

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

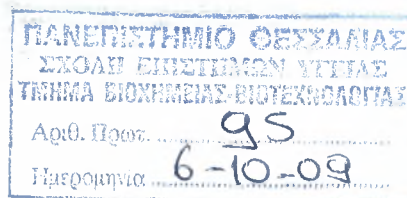
ΚΑΡΑΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ



**«Αξιολόγηση επιλεγμένων μυκήτων για την αποδόμηση γεωργικών
φαρμάκων σε υγρά απόβλητα της αγροτικής -μεταποιητικής
βιομηχανίας»**

ΛΑΡΙΣΑ 2009

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΚΑΡΑΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ



**«Αξιολόγηση επιλεγμένων μυκήτων για την αποδόμηση γεωργικών
φαρμάκων σε υγρά απόβλητα της αγροτικής -μεταποιητικής
βιομηχανίας»**

ΛΑΡΙΣΑ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7643/1
Ημερ. Εισ.: 18-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
632.952
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087153

**«Αξιολόγηση επιλεγμένων μυκήτων για την αποδόμηση γεωργικών
φαρμάκων σε υγρά απόβλητα της αγροτικής -μεταποιητικής
βιομηχανίας »**

Τριμελής Επιτροπή:

- Καρπούζας Δημήτριος, Λέκτορας βιοτεχνολογίας αποικοδομητικών μικροοργανισμών, τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Οιχαλιώτης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής εδαφολογίας και γεωργικής χημείας, τμήματος αξιοποίησης φυσικών πόρων και γεωργικής μηχανικής, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Πρόλογος

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Καρπούζα Δημήτριο, λέκτορα βιοτεχνολογίας αποικοδομητικών μικροοργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη πολύτιμη βοήθειά του που μου παρείχε κατά την ανάθεση, την διεξαγωγή του πειράματος και την γραπτή παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στην Δρ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη και τον Δρ. Οιχαλιώτη Κωνσταντίνο που με ευχαρίστηση δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή για την παρούσα μελέτη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος και ιδιαίτερα τους Δρ. Ιωάννη Υψηλάντη και Δρ Δελή Κωνσταντίνο, για τη βοήθειά τους στη διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδερφό μου Στέφανο για την ηθική και οικονομική τους υποστήριξη, κατά την διάρκεια φοίτησης του μεταπτυχιακού μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	3
Κεφάλαιο Πρώτο	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση	8
1.2. Περιβαλλοντική ρύπανση από φυτοφάρμακα	9
1.3. Υγρά απόβλητα από τη βιομηχανία μεταποίησης φρούτων	10
1.4. Φυτοφάρμακα και μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων	11
1.4.1. Chlorpyrifos	11
1.4.2. Imazalil	13
1.4.3. Thiabendazole	14
1.4.4. <i>Ortho</i> -phenyl-phenol	16
1.4.5. Diphenylamine	18
1.5. Βιοαπορρύπανση	19
1.6. Μύκητες λευκής σήψης (White rot fungi)	22
1.6.1. Μηχανισμός δράσης του ενζύμου λακκάση	23
1.6.2. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση	24
1.6.3. Μηχανισμός δράσης της λιγνίνης υπεροξειδάσης (LiP)	26
1.7. Αποδόμηση φυτοφαρμάκων με τη βοήθεια μυκήτων λευκής σήψης	28
1.8. Επιλεγμένοι μύκητες που εξετάστηκαν	29
1.8.1. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	30

1.8.2. <i>Pleurotus ostreatus</i>	30
1.8.3. <i>Trametes versicolor</i>	31
1.8.4. <i>Aspergillus niger</i>	32
1.9. Σκοπός του πειράματος	33

Κεφάλαιο Δεύτερο

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Μύκητες	35
2.2. Θρεπτικά υποστρώματα	35
2.2.1. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Potato dextrose agar (PDA)	35
2.2.2. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Malt Extract Agar (MEA)	36
2.2.3. Παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος εκχυλίσματος άχυρου (StEM)	37
2.3. Μέθοδοι ανάλυσης φυτοφαρμάκων σε σύστημα HPLC	38
2.3.1. Σύστημα HPLC	38
2.3.2. Διαλύτες και φυτοφάρμακα	38
2.3.3. Καμπύλες αναφοράς	38
2.3.4. Πειράματα ανάκτησης	39
2.3.5. Chlorpyrifos και TCP	39
2.3.6. Imazalil	40
2.3.7. Thiabendazole και <i>ortho</i> -phenylphenol	40
2.3.8. Diphenylamine	41
2.4. Μέτρηση μυκηλιακής βιομάζας	41

2.5. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας	41
2.5.1. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση	41
2.5.2. Μελέτη της παρεμβολής του υποστρώματος στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (εξαρτημένου ή μη του Mn)	42
2.5.3. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένου του Mn)	43
2.5.4. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση	44
2.5.5. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης	45
2.5.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση	45
2.6. Πειραματικός σχεδιασμός	46
2.6.1. Chlorpyrifos	46
2.6.2. Thiabendazole, Imazalil, 2-phenyl-phenol και Diphenylamine	49
2.7. Στατιστική ανάλυση	51

Κεφάλαιο Τρίτο

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Γενικά	52
3.2. Chlorpyrifos	52
3.3. Imazalil	58
3.4. Thiabendazole και <i>ortho</i> -phenylphenol	64
3.5. Diphenylamine	70

Κεφάλαιο Τέταρτο

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Συζήτηση	76
4.1.1. Chlorpyrifos	77
4.1.2. Imazalil	78
4.1.3. Thiabendazole και ortho-phenylphenol	79
4.1.4. Diphenylamine	81
4.2. Συμπεράσματα	82
4.3. Συγκριτικά συμπεράσματα	83
4.4. Μελλοντική εργασία	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

ΠΡΩΤΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση

Από τον περασμένο αιώνα και στις μέρες μας παρατηρείται παγκοσμίως, μια σημαντική αύξηση της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Η βιομηχανική επανάσταση, η αύξηση του πληθυσμού, η αστικοποίηση και η αμέλεια για το περιβάλλον έχουν ως συνέπεια την συνεχή απελευθέρωση χημικών στο περιβάλλον συμβάλλοντας έτσι στην υποβάθμιση του (Philp *et al.*, 2005). Ένας μεγάλος αριθμός βιομηχανιών, όπως η βιομηχανίες παραγωγής πετρελαίου και χημικών, ευθύνονται σε ένα σημαντικό βαθμό για την απελευθέρωση ξеноβιοτικών ουσιών στο περιβάλλον. Συμπερασματικά, στο φυσικό περιβάλλον στις μέρες μας υπάρχει πληθώρα χημικών ρυπαντών, οι οποίοι παρουσιάζουν τοξικές επιδράσεις σε ανώτερους και κατώτερους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς μη-στόχους και προέρχονται από φυσικούς και ανθρωπογενείς παράγοντες (Tortella and Diez, 2005).

Από τις αρχές τις δεκαετίας του '70 υπάρχει μια κοινή απαίτηση για πρακτικές πρόληψης της ρύπανσης και αποκατάστασης των υπαρχόντων ρυπασμένων και υποβαθμισμένων περιοχών. Η προστασία της ανθρώπινης υγείας αλλά και του περιβάλλοντος από τη βιομηχανική ρύπανση αποτελεί πρωτεύων σκοπό για την κοινωνία και τους επιστήμονες. Δεδομένης της τοξικότητας που προκαλούν στο περιβάλλον οι ξеноβιοτικές ουσίες, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες απομάκρυνσής τους από το οικοσύστημα, με φυσικές τεχνικές όπως η αποτέφρωση αλλά και με τη βοήθεια μικροοργανισμών (Philp *et al.*, 2005).

Η λίστα των παραγόμενων χημικών ουσιών από τις βιομηχανίες μεγαλώνει συνεχώς με την πάροδο των χρόνων και είναι αυτή που ευθύνεται για τη συνεχώς αυξανόμενη ρύπανση του περιβάλλοντος. Οι ξеноβιοτικές ουσίες που απαντώνται στο περιβάλλον διαφέρουν στην χημική τους δομή από τις φυσικές οργανικές ουσίες. Τέτοιοι οργανικοί ρυπαντές είναι τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια, οι πολυχλωριωμένοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες κ.α. (Iwamoto and Nasu 2001: Dua *et al.*, 2002).

Η επιβάρυνση του περιβάλλοντος ή ενός συγκεκριμένου οικοσυστήματος, σχετίζεται άμεσα από τον τύπο των ρύπων που αναφέρθηκαν παραπάνω, αλλά και με τα επίπεδα συγκέντρωσή τους στο περιβάλλον που μελετούμε. Η μέτρηση της συγκέντρωσης του ρύπου στο περιβάλλον εξαρτάται κυρίως από την ποσότητα και το ρυθμό με τον οποίο απελευθερώνεται, την σταθερότητά του στο περιβάλλον, την διαλυτότητα του, την κινητικότητα του και τέλος τον ρυθμό αβιοτικής και βιοτικής αποδόμησης του (Janssen *et al.*, 2001).

1.2. Περιβαλλοντική ρύπανση από φυτοφάρμακα

Στην σύγχρονη συμβατική γεωργία η αυξημένη παραγωγή αγροτικών προϊόντων εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την εφαρμογή φυτοφαρμάκων τα οποία προστατεύουν τα φυτά από προσβολές από μύκητες, βακτήρια, νηματώδεις και έντομα που περιορίζουν σημαντικά την αγροτική παραγωγή. Οι πιο γνωστές κατηγορίες φυτοφαρμάκων είναι τα ζιζανιοκτόνα, τα εντομοκτόνα και τα μυκητοκτόνα (Tortella and Diez 2005; Ζιώγας 2007).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, οι ποσότητες των φυτοφαρμάκων που πουλήθηκαν κατά το 2001, έφτασαν περίπου τους 330.000 τόνους, αποδεικνύοντας έτσι την αναγκαιότητά τους στην αγροτική παραγωγή. Τα φυτοφάρμακα με την πάροδο του χρόνου, διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζουν σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον και στην υγεία του ανθρώπου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η χρήση του εντομοκτόνου DDT κατά την δεκαετία του '50 και του '60, είχε καταστροφικές συνέπειες για τα χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα αλλά και για την υγεία οργανισμών μη στόχων (Echols *et al.*, 2008).

Παράλληλα αναφέρεται, ότι η αλόγιστη χρήση των φυτοφαρμάκων πριν και μετά την συγκομιδή, μπορεί να προκαλέσει την ρύπανση υδάτινων φυσικών πόρων, όπως επιφανειακά και υπόγεια νερά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πιθανή ρύπανση του πόσιμου νερού και την επιβάρυνση της ανθρώπινης υγείας. Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι σε επιφανειακά αλλά και σε υπόγεια νερά ανιχνεύτηκαν ποσότητες ζιζανιοκτόνων (π.χ. diuron) και εντομοκτόνων (π.χ. chlorpyrifos), που χρησιμοποιήθηκαν κατά την γεωργική πρακτική πριν την συγκομιδή (Echols *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009), αλλά και ποσότητες μυκητοκτόνων (π.χ. imazalil,

thiabendazole) που χρησιμοποιήθηκαν κατά τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς των φρούτων (Ortelli *et al.*, 2005).

Τα φυτοφάρμακα μπορούν να προκαλέσουν ρύπανση των υδάτινων φυσικών πόρων μέσω σημειακών και μη – σημειακών πηγών. Μη σημειακή ρύπανση αποτελεί η διάχυση των φυτοφαρμάκων στα υδάτινα οικοσυστήματα μέσω της κάθετης απορροής τους στο έδαφος ύστερα από την εφαρμογή τους στον αγρό κατά την κοινή γεωργική πρακτική. Αντίθετα, η σημειακή ρύπανση των φυσικών υδάτινων πόρων που προκύπτει από μη ορθόδοξες γεωργικές πρακτικές όπως το πλύσιμο των ψεκαστικών μηχανημάτων ή η απόρριψη υγρών αποβλήτων από την αγροτική βιομηχανία (μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων) που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις φυτοφαρμάκων σε επιφανειακά υδροφόρα συστήματα (Reichenberger *et al.*, 2007: de Wilde *et al.*, 2007: Candela *et al.*, 2008: Bourton *et al.*, 2009).

Η ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων υδροφόρων συστημάτων από τη χρήση των φυτοφαρμάκων αποτελεί μείζον πρόβλημα για την Ευρωπαϊκή Ένωση. Για το λόγο αυτό η Ευρωπαϊκή Ένωση, θέσπισε και καθόρισε τα ανώτατα επιτρεπτά όρια ανίχνευσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο νερό που προορίζεται για πόσιμο, στα 0.1 mg L^{-1} για ένα φυτοφάρμακο και στα 0.5 mg L^{-1} για το σύνολο των φυτοφαρμάκων που περιέχονται σε ένα δείγμα νερού (de Wilde *et al.*, 2007: Bourton *et al.*, 2009).

1.3. Υγρά απόβλητα από τη βιομηχανία μεταποίησης φρούτων

Η βιομηχανία μεταποίησης φρούτων εμπλέκεται στους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς των φρούτων με κύριο σκοπό τον περιορισμό της υποβάθμισης της ποιότητας των αγροτικών προϊόντων κατά την αποθήκευση. Η μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων όπως μήλων, αχλαδιών, εσπεριδοειδών και μπανανών περιλαμβάνει την χρήση ιδιαίτερα υπολειμματικών μυκητοκτόνων όπως imazalil, thiabendazole και 2-phenyl-phenol, με σκοπό να αποτρέψουν την εμφάνιση μυκήτων κατά την αποθήκευση (Ortelli *et al.*, 2005).

Οι μέθοδοι εφαρμογής των μυκητοκτόνων στα φρούτα ποικίλουν και περιλαμβάνουν: 1) ψεκασμό πυκνών διαλυμάτων μυκητοκτόνων με υψηλή ή χαμηλή ένταση, 2) εμβάπτιση σε πυκνά διαλύματα μυκητοκτόνων και 3) ψεκασμό με τεχνικές

υδρονέφωσης. Οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων κυμαίνονται από 1000 mg L⁻¹ στα υδατικά διαλύματα που εφαρμόζονται στα φρούτα ως και 2000 mg L⁻¹ όταν η εφαρμογή συνοδεύεται από ταυτόχρονη κήρωση των φρούτων (Ritenour et al., 2003; Mari *et al.*, 2003). Κατά συνέπεια, τα υγρά απόβλητα που προκύπτουν από την μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων και περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις υπολειμματικών μυκητοκτόνων θα πρέπει να υποστούν κάποια επεξεργασία πριν την απόρριψη τους στο περιβάλλον. Η εναπόθεση των συγκεκριμένων υγρών αποβλήτων χωρίς προηγούμενη επεξεργασία οδηγεί σε σημαντική επιβάρυνση των φυσικών υδάτινων πόρων και υποβάθμιση της οικολογικής τους ποιότητας.

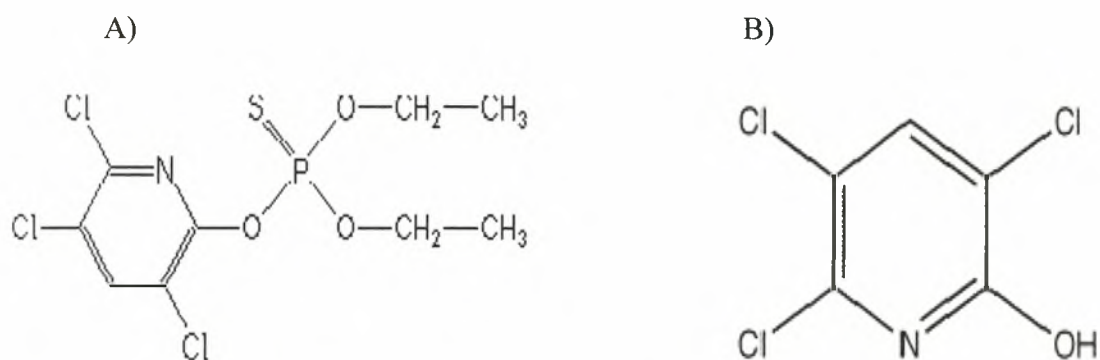
1.4. Φυτοφάρμακα και μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων

1.4.1. Chlorpyrifos

Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις χρησιμοποιούνται παγκοσμίως ως εντομοκτόνα, στην αγροτική παραγωγή, για οικιακή χρήση (καταπολέμηση μυγών και κουνουπιών) και για κτηνιατρική χρήση. Υπολογίζεται ότι τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα αποτελούν το 34% της παγκόσμιας χρήσης εντομοκτόνων και ότι περίπου 40.000 τόνοι τέτοιων εντομοκτόνων εφαρμόζονται κάθε έτος στις αγροτικές εκτάσεις των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (Karpouzas and Singh 2006, Singh and Walker 2006). Παρά την ιδιότητα τους να βιοαποδομούνται, τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα από μελέτες έχει αποδειχτεί ότι παρουσιάζουν υψηλή οξεία τοξικότητα στα θηλαστικά. Χαρακτηριστικό είναι να αναφερθεί ότι σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα προκαλούν κάθε χρόνο περίπου 3 εκατομμύρια δηλητηριάσεις και 200,000 θανάτους σε ανθρώπους (Karalliedde & Senanayake, 1999) καθώς και νευρομυϊκές παθήσεις σε ανθρώπους που έχουν εκτεθεί σε αυτά (Sogorb et al., 2004).

Το chlorpyrifos (O,O-diethyl-O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate, Εικόνα 1α) ανήκει στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων και χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο επαφής και στομάχου ευρέως φάσματος. Εφαρμόζεται σε πλήθος καλλιεργειών αλλά κυρίως σε δενδρώδεις καλλιέργειες ακόμη και κοντά στην συγκομιδή με αποτέλεσμα την ανίχνευση υπολειμμάτων του στα απόνερα που προκύπτουν κατά την μετασυλλεκτική επεξεργασία των νωπών

φρούτων. Η ταχύτητα διάσπασης του chlorpyrifos στο έδαφος ποικίλει και ο χρόνος ημίσειας ζωής του κυμαίνεται μεταξύ 10 - 120 μέρες, με κυριότερο προϊόν διάσπασης το 3,5,6-trichloro-2-pyridinol TCP (Εικόνα 1β), το οποίο σε υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση εμποδίζοντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών που βιοαποδομούν το chlorpyrifos (Duirk and Collette, 2006: Karpouzas and Singh, 2006: Lakshmib *et al.*, 2008: Li *et al.*, 2007: Yang *et al.*, 2006). Η μεγάλη απόκλιση υγρασία, το οργανικό φορτίο και η μέθοδος εφαρμογή του εντομοκτόνου (Singh *et al.*, 2003).



Εικόνα 1: Χημική δομή του φυτοφαρμάκου A) chlorpyrifos και του κύριου μεταβολίτη του B) TCP.

Το chlorpyrifos χαρακτηρίζεται, όπως και άλλα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, από ένα χημικό δεσμό P-O-C, που όταν υδρολυθεί οδηγεί στην παραγωγή του TCP. Ένζυμα που εμπλέκονται στην διάσπαση αυτού του δεσμού έχουν χαρακτηριστεί ως φωσφοτριεστεράσες και έχουν απομονωθεί από πλήθος διαφορετικών μικροοργανισμών (Singh *et al.*, 2003). Παρόλο την μικρή υπολειμματική δράση του chlorpyrifos και την αντιμικροβιακή δράση του κύριου μεταβολίτη του TCP, πλήθος μελετών έχουν οδηγήσει στην απομόνωση μικροοργανισμών από εδάφη ή υδάτινα περιβάλλοντα με την ικανότητα να αποδομούν το chlorpyrifos.

Πρόσφατη μελέτη οδήγησε στην απομόνωση από ρυπασμένα νερά μιας βιομηχανίας παρασκευής chlorpyrifos στην Κίνα ενός ιδιαίτερα αποτελεσματικού βακτηριακού στελέχους Dsp-2 του γένους *Sphingomonas* sp., που αποδομούσε ταχύτατα το εντομοκτόνο chlorpyrifos (Li *et al.*, 2007) με αντίστοιχη παραγωγή TCP.

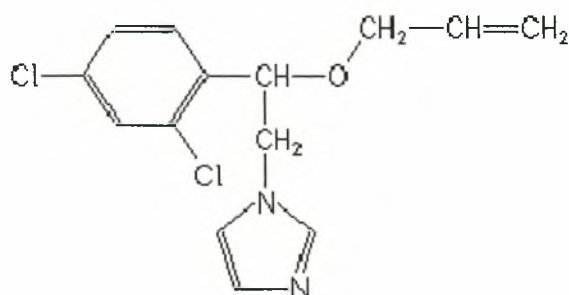
Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος όταν εμβολιάστηκε σε έδαφος φορτισμένο με 100 mg L^{-1} chlorpyrifos οδήγησε σε αποδόμηση του 90% του εντομοκτόνου σε διάστημα 7 ημερών.

Αντίστοιχες μελέτες από τους Yang *et al.*, (2006) οδήγησαν στην απομόνωση ενός άλλου βακτηριακού στελέχους YU-1 του γένους *Stenotrophomonas* από λάσπη υγρών αποβλήτων εργοστασίου παρασκευής εντομοκτόνων. Το στέλεχος YU-1 χρησιμοποιήθηκε στην πλήρη αποδόμηση του chlorpyrifos (100 mg L^{-1}) εντός 24 ωρών με αντίστοιχη συσσώρευση TCP (περίπου 75 mg L^{-1}).

Ανάλογες μελέτες σε εδάφη που συλλέχθηκαν από περιοχή της Ινδίας, και είχαν επιβαρυνθεί με το εντομοκτόνο chlorpyrifos επί σειρά ετών οδήγησαν στην απομόνωση οκτώ βακτηριακών στελεχών που ανήκαν στα είδη *Pseudomonas fluorescence* (P), *Brucella melitensis* (M19), *Bacillus subtilis* (M119), *Bacillus cereus* (D113), *Klebsiella sp* (Q1a/Q2a), *Serratia marcescens* (Q2b) και *Pseudomonas aeruginosa* (Q2c) που παρουσίαζαν αυξημένη αποδομητική ικανότητα για το chlorpyrifos (Lakshmib *et al.*, 2008).

1.4.2. Imazalil

Το imazalil (1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxy)ethyl]-1H-imidazole, (Εικόνα 2), είναι μυκητοκτόνο, της ομάδας των ιμιδαζολικών τα οποία δρουν παρεμποδίζοντας την βιοσύνθεση της εργοστερόλης στους μύκητες. Το imazalil παρουσιάζει ευρύ φάσμα δράσης και είναι αποτελεσματικό εναντίον Ασκομυκήτων και Αδηλομυκήτων στα οπωροφόρα και τα κηπευτικά αλλά κυρίως χρησιμοποιείται μετασυλλεκτικά για την προστασία των καρπών από μύκητες του γένους *Penicillium*, *Gloeosporium*, *Fusarium* κ.α. (Chu *et al.*, 2007; Kodama *et al.*, 2003; Maruyama *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2001).



Εικόνα 2: Χημική δομή του φυτοφαρμάκου Imazalil.

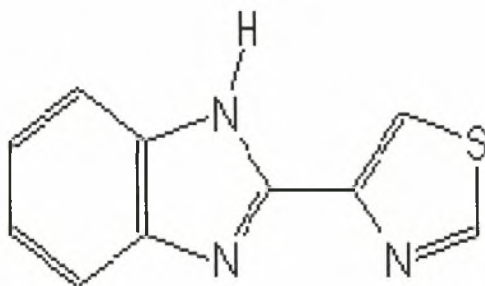
Μελέτες έχουν δείξει ότι το imazalil παρουσιάζει ανεπιθύμητες τοξικές επιδράσεις στον άνθρωπο και τα θηλαστικά. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι το imazalil παρουσίασε κυτταροτοξική δράση σε απομονωμένα ηπατικά κύτταρα αρουραίων (Nakagawa and Moore, 1995), ενώ βρέθηκε ότι επηρεάζει την δράση του κυτοχρώματος P450 (Muto *et al.*, 1997). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι το imazalil έχει ανασταλτική δράση εναντίον της αρωματάσης CYP19, η οποία καταλύει την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (Vinggaard *et al.*, 2000).

Πρόσφατη αξιολόγηση του μυκητοκτόνου imazalil από την Επιστημονική Επιτροπή Φυτών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Scientific Committee on Plants, SCP) κατέληξε ότι η μετασυλλεκτική χρήση του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου σε φρούτα, κηπευτικά και πατάτες θα επιτραπεί στα κράτη-μέλη μόνο υπό την προϋπόθεση ότι θα υπάρξει ολοκληρωμένο και κατάλληλο σχέδιο απορρύπανσης των υγρών αποβλήτων που παράγονται από την συγκεκριμένη χρήση του. Εναλλακτικά, θα πρέπει να παρουσιάζονται μελέτες όπου τα υπολείμματα του μυκητοκτόνου δεν προκαλούν βλάβες σε χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα (91/414/EEC/ Imazalil-1688/VI/97-Final). Θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχουν δεδομένα στην διεθνή βιβλιογραφία για την μικροβιακή αποδόμηση του μυκητοκτόνου imazalil.

1.4.3. Thiabendazole

Το thiabendazole (TBZ, 2-(4-thiazolyl)-1*H*-benzimidazole, Εικόνα 3), ανήκει στην κατηγορία των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων και χρησιμοποιείται όπως και το imazalil για την καταπολέμηση μυκήτων στην μετασυλλεκτική αποθήκευση φρούτων και λαχανικών. Επίσης, το TBZ εφαρμόζεται προ-φυτρωτικά σε σπόρους

πατάτας, σιτηρών κ.α. και σε φρούτα και λαχανικά (μπανάνες, εσπεριδοειδή, κ.α.) για την καταπολέμηση παθογόνων ασθενειών του γένους *Verticillium sp*, *Trichoderma sp*, *Penicillium sp*, *Botrytis sp* (Hu *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2001).



Εικόνα 3: Χημική δομή του φυτοφαρμάκου Thiabendazole.

Το TBZ αναστέλλει τον σχηματισμό και τη λειτουργία των μικροσωληνίσκων της κυτταρικής ατράκτου κατά την διάρκεια της μίτωσης των μυκήτων (Danaher *et al.*, 2007). Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι το TBZ αναστέλλει τη δράση του ενζύμου ρεδουκτάση του φουμαρικού οξέος στο σχηματισμό του ηλεκτρικού οξέος και την απορρόφηση της γλυκόζης (Bennett and Bryant, 1984).

Το TBZ έχει αποδειχτεί ότι δεν παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα σε ανθρώπους και θηλαστικά, σε δόσεις μέχρι και 20 φορές πάνω από την συνιστώμενη (Danaher *et al.*, 2007), ενώ παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα σε ψάρια (91/414/EEC/ Thiabendazole). Το TBZ είναι ύποπτο για καρκινογένεση σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις, προκαλώντας αδενώματα του θυρεοειδή και διαταραχή στην ισορροπία των ορμονών σε αρουραίους. Με βάση τις τοξικολογικές αναλύσεις η Ευρωπαϊκή Ένωση θέσπισε ως ανώτατο επιτρεπτό όριο MRL στον άνθρωπο για το TBZ, τα 100 µg/kg (Cannavan *et al.*, 1998: 91/414/EEC/ Thiabendazol).

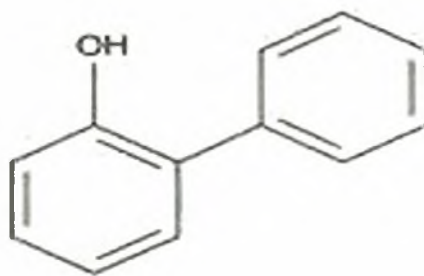
Το TBZ παρουσιάζει υψηλή υπολειμματικότητα στο περιβάλλον και για το λόγο αυτό δεν μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια ο χρόνος ημίσειας ζωής του. Αυτό οφείλεται κυρίως, στην ιδιότητα του να δεσμεύεται ισχυρά στα κolloειδή του εδάφους. Η διάσπαση του TBZ στο έδαφος πραγματοποιείται με ιδιαίτερα χαμηλούς ρυθμούς τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες (91/414/EEC/ Thiabendazol). Ο κύριος μεταβολίτης του TBZ, είναι το 5-hydroxythiabendazole (5-

OH TBZ) που παράγεται ύστερα από υδροξυλίωση του 5 άκρου του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου (Cannavan *et al.*, 1998).

Αξιολόγηση της χρήσης του μυκητοκτόνου TBZ στα πλαίσια της Ευρωπαϊκής Κοινότητας από την Επιστημονική Επιτροπή Φυτών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Scientific Committee on Plants, SCP) κατέληξε ότι η εναπόθεση υγρών αποβλήτων που παράγονται από την χρήση του στην μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων, σε επιφανειακά νερά ή στους βιολογικούς καθαρισμούς αστικών αποβλήτων, μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα στην λειτουργία των συστημάτων αυτών καθώς και προβλήματα τοξικότητας σε οργανισμούς μη-στόχους (91/414/EEC/ Thiabendazole). Θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχουν δεδομένα στην διεθνή βιβλιογραφία για την μικροβιακή αποδόμηση του μυκητοκτόνου imazalil.

