



Βακτηριακή κοινοπραξία

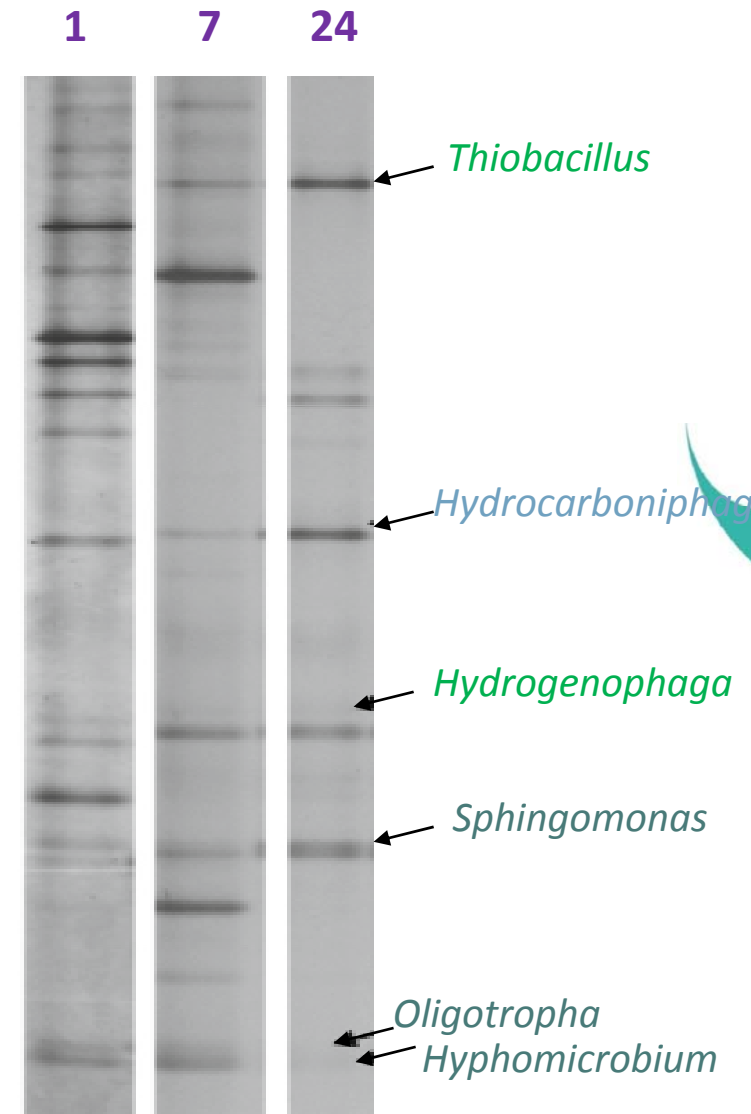
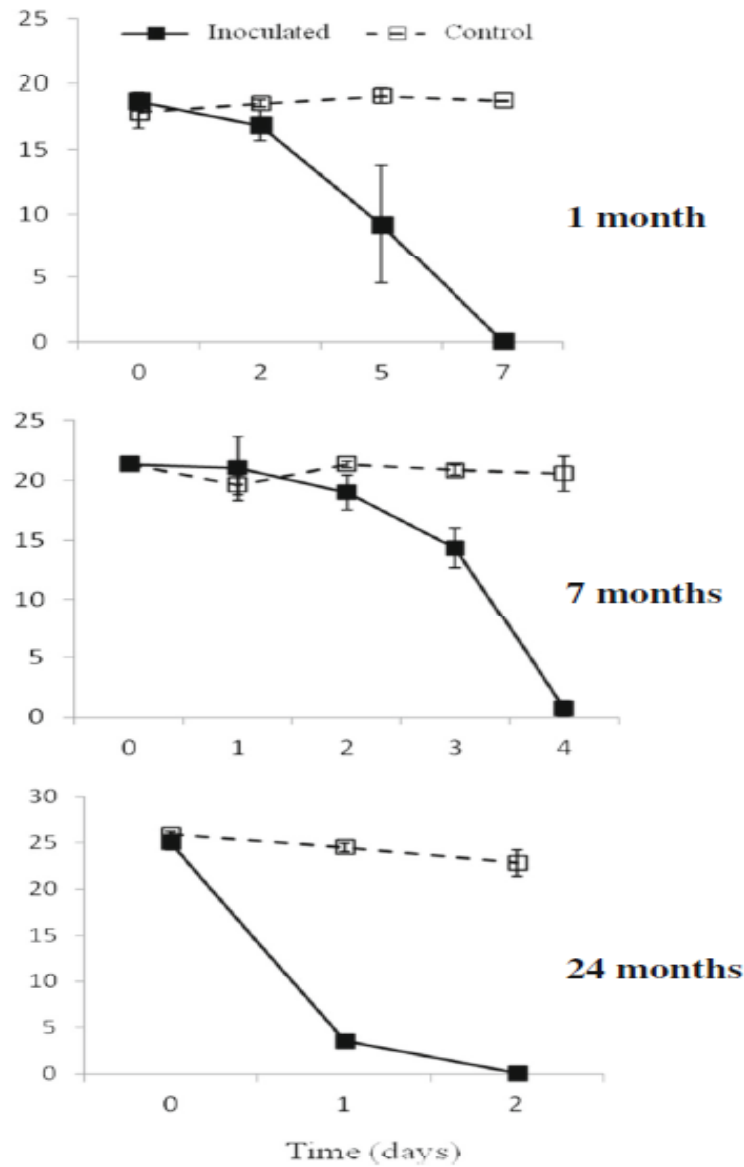
Απομονώθηκε με καλλιέργειες εμπλουτισμού από
δείγμα εδάφους που συλλέχθηκε από περιοχή όπου
απορρίπτονταν τα απόβλητα συσκευαστηρίου
φρούτων στην Κύπρο

οδησιμοποιεί το TBZ ως
νή C και N

αποδομητική του
νότητα

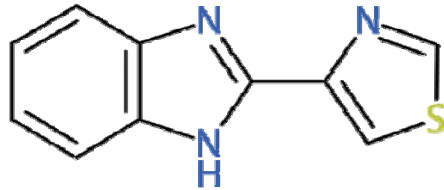
πιστοποιήθηκε και η
υπλοκότητα του
ώθηκε (diversity)

