



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας» «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Απομόνωση και Ταυτοποίηση Βακτηρίων με την Ικανότητα
Αποδόμησης του μυκητοκτόνου *ortho-phenylphenol* »**

ΠΑΤΣΙΟΥΡΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

Λάρισα 2011

«Απομόνωση και Ταυτοποίηση Βακτηρίων με την Ικανότητα Αποδόμησης του μυκητοκτόνου ortho-phenylphenol»

Υπεύθυνος Καθηγητής

Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής Επιτροπή:

- Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μόσσιαλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Δημήτριο Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την πολύτιμη βοήθεια και καίρια παρέμβαση του καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής και συγγραφικής εργασίας της διπλωματικής αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Chiara Perruchon για την συνεχή επίβλεψή και βοήθεια που μου παρείχε πρόθυμα στα διάφορα πειραματικά στάδια. Ακόμη, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία καθόλη τη διάρκεια της παραμονής μου σ' αυτό καθώς και τον κύριο Ν.Μεσδενίτη, γεωπόνο που μου παρείχε πληροφορίες σχετικές με το θέμα της εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, για την πλήρη υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μυκητοκτόνο ortho-phenylphenol (OPP) χρησιμοποιείται εκτεταμένα στα συσκευαστήρια φρούτων για την προστασία αχλαδιών και εσπεριδοειδών από μυκητολογικές προσβολές κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Η μετασυλλεκτική εφαρμογή του OPP οδηγεί στην παραγωγή σημαντικού όγκου υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις (εως και 600 mg/L) από το μυκητοκτόνο και σύμφωνα με την κοινοτική νομοθεσία χρήζουν επεξεργασίας στον τόπο παραγωγής. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν επαρκής και αποτελεσματικές μέθοδοι για την επεξεργασία αυτών των αποβλήτων. Έτσι μελετήθηκε η απομόνωση βακτηρίων που θα έχουν την ικανότητα να αποδομούν το μυκητοκτόνο OPP με βαθύτερο στόχο την χρήση τους σε μονάδες βιολογικής επεξεργασίας αποβλήτων από συσκευαστήρια. Έτσι με την μέθοδο των εμπλουτισμένων καλλιεργειών απομονώθηκαν από δείγμα εδάφους από την περιοχή της Αγιάς που είχε ιστορικό απορρίψης αποβλήτων με OPP αρχικά 15 βακτηριακά στελέχη που είχαν την ικανότητα να διασπών το μυκητοκτόνο σε λιγότερο από 7 ημέρες σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MSMN + OPP (20 mg/L) όπου το OPP αποτελούσε την μοναδική πηγή C. Επίστρωση των καλλιεργειών σε τριβλία LB έδειξαν ότι μόνο 2 από τις 15 καλλιέργειες ήταν αμιγής και ακολούθησε μοριακή ταυτοποίηση τους μέσω αλληλούχισης του 16S rRNA γονιδίου. Ομοπαράθεση των αλληλουχιών για τα δύο στελέχη στη βάση δεδομένων EMBL με την βοήθεια του εργαλείου BLAST έδειξαν ότι τα δύο βακτήρια αποτελούν συγγενικά στελέχη του ίδιου είδους *Pseudomonas stutzeri*. Περαιτέρω μελέτη της κινητικής διάσπασης του OPP σε θρεπτικό μέσο MSMN από τα δύο βακτήρια έδειξε ότι το στέλεχος 26 είχε την ικανότητα να διασπά το OPP πλήρως εντός 3 ημερών σε αντίθεση με το στέλεχος 21 που κατάφερε να διασπάσει 70% της αρχικής ποσότητας OPP εντός 14 ημερών. Συνολικά στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μια ακόμη αναφορά για την απομόνωση βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να διασπών ταχύτατα το OPP. Περαιτέρω μελέτες θα στοχεύσουν στην απομόνωση και άλλων βακτηρίων (από τις απομονωθέντες μικτές καλλιέργειες) που έχουν την ικανότητα να αποδομούν το OPP καθώς και στην διευκρίνιση του μεταβολικού μονοπατιού του OPP από τα βακτηριακά στελέχη που έχουν απομονωθεί.

ABSTRACT

Fungicide ortho-phenylphenol (OPP) is widely used for the packaging and protection of pears as well as orange fruits against fungi, during their storage. Treatment with OPP after fruit's selection produces a significant volume of liquid waste products which contain high concentrations (almost 600 mg/L) of fungicide. According to European legislation these residues should be converted into non harmful water products at the point of their production. Up until now there haven't been any sufficient and effective methods for the treatment of these residues. For that reason we tried to isolate bacteria which will be able to degrade the fungicide OPP, aiming at being used in units of biological conversion of waste products from the packaging point. Applying the method of enriched cultures which were isolated from a soil sample of Agia region, a place that was treated with OPP for years, we isolated 15 different bacteria colonies with the ability to degrade the fungicide in less than 7 days. These bacteria were grown into a MSMN+OPP nutritive mean (20 mg/L) where OPP is the only carbon source. By plating cultures on LB plates we found that only 2 of the 15 colonies were single. We continued with the isolation of the 16S rRNA gene in order to identify them molecularly. The comparison between the sequences of the two bacteria strains through BLAST alignment tool showed that both bacteria belong to related strain of the same specie, *Pseudomonas stutzeri*. Further research on the kinetic degradation of OPP in MSMN media from both bacteria showed that strain 26 has the ability to degrade OPP fully within 3 days, whereas strain 21 manages to degrade only 70% of the initial quantity of OPP within 14 days. There is only one other reference in international literature concerning the isolation of bacteria that can degrade rapidly OPP. Further experiments will aim at the isolation of other bacteria (from the isolated mixed cultures) that could degrade OPP as well as at the clarification of the OPP metabolic pathway from bacterial strains that were isolated.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Περιβαλλοντική ρύπανση από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων - Μετασσυλεκτική μεταχείριση εσπεριδοειδών.....	8
1.2 Βιολογική απορρύπανση.....	10
1.3 Ortho-phenylphenol (OPP).....	10
1.3.1 Χρήσεις.....	10
1.3.2 Τοξικότητα.....	10
1.3.3 Περιβαλλοντική τύχη και μικροβιακός μεταβολισμός του OPP.....	11
1.4 Αποδόμηση υδρογονανθράκων.....	11
1.5 Σκοπός πειραματικής διαδικασίας.....	12

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Έδαφος.....	14
2.2 Γεωργικά φάρμακα	16
2.3 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης.....	16
2.3.1 Παρασκευή θρεπτικού μέσου εκχυλίσματος εδάφους (SEM).....	16
2.3.2 Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (MSM+N).....	17
2.3.3 Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB (Luria Bertani).....	17
2.4 Μέθοδος ανάλυσης OPP σε σύστημα HPLC.....	18
2.5 Εφαρμογή OPP στο έδαφος για ενεργοποίηση της μικροβιακής κοινότητας.....	19
2.6 Εμπλουτισμένες καλλιέργειες για την απομόνωση αποδομητικών βακτηρίων.....	19
2.6.1 Κύκλοι ανακαλλιέργειας στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες.....	20
2.7 Απομόνωση αποδομητικών βακτηρίων που διασπών το μυκητοκτόνο OPP από το έδαφος.....	20
2.7.1 Επιλογή αποικιών και έλεγχος της αποδομητικής τους ικανότητας.....	21

2.7.2 Εξαγωγή DNA από τις αμιγείς αποικίες των βακτηρίων.....	22
2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	23
2.9 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτη αγαρόζης.....	26
2.9.1 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA από τις αμιγείς αποικίες των βακτηρίων και των προϊόντων της PCR.....	26
2.10 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR (PCR purification).....	27
2.11 Ένθεση (Ligation).....	27
2.12 Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα <i>E.coli</i>	28
2.13 Επιλογή θετικών κλώνων από τα τριβλία LB.....	29
2.14 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Plasmid extraction).....	29
2.15 Μελέτη της κινητικής αποδόμησης του OPP σε υγρές καλλιέργειες από τα απομονωθέντα βακτήρια.....	30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποδόμηση του OPP σε καλλιέργειες εμπλουτισμού.....	31
3.2 Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το OPP.....	33
3.3 Ταυτοποίηση των βακτηρίων που αποδομούν το OPP.....	34
3.4 Μελέτη της κινητικής διάσπασης του OPP από τα στελέχη 21 και 26.....	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Αποδομητική ικανότητα των απομονωθέντων βακτηρίων-Κινητική τους- Προτεινόμενος μηχανισμός αποδόμησης από στελέχη <i>Pseudomonas</i>	38
4.2 Συμπεράσματα και μελλοντικές ερευνητικές κατευθύνσεις.....	40

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41
---------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων-Μετασυλλεκτική μεταχείριση εσπεριδοειδών

Η χρήση των παρασιτοκτόνων στην γεωργική πρακτική μετρά ήδη έναν αιώνα μέσα στον οποίο σημαντικές βελτιώσεις τους έχουν επιτευχθεί, αν αναλογιστεί κανείς πως κάποτε το ιδιαίτερα τοξικό και υπολειμματικό DDT αποτελούσε την πρώτη και πιο αποτελεσματική επιλογή για τους παραγωγούς μετά τον Β' Παγκόσμιο πόλεμο. Κατά τα τελευταία 30 έτη έχουν εισαχθεί στην αγορά και χρησιμοποιούνται νέες ομάδες γεωργικών φαρμάκων που χαρακτηρίζονται από υψηλή αποτελεσματικότητα σε χαμηλές δόσεις και μικρή υπολειμματικότητα. Πάραυτα τα περισσότερα γεωργικά φάρμακα ακόμα και σήμερα παρουσιάζουν τοξικότητα σε οργανισμούς μη στόχους. Για μεν τον χρήστη τα προβλήματα δημιουργούνται κύρια από την μη ορθολογική χρήση των γεωργικών φαρμάκων με αποτέλεσμα τη έκθεσή του σε αυτά, για δε τον καταναλωτή από ενδεχόμενα, εκτός των προβλεπομένων ορίων, υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων στα τρόφιμα.

Η μη ορθολογική χρήση των γεωργικών φαρμάκων οδηγεί σε ρύπανση των υδάτινων πόρων.. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γεωργικών φαρμάκων στα υδάτινα οικοσυστήματα έχει άμεσες επιπτώσεις στα ψάρια και στους υπόλοιπους υδρόβιους οργανισμούς (Environmental Defence Fund 2004) αλλά και στον άνθρωπο στις περιπτώσεις που το νερό χρησιμοποιείται ως πόσιμο.

