



Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Παραδοτέο Π.4.6.2: Αναφορά της συμπεριφοράς των μεταβολιτών των βακτηρίων στο έδαφος

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.4.6.2**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ4**

Επικεφαλής δικαιούχος: **[ΓΠΑ]**

Συγγραφείς: **[Γιαννακού Ιωάννης]**

Έκδοση: **1**

Είδος Παραδοτέου: **[Έκθεση]**

Ημερομηνία παράδοσης: **[15/05/2025]**

Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (EN): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: ΤΑΕDR-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	5
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	6
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	6
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	6
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	8
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- Βιβλιογραφικές Αναφορές	9

Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχισης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

Σύνοψη της ΕΕ4

Στην ΕΕ4 θα αναπτυχθούν δράσεις που θα ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα της βιολογικής καταπολέμησης. Θα γίνει βελτίωση της αρμοστικότητας των ωφέλιμων αρπακτικών και ενίσχυση της δράσης τους, καθώς επίσης και αξιοποίηση της λειτουργικής βιοποικιλότητας για την ανάπτυξη καλύτερα προσαρμοσμένης βιολογικής καταπολέμησης. Θα αναπτυχθούν βελτιωμένα προϊόντα για τη βιολογική καταπολέμηση, θα διερευνηθεί η αξιοποίηση άγριων αυτοφυών φυτών για την ενίσχυση των οικοσυστημικών υπηρεσιών για την αντιμετώπιση επιβλαβών οργανισμών μέσω της βιολογικής καταπολέμησης και θα ενισχυθεί η δράση παρασιτοειδών με χρήση ουσιών φυσικής προέλευσης ή/και «ωφέλιμων ιών». Θα αναπτυχθούν βελτιωμένες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των εχθρών μέσω της χρήσης βακτηρίων και μικροοργανισμών. Θα αναπτυχθούν τέλος καινοτόμες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των ζιζανίων, μέσω προσεγγίσεων αξιοποίησης της βιοποικιλότητας και καλλιεργητικών πρακτικών.

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π4.6.2

Σκοπός του παραδοτέου Π4.6.2 είναι να γίνει μία αναφορά της συμπεριφοράς των μεταβολιτών των βακτηρίων στο έδαφος. Θα διερευνηθεί η μετακίνηση των βακτηρίων και των μεταβολιτών τους στο έδαφος με σκοπό να προβλεφθεί η προσρόφηση τους στο έδαφος, η παραμονή τους και εντέλει η συμπεριφορά τους σχετικά με την υπολειμματική δράση τους.

Η πρόοδος των εργασιών στο πλαίσιο του ΠΕ 4.6.2 κρίνεται ικανοποιητική και είναι εντός του αρχικού στόχου που έχει τεθεί.

Συνοπτικά, τα σημαντικότερα αποτελέσματα στο πλαίσιο του Π4.6.2 είναι τα εξής:

- Από τα έως τώρα αποτελέσματα προκύπτει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των

κυττάρων των βακτηρίων δεσμεύεται στα πρώτα 10 εκ. της στήλης του εδάφους. Αρκετά μικρότερο ποσοστό μετακινείται έως το βάθος των 20 εκ. ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό κυττάρων απομονώθηκε από το τμήμα της εδαφικής στήλης που βρίσκεται στα 20-30 εκατοστά.

- Η χρήση του tween-20 δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσο επηρεάζει τη μετακίνηση και δέσμευση των κυττάρων των βακτηρίων στο έδαφος.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

-Εισαγωγή

Οι κομβονηματώδεις αποτελούν σημαντικά παράσιτα των λαχανοκομικών φυτών ιδιαίτερος αυτών που αναπτύσσονται εντός θερμοκηπίων. Η μείωση των διαθέσιμων εμπορικών σκευασμάτων έχει οδηγήσει τους ερευνητές στη χρήση νέων μεθόδων αντιμετώπισης των επιζήμιων νηματωδών. Βιονηματωδοκτόνα τα οποία περιέχουν βακτήρια δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς όσον αφορά τη συμπεριφορά τους στο έδαφος. Επομένως ο κύριος στόχος του ΠΕ 4.6.2 είναι η μελέτη της συμπεριφοράς ορισμένων βακτηριακών διαλυμάτων στο έδαφος και καταγραφή των αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια τα οποία έχουν δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά τον έλεγχο των κομβονηματωδών από το ΠΕ 4.6.1. Για την επίτευξη του στόχου του ΠΕ 4.6.2 χρησιμοποιήθηκαν στήλες εδάφους διαστάσεων 10 x 30cm κατασκευασμένες από σωλήνες PVC.