ερα από 24 μήνες
νεχούς εμπλουτισμού

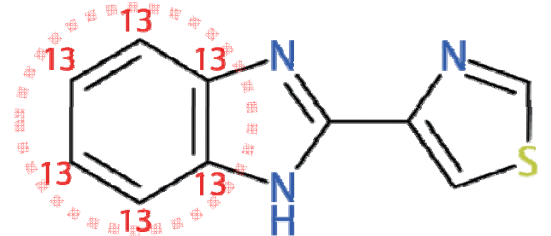
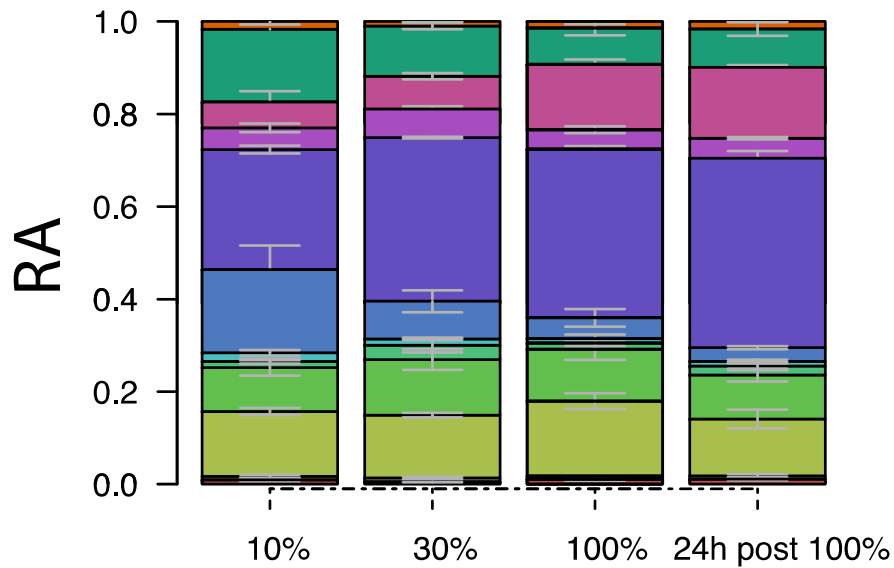


ο κύριος αποδομητής;

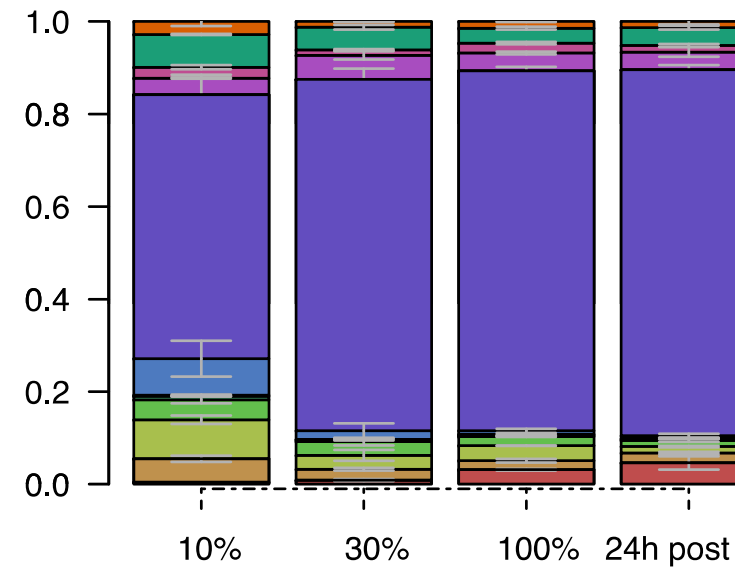
able
otope
obing –
αζική
αλληλούχιση



¹²C-DNA fraction (unlabeled TBZ)



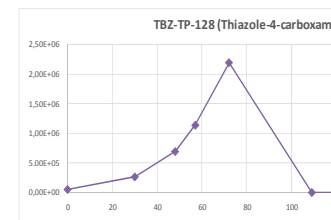
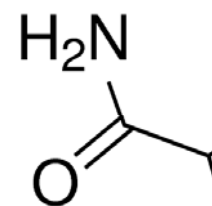
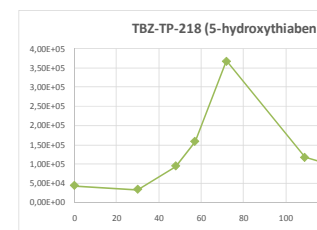
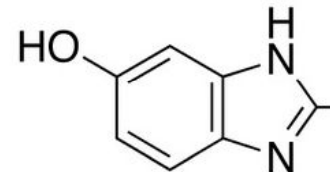
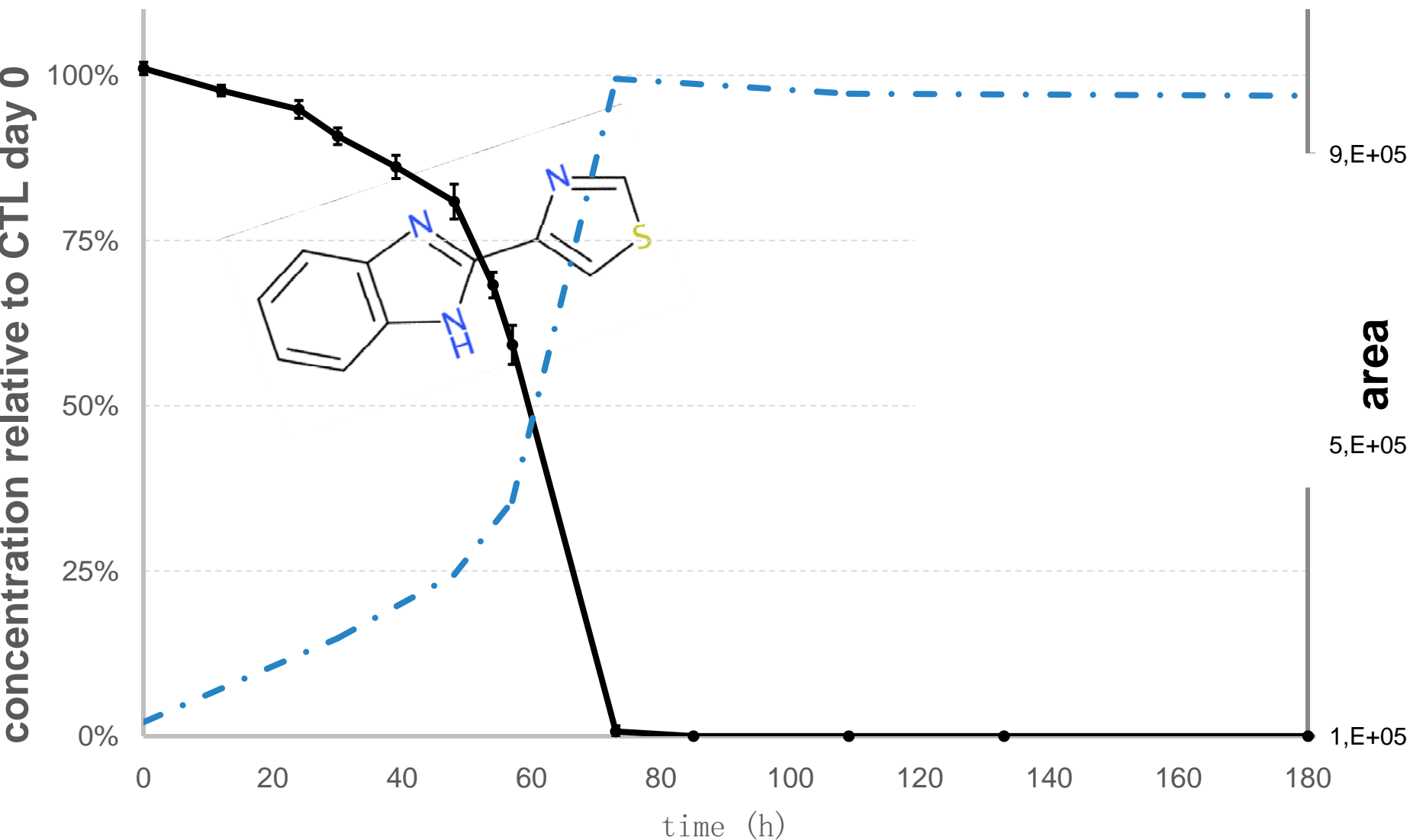
¹³C-DNA fraction (labeled T)