Η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων έχει οδηγήσει σε πολλές περιπτώσεις στη συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος πολλά από τα οποία διασπώνται σταδιακά από τους μικροοργανισμούς του εδάφους (υδρόλυση, οξείδωση, διάσπαση, εξάτμιση, δράση μικροοργανισμών). Έχει όμως παρατηρηθεί ότι ορισμένα γεωργικά φάρμακα ή τα προϊόντα αποσύνθεσης του μεταβολισμού τους έχουν αρνητική επίδραση στους μικροοργανισμούς του εδάφους όπως για παράδειγμα το captan που έχει τοξική επίδραση στο *Rhizobium*, συμβιωτικό βακτήριο των ψυχανθών (Saxena et al. 1997) Ειδικά στην περιοχή όπου διαβιούμε το πρόβλημα από την αλόγιστη χρήση των γεωργικών φαρμάκων είναι πιο ανησυχητικό καθώς η έντονη γεωργική δραστηριότητα στον θεσσαλικό κάμπο οδηγεί σε επιβάρυνση των φυσικών υδάτινων πόρων της περιοχής με γεωργικά φάρμακα και λιπάσματα. Η εκτεταμένη παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων

γεωργικών φαρμάκων στα νερά επιφανειακών υδατικών συστημάτων της Θεσσαλίας όπως ο ποταμός Πηνειός έχει διαπιστωθεί από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία έτη στην περιοχή. Ερευνητικά δεδομένα της τελευταίας εικοσαετίας καταδεικνύουν τη σημαντική συμβολή των σημειακών πηγών στη ρύπανση των φυσικών υδροφόρων συστημάτων από γεωργικά φάρμακα. Η σημειακή ρύπανση από γεωργικά φάρμακα προκύπτει από μη ορθολογικούς χειρισμούς των αδιάθετων πλεοναζόντων ψεκαστικών υγρών, ατυχήματα ή διαρροές κατά την προετοιμασία του ψεκαστικού υγρού ή σε απόνερα από το πλύσιμο των ψεκαστικών μηχανημάτων (Αγγελοπούλου Φ. και Τζιουβάρα Κ.2007). Στη παραπάνω διάσταση της σημειακής ρύπανσης και με αφορμή αυτή, σε συσκευαστήρια εσπεριδοειδών και αχλαδιών από την περιοχή της Αγιάς μετασυλλεκτικά, εφαρμόζεται στα φρούτα μεταχείριση με το μυκητοκτόνο orthophenylphenol με σκοπό να συντηρηθούν παραπάνω στα ράφια και στους χώρους αποθήκευσής τους μέχρι την κατανάλωση τους. Πιο συγκεκριμένα το δείγμα που χρησιμοποιήσαμε προέρχεται από έδαφος συσκευαστηρίων φρούτων στην περιοχή το οποίο έχει επιβαρυνθεί, σύμφωνα με πληροφορίες του παραγωγού, επί σειράς έξι ετών με το μυκητοκτόνο. Τα αχλάδια συλλέγονται τον Αύγουστο και πριν τοποθετηθούν στα ψυγεία για τη συντήρησή τους (παρομοίως και τα πορτοκάλια αλλά το μήνα Νοέμβρη) είτε εμβαπτίζονται σε δεξαμενές που περιέχουν πυκνά υδατικά διαλύματα με το εν λόγω μυκητοκτόνο είτε τοποθετούνται σε λωρίδες και δέχονται εφαρμογή από ειδικό ψεκαστικό μηχάνημα με διάλυμα OPP. Τα υγρά απόβλητα που απορρέουν από την επιφάνεια των φρούτων περιέχουν σημαντικές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου OPP και συχνά απορρίπτονται σε παρακείμενους αγρούς ή χειμάρους χωρίς καμία προηγούμενη επεξεργασία για μείωση του φορτίου τους στο μυκητοκτόνο. Η απόρριψη των συγκεκριμένων αποβλήτων στο έδαφος αλλά και σε παρακείμενα υδροφόρα συστήματα αλλά ακόμη και στο σύστημα βιολογικού καθαρισμού των αστικών κέντρων αποτελεί σημαντικό πρόβλημα και αποτελεί επιτακτική ανάγκη σύμφωνα και με τις επιταγές της Ευρωπαϊκή Ένωσης η δημιουργία τοπικών μονάδων επεξεργασίας των συγκεκριμένων υγρών αποβλήτων.

1.2 Βιολογική απορρύπανση

Η βιολογική απορρύπανση (bioremediation) είναι η διαδικασία κατά την οποία, μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται ενδογενώς ή εξωγενώς για την απομάκρυνση ρύπων

από επιβαρυμένα περιβαλλοντικά υποστρώματα και στην πιο αποτελεσματική της μορφή, οργανικοί ρύποι μετατρέπονται σε τελικά προϊόντα CO₂ και H₂O.

Η βιολογική απορρύπανση εφαρμόζεται είτε με τη μορφή της βιολογικής ενεργοποίησης (biostimulation) είτε με τη μορφή βιολογικού εμπλουτισμού (bioaugmentation). Η χρήση βιολογικών μεθόδων για περιβαλλοντική εξυγίανση αποτελεί ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο. Έτσι η χρήση μικροοργανισμών ή των ενζύμων που παράγουν στην αποτοξικοποίηση γεωργικών φαρμάκων θεωρείται μία θεμιτή και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος απορρύπανσης (Lunt and Evans, 1970).

1.3 Orthophenylphenol (OPP)

1.3.1. Χρήσεις

Το OPP είναι μυκητοκτόνο που το μόριο του αποτελείται από δύο φαινολικούς δακτυλίους με ένα OH υποκαταστάση στην θέση 2 (*ορθο*) του ενός δακτυλίου. Χρησιμοποιείται μετασυλλεκτικά για την προστασία των φρούτων από προσβολές κατά την αποθήκευση από μύκητες τους γένους *Penicillium*. Το OPP χρησιμοποιείται ως άλας νατρίου, SOPP (Sodium Orthophenylphenol) στην επεξεργασία των φρούτων. Η εφαρμογή του γίνεται είτε με εμβάπτιση είτε με ψεκασμό των φρούτων (εσπεριδοειδών και αχλαδιών) σε πυκνά υδατικά διαλύματα του μυκητοκτόνου (600 mg/L) τα οποία με την ολοκλήρωση της μεταχείρισης θα πρέπει να αποτοξικοποιηθούν πριν ελευθερωθούν στο περιβάλλον. Όπως γίνεται αντιληπτό η εφαρμογή του OPP στην μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων οδηγεί στην παραγωγή υγρών αποβλήτων με υψηλό φορτίο του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου τα οποία, σύμφωνα με την ΕΕ χρήζουν επεξεργασίας σε τοπικό επίπεδο πριν την εφαρμογή τους στο περιβάλλον (EFSA, 2008). Συνεπώς είναι απαραίτητη η ανάπτυξη συστήματος αποτοξικοποίησης των υγρών αποβλήτων που παράγονται κατά την χρήση του OPP στα συσκευαστήρια φρούτων.

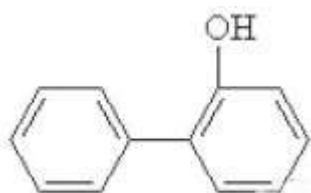
1.3.2. Τοξικότητα

Δεδομένα για την τοξικότητα του OPP σε ανώτερους οργανισμούς μπορούν να αντληθούν κυρίως από τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την έγκριση χρήσης του στην ΕΕ (EU, 2008). Έτσι γενικότερα το OPP παρουσιάζει χαμηλή οξεία και χρόνια τοξικότητα σε θηλαστικά και πουλιά ενώ αντίθετα εμφανίζει σχετικά υψηλή τοξικότητα, χρόνια και οξεία, σε υδρόβιους οργανισμούς (άλγη, ψάρια, ασπόνδυλα). Επιγραμματικά αναφέρεται

ότι οι τιμές LC₅₀ για ψάρια (*Onchorychus mykiss*) ήταν 4 mg/L ενώ οι τιμές EC₅₀ για άλγη και ασπόνδυλα (*Daphnia magna*) ήταν 1.35 και 2.42 mg/L αντίστοιχα. Παρόμοια υψηλή χρόνια τοξικότητα του OPP εμφανίζεται για τα ψάρια (NOEC 21d 0.036 mg/L) και ασπόνδυλα (NOEC 28d, *Chironomus sp.* 1.85 mg/L). Το OPP εμφανίζει μέτρια τοξικότητα στους γεωσκώληκες (LC₅₀ = 99.1 mg/kg έδαφος) και σχετικά υψηλή τοξικότητα στους μικροοργανισμούς της λυματολάσπης (3 hr IC₅₀ = 56 mg/L).

1.3.3. Περιβαλλοντική τύχη και μικροβιακός μεταβολισμός OPP

Το OPP αμέσως μετά την εφαρμογή του στο έδαφος είτε προσροφάται ισχυρά στα κολλοειδή του εδάφους είτε διασπάται κυρίως μικροβιακά (EU, 2008). Προηγούμενες μελέτες οδήγησαν στην απομόνωση ενός βακτηρίου *Pseudomonas sp.* strain HBP1 που είχε την ικανότητα να μεταβολίζει ταχύτατα το OPP μέσω ενός *meta*- μονοπατιού με τελική παραγωγή απλούστερων οργανικών ενώσεων που αποτελούσαν πηγή C για το συγκεκριμένο βακτήριο (Kohler et al., 1988). Το συγκεκριμένο βακτήριο αποτελεί την μοναδική αναφορά εξειδικευμένου βακτηρίου που είχε την ικανότητα να διασπά το OPP ενώ δεν είχε την ικανότητα να διασπά ανάλογα του OPP που ήταν υδροξυλιωμένα στις θέσεις 3' ή 4'.



Εικόνα 1.1: Χημικός τύπος του orthophenylphenol

Τα γονίδια που ελέγχουν το ανώτερο μονοπάτι μεταβολισμού του OPP έχουν απομονωθεί από το βακτήριο *Pseudomonas sp.* strain HBP1 και περιλαμβάνουν μονοξυγενάσες (*HbpACD*) που οδηγούν στην παραγωγή βενζοϊκού οξέος το οποίο στην συνέχεια αποδομείται πλήρως (Jaspers et al., 2001).

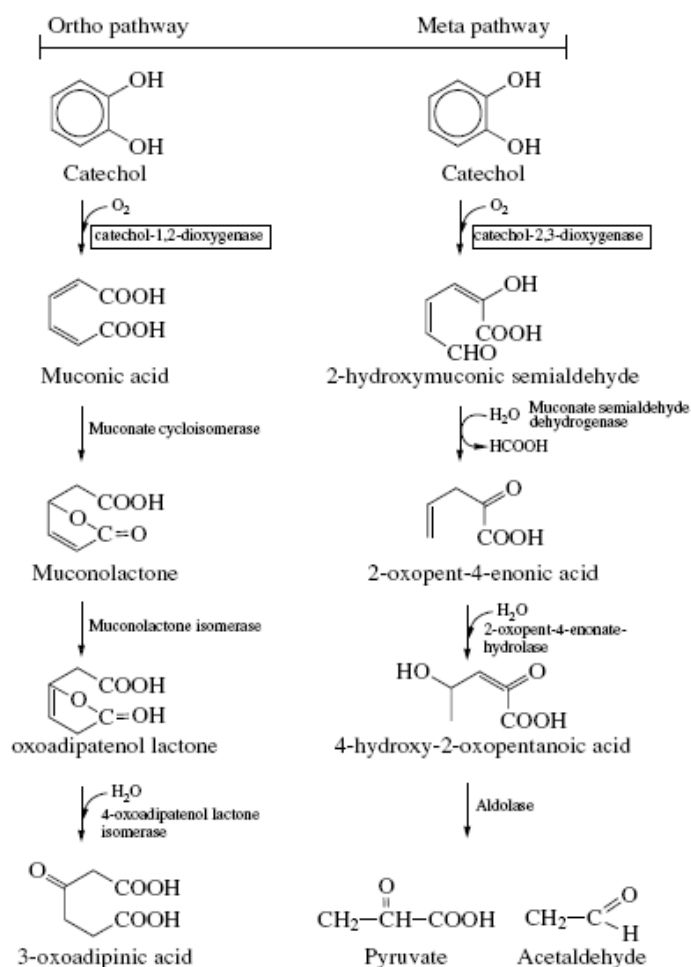
1.4 Αποδόμηση υδρογονανθράκων

Οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες συμπεριλαμβανομένου και του OPP, αποτελούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρύπους λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας τους που

τους καθιστά ελάχιστα βιοδιαθέσιμους στο περιβάλλον αλλά και ιδιαίτερα ανθεκτικούς στην μικροβιακή διάσπαση. Ανάλογα με τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση των αρωματικών υδρογονανθράκων το μονοπάτι μεταβολισμού τους διαχωρίζεται σε δύο στάδια:

Ανώτερο Στάδιο (Upper pathway): Συμμετέχουν ένζυμα με εξειδίκευση προς τα ξενοβιοτικά μόρια που τα αναγνωρίζουν και τα μετατρέπουν σε ουσίες που διασπώνται μικροβιακά με ευκολία. Σημαντικά ένζυμα για τη μικροβιακή διάσπαση ξενοβιοτικών μορίων είναι οι *διοξυγενάσες*, *μονοξυγενάσες*, *απαλαγονάσες*. Τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτό το στάδιο οδηγούν στην τελική παραγωγή προϊόντων διυδροξυλιωμένων παραγώγων όπως η κατεχόλη, τα οποία διασπώνται περαιτέρω μέσω του επόμενου σταδίου.