-Σκοπός του παρόντος εγγράφου

Σκοπός του παρόντος εγγράφου είναι η λεπτομερής περιγραφή των στόχων του συγκεκριμένου ΠΕ 4.6.2, των υλικών και μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να επιτευχθούν οι στόχοι που έχουν τεθεί εξ αρχής, η λεπτομερής παρουσίαση των αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει και εν κατακλείδι η παρουσίαση των συμπερασμάτων.

- Δομή του παρόντος εγγράφου

Περιγράφονται αναλυτικά τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε πείραμα. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει ενώ οι πίνακες των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στο Παράρτημα του αρχείου. Στο τέλος του κειμένου παρουσιάζονται επιγραμματικά τα σημαντικότερα συμπεράσματα που έχουν προκύψει.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

Ανάπτυξη βακτηριακού διαλύματος

Τα βακτηριακά στελέχη που συμμετείχαν στην μελέτη διατηρούνται σε καθαρές καλλιέργειες σε τράπεζα στο εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας και στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ενώ οι μονές αποικίες αυτών βρίσκονται σε stock (υδατικό διάλυμα 30% γλυκερόλης) σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C). Τα βακτήρια αναπτύσσονταν σε στερεά θρεπτικά μέσα (Nutrient Agar) μετά από επώαση στους 30 °C για 24 ώρες. Μονήρεις αποικίες αυτών, επιλέχθηκαν για τον εμβολιασμό υγρού μέσου ανάπτυξης που περιείχε σε αναλογία 1:1 Nutrient Broth και R2A αντίστοιχα και επώαση 24 ωρών σε 180 στροφές το λεπτό (rpm). Συγκεκριμένα παρήχθησαν βακτηριακά διαλύματα τελικής συγκέντρωσης 10⁹ cfu/ml σε υγρό μέσο ανάπτυξης που περιείχε σε αναλογία 1:1 Nutrient Broth και R2A αντίστοιχα.

Στήλες εδάφους

Δοκιμάστηκαν σε προκαταρκτικές δοκιμές διαφορετικοί τύποι στηλών και τελικά επιλέχθηκαν στήλες διαστάσεων 10 x 30cm (**Εικόνα 1**). Στο κάτω άκρο της κάθε στήλης τοποθετήθηκε δίχτυ συγκράτησης του εδάφους και η στήλη τοποθετήθηκε σε δίσκο συλλογής του απορρέοντος εδαφικού διαλύματος. Έγιναν προκαταρκτικές δοκιμές ώστε να ελεγχθεί η μετακίνηση του νερού σε διαφορετικής σύστασης εδάφη και να δοκιμαστούν διαφορετικά σενάρια άρδευσης. Τελικά επιλέχθηκε έδαφος από παραγωγικό θερμοκήπιο το οποίο παστεριώθηκε πριν τη χρήση του. Η καταγραφή της μετακίνησης του νερού και κατ' επέκταση των βακτηρίων και των μεταβολιτών τους πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας τεμαχισμού του εδάφους της στήλης σε τρία τμήματα (0-10, 10-20, και 20-30 cm).

Εφαρμογή του διαλύματος

Ποσότητα βακτηριακού διαλύματος ίση με 100ml (μεταχείριση 1) και 50ml (μεταχείριση 2) εφαρμοζόταν στη κορυφή της στήλης με προσοχή ώστε να πραγματοποιηθεί καλή διαβροχή του εδάφους σε όλη την επιφάνεια της στήλης. Στη μεταχείριση 2 το τελικό διάλυμα συμπληρώθηκε με 50ml καθαρού νερού. Ακολουθούσε πότισμα της στήλης κάθε δεύτερη ημέρα με ποσότητα νερού ίση με 100ml η οποία εφαρμοζόταν με τη χρήση υδροβολέα ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη εφαρμογή σε όλη την επιφάνεια της στήλης. Οι εφαρμογές περατώθηκαν 10 ημέρες μετά την εφαρμογή των βακτηριακών

διαλυμάτων όταν άρχισε η απορροή του νερού στο πυθμένα της κάθε στήλης.