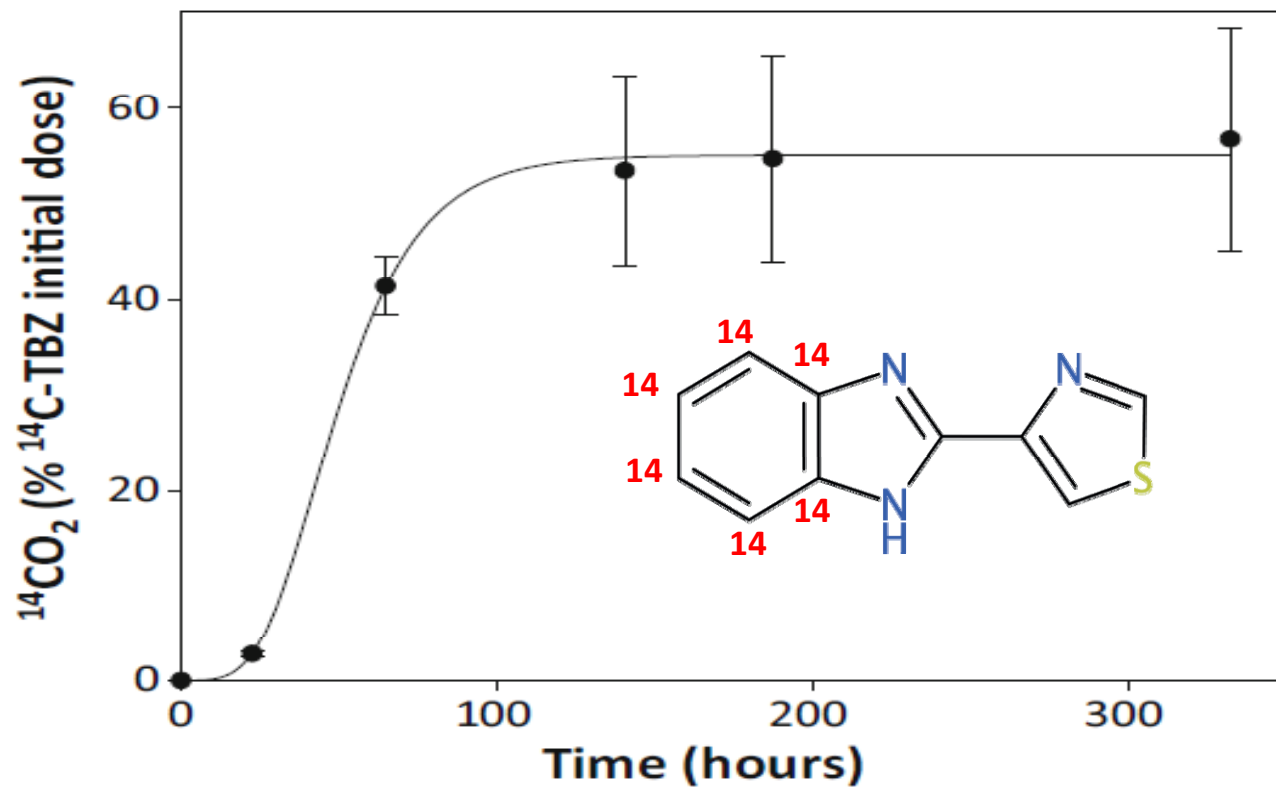
TBZ degradation (% of initial)

- Microbacterium
- Filimonas
- Bradyrhizobiaceae
- Rhizobium
- Hyphomicrobium
- Shinella
- Novosphingobium
- Sphingomonas**
- Hydrogenophaga
- Thiobacillus
- Thiohalobacter
- ≤ 2 % relative ab

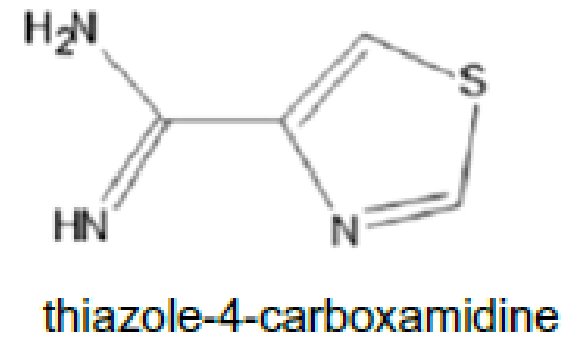
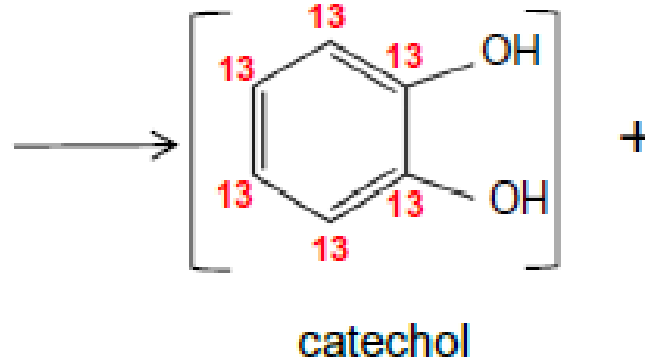
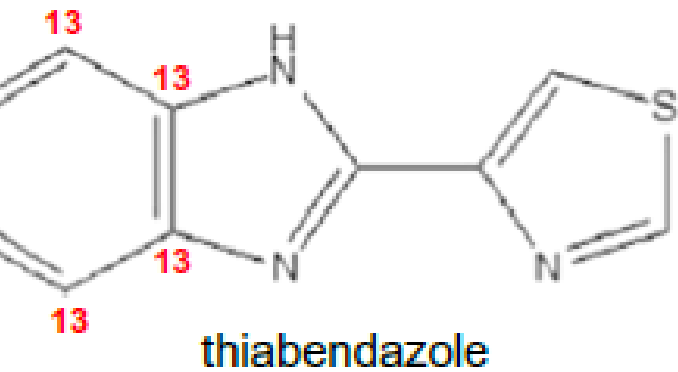
ως μεταβολίζεται το TBZ;