1.4.4. *Ortho*-phenyl-phenol

Το *ortho*-phenyl-phenol (OPP) (Εικόνα 4), είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μυκητοκτόνο της ομάδας των αρωματικών υδρογονανθράκων και χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο αλλά και ως συστατικό απολυμαντικών προϊόντων. Το OPP χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο στην αντιμετώπιση μετασυλλεκτικών σήψεων (*Penicillium digitatum*, *P. Italicum*, *Botrytis cinerea* κ.α.), κυρίως εσπεριδοειδών φρούτων και στη συσκευασία σπόρων, αλλά και ως μυκητοστατικό κερύ για την επικάλυψη λαχανικών για την αποφυγή μικροβιακών αλλοιώσεων κατά την αποθήκευση και μεταφορά των λαχανικών. Ακόμη, το OPP, ως απολυμαντικό, χρησιμοποιείται για κάθε χρήση νοσοκομειακής και υγιεινής φροντίδας στον καθαρισμό και την απολύμανση μηχανημάτων (Cnubben *et al.*, 2002; Zamora *et al.*, 2004; Γεωργική φαρμακολογία, Ζιώγας 2007).



Εικόνα 4: Χημική δομή του φυτοφαρμάκου *ortho*-phenyl-phenol.

Για την διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του OPP έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες και διατυπώθηκαν πολλές θεωρίες, αλλά δεν φαίνονται να εξηγούν ικανοποιητικά την πρωταρχική δράση του μυκητοκτόνου. Μια επικρατούσα θεωρία αναφέρει ότι το OPP και γενικά οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες, προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων στην εσωτερική μιτοχονδριακή και πυρηνική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δίκτυο των ευαίσθητων μυκήτων. Έτσι για παράδειγμα, με τη δράση των μυκητοκτόνου δημιουργούνται βλάβες στην πυρηνική μεμβράνη των μυκήτων, αφήνοντας εκτεθειμένα τα χρωμοσώματα στη δράση ελευθέρων ριζών και ενζύμων (Γεωργική φαρμακολογία, Ζιώγας 2007).

Σύμφωνα με το πρακτορείο περιβαλλοντικής προστασίας των Ηνωμένων πολιτειών Αμερικής (U.S. Environmental Protection Agency 2006, EPA), σε τοξικολογικές μελέτες που έγιναν σε εργαστηριακά ποντίκια και κουνέλια, το OPP παρουσίασε τοξικότητα μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (περίπου 1650 mg kg⁻¹), οδηγώντας σε μείωση σωματικού βάρους, πρόσληψης τροφής και της συγκέντρωσης της αιμογλοβίνης στα πειραματόζωα. Το OPP είναι πιθανό καρκινογόνο για τους ανθρώπους αλλά σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Πειράματα που έγιναν σε αρουραίους και ποντίκια που διατράφηκαν με 200 mg/kg/ημέρα OPP παρουσίασαν όγκο στην ουροδόχο κύστη και στο συκώτι αντίστοιχα. Τέλος, υπάρχουν αναφορές που αποδεικνύουν ότι το OPP δεν παρουσιάζει μεταλλαξιγόνο δράση (Tani *et al.*, 2007).

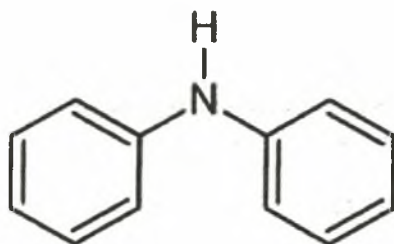
Το OPP παραμένει ιδιαίτερα υπολειμματικό σε αβιοτικές συνθήκες στο περιβάλλον. Οι τιμές για το χρόνο ημίσειας ζωής του OPP κυμαίνονται από μερικές ώρες μέχρι και εβδομάδες ανάλογα με το περιβαλλοντικό υπόστρωμα που μελετήθηκε (λίμνες, ποτάμια με στάσιμα ή τρεχούμενα νερά). (U.S. Environmental

Protection Agency, 2006). Έτσι, η Ευρωπαϊκή Ένωση θέσπισε ως ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων (MRL) του OPP σε εσπεριδοειδή και μπανάνες τα 12 mg kg^{-1} και τα 0.1 mg kg^{-1} , αντίστοιχα (Zamora *et al.*, 2004).

Ελάχιστες είναι αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με την μικροβιακή αποδόμηση του OPP. Οι Sembiring και Winter, (1989), απομόνωσαν το βακτηριακό στέλεχος B10 από το ίζημα υγρών αποβλήτων βιομηχανίας ζάχαρης που περιείχαν το μυκητοκτόνο OPP. Το στέλεχος B10 είχε την δυνατότητα να διασπά το OPP (4.2 mmol L^{-1}) με ρυθμούς μέχρι και 0.4 mmol L^{-1} την ημέρα.

1.4.5. Diphenylamine

Το μόριο του diphenylamine (DPA) (Εικόνα 5), αποτελείται από δυο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μια γέφυρα αμινομάδας. Το DPA στην γεωργία χρησιμοποιείται μετασυλλεκτικά για την αντιμετώπιση της επιφανειακής νέκρωσης (scald) και καστανόχρωσης της επιδερμίδας των καρπών των μηλοειδών (Γεωργική φαρμακολογία, Ζιώγας 2007; Drzyzga and Blotevogel, 1997).



Εικόνα 5: Χημική δομή του φυτοφαρμάκου Diphenylamine.

Ο μηχανισμός δράσης του DPA δεν είναι απόλυτα γνωστός, θεωρείται όμως ότι προσφέρει αντιοξειδωτική δράση στα φυτά (Γεωργική φαρμακολογία, Ζιώγας 2007). Το DPA μπορεί να τοποθετηθεί στην κατηγορία των ιδιαίτερα τοξικών ουσιών για υδρόβιους οργανισμούς. Το DPA έχει αποδειχτεί ότι προκαλεί δερματοπάθειες σε χέρια εργατών που χρησιμοποιούν σκευάσματα του, νεφροτοξικότητα σε αρσενικούς

εργαστηριακούς αρουραίους και πιθανόν να επιφέρει αναστολή στη σύνθεση των καροτενοειδών σε φωτοσυνθετικά βακτήρια (Drzyzga *et al.*, 1995).

Το DPA παρουσιάζει υψηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος. Πειράματα με επώαση 12 μηνών σε αεροβικές συνθήκες όπου εφαρμόστηκε ^{14}C DPA έδειξαν ότι μόνο το 18% ανοργανοποιήθηκε. Το DPA παρουσίασε υψηλή υπολειμματικότητα σε πειράματα προσομοίωσης συνθηκών εμπορικών μετασυλλεκτικών τεχνικών για μήλα που αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο για 40 εβδομάδες. Σε αυτά τα πειράματα το 41% του DPA παρέμεινε στην επιφάνεια των μήλων, το 37% συμπλοκοποιήθηκε και το 8% μεταβολίστηκε προς ύδροξυ-DPA.

Ελάχιστες αναφορές υπάρχουν στην διεθνή βιβλιογραφία για την μικροβιακή αποδόμηση του DPA. Οι Drzyzga and Blotvogel, (1997) παρατήρησαν ότι το DPA (100 μM) συµμεταβολίζεται από βακτήρια. Μετά από επώαση των καλλιεργειών για 6 εβδομάδες παρατηρήθηκε μείωση κατά 60% της αρχικής ποσότητας του DPA με παράλληλη ανίχνευση της αντίστοιχης ανιλίνης ως κύριο προϊόν μεταβολισμού.

1.5. Βιοαπορρύπανση

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί μια σταδιακή αύξηση ρύπανσης του περιβάλλοντος και της βιόσφαιρας γενικά, από διάφορες ξеноβιοτικές ενώσεις, όπως φυτοφάρμακα, πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις, χλωριωμένα διφαινύλια, πολυχλωριωμένες διβενζο-διοξίνες (Singh and Chen, 2008). Η συχνή ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων οργανικών ρυπαντών στο περιβάλλον έχει δημιουργήσει παγκόσμια ανησυχία λόγω της αυξημένης πιθανότητας προβλημάτων στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Εκτιμάται ότι περίπου 80 δις λίβρες επικίνδυνων οργανικών ρύπων παράγονται κάθε χρόνο μόνο στην Αμερική, από βιομηχανίες χημικών, γεωργικών προϊόντων, πετρελαίου, χαρτιού, αεροναυπηγικής. Μόνο το 10% αυτών των αποβλήτων πιστεύεται ότι εναποτίθενται στο περιβάλλον ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία (Fernando and Aust, 1994).

Παραδοσιακές τεχνικές διαχείρισης επικίνδυνων αποβλήτων, όπως φυσικές, χημικές και θερμικές τεχνικές ή διήθηση μέσω του εδάφους δεν είναι πάντα αποτελεσματικές. Έχει υπολογιστεί ότι κοστίζει περίπου ένα τρισεκατομμύριο δολάρια στην Αμερική, για να απορρυπανθεί μια περιοχή με τοξικά απόβλητα

χρησιμοποιώντας συμβατικές τεχνικές διαχείρισης αποβλήτων (Barr and Aust, 1994). Άρα υπάρχει άμεση ανάγκη για την εύρεση και εφαρμογή μιας εναλλακτικής, γρήγορης, αποτελεσματικής και οικονομικά αποδεκτής μεθόδου για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων. Μια κοινώς αποδεκτή και αποτελεσματική μέθοδος απορρύπανσης του περιβάλλοντος είναι και η βιοαπορρύπανση.

Βιοαπορρύπανση ονομάζεται η χρήση της μεταβολικής ικανότητας μικροοργανισμών για την αποδόμηση και αποτοξικοποίηση των ρυπαντών. Η τεχνολογία της βιοαπορρύπανσης παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για την αποκατάσταση επιβαρυσμένων με ρύπους περιοχών και με τελικό και επιθυμητό στόχο την πλήρη ανοργανοποίηση των οργανικών ρύπων προς CO₂ και H₂O. Αντίθετα, στην περίπτωση των βαρέων μετάλλων η βιοαπορρύπανση στοχεύει στην απομάκρυνση μέσω προσρόφησης ή μετασχηματισμού σε λιγότερο τοξικές μορφές (Pointing, 2001).

Φυσικές παράμετροι, όπως ο αερισμός, η υγρασία, τα επίπεδα των θρεπτικών, το pH, η θερμοκρασία και το επίπεδο των ρύπων επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας και κατά συνέπεια και την αποτελεσματικότητα της βιοαπορρύπανσης. Ακόμη, βιολογικές παράμετροι όπως ο παρασιτισμός και ο ανταγωνισμός του ενδογενούς μικροβιακού πληθυσμού για χώρο και θρεπτικά στοιχεία επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την αποτελεσματικότητα της *in situ* βιοαπορρύπανσης. Δυο βιολογικές στρατηγικές εφαρμόζονται στα πλαίσια της βιολογικής απορρύπανσης η βιοενεργοποίηση (biostimulation) και η βιοπροσθήκη η βιοεμπλουτισμός (bioaugmentation). Η πρώτη περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ενδογενούς μικροβιακού πληθυσμού και της μεταβολικής δραστηριότητας αυτού με προσθήκη θρεπτικών (π.χ. άζωτο, φώσφορο) για την αποδόμηση των ξενοβιοτικών ενώσεων. Ενώ, η δεύτερη στρατηγική περιλαμβάνει τον εμβολιασμό του ρυπασμένου περιβαλλοντικού υποστρώματος με πληθυσμούς εξωγενών μικροοργανισμών που παρουσιάζουν εξειδικευμένη αποδομητική δραστηριότητα κατά των συγκεκριμένων ρύπων (Bennett *et al*, 2001).

Μεγάλος αριθμός μελετών έχει επικεντρωθεί στη χρήση βακτηρίων για την βιοαπορρύπανση και βιοαποδόμηση μικρο- ή μάκρο-οικοσυστημάτων ρυπασμένων με οργανικούς ρύπους (π.χ. φυτοφάρμακα). Τα βακτήρια συγκεντρώνουν αρκετά πλεονεκτήματα για την χρήση τους ως φορείς βιολογικής απορρύπανσης: είναι

εύκολα στην καλλιέργειά τους, έχουν πιο γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης, χρησιμοποιούν τους οργανικούς ρύπους ως θρεπτική πηγή C και N, που συνεπάγεται ταχύτερη αποδόμηση, και είναι ευέλικτοι αποδομητές καθώς έχουν την δυνατότητα να αποδομούν πλήθος ρύπων τόσο σε αναερόβιες όσο και σε αερόβιες συνθήκες, σε αντίθεση με τους μύκητες που είναι υποχρεωτικά αερόβιοι οργανισμοί (Maloney, 2001; Pointing, 2001). Από την άλλη μεριά είναι συνήθως εξαιρετικά εξειδικευμένοι αποδομητές πράγμα που περιορίζει την χρήση τους σε περιπτώσεις ρύπανσης με οργανικούς ρυπαντές διαφορετικής χημικής δομής και σύστασης.

Από την άλλη, αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι οι μύκητες και ιδιαίτερα μια συγκεκριμένη ομάδα μυκήτων, οι μύκητες λευκής σήψης (ΜΛΣ), είναι ικανοί να αποδομούν ένα σημαντικό αριθμό περιβαλλοντικών ρύπων, συμπεριλαμβανομένων και φυτοφαρμάκων (Barr and Aust, 1994, Paszczynski and Crawford, 1995: Alexander, 1999).

Η χρήση των ΜΛΣ στην βιοαπορρύπανση, προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Πρώτον, τα βασικά ενζυμικά συστήματα των μυκήτων αυτών, είναι εξωκυτταρικά, με αποτέλεσμα να μην είναι απαραίτητη η μεταφορά των ρύπων στο κυτόπλασμα για τον περαιτέρω μεταβολισμό τους. Το χαρακτηριστικό αυτό δίνει την δυνατότητα στους ΜΛΣ να οξειδώνουν υποστρώματα που παρουσιάζουν χαμηλή διαλυτότητα και δεν μπορούν να εισέλθουν με ευκολία διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων αλλά και επίσης να αποδομούν ενώσεις που δεν είναι βιοδιάθεσιμες αλλά παραμένουν προσροφημένες σε κάποια εδαφική επιφάνεια. Δεύτερον, οι ΜΛΣ έχουν τα ενζυμικά συστήματα για την αποδόμηση ενός πολύπλοκου πολυμερούς όπως η λιγνίνη, κάτι που συνεπάγεται ότι έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν ένα μεγάλο φάσμα οργανικών ρύπων παρουσιάζοντας, σε αντίθεση με τα βακτήρια, χαμηλή εξειδίκευση. Επιπροσθέτως, οι ΜΛΣ βρίσκονται ευρέως διαδεδομένοι στη φύση αποδομώντας τη λιγνίνη, αλλά δεν μπορούν να τη χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους, παρά μόνο με την παρουσία συν-υποστρωμάτων, όπως η κυτταρίνη. Έτσι, φθινά υποστρώματα λιγνο-κυτταρίνης (π.χ. άχυρο, υπολείμματα καλαμποκιών κ.α.) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θρεπτικό υπόστρωμα σε ρυπασμένες περιοχές για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών και την αποδόμηση των ρύπων (Barr and Aust, 1994: Fernando and Aust, 1994: Reddy, 1995).

1.6. Μύκητες λευκής σήψης (White rot fungi)

Οι ΜΛΣ ανήκουν ταξινομικά στο φύλλο Ascomycota (π.χ. *Xylaria polymorpha*, *X. Hypoxylon* κ.α.) αλλά κυρίως στο φύλλο Basidiomycota (π.χ. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*.) (Rabinovich *et al.*, 2004). Είναι νηματοειδείς σαπροφυτικοί μύκητες που αναπτύσσονται κυρίως στο ξύλο νεκρών δέντρων και το όνομά τους, “λευκής σήψης”, το πήραν από την άσπρη εμφάνιση των αποικισμένων νεκρών φυτικών ιστών (Knapp *et al.*, 2001).

Οι ΜΛΣ είναι οι μόνοι γνωστοί οργανισμοί που μπορούν να αποδομήσουν πλήρως την λιγνίνη σε CO₂ και H₂O (Kirk and Farrell, 1987). Η λιγνίνη είναι ένα πολύπλοκης δομής ετερο-πολυμερές και αποτελείται από φαινολικά-προπανοειδή μονομερή, τα οποία συνδέονται τυχαία μεταξύ τους με δεσμούς C-C και C-O. Για τους παραπάνω λόγους η λιγνίνη είναι ένα από τα πιο δύσκολα βιοδιασπώμενα βιοπολυμερή (Singh and Chen, 2008).

Η λιγνίνη συνδέεται με την κυτταρίνη και ημι-κυτταρίνη στο σχηματισμό λιγνο-κυτταρινών, που αποτελούν τις ενώσεις των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών και των δέντρων. Ο ρόλος της λιγνίνης είναι να προσφέρει σταθερότητα, να βοηθάει στην αντιμετώπιση της μικροβιακής αποσύνθεσης και λειτουργεί ως ενδιάμεση βαλβίδα μεταφοράς νερού μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και του ξυλώματος των φυτών (Hammel and Cullen, 2008; Ward *et al.*, 2004). Η λιγνίνη όμως, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους ΜΛΣ, ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, ενώ η αποδόμησή της δίνει στους ΜΛΣ, την ευκαιρία να χρησιμοποιήσουν την κυτταρίνη και την ημι-κυτταρίνη ως κύριες πηγές άνθρακα και ενέργειας (Ward *et al.*, 2004).

Οι μύκητες λευκής σήψης για να μπορέσουν να αποδομήσουν την λιγνίνη, ανέπτυξαν ένα μη-εξειδικευμένο λιγνολυτικό ενζυμικό σύστημα, που περιλαμβάνει υπεροξειδάσες και λακκάσες οι οποίες αποδομούν την λιγνίνη μέσω οξειδωτικών μηχανισμών. Για την δράση των ενζύμων αυτών απαιτείται η παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) για την οξείδων των φαινολικών ή μη-φαινολικών περιοχών του μορίου της λιγνίνης. Τέτοιες υπεροξειδάσες είναι η λιγνίνη υπεροξειδάση (Lignin peroxidase, LiP) και η υπεροξειδάση του μαγγανίου (manganese peroxidase, MnP). Από την άλλη μεριά, οι λακκάσες είναι χαλκοξειδάσες πολλαπλών ενεργών κέντρων

που οξειδώνουν φαινολικές ενώσεις και αρωματικές αμίνες. Αντίθετα με τις υπεροξειδάσες, οι λακκάσες χρησιμοποιούν το O₂ και το ανάγουν μέσω τεσσάρων ηλεκτρονίων σε νερό (Rabinovich *et al.*, 2004, Ward *et al.*, 2004, Hammel and Cullen, 2008).

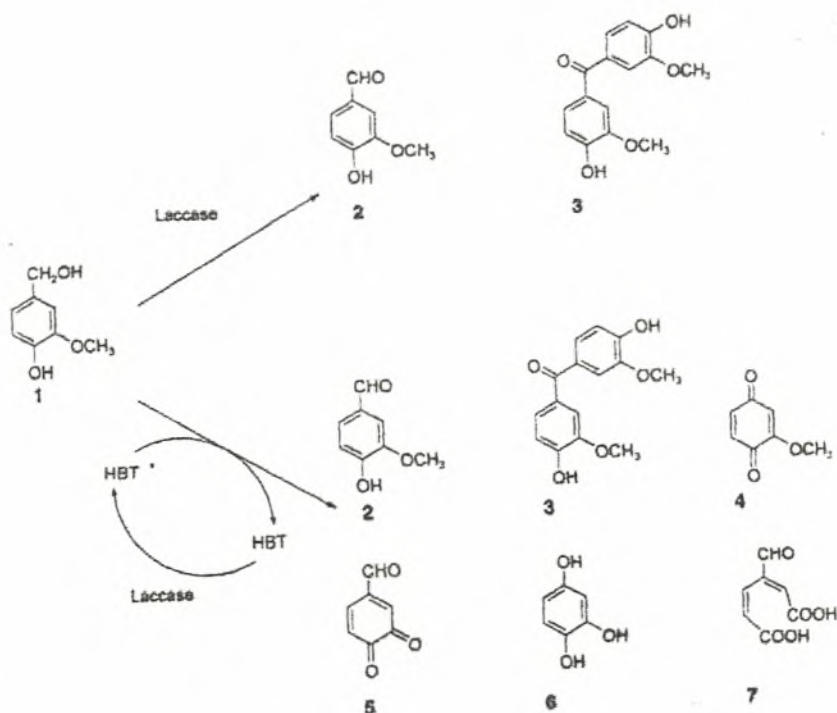
1.6.1. Μηχανισμός δράσης του ενζύμου λακκάση

Η δομή του ενζύμου περιλαμβάνει τέσσερα ενεργά κέντρα χαλκού (T1, T2, T3, T4), με τη βοήθεια των οποίων ανάγεται το οξυγόνο. Στο ενεργό κέντρο χαλκού T1 προκαλείται η οξείδωση του υποστρώματος, με ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίων στα T2 και T3 άτομα χαλκού (Crestini *et al.*, 2003).

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν τα τυπικά υποστρώματα δράσης του ενζύμου λακκάση. Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών, πραγματοποιείται μέσω μιας διαδικασίας μεταφοράς ηλεκτρονίων, κατά την οποία, με τη αφαίρεση ενός πρωτονίου σχηματίζεται μια φαίνοξυ-ρίζα (Εικόνα 6). Η λακκάση, ως ένζυμο, έχει υψηλή θερμική αντοχή (σταθερή στους 60°C), με ικανότητα να δρα σε μεγάλο εύρος υποστρωμάτων (σχετικά μικρή εκλεκτικότητα στο υπόστρωμα), οξειδώνοντας έτσι ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών αρωματικών ενώσεων (Crestini *et al.*, 2003).

Το ένζυμο λακκάση, από είδος σε είδος παρουσιάζει διαφορετικό δυναμικό οξειδοαναγωγής, που οφείλεται στη γενετική διαφοροποίηση των μυκήτων που την παράγουν. Ο μικρός αριθμός ουσιών που την αναστέλλουν και η υψηλή οξειδωτική δράση της (10-100 φορές υψηλότερη από τη δράση των ενζύμων Li-υπεροξειδάσης ή Mn-υπεροξειδάσης), καθιστούν τη λακκάση ιδανικό ένζυμο για την αποδόμηση φαινολικών και άλλων αρωματικών συστατικών (Crestini *et al.*, 2003).

Εντούτοις, η λακκάση αυτή καθεαυτή παρουσιάζει χαμηλή λιγνολυτική δράση, όμως η χρησιμοποίηση ενεργοποιητών (π.χ. διαφόρων ριζών), όπως η προσθήκη της 1-υδροξυ-βενζο-τριαζόλης (HBT), συμβάλλει σημαντικά στην βελτίωση της δράσης της. Το μεγάλο ποσοστό της λιγνολυτικής δράσης που παρουσιάζει η λακκάση με την χρήση ενεργοποιητών, οφείλεται κυρίως στην αυξημένη οξείδωση των παράπλευρων, ως προς τον αρωματικό δακτύλιο, υποομάδων (Crestini *et al.*, 2003).



Εικόνα 6: Μηχανισμός δράσης του ενζύμου λακκάση.

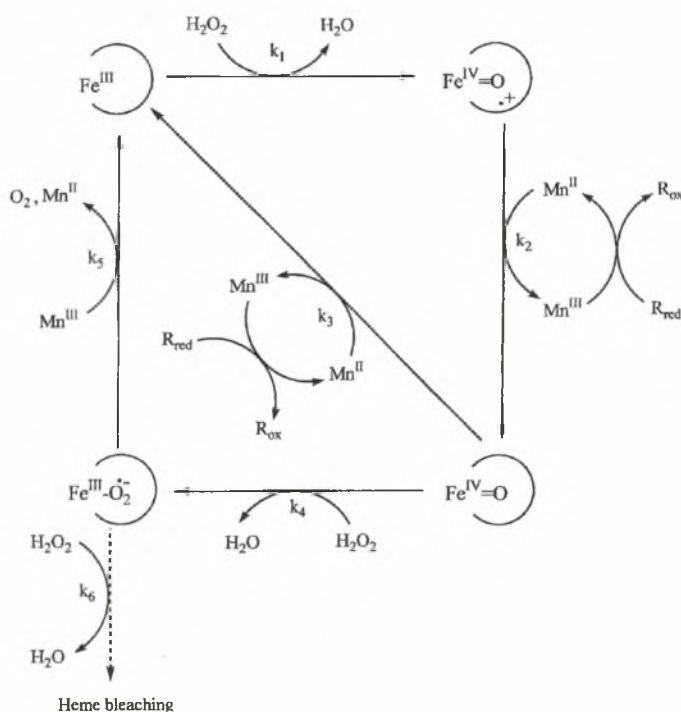
1.6.2. Μηχανισμός δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση

Η Mn-υπεροξειδάση ανήκει στην κατηγορία των υπεροξειδασών, η δράση της οποίας είναι εξαρτώμενη από την παρουσία του μαγγανίου, προκαλώντας την αποδόμηση φαινολικών συστατικών και άλλων αρωματικών ενώσεων. Διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι μύκητες λευκής σήψευας, όπως ο *Phanerochaete chrysosporium*, με τη βοήθεια της Mn-υπεροξειδάσης που παράγουν, παρουσιάζουν την ικανότητα να αποδομούν πλήθος ενώσεων με ρυπογόνο δράση, συμπεριλαμβανομένων και φαινολικών ουσιών (Serguei *et al.*, 1998).

Η δράση του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση, είναι παρόμοια με αυτή των άλλων υπεροξειδασών (Εικόνα 7). Έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια της δράσης του ενζύμου αυτού, η σιδηρούχος Mn-υπεροξειδάση οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε ένα σιδηρούχο-π-πορφυρικό κατιόν, γνωστό ως συστατικό I. Η Mn-υπεροξειδάση θεωρείται απόλυτα εξαρτώμενη από το Mn (II), καθώς παρουσία Mn (II) είναι εφικτή η πραγματοποίηση δυο διαδοχικών αναγωγών, πρώτα του

συστατικού I σε ένα συστατικό, γνωστό στη βιβλιογραφία ως συστατικό II, και έπειτα πάλι στην αρχική του μορφή (Serguei *et al.*, 1998).

Επιπλέον, η προσθήκη ενώσεων ικανών να σχηματίσουν σύμπλοκα, όπως τα οξαλικά και τα γαλακτικά ιόντα, διευκολύνουν την οξειδωση του Mn (II). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, κάτω από προϋποθέσεις, μπορεί να αντιδράσει με το συστατικό II της Mn-υπεροξειδάσης, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα υπεροξικό σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου γνωστό και ως συστατικό III. Επιπλέον οξειδωση του συστατικού III από το υπεροξείδιο του υδρογόνου προκαλεί την απενεργοποίηση της Mn-υπεροξειδάσης. Αντιθέτως, ακολουθώντας άλλη πορεία, το συστατικό III (που κυρίως αποτελεί ένα απενεργοποιημένο καταλυτικά σύμπλοκο) μπορεί να επανασχηματίσει το αρχικό ένζυμο σιδήρου, είτε με προσθήκη τριών ηλεκτρονίων ή με απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου (Serguei *et al.*, 1998).

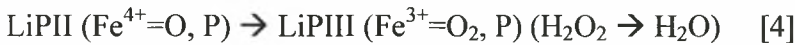
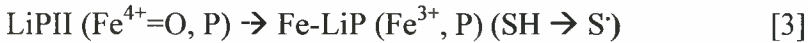
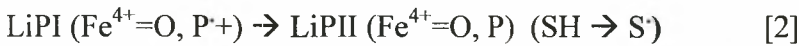
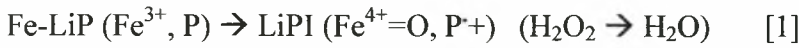


Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση.