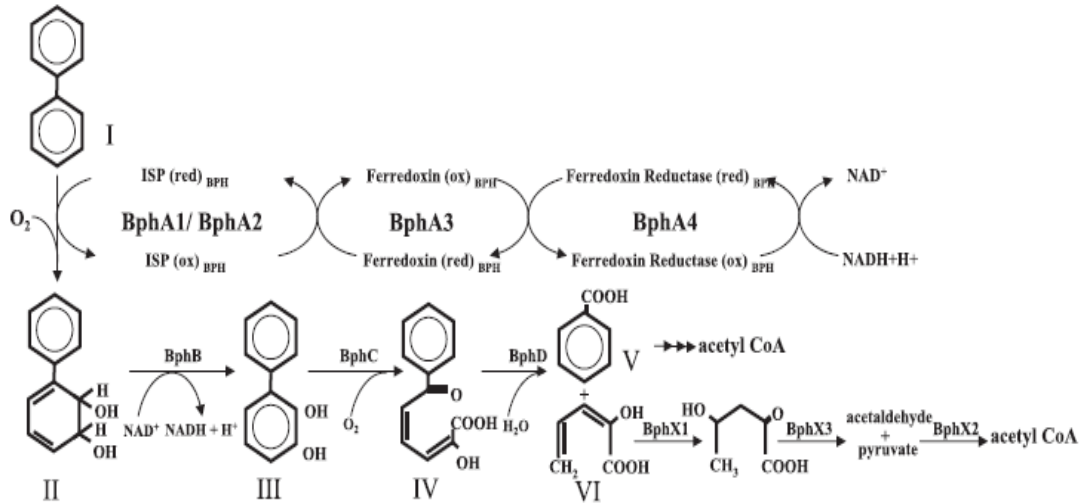
Μονοπάτι διάσπασης δακτυλίου (Ring cleavage pathway): Συμμετέχουν ένζυμα που είναι συνήθως κοινά στο μεταβολισμό πολλών διαφορετικών ξενοβιοτικών μορίων και δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη εξειδίκευση. Στο συγκεκριμένο στάδιο λαμβάνει χώρα η διάσπαση του δακτυλίου της κατεχόλης μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών, *ortho* ή *meta* ανάλογα με το αν η διάσπαση του δακτυλίου ξεκινά από την *ortho* ή *meta* θέση, ως προς τα υδροξύλια του δακτυλίου (Εικ.1.2)



Εικόνα 1.2. Το δεύτερο στάδιο μεταβολισμού των αρωματικών υδρογονανθράκων όπου παρουσιάζεται η διάσπαση της κατεχόλης μέσω του *ortho* ή του *meta* μονοπατιού.

Ο καταβολισμός υποκατεστημένων διφαινυλίων έχει συγκεντρώσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω κυρίως των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCBs) που είναι ιδιαίτερα υπολειμματικοί ρυπαντές (Furukawa and Fujiyama, 2008). Τα υποκατεστημένα διαφαινύλια μεταβολίζονται με την βοήθεια διοξυγενασών σε κατεχόλες που διασπώνται παραπέρα ανάλογα με το είδος των υποκαταστατών τους ακολουθώντας το *ortho* ή το *meta* μονοπάτι.

Μέχρι σήμερα έχει απομονωθεί μεγάλος αριθμός βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να διασπούν τα PCBs και γενικότερα διφαινύλια σύμφωνα με το γενικό μονοπάτι που περιγράφεται στην Εικόνα 1.3.



Εικόνα 1.3: Το ανώτερο μονοπάτι μεταβολισμού του διαφινυλίου και τα ένζυμα/γονίδια που εμπλέκονται στη διάσπαση.

Τα βακτήρια αυτά ανήκουν σε διάφορα βακτηριακά γένη όπως *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Furukawa and Miyazaki, 1985), *Rhodococcus* strain RHA1 (Masai et al.,1995), *Dyella ginsegnisoli* (Ang et al.,2009).

1.5. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας

Ο βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η απομόνωση, ταυτοποίηση και βασικός χαρακτηρισμός βακτηρίων εδάφους που έχουν την ικανότητα να διασπούν ταχύτατα το μυκητοκτόνο OPP με την προοπτική να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη βιολογικών συστημάτων απορρύπανσης υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων που είναι επιβαρυνόμενα με το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Έδαφος

Το δείγμα εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μικροοργανισμών συλλέχθηκε από αγρό παρακείμενο σε συσκευαστήριο φρούτων της περιοχής της Αγιάς, Λάρισας, που χρησιμοποιούνταν για την απόρριψη αποβλήτων από το συσκευαστήριο. Σύμφωνα με τον ιδιοκτήτη του συσκευαστηρίου, τα υγρά απόβλητα που απορρίπτονταν εκεί τα τελευταία 6 έτη περιείχαν εκτός του OPP, το μυκητοκτόνο imazalil και τα συντηρητικά/αντιοξειδωτικά diphenylamine και ethoxyquin.

2.2. Γεωργικά φάρμακα

Για την προετοιμασία των θρεπτικών μέσων αλλά και πρότυπων διαλυμάτων του OPP για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του στα θρεπτικά μέσα, πρότυπη ουσία *ortho*-phenylphenol (99,9%, Fluka, Switzerland).

2.3. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Δύο διαφορετικά υγρά θρεπτικά μέσα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των βακτηρίων. Το πρώτο ήταν θρεπτικό μέσο από εκχύλισμα εδάφους (*SEM Soil Extract Medium*) και το οποίο αποτελεί φυσικό μη εκλεκτικό μέσο. Το δεύτερο ήταν θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (*MSM+N Mineral Salts Medium supplemented with Nitrogen*) το οποίο αποτελεί εκλεκτικό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Για την επιβεβαίωση της αμιγότητας των βακτηριακών καλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκε επίσης στερεό θρεπτικό μέσο με την προσθήκη άγαρ στα παραπάνω καθώς και το θρεπτικό μέσο *LB (Luria Bertani)* ως γενικό και μη εκλεκτικό μέσο. Τέλος, για τη διαδικασία του μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο *LB (Luria Bertani) + ampicillin*. Όλες οι προεργασίες έγιναν ασηπτικά σε θάλαμο νηματικής ροής και ακολούθησε αποστείρωση των διαλυμάτων στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min.

Η προετοιμασία θρεπτικών μέσων που να περιέχουν OPP (20 µg/ml) βασίστηκε στην παρασκευή υδατικού διαλύματος OPP (100 mg/L) σε αποστειρωμένο νερό. Η περαιτέρω

αποστείρωση των θερμικά ευαίσθητων υδατικών διαλυμάτων του OPP πραγματοποιήθηκε με διήθηση με φίλτρα σύριγγας (Acrodisk Syringe Filters, 0.2μm HT Tuffryn Membrane).

2.3.1. Παρασκευή θρεπτικού μέσου εκχυλίσματος εδάφους (SEM)

Για την προετοιμασία 1 L υγρού θρεπτικού μέσου SEM, αναμίχθηκαν 500 g εδάφους με 1 L απιονισμένο νερό. Το μίγμα αναδεύτηκε καλά και στη συνέχεια αποστειρώθηκε στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στις 10000 rpm και στους 19°C για 8 min και το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης διηθήθηκε και επαναποστειρώθηκε στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού διαλύματος SEM + OPP (20 mg/L), 40 mL από το αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα OPP (500 mg/L) προστέθηκαν σε 950 mL SEM υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.3.2. Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (MSM+N)

Το θρεπτικό μέσο MSM+N περιείχε εκτός από C, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μακροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N). Αυτό έγινε ώστε το μυκητοκτόνο να αποτελεί τη μοναδική πηγή C για τους αναπτυσσόμενους μικροοργανισμούς. Το θρεπτικό αυτό διάλυμα παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα (Stock) ανοργάνων αλάτων, τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες και έδωσαν το τελικό MSM+N (Πίνακας 2.1).

Τα Stock 1 και 2 προετοιμάστηκαν με διάλυση των συστατικών τους σε 1 L απεσταγμένο νερό και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Το Stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση από ειδικά φίλτρα επειδή ο FeSO₄ είναι θερμοευαίσθητος. Για την προετοιμασία 1 L MSM+N, 100 mL από το stock 1 διαλύθηκαν σε 780 mL αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε εκ νέου. Μόλις το διάλυμα έφτασε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκαν ασηπτικά 100 mL stock 2 και 20 mL stock 3.

Πίνακας 2.1: Συστατικά στοιχεία του θρεπτικού μέσου MSM+N

	Συστατικά	g/L
Stock 1	KH ₂ PO ₄	22,7
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	59,7
	NH ₄ Cl	10,0
Stock 2	MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,2
Stock 3	FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,96

Η προετοιμασία θρεπτικών διαλυμάτων MSMN + OPP (20 mg/L)–καθώς και των αντίστοιχων στερεών θρεπτικών μέσων πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί παραπάνω (ενότητα 2.3.1.) για το SEM.

2.3.3. Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB (*Luria Bertani*)

Για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού μέσου LB, 10 g NaCl, 10 g καζεΐνης και 5 g yeast extract αραιώθηκαν σε 1 L απεσταγμένο νερό, αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Ακολούθησε η προσθήκη 1000 µL αντιβιοτικού αμπικιλίνης από υδατικό διάλυμα stock (100 mg/mL) υπό ασηπτικές συνθήκες. Για την προετοιμασία στερεού θρεπτικού μέσου LB, απλά προστέθηκαν στο 1L νερό και 15g άγαρ (1,5%) και τέλος ακολούθησε η επίστρωση τριβλίων.