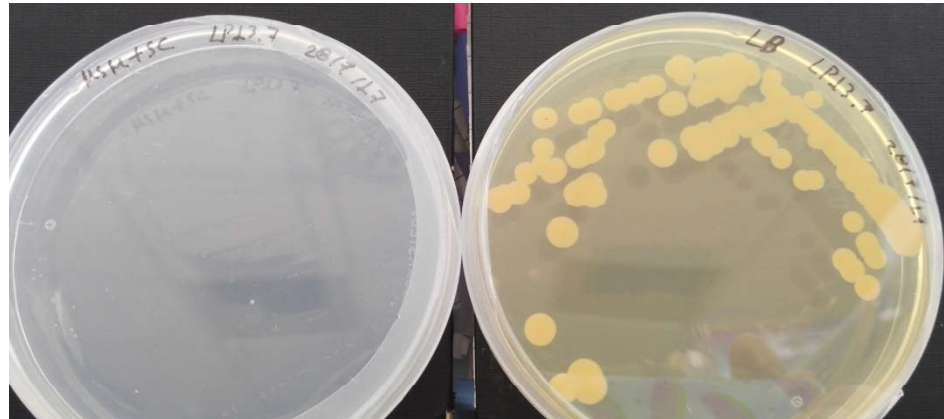
Ανοργανοποίηση ^{14}C -phenyl-thiabendazole