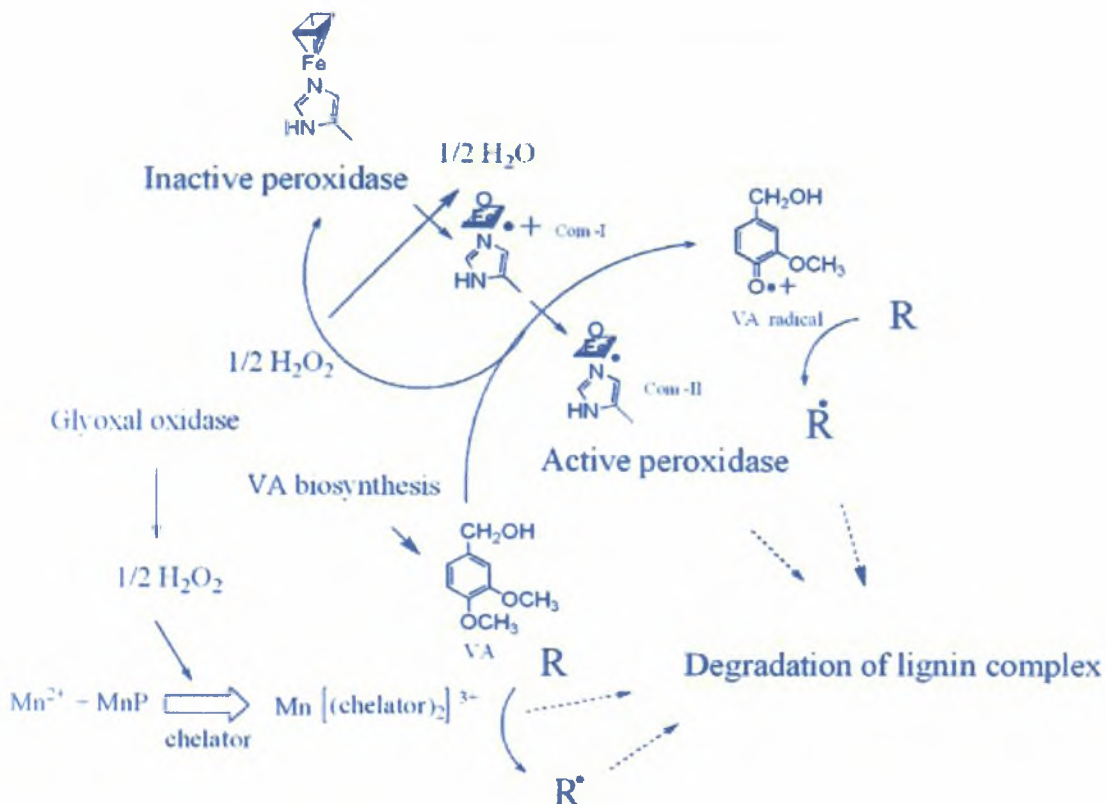
1.6.3. Μηχανισμός δράσης της λιγνίνης υπεροξειδάσης (LiP)

Η λιγνίνη υπεροξειδάση κατατάσσεται στην κατηγορία των αίμο-υπεροξειδασών και εκκρίνεται εξωκυτταρικά, ως μια σειρά γλυκοσυλιωμένων ισοενζύμων με PI μεταξύ 3.2-4.0 και μοριακό βάρος από 38 έως 43 KDa. Το κάθε ισοένζυμο περιέχει 1 mole αίμης ανά mole πρωτεΐνης. Επίσης, η LiP έχει απομονωθεί από πολλούς μύκητες λευκής σήψης (π.χ. *Phanerochaete chrysosporium* *Trametes versicolor* κ.α.) και έχει αποδειχτεί ότι μπορεί και οξειδώνει πληθώρα πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και συγγενικών δομών (Kirk *et al.*, 1990).

Ο καταλυτικός κύκλος της λιγνίνης υπεροξειδάσης (Εικόνα 8), είναι παρόμοιος με άλλων υπεροξειδασών.



Ο καταλυτικός κύκλος ξεκινάει με την αντίδραση [1], όπου ένα σιδηρούχο ένζυμο λιγνίνης υπεροξειδάσης [Fe-LiP, Fe³⁺, P (πορφυρίνη)] οξειδώνεται με το H₂O₂ και παράγεται ένα σύμπλοκο οξο-σιδηρούχο-πορφυρικό κατιόν (Fe⁴⁺=O, P⁺), γνωστό ως LiP-συστατικό I (LiPI). Έπειτα, με οξείδωση ενός ηλεκτρονίου, το αναγόμενο υπόστρωμα (SH) οξειδώνεται από το LiP-συστατικό I, παράγοντας μια καντιοντική ρίζα (S[·]) και το οξειδωμένο κατά ένα ηλεκτρόνιο ενδιάμεσο ένζυμο, το LiP-συστατικό II [LiPII, (Fe⁴⁺=O, P)], αντίδραση [2]. Τέλος, ο καταλυτικός κύκλος κλείνει με την οξείδωση [3] ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ενός δεύτερου υποστρώματος και επαναφέρει το ένζυμο της LiP στην αρχική του κατάσταση Fe-LiP. Επίσης, σε περίπτωση απουσίας κατάλληλου υποστρώματος (SH) ή υψηλής συγκέντρωσης H₂O₂, το LiP-συστατικό II (LIPII) οξειδώνεται επιπλέον [4] από το H₂O₂ στο LiP-συστατικό III [LIPIII, (Fe³⁺=O₂, P)] (Ward *et al.*, 2004).



Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης του ενζύμου LiP.

Το LiP-συστατικό III (LPIII) έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να επιστρέψει στην αρχική κατάσταση του ενζύμου (Fe-LIP) [5] παρουσία του H₂O₂ και της βερατρυλικής αλκοόλης (veratryl alcohol, 3,4-dimethoxybenzyl alcohol, VA).



Λιγνολυτικές καλλιέργειες του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* απέδειξαν ότι ο μύκητας υπό κανονικές συνθήκες μπορεί και παράγει VA. Ένας από τους φυσιολογικούς ρόλους της VA, όπως πιστεύεται είναι να προστατεύει την αδρανοποίηση της LiP, εξαρτώμενης από το H₂O₂, από τον επανασχηματισμό του LIP-συστατικού III. Ακόμη έχει δείχτει ότι η VA λειτουργεί ως μεσολαβητής στις καταλυτικές αντιδράσεις της LiP (Ward *et al*, 2004).

1.7 . Αποδόμηση φυτοφαρμάκων με τη βοήθεια μυκήτων λευκής σήψης

Τα φυτοφάρμακα αποτελούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρυπαντές καθώς απαντώνται συχνά και σε υψηλές συγκεντρώσεις σε επιφανειακά και υπόγεια νερά που αποτελούν τις βασικές πηγές άντλησης πόσιμου νερού και σημαντικό ενδιαίτημα για πλήθος υδρόβιων φυτών και ζωικών οργανισμών (Ortelli *et al.*, 2005; Echols *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009). Η πιο σημαντική διεργασία με την οποία απομακρύνονται τα φυτοφάρμακα από το περιβάλλον είναι η μικροβιακή διάσπαση (Pointing, 2001). Πλήθος μικροοργανισμών, βακτηρίων και μυκήτων, έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να αποδομούν αποτελεσματικά τα περισσότερα φυτοφάρμακα (Janssen *et al.*, 2001).

Διάφοροι ΜΛΣ έχουν δοκιμαστεί για την διάσπαση μεγάλου φάσματος γεωργικών φαρμάκων. Έτσι, εξετάστηκε η ικανότητα του μύκητα λευκής σήψης *Phanerochaete chrysosporium* στην αποδόμηση του ζιζανιοκτόνου isoproturon. Ο μύκητας εμβολιάστηκε σε σταθερές καλλιέργειες με υπόστρωμα άχυρου και παρατηρήθηκε αποδόμηση του isoproturon (8 mg L^{-1}) σε ποσοστό 91% ύστερα από 14 ημέρες επώασης. Αντίστοιχες δοκιμές με προσθήκη καθαρών ενζύμων LiP ($0.04 \mu\text{M}$) και MnP ($0.225 \mu\text{M}$) αντί του μύκητα έδειξαν ότι ο ρυθμός αποδόμησης του isoproturon ήταν $5.3 \mu\text{mol isoproturon}/\mu\text{mol LiP/h}$ και $0.526 \mu\text{mol isoproturon}/\mu\text{mol MnP /h}$, αντίστοιχα (Castillo *et al.*, 2000).

Μια άλλη μελέτη ερεύνησε την αποδόμηση του εντομοκτόνου hexachlorocyclohexane (HCH) στο έδαφος με την βοήθεια του μύκητα λευκής σήψης *Bjerkandera adusta*. Σε υγρές καλλιέργειες προστέθηκε 10% αποστειρωμένο έδαφος και τα ισομερή α -, β -, γ - και δ -του HCH (25 mg L^{-1}) σε τελικό όγκο 20 ml και παρατηρήθηκε μείωση της αρχικής συγκέντρωσης τους κατά 30%, 17%, 31.4% και 25.8%, αντίστοιχα. Αντίθετα όταν ο ίδιος μύκητας χρησιμοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του ποσοστού διάσπασης των ισομερών α -, β -, γ - και δ - του HCH σε επίπεδα 94.5%, 66.4%, 94.5% και 78.5%, αντίστοιχα (Quintero *et al.*, 2007).

Παράλληλα, οι Bending *et al.*, (2002) χρησιμοποίησαν μύκητες λευκής σήψης όπως *Trametes versicolor*, *Hypholoma fasciculare* και *Stereum hirsutum* για την αποδόμηση των φυτοφαρμάκων diuron, metalaxyl, atrazine και terbuthylazine και

παρατήρησαν ότι τα ζιζανιοκτόνα diuron, atrazine και terbuthilazine αποδομήθηκαν σε ποσοστό >84% ενώ για το metalaxyl το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 44%.

Σε άλλα ανάλογα πειράματα έγινε η αξιολόγηση 18 μυκήτων λευκής σήψης για την αποδόμηση του οργανοφωσφορικού φυτοφαρμάκου parathion και παρατηρήθηκε αποδόμηση του εντομοκτόνου από όλους τους μύκητες που δοκιμάστηκαν με μοναδική εξαίρεση το στέλεχος *Ganoderma applanatum* 8168. Κατόπιν, επιλέχθηκαν τα τρία στελέχη με την υψηλότερη αποδομητική ικανότητα (*Bjerkandera adusta* 8258, *Pleurotus ostreatus* 7989 και *Phanerochaete chrysosporium* 3641) και δοκιμάστηκαν για την αποδόμηση των φυτοφαρμάκων terbufos, azinphos-methyl, phosmet και tribufos, όπου και παρατηρήθηκε ποσοστό αποδόμησης 50-96% μετά από επώαση 4 ημερών. Τέλος, μελετήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα των παραπάνω στελεχών σε λιγνολυτικά υποστρώματα ανάπτυξης. Η υψηλότερη δράση των ενζύμων λακκάση (250 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης) και MnP (100 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης) παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες του *Pleurotus ostreatus* 7989, ενώ η υψηλότερη δράση για το ένζυμο LiP (112 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ πρωτεΐνης) παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες του μύκητα *Bjerkandera adusta* 8258 (Jauregui *et al.*, 2003).

Τέλος, ο μύκητας λευκής σήψης *Phanerochaete chrysosporium* όταν εμβολιάστηκε σε ένα σταθερό σύστημα, που περιείχε γυάλινες ράβδους γεμισμένες με πεπιεσμένα φυτικά υπολείμματα από ζαχαροκάλαμα και αναμίχθηκε με έδαφος που περιείχε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ πενταχλωροφαινόλης (Pentachlorophenol, PCP), σε αναλογία έδαφος/φυτικά υπολείμματα 85/15 αποδόμησε 87% της πενταχλωροφαινόλης σε 4 ημέρες (Mendoza-Cantu *et al.*, 2000).

1.8. Επιλεγμένοι μύκητες που εξετάστηκαν

Στα πειράματα τις παρούσας μελέτης εξετάστηκε η αποδομητική ικανότητα τεσσάρων μυκήτων, τριών βασηδιομυκήτων (*Basidiomycetes*) τους *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* και *Trametes versicolor* και ενός ασκομύκητα (*Ascomycete*) του *Aspergillus niger*.

1.8.1. *Phanerochaete chrysosporium*

Ο *Phanerochaete chrysosporium* είναι σαπροφυτικός βασιδιομύκητας που ανήκει στην κλάση *Agaricomycetes*, της τάξης *Corticales*, της οικογένειας *Corticaceae* του γένους *Phanerochaete*. Για την αναπαραγωγή του ο μύκητας δεν παράγει μανιτάρι, αλλά αντίθετα παράγει επίπεδα σώματα καρποφορίας που εμφανίζονται ως στρώμα στην επιφάνεια του ξύλου. Επίσης, αναφέρεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι υψηλή, χαρακτηριστικό που του επιτρέπει να αναπτύσσεται σε διάφορα περιβαλλοντικά συστήματα (Singh and Chen, 2008).

Το γονιδίωμα του *Phanerochaete chrysosporium* είναι από τα πρώτα που αλληλουχήθηκαν, μεταξύ των βασιδιομυκήτων, και είναι περίπου 30-40 Mb και οργανώνεται σε 10 χρωμοσώματα. Έχει γίνει από πολλούς επιστήμονες, η μελέτη του γονιδιώματος του συγκεκριμένου μύκητα, για την κατανόηση του μηχανισμού έκφρασης των λιγνολιτικών ενζύμων και έχει παρατηρηθεί ότι στο γονιδίωμα του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* υπάρχουν τουλάχιστον δέκα LiP γονίδια, πέντε MnP γονίδια και έξι γονίδια οξειδασών εξαρτώμενα του χαλκού (Martinez *et al.*, 2004).

Ο μύκητας *Phanerochaete chrysosporium* είναι από τους πιο καλά μελετημένους μύκητες λευκής σήψης στην ικανότητά του να αποδομεί ξενοβιοτικές ουσίες. Το λιγνολυτικό σύστημα εξωκυτταρικών ενζύμων που διαθέτει του δίνει την δυνατότητα να αποδομεί διάφορες ενώσεις όπως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, φυτοφάρμακα, κυανίδια και άλλους οργανικούς ρυπαντές (Kullman and Matsumura, 1996; Mougín *et al.*, 1997; Fratila-Arachitei *et al.*, 1999).

1.8.2. *Pleurotus ostreatus*

Ο μύκητας λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus* ανήκει στην κλάση *Agaricomycetes*, της τάξης *Agaricales*, της οικογένειας *Tricholomataceae* του γένους *Pleurotus* και αποτελεί ένα από κοινά μανιτάρια που χρησιμοποιούνται ως εδώδιμα. Το χρώμα τους στους φυσικούς πληθυσμούς του μύκητα ποικίλει από άσπρο έως γκρι ή από ανοιχτό έως σκούρο καφέ. Εκφύεται παγκοσμίως σε ηπειρωτικά και υποτροπικά δάση και μεγαλώνει σε ομάδες πάνω σε νεκρά ή ζωντανά δέντρα,

προτιμώντας τα δέντρα με σκληρό ξύλο αλλά εμφανίζεται και σε κωνοφόρα (Phillips, 2006).

Ο μύκητας *Pleurotus ostreatus* είναι γνωστό στη βιβλιογραφία ότι παράγει λιγνολιτικά ένζυμα όπως λακκάση και Mn-υπεροξειδάση (εξαρτώμενη ή μη του Mn), αλλά δεν μπορεί να παράγει LiP (Hatakka, 1990). Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι ο *Pleurotus ostreatus* έχει την ικανότητα να αποδομεί πολλές ξενοβιοτικές ενώσεις, όπως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs). Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στελέχη του συγκεκριμένου μύκητα σε πειράματα με PAHs με τρεις, τέσσερις και πέντε αρωματικούς δακτυλίους οδήγησε στην αποδόμηση του 89%, 87% και 48% της αρχικής τους ποσότητας, αντίστοιχα (Eggen, 1999). Αντίστοιχα και οι Bazalel *et al.*, (1996), έδειξαν ότι ο μύκητας λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus* έχει την ικανότητα να αποδομεί πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες όπως τα πυρένιο, ανθρακένιο, φλουορένιο και διβενζοθειοφαίνιο.

1.8.3. *Trametes versicolor*

Ο μύκητας *Trametes versicolor* ανήκει στην κλάση *Agaricomycetes*, της τάξης *Poriales*, της οικογένειας *Poriceae* του γένους *Trametes*. Ο *Trametes versicolor* είναι ένας σαπροφυτικός μύκητας και εμφανίζεται σε πολλούς χρωματισμούς, γι' αυτό και το όνομά του “versicolor” που σημαίνει πολύχρωμος. Συναντάται συχνά ως μανιτάρι σε όλα τα δάση της Ευρώπης και της νότιας Αμερικής, κυρίως πάνω σε κορμούς νεκρών δέντρων.

Η ικανότητα του μύκητα *Trametes versicolor* στην αποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών με τη βοήθεια των λιγνολιτικών ενζύμων Lac, MnP και LiP που παράγει έχει αποδειχτεί από πολλές ερευνητικές ομάδες (Rabinovich *et al.*, 2003). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι ο *Trametes versicolor* έχει την δυνατότητα να αποδομεί πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Pointing, 2001), πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Zeddel *et al.*, 1993) και φυτοφάρμακα όπως diuron, atrazine, terbutylazine, chlorpyrifos, simazine, dieldrin και trifluralin (Bending *et al.*, 2002, Fragoeiro and Magan, 2005).

1.8.4. *Aspergillus niger*

Ο *Aspergillus niger* ανήκει στην κλάση *Eurotiomycetes*, της τάξης *Eurotiales*, της οικογένειας *Trichonomaceae* του γένους *Aspergillus* και αποτελεί ένα κοινό νηματοειδή ασκομύκητα ή μύκητα μαλακής σήψης (soft rot fungi). Ο *Aspergillus niger* έχει απομονωθεί από πολλά μέρη παγκοσμίως και αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες αποδομώντας οργανικές ουσίες. Παράλληλα, είναι γνωστό ότι προκαλεί μετασυλλεκτικές προσβολές σε φρούτα που είναι κοινώς γνωστή με το όνομα μαύρη μούχλα (Schuster *et al.*, 2002).

Ο *Aspergillus niger* αποτελεί κοινό εδαφογενή μύκητα και παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα (Baker, 2006). Στη φύση αναπτύσσεται σε μεσόφιλα περιβάλλοντα όπως περιοχές αποσύνθεση εδάφους ή φυτών, ενώ η θερμοκρασία ανάπτυξης του κυμαίνεται μεταξύ 6-40 °C με βέλτιστες τιμές μεταξύ 35-37 °C. Ακόμη, ο *Aspergillus niger* αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος pH (1.4-9.8) και έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται τόσο σε ξηρά όσο και σε ιδιαίτερα υγρά περιβάλλοντα (Schuster *et al.*, 2002).

Ο *A. niger* έχει βρει σημαντική βιομηχανική χρήση. Πολλά στελέχη του μύκητα *Aspergillus niger* χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία για την παραγωγή κιτρικού και γλυκονικού οξέος αλλά και για την παραγωγή πολλών χρήσιμων ενζύμων. (Baker, 2006).

Ο *A. niger* δεν ανήκει στην κατηγορία των μυκήτων λευκής σήψης και για το λόγο αυτό δεν παράγει λιγνολιτικά ένζυμα. Παρόλο αυτά, πολλές είναι οι μελέτες που αναφέρουν ότι ο μύκητας αυτός έχει την ικανότητα να αποδομεί ρύπους. Η ικανότητα του αυτή σχετίζεται με την ικανότητα του να παράγει διάφορα ένζυμα κάποια από τα οποία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί. Έτσι, το στέλεχος ZHY256 του μύκητα *A. niger* παρουσίαζε αυξημένη ικανότητα να αποδομεί οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα. όπως parathion, dichloronos, dimethoate, formothion και malathion. Το ένζυμο που απομονώθηκε από το συγκεκριμένο στέλεχος είχε την ικανότητα να υδρολύει δεσμούς P-S ενώ δεν μπόρεσε να υδρολύσει δεσμούς P-O (Liu *et al.*, 2001). Παρόμοια μελέτη από τους Qing *et al.*, (2003) οδήγησε στην απομόνωση από το στέλεχος *A. niger* PY168 μιας καρβοξυεστεράσης που μπορούσε και υδρολύει τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα carbaryl, carbofuran, propoxux, isoprocarb, fenobucarb και aldicarb.

Τέλος, ένα άλλο στέλεχος του *A. niger* παρουσίασε αποδομητική ικανότητα έναντι του οργανοχλωριομένου εντομοκτόνου endosulfan. Ο μύκητας είχε την ικανότητα να αποδομεί πλήρως το συγκεκριμένο φυτοφάρμακο με προϊόντα μεταβολισμού τα endosulfan sulfate και endodiol αποδεικνύοντας ότι το συγκεκριμένο στέλεχος κατείχε ένζυμα που μπορούσαν τόσο να οξειδώσουν όσο και να υδρολύσουν το endosulfan (Bhalerao and Puranik, 2007).

1.9. Σκοπός του πειράματος

Κατά την επεξεργασία των φρούτων από τις βιομηχανίες μεταποίησης παράγονται υψηλές ποσότητες υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων όπως TBZ, IMZ, DPA και OPP, που χρησιμοποιούνται κατά την μεταποίηση, αποθήκευση και μεταφορά των φρούτων. Πολύ συχνά στα υγρά απόβλητα ανιχνεύονται και εντομοκτόνα όπως το chlorpyrifos, τα οποία εφαρμόζονται στα φρούτα κοντά στη συγκομιδή. Η διαχείριση των υγρών αποβλήτων από τις βιομηχανίες γίνεται κυρίως με την εναπόθεσή τους σε ανοιχτές δεξαμενές εξάτμισης, αλλά και με την απόρριψή τους σε επιφανειακά υδροφόρα συστήματα ή ακόμη και στα συστήματα επεξεργασίας αστικών αποβλήτων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων των συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων στα επιφανειακά αλλά και υπόγεια νερά προκαλώντας σημαντική περιβαλλοντική ρύπανση. Επιπρόσθετα η χρήση ορισμένων από τα παραπάνω μυκητοκτόνα στις χώρες-μέλη της Ευρωπαϊκής Κοινότητας επιτρέπεται μόνο υπό την προϋπόθεση ότι τα υγρά απόβλητα που παράγονται από την χρήση τους θα χρίζουν επεξεργασίας από κατάλληλο σύστημα. Μέχρι σήμερα υπάρχει παντελής έλλειψη ερευνητικών δεδομένων για την ανάπτυξη και αξιολόγηση τέτοιων συστημάτων.

Συνεπώς, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη της αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων thiabendazole, imazalil, 2-phenyl-phenol, diphenylamine και chlorpyrifos από επιλεγμένους μύκητες όπως *Phanerochaete chrysosporium* DSM 6909, *Trametes versicolor* DSM 11309, *Pleurotus ostreatus* DSM 1020 και *Aspergillus niger* DSM 11167, σε θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος άχρου. Ο προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων έγινε με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High performance liquid chromatography HPLC). Επιπλέον, μελετήθηκε η δραστηριότητα των παραγόμενων από τους μύκητες λευκής σήψεως

ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση, Mn – υπεροξειδάση, λιγνίνης υπεροξειδάση και οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης ώστε να διαπιστωθεί εάν το λιγνολυτικό ενζυμικό σύστημα των παραπάνω ΜΛΣ συμμετέχει στην αποδόμηση των συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε παράλληλα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο εργαστήριο από τη φοιτήτρια Chiara Perruchon, έγινε αξιολόγηση των ίδιων μυκήτων στην αποδόμηση των ίδιων φυτοφαρμάκων αλλά σε θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος εδάφους αντί εκχυλίσματος αχύρου. Τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη καθώς και από την αντίστοιχη μελέτη της Chiara Perruchon αποτέλεσαν βασικό κριτήριο για την επιλογή του πιο αποτελεσματικού μύκητα για την αποδόμηση των συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων αλλά και του καταλληλότερου υποστρώματος για την ανάπτυξη των μυκήτων. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής θα αποτελέσουν τη βάση για την κατασκευή βιοφίλτρων για την διαχείριση των συγκεκριμένων υγρών αποβλήτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Μύκητες

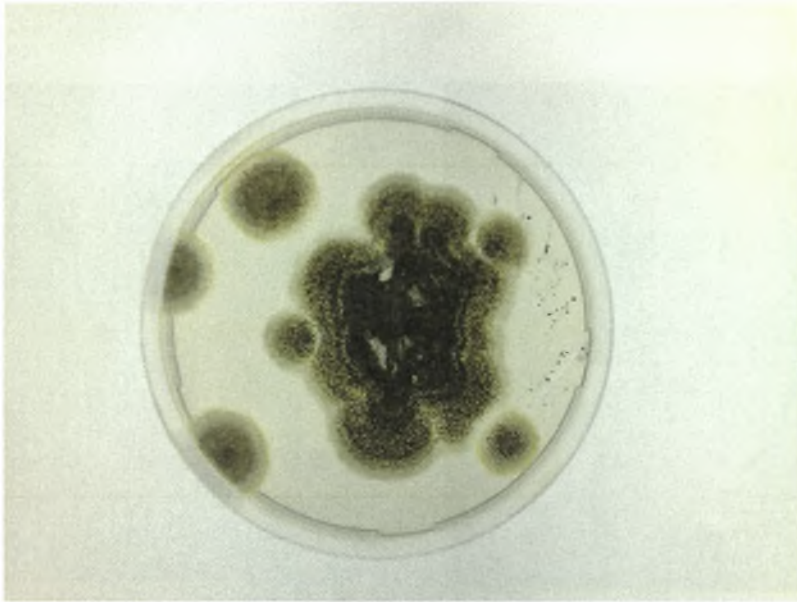
Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τρεις μύκητες λευκής σήψη και ένας ασκομύκητας. Τα στελέχη των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αγοράστηκαν από το τράπεζα μικροοργανισμών DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) και ήταν τα παρακάτω:

- *Phanerochaete chrysosporium* DSM 6909,
- *Coriolus (Trametes) versicolor* DSM 11309,
- *Pleurotus ostreatus* DSM 1020
- *Aspergillus niger* DSM 11167.

2.2. Θρεπτικά υποστρώματα

2.2.1. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος *Potato dextrose agar (PDA)*

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος PDA, αναμίχθηκαν 4 g potato peptone, 20 g γλυκόζης, 15 g άγαρ και 1 L απιονισμένο νερό. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C υπό πίεση 2.1 atm για 20 min. Το θρεπτικό υπόστρωμα στην συνέχεια επιστρώθηκε σε τριβλία petri υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τριβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα PDA χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του μύκητα *Aspergillus niger* (Εικόνα 9). Ανακαλλιέργειες του μύκητα πραγματοποιούνταν ανά 20 ημέρες.



Εικόνα 9: Καλλιέργεια του μύκητα *Aspergillus niger* σε PDA.

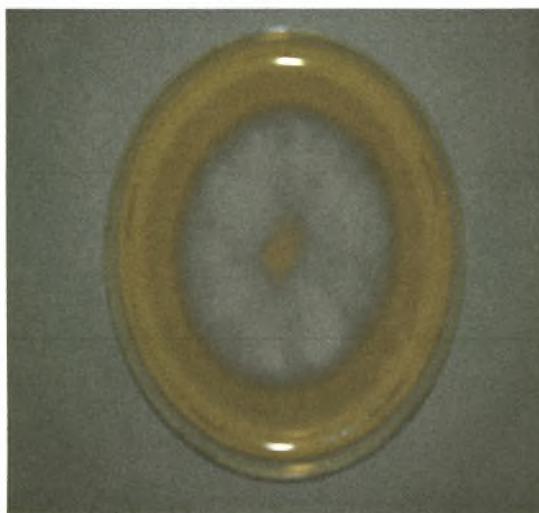
2.2.2. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Malt Extract Agar (MEA)

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Malt Extract Agar (MEA) αναμίχθηκαν 30 g malt extract, 3 g soya peptone, 15 g άγαρ και 1 L απιονισμένο νερό. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C υπό πίεση 2.1 atm για 20 min και στην συνέχεια το θρεπτικό υπόστρωμα επιστρώθηκε σε τριβλία Petri υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τριβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα MEA χρησιμοποιήθηκαν, για την καλλιέργεια των μυκήτων λευκής σήψης *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* και *T. Versicolor* (Εικόνα 10). Ανακαλλιέργειες των μυκήτων πραγματοποιούνταν ανά 20 ημέρες.

(α)



(β)



(γ)



Εικόνα 10: Καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus* (α), *Trametes versicolor* (β) και *Phanerochaete chrysosporium* (γ) σε ΜΑΕ.

2.2.3. Παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος εκχυλίσματος άχυρου (StEM).

Για την προετοιμασία ενός λίτρου υγρού θρεπτικού υποστρώματος StEM, αναμίχθηκαν 100 g ξηρού βάρους άχυρου με 1 L απιονισμένο νερό. Το μίγμα αναδεύτηκε καλά για 5 min και στη συνέχεια αποστειρώθηκε στους 121°C υπό πίεση

2.1 atm για 30 min. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε (10000 rpm) για 10 min και το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης διηθήθηκε και επαναπαστευρώθηκε στους 121°C υπό πίεση 2.1 atm για 30 min.