2.4. Μέθοδος ανάλυσης OPP σε σύστημα HPLC

Για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του OPP στις υγρές καλλιέργειες των βακτηριών χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σύστημα HPLC Marathon III, που ήταν εξοπλισμένο με σύστημα αντλιών βαθμιδωτής έκλουσης, όγκο έγχυσης 20 µL και ανιχνευτή UV, ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό Clarify® για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Ο διαχωρισμός του OPP έγινε σε στήλη

αντίστροφης φάσης (RP) C18, Nucleosil (150 x 4.6 mm, 5 μm id) (Macherey-Nagel GmbH, Germany) με ισοκρατική έκκλουση με κινητή φάση 49% ACN: 50,5% H₂O: 0,5% NH₃ και ροή 1ml/min. Η ανίχνευση τους πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 254 nm και ο χρόνος κατακράτησης του OPP ήταν 5,4 min. Για την προετοιμασία της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν αμμωνία (NH₃), ακετονιτρίλιο (ACN) και νερό HPLC grade (Merck GmbH, Germany).

2.5 Εφαρμογή OPP στο έδαφος για ενεργοποίηση της μικροβιακής κοινότητας

Αρχικά, για να μελετηθεί πραγματοποιήθηκε μια εφαρμογή νέας δόσης OPP στο έδαφος (20 mg/L), ώστε να ενισχυθεί η δραστηριότητα των μικροοργανισμών που διασπούν το OPP στο έδαφος. Έτσι, δείγμα εδάφους (300g) τοποθετήθηκε σε πλαστική σακούλα αεροστεγές κλείσιμο και δέχτηκε εφαρμογή κατάλληλης ποσότητας υδατικού διαλύματος OPP (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ώστε στο έδαφος να υπάρξει συγκέντρωση 20 $\mu\text{g}/\text{g}$ ξηρού βάρους εδάφους. Μετά την εφαρμογή τα δείγματα αφέθηκαν για μικρό χρονικό διάστημα (2 h) και ακολούθησε προσθήκη νερού ώστε η υγρασία του εδάφους να προσαρμοστεί στο 40% της υδατοχωρητικότητας. Το δείγμα εδάφους αναμίχθηκε καλά για να επέλθει ομοιόμορφη κατανομή του γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος, ζυγίστηκε εκ νέου στη σακούλα του και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 28 °C. Η σακούλα τρυπήθηκε σε ένα σημείο ώστε να διατηρηθούν αερόβιες συνθήκες για το έδαφος.

2.6 Εμπλουτισμένες καλλιέργειες για την απομόνωση αποδομητικών βακτηρίων

Μετά από 20 ημέρες από την εφαρμογή του OPP στο έδαφος ξεκίνησε διαδικασία εμπλουτισμού για την απομόνωση των αποδομητικών βακτηρίων. Έτσι, 0,5g εδάφους απομακρύνθηκαν και εμβολιάστηκαν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες (100 mL) που περιείχαν 20 mL SEM ή MSMN + OPP (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Υπήρχαν τρεις επαναλήψεις για κάθε θρεπτικό μέσο. Ταυτόχρονα προετοιμάστηκαν και δύο κωνικές φιάλες για κάθε θρεπτικό μέσο, στις οποίες δεν προστέθηκε έδαφος και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τέλος, όλες οι φιάλες τοποθετήθηκαν για επώαση σε ψυχόμενο επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία

25 °C υπό ανάδευση 160 στροφών/min. Η αποδόμηση του OPP παρακολουθήθηκε με λήψη δειγμάτων στις 0, 2, 4 και 6 ημέρες (1^{ος} κύκλος ανακαλλιέργειας) και ανάλυση για υπολείμματα OPP σε σύστημα HPLC-UV. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- A. 0.5 mL από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωλήνες erpendorf
- B. Προστέθηκε 1 ml μεθανόλη και ακολούθησε σύντομη ανάδευση σε vortex
- Γ. Το δείγμα στη συνέχεια διηθήθηκε μέσω φίλτρο σύριγγας και ακολούθησε ανάλυση σε σύστημα HPLC

2.6.1 Κύκλοι ανακαλλιέργειας στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες

Μετά την επιβεβαίωση της ταχύτερης αποδόμησης του OPP κατά τον πρώτο κύκλο εμπλουτισμού και όταν το ποσοστό αποδόμησής του έφτασε το 80 % προετοιμάστηκε ο 2^{ος} κύκλος ανακαλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, 1 mL από τις καλλιέργειες μεταφέρθηκε ασηπτικά σε νέα σειρά των ιδίων θρεπτικών μέσων (20 mL). Στη συνέχεια, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο προετοιμάστηκε 3^{ος}, 4^{ος} και 5^{ος} κύκλος ανακαλλιέργειας για όλα τα θρεπτικά. Κατά την διάρκεια των κύκλων ανακαλλιέργειας, η αποδόμηση του OPP παρακολουθήθηκε με την ημερήσια σχεδόν απομάκρυνση δειγμάτων από τις υγρές καλλιέργειες και ανάλυση τους σε σύστημα HPLC όπως και κατά τον αρχικό κύκλο εμπλουτισμένης καλλιέργειας. Σε κάθε κύκλο ανακαλλιέργειας υπήρχαν ταυτόχρονα και δείγματα – μάρτυρες για κάθε θρεπτικό μέσο.

2.7 Απομόνωση αποδομητικών βακτηρίων που διασπούν το μυκητοκτόνο OPP

Όταν η αποδόμηση OPP στον τελευταίο κύκλο ανακαλλιέργειας έφτασε το 20-50% προετοιμάστηκε σειρά διαδοχικών αραιώσεων ($10^{-1} - 10^{-8}$) για κάθε θρεπτικό μέσο. Οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν ως εξής:

- Προετοιμάστηκαν $2 \times 6 = 12$ αποστειρωμένα falcons των 15 mL που περιείχαν 9 mL αποστειρωμένο νερό
- Οι καλλιέργειες στον τελευταίο κύκλο εμπλουτισμό μεταφέρθηκαν στον θάλαμο νηματικής ροής
- Οι τρεις επαναλήψεις από κάθε καλλιέργεια (SEM ή MSMN + OPP) αφού αναδεύτηκαν σε vortex, αναμίχθηκαν

- 1 mL από κάθε μπουκάλι DURAN μεταφέρθηκε στο πρώτο αποστειρωμένο falcon και αναδεύτηκε
1 mL από το πρώτο falcon μεταφέρθηκε στο δεύτερο κ.ο.κ., μέχρι και το τελευταίο falcon όπου είχε τελικά την υψηλότερη αραιώση 10^{-6} .

Στη συνέχεια, οι παραπάνω ποσότητες από τις κατάλληλες αραιώσεις επιστρώθηκαν σε δύο τριβλία κάθε φορά που περιείχαν το αντίστοιχο στερεό θρεπτικό μέσο. Τα τριβλία διατηρήθηκαν στην επώαση στους 25°C μέχρι να αναπτυχθούν οι αποικίες.

2.7.1 Επιλογή αποικιών και έλεγχος της αποδομητικής τους ικανότητας

Ύστερα από τρεις ημέρες επώασης, ικανοποιητικός αριθμός βακτηριακών αποικιών είχε αναπτυχθεί στα τριβλία που είχαν επιστρωθεί με το MSMN, σε αντίθεση με το θρεπτικό μέσο SEM που δεν εμφανίστηκε μεγάλος αριθμός αποικιών. Για το λόγο αυτό συνεχίσαμε τα πειράματά μας και την επιλογή μόνο βακτηρίων από τριβλία MSMN. Ακολούθησε επιλογή αποικιών από τα τριβλία με βάση τρία κριτήρια 1) την εμφάνιση περιθωρίου γύρω από την αποικία που καταδεικνύει πιθανότατα την κατανάλωση του OPP από την αποικία, 2) μορφολογικά χαρακτηριστικά και 3) όσο το δυνατό καλύτερο διαχωρισμό από παρακείμενες αποικίες ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα απομόνωσης αξενικών καλλιιεργειών. Τελικά, επιλέχθηκαν 30 αποικίες με τη βοήθεια αποστειρωμένων ακίδων. Οι συνολικά 30 αποικίες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά μπουκάλια (30 ml) μιας χρήσης που περιείχαν 5 mL από το ίδιο θρεπτικό μέσο (20 mg/L) με αυτό του τριβλίου από το οποίο επιλέχθηκαν. Ακολούθησε ανάδευση σε vortex και τοποθέτησή τους σε αναδεδυμένο επωαστήρα στους 25°C και στις 150 στροφές/min.

Στη συνέχεια, παρακολούθηθηκε η αποδόμηση του OPP από τις επιλεγμένες αποικίες στις 7 και 14 ημέρες όπως έχει ήδη περιγραφεί. Από τις καλλιέργειες που έδειξαν αποδόμηση έγινε εμβολιασμός και επίστρωση σε τριβλία LB για την αξιολόγηση της αμιγότητας των καλλιιεργειών. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν στην επώαση στους 25°C . Στις καλλιέργειες που παρουσίασαν υψηλή αποδομητική ικανότητα και ήταν αμιγείς, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια με εμβολιασμό 0,5 mL σε νέα θρεπτικά μέσα (5 mL). Οι νέες καλλιέργειες καθώς και οι αντίστοιχες καλλιέργειες-μάρτυρες τοποθετήθηκαν σε

αναδεδυμένο επωαστικό θάλαμο στους 25 °C στις 150 στροφές/min. Ακολούθησαν δειγματοληψίες στις 0,1,2 3 και 14 ημέρες για την παρακολούθηση της αποδόμησης του OPP.

Τέλος, στα τριβλία MSMN+OPP που είχαν επιστρωθεί με τις αποδομητικές καλλιέργειες προστέθηκε 0,8 mL αποστειρωμένο νερό και η βακτηριακή μάζα συγκομίστηκε και μεταφέρθηκε σε νέα αποστειρωμένα erpendorfs, όπου αναμίχθηκαν με 0,2 mL αποστειρωμένου υδατικού διαλύματος γλυκερόλης (80 %) και αποθηκεύτηκαν στους – 80°C.

2.7.2 Εξαγωγή DNA από τις αμιγείς αποικίες των βακτηρίων

Εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε από αμιγείς βακτηριακές καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί σε τριβλία LB και παρουσίασαν βακτηριακή ανάπτυξη με αμιγείς αποικίες. Η βακτηριακή ανάπτυξη συγκομίστηκε με 1 mL αποστειρωμένο νερό, φυγοκεντρήθηκε και ακολούθησε εξαγωγή DNA με τη χρήση του εμπορικού κιτ Nucleospin® Tissue της εταιρείας Macherey – Nagel. Τα βήματα του πρωτοκόλλου που ακολούθηθηκαν ήταν τα εξής:

- Η βακτηριακή πελέτα επαναδιαλύθηκε με 180 μL Buffer T1 (Lysis Buffer) και το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνίδια
- Προστέθηκαν 25 μL πρωτεϊνάσης K από πρότυπο διάλυμα 20 mg/mL, ακολούθησε ανάδευση σε vortex και επώαση (1-3 ώρες) στους 56 °C έως ότου επέλθει πλήρης λύση των κυττάρων. Στο διάστημα αυτό, πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε vortex ανά τακτά χρονικά διαστήματα μιας και η διαδικασία αυτή μειώνει τον χρόνο λύσης των κυττάρων
- Μετά τη λύση των κυττάρων προστέθηκαν 200 μL από το Buffer B3, ακολούθησε vortex και επώαση των δειγμάτων στους 70 °C για 10 min.
- Προστέθηκαν 210 μL αιθανόλης (96-100 %) στα δείγματα και ακολούθησε αμέσως vortex
- Κατόπιν, οι στήλες Nucleospin τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια συλλογής των 2 mL, προστέθηκαν τα δείγματα και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε

- Προστέθηκαν 500 μL του Buffer BW (Wash Buffer) στην στήλη και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε
- Προστέθηκαν 600 μL του Buffer B5 (Concentrated Wash Buffer) στην στήλη και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε
- Ακολούθησε αμέσως μία δεύτερη φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα αιθανόλης του Buffer B5
- Τέλος, οι στήλες Nucleospin τοποθετήθηκαν σε νέα αποστειρωμένα eppendorfs και η έκλυση του DNA έγινε με την προσθήκη 100 μL του Buffer BE (Elution Buffer), το οποίο είχε προθερμανθεί στους 70 $^{\circ}\text{C}$. Οι στήλες αφέθηκαν με το Buffer BE για 1 min και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min
- Τα δείγματα DNA διατηρήθηκαν στους - 20 $^{\circ}\text{C}$

2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος.