Ραδιοεινόμενο Μεταβολικό Μονοπάτι thiabendazole



↓
C1 compounds

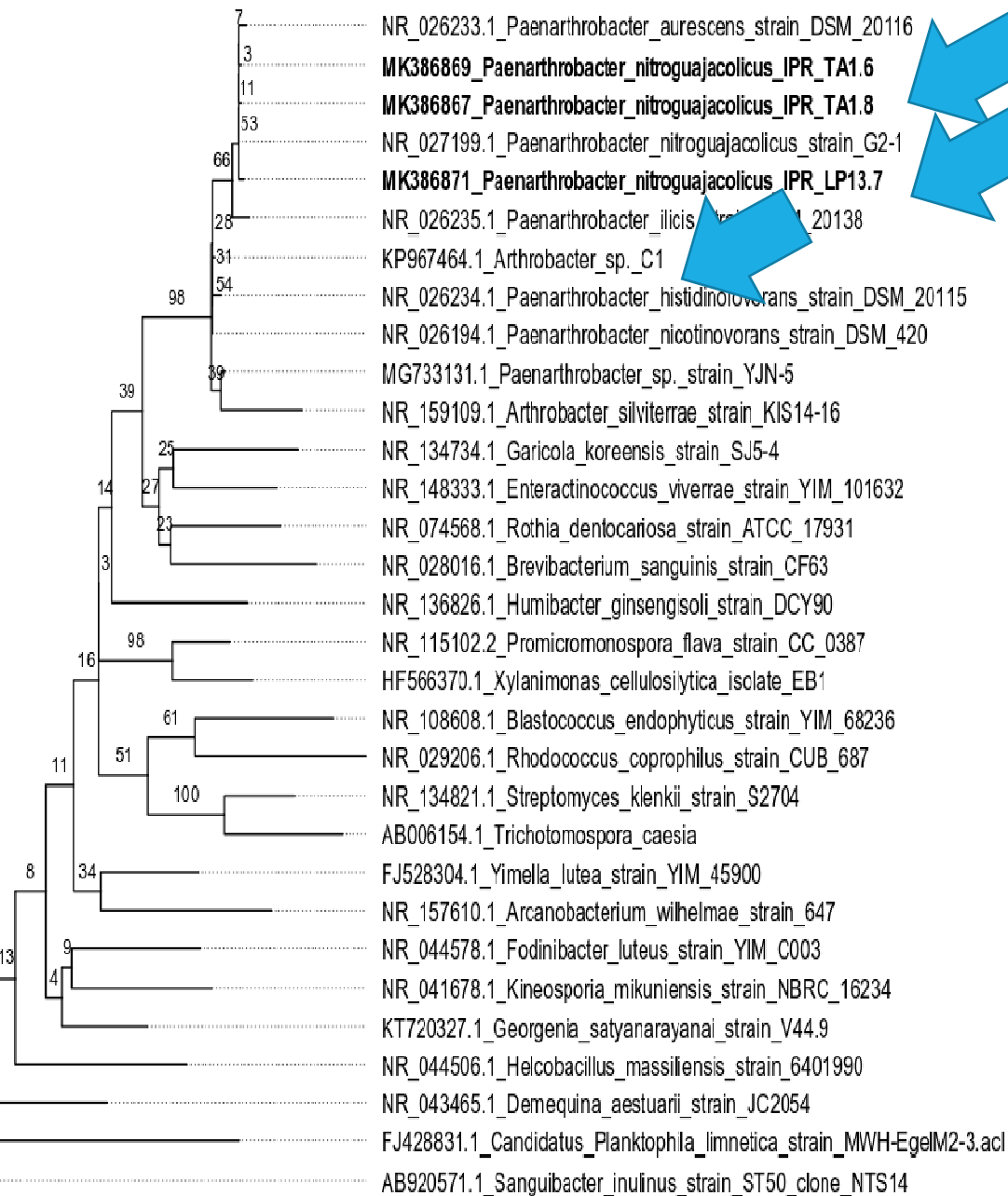


Μικροβιακός Μεταβολισμός iprodione

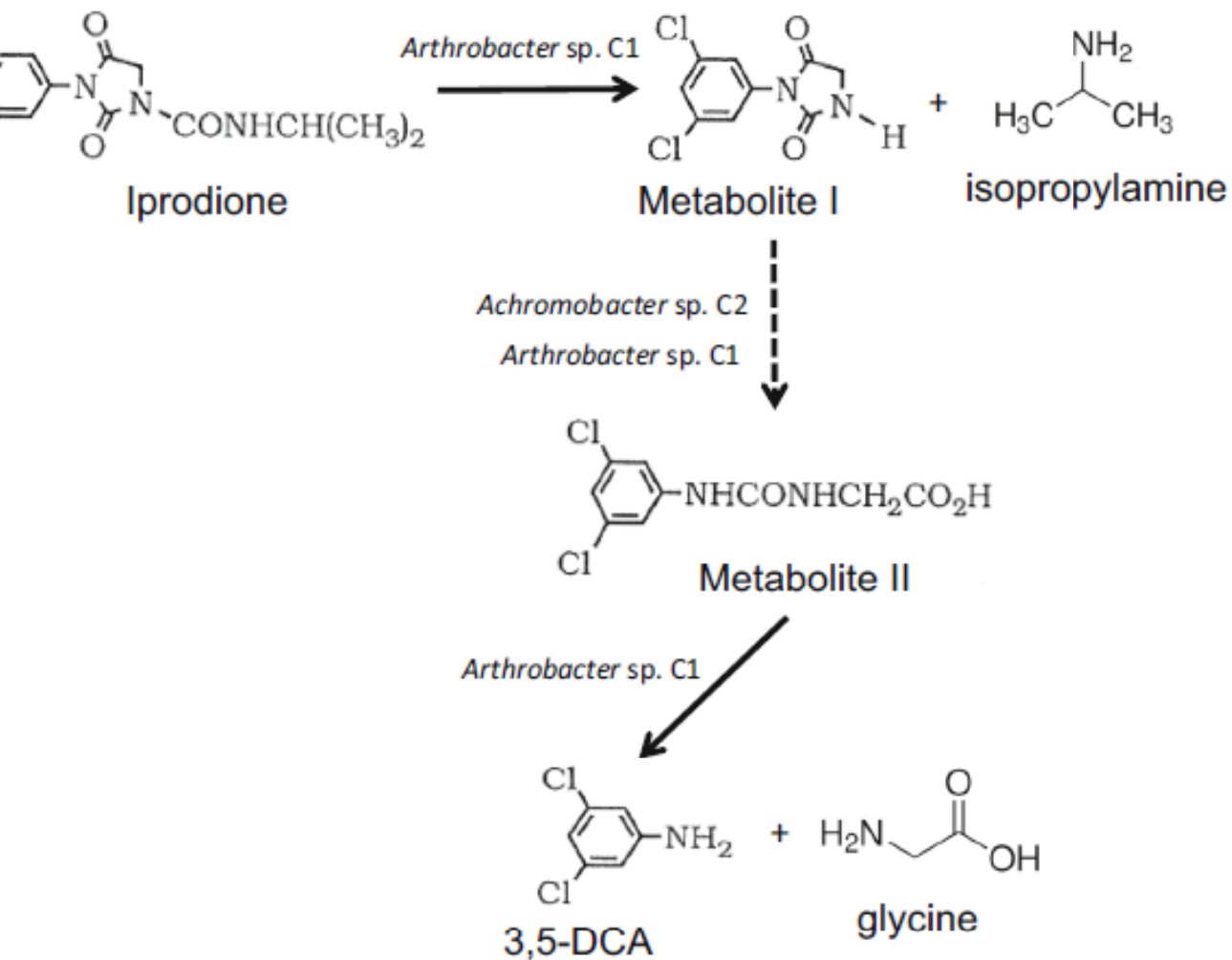
Βακτήρια που αποδομούν το iprodione

- *Raenarthrobacter* sp. C1 απομονώθηκε από έδαφος από την Χιλή χωρίς ιστορικό χρήσης iprodione
- *Raenarthrobacter* sp. NK απομονώθηκε από την ριζόσφαιρα και την φυλλόσφαιρα φυτών πιπερίας που δέχτηκαν πολλαπλές εφαρμογές iprodione

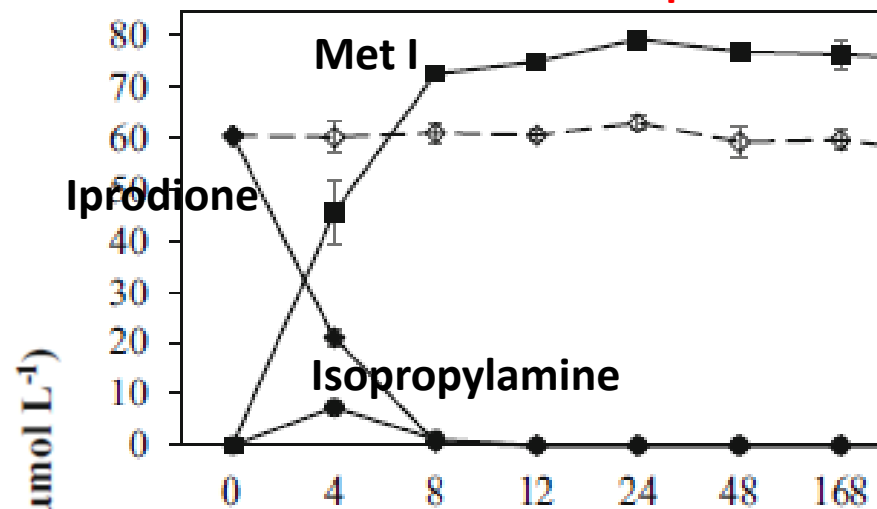




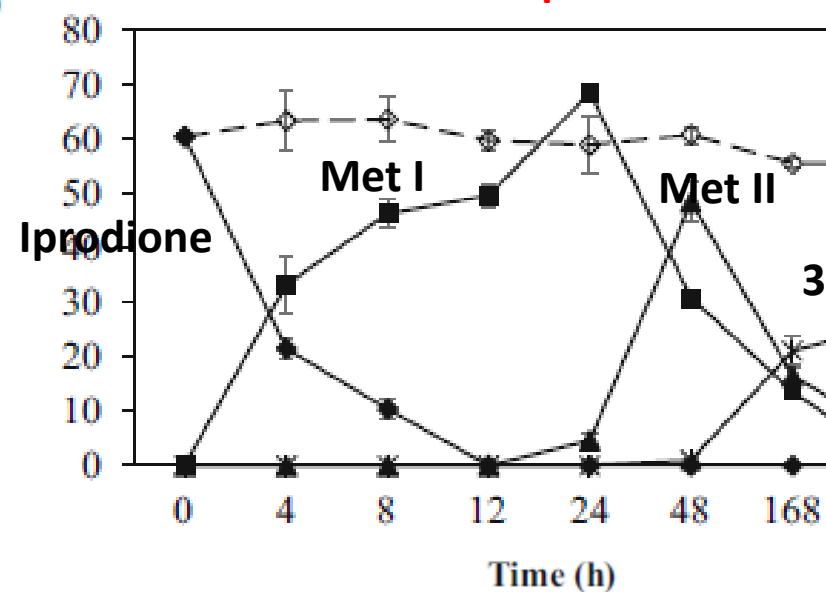
Ενδιαφέρον ότι και τα 4
 βακτήρια που έχουν
 απομονωθεί από
Ελλάδα, Χιλή, Καναδά και
 Κίνα και έχουν την
 δυνατότητα να
 αποδομούν το *iprodione*
 ανήκουν στο γένος
Paenarthrobacter!!!!