2.3. Μέθοδοι ανάλυσης φυτοφαρμάκων σε σύστημα HPLC

2.3.1 Σύστημα HPLC

Για την ανάλυση και προσδιορισμό των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων στις υγρές καλλιέργειες των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σύστημα HPLC Marathon III, που ήταν εξοπλισμένο με σύστημα αντλιών gradient, όγκο έγχυσης 20 μ l, ανιχνευτή UV ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό Clarify® για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Ο διαχωρισμός των διαφόρων φυτοφαρμάκων και προϊόντων μεταβολισμού τους πραγματοποιήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης (RP) C18, Nucleosil (150 x 4.6 mm, 5 μ m id) (Macherey – Nagel GmbH, Germany) με διάφορες κινητές φάσεις που περιγράφονται παρακάτω και ροή 1 ml min⁻¹.

2.3.2. Διαλύτες και φυτοφάρμακα

Για την προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων φυτοφαρμάκων και κινητής φάσης για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό HPLC grade (Merck GmbH, Germany), οξικό οξύ και NH₄OH pA grade (AppleChem). Για την ανάλυση και τον περαιτέρω πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικά πρότυπα φυτοφαρμάκων υψηλής καθαρότητας (Riedel-Haen GmbH, Germany) όπως, chlorpyrifos (99.0%), TCP (99.7%), thiabendazole (99.9%), imazalil (99.8%), 2-phenylphenol (99.9%) , diphenylamine (99.9%).

2.3.3. Καμπύλες αναφοράς

Ο ποσοτικός προσδιορισμός όλων των φυτοφαρμάκων πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον λόγο αυτό αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 1000 μ g ml⁻¹ για όλα τα φυτοφάρμακα που

μελετήθηκαν σε μεθανόλη. Ακολούθως παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 10, 5, 2, 1, 0.5 και 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ σε μεθανόλη με διαδοχικές αραιώσεις και έγινε έγχυση 20 μl από καθένα από τα πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC. Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών τους με την βοήθεια του λογισμικού Clarify®.

2.3.4. Πειράματα ανάκτησης

Για όλα τα φυτοφάρμακα και τα προϊόντα μεταβολισμού τους πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (0.5, 2 και 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εκχύλισης και παραλαβής των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων από τα δείγματα των υγρών καλλιεργειών των μυκήτων. Τα επίπεδα ανάκτησης για όλα τα φυτοφάρμακα και σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης ήταν > 80%.

2.3.5. Chlorpyrifos και TCP

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των chlorpyrifos και του κύριου προϊόντος μεταβολισμού του, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) προετοιμάστηκαν καμπύλες αναφοράς όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω. Για την έκλυση και τον διαχωρισμό των δύο ουσιών χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα διαβάθμισης όπου οι δύο αντλίες περιείχαν τις παρακάτω κινητές φάσεις:

- **Αντλία A:** Νερό 80% + Μεθανόλη 20% + Οξικό οξύ 1% κ.ο.
- **Αντλία B:** Ακετονιτρίλιο 100%

Το πρόγραμμα διαβάθμισης των αντλιών σε σχέση με το χρόνο για την ανάλυση του chlorpyrifos και του μεταβολίτη του TCP φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 1. Η ανίχνευση του chlorpyrifos και του TCP πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 300 nm και οι χρόνοι κατακράτησης για τις δύο ουσίες ήταν 9.5 και 6.3 min αντίστοιχα.

Χρόνος (min)	Αντλία A (%)	Αντλία B (%)
0	80	20
1	80	20
6	20	80
10	20	80
12	80	20
15	80	20

Πίνακας 1: Το πρόγραμμα διαβάθμισης των αντλιών του συστήματος HPLC σε σχέση με το χρόνο για την ανάλυση των chlorpyrifos και TCP.

2.3.6. Imazalil.

Για τον προσδιορισμό του μυκητοκτόνου imazalil κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη όπως έχει ήδη περιγραφεί. Η έκλυση του imazalil στο σύστημα HPLC έγινε ισοκρατικά με κινητή φάση μεθανόλη (80%) + υδατικό διάλυμα NH₃ 0.25% (20%). Η ανίχνευση του imazalil πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 204 nm και ο χρόνος κατακράτησης του ήταν 4.7 min.

2.3.7. Thiabendazole και 2 – phenyl phenol.

Για τον προσδιορισμό των μυκητοκτόνων TBZ και OPP κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη όπως έχει ήδη περιγραφεί. Η έκλυση και διαχωρισμός των δύο μυκητοκτόνων πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά με κινητή φάση ακετονιτρίλιο (39%) + νερό (60.5%) + αμμωνία 25% (0.5%). Η ανίχνευση των TBZ και OPP πραγματοποιήθηκαν στα 254 nm και οι χρόνοι κατακράτησης ήταν 4.3 και 12.2 min αντίστοιχα.

2.3.8. Diphenylamine.

Για τον προσδιορισμό του DPA κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη όπως έχει ήδη περιγραφεί. Η έκλουση του DPA έγινε ισοκρατικά με κινητή φάση ακετονιτρίλιο (40%) + νερό (50%) + μεθανόλη (10%). Η ανίχνευση του diphenylamine πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 210 nm και ο χρόνος κατακράτησης ήταν 16.3 min.

2.4. Μέτρηση μυκηλιακής βιομάζας

Η μυκηλιακή μάζα των μυκήτων που αναπτύχθηκε κατά την διάρκεια της επώασης στις διάφορες καλλιέργειες εκτιμήθηκε με το πέρας της επώασης. Η μυκηλιακή βιομάζα του μύκητα διηθήθηκε μέσω διηθητικού χαρτιού (Whatman 40) για τη συγκράτηση της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα. Κατόπιν, το διηθητικό χαρτί με το μυκήλιο τοποθετήθηκε στο ξηραντήριο στους 70°C για 24 h και στην συνέχεια ακολούθησε ζύγιση του ξηρού μυκηλίου.

2.5. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας

2.5.1. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση.

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της λακκάσης πραγματοποιήθηκε φασματοφωμετρικά με την προσθήκη σε κυψελίδα 1.2 ml τρυγικού νατρίου συγκέντρωσης 0.1 M (του οποίου το pH ρυθμίστηκε σε τιμή 4.5 με προσθήκη NaOH) και 0.8 ml δείγματος StEM από την καλλιέργεια του μύκητα. Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.4 ml ABTS (2,2 – azinobis – 3 – ethylbenzothiazolin – 6 – sulfolic acid) συγκεντρώσεως 1.5 mM, που αναδεύτηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 425 nm ανά διαστήματα 20 sec μέχρι το τέλος της αντίδρασης. Ο υπολογισμός της δράσεως του ενζύμου λακκάση πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

$$\text{Laccase activity} = [d(A_{425 \text{ nm}})/(dt \text{ (min)} \times E \text{ (lt/mol.cm)})] \times V_{\text{reaction}} \text{ (ml)}/V_{\text{sample}} \text{ (ml)}$$

όπου $d(A_{425\text{nm}})$: είναι η μέγιστη διαφορά της απορρόφησης που μετρήθηκε στα 3 min

dt : είναι το χρονικό διάστημα μεταξύ των μετρήσεων (σε min)

E : είναι ο συντελεστής απόσβεσης (σε lt/mol.cm) = 36 lt/mol.cm (για τη λακκάση)

V_{reaction} : είναι ο τελικός όγκος της αντίδρασης στην κυψελίδα (σε ml)

V_{sample} : είναι ο αρχικός όγκος της καλλιέργειας που πάρθηκε το δείγμα (σε ml)

2.5.2. Μελέτη της παρεμβολής του υποστρώματος στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (εξαρτημένου ή μη του Mn)

Ο προσδιορισμός της παρεμβολής του υποστρώματος, στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση, πραγματοποιήθηκε φασματοφωμετρικά με την προσθήκη σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού οξέος συγκέντρωσης 0.1 M (του οποίου το pH ρυθμίστηκε στο 4.5 με προσθήκη διαλύματος γαλακτικού νάτριου), 0.2 ml διαλύματος DMAB (3 – dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM και 0.1 ml διαλύματος MBTH (3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride) συγκεντρώσεως 1 mM. Για την εκκίνηση της μη-ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.66 ml δείγματος StEM από την καλλιέργεια του μύκητα που αναμίχθηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 590 nm ανά διαστήματα 20 sec μέχρι το τέλος της αντίδρασης. Η παρεμβολή του υποστρώματος υπολογίζεται ως ακολούθως:

$$\text{Background activity} = [d(A_{425 \text{ nm}})/(dt \text{ (min)} \times E \text{ (lt/mol.cm)})] \times V_{\text{reaction}} \text{ (ml)}/V_{\text{sample}} \text{ (ml)}$$

όπου $d(A_{590\text{nm}})$: είναι η μέγιστη διαφορά της απορρόφησης που μετρήθηκε στα 3 min

dt : είναι το χρονικό διάστημα μεταξύ δύο διαδοχικών μετρήσεων (σε min)

E : είναι ο συντελεστής απόσβεσης (σε lt/mol.cm) = 32.9 lt/mol.cm (για την υπεροξειδάση, εξαρτημένου ή μη του Mn)

V_{reaction} : είναι ο τελικός όγκος της αντίδρασης στην κυψελίδα (σε ml)

V_{sample} : είναι ο αρχικός όγκος της καλλιέργειας που πάρθηκε το δείγμα (σε ml)

2.5.3. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένου του Mn)

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένου του Mn) πραγματοποιήθηκε φασματοφωμετρικά με την προσθήκη σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού οξέος συγκέντρωσης 0.1 M (του οποίου το pH ρυθμίστηκε στο 4.5 με προσθήκη διαλύματος γαλακτικού νάτριου), 0.2 ml διαλύματος DMAB (3 – dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM, 0.1 ml διαλύματος MBTH (3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride) συγκεντρώσεως 1 mM και 0.66 ml δείγματος StEM από την καλλιέργεια επώασης. Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.01 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) συγκεντρώσεως 10 mM που αναδεύτηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 590 nm ανά διαστήματα 20 sec μέχρι το τέλος της αντίδρασης. Η δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτώμενου του Mn) υπολογίζεται ως ακολούθως:

$$AP = \text{Independent peroxidase activity} + \text{Background activity} = [d(A_{590 \text{ nm}})/(dt (\text{min}) \times E (\text{lt/mol.cm}))] \times V_{\text{reaction}} (\text{ml})/V_{\text{sample}} (\text{ml})$$

όπου $d(A_{590 \text{ nm}})$: είναι η μέγιστη διαφορά της απορρόφησης που μετρήθηκε στα 3 min

dt: είναι το χρονικό διάστημα μεταξύ δύο διαδοχικών μετρήσεων (σε min)

E: είναι ο συντελεστής απόσβεσης (σε lt/mol.cm) =32.9 lt/mol.cm (για την υπεροξειδάση, εξαρτημένου ή μη του Mn)

V_{reaction} : είναι ο τελικός όγκος της αντίδρασης στην κυψελίδα (σε ml)

V_{sample} : είναι ο αρχικός όγκος της καλλιέργειας που πάρθηκε το δείγμα (σε ml)

Η υπεροξειδάση (μη εξαρτημένη του Mn) υπολογίζεται από την AP με αφαίρεση της παρεμβολής του υποστρώματος (Background activity), δηλαδή:

$$\text{Independent peroxidase activity} = AP - \text{Background activity}$$

2.5.4. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε φασματοφωμετρικά με την προσθήκη σε κυψελίδα 1 ml διαλύματος ηλεκτρικού οξέος συγκέντρωσης 0.1 M (του οποίου το pH ρυθμίστηκε στη τιμή 4.5 με προσθήκη διαλύματος γαλακτικού νάτριου), 0.2 ml διαλύματος DMAB (3 – dimethylaminobenzoic acid) συγκεντρώσεως 25 mM, 0.1 ml διαλύματος MBTH (3 – methyl – 2 – benzothiazolinon – hydrazon – hydrochloride) συγκεντρώσεως 1 mM, 0.66 ml δείγματος StEM από την καλλιέργεια επώασης και 0.01 ml διαλύματος MnSO₄ συγκέντρωσης 20 mM. Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.01 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) συγκεντρώσεως 10 mM, που αναδεύτηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 590 nm ανά διαστήματα 20 sec μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Η δραστηριότητα του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση υπολογίζεται ως ακολούθως:

$$AR = Mn\text{-peroxidase activity} + Independent\text{ peroxidase activity} + Background\text{ activity} = d(A_{590\text{ nm}})/dt\text{ (min)} \times E\text{ (lt/mol.cm)} \times V_{\text{reaction}}\text{ (ml)}/V_{\text{sample}}\text{ (ml)}$$

όπου $d(A_{590\text{ nm}})$: είναι η μέγιστη διαφορά της απορρόφησης που μετρήθηκε στα 3 min

dt: είναι το χρονικό διάστημα μεταξύ δύο διαδοχικών μετρήσεων (σε min)

E: είναι ο συντελεστής απόσβεσης (σε lt/mol.cm) = 32.9 lt/mol.cm (για την υπεροξειδάση, εξαρτημένου ή μη του Mn)

V_{reaction} : είναι ο τελικός όγκος της αντίδρασης στην κυψελίδα (σε ml)

V_{sample} : είναι ο αρχικός όγκος της καλλιέργειας που πάρθηκε το δείγμα (σε ml)

Η Mn-υπεροξειδάση υπολογίζεται από την AR με αφαίρεση της τιμής της AP (Independent peroxidase + Background activity). Συνεπώς:

$$Mn\text{-peroxidase activity} = AR - AP$$

2.5.5. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της οξειδάσης της βερατρυλικής αλκοόλης πραγματοποιήθηκε φασματοφωμετρικά με την προσθήκη σε κυψελίδα 1.6 ml τρυγικού νατρίου (pH 3) συγκέντρωσης 0.1 M και 0.8 ml δείγματος StEM από την καλλιέργεια επώασης. Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.07 ml διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης (Veratryl - alcohol) συγκεντρώσεως 20 mM, που αναδεύτηκε με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντίδρασης.

2.5.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της λιγνίνης υπεροξειδάσης πραγματοποιήθηκε φασματοφωμετρικά με την προσθήκη σε κυψελίδα 1.6 ml τρυγικού νατρίου (pH 3) συγκέντρωσης 0.1 M, 0.8 ml δείγματος StEM από την καλλιέργεια επώασης και 0.07 ml διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης (Veratryl alcohol) συγκεντρώσεως 20 mM. Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0.03 ml διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) συγκεντρώσεως 54 mM, που αναδεύτηκαν με τον υπόλοιπο όγκο της κυψελίδας. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Σε περίπτωση προσδιορισμού της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση αφαιρείται από την τελική τιμή η ενζυμική δραστηριότητα της οξειδάσης της βερατρυλικής αλκοόλης.

2.6. Πειραματικός σχεδιασμός

2.6.1. *Chlorpyrifos*.

Για τη μελέτη της αποδόμησης και μεταβολισμού του εντομοκτόνου chlorpyrifos ακολουθήθηκε διαφορετική προσέγγιση για την προετοιμασία των υγρών καλλιεργειών StEM + chlorpyrifos σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτοφάρμακα που εξετάστηκαν λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας (4.5 mg L^{-1}) συγκεκριμένου εντομοκτόνου. Έτσι προετοιμάστηκε αρχικά πυκνό διάλυμα chlorpyrifos ($10,000 \text{ mg ml}^{-1}$) σε μεθανόλη. Ποσότητα 1 ml από αυτό τοποθετήθηκε στον πυθμένα αποστειρωμένου δοχείου DURAN (1 L) υπό ασηπτικές συνθήκες και αφέθηκε να εξατμιστεί εντός θαλάμου νηματικής ροής. Με την ολοκλήρωση της εξάτμισης το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1 L StEM. Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα StEM + chlorpyrifos (10 mg L^{-1}) που προέκυψε αναδεύτηκε για διάστημα μίας ώρας σε μαγνητικό αναδευτήρα και στην συνέχεια τοποθετήθηκε για διάστημα 30 min σε λουτρό υπερήχων (Ultrasonic bath, Elmasonic S30, ELMA) ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατό καλύτερη διαλυτοποίηση του φυτοφαρμάκου. Στην συνέχεια, μεταφέρθηκαν 60 ml από το StEM + Chlorpyrifos (10 mg L^{-1}) σε 12 κωνικές φιάλες των 250 ml, ώστε να υπάρξουν τρεις επαναλήψεις για καθένα από τους τέσσερις μύκητες που μελετήθηκαν. Ακολούθησε εμβολιασμός των καλλιεργειών με τους μύκητες με μεταφορά 4 εμβολίων από το τρυβλίο σε κάθε κωνική. Τα εμβόλια ελήφθησαν με τη βοήθεια του φελοτρυπητήρα και αποτελούνταν από νέα καλλιέργεια του μύκητα σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (ενότητα 2.2.). Οι κωνικές φιάλες κατόπιν, τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο στις 60 rpm και σε θερμοκρασία 25°C (Εικόνα 11).

Παράλληλα με τις εμβολιασμένες καλλιέργειες των μυκήτων, χρησιμοποιήθηκαν και τρεις φιάλες που περιείχαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα StEM + chlorpyrifos (60 ml) και οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν με κανένα από τους μύκητες για να χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες αβιοτικής αποδόμησης του φυτοφαρμάκου. Επίσης στο πείραμα συμπεριλήφθησαν και τρεις φιάλες για κάθε μύκητα (σύνολο εννέα φιάλες καθώς ο μύκητας *A. niger* δεν παράγει λιγνολυτικά ένζυμα) που περιείχαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα StEM χωρίς chlorpyrifos για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας από τους μύκητες εν τη απουσία του φυτοφαρμάκου.

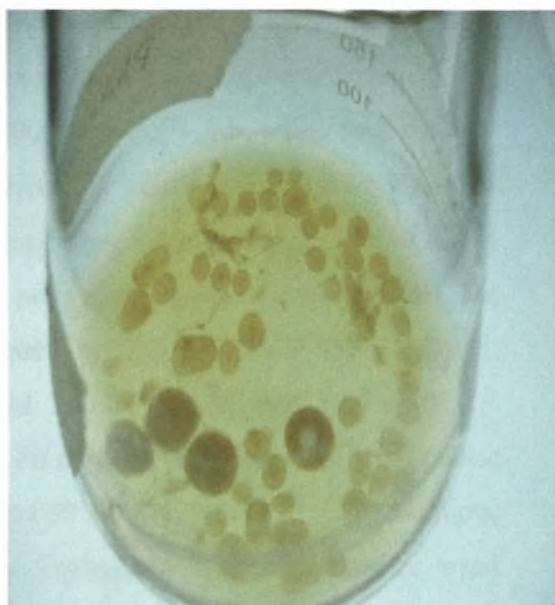
Αμέσως μετά την προσθήκη του φυτοφαρμάκου στις καλλιέργειες (χρόνος 0) αλλά και 5, 10, 15, 20 και 30 ημέρες αργότερα ελήφθησαν δείγματα της υγρής καλλιέργειας για την μελέτη τόσο της αποδόμησης του chlorpyrifos και του κύριου προϊόντος μεταβολισμού του TCP, όσο και της ενζυμικής δραστηριότητας των μυκήτων. Σε κάθε δειγματοληψία παραλαμβάνονταν 3.5 ml σε γυάλινα φιαλίδια των 10 ml για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας και 1 ml για ανάλυση σε σύστημα HPLC.

Η εκχύλιση του chlorpyrifos από την υγρή καλλιέργεια των μυκήτων πραγματοποιήθηκε με την παρακάτω διαδικασία: Σε 1 ml δείγματος που συλλέχθηκε από την υγρή καλλιέργεια σε γυάλινο φιαλίδιο, προστέθηκαν 2 ml μεθανόλης και το μίγμα αναδεύτηκε σε vortex για 30 sec σε μέγιστη ταχύτητα. Ακολούθησε διήθηση του μίγματος από φίλτρα σύριγγας Minisart® SRP25 0.45μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH). Το διηθημένο δείγμα παραλήφθηκε σε HPLC φιαλίδια (1.8 ml) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους.

α)



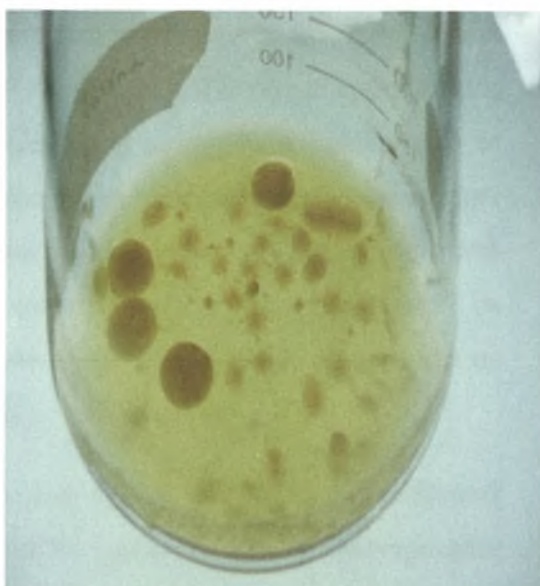
β)



γ)



δ)



Εικόνα 11: Υγρές καλλιέργειες των μυκήτων α) *Aspergillus niger*, β) *Phanerochaete chrysosporium*, γ) *Pleurotus ostreatus* και δ) *Trametes versicolor*.

2.6.2. Thiabendazole, Imazalil, ortho-phenylphenol και Diphenylamine.

Για την μελέτη της αποδόμησης των μυκητοκτόνων TBZ, imazalil, OPP και DPA ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και για τον λόγο αυτό παρουσιάζονται μαζί.. Αρχικά προετοιμάστηκε πυκνό διάλυμα ($10,000 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) για κάθε ένα από τα παραπάνω μυκητοκτόνα σε μεθανόλη. Ποσότητα 2 ml από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα τοποθετήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες στον πυθμένα δοχείου DURAN (1 L) και αφέθηκε εντός του θαλάμου νηματικής ροής ώστε να εξατμιστεί πλήρως. Με την ολοκλήρωση της εξάτμισης τα υπολείμματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 1 L αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα StEM. Το διάλυμα που προέκυψε (StEM + μυκητοκτόνο) αναδεύτηκε με μαγνητάκι για διάστημα μίας ώρας και ακολούθως τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για διάστημα 30 ώρας ώστε να επιτευχθεί πλήρης διαλυτοποίηση των μυκητοκτόνων. Από την διαδικασία αυτή προέκυψαν υγρά θρεπτικά υποστρώματα StEM που περιείχαν τα μυκητοκτόνα σε συγκέντρωση 20 mg L^{-1} . Τα μυκητοκτόνα TBZ και OPP μελετήθηκαν στην ίδια καλλιέργεια διότι κυκλοφορούν ως εμπορικό σκεύασμα που περιέχει και τις δύο δραστικές ουσίες και χρησιμοποιούνται μαζί στην πράξη. Για κάθε στέλεχος μύκητα τοποθετήθηκαν 30 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος StEM σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη των 250 ml. Προετοιμάστηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε μύκητα και ακολούθησε εμβολιασμός με τους μύκητες σε ασηπτικές συνθήκες με προσθήκη τεσσάρων εμβολίων από το τρυβλίο σε κάθε κωνική. Τα εμβόλια ελήφθησαν με τη βοήθεια του φελοτρυπητήρα και αποτελούνταν από νέα καλλιέργεια του μύκητα σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (Ενότητα 2.2.). Οι κωνικές φιάλες κατόπιν τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο για περίοδο τριών ημερών στις 60 rpm και σε θερμοκρασία 25°C για την ανάπτυξη των μυκήτων (Εικόνα 11).

Ύστερα από επώαση τριών ημερών σε όλες τις κωνικές φιάλες προστέθηκαν άλλα 30 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος StEM + μυκητοκτόνο (συγκεντρώσεως 20 mg L^{-1}), με αποτέλεσμα την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης των μυκητοκτόνων στην υγρή καλλιέργεια 10 mg L^{-1} . Στην συνέχεια, οι κωνικές φιάλες επανατοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στις ίδιες συνθήκες επώασης. Παράλληλα με τις εμβολιασμένες καλλιέργειες των μυκήτων, χρησιμοποιήθηκαν και τρεις φιάλες που περιείχαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα StEM + μυκητοκτόνο (60 ml) και οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν με κανένα από τους μύκητες και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες αβιοτικής αποδόμησης των μυκητοκτόνων. Επίσης στο πείραμα

συμπεριλήφθηκαν και τρεις φιάλες για κάθε μύκητα (σύνολο εννέα φιάλες καθώς ο μύκητας *A. niger* δεν παράγει λιγνολυτικά ένζυμα) που περιείχαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα StEM χωρίς μυκητοκτόνο για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας από τους μύκητες εν τη απουσία του φυτοφαρμάκου.

Αμέσως μετά την προσθήκη των μυκητοκτόνων στις καλλιέργειες (χρόνος 0) αλλά και 2 ώρες και 2, 5, 10, 15, 20 και 30 ημέρες αργότερα ελήφθησαν δείγματα της υγρής καλλιέργειας για την μελέτη τόσο της αποδόμησης των μυκητοκτόνων όσο και για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας των μυκήτων. Σε κάθε δειγματοληψία παραλαμβάνονταν 3.5 ml σε γυάλινα φιαλίδια των 10 ml για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας και 1 ml για ανάλυση σε σύστημα HPLC. Η δειγματοληψία των 2 ώρων πραγματοποιήθηκε μόνο στην περίπτωση των φαινολικών μυκητοκτόνων DPA, OPP καθώς αποτελούν ιδανικά υποστρώματα για το λιγνολυτικό σύστημα των μυκήτων λευκής σήψης και ήταν πιθανή η ταχύτατη διάσπαση τους.

Για την ανάλυση και προσδιορισμό των υπολειμμάτων των μυκητοκτόνων TBZ, imazalil και OPP στις υγρές καλλιέργειες των μυκήτων, χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος εκχύλισης. Συγκεκριμένα, 0.5 ml StEM απομακρύνθηκαν από κάθε κωνική φιάλη και τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια erpendorf. Τα δείγματα στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν για 15 min στις 13200 rpm και 0.4 ml από το καθαρό υπερκείμενο τοποθετήθηκαν σε καινούρια σωληνάκια erpendorf που περιείχαν 0.8 ml μεθανόλης. Τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν σε vortex για 30 sec σε μέγιστη ταχύτητα και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν ξανά για 15 min στις 13200 rpm. Το καθαρό υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τοποθετήθηκε σε HPLC φιαλίδια (1.8 ml) και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Η μέθοδος εκχύλισης που ακολουθήθηκε για την παραλαβή του DPA από τα δείγματα υγρής καλλιέργειας των μυκήτων ήταν η εξής: από κάθε υγρή καλλιέργεια απομακρύνθηκαν 0.5 ml StEM και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια (10 ml) στα οποία ακολούθως προστέθηκε 1 ml μίγματος ακετονιτριλίου : μεθανόλης (80:20). Τα δείγματα αναμίχθηκαν σε vortex για 30 sec σε μέγιστη ταχύτητα. Ακολούθησε διήθηση του δείγματος από φίλτρα σύριγγας Minisart® SRP25 0.45μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH) και το διηθημένο δείγμα συλλέχτηκε σε HPLC φιαλίδια (1.8 ml) και αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC όπως έχει ήδη περιγραφεί.