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Στο πρώτο στάδιο, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 92-95 $^{\circ}\text{C}$. Στο δεύτερο στάδιο, οι εκκινητές που βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στους δύο κλώνους του DNA στους 50-65 $^{\circ}\text{C}$. Κατά το τρίτο στάδιο, το οποίο πραγματοποιείται στους 70-78 $^{\circ}\text{C}$, συντίθεται DNA αρχίζοντας από τους δύο εκκινητές. Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μετά από μερικούς κύκλους το προϊόν είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές.

Υλικά

- Buffer A
- DyNAzyme EXT Buffer (Finnzymes)
- Polymerase Extent

- DyNAzyme EXT DNA πολυμεράση (Finnzymes)
- Νουκλεοτίδια (dNTPs) (HT BIOTECHNOLOGY LTD)
- MgCl₂ (25 mM)
- Εκκινητές
- dd H₂O

Στην αντίδραση της PCR ενισχύθηκε όλο το 16S rRNA γονίδιο (1500 bp) των βακτηρίων με τους εκκινητές 8f - 1512r χρησιμοποιώντας ως μήτρα το DNA που εκχυλίστηκε από τις αμιγείς καλλιέργειες. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε παρουσιάζονται στους πίνακες 2.3. και 2.4. αντίστοιχα.

Πίνακας 2.2: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση του 16S r DNA γονιδίου των βακτηρίων

Εκκινητής	Αλληλουχία	T _m (°C)
8f	5'-CACGGATCCAGACTTTGATYMTGGCTCA -3'	52
1512r	5'-GTGAAGCTTACGGYTAGCTTGTTACGAC -3'	52

Πίνακας 2.3: Αντίδραση PCR για τα βακτήρια που εμφάνισαν αποδομητική ικανότητα

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized) MgCl ₂ (50 mM)	2,5 µL 0,75 µL	
dNTPs (10 mM)	0,5 µL	200 µM από το καθένα
Forward primer 8f (20 pmol/µL)	1 µL	0,2 µM
Reverse primer 1512r (20 pmol/µL)	1 µL	0,2 µM
Polymerase Extent (1 U/µL)	1 µL	1 U/25 µL

DNA	1 μ L	10-50 ng
ddH ₂ O	17,25 μ L	
Συνολικός όγκος	25 μ L	

Πίνακας 2.4: Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες PCR με τους εκκινητές 8f-1512r

Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min	
Αποδιάταξη	95 °C	1 min	30 κύκλοι
Υβριδοποίηση	55 °C	1 min	
Επιμήκυνση	72 °C	2 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	

2.9 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA. Στην εργασία αυτή, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 1) στα δείγματα DNA που εξήχθησαν από τις αμιγείς καλλιέργειες των βακτηρίων, 2) στα δείγματα του πλασμιδιακού DNA των βακτηρίων που απομονώθηκαν. Επίσης, 3) ηλεκτροφορήθηκαν και όλα τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού προϊόντος.

2.9.1 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA από τις αμιγείς αποικίες των βακτηρίων και των προϊόντων της PCR

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή 1 % (0,70 g αγαρόζης σε 70 mL TAE 1x) και 2 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 5 μ l DNA αναμεμειγμένα με 1 μ L loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 80 V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές αφού τοποθετήθηκαν σε τράπεζα UV.

2.10 Καθαρισμός των προϊόντων PCR (PCR Purification)

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR για την περαιτέρω χρήση τους στην αντίδραση ένθεσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού κιτ PCR Purification (Invitrogen). Συγκεκριμένα τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Έγινε προσθήκη 4 όγκων Binding Buffer σε ένα όγκο από PCR product και ακολούθησε ανάδευση
2. Το διάλυμα προστίθεται σε στήλη έκλουσης
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10000x g για ένα λεπτό
4. Το διάλυμα που συλλέχθηκε στο erpendorf απομακρύνθηκε
5. Ακολουθεί πλύσιμο της στήλης με 650 μλ Wash Buffer
6. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση και το εκλούμενο διάλυμα απομακρύνθηκε
7. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση ώστε να εκλουστεί όλο το Wash Buffer από τη στήλη
8. Στη στήλη προστέθηκαν 50 μλ elution buffer και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min

2.11 Ένθεση (Ligation)

Με βάση τις τιμές απορρόφησης και βάση του τύπου $[25 \text{ ng vector} \times 1,5 \text{ kb (μήκος DNA)} / 3] \times (3 / 1)$ υπολογίστηκαν τα μL DNA κάθε δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση ένθεσης σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα pGEM®-T easy (Promega). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση ένθεσης παρουσιάζονται στον πίνακα 2.6. Μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων τα δείγματα επώαστηκαν στους 4°C για 16 h.

Πίνακας 2.6: Οι όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση ένθεσης των διαφόρων PCR προϊόντων

Αντιδραστήρια	Δείγματα DNA
2x Buffer	5 μL

Vector pGem	0,5 μL
PCR product	1,6 - 4,3 μL
Λιγάση	1 μL
dd H ₂ O	X μL
Συνολικός όγκος	10 μL

Πίνακας 2.7: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό του φορέα σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*

<u>10 mL X Gal (2 %)</u>		<u>10 mL IPTG (0,1 M)</u>	
X Gal (- 20 °C)	0,2 g	IPTG (- 20 °C)	0,238 g

2.12 Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*

Με την ολοκλήρωση της ένθεσης ακολούθησε ο μετασχηματισμός των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε δεκτικά κυττάρια *E. coli* (DH5a Competent Cells, Invitrogen, USA) Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη διαδικασία του μετασχηματισμού ήταν τα εξής:

- Σε αποστειρωμένα erpendorfs μεταφέρθηκαν 2 μL ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και προστέθηκαν 80 μL δεκτικών κυττάρων. Τα erpendorfs τοποθετήθηκαν για 30 min στον πάγο
- Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν για 42-50 sec στους 42 °C και για 2 min σε πάγο
- Προστέθηκαν 200 μL LB υπό φλόγα και τα δείγματα επώαστηκαν για 60 min στους 37 °C
- Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής και ασηπτικά προστέθηκαν 50 μL X GAL (2 %) που φυλασσόταν στους - 20 °C και 10 μL IPTG που φυλασσόταν στους 4 °C
- Τέλος, τα δείγματα επιστρώθηκαν σε τριβλία LB + Ampicillin και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 16 h

2.13 Επιλογή θετικών κλώνων από τα τριβλία LB

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε επιλογή πέντε λευκών αποικιών από κάθε τριβλίο με τη χρήση αποστειρωμένων ακίδων και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκάλια (25 mL) που περιείχαν 5 mL LB + ampicillin. Ακολούθως, τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με ανάδευση στους 37 °C στις 200 στροφές/min για 16 h.

2.14 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Plasmid Extraction)

Από τις παραπάνω καλλιέργειες με την ολοκλήρωση της επώασης πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις κλώνοι για κάθε βακτήριο (24 δείγματα). Η εξαγωγή πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό κιτ Nucleospin® Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel και τα βήματα του πρωτοκόλου που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- 1 mL από τις καλλιέργειες μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο eppendorf και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 30 sec. Τα κύτταρα ιζηματοποιήθηκαν και το υπερκείμενο απορρίφθηκε
- Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε προσεκτικά σε 250 μL του Buffer A1 που περιέχει λυσοζύμη
- Προστέθηκαν 250 μL του Buffer A2 που περιέχει SDS και τα eppendorfs ανακινήθηκαν 6 - 8 φορές και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
- Προστέθηκαν 300 μL Buffer A3 και τα eppendorfs ανακινήθηκαν πάλι 6 - 8 φορές
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 10 min
- Στη συνέχεια, οι στήλες NucleoSpin Plus που παρέχονται στο κιτ τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια συλλογής των 2 mL και φορτώθηκε σε αυτά το υπερκείμενο
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min και το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη της στήλης απορρίφθηκε
- Προστέθηκαν στην στήλη 500 μL του Buffer AW το οποίο είχε προθερμανθεί στους 50 °C και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη της στήλης απορρίφθηκε
- Προστέθηκαν στην στήλη 600 μL του Buffer A4 που περιέχει αιθανόλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη της στήλης απορρίφθηκε
- Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 2 min ώστε να απομακρυνθεί κάθε υπόλειμμα αιθανόλης από τη μεμβράνη της στήλης

- Στην συνέχεια οι στήλες μεταφέρθηκαν σε καινούρια αποστειρωμένα eppendorfs και η έκλυση του DNA πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 50 μL του Buffer AE (5 mM Tris-HCl, pH 8,5). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και κατόπιν φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min
- Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους - 20 $^{\circ}\text{C}$

Το πλασμιδιακό DNA απεστάλη για αλληλούχιση στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Οι αλληλουχίες αναγνώστηκαν και προς τις δύο κατευθύνσεις (forward και reverse) ώστε να παραλάβουμε την πλήρη αλλουχία (1500 bp) του γονιδίου 16S rRNA των απομονωθέντων βακτηρίων. Οι μετασχηματισμένες με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο καλλιέργειες *E. coli* από τις οποίες πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA ανακαλλιιεργήθηκαν σε νέο θρεπτικό μέσο (LB+ampicillin) και ακολούθησε ανάμιξη με γλυκερόλη και αποθήκευση στους - 80 $^{\circ}\text{C}$.