Εκλεκτικό θρεπτικό



Πλούσιο θρεπτικό

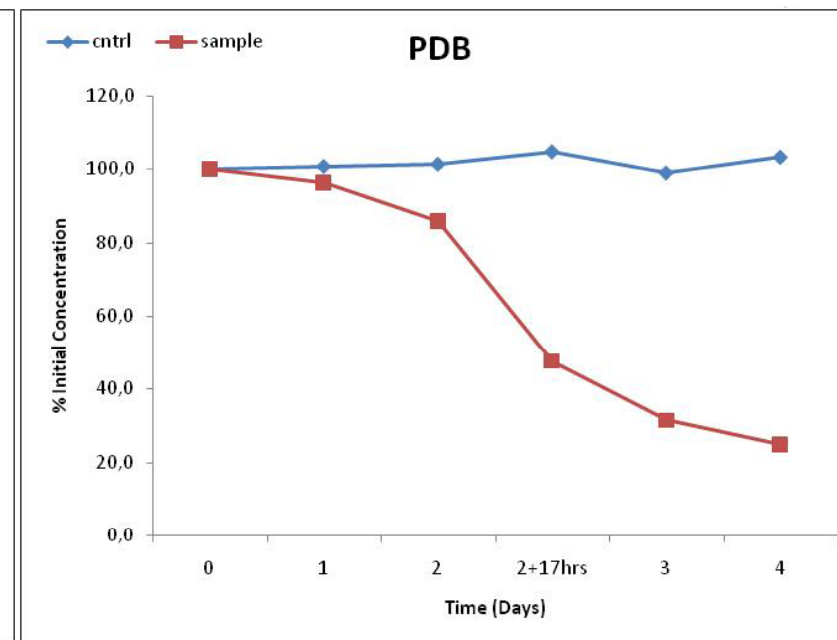
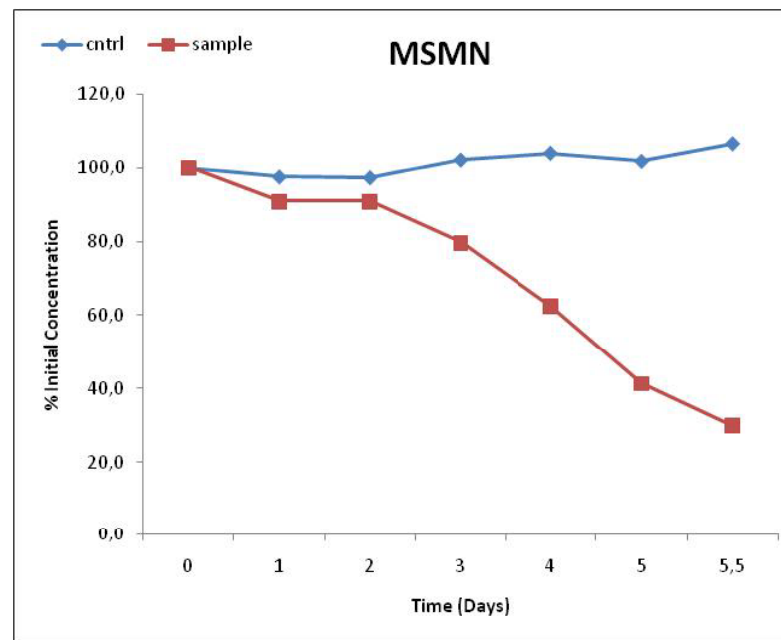




Μικροβιακός μεταβολισμός imazalil

Απομονώθηκε από έδαφος επιβαρυμένο με imazalil
Διασπά το imazalil (100 mg/L) τόσο σε εκλεκτικό μέσο όσο και σε PDB

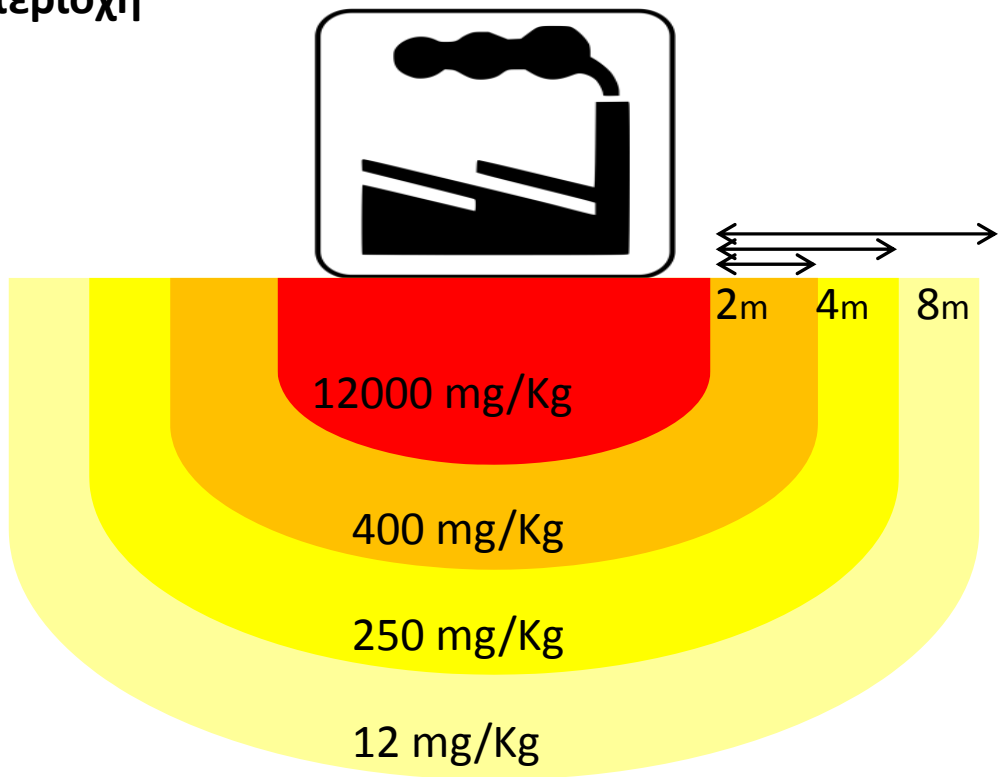
Αναμένεται η μοριακή ταυτοποίηση του μικροοργανισμού