2.7. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα των πειραμάτων ενζυμικής δραστηριότητας αναλύθηκαν με Ανάλυση Παραλλακτικότητας δύο παραγόντων (Two-Way ANOVA). Οι δύο παράγοντες που αξιολογήθηκαν ως προς την επίδραση τους στην διακύμανση των τιμών ήταν: ο χρόνος και το είδος μύκητα καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους. Στις περιπτώσεις όπου οι αλληλεπιδράσεις των δύο παραγόντων ήταν στατιστικά σημαντικές, χρησιμοποιήθηκε το LSD – test (0.05) ώστε να εξεταστεί η ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των διαφόρων καλλιεργειών μυκήτων, και ιδιαίτερα μεταξύ καλλιεργειών του ίδιου μύκητα παρουσία ή απουσία του φυτοφαρμάκου, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Γενικά

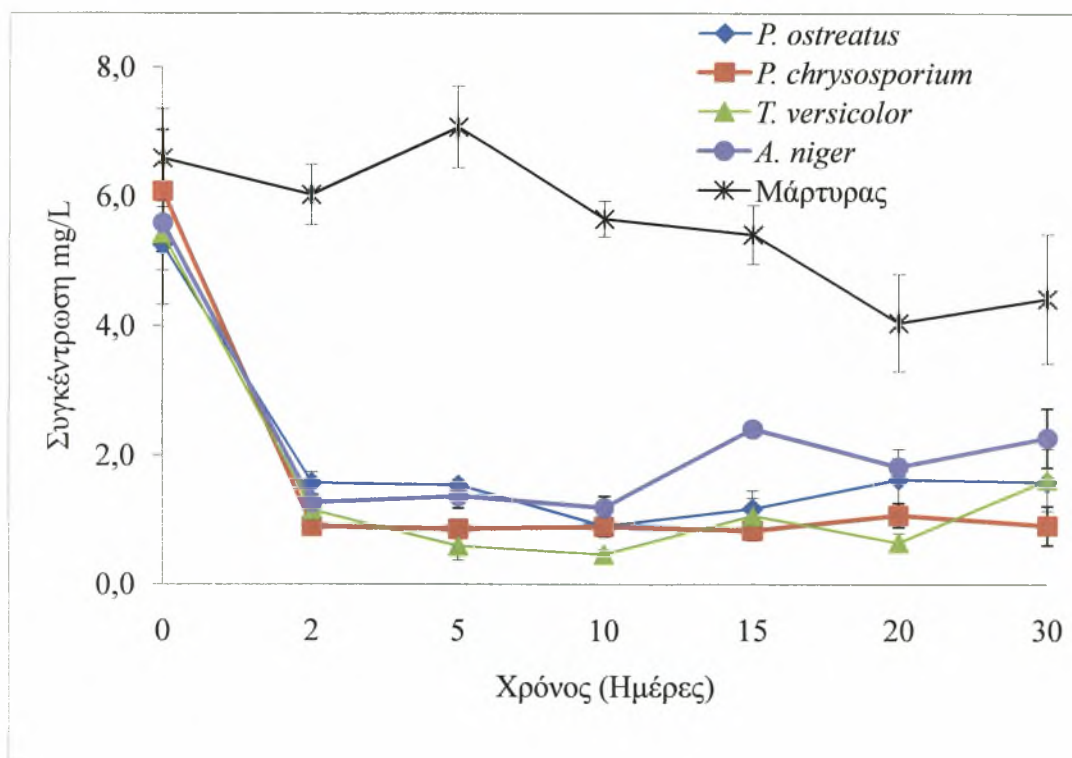
Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των μυκήτων λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* και του ασκομύκητα *Aspergillus niger* για την αποδόμηση των φυτοφαρμάκων chlorpyrifos, TBZ, imazalil, OPP και DPA. Παράλληλα παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας για τα ένζυμα λακκάση, Mn-υπεροξειδάση (εξαρτώμενης και μη του Mn) και λιγνίνης υπεροξειδάσης. Θα πρέπει να τονιστεί ότι δράση του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση δεν ανιχνεύτηκε σε καμία από τις καλλιέργειες των μυκήτων που αξιολογήθηκαν. Παράλληλα, κατά την μέτρηση της δράσης του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση μη εξαρτώμενης του Mn, παρατηρήθηκε ότι οι τιμές του ενζύμου σε όλους τους μύκητες λευκής σήψης και σε όλες τις μεταχειρίσεις με τα φυτοφάρμακα, ήταν ανάλογες με της τιμές του ενζύμου MnP. Για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζονται διαγραμματικά τα αποτελέσματα από την δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου. Επιπροσθέτως μετρήθηκε και η παραγωγή βιομάζας από τους μύκητες με την ολοκλήρωση του πειράματος.

3.2. Chlorpyrifos

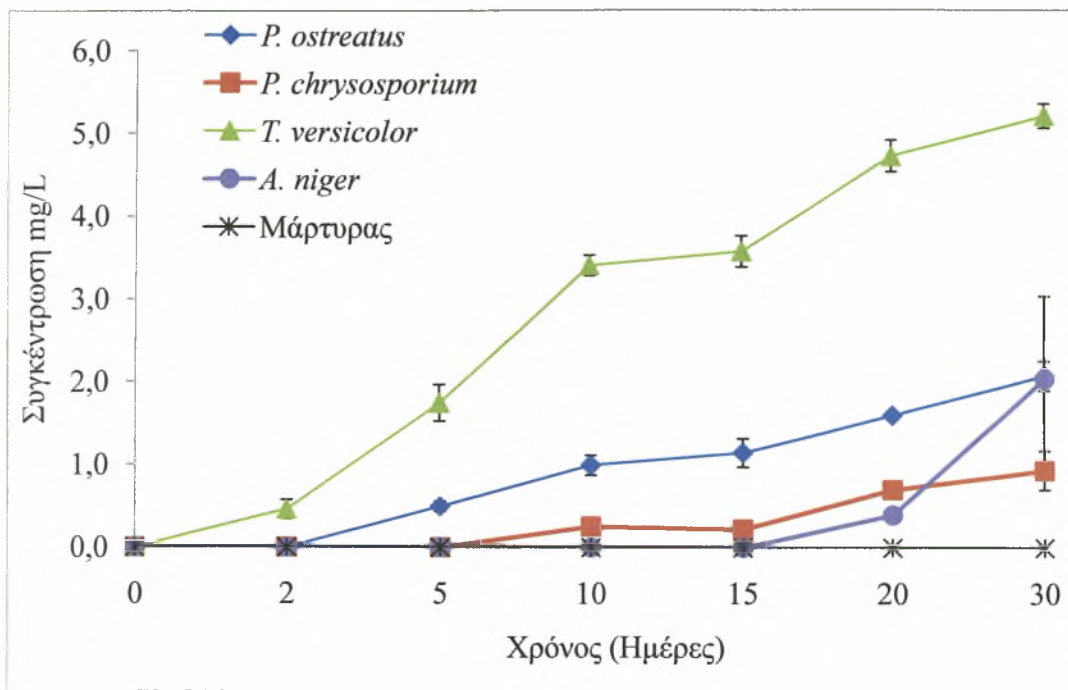
Η αποδόμηση του εντομοκτόνου chlorpyrifos συνοδεύτηκε από σχηματισμό του συχνά ανιχνευόμενου μεταβολίτη του, TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol) του οποίου οι συγκεντρώσεις επίσης προσδιορίστηκαν (Διαγράμματα 1 και 2). Η αποδόμηση του φυτοφαρμάκου από όλους του μύκητες ήταν ταχύτατη κατά τις 5 πρώτες μέρες της επώασης. Από τους μύκητες που αξιολογήθηκαν η υψηλότερη αποδομητική ικανότητα παρατηρήθηκε από τον *T. versicolor* που προκάλεσε διάσπαση του 91.3% της αρχικής ποσότητας του εντομοκτόνου εντός 10 ημερών. Τα αντίστοιχα ποσοστά διάσπασης για τους μύκητες *P. chrysosporium*, *P. ostreatus* και *A. niger* ήταν 85.0, 82.8 και 78.8% αντίστοιχα (Διάγραμμα 1). Η διάσπαση του chlorpyrifos στις καλλιέργειες των μυκήτων συνοδεύτηκε από σταδιακή συσσώρευση

του μεταβολίτη του TCP με την ολοκλήρωση της επώασης. Έτσι στις καλλιέργειες του μύκητα *T. versicolor* ανιχνεύθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση του μεταβολίτη TCP, που έφτασε τα 5.2 mg L^{-1} στο τέλος της επώασης. Συγκριτικά στις καλλιέργειες του μύκητα *P. ostreatus* η υψηλότερη συγκέντρωση TCP ήταν 2.1 mg L^{-1} (Διάγραμμα. 2). Η διάσπαση του chlorpyrifos στα δείγματα StEM χωρίς μύκητα (αβιοτικός μάρτυρας) ήταν περιορισμένη ενώ δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές ποσότητες TCP.

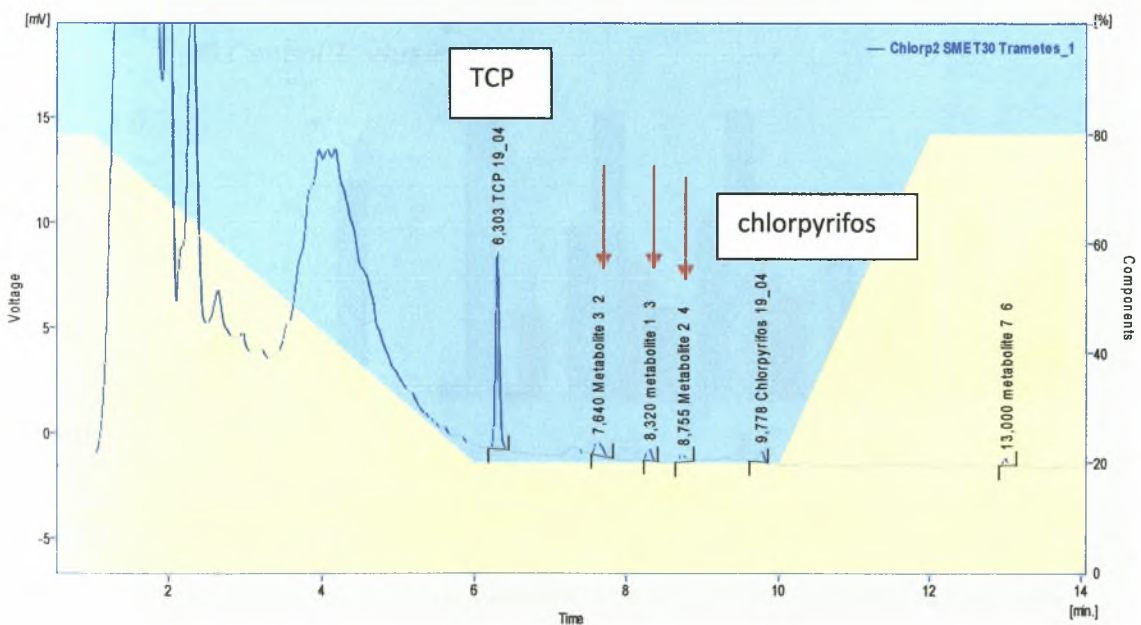
Θα πρέπει να τονιστεί ότι στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων των υγρών καλλιεργειών των διαφόρων μυκήτων παρατηρήθηκε η εμφάνιση άλλων κορυφών, εκτός των chlorpyrifos και TCP, των οποίων η παρουσία μεταβάλλονταν με το χρόνο, και πιθανών να ανήκουν σε προϊόντα μεταβολισμού. Επιλεγμένα δείγματα έχουν ήδη αναλυθεί και σε σύστημα LC-MS/MS και γίνεται προσπάθεια να ταυτοποιηθούν (Εικόνα 12).



Διάγραμμα 1: Η αποδόμηση του εντομοκτόνου chlorpyrifos στις καλλιέργειες των διαφόρων μυκήτων που αξιολογήθηκαν καθώς και σε αντίστοιχη καλλιέργεια StEM χωρίς μύκητα (Μάρτυρας). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



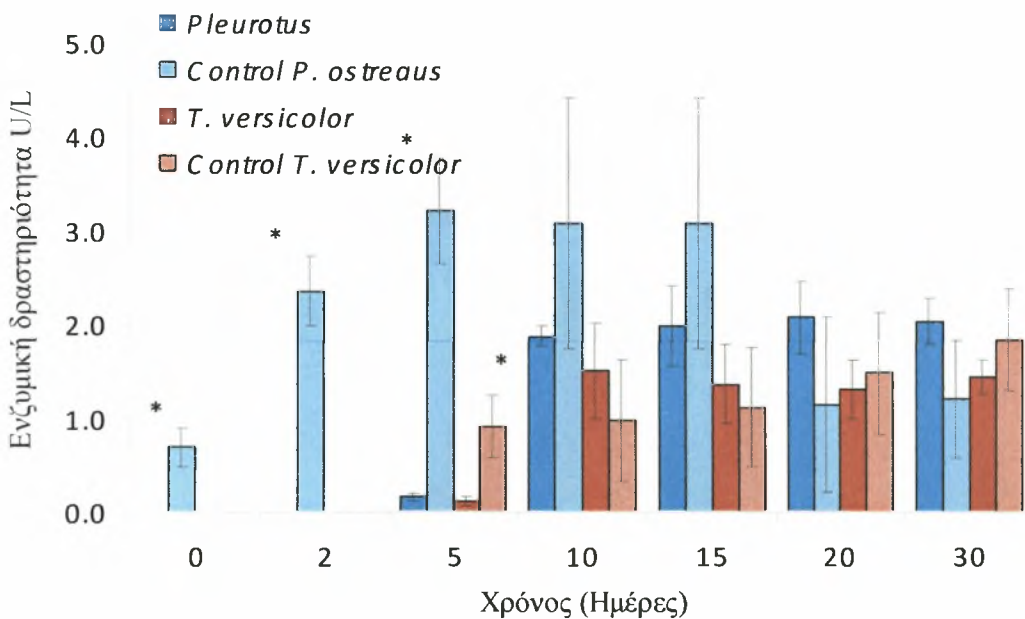
Διάγραμμα 2: Οι συγκεντρώσεις του κύριου μεταβολίτη του chlorpyrifos, TCP που ανιχνεύθηκε στις καλλιέργειες των διαφόρων μυκήτων καθώς και σε αντίστοιχη καλλιέργεια StEM χωρίς μύκητα (Μάρτυρας). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Εικόνα 12: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από την ανάλυση δείγματος που συλλέχθηκε από καλλιέργεια του μύκητα *T. versicolor* σε χρόνο 30 ημερών. Οι

κορυφές των chlorpyrifos και TCP εμφανίζονται ξεκάθαρα ενώ οι κορυφές που ανήκουν σε πιθανούς μεταβολίτες υποδεικνύονται με κόκκινα βέλη.

Αναφορικά με την δραστηριότητα του ενζύμου λακκάση, όπως αναμενόταν ο μύκητας *P. chrysosporium* δεν παρήγαγε καθόλου λακκάση ανεξάρτητα από την παρουσία του chlorpyrifos. Η υψηλότερη δράση του ενζύμου παρουσία chlorpyrifos καταγράφηκε στις καλλιέργειες του μύκητα *P. ostreatus* (2.08 ± 0.40 U L⁻¹) 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, ενώ η αντίστοιχη μέγιστη τιμή για τον μύκητα *T. versicolor* ήταν 1.51 ± 0.50 U L⁻¹ και παρατηρήθηκε 10 ημέρες μετά το εμβολιασμό (Διάγραμμα 3). Η ενζυμική δραστηριότητα λακκάσης μειώθηκε με την πάροδο του χρόνου και για τους δύο παραπάνω μύκητες (Πίνακας 2). Από την άλλη μεριά στα δείγματα – μάρτυρες (μύκητας απουσία chlorpyrifos) των μυκήτων *T. versicolor* και *P. ostreatus* παρατηρήθηκαν αυξημένες τιμές ενζυμικής δραστηριότητας λακκάσης συγκριτικά με τις τιμές που μετρήθηκαν στις αντίστοιχες καλλιέργειες παρουσία chlorpyrifos αν και οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο για τον μύκητα *P. ostreatus* ($P < 0.001$, Πίνακας 2). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν μια ανασχετική δράση του chlorpyrifos στην ενζυμική δραστηριότητα λακκάσης για τον μύκητα *P. ostreatus*.

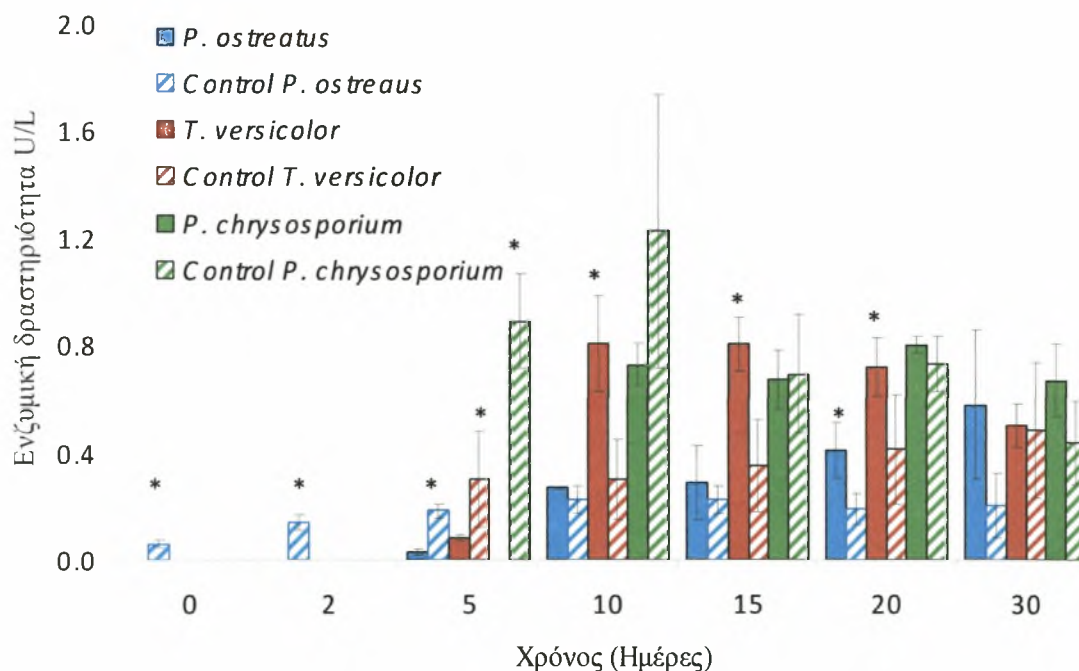


Διάγραμμα 3: Η δράση του ενζύμου λακκάση που μετρήθηκε στις καλλιέργειες των μυκήτων *T. versicolor* και *P. ostreatus* παρουσία ή απουσία (Control) chlorpyrifos. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Στήλες που

έχουν σημανθεί με (*) παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκριτικά με την αντίστοιχη καλλιέργεια του μύκητα με ή χωρίς φυτοφάρμακο στον ίδιο χρόνο.

Πίνακας 2: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας λακκάσης από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία του chlorpyrifos.

Παράγοντες	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. ostreatus</i>	Συνολικά
Μύκητες	0.498	-	<0.001	<0.001
Χρόνος	<0.001	-	<0.001	<0.001
Μύκητες * Χρόνος	0.154	-	<0.001	<0.001



Διάγραμμα 4: Η δράση του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση (MnP) που μετρήθηκε στις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης παρουσία ή απουσία (Control) chlorpyrifos. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Στήλες που έχουν σημανθεί με (*) παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκριτικά με την αντίστοιχη καλλιέργεια του μύκητα με ή χωρίς φυτοφάρμακο στον ίδιο χρόνο.

Πίνακας 3: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας MnP από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία του chlorpyrifos.

Παράγοντες	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. ostreatus</i>	Συνολικά
Μύκητες	<0.001	0.006	0.108	<0.001
Χρόνος	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Μύκητες * Χρόνος	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Ενζυμική δραστηριότητα MnP παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες και των τριών μυκήτων λευκής σήψης που δοκιμάστηκαν ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι του chlorpyrifos (Διάγραμμα 4). Γενικότερα, σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα MnP καταγράφηκε στις καλλιέργειες του μύκητα *P. chrysosporium* απουσία chlorpyrifos με μέγιστη τιμή 1.20 U L^{-1} . Οι μέγιστες τιμές ενζυμικής δραστηριότητας MnP στις καλλιέργειες του ίδιου μύκητα παρουσία chlorpyrifos ήταν 0.80 U L^{-1} αντίστοιχα. Γενικότερα, η ενζυμική δραστηριότητα MnP σε όλες τις καλλιέργειες ήταν περιορισμένη κατά τις πρώτες πέντε ημέρες της επώασης ιδιαίτερα στις καλλιέργειες των μυκήτων *T. versicolor* και *P. ostreatus*. Η παρουσία chlorpyrifos δεν φαίνεται να είχε συνολικά σημαντική επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα λακκάσης από τον μύκητα *P. ostreatus* (Πίνακας 3, $P=0.108$). Παρόλα αυτά, η παρουσία chlorpyrifos προκάλεσε σημαντική ανάσχεση της MnP στις καλλιέργειες του μύκητα *P. ostreatus* κατά τις πρώτες 5 ημέρες της επώασης ($P<0.001$ αλληλεπίδρασης χρόνου*μύκητες, Πίνακας 3). Αντίθετα, στις καλλιέργειες του μύκητα *T. versicolor* που περιείχαν chlorpyrifos παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση ($P<0.05$, Πίνακας 3) στην ενζυμική δραστηριότητα MnP μεταξύ 10 και 20 ημερών σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στις καλλιέργειες μάρτυρες (απουσία chlorpyrifos) (Διάγραμμα 4).

Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων προσδιορίστηκε το ξηρό βάρος των μυκηλίων των μυκήτων στις διάφορες καλλιέργειες και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 4. Η παρουσία του chlorpyrifos στις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης δεν προκάλεσε σημαντική αύξηση ή μείωση της βιομάζας του μυκηλίου τους σε σχέση με τις αντίστοιχες καλλιέργειες απουσία chlorpyrifos.

Αντίθετα, το chlorpyrifos προκάλεσε μια μικρή αλλά σημαντική ($P<0.05$) μείωση στην ανάπτυξη του μύκητα *A. niger*.

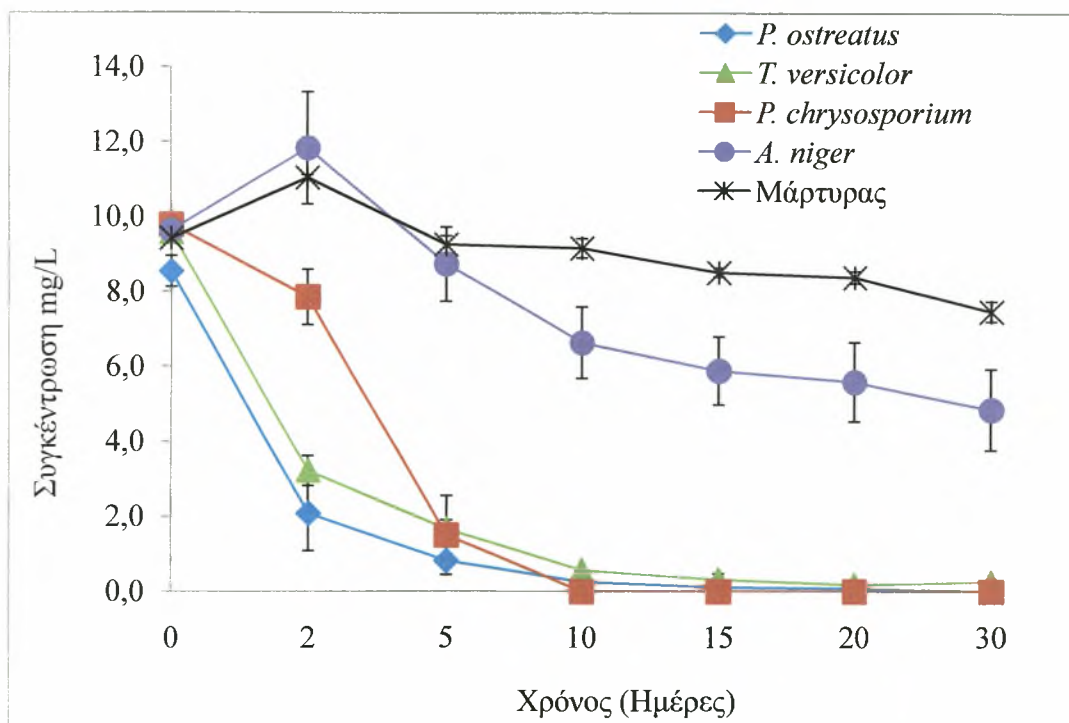
Πίνακας 4: Μέτρηση ξηρού βάρους βιομάζας των μυκήτων

	Ξηρό βάρος (g)
<i>P. ostreatus</i>	0.054±0.004
Μάρτυρας <i>P. ostreatus</i>	0.051±0.008
<i>T. versicolor</i>	0.044±0.004
Μάρτυρας <i>T. versicolor</i>	0.043±0.002
<i>P. chrysosporium</i>	0.049±0.003
Μάρτυρας <i>P. chrysosporium</i>	0.052±0.003
<i>A. niger</i>	0.065±0.004
Μάρτυρας <i>A. niger</i>	0.076±0.002

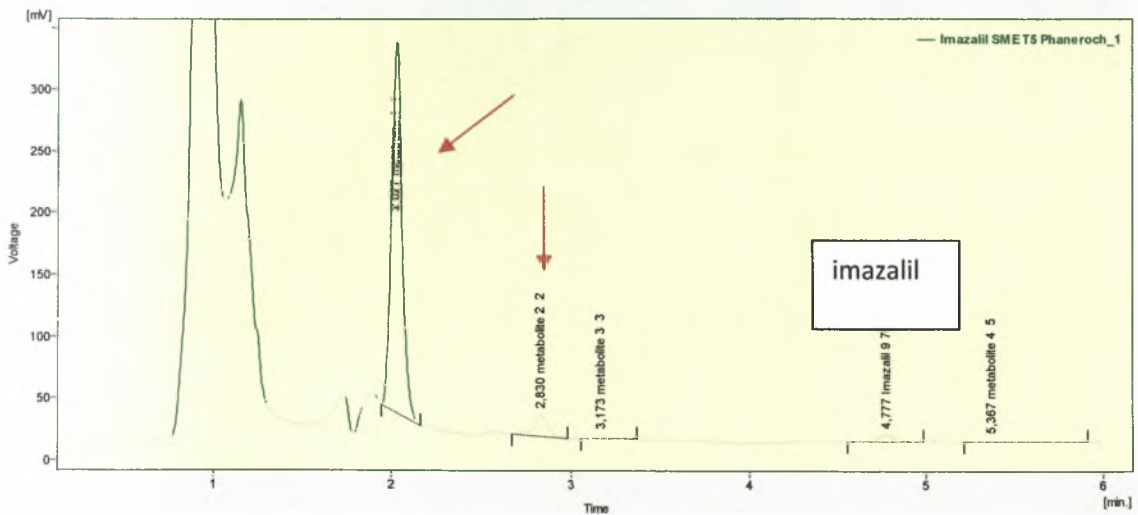
3.3. Imazalil

Το μυκητοκτόνο imazalil αποδομήθηκε ταχύτατα από τους μύκητες λευκής σήψης *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* και *T. versicolor*. Έτσι σε διάστημα 5 ημερών παρατηρήθηκε διάσπαση 90.5, 84.7 και 82.7% της αρχικής ποσότητας imazalil από τους παραπάνω μύκητες. Αντίθετα περιορισμένη αποδόμηση (9.5%) του imazalil παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες του μύκητα *A. niger* κατά το ίδιο χρονικό διάστημα. Η αποδόμηση του imazalil από τους μύκητες *P. chrysosporium*, *P. ostreatus* και *T. versicolor* ολοκληρώθηκε εντός 10 ημερών από την προσθήκη του μυκητοκτόνου σε αντίθεση με τον *A. niger* όπου με την ολοκλήρωση της επώασης παρατηρήθηκε λιγότερο από 50% διάσπαση του μυκητοκτόνου (Διάγραμμα 5). Περιορισμένη διάσπαση (<15%) παρατηρήθηκε και στις μη εμβολιασμένες με μύκητα καλλιέργειες StEM (αβιοτικός μάρτυρας) καταδεικνύοντας την ικανότητα των μυκήτων να διασπούν το μυκητοκτόνο imazalil.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων των υγρών καλλιέργειών των διαφόρων μυκήτων παρατηρήθηκε η εμφάνιση νέων κορυφών εκτός του imazalil. Οι κορυφές αυτές δεν υπήρχαν στα αντίστοιχα δείγματα – μάρτυρες, το μέγεθος των κορυφών και κατά συνέπεια η συγκέντρωσή τους στις καλλιέργειες παρουσίασαν μεταβολές με τον χρόνο επώασης και είναι πιθανόν να ανήκουν σε προϊόντα μεταβολισμού της μητρικής ουσίας. Επιλεγμένα δείγματα από τις καλλιέργειες των μυκήτων έχουν ήδη αναλυθεί σε σύστημα LC-MS/MS και γίνεται προσπάθεια να ταυτοποιηθούν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα παρουσιάζεται στην Εικόνα 13 όπου είναι εμφανής η παρουσία δύο κορυφών με χρόνους κατακράτησης 2 και 2.8 min σε χρωματογράφημα από καλλιέργεια του μύκητα *P. chrysosporium* που λήφθηκε 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

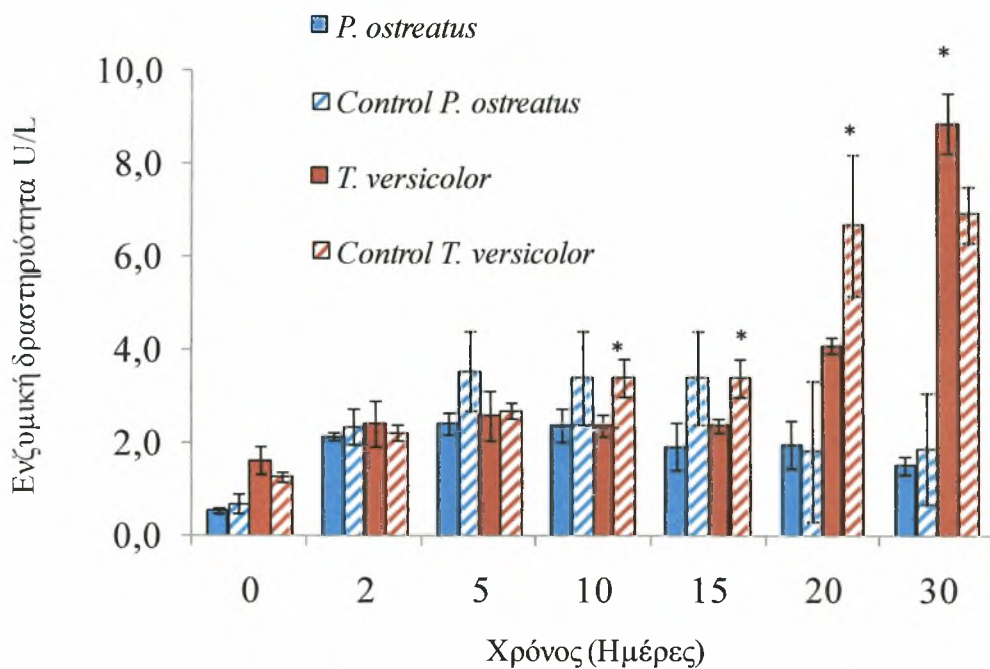


Διάγραμμα 5: Η αποδόμηση του μυκητοκτόνου imazalil στις καλλιέργειες των διαφόρων μυκήτων που αξιολογήθηκαν καθώς και σε αντίστοιχη καλλιέργεια StEM χωρίς μύκητα (Μάρτυρας). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Εικόνα 13: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από την ανάλυση δείγματος από καλλιέργεια του μύκητα *P. chrysosporium* 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Οι κορυφές που πιθανολογείται ότι ανήκουν σε μεταβολίτες του imazalil υποδεικνύονται με κόκκινα βέλη.