2.15 Μελέτη της κινητικής αποδόμησης του OPP από τα απομονωθέντα βακτήρια

Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να μελετηθεί η κινητική αποδόμησης του OPP από τα βακτήρια που απομονώθηκαν όταν το μυκητοκτόνο αποτελούσε τη μοναδική πηγή άνθρακα στην καλλιέργεια. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια στις παλιές καλλιέργειες των βακτηρίων με τη μεταφορά 0,5 mL σε νέο θρεπτικό μέσο 10 ml MSMN + OPP (20 mg/L). Οι νέες καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα στους 25 $^{\circ}\text{C}$ και στις 150 στροφές/min και η αποδομητική τους ικανότητα μελετήθηκε με λήψη δειγμάτων σε χρόνο 0,1 και 3 ημέρες για το στέλεχος 26B και 0,1,3,5,8,11 και 14 ημέρες για το στέλεχος 21D. Για κάθε βακτήριο υπήρχαν τρεις επαναλήψεις. Παράλληλα μετρήθηκε η διάσπαση του OPP σε φιάλες που περιείχαν 10ml MSMN+OPP (δύο επαναλήψεις) και οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια, για να μετρήσουμε πιθανή αβιοτική διάσπαση του μυκητοκτόνου στο θρεπτικό μέσο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

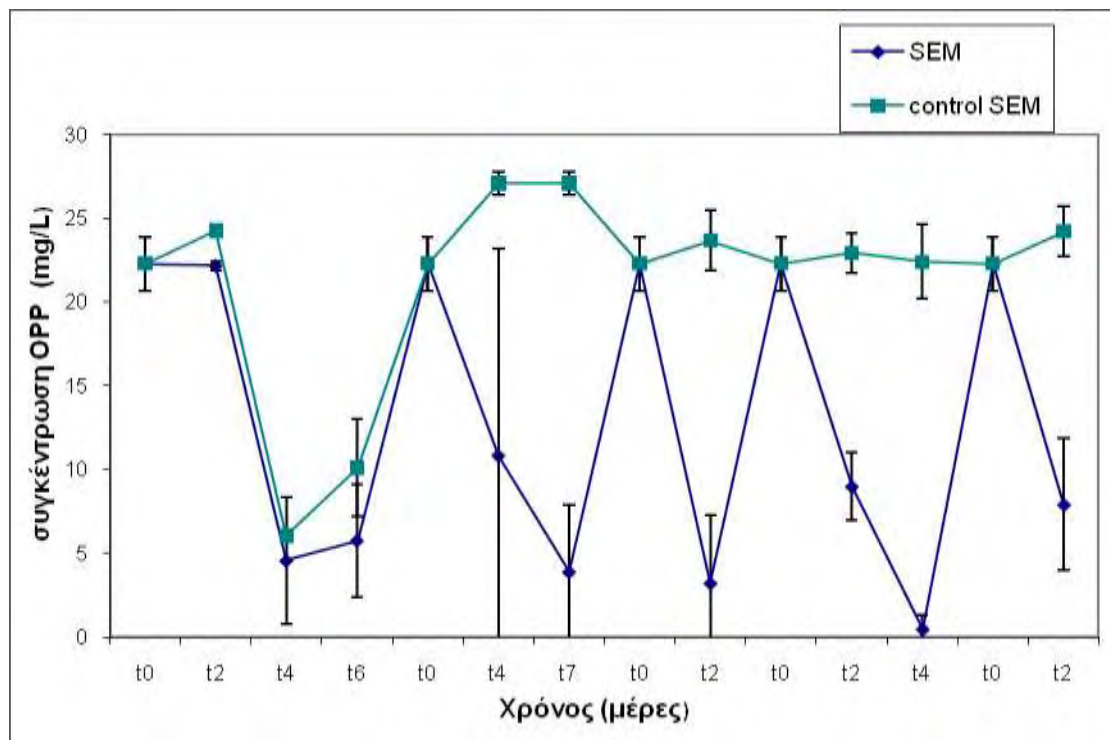
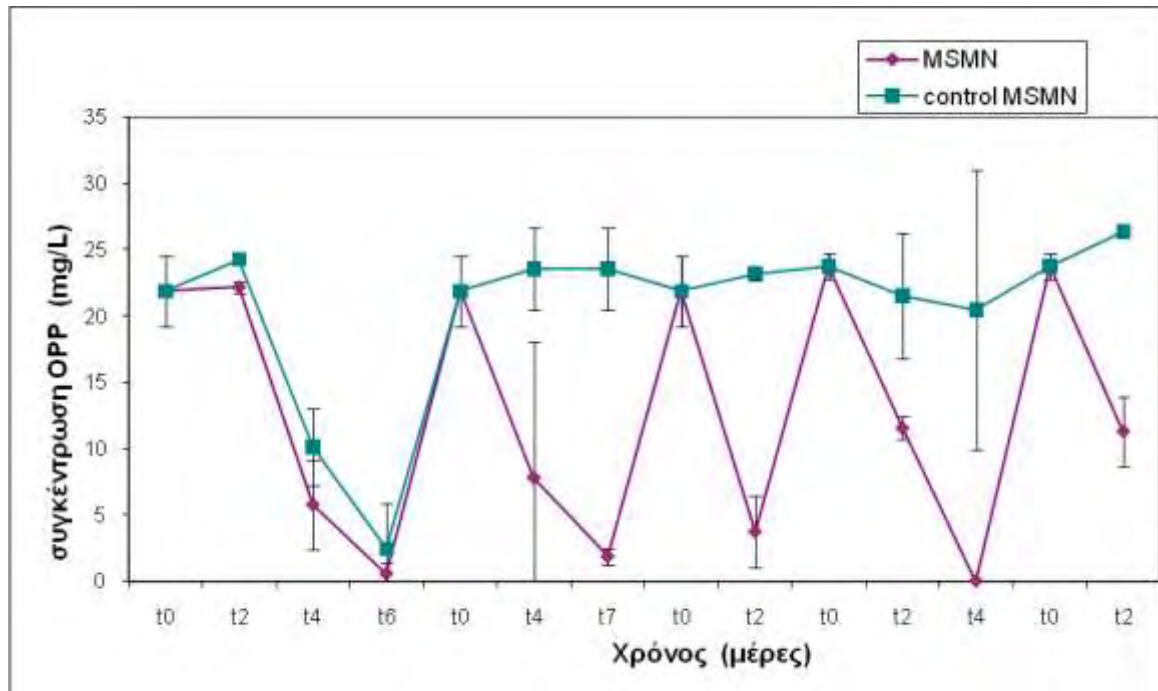
3.1 Αποδόμηση του OPP σε καλλιέργειες εμπλουτισμού

Όπως διαπιστώθηκε από τις καλλιέργειες εμπλουτισμού το δείγμα εδάφους περιείχε μικροοργανισμούς που είχαν την ικανότητα να αποδομούν ταχύτατα το OPP καθώς παρατηρήθηκε πλήρης διάσπαση του μυκητοκτόνου σε 6 ημέρες ακόμα και στον πρώτο κύκλο εμπλουτισμού (Διάγραμμα 3.1) σε θρεπτικό μέσο MSMN όπου το μυκητοκτόνο αποτελεί τη μοναδική πηγή C. Συνεχίζοντας τους κύκλους εμπλουτισμού παρατηρήθηκε ενίσχυση της αποδομητικής ικανότητας καθώς στους επόμενους κύκλους απαιτήθηκαν 4 ημέρες για την πλήρη διάσπαση του OPP. Με εξαίρεση τον πρώτου κύκλου εμπλουτισμού όπου παρατηρήθηκε μια ταχεία διάσπαση του OPP και στους μη εμβολιασμένους

μάρτυρες, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αβιοτική διάσπαση του OPP στο MSMN.

Στο θρεπτικό μέσο SEM, το οποίο είναι μη εκλεκτικό θρεπτικό μέσο, η αποδόμηση του OPP ήταν εξίσου ταχεία με αυτή που παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες εμπλουτισμού του OPP (Διάγραμμα 3.2) .

Στον πέμπτο κύκλο εμπλουτισμού πραγματοποιήθηκε με την ολοκλήρωση της διάσπασης του 50% της αρχικής ποσότητας OPP και στα δύο θρεπτικά μέσα, επίστρωση τριβλίων με τα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα.



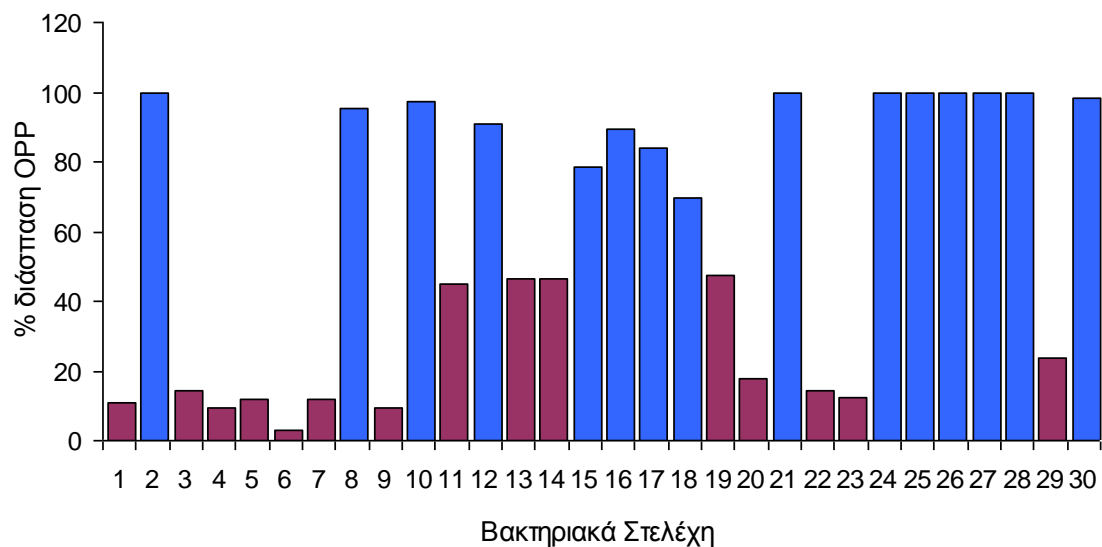
Διάγραμμα 3.2: Η αποδόμηση του OPP στους πέντε κύκλους εμπλουτισμού στο θρεπτικό μέσο SEM καθώς και σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο SEM (control). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

3.2. Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το OPP

Ύστερα από την επώαση των τριβλίων που είχαν επιστρωθεί με τις καλλιέργειες εμπλουτισμού από τα δύο θρεπτικά μέσα, παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός ευδιάκριτων αποικιών στα τριβλία με MSMN σε αντίθεση με τα τριβλία SEM όπου παρατηρήθηκε περιορισμένη ανάπτυξη αποικιών. Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκαν αποικίες μόνο από τα τριβλία με MSMN+OPP.

Επιλέχθηκαν 30 συνολικά αποικίες μορφολογικά διαφορετικές μεταξύ τους και τοποθετήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες MSMN+OPP ώστε να αξιολογηθεί η αποδομητική τους ικανότητα ως προς το OPP. Από το σύνολο των 30 επιλεγμένων αποικιών μετά την καλλιέργειά τους σε υγρό θρεπτικό μέσο παρατηρήθηκε αποδόμηση της τάξης του 70-100% της αρχικής ποσότητας του OPP, εντός 7 ημερών από τις 15 επιλεγμένες βακτηριακές καλλιέργειες (Διάγραμμα 3.3). Στις υπόλοιπες 15 καλλιέργειες δεν παρατηρήθηκε διάσπαση του OPP εντός 14 ημερών.

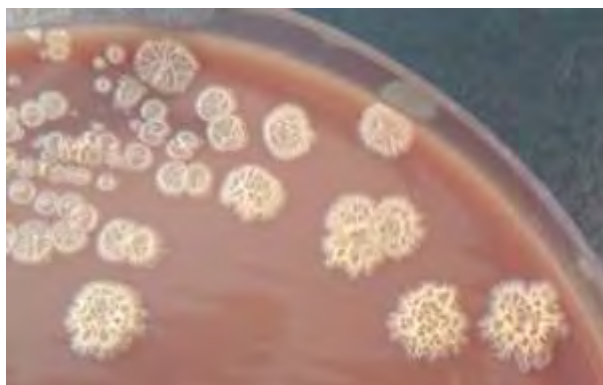
Επίστρωση σε τριβλία MSMN+OPP έδειξε ότι μόνο δύο, τα στελέχη 21 και 26, από τις συνολικά 15 καλλιέργειες ήταν αμιγείς και αυτές επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη.