Εφαρμογή βακτηρίων για την εξυγίανση ρυπασμένων εδαφών

Εδαφος επιβαρυνμένο με βαθμίδωση συγκεντρώσεων TBZ

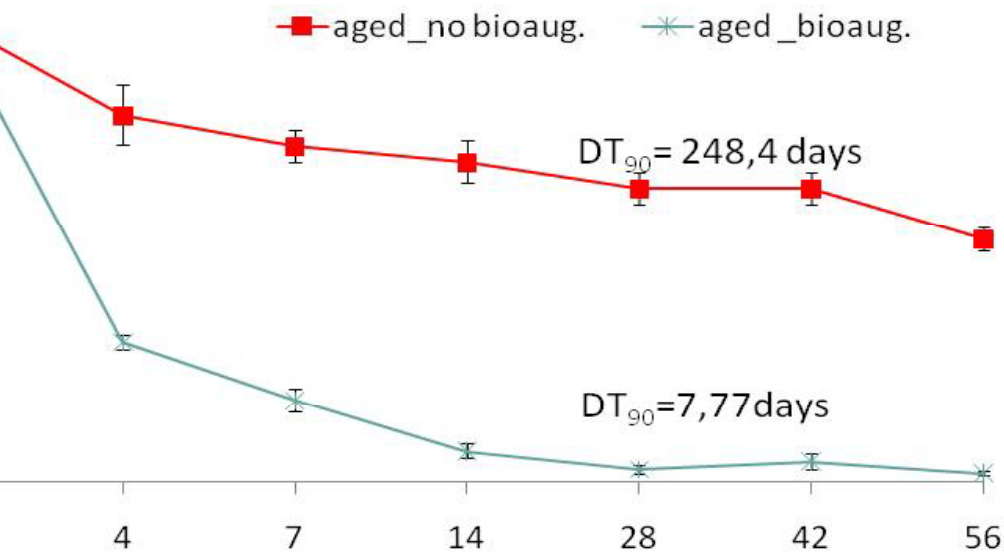
Βαθμίδωση συγκεντρώσεων TBZ στην ρυπασμένη περιοχή



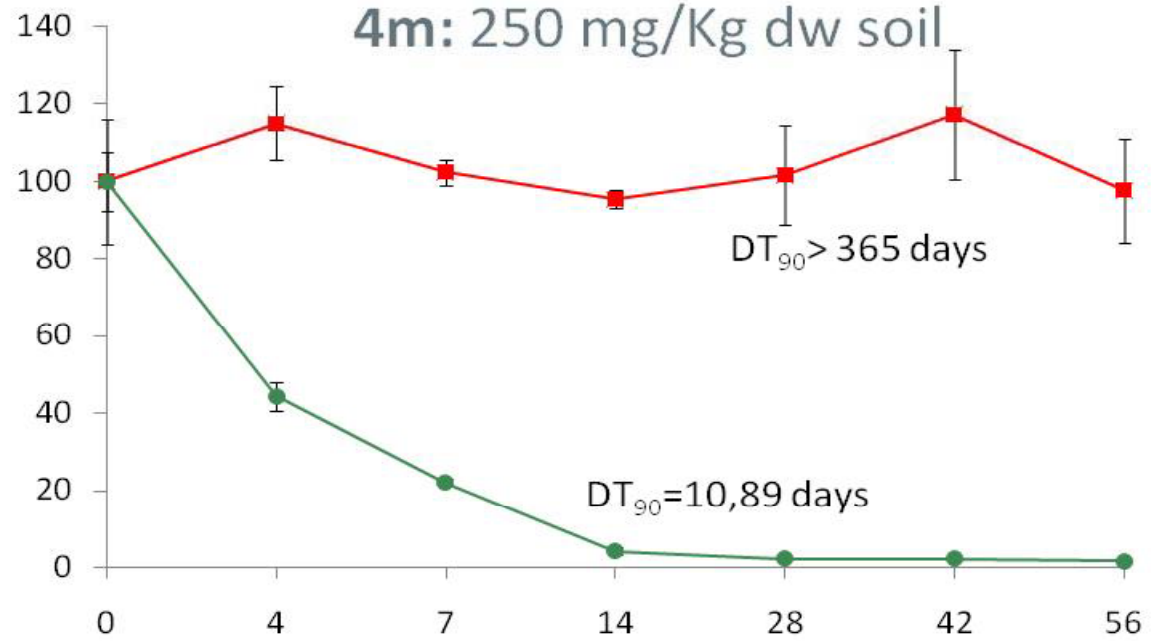
Η ρυπασμένη περιοχή εντοπίστηκε δίπλα σε συσκευαστήριο φρούτων