Όπως αναφέρεται και στην βιβλιογραφία, ο μύκητας *P. chrysosporium* και στην παρούσα μελέτη δεν παρουσίασε καμία ενζυμική δραστηριότητα λακκάσης. Συνολικά η παρουσία του φυτοφαρμάκου στις καλλιέργειες των μυκήτων *T. versicolor* και *P. ostreatus*, προκάλεσε μια μη στατιστικά σημαντική μείωση της λακκάσης (Διάγραμμα 6 και Πίνακας 5, $P > 0.05$). Ο μύκητας *T. versicolor* παρουσίασε την υψηλότερη ενζυμική δραστηριότητα ($8.87 \pm 0.64 \text{ U L}^{-1}$) παρουσία imazalil με την ολοκλήρωση της επώασης (30 ημέρες) όπου και παρατηρήθηκε ένας διπλασιασμός της δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση μεταξύ 20 και 30 ημερών από τον εμβολιασμό. Αντίθετα, στις καλλιέργειες του μύκητα *P. ostreatus* η υψηλότερη τιμή ενζυμικής δραστηριότητας ($2.41 \pm 0.23 \text{ U L}^{-1}$) ανιχνεύτηκε 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό απουσία imazalil.



Διάγραμμα 6: Η δράση του ενζύμου λακκάση στις καλλιέργειες των μυκήτων *T. versicolor* και *P. ostreatus* παρουσία ή απουσία (control) του μυκητοκτόνου imazalil. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Στήλες που έχουν σημειωθεί με (*) παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκριτικά με την αντίστοιχη καλλιέργεια του μύκητα με ή χωρίς φυτοφάρμακο στον ίδιο χρόνο.

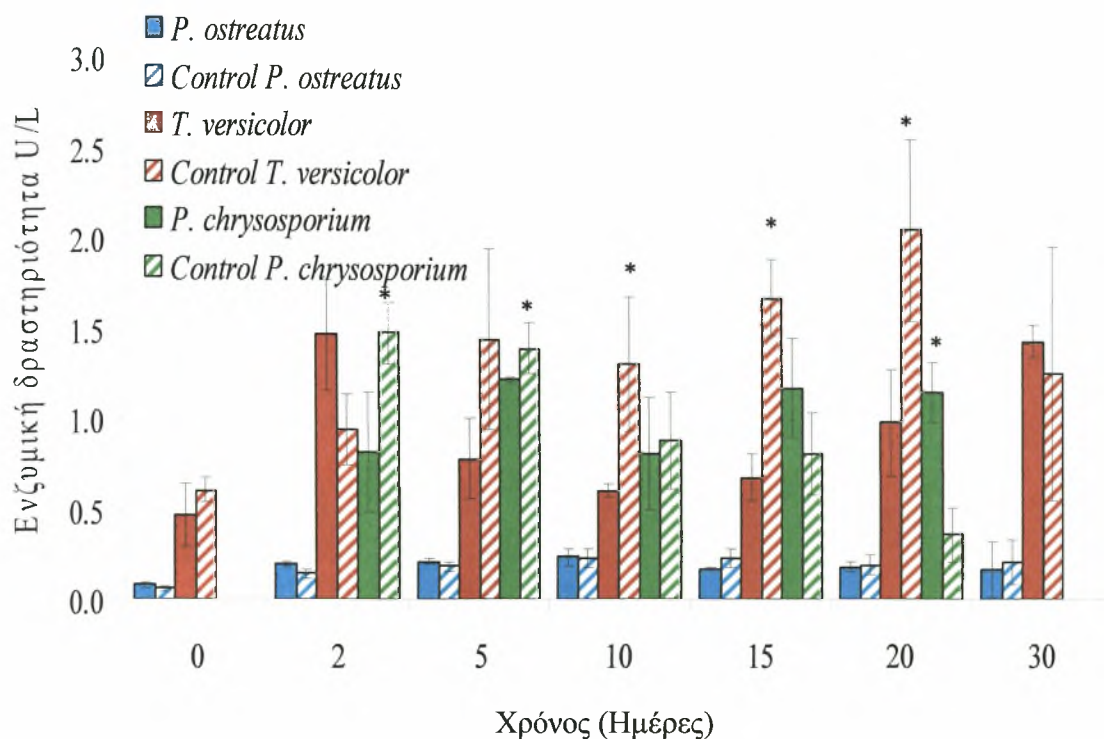
Πίνακας 5: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας λακκάσης από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία του imazalil.

Παράγοντες	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. ostreatus</i>	Συνολικά
Μύκητες	0.075	-	0.064	<0.001
Χρόνος	<0.001	-	0.005	<0.001
Μύκητες * Χρόνος	<0.001	-	0.770	<0.001

Η δραστηριότητα του ενζύμου MnP στις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης που εξετάστηκαν παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 7. Στις καλλιέργειες του μύκητα *T. versicolor* παρουσία imazalil οι υψηλότερες τιμές ενζυμικής δραστηριότητας MnP ($1.46 \pm 0.31 \text{ U L}^{-1}$) παρατηρήθηκαν 2 ημέρες μετά την προσθήκη του μυκητοκτόνου. Αντίθετα, απουσία του imazalil ο ίδιος μύκητας παρουσίασε σημαντικά υψηλότερες τιμές ενζυμικής δραστηριότητας MnP ($P < 0.001$, Πίνακας 6) μεταξύ 10 και 20 ημερών με μέγιστη τιμή $3.61 \pm 0.76 \text{ U L}^{-1}$ 20 ημέρες μετά την εφαρμογή του μυκητοκτόνου. Από την άλλη μεριά, οι μύκητες *P. chrysosporium* και *P. ostreatus* παρουσίασαν χαμηλότερη ενζυμική δραστηριότητα MnP σε σχέση με τον μύκητα *T. versicolor* ενώ η παρουσία ή απουσία imazalil δεν προκάλεσε συνολικά σημαντικές μεταβολές στην ενζυμική δραστηριότητα MnP (Πίνακας 6, $P > 0.05$).

Πίνακας 6: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας MnP από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία του imazalil.

Παράγοντες	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. ostreatus</i>	Συνολικά
Μύκητες	<0.001	0.599	0.940	<0.001
Χρόνος	<0.001	<0.001	0.005	<0.001
Μύκητες * Χρόνος	<0.001	<0.001	0.752	<0.001



Διάγραμμα 7: Η δράση του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση (MnP) των μυκήτων λευκής σήψης παρουσία ή απουσία (control) του μυκητοκτόνου imazalil. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Στήλες που έχουν σημειωθεί με (*) παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκριτικά με την αντίστοιχη καλλιέργεια του μύκητα με ή χωρίς φυτοφάρμακο στον ίδιο χρόνο.

Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων μετρήθηκε το ξηρό βάρος των μυκηλίων των μυκήτων στις διάφορες καλλιέργειες και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 7. Όπως φαίνεται η παρουσία imazalil προκάλεσε σημαντική αύξηση στην βιομάζα των μυκήτων *P. ostreatus* και *A. niger* σε αντίθεση με του μύκητες *P. chrysosporium* και *T. versicolor* των οποίων η ανάπτυξη δεν επηρεάστηκε από την παρουσία του μυκητοκτόνου.

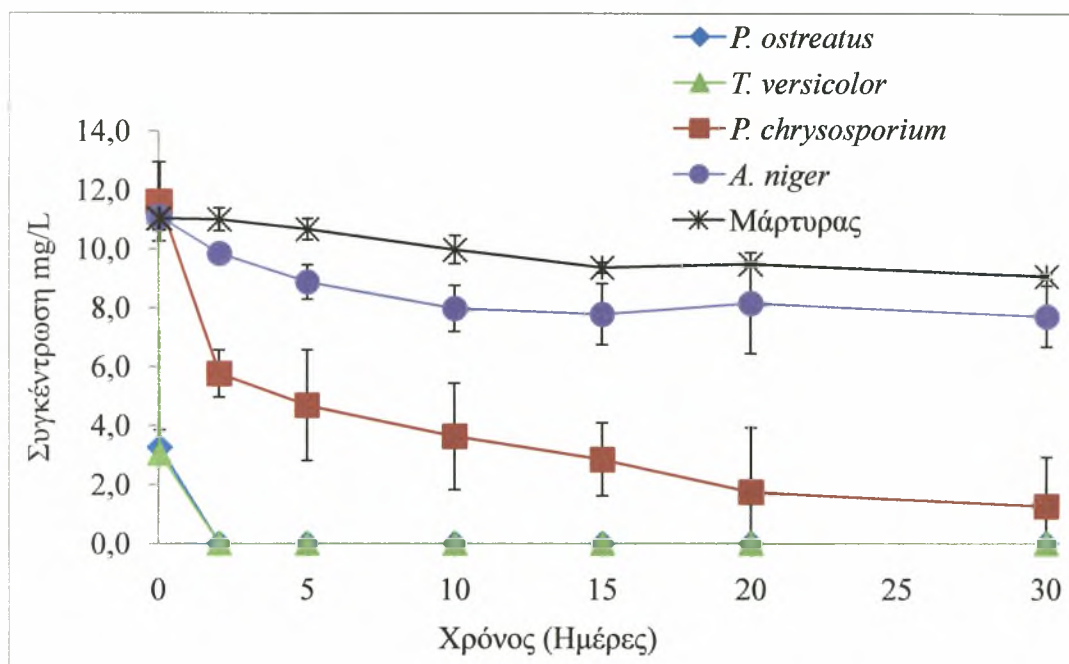
Πίνακας 7: Μέτρηση ξηρού βάρους των μυκήτων

	Ξηρό βάρος (g)
<i>P. ostreatus</i>	0.071±0.007
Control <i>P. ostreatus</i>	0.051±0.008
<i>T. versicolor</i>	0.044±0.004
Control <i>T. versicolor</i>	0.043±0.002
<i>P. chrysosporium</i>	0.050±0.004
Control <i>P. chrysosporium</i>	0.052±0.003
<i>A. niger</i>	0.090±0.003
Control <i>A. niger</i>	0.076±0.002

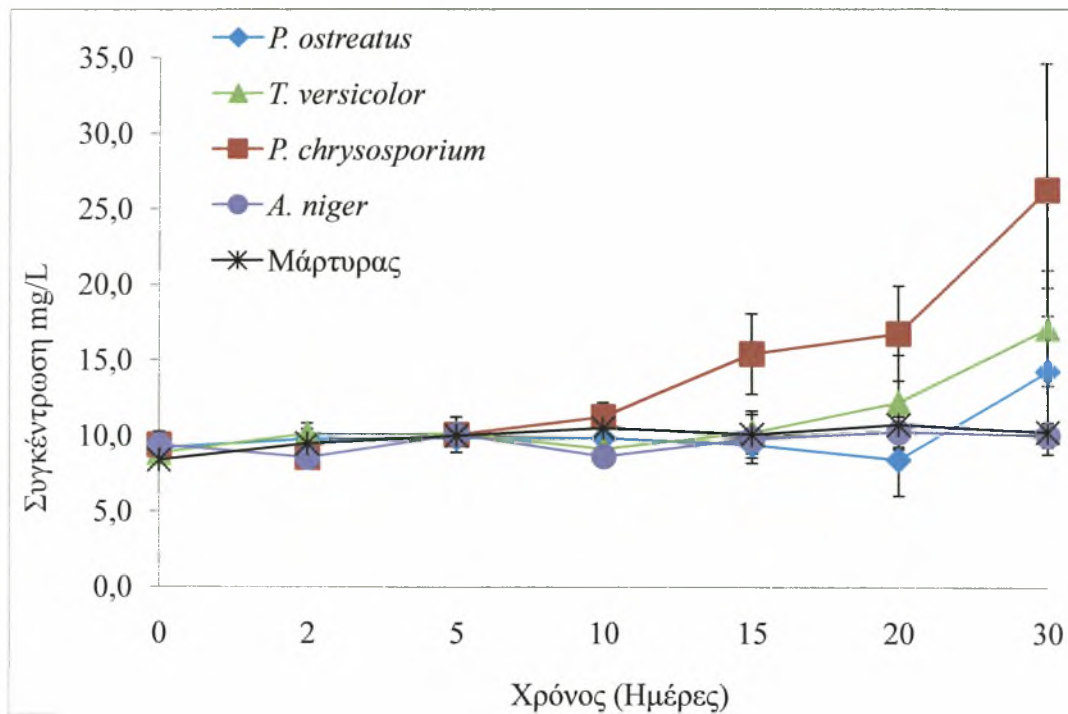
3.4. Thiabendazole και *ortho*-phenylphenol

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η διάσπαση των TBZ και OPP μελετήθηκε ταυτόχρονα καθώς τα δύο αυτά φυτοφάρμακα εφαρμόζονται σε πολλές περιπτώσεις μαζί στην πράξη. Αναφορικά με το OPP, οι μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* κατάφεραν να διασπάσουν πλήρως το OPP εντός 2 ημερών, ενώ είχαν ήδη αποδομήσει περίπου το 70% της αρχικής ποσότητας του OPP σε διάστημα των δύο ωρών (Διάγραμμα 8). Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι μύκητες είχαν προ-εμβολιαστεί στο υπόστρωμα τρεις ημέρες πριν την προσθήκη των φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες. Ο μύκητας *P. chrysosporium* παρουσίασε βραδύτερους ρυθμούς αποδόμησης με διάσπαση του 87% της αρχικής ποσότητας OPP με την ολοκλήρωση της επώασης. Αντίθετα, ο μύκητας *A. niger* παρουσίασε περιορισμένη αποδομητική ικανότητα για το OPP. Έτσι στις καλλιέργειες του μύκητα *A. niger* παρατηρήθηκε λιγότερο από 20% αποδόμηση του OPP με το τέλος του πειράματος. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στις καλλιέργειες που δεν εμβολιάστηκαν με μύκητες (αβιοτικός μάρτυρας) όπου και εκεί παρατηρήθηκε περιορισμένη διάσπαση του OPP στις 30 ημέρες που διήρκησε η επώαση.

Στην περίπτωση του TBZ, αντίθετα με το OPP, κανένας από τους επιλεγμένους μύκητες δεν κατάφερε να αποδημήσει το μυκητοκτόνο (Διάγραμμα 9). Αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί ότι κατά τις 15 πρώτες μέρες της επώασης οι συγκεντρώσεις του TBZ τόσο στις εμβολιασμένες με μύκητες καλλιέργειες όσο και στις καλλιέργειες μάρτυρες παρέμειναν αμετάβλητες. Αντίθετα στις δειγματοληψίες των 20 και 30 ημερών σημειώθηκε μια σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων του TBZ στις καλλιέργειες όλων των μυκήτων λευκής σήψης σε αντίθεση με τις καλλιέργειες του *A. niger* και των μαρτύρων όπου οι συγκεντρώσεις του TBZ παρέμειναν ίδιες.



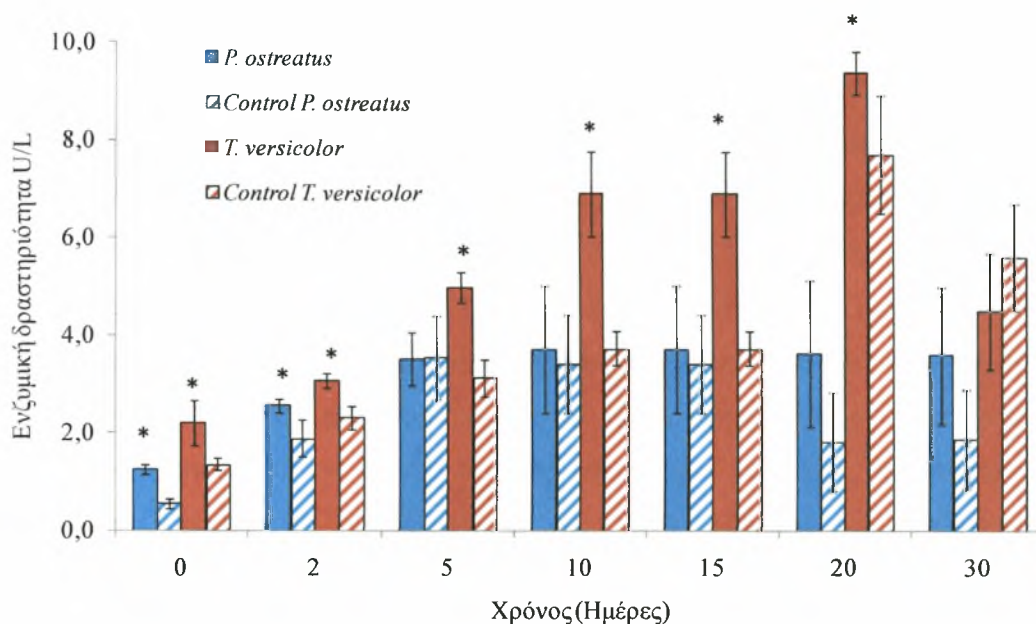
Διάγραμμα 8: Η αποδόμηση του μυκητοκτόνου OPP στις καλλιέργειες των διαφόρων μυκήτων που αξιολογήθηκαν καθώς και σε αντίστοιχη καλλιέργεια StEM χωρίς μύκητα (Μάρτυρας). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 9: Η αποδόμηση του μυκητοκτόνου TBZ στις καλλιέργειες των διαφόρων μυκήτων που αξιολογήθηκαν καθώς και σε αντίστοιχη καλλιέργεια StEM χωρίς μύκητα (Μάρτυρας). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Ενζυμική δραστηριότητα λακκάσης δεν ανιχνεύτηκε στις καλλιέργειες του μύκητα *P. chrysosporium* όπως και αναμένονταν. Γενικότερα, η παρουσία των φυτοφαρμάκων, και κυρίως του OPP που αποδομήθηκε ταχύτατα, προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας λακκάσης στις καλλιέργειες του μύκητα *T. versicolor* ($P < 0.001$, Πίνακας 8) που ήταν εμφανής από την έναρξη της επώασης μέχρι και την 20^η ημέρα (Διάγραμμα 10). Οι υψηλότερες τιμές λακκάσης καταγράφηκαν στις καλλιέργειες του μύκητα *T. versicolor* παρουσία των φυτοφαρμάκων TBZ και OPP ($9.37 \pm 0.23 \text{ U L}^{-1}$, 20 ημέρες) και ήταν σημαντικά υψηλότερες από τις τιμές της λακκάσης που ανιχνεύτηκαν στις αντίστοιχες καλλιέργειες απουσία των μυκητοκτόνων ($7.67 \pm 1.08 \text{ U L}^{-1}$, 20 ημέρες). Στην περίπτωση του *P. ostreatus* η παρουσία των μυκητοκτόνων στην καλλιέργεια προκάλεσε συνολικά μια αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας η οποία όμως δεν ήταν σημαντική (Πίνακας 8, $P = 0.054$). Παρόλα αυτά, όπως φαίνεται και από την ύπαρξη σημαντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ χρόνου * μύκητες (Πίνακας 8) η παρουσία των μυκητοκτόνων στις καλλιέργειες του μύκητα *P. ostreatus* προκάλεσε

μια σημαντική αύξηση της λακκάσης κατά τις πρώτες ημέρες της επώασης (Διάγραμμα 10, $P < 0.05$).

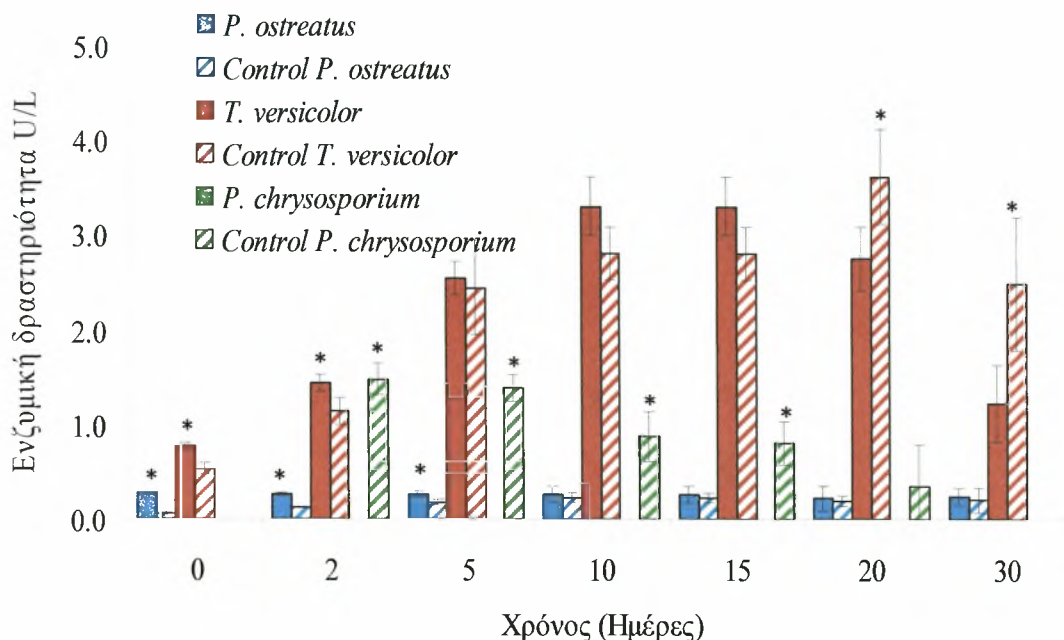


Διάγραμμα 10: Η δράση του ενζύμου λακκάση στις καλλιέργειες των μυκήτων *T. versicolor* και *P. ostreatus* παρουσία ή απουσία (control) των φυτοφαρμάκων TBZ και OPP. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + τυπική απόκλιση. Στήλες που έχουν σημειωθεί με (*) παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκριτικά με την αντίστοιχη καλλιέργεια του μύκητα με ή χωρίς φυτοφάρμακο στον ίδιο χρόνο.

Πίνακας 8: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας λακκάσης από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία των TBZ και OPP.

Παράγοντες	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. ostreatus</i>	Συνολικά
Μύκητες	<0.001	-	0.054	<0.001
Χρόνος	<0.001	-	0.009	<0.001
Μύκητες * Χρόνος	0.002	-	0.002	<0.001

Αναφορικά με την ενζυμική δραστηριότητα MnP, οι υψηλότερες τιμές παρουσία των μυκητοκτόνων καταγράφηκαν στις καλλιέργειες του μύκητα *T. versicolor* ($3.29 \pm 0.31 \text{ U L}^{-1}$). Η παρουσία των μυκητοκτόνων στις καλλιέργειες του μύκητα *T. versicolor* δεν προκάλεσε συνολικά σημαντικές μεταβολές στην MnP (Πίνακας 9, $P=0.658$). Παρόλα αυτά, η παρουσία των μυκητοκτόνων προκάλεσε σημαντική αύξηση των τιμών MnP κατά τις πρώτες δύο ημέρες της επώασης (Διάγραμμα 11) όπως επιβεβαιώνεται και από την σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ μυκήτων * χρόνου. Γενικότερα, στις καλλιέργειες αυτές παρατηρήθηκε μια σταδιακή αύξηση της δραστηριότητας MnP κατά τις πρώτες 15 ημέρες και ακολούθησε σταδιακή μείωση μέχρι την ολοκλήρωση της επώασης. Ανάλογη τάση παρατηρήθηκε κατά τις πρώτες ημέρες του πειράματος και στις καλλιέργειες του ίδιου μύκητα απουσία των μυκητοκτόνων με την διαφορά ότι οι τιμές ενζυμικής δραστηριότητας MnP ήταν χαμηλότερες συγκριτικά με τις εμπλουτισμένες με φυτοφάρμακα καλλιέργειες. Ο μύκητας *P. chrysosporium* δεν παρουσίασε ενζυμική δραστηριότητα MnP παρουσία των μυκητοκτόνων, σε αντίθεση με τις καλλιέργειες του μύκητα όπου δεν είχαν προστεθεί τα TBZ και OPP, όπου παρατηρήθηκε δραστηριότητα του ενζύμου MnP με μέγιστη τιμή $1.47 \pm 0.17 \text{ U L}^{-1}$ 2 ημέρες μετά την προσθήκη των φυτοφαρμάκων (Πίνακας 9). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ενδείξεις ότι η παρουσία των μυκητοκτόνων αναστέλλει την δράση του ενζύμου MnP τουλάχιστον στον μύκητα *P. chrysosporium*. Οι χαμηλότερες τιμές ενζυμικής δραστηριότητας MnP καταγράφηκαν στις καλλιέργειες του μύκητα *P. ostreatus* ($<0.2 \text{ U L}^{-1}$) όπου όμως η παρουσία των μυκητοκτόνων οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας MnP (Πίνακας 9, $P<0.001$), ιδιαίτερα κατά τις πρώτες 5 ημέρες της επώασης (Διάγραμμα 11).



Διάγραμμα 11: Η δράση του ενζύμου Μn-υπεροξειδάση (MnP) στις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης παρουσία ή απουσία (control) των φυτοφαρμάκων TBZ και OPP. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Στήλες που έχουν σημειωθεί με (*) παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκριτικά με την αντίστοιχη καλλιέργεια του μύκητα με ή χωρίς φυτοφάρμακο στον ίδιο χρόνο.

Πίνακας 9: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας MnP από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία OPP - TBZ.

Παράγοντες	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. ostreatus</i>	Συνολικά
Μύκητες	0.658	<0.001	<0.001	<0.001
Χρόνος	<0.001	<0.001	0.440	<0.001
Μύκητες * Χρόνος	0.031	<0.001	0.196	<0.001

Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων μετρήθηκε το ξηρό βάρος των μυκηλίων των μυκήτων στις διάφορες καλλιέργειες και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 10. Από τις παρακάτω μετρήσεις ξηρού βάρους των μυκήτων παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στην ανάπτυξη του μυκηλίου των μυκήτων *P. ostreatus*, και *A. niger* παρουσία των μυκητοκτόνων.

Πίνακας 10: Μέτρηση ξηρού βάρους των μυκήτων.