Απομόνωση βακτηρίων από το έδαφος

Χρησιμοποιήθηκε βακτηριακό διάλυμα με ή χωρίς tween-20. Το tween-20 χρησιμοποιήθηκε διότι υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία ότι βοηθά στη καλύτερη ενσωμάτωση των βακτηριακών κυττάρων στο έδαφος. Η απομόνωση των βακτηρίων θα πραγματοποιηθεί όπως περιγράφεται παρακάτω. Δείγματα χώματος 3 g από τα 10, 20 και 30 cm των στηλών εδάφους, τοποθετήθηκαν σε κωνικές με 5 ml αποστειρωμένου και απιονισμένου νερού. Για τον προσδιορισμό του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και η καταμέτρηση των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (cfu/ml). Τρυβλία που περιείχαν το θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar, επιστρώθηκαν με 100 μl της εκάστοτε αραιώσης και επώαστηκαν στους 30 °C σε σκοτεινό θάλαμο. Οι βακτηριακές αποικίες μετρήθηκαν 2 μέρες μετά την επίστρωση. Για κάθε ύψος στήλης πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις..

2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Μετά το πέρας του πειράματος πραγματοποιήθηκε τεμαχισμός των στηλών εδάφους, απομονώθηκαν τα βακτήρια από το έδαφος και πραγματοποιήθηκαν οι αραιώσεις και η καταμέτρηση των βιώσιμων μονάδων (cfu/ml). Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Πίνακα 1** (δύο επαναλήψεις A & B) ως αριθμός βιώσιμων μονάδων (cfu/ml) μετά από εφαρμογή 100 ή 50 ml βακτηριακού διαλύματος, με ή χωρίς τη παρουσία tween-20. Από τα έως τώρα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο πίνακα 1 προκύπτει ότι στα πρώτα 10 εκ. εδάφους υπάρχει αρκετά υψηλότερο φορτίο βακτηρίων σε σύγκριση με τα άλλα δύο βάθη εδάφους δηλ. 10-20 και 20-30 εκατοστά. Επίσης δεν είναι ξεκάθαρο με τα αποτελέσματα από το πείραμα αυτό εάν υπάρχει σημαντική διαφορά του επιπέδου των βακτηρίων με χρήση ή χωρίς του Tween-20.

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύνοψη

Οι κομβοημάτων αποτελούν ένα σημαντικό και συνάμα δυσεπίλυτο πρόβλημα των λαχανοκομικών καλλιεργειών που αναπτύσσονται σε θερμοκήπια στην Ελληνική Επικράτεια. Εξαιτίας των προβλημάτων που έχουν δημιουργηθεί με τα χημικά σκευάσματα, η έρευνα αλλά και οι παραγωγοί έχουν στραφεί και στη χρήση βιονηματοδοκτών τα οποία περιέχουν βακτήρια. Ωστόσο δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τη συμπεριφορά αυτών των σκευασμάτων στο έδαφος μετά την εφαρμογή τους. Στο ΠΕ 4.6.2 έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί η συμπεριφορά ενός βακτηριακού διαλύματος σε έδαφος που συλλέχθηκε από παραγωγικό θερμοκήπιο προσομοιάζοντας ένα σενάριο άρδευσης που ακολουθείται από παραγωγούς. Χρησιμοποιήθηκαν στήλες εδάφους διαστάσεων 10 x 30 cm, και εφαρμογή είτε αμιγούς βακτηριακού διαλύματος (μεταχείριση 100%) είτε βακτηριακού διαλύματος αραιωμένου στο 1/2 της αρχικής περιεκτικότητας (μεταχείριση 50%). Καταγράφηκε η μετακίνηση του διαλύματος μετά από τεμαχισμό του εδάφους της στήλης σε τρία τμήματα (0-10, 10-20, 20-30 εκ.). Σημαντικά μεγάλη ποσότητα βακτηρίων καταγράφηκε στα πρώτα 10 εκατοστά του εδάφους ακολουθούμενη από αρκετά μικρότερη στα επόμενα 10 εκ. (10-20 εκ.) και υπήρξε πολύ μικρή ποσότητα βακτηρίων σε βάθος 20-30 εκ.

Συμπεράσματα

Σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα βακτηρίων δεσμεύεται στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους(0-10 cm) όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του πειράματος.

Η παρουσία του διαβρεκτικού παράγοντα tween-20 δεν είναι ξεκάθαρο εάν βοηθά στη μετακίνηση του βακτηριακού διαλύματος σε βαθύτερα στρώματα εδάφους.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Εικόνα 1. Στήλες εδάφους (10D x 30L cm) που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα μετακίνησης του βακτηριακού διαλύματος.