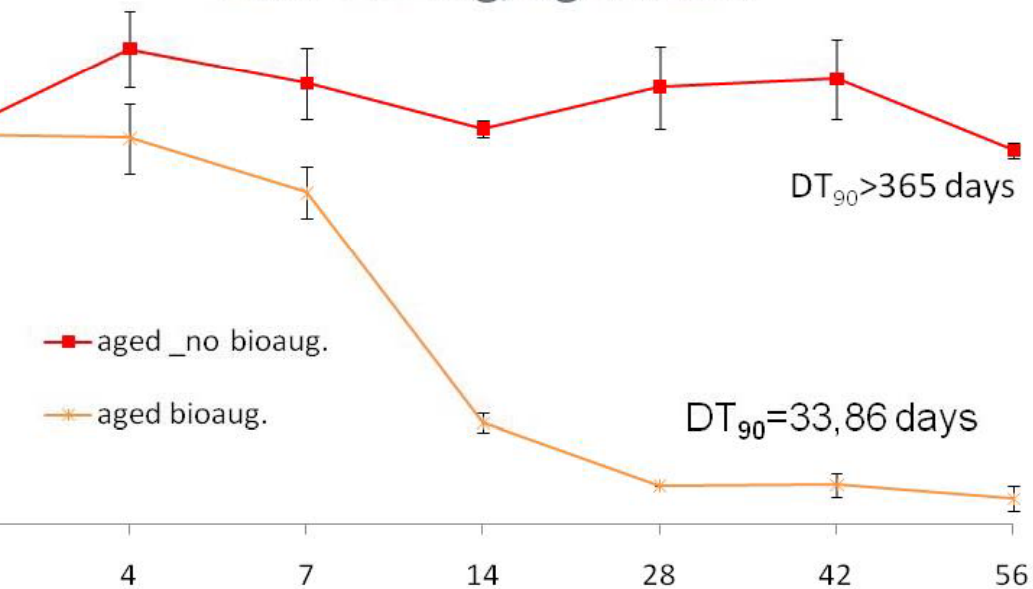
8m: 12 mg/Kg dw soil



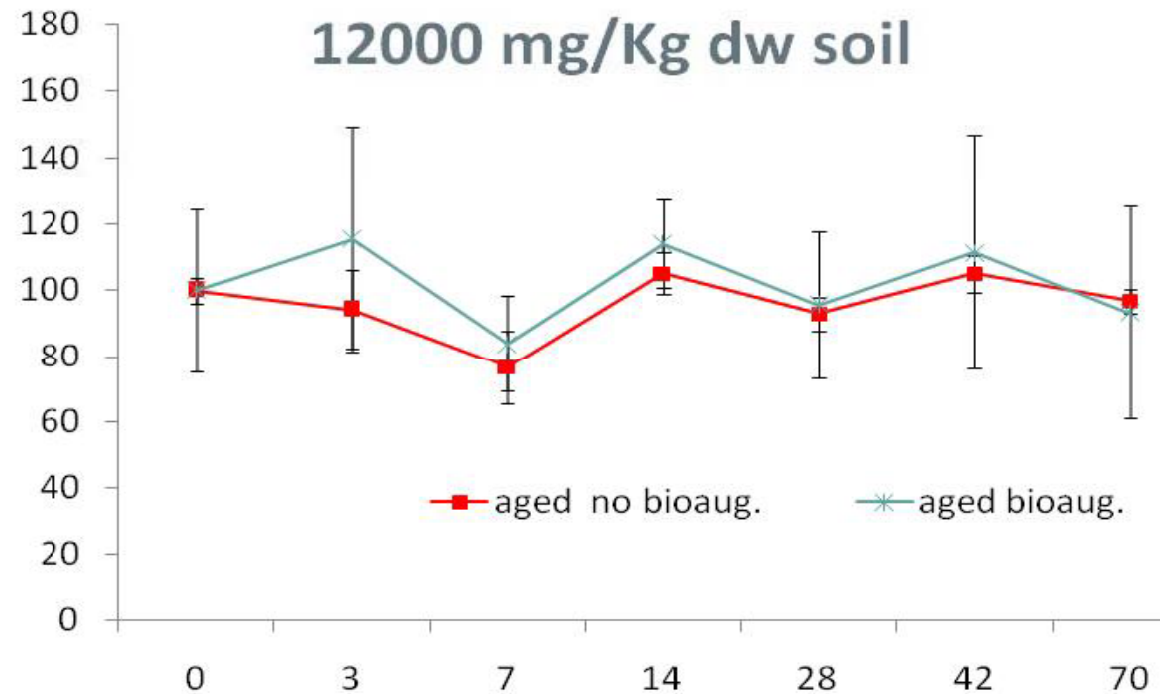
4m: 250 mg/Kg dw soil



2m: 400 mg/Kg dw soil



12000 mg/Kg dw soil

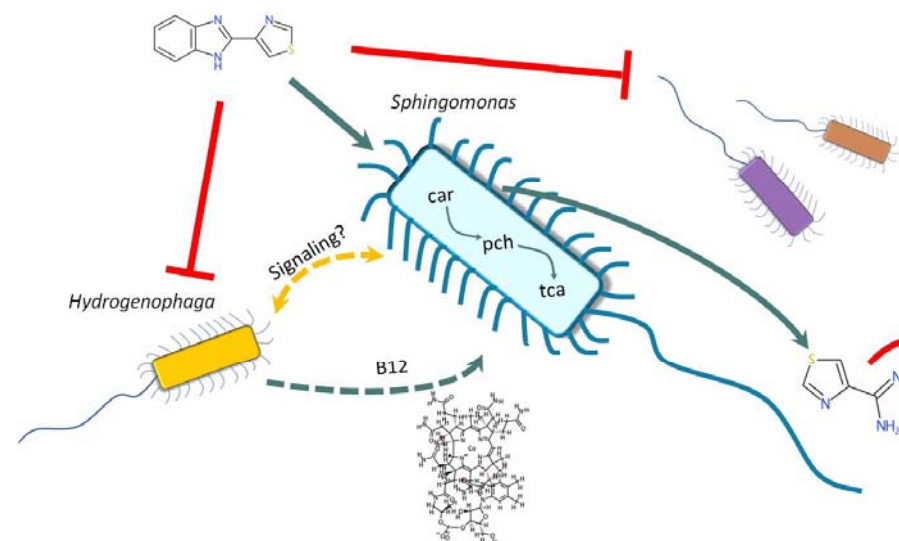


Που βρισκόμαστε.....

- Διαθέσιμη τράπεζα μικροοργανισμών, πλήρως χαρακτηρισμένων, που εμφανίζουν εξειδικευμένη δράση έναντι των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων
- Αποτελεσματικά σε εφαρμογές βιοεμπλουτισμού εδαφών για την εξυγίανση εδαφών σε περιοχές απόρριψης υγρών αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων

Που θέλουμε να πάμε.....

- Δοκιμές των μικροβιακών εμβολίων σε συνθήκες βιοαντιδραστήρα
- Μοριακή ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός του μικροοργανισμού που αποδομεί το imazalil
- Διευκρίνιση του ρόλου των υπολοίπων μελών της βακτηριακής κοινοπραξίας που διασπά το thiabendazole
- Συμπλήρωση της συλλογής με την απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το fludioxonil
- Εντοπισμός των γονιδίων/ενζύμων που εμπλέκονται στο μικροβιακό μεταβολισμό του iprodione



Φηματοδότηση, Συνεργάτες και τα παιδιά.....

«Live-to-Hate» IAPP-FP7-MSCA
«MIGRATE» IF-H2020-MSCA



«FOREMEDIATOMICS»
ΠΡΟΣΤΕΙΑ II, ΓΓΕΤ



«Πρόγραμμα Κρατικών Υποτροφιών»



«OMIC-Engine» Ερευνητική Υποδομή Συνθετική Βιολογίας



Co-financed by Greece and the European Union



UFZ- Leipzig
Antonis Chatzinotas
Nicole Steinbach



Univ. of Almeria
Agüera Ana



Δημοκρίτειο Παν.
Θράκης
Σπύρος Ντούγιας

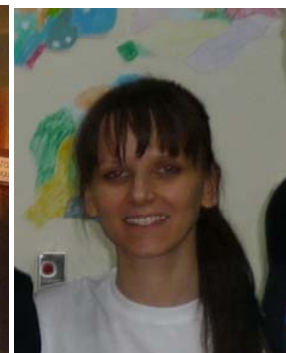
Chiara



Σωτήρης



Κωνσταντίνα



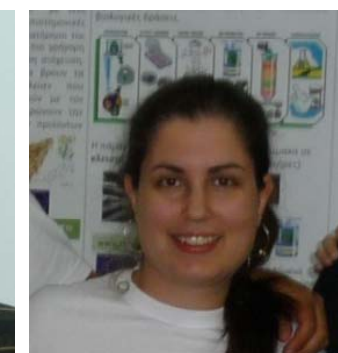
Ευαγγελία



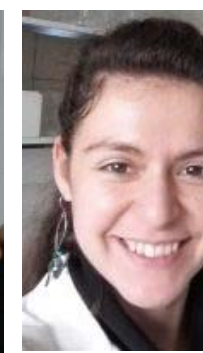
Πάνος



Νάνσυ



Χριστίνα



«MINOTAUR» ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ



Co-financed by Greece and the European Union