Διάγραμμα 3.3 : Η % διάσπαση του OPP από τις 30 επιλεγμένες αποικίες που είχαν αναπτυχθεί σε στερεή καλλιέργεια MSMN ύστερα από 7 ημέρες καλλιέργειας σε υγρό θρεπτικό μέσο MSMN + OPP.

3.3. Ταυτοποίηση των βακτηρίων που αποδομούν το OPP

Μορφολογικά οι αποικίες που παρατηρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB διέφεραν μεταξύ τους. Έτσι το στέλεχος 21 παρουσίασε αποικίες μικρές, λευκού χρώματος και στρογγυλές ενώ το στέλεχος 26 παρουσίασε αποικίες λευκές ακτινωτά αναπτυσσόμενες όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.1.



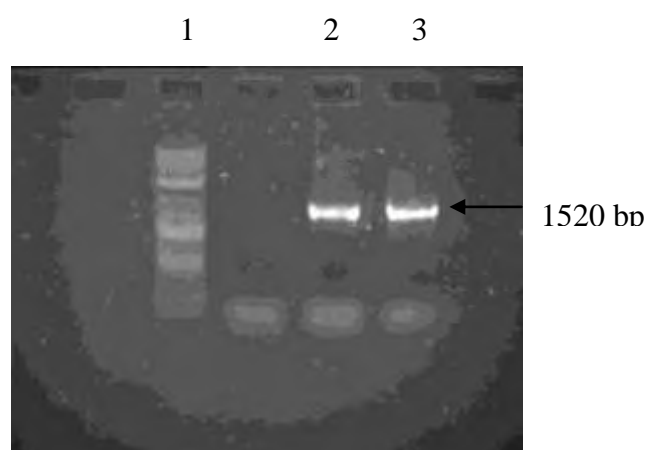
Εικόνα 3.1: Μορφολογία των αποικιών του στελέχους 26 σε θρεπτικό μέσο LB.

Από τα στελέχη 21 και 26 που εμφανίστηκαν να είναι αμιγή πραγματοποιήθηκε επιτυχής εξαγωγή ολικού DNA (Εικόνα 3.2) ώστε να γίνει μοριακή ταυτοποίηση τους.



Εικόνα 3.2: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 0,8 % δειγμάτων DNA από τα βακτήρια 26 (γραμμή 2) και 21(γραμμή 3). Γραμμή 1: Ladder Biolabs 10 kb

Ακολούθησε PCR ενίσχυση του 16S rDNA (ca. 1500 bp) γονιδίου των βακτηρίων χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές (8f-1512r) ειδικούς για το συγκεκριμένο γονίδιο. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για επιβεβαίωση της ενίσχυσης του σωστού μεγέθους προϊόντος (Εικόνα 3.3.)



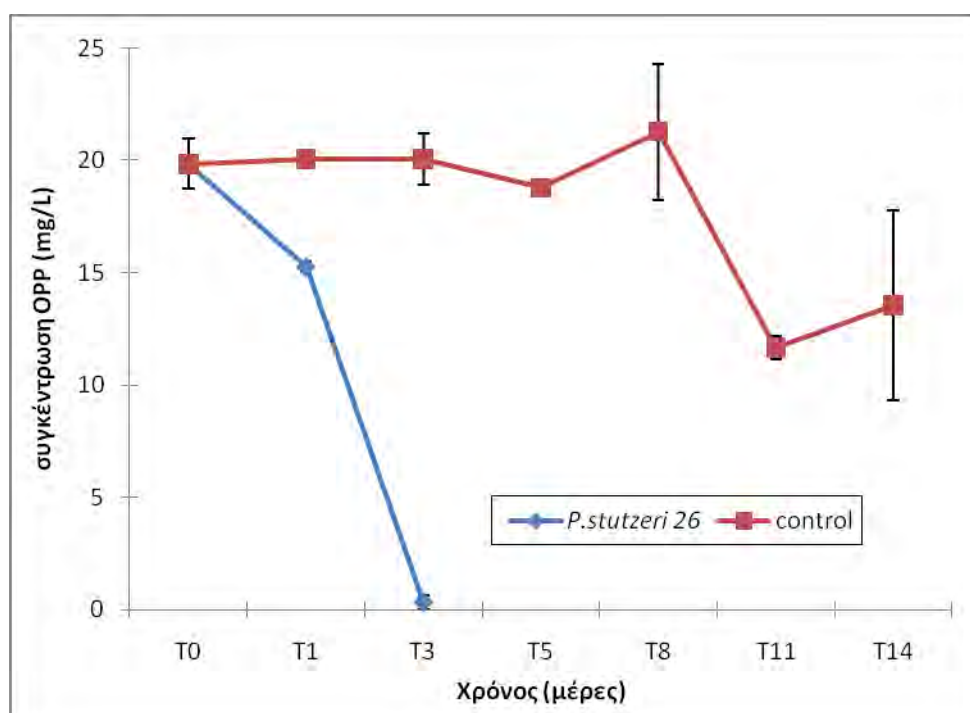
Εικόνα 3.3: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1 % PCR προϊόντων που προήλθαν από την ενίσχυση περιοχής του 16S rRNA γονιδίου των απομονωθέντων βακτηρίων Γραμμη 1: ladder biolabs 10kb, Γραμμή 2: στέλεχος 26, Γραμμή 3: Στέλεχος 21

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων ,ένθεση σε πλασμιδιακό φορέα pGEM και μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα DH5A *E.coli* .Ακολούθησε επιλογή πέντε αποικιών με το κατάλληλο ένθεμα , απομόνωση πλασμιδιακού DNA και αλληλούχιση του ενθέματος για ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών που αποδομούν το OPP. Ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του 16S rRNA των βακτηρίων που αποδομούσαν το OPP και ομοπαράθεσή τους στη βάση δεδομένων EMNL (BLAST) έδειξε ότι και τα δύο στελέχη ανήκουν στο είδος *Pseudomonas stutzeri* και παρουσιάζουν μεταξύ τους ιδιαίτερα υψηλή ομολογία 99,7%. Πιο συγκεκριμένα το στέλεχος 21 παρουσίασε

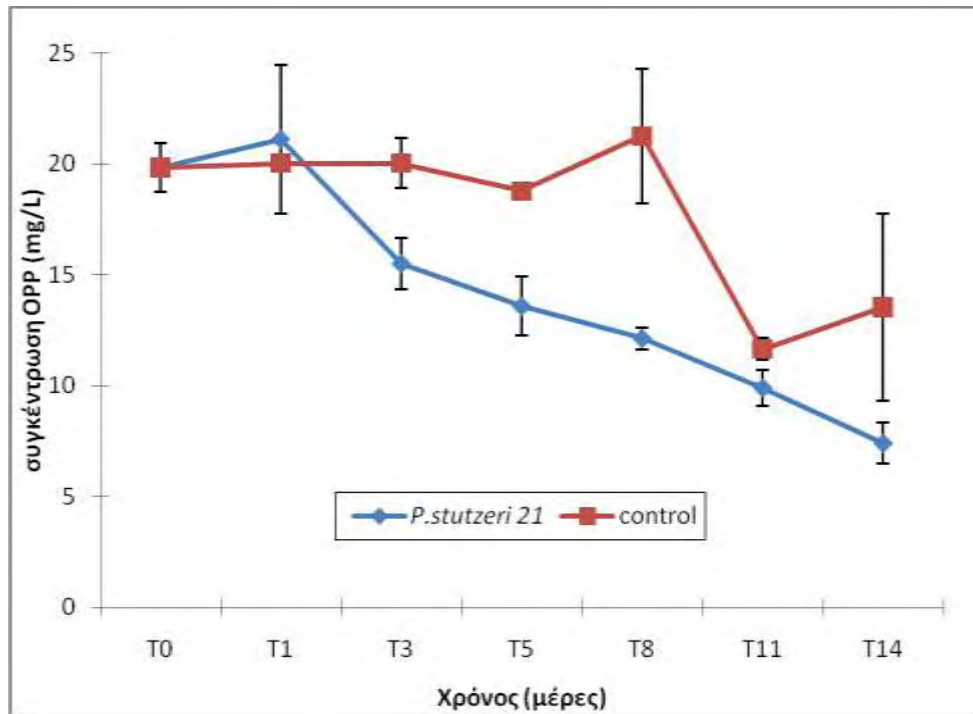
ομολογία 100% (1459/1459bp) με το στέλεχος *Pseudomonas stutzeri* SA1 (DQ059046) ενώ το στέλεχος 26 παρουσίασε υψηλή ομολογία (99%, 1455/1456) με το στέλεχος *Pseudomonas stutzeri* S1 (AY485995).

3.4 Μελέτη της κινητικής διάσπασης του OPP από τα στελέχη 21 και 26

Η πυκνότητα του μικροβιακού εμβολίου που προστέθηκε στις νέες καλλιέργειες με την έναρξη του πειράματος υπολογίστηκε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και επίστρωσης σε τριβλία LB ότι ήταν $1,4 \times 10^6$ και $3,5 \times 10^6$ κύτταρα/ml για τα στελέχη 26 και 21 αντίστοιχα. Το στέλεχος *P. stutzeri*, 26 αποδόμησε πλήρως το OPP εντός 3 ημερών σε θρεπτικό μέσο MSMN+OPP (20 mg/L) (Διάγραμμα 3.4). Αντίθετα, το στέλεχος *P. stutzeri*, 21 κατάφερε να διασπάσει περίπου 70% της αρχικής ποσότητας OPP εντός 14 ημερών (Διάγραμμα 3.5). Και στις δύο περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε σημαντική διάσπαση του OPP στις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες MSMN (Controls).



Διάγραμμα 3.4: Η αποδόμηση του OPP από το στέλεχος *Pseudomonas stutzeri* 26 σε υγρή καλλιέργεια MSMN+OPP



Διάγραμμα 3.5: Η αποδόμηση του OPP από το στέλεχος *Pseudomonas stutzeri* 21 σε υγρή καλλιέργεια MSMN+OPP

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

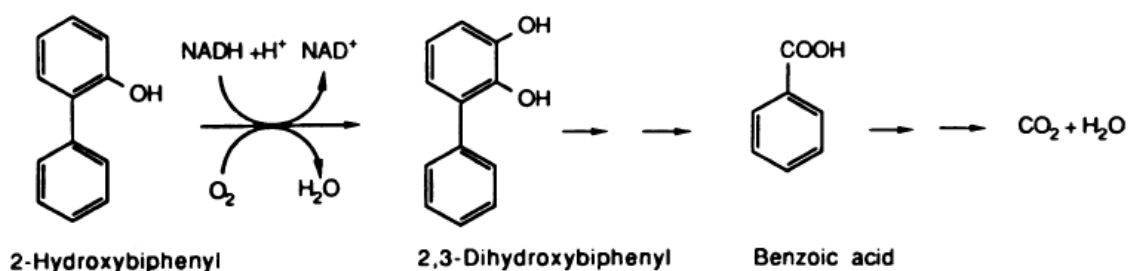
4.1 Αποδομητική ικανότητα των απομονωθέντων βακτηρίων-Κινητική τους- Προτεινόμενος μηχανισμός αποδόμησης από στελέχη *Pseudomonas*

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας απομονώθηκαν δύο βακτηριακά στελέχη που είχαν την ικανότητα να διασπούν το μυκητοκτόνο OPP και ιδιαίτερα το στέλεχος 26 που διέσπασε πλήρως 20 mg/l OPP εντός τριών ημερών. Και τα δύο βακτηριακά στελέχη ταυτοποιήθηκαν μοριακά ως συγγενή στελέχη του είδους *P. stutzeri*. Βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* είναι κατεξοχήν κυρίαρχα στο εδαφικό περιβάλλον και υπεύθυνα για την αποδόμηση πλήθους γεωργικών φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων οργανοφωσφορικών ethoprophos, methyl parathion, dimethoate, isofenphos και

monocrotophos (Karpouzas and Singh, 2006) αλλά και ποικίλων διφαινυλικών οργανικών ρυπαντών (Higson and Focht, 1989; Catelani *et al.*, 1973; Hayase *et al.*, 1990; Kimbara *et al.*, 1989). Ειδικότερα βακτήρια του είδους *P.stutzeri* έχουν αναφερθεί να εμπλέκονται στην διάσπαση του οργανοφωσφορικού γεωργικού φαρμάκου parathion (Munnecke and Hsieh, 1976), αλλά και του πυρεθροειδούς εντομοκτόνου cyfluthrin (Saikia *et al.*, 2005). Πέραν αυτών, βακτήρια του είδους *P.stutzeri* έχει βρεθεί ότι αποτελούν σημαντικούς αποδομητές αλειφατικών υδρογονανθράκων όπως το τετραχλωρίδιο (Criddle *et al.*, 1990) και το 1,2- διχλωροαιθάνιο (Dijk *et al.*, 2003) αλλά και αρωματικών υδρογονανθράκων όπως πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες, PCBs, ξυλένιο, τολουόλιο, βενζοϊκό και σαλυκιλικό οξύ (Lalucat *et al.*, 2006).