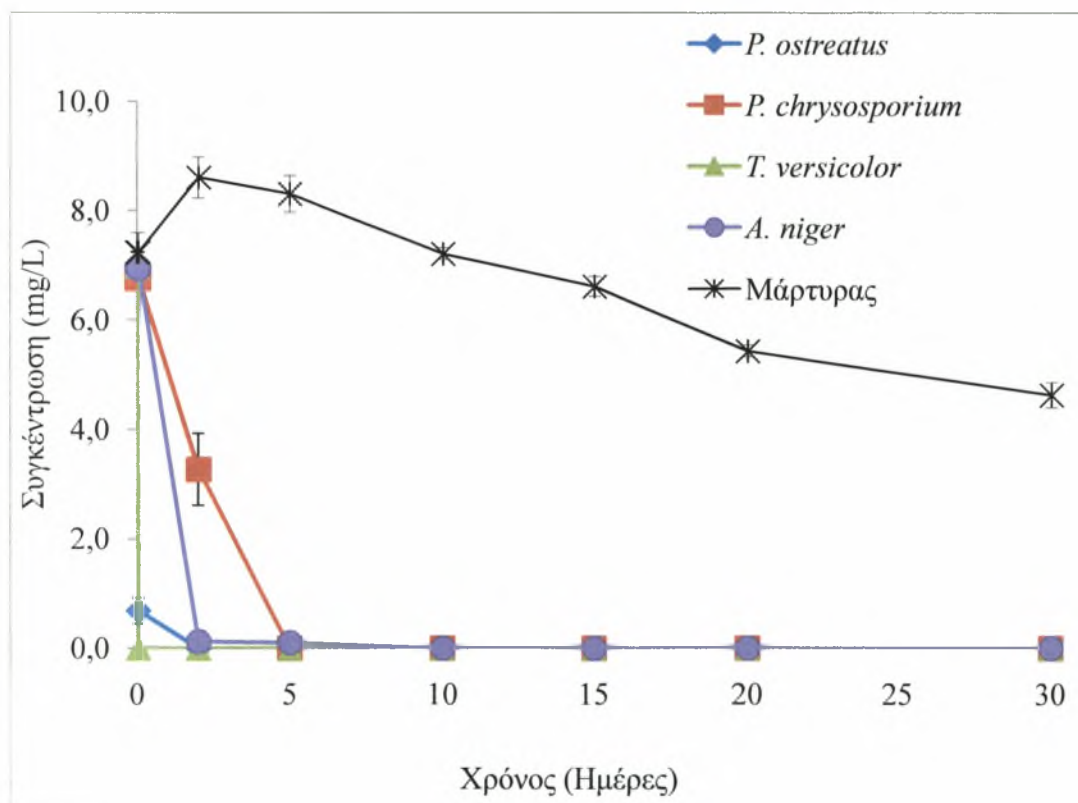
	Ξηρό βάρος (gr)
<i>P. ostreatus</i>	0.039±0.010
Control <i>P. ostreatus</i>	0.051±0.008
<i>T. versicolor</i>	0.044±0.002
Control <i>T. versicolor</i>	0.043±0.002
<i>P. chrysosporium</i>	0.047±0.007
Control <i>P. chrysosporium</i>	0.052±0.003
<i>A. niger</i>	0.046±0.004
Control <i>A. niger</i>	0.076±0.002

3.5. Diphenylamine

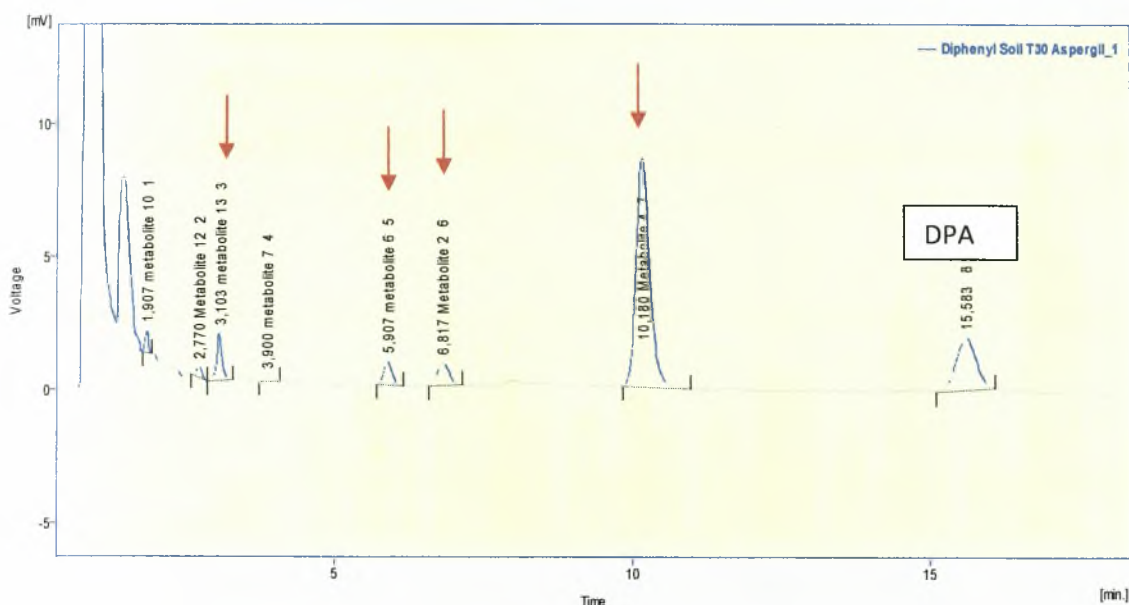
Το DPA αποδομήθηκε ταχύτατα από όλους τους μύκητες που μελετήθηκαν (Διάγραμμα 12). Συγκεκριμένα, ο μύκητας *T. versicolor* κατάφερε να αποδομήσει το 100% του μυκητοκτόνου εντός περίπου δύο ωρών. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και για τον μύκητα *P. ostreatus* όπου αποδομήθηκε το 95% της αρχική ποσότητας DPA εντός δύο ωρών. Τέλος βραδύτερη αποδόμηση σε σύγκριση με τους μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες των μυκήτων *A. niger* και *P. chrysosporium* όπου η αποδόμηση του DPA ολοκληρώθηκε σε 3 και 5 ημέρες αντίστοιχα (Διάγραμμα 12). Αντίθετα, περιορισμένη διάσπαση (<20%) του DPA παρατηρήθηκε στα δείγματα – μάρτυρες που δεν εμβολιάστηκαν με μύκητες κατά την

διάρκεια των 30 ημερών επώασης επιβεβαιώνοντας την ικανότητα των μυκήτων να διασπών το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων των υγρών καλλιεργειών των διαφόρων μυκήτων παρατηρήθηκε η εμφάνιση νέων κορυφών εκτός του DPA. Οι κορυφές αυτές δεν υπήρχαν στα αντίστοιχα δείγματα – μάρτυρες, το μέγεθος των κορυφών και κατά συνέπεια η συγκέντρωσή τους στις καλλιέργειες παρουσίασαν μεταβολές με τον χρόνο επώασης και είναι πιθανόν να ανήκουν σε προϊόντα μεταβολισμού της μητρικής ουσίας. Επιλεγμένα δείγματα έχουν ήδη αναλυθεί σε σύστημα LC-MS/MS και ως σήμερα γίνονται προσπάθειες για την ταυτοποίηση των κορυφών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα παρουσιάζεται στην Εικόνα 14 όπου είναι εμφανής η παρουσία τεσσάρων νέων κορυφών σε χρωματογράφημα από καλλιέργεια του μύκητα *A. niger* που συλλέχθηκε 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

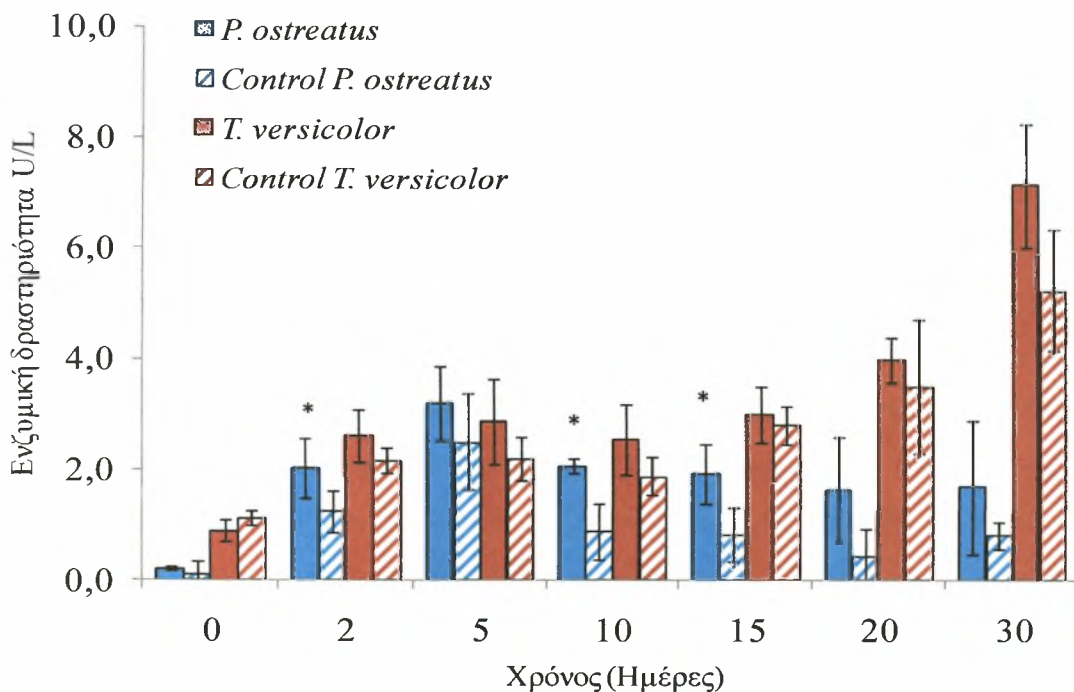


Διάγραμμα 12: Η αποδόμηση του DPA στις καλλιέργειες των διαφόρων μυκήτων που αξιολογήθηκαν καθώς και σε αντίστοιχη καλλιέργεια StEM χωρίς μύκητα (Μάρτυρας). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Εικόνα 14: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από την ανάλυση δείγματος από καλλιέργεια του μύκητα *A. niger* 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Οι κορυφές που πιθανολογείται ότι ανήκουν σε μεταβολίτες του DPA υποδεικνύονται με κόκκινα βέλη.

Ενζυμική δραστηριότητα λακκάσης δεν καταγράφηκε σε καμία από τις καλλιέργειες του μύκητα *P. chrysosporium* σε αντίθεση με τους μύκητες *P. ostreatus* και *T. versicolor* στις καλλιέργειες των οποίων ανιχνεύθηκε ενζυμική δραστηριότητα λακκάσης (Διάγραμμα 13). Γενικότερα, η παρουσία του DPA φαίνεται να προκάλεσε συνολικά σημαντικές μεταβολές στην ενζυμική δραστηριότητα λακκάσης στις καλλιέργειες των *P. ostreatus* και *T. versicolor* ($P < 0.001$, Πίνακας 11).

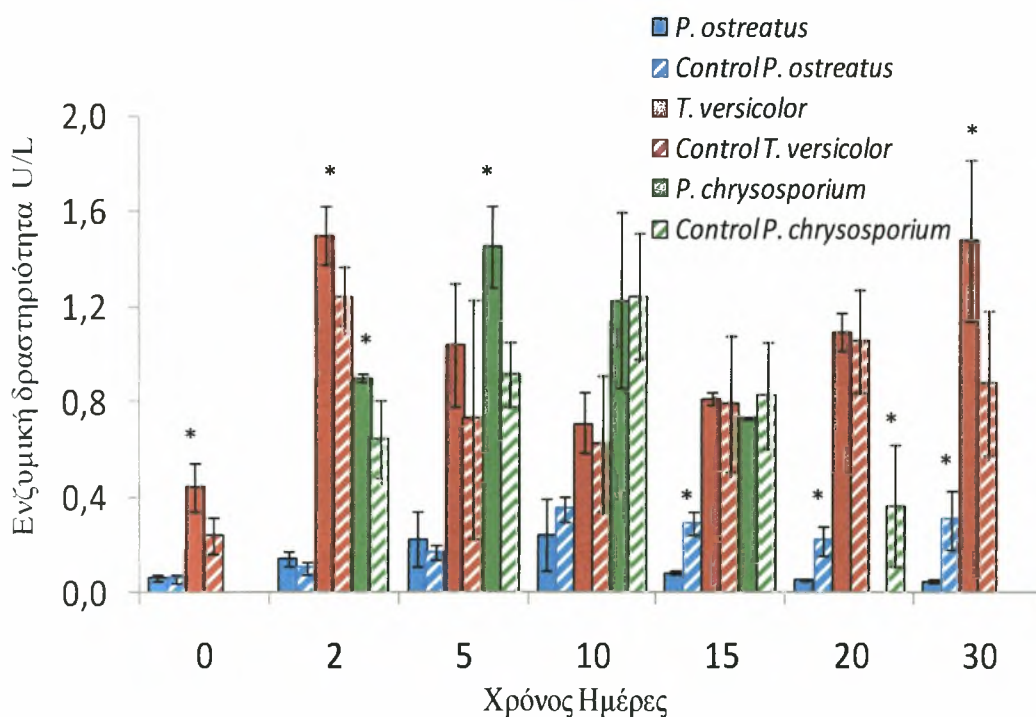


Διάγραμμα 13: Η δράση του ενζύμου λακκάση στις καλλιέργειες των μυκήτων *T. versicolor* και *P. ostreatus* παρουσία ή απουσία (control) του DPA. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Στήλες που έχουν σημειωθεί με (*) παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκριτικά με την αντίστοιχη καλλιέργεια του μύκητα με ή χωρίς φυτοφάρμακο στον ίδιο χρόνο.

Πίνακας 11: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας λακκάσης από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία του DPA.

Παράγοντες	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. ostreatus</i>	Συνολικά
Μύκητες	0.001	-	<0.001	<0.001
Χρόνος	<0.001	-	<0.001	<0.001
Μύκητες * Χρόνος	0.055	-	0.529	<0.001

Η παρουσία DPA στις καλλιέργειες του μύκητα *T. versicolor* προκάλεσε συνολικά μια σημαντική αύξηση στην ενζυμική δραστηριότητα MnP (Πίνακας 12, $P<0.001$). Ο μύκητας *T. versicolor* παρουσίασε το μέγιστο τις τιμές της ενζυμικής δραστηριότητας MnP στις 2 ημέρες της επώασης όπου οι τιμές ενζυμικής δραστηριότητας ήταν σημαντικά υψηλότερες παρουσία παρά απουσία DPA (1.5 και 1.3 U/L, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 14). Οι χαμηλότερες τιμές ενζυμικής δραστηριότητας MnP παρατηρήθηκαν στις καλλιέργειες του μύκητα *P. ostreatus* ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία DPA. Οι τιμές MnP στις καλλιέργειες του μύκητα *P. ostreatus* παρουσία DPA παρουσίασαν μια σημαντική μείωση ($P<0.05$) προς το τέλος της επώασης σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απουσία DPA (Διάγραμμα 14). Τέλος, η παρουσία DPA στις καλλιέργειες του μύκητα *P. chrysosporium* δεν φαίνεται να είχε συνολικά σημαντική επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα MnP (Πίνακας 12, $P=0.325$). Παρόλα αυτά, η παρουσία DPA στις καλλιέργειες αυτού του μύκητα προκάλεσε σημαντική αύξηση της MnP κατά τις πρώτες 5 ημέρες της επώασης (Διάγραμμα 14, $P<0.05$), κάτι που επιβεβαιώνεται και από την εμφάνιση σημαντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ χρόνου και μυκήτων (Πίνακας 12, $P<0.001$).



Διάγραμμα 14: Η δράση του ενζύμου MnP-υπεροξειδάση (MnP) στις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης παρουσία ή απουσία (control) του φυτοφαρμάκου DPA. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Στήλες που

έχουν σημανθεί με (*) παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκριτικά με την αντίστοιχη καλλιέργεια του μύκητα με ή χωρίς φυτοφάρμακο στον ίδιο χρόνο.

Πίνακας 12: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας MnP από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία του DPA

Παράγοντες	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. ostreatus</i>	Συνολικά
Μύκητες	<0.001	0.325	<0.001	<0.001
Χρόνος	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Μύκητες * Χρόνος	0.074	<0.001	<0.001	<0.001

Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων μετρήθηκε το ξηρό βάρος των μυκηλίων των μυκήτων στις διάφορες καλλιέργειες και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 13. Οι μύκητες *P. chrysosporium* και *A. niger* παρουσίασαν μικρότερη ανάπτυξη παρουσία του DPA σε σχέση με τις καλλιέργειες που δεν περιείχαν DPA.

Πίνακας 13: Μέτρηση ξηρού βάρους των μυκήτων

	Ξηρό βάρος (gr)
<i>P. ostreatus</i>	0.054±0.004
Control <i>P. ostreatus</i>	0.051±0.008
<i>T. versicolor</i>	0.043±0.005
Control <i>T. versicolor</i>	0.043±0.002
<i>P. chrysosporium</i>	0.043±0.003
Control <i>P. chrysosporium</i>	0.052±0.003
<i>A. niger</i>	0.068±0.005
Control <i>A. niger</i>	0.076±0.002

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Συζήτηση

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε συγκριτική αξιολόγηση τριών επιλεγμένων στελεχών μυκήτων λευκής σήψεως, *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *T. versicolor* και του ασκομύκητα *A. niger*, αποσκοπώντας στην επιλογή των καταλληλότερων για την αποτελεσματικότερη διαχείριση και αποδόμηση των φυτοφαρμάκων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα των βιομηχανιών μετασυλλεκτικής μεταχείρισης φρούτων. Η αξιολόγηση βασίστηκε κυρίως στην αποδόμηση των φυτοφαρμάκων chlorpyrifos, imazalil, TBZ, OPP και DPA από τους παραπάνω μύκητες με χρωματογραφική ανάλυση σε HPLC-UV. Παράλληλα, μελετήθηκε η δράση των παραγόμενων από τους μύκητες λευκής σήψεως ένζυμων λακκάση, υπεροξειδάση, Mn-υπεροξειδάση, λιγνίνη υπεροξειδάση και οξειδάση της βερατριλικής αλκοόλης για να διερευνήσουμε την ύπαρξη πιθανής συσχέτισης μεταξύ αποδόμησης των φυτοφαρμάκων και ενζυμικής δραστηριότητας.

Στην παρούσα μελέτη όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των μυκήτων το εκχύλισμα αχύρου. Παράλληλα με αυτή τη μελέτη, στο ίδιο εργαστήριο, η φοιτήτρια Erasmus Chiara Perruchon από το University of Pavia της Ιταλίας, μελέτησε την αποδόμηση των ίδιων φυτοφαρμάκων με τους ίδιους μύκητες σε θρεπτικό υπόστρωμα εκχύλισμα εδάφους (SEM). Τα δυο αυτά υποστρώματα επιλέχθηκαν για το λόγο ότι θέλαμε να μελετήσουμε την αποδομητική ικανότητα των επιλεγμένων μυκήτων σε θρεπτικά υποστρώματα όσο το δυνατό παρόμοια με το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται οι μύκητες στο φυσικό τους περιβάλλον. Επίσης, τα συγκριτικά αποτελέσματα των δύο μελετών οδήγησαν σε ασφαλή συμπεράσματα για το βέλτιστο φυσικό υπόστρωμα ανάπτυξης των μυκήτων (άχυρο ή έδαφος) και τον ικανότερο αποδομητικό μύκητα για την χρήση τους σε συστήματα βιοφίλτρων. Συγκεκριμένα, η επιλογή του SEM έγινε για τον μύκητα *A. niger* καθώς ο συγκεκριμένος είναι μύκητας εδάφους και το StEM για τους τρεις μύκητες λευκής σήψης που προτιμούν υποστρώματα πλούσια σε λιγνίνη και φτωχά σε άζωτο όπως το άχυρο. Ο μύκητας *A. niger* συμπεριλήφθηκε

στην μελέτη μας για το λόγο ότι παρουσιάζει αυξημένη αποδομητική ικανότητα για πλήθος οργανικών ρυπαντών (Liu *et al.*, 2001, Qing *et al.*, 2003, Liang *et al.*, 2005). Στην περίπτωση των βασιδιομυκήτων, η επιλογή του *P. chrysosporium* έγινε για το λόγο ότι είναι ένα πολύ καλά μελετημένο στέλεχος-μοντέλο στην αποδόμηση ρύπων (Fratila-Arachitei *et al.*, 1999, Castillo *et al.*, 2000), ενώ οι μύκητες *P. ostreatus* και *T. versicolor* είναι επίσης πολύ καλά μελετημένα στελέχη μυκήτων λευκής σήψης με σημαντικές αποδομητικές ικανότητες έναντι πλήθους οργανικών ρύπων (Eggen 1999, Hundt *et al.*, 1999, Fragoeiro and Magan 2005).

4.1.1. *Chlorpyrifos*

Το chlorpyrifos είναι οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο που χρησιμοποιείται συχνά σε δενδρώδεις καλλιέργειες ακόμα και πολύ κοντά σε περιόδους συγκομιδής, με αποτέλεσμα υπολείμματα του να ανιχνεύονται με υψηλή συχνότητα και αρκετές φορές σε υψηλές συγκεντρώσεις στα υγρά απόβλητα των μετασυλλεκτικών χειρισμών. Στην παρούσα μελέτη οι μύκητες κατάφεραν να αποδομήσουν σε σημαντικό βαθμό το chlorpyrifos (>70% της αρχικής συγκέντρωσης) με τελική παραγωγή του μεταβολίτη TCP. Η ταχύτερη διάσπαση του chlorpyrifos παρατηρήθηκε από τον μύκητα *T. versicolor* με παράλληλη βραδεία συσσώρευση TCP. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πιθανότατα την ύπαρξη ενός διαφορετικού μεταβολικού μονοπατιού αποδόμησης του chlorpyrifos, την ύπαρξη δηλαδή ενός ενδιάμεσου μεταβολίτη, ο οποίος δεν ανιχνεύτηκε στην παρούσα εργασία, και την σταδιακή υδρόλυση αυτού προς παραγωγή TCP. Προηγούμενες μελέτες με τον εντόμοκτόνο chlorpyrifos και μύκητες λευκής σήψης έδειξαν περιορισμένη ανοργανοποίηση (27.5%) του συγκεκριμένου εντομοκτόνου από τον μύκητα *P. chrysosporium* σε υπόστρωμα φτωχό σε N (Bumpus *et al.*, 1993). Η υδρόλυση του chlorpyrifos προς TCP αποτελεί το πιο σύνθετο μεταβολικό μονοπάτι που απαντάται σε βακτήρια. Έτσι, έχουν απομονωθεί διάφορα βακτήρια εδάφους που έχουν την ικανότητα να υδρολύουν το chlorpyrifos εντός 24-48 h με παράλληλη παραγωγή TCP (Yang *et al.*, 2006, Lakshmi *et al.*, 2008). Επίσης, μελέτες αναφέρουν ότι πέραν του TCP υπάρχουν και άλλοι μεταβολίτες που έχουν ανιχνευθεί σε διάφορες μελέτες σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, όπως τα chlorpyrifos oxon, desethyl chlorpyrifos, desethyl chlorpyrifos oxon 3,5,6-trichloro-2 methoxyrimidine (Bicker *et al.*, 2005: Blasco *et al.*, 2008). Οι παραπάνω μεταβολίτες πιθανόν να σχηματίστηκαν κατά την

διάρκεια και των δικών μας πειραμάτων διάσπασης καθώς άγνωστες κορυφές παρατηρήθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος στα χρωματογραφήματα από τις καλλιέργειες των μυκήτων χωρίς όμως να είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν επί του παρόντος.

Όσον αφορά την ενζυμική δραστηριότητα, η παρουσία του *chloryrifos* στις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης δεν οδήγησε σε αυξημένη δραστηριότητα των λιγνολυτικών ενζύμων λακκάση και MnP. Έτσι στην περίπτωση των μυκήτων *T. versicolor* και *P. ostreatus* παρατηρήθηκε μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου λακκάση παρουσία *chloryrifos* παρά την αποτελεσματική αποδόμηση του εντομοκτόνου, ενώ στην περίπτωση της δράσης του ενζύμου MnP μόνο ο μύκητας *T. versicolor* παρουσίασε θετική συσχέτιση στην αποδόμηση του φυτοφαρμάκου και την δράση του ενζύμου. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα ένζυμα που μελετήθηκαν, λακκάση και MnP, δεν φαίνεται να εμπλέκονται στην διάσπαση του φυτοφαρμάκου *chloryrifos*. Είναι λοιπόν πιθανόν άλλα ενζυμικά συστήματα των μυκήτων λευκής σήψης να εμπλέκονται στην διάσπαση του *chloryrifos* τα οποία όμως δεν αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες όπου η αποδόμηση φυτοφαρμάκων όπως *atrazine* και *terbuthylazine* (Mougin *et al.*, 1997), *lindane* (Mougin *et al.*, 1996), *endosulfan* (Kullman *et al.*, 1996), *nitrofen* (Hiratsuka *et al.*, 2001) από τους μύκητες λευκής σήψης ήταν αποτελεσματική χωρίς να υπάρξει συσχέτιση με τα λιγνολυτικά ενζυμικά συστήματα των μυκήτων αυτών. Οι ίδιες μελέτες έδειξαν την ύπαρξη άλλων ενζυμικών συστημάτων όπως P-450 κυτοχρωμικές οξειδάσες (Hiratsuka *et al.*, 2001), β-γλυκοσιδάσες (Fragoeiro and Magan, 2005) που πιθανότατα να συμμετέχουν ενεργά στην διάσπαση των φυτοφαρμάκων.

4.1.2. *Imazalil*

Η χρήση του *imazalil* στην βιομηχανία επεξεργασίας φρούτων είναι πολύ συχνή και για το λόγο αυτό είναι ένα από τα μυκητοκτόνα, που ανιχνεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα υγρά απόβλητα των βιομηχανιών αυτών. Οι μύκητες λευκής σήψης που μελετήθηκαν σε υπόστρωμα εκχυλίσματος αχύρου αποδόμησαν πλήρως το *imazalil* σε διάστημα 10 ημερών σε αντίθεση με την περιορισμένη

διάσπαση του μυκητοκτόνου από τον μύκητα, *A. niger*. Ελάχιστη αβιοτική διάσπαση του imazalil παρατηρήθηκε κατά την διάρκεια της επώασης επιβεβαιώνοντας την μικροβιακή προέλευση της διάσπασης του μυκητοκτόνου στις καλλιέργειες των μυκήτων. Αντίθετα, σε παράλληλες μελέτες με τους ίδιους μύκητες και το imazalil σε υπόστρωμα εκχυλίσματος εδάφους που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας από την φοιτήτρια Chiara Pettuchon, οι ίδιοι μύκητες δεν κατάφεραν να αποδομήσουν το μυκητοκτόνο. Η μειωμένη αποδομητική ικανότητα των μυκήτων λευκής σήψης στο υπόστρωμα εκχυλίσματος εδάφους σε σχέση με το υπόστρωμα εκχυλίσματος αχύρου ήταν αναμενόμενη καθώς το άχυρο αποτελεί το φυσικό περιβαλλοντικό υπόστρωμα ανάπτυξης των σαπροφυτικών λιγνολυτικών μυκήτων (Reddy and D' Souza, 1994). Παρόλα αυτά προηγούμενες μελέτες με τους μύκητες *P. chrysosporium* και *T. versicolor* σε υπόστρωμα ανάλογο του SEM έδειξαν αυξημένη αποδομητική δράση για μίγματα φυτοφαρμάκων χωρίς όμως να υπάρξει συσχέτιση μεταξύ λιγνολυτικών ενζύμων και διάσπασης (Fragoieiro and Magan, 2005) Από την άλλη μεριά, η περιορισμένη αποδομητική ικανότητα του εδαφογενή μύκητα *A. niger* στο εκχύλισμα αχύρου ήταν αναμενόμενη καθώς το συγκεκριμένο υπόστρωμα δεν αποτελεί φυσικό υπόστρωμα για τον μύκητα *A. niger* που προτιμά πλούσια θρεπτικά υποστρώματα για την διάσπαση φυτοφαρμάκων (Torra – Reventos *et al.*, 2004, Bhalerao and Puranik, 2007).

Κατά την μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας στις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ της ενζυμικής δραστηριότητας, λακκάσης και MnP, και της αποδόμησης του φυτοφαρμάκου. Τα παραπάνω αποτελέσματα παραπέμπουν στην εμπλοκή άλλων ενζυμικών συστημάτων, εκτός των λιγνολυτικών ενζύμων, στην διάσπαση του imazalil (Hiratsuka *et al.*, 2001, Fragoieiro and Magan 2005).

4.1.3. Thiabendazole και ortho-phenylphenol

Τα TBZ και OPP είναι δυο μυκητοκτόνα, που πολύ συχνά χρησιμοποιούνται στους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς των φρούτων. Κατά την πειραματική διαδικασία τα δυο αυτά μυκητοκτόνα προστέθηκαν μαζί στις καλλιέργειες των μυκήτων, για το λόγο ότι και στην πράξη χρησιμοποιούνται σε σκευάσματα που περιέχουν και τις δυο δραστικές ουσίες. Οι μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* κατάφεραν να

διασπάσουν ταχύτατα και πλήρως το OPP σε διάστημα δύο ημερών. Ο μύκητας *P. chrysosporium* αποδόμησε σχεδόν πλήρως το OPP με σημαντικά βραδύτερο ρυθμό ενώ ο *A. niger* δεν παρουσίασε σημαντική αποδομητική ικανότητα ως προς το OPP. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα στην αποδόμηση του OPP όταν οι μύκητες καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα SEM (Chiara Perucchon Thesis 2009), αλλά με εμφανώς βραδύτερους ρυθμούς διάσπασης, επιβεβαιώνοντας για μια ακόμη φορά ότι το υπόστρωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των φυτοφαρμάκων από τους μύκητες λευκής σήψης.