Πίνακας 1(Α)

100% (χωρίς tween) Αποικίες (cfu/100μl)						
	1		2		3	
10 cm	45	10 ⁴	53	10 ⁴	31	10 ⁴
20 cm	22	10 ³	10	10 ³	39	10 ³
30 cm	70	10 ¹	33	10 ¹	12	10 ¹
50% (χωρίς tween) Αποικίες (cfu/100μl)						
	1		2		3	
10 cm	22	10 ³	78	10 ³	16	10 ³
20 cm	19	10 ¹	31	10 ¹	11	10 ¹
30 cm	43	10 ⁰	67	10 ⁰	65	10 ⁰
100% (με tween) Αποικίες (cfu/100μl)						
	1		2		3	
10 cm	97	10 ⁴	110	10 ⁴	67	10 ⁴
20 cm	41	10 ³	15	10 ³	29	10 ³
30 cm	55	10 ¹	16	10 ¹	21	10 ¹
50% (με tween) Αποικίες (cfu/100μl)						
	1		2		3	
10 cm	32	10 ³	28	10 ³	45	10 ³
20 cm	17	10 ¹	50	10 ¹	65	10 ¹
30 cm	19	10 ⁰	23	10 ⁰	87	10 ⁰
Μάρτυρας Αποικίες (cfu/100μl)						
	1		2		3	
10 cm	0	10 ⁰	3	10 ⁰	1	10 ⁰
20 cm	0	10 ⁰	0	10 ⁰	0	10 ⁰
30 cm	0	10 ⁰	0	10 ⁰	0	10 ⁰

100% (χωρίς tween) Αποικίες (cfu/100μl)			
	1	2	3
10 cm	4500000	4500000	3100000
20 cm	220000	10000	390000
30 cm	7000	3300	1200
50% (χωρίς tween) Αποικίες (cfu/100μl)			
	1	2	3
10 cm	220000	780000	160000
20 cm	1900	3100	1100
30 cm	430	670	650
100% (με tween) Αποικίες (cfu/100μl)			
	1	2	3
10 cm	9700000	11000000	6700000
20 cm	410000	150000	290000
30 cm	5500	1600	2100
50% (με tween) Αποικίες (cfu/100μl)			
	1	2	3
10 cm	320000	28000	450000
20 cm	1700	500	6500
30 cm	190	230	870
Μάρτυρας Αποικίες (cfu/100μl)			
	1	2	3
10 cm	0	30	10
20 cm	0	0	0
30 cm	0	0	0

Πίνακας 1(Β)

100% (χωρίς tween) Αποικίες (cfu/100μl)						
	1		2		3	
10 cm	32	10 ⁴	22	10 ⁴	40	10 ⁴
20 cm	37	10 ³	45	10 ³	56	10 ³
30 cm	62	10 ¹	13	10 ¹	62	10 ¹
50% (χωρίς tween) Αποικίες (cfu/100μl)						
	1		2		3	
10 cm	56	10 ³	28	10 ³	42	10 ³
20 cm	41	10 ¹	52	10 ¹	9	10 ¹
30 cm	59	10 ⁰	12	10 ⁰	27	10 ⁰
100% (με tween) Αποικίες (cfu/100μl)						
	1		2		3	
10 cm	41	10 ⁴	143	10 ⁴	89	10 ⁴
20 cm	77	10 ³	19	10 ³	32	10 ³
30 cm	49	10 ¹	27	10 ¹	3	10 ¹
50% (με tween) Αποικίες (cfu/100μl)						
	1		2		3	
10 cm	14	10 ³	18	10 ³	32	10 ³
20 cm	55	10 ¹	2	10 ¹	17	10 ¹
30 cm	21	10 ⁰	19	10 ⁰	34	10 ⁰
Μάρτυρας Αποικίες (cfu/100μl)						
	1		2		3	
10 cm	0	10 ⁰	0	10 ⁰	4	10 ⁰
20 cm	3	10 ⁰	1	10 ⁰	0	10 ⁰
30 cm	0	10 ⁰	0	10 ⁰	0	10 ⁰

100% (χωρίς tween) Αποικίες (cfu/100μl)			
	1	2	3
10 cm	3200000	2200000	4000000
20 cm	370000	45000	560000
30 cm	6200	1300	6200
50% (χωρίς tween) Αποικίες (cfu/100μl)			
	1	2	3
10 cm	560000	280000	420000
20 cm	4100	5200	900
30 cm	590	120	270
100% (με tween) Αποικίες (cfu/100μl)			
	1	2	3
10 cm	4100000	14300000	8900000
20 cm	770000	190000	320000
30 cm	4900	2700	300
50% (με tween) Αποικίες (cfu/100μl)			
	1	2	3
10 cm	140000	18000	320000
20 cm	5500	200	1700
30 cm	210	190	370
Μάρτυρας Αποικίες (cfu/100μl)			
	1	2	3
10 cm	0	0	40
20 cm	30	10	0
30 cm	0	0	0