Ειδικότερα οι Higson και Focht (1989) απομόνωσαν δύο στελέχη του γένους *Pseudomonas* που είχαν την ικανότητα να αποδομούν ταχύτατα υδροξυλιωμένο διφαινύλιο στις θέσεις 3' και 4'. Τα συγκεκριμένα στελέχη F12 και F13 δεν είχαν την ικανότητα όμως να αποδομούν το 2-phenylphenol (OPP) παρουσιάζοντας έτσι μια εξειδίκευση ως προς τη θέση του OH υποκαταστάτη. Ακολούθως οι Kohler *et al.*, (1988) απομόνωσαν ένα άλλο στέλεχος *Pseudomonas* sp. strain HBP1 το οποίο είχε την ικανότητα να διασπά τα 2-υδροξυ και 2,2'-διυδροξυδιφαινύλια χρησιμοποιώντας τα ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Το πρώτο βήμα στην διάσπαση του OPP οφείλεται σε μια NADH-εξαρτώμενη μονοξυγενάση που προσθέτει μια υδροξυλομάδα στη θέση 3 του OPP σχηματίζοντας αρχικά το 2,3-διυδροξυδιφαινύλιο. Η δράση του συγκεκριμένου ενζύμου επιτυγχάνεται όταν έχουν ως υποστρώματα μόρια με μια 2-υδροξυφαινυλο-R δομή όπου R είναι ένα υδρόφοβο μόριο (μεθύλιο, φαινόλη, αιθυλιο, προπύλιο ή 2-υδροξυφαινύλιο). Η διάσπαση του OPP από το συγκεκριμένο στέλεχος ακολουθεί το *meta*-μονοπάτι με παραγωγή βενζοϊκού οξέος και τελικό προϊόν διοξείδιο του άνθρακα και νερό (Εικ.4.1).

Παρά την απομόνωση μεγάλου αριθμού βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να αποδομούν PCBs και ειδικότερα διφαινυλικά παράγωγα, αυτή ήταν η μόνο αναφορά ως σήμερα στη βιβλιογραφία για βακτήρια που έχουν την ικανότητα να διασπούν το OPP. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας αναφέρεται μόλις για δεύτερη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία η απομόνωση δύο βακτηριακών στελεχών που έχουν την ικανότητα να αποδομούν το OPP.



Εικόνα 4.1: *meta*-μονοπάτι της διάσπασης του OPP από το *Pseudomonas azelaica* στέλεχος HBP1 (Kohler *et al.*, 1988)

Τα δύο στελέχη αν και απομονώθηκαν από το ίδιο εδαφικό δείγμα και ανήκουν στο ίδιο γένος και είδος, έδειξαν εντελώς διαφορετική αποδομητική ικανότητα και η κινητική τους διαφέρει αισθητά. Έτσι το στέλεχος 26 κατάφερε να διασπάσει 20 mg/L OPP εντός 3 ημερών σε αντίθεση με το στέλεχος 21 που διέσπασε περίπου 70 % της αρχικής ποσότητας OPP εντός 14 ημερών. Το στέλεχος της χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα καλός αποδομητής του OPP καθώς κατάφερε να διασπάσει πλήρως το μυκητοκτόνο σε σύντομο χρονικό διάστημα και συνεπώς έχει την προοπτική να χρησιμοποιηθεί για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις OPP.

Αντίστοιχα υψηλή ικανότητα διάσπασης του OPP παρατηρήθηκε σε πειράματα εργαστηρίου από το μύκητα λευκής σήψης *Trameters versicolor* όπου η διάσπαση 50 mg/l ολοκληρώθηκε εντός 5 ημερών με παράλληλη ενεργοποίηση του λιγνολυτικού ενζυμικού συστήματος του μύκητα που περιλαμβάνει υπεροξειδάσεις και λακκάσες (Karas *et. al.*, 2011). Παρόλα αυτά θα πρέπει να τονιστεί η χαμηλή ανταγωνιστικότητα των μυκήτων αυτών σε συστήματα επεξεργασίας αποβλήτων ή σε μίγμα με έδαφος που μειώνει σημαντικά την αποτελεσματικότητά τους ως αποδομητές.

4.2 Συμπεράσματα και μελλοντικές ερευνητικές κατευθύνσεις

Συνολικά η παρούσα πτυχιακή οδήγησε στην απομόνωση δύο βακτηριακών στελεχών από έδαφος που είχε χρόνια επιβάρυνση με υγρά απόβλητα από συσκευαστήρια που περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου OPP. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν με μοριακές τεχνικές ως συγγενή του είδους *P.stutzeri* εκ των οποίων ιδιαίτερα το ένα είχε την ικανότητα να διασπά ταχύτατα το μυκητοκτόνο OPP.

Περαιτέρω μελέτες στο εργαστήριο θα στοχεύσουν:

1. Στην απομόνωση και ταυτοποίηση αμιγών βακτηριακών στελεχών από τις αξενικές καλλιέργειες που είχαν την ικανότητα να διασπούν ταχύτατα το OPP.
2. Επίσης τα απομονωθέντα στελέχη θα χρησιμοποιηθούν για τη μοριακή μελέτη του μεταβολικού μονοπατιού του OPP για τη διαευκρίνιση των γονιδίων, ενζύμων και μεταβολιτών που εμπλέκονται. Πέρα αυτού, τα αποδομητικά στελέχη θα αξιολογηθούν ως προς την ικανότητά τους να αποδομούν υψηλές συγκεντρώσεις OPP (έως 500 mg/L) που προσωμοιάζουν πραγματικές συνθήκες στα υγρά απόβλητα συσκευαστηρίων
3. Τα απομονωθέντα βακτήρια θα αξιολογηθούν περαιτέρω ως μικροβιακά εμβόλια για τη χρήση τους σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων κάτι που δεν έχει δοκιμαστεί μέχρι σήμερα και κρίνεται απολύτως απαραίτητο σύμφωνα με την κοινοτική νομοθεσία για τη χρήση γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αγγελοπούλο Φ., Τζιουβάρα Γ., (2007). Πτυχειακή εργασία : Η γνώση και η στάση των κατοίκων του Δήμου Πύλης προς τον Πηνειό ποταμό, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2007
2. Ang LI, Yuanyuaan QU, Jiti Z., Min G., (2009). Isolation and characteristics of a novel biphenyl-degrading bacteria strain, *Dyella ginsengisoli* LA-4. *Journal of Environmental Sciences* 21, 211-217.
3. Criddle, C. S., J. T. DeWitt, Grbic-Galic D., and McCarty P. L. (1990). Transformation of carbon tetrachloride by *Pseudomonas* sp. strain KC under denitrification conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3240-3246.
4. Dijk J. A., Stams A. J. M., Schraa G., Ballerstedt H, J. A. M. de Bont, and Gerritse J. (2003). Anaerobic oxidation of 2-chloroethanol under denitrifying conditions by *Pseudomonas stutzeri* strain JJ. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 68-74.
5. EFSA (2008). Conclusion on the pesticide peer review of 2-phenylphenol. Summary of the EFSA Scientific Report 215, 1-67.
6. EPA (2004). <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets>.
7. EU (2008). Draft assessment report, Initial risk assessment provided by the Rapporteur member state for the substance 2-phenylphenol.
8. Furukawa K., Miyazaki, T. (1986). Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.*, 166, 392-398.
9. Furukawa K., Fujihara H (2008). Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls: Biochemical and Molecular Features. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105, 433-449.
10. Higson FK, Focht DD, (1989). Degradation of 2- Bromobenzoic Acid by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied And Environmental Microbiology*, June 1990, p. 1615-1619.
11. <http://www.edf.org/article.cfm?contentID=3952>
12. <http://en.wikipedia.org/wiki/2-Phenylphenol>
13. Jasper MCM, Schmid A, Sturme MHJ, Goslings DAM, Kohler H-P.E., van der Meer JR (2001). Transcriptional organization and dynamic expression of the

- hbpCAD genes, which encode the first three enzymes for 2-hydroxybiphenyl degradation in *Pseudomonas azelaica* HPB1. *Journal of Bacteriology* 183, 270-279.
14. Karas P., Perucchon C., Exarhou C., Ehaliotis C., Karpouzas D.G., (2011). Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. *Biodegradation* Feb. (2011). 22 (1); 215-28.
 15. Karpouzas, D.G. and Singh, B.K. (2006). Phosphorus containing xenobiotics: microbial degradation, metabolic pathways and molecular basis. *Advances in Microbial Physiology* 51, 119-186.
 16. Kohler HP, Kohler-Staub D, Focht D (1998). Degradation of 2-hydroxybiphenyl and 2,2'- dihydroxybiphenyl by *Pseudomonas* sp.strain HBP1, *Appl Environ Microbiol.* 1988 November; 54(11), 2683-2688.
 17. Lalucat J., Bennasar A., Bosch R., García-Valdés E., Palleroni N.J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*, *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006 June; 70(2), 510–547.
 18. Lunt D., Evans WC (1970). The microbial metabolism of biphenyl, *Biochem. J.* (1970) 118, (54–0).
 19. Masai E., Yamada, A., Healy J. M., Hatta, T., Kimbara,K., Fukuda, M., and Yano, K.(1995). Characterization of biphenylcatabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyldegrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ.Microbiol.*, 61, 2079–2085.
 20. Munnecke D. M., and D. P. H. Hsieh (1976). Pathways of microbial metabolism of parathion. *Appl. Environ. Microbiol.* 31,63-69.
 21. Saikia N., Das S.K, Patel B.K.C, Niwas R.,Singh A.,Gopal M. (2005). Biodegradation of beta-cyfluthrin by *Pseudomonas stutzeri* strain S1. *Biodegradation* 16, 581-589.
 22. Saxena S., B T Ashok, Musarrat J, (1997). Mutagenic and genotoxic activities of four pesticides : captan,foltaf,phosphamidon and furadan .*Biochem Mol Biol Int* 1997 May;41 (6), 1125-36