Σε αντίθεση με την ταχύτατη διάσπαση του OPP, το μυκητοκτόνο TBZ δεν αποδομήθηκε από κανένα από τους μύκητες που μελετήθηκαν. Αντιθέτως, στις τελευταίες χρονικά δειγματοληψίες των 20 και 30 ημερών παρατηρήθηκε μια αύξηση της συγκέντρωσης του TBZ. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε μόνο στις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης *T. versicolor*, *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* και όχι στις καλλιέργειες του *A. niger* και του αβιοτικού μάρτυρα που δεν ήταν εμβολιασμένες με μύκητες. Η αύξηση της συγκέντρωσης του TBZ στις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης δεν ήταν αναμενόμενη και μπορεί να αποδοθεί στην εμφάνιση κάποιου προϊόντος μεταβολισμού το οποίο δεν μπορεί να διαχωριστεί από τα μητρικό προϊόν στις παρούσες χρωματογραφικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, ο κύριος μεταβολίτης του TBZ είναι το 5-hydroxythiabendazole (5-OH TBZ) που παράγεται ύστερα από υδροξυλίωση του 5 άκρου του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο ανιχνευτής UV στα συστήματα υγρής χρωματογραφίας παρουσιάζει διπλάσια ευαισθησία για το 5-OH TBZ σε σχέση με την μητρική ουσία TBZ (Cannavan *et al.*, 1998). Έτσι με τις δικές μας χρωματογραφικές συνθήκες (HPLC-UV) δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός του 5-OH-TBZ από το μητρικό μόριο. Άρα είναι πιθανόν η σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του TBZ στις καλλιέργειες των μυκήτων να οφείλεται στην μετατροπή του σε 5-OH-TBZ. Περαιτέρω μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη για να διερευνηθούν περαιτέρω το παραπάνω πειραματικό εύρημα.

Μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας στις καλλιέργειες των μυκήτων παρουσία TBZ/OPP, έδειξαν ότι η ταχύτατη αποδόμηση του OPP συνοδεύτηκε από αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων λακκάση και MnP από τους μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* ιδιαίτερα κατά τα πρώτα στάδια της επώασης (0 ως 5 ημέρες) που ήταν και το χρονικό διάστημα ταχύτατης αποδόμησης του OPP.

Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τους ίδιους μύκητες και μυκητοκτόνα όταν αυτά μελετήθηκαν σε υπόστρωμα ανάπτυξης SEM (C. Perucchon, Thesis 2009). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα λιγνολυτικά ένζυμα των μυκήτων *T. versicolor* και *P. ostreatus* εμπλέκονται στην διάσπαση του φαινολικού μυκητοκτόνου OPP. Χαρακτηριστικό είναι ότι δεν παρατηρήθηκε καθόλου δράση του ενζύμου MnP από το μύκητα *P. chrysosporium* παρουσία των μυκητοκτόνων. Είναι πιθανόν η παρουσία του μυκητοκτόνου TBZ, αφού το OPP αποδομήθηκε σε μεγάλο ποσοστό, να παρουσίασε ανασχετική δράση στην παραγωγή των λιγνολυτικών ενζύμων από τον συγκεκριμένο μύκητα.

4.1.4. *Diphenylamine*

Το DPA χρησιμοποιείται κυρίως ως συντηρητικό στη μετασυλλεκτική μεταχείριση των μηλοειδών για την αντιμετώπιση της επιφανειακής νέκρωσης και της καστανόχρωσης της επιδερμίδας των καρπών. Έτσι, είναι συχνή η εμφάνιση υψηλών συγκεντρώσεων DPA στα υγρά απόβλητα των μετασυλλεκτικών βιομηχανιών. Το DPA αποδομήθηκε ταχύτατα και πλήρως από όλους τους μύκητες που μελετήθηκαν με ταχείς ρυθμούς. Έτσι οι μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* αποδόμησαν πλήρως το DPA εντός 2 ωρών. Θα πρέπει να τονιστεί ότι όπως και για τα άλλα μυκητοκτόνα, οι μύκητες είχαν ήδη εμβολιαστεί στο υπόστρωμα τρεις ημέρες πριν την προσθήκη του DPA κάτι που πιθανότατα βοήθησε αυτή την ταχύτατη αποδόμηση του DPA. Οι μύκητες *A. niger* και *P. chrysosporium* αποδόμησαν πλήρως το DPA σε διάστημα 3 και 5 ημερών αντίστοιχα. Αντίθετα, στην αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε SEM (Chiara Perucchon Thesis 2009) η αποδόμηση του DPA από τους μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* ολοκληρώθηκε σε διάστημα 5 ημερών, ενώ οι άλλοι δυο μύκητες κατάφεραν να αποδομήσουν > 90% του DPA με την ολοκλήρωση της επώασης.

Η πολύ γρήγορη διάσπαση του DPA από τους μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* δεν συνοδεύτηκε από ιδιαίτερα αυξημένη δραστηριότητα λακκάσης. Αντίθετα, η διάσπαση του DPA από τους μύκητες *T. versicolor* και *P. chrysosporium* συνοδεύτηκε από αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της MnP. Αξιοσημείωτο είναι ότι στην παράλληλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα SEM οι μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* παρουσίασαν μια ενεργοποίηση της ενζυμικής

δραστηριότητας των ενζύμων λακκάση και MnP κατά τα πρώτα στάδια της επώασης όπου και παρατηρήθηκε ταχύτατη διάσπαση του OPP. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα λιγνολυτικά ένζυμα λακκάση και MnP φαίνονται να εμπλέκονται στην αποδόμηση του φαινολικού συντηρητικού-μυκητοκτόνου DPA όταν οι μύκητες καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα SEM, ενώ κάτι τέτοιο φαίνεται να ισχύει μόνο για την MnP και τους μύκητες *P. chrysosporium* και *T. versicolor* σε υπόστρωμα StEM.

Ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου λιγνίνης υπεροξειδάση δεν ανιχνεύθηκε σε καμία από τις μεταχειρίσεις του πειράματος και ιδιαίτερα στις καλλιέργειες του *P. chrysosporium* που είναι γνωστό ότι παράγει (Kirk *et al.*, 1978, Leisola *et al.*, 1985, Reddy and D'Souza 1994). Προσπάθειες για βελτιστοποίηση της μεθόδου με καθαρό ένζυμο LiP δεν οδήγησαν σε ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας LiP. Παλιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η δράση της LiP μπορεί να μην είναι δυνατό να προσδιοριστεί με τη μέθοδο της βερατρυλικής αλκοολής την οποία και χρησιμοποιήσαμε, λόγω παρεμβολής φυσικών φαινολικών συστατικών που συνεχυλίζονται σε υποστρώματα όπως StEM, SEM και δρουν ως υπόστρωμα για την LiP, οξειδώνονται αυτά αντί της βερατρυλικής αλκοολής και παρεμποδίζουν την ανίχνευση (Castillo *et al.*, 1997).

4.2. Συμπεράσματα

Έχοντας λάβει υπόψη όλα τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, μπορούμε να καταλήξουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Ο μύκητας *T. versicolor* ήταν ο πιο αποτελεσματικός αποδομητής των φυτοφαρμάκων της παρούσας μελέτης, με ικανότητα να αποδομεί πλήρως τα imazalil, *ortho*-phenylphenol, diphenylamine και σε ποσοστό >90% το chlorpyrifos
- Ο μύκητας *P. ostreatus* ήταν ο δεύτερος ικανότερος μύκητας της μελέτης καταφέροντας με ελαφρώς βραδύτερο ρυθμό την πλήρη αποδόμηση των imazalil, *ortho*-phenylphenol, diphenylamine και σε σημαντικό ποσοστό του chlorpyrifos.

- Ο μύκητας *P. chrysosporium* ήταν ο λιγότερο αποτελεσματικός αποδομητής μεταξύ των μυκήτων λευκής σήψης, παρόλο την γενική αντίληψη ότι αποτελεί ικανό αποδομητή ξενοβιοτικών ενώσεων.
- Ο μύκητας *A. niger* παρουσίασε την χαμηλότερη αποδομητική ικανότητα μεταξύ των μυκήτων της μελέτης, αφού μπόρεσε να αποδομήσει μόνο μερικώς μόνο τα φυτοφάρμακα chlorpyrifos, *ortho*-phenylphenol και diphenylamine.
- Σε γενικές γραμμές παρατηρήθηκε μια μερική συσχέτιση μεταξύ της δράσης των λιγνολυτικών ενζύμων των μυκήτων λευκής σήψης και της διάσπασης των φυτοφαρμάκων που δοκιμάστηκαν. Μοναδική περίπτωση αποτέλεσε το OPP και σε μικρότερο βαθμό το DPA, ενώ για την περίπτωση του chlorpyrifos μόνο από το μύκητα *T. versicolor* παρατηρήθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ της αποδόμησης και της δράσης των λιγνολυτικών ενζύμων.
- Παρατηρήθηκε μια ασθενής συσχέτιση μεταξύ χημικής δομής των φυτοφαρμάκων και εμπλοκής των λιγνολυτικών ενζύμων στην διάσπαση τους. Τα λιγνολυτικά ένζυμα MnP και λακκάση φαίνεται να εμπλέκονται στην διάσπαση των φαινολικών μυκητοκτόνων DPA, OPP ενώ αντίθετα δεν φαίνεται να συμμετέχουν στην διάσπαση μη-φαινολικών φυτοφαρμάκων όπως τα chlorpyrifos, imazalil που κατέχουν ετεροκυκλικούς δακτυλίους με N. Ανάλογη και περισσότερο ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ διάσπασης – λιγνολυτικών ενζύμων – χημικής δομής φυτοφαρμάκων καταγράφηκαν όταν τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε υγρό υπόστρωμα εκχυλίσματος εδάφους (Chiara Perruchon, Thesis 2009)

4.3. Συγκριτικά συμπεράσματα

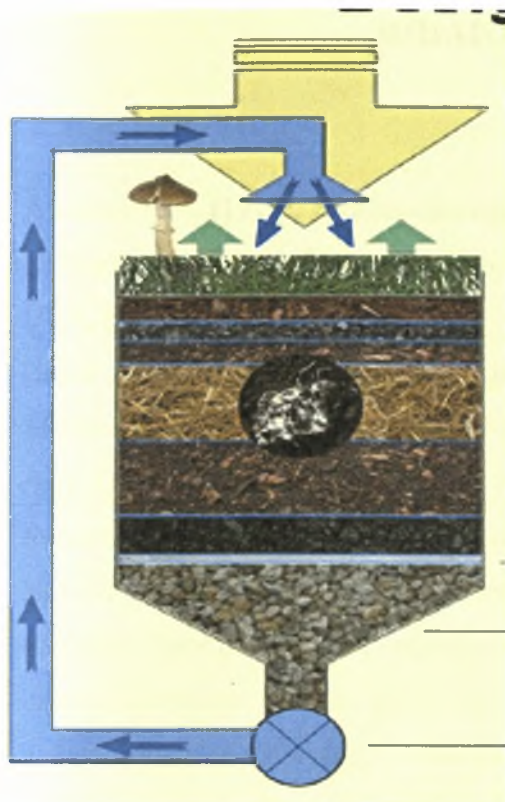
Ο σκοπός της μελέτης αυτής, και της παράλληλης μελέτης που έγινε από την Chiara Perruchon, ήταν η επιλογή του περισσότερο αποτελεσματικού μύκητα και του καταλληλότερου υποστρώματος ανάπτυξης για την δημιουργία και κατασκευή βιοφίλτρων μεγαλύτερης κλίμακας, για την αποτελεσματική επεξεργασία και αποτοξικοποίηση των υγρών αποβλήτων της μεταποιητικής αγροτικής βιομηχανίας

που παρουσιάζουν υψηλή επιβάρυνση σε μυκητοκτόνα. Έτσι, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο μελετών μπορούμε να συμπεράνουμε ότι:

- Η αποδόμηση των φυτοφαρμάκων από τους μύκητες ήταν πιο αποδοτική στο υπόστρωμα StEM απ' ό τι στο SEM.
- Οι μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* ήταν οι πιο αποτελεσματικοί στην αποδόμηση των φυτοφαρμάκων που εξετάστηκαν

4.4. Μελλοντική εργασία

Σύμφωνα, με τα παραπάνω, οι μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* θα χρησιμοποιηθούν σε υπόστρωμα ανάπτυξης άχυρου για την περαιτέρω διερεύνηση της δράσης τους σε συστήματα βιοφίλτρων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15. Τα βιοφίλτρα θα αποτελούνται από ένα στρώμα άχυρου που θα έχει εμβολιαστεί και αποικιστεί επαρκώς με μυκήλιο των *T. versicolor* ή *P. ostreatus*. Επάνω και κάτω του στρώματος του άχυρου, θα υπάρχουν στρώσεις εδάφους:άμμου που θα προσφέρουν τον απαραίτητο αερισμό και πορώδες. Τα υγρά απόβλητα μετασυλλεκτικών βιομηχανιών επεξεργασίας φρούτων, που θα περιέχουν κυρίως τα φυτοφάρμακα της μελέτης, θα διοχετεύονται στα βιοφίλτρα. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η χρήση του μύκητα *P. ostreatus* αποτελεί ιδανική επιλογή λόγω της διαθεσιμότητας έτοιμου υποστρώματος εμβολιασμένου με τον συγκεκριμένο μύκητα που προκύπτει ως παραπροϊόν από την καλλιέργεια μανιταριών και μάλιστα σε μηδενικό κόστος.



Υγρά απόβλητα από μετασυλλεκτικούς χειρισμούς φρούτων.

Στρώμα άχυρου εμβολιασμένο με τους *T. versicolor* ή *P. ostreatus*.

Ανακύκλωση των επεξεργασμένων αποβλήτων.

Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση ενός βιοφίλτρου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alexander M. (1999). Bioremediation Technologies: *In situ* and solid phase. In: *Biodegradation and Bioremediation*, second ed. Academic Press, New York, USA. p. 349.
2. Baker S. (2006). *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. *Medical Mycology September*, **44**, 17-21.
3. Barr D.P. and Aust S.D. (1994). Pollutant degradation by white rot fungi. *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, **138**, 49-72.
4. Bazalel L., Hadar Y., Fu P.P., Freeman P.J. and Cerniglia E.C. (1996). Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology*, 2554–2559.
5. Bending G.D., Friloux M. and Walker A. (2002). Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, **212**, 59-63.
6. Bennett E.M. and Bryant C. (1984). *Mol. Biochem. Parasitol.*, **10**, 335.
7. Bennett J.W., Connick W.J., Daigle D. and Wunch K. (2001), Formulation of fungi for *in situ* bioremediation. In: *Fungi in Bioremediation*. Gadd M.G. (ed.), Cambridge University Press, 97-112.
8. Bhalerao T.S. and Puranik P.R. (2007). Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **59**, 315-321.
9. Bicker W., Lammerhofer M. and Lindner W. (2005). Determination of chlorpyrifos metabolites in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **822**, 160–169.
10. Blasco C., Font G. and Pico Y. (2008). Solid-phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry applied to the analysis of insecticides in honey. *Food Additives and Contaminants*, **25**, 59–69.
11. Boutron O., Gouy V., Touze-Foltz N., Benoit P., Chovelon M.J. and Margouma C. (2009). Geotextile fibres retention properties to prevent surface water nonpoint

- contamination by pesticides in agricultural areas. *Geotextiles and Geomembranes*, **27**, 254–261.
12. Bumpus J.A., Kakar S.N. and Coleman R.D. (1993). Fungal degradation of organophosphorus insecticides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **39**, 715-726.
 13. Cannavan A., Haggan A.S. and Kennedy D.G. (1998). Simultaneous determination of thiabendazole and its major metabolite, 5-hydroxythiabendazole, in bovine tissues using gradient liquid chromatography with thermospray and atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **718**, 103–113.
 14. Candela L., Wallis J.K. and Mateos M.R. (2008). Non-point pollution of groundwater from agricultural activities in Mediterranean Spain: the Balearic Islands case study. *Environmental Geology*, **54**, 587–595.
 15. Castillo M.P., Ander P., Stenstrom J. and Torstensson L., (2000). Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in two solid substrate fermentation systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**, 289-295.
 16. Castillo M.P., Ander P. and Stenstrom J. (1997). Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations. *Biotechnol. Tech.*, **11**, 701-706.
 17. Chu B.L., Guo B.Y., Peng Z., Wang Z., Guo G. and Lin J.M. (2007). Studies on degradation of imazalil enantiomers in soil using capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **30**, 923 – 929.
 18. Cnubben N, Elliott G.R., Hakkert B.C., Meuling W.J. and van de Sandt J.J. (2002). Comparative *in Vitro–in Vivo* Percutaneous Penetration of the Fungicide *ortho*-Phenylphenol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **35**, 198–208.
 19. Crestini, C., Jurasek, L., and Argyropoulos D.S. (2003). On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. *Chemical European Journal* **9**, 5371-5378.
 20. Danaher M., De Ruyckb H., Crooks S.R.H., Dowling G. and O’Keeffe M. (2007). Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, **845**, 1–37.
 21. De Wilde T., Spanoghe P., Debaer P., Ryckeboer J., Springael D. and Jaeken P. (2007). Review: Overview of on-farm bioremediation systems to reduce the

- occurrence of point source contamination. *Pest Management Science* **63**, 111–128.
22. Drzyzga O. and Blotevogel K.H. (1997). Microbial degradation of Diphenylamine under anoxic conditions. *Current microbiology*, **35**, 343–347.
 23. Drzyzga O., Janssen S. and Blotevogel K.H. (1995). Toxicity of Diphenylamine and some of its nitrated and aminated derivatives to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Ecotoxicology and environmental safety*, **31**, 149-152.
 24. Dua M., Singh A., Sethunathan N. and Johri K.A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**,143–152.
 25. Duirk S. and Collette T.W. (2006). Degradation of Chlorpyrifos in aqueous chlorine solutions: Pathways, Kinetics, and Modeling. *Environmental Science & Technology*, **40**, 546-551.
 26. Echols R.K, Brumbaugh W.G., Orazio C.E., May T.W., Poulton B.C. and Peterman P.H. (2008). Distribution of Pesticides, PAHs, PCBs, and Bioavailable Metals in Depositional Sediments of the Lower Missouri River, USA. *Archiv Environmental Contaminante Toxicology*, **55**, 161–172.
 27. Eggen T. (1999). Application of fungal substrate from commercial mushroom production *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of creosote contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **44**, 117-126.
 28. Fernando T. and Aust S.D. (1994). Biodegradation of toxic chemicals by white rot fungi. In *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*, 386-402.
 29. Fragoeiro S. and Magan N. (2005). Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environmental Microbiology*, **7**, 348-355.
 30. Fratila-Apachitei L.E., Hirst J.A., Siebel M.A. and Gijzen H.J. (1999). Diuron degradation by *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 in synthetic and natural media. *Biotechnology Letters*, **21**, 147-154.
 31. Hammel K.E. and Cullen D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 349–355.

32. Hatakka, A. (1990). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, **13**, 125-135.
33. Hiratsuka N., Wariishi H. and Tanaka H. (2001). Degradation of diphenyl ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**, 563-571.
34. Hundt K., Jonas U., Hammer E. and Schauer F. (1999). Transformation of diphenyl ether by *Trametes versicolor* and characterization of ring cleavage products. *Biodegradation*, **10**, 279-286.
35. Hu Y., Yang X., Wang C., Zhao J., Li W. and Wang Z. (2009). A sensitive determination method for carbendazim and thiabendazole in apples by solid-phase microextraction high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*, **25**, 314–319.
36. Hu W., Lu Y., Wang G., Wang T., Luo W., Shi Y., Zhang X. and Jiao W. (2009). Organochlorine Pesticides in Soils Around Watersheds of Beijing Reservoirs: A Case Study in Guanting and Miyun Reservoirs. *Bull Environment Contamination Toxicology*, **82**, 694–700.
37. Janssen D.B., Oppentocht J.E. and Poelarends G. (2001). Microbial dehalogenation. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**, 254–258.
38. Jauregui J., Valderrama B., Albores A. and Vazquez-Duhalt A. (2003). Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot Fungi. *Biodegradation*, **14**, 397–406.
39. Iwamoto T. and Nasu M. (2001). Current Bioremediation Practice and Perspective. *Journal of bioscience and bioengineering*, **92**, 1-8.
40. Karalliedde L. and Senanayake N. (1999). Organophosphorus insecticide poisoning. *J Int Fed Clin Chem* **11**, 4–9.
41. Karpouzas D. and Singh B.K. (2006). Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basic. *Advances in microbial physiology*, **51**, 119-185.
42. Kirk T.K., Schultz E., Connors W.J., Lorenz L.F. and Zeikus J.G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives Microbiology*, **117**, 277-285.
43. Kirk T.K. and Farrell R.L. (1987). Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol*, **41**, 465-505.

44. Kirk T.K., Tien M., Kersten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E. and Farrell R.L. (1990). Lignin Peroxidase from Fungi: *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, **188**, 159-171.
45. Knapp J.S., Vantoch-Wood E.J. and Zhang F. (2001). Use of wood-rotting fungi for the decolorization of dyes and industrial effluents. In: *Fungi in Bioremediation*. Gadd M.G. (ed.), Cambridge University Press, 242-304.
46. Kodama S., Yamamoto A., Ohura T., Matsunaga A. and Kanbe T. (2003). Enantioseparation of Imazalil residue in orange by Capillary Electrophoresis with 2-hydroxypropyl- α -cyclodextrin as a chiral selector. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **51**, 6128-6131.
47. Kullman S.W. and Matsumura F. (1996). Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of cyclodiene pesticide endosulfan. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 593-600.
48. Lakshmi V., Kumar M. and Khanna S. (2008). Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **62**, 204-209.
49. Leisola M.S.A., Thanei-Wyss U. and Fiechter A. (1985). Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, **3**, 97-107.
50. Liang W.Q., Wang Z.Y., Li H., Wu P.C., Hu J.M., Luo N., Cao L.X. and Liu Y.H. (2005). Purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase from *Aspergillus niger* ZD11. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 7415-7420.
51. Li H., He J. and Li S. (2007). Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the mpd gene. *Research in Microbiology*, **158**, 143-149.
52. Liu Y.H., Chung Y.C. and Xiong Y. (2001). Purification and characterization of a dimethoate-degrading enzyme of *Aspergillus niger* ZHY256, isolated from sewage. *Applied and environmental microbiology*, **67**, 3746-3749.
53. Maloney S.E. (2001). Pesticide degradation. In: *Fungi in Bioremediation*. Gadd M.G. (ed.), Cambridge University Press, 188-223.
54. Mari M., Bertolini P. and Pratella G.C. (2003). Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases: a review. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 761-766.

55. Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Sollewijn Gelpke MD, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Detter JC, Larimer F, Coutinho PM, Henrissat B, Berka R, Cullen D, Rokhsar D. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology*, **22**, 695–700.
56. Maruyama T., Komatsu C., Michizoe J., Sakai S. and Goto M. (2007). Laccase-mediated degradation and reduction of toxicity of the postharvest fungicide imazalil. *Process Biochemistry*, **42**, 459–461.
57. Mendoza-Cantu A., Albores A., Linares L.F. and Rodriguez-Vazquez R. (2000). Pentachlorophenol Biodegradation and Detoxification by the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Toxicology*, **15**, 107-113.
58. Mougin C., Laugero C., Asther M. and Chaplain V. (1997). Biotransformation of s-triazine herbicides and related degradation products in liquid cultures by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Pesticide Science*, **49**, 169-177.
59. Mougin C., Pericaud C., Malosse C., Laugero C. and Asther M. (1996). Biotransformation of the insecticide lindane by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Pesticide Science*, **47**, 51-59.
60. Muto N. Hirai H., Tanaka T., Itoh N. and Tanaka K. (1997). Induction and inhibition of cytochrome P450 isoforms by imazalil, a food contaminant, in mouse small intestine and liver. *Xenobiotica*, **27**, 1215-1223.
61. Nakagawa Y. and Moore G.A. (1995). Cytotoxic effects of postharvest fungicides, *ortho*-phenylphenol, thiabendazole and imazalil, on isolated rat hepatocytes. *Life Sci.*, **57**, 1433-1440
62. Nunes C., Usall J., Teixido N. and Vinas I. (2001). Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology*, **70**, 53–61.
63. Ortelli D., Edder P. and Corvi C. (2005). Pesticide residues survey in citrus fruits. *Food Additives and Contaminants*, **22**, 423–428.
64. Paszczynski A. and Crawford R.L. (1995). Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology progress*, **11**, 368-379.
65. Phillips, Roger (2006), *Mushrooms*. Pub. McMillan, ISBN 0-330-44237-6.
66. Philp C.J., Bamforth M.S., Singleton I. and Atlas M.R. (2005). Environmental pollution and restoration: a role for bioremediation. In: *Bioremediation: Applied*

- microbial solution for real-world environmental cleanup*. Atlas M.R and Philp J. (ed), ASM press Washington, 1-48.
67. Pointing S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Applied in Microbiology and Biotechnology*, **57**, 20-33.
 68. Qing Z., Yang L. and Yu-Huan L. (2003). Purification and characterization of a novel carbaryl hydrolase from *Aspergillus niger* PY168. *FEMS Microbiology Letters*, **228**, 39-44.
 69. Quintero J.C., Lu-Chau T.A., Moreira M.T., Feijoo G. and Lema J.M. (2007). Bioremediation of HCH present in soil by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* in a slurry batch bioreactor. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **60**, 319–326
 70. Rabinovich M.L., Bolobova A.V. and Vasil'chenko L.G. (2004). Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **40**, 1-17.
 71. Reddy C.A. (1995). The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, **6**, 320-328.
 72. Reddy C.A. and D'Souza T.M. (1994). Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Reviews*, **13**, 137-152.
 73. Reichenberger S., Bach M., Skitschak A. and Frede H.G. (2007). Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness: A review. *Science of the Total Environment*, **384**, 1–35.
 74. Ritenour M.A., Zhang J., Wardowski F.W. and Brown G.E. Postharvest Decay Control Recommendations for Florida Citrus Fruit. *University of Florida IFAS extension*, circular 359A.
 75. Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C. and van Dijck P.W.M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied and Microbiology Biotechnology*, **59**, 426–435.
 76. Sembiring T. and Winter J. (1989). Anaerobic degradation of o-phenylphenol by mixed and pure cultures. *Applied in Microbiology and Biotechnology*, **31**, 89-92.
 77. Serguei L., Timofeevski N., Reading S. and Aust, S.D., (1998). Mechanisms for Protection against Inactivation of Manganese Peroxidase by Hydrogen Peroxide 1. *Biochemistry and Biophysics* **356**, 287–295.

78. Singh D. and Chen S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **81**, 399–417.
79. Singh B.K. and Walker A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev*, **30**, 428–471.
80. Singh B.K., Walker A., Morgan A.M. and Wright D.J. (2003). Effects of soil pH on the biodegradation of Chlorpyrifos and isolation of a Chlorpyrifos-degrading bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 5198-5206.
81. Sogorb M.A., Vilanova E. and Carrera V. (2004). Future application of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisoning. *Toxicology Letters* **151**, 219–233
82. Tani S., Yonezawa Y., Morisawa S. and Nishioka H. (2007). Development of a new *E. coli* strain to detect oxidative mutation and its application to the fungicide *o*-phenylphenol and its metabolites. *Mutation Research*, **628**, 123–128.
83. Torra-Reventos M., Yajima M., Yamanaka S. and Kodama T. (2004). Degradation of the herbicides thiobencarb, butachlor and molinate by a newly isolated *Aspergillus niger*. *Journal of Pesticide Science*, **29**, 214-216.
84. Tortella R.G. and Diez M.C. (2005). Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. *Critical Reviews in Microbiology*, **31**, 197–212.
85. Vinggaard A.M., Hnida C., Breinholt V. and Larsen J. C. (2000). Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity *in Vitro*. *Toxicology in Vitro*, **14**, 227-234.
86. Ward G., Hadar Y. and Dosoretz C.G. (2004). The biodegradation of lignocelluloses by white rot fungi. In: *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*. Arora D. (ed) Marcel Dekker, inc, New York, 393-407.
87. Yang C., Liu N., Guo X. and Qiao C. (2006). Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *FEMS Microbiol Lett*, **265**, 118-125.
88. Zamora T., Hidalgo C., Lopez F.J. and Hernandez F. (2004). Determination of fungicide residues in fruits by coupled-column liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, **27**, 645-652.

89. Zeddel A, Majcherczyk A, Hutterman A (1993) Degradation of polychlorinated biphenyls by white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in a solid state system. *Toxicology Environmental and Chemistry*, **40**, 225–266.
90. Scientific Committee on Plants/Thiabendazole/002-Final (2000).
91. U.S. Environmental Protection Agency, EPA. Reregistration Eligibility Decision for 2-phenylphenol and Salts (Orthophenylphenol or OPP). 739-R-06-004, July 2006.
92. 91/414/EEC/ Imazalil-1688/VI/97-Final.
93. 91/414/EEC/ Thiabendazol-7603/VI/97-Final.
94. Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α. (2007). Γεωργική φαρμακολογία. Βιοχημεία, φυσιολογία, μηχανισμοί δράσης και χρήσεις των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, Αθήνα.

