

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Β. ΕΞΑΡΧΟΥ



" Μελέτη της διάσπασης μυκητοκτόνων που περιέχονται σε υγρά απόβλητα από την μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων "

ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8674/1

Ημερ. Εισ.: 02-09-2010

Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

632.952

ΕΞΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087049

« Μελέτη της διάσπασης μυκητοκτόνων που περιέχονται σε υγρά απόβλητα από την μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων»

Τριμελής Επιτροπή:

- Καρούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Οιχαλιώτης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας και Γονιμότητας Εδάφους, Τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---------------|---|
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ..... | 6 |
|---------------|---|

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

| | |
|--|----|
| 1. Εισαγωγή..... | 7 |
| 1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση από φυτοπροστατευτικές ουσίες..... | 7 |
| 1.2. Φυτοπροστατευτικές ουσίες..... | 9 |
| 1.2.1. Thiabendazole..... | 9 |
| 1.2.2. Imazalil..... | 10 |
| 1.2.3. Diphenylamine..... | 12 |
| 1.2.4. Ortho-phenyl-phenol..... | 13 |
| 1.2.5. Thiophanate methyl..... | 14 |
| 1.3. Βιοαπορρύπανση..... | 16 |
| 1.4. Μύκητες Λευκής Σήψης..... | 17 |
| 1.5. Επιλεγμένοι μύκητες που εξετάστηκαν | 18 |
| 1.5.1. <i>Aspergillus niger</i> | 19 |
| 1.5.2. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | 21 |
| 1.5.3. <i>Pleurotus ostreatus</i> | 22 |
| 1.5.4. <i>Trametes versicolor</i> | 23 |
| 1.6. Σκοπός του πειράματος..... | 24 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

| | |
|--------------------------------|----|
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 25 |
| 2.1. Μύκητες..... | 25 |
| 2.2. Θρεπτικά υποστρώματα..... | 25 |

| | |
|--|----|
| 2.2.1. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Potato dextrose agar (PDA)..... | 25 |
| 2.2.2. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Malt extract agar (MEA)..... | 26 |
| 2.2.3. Παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος αχύρου (StEM)..... | 28 |
| 2.2.4. Παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος εδάφους (SEM)..... | 28 |
| 2.3. Μέθοδοι ανάλυσης ΦΟ σε σύστημα HPLC..... | 28 |
| 2.3.1. Σύστημα HPLC..... | 28 |
| 2.3.2. Διαλύτες και ΦΟ..... | 29 |
| 2.3.3. Καμπύλες αναφοράς..... | 29 |
| 2.3.4. Πειράματα ανάκτησης..... | 29 |
| 2.3.5. Εκχύλιση και προσδιορισμός των υπολειμμάτων του μυκητοκτόνου Imazalil..... | 30 |
| 2.3.6. Εκχύλιση και προσδιορισμός των υπολειμμάτων των Thiabendazole και 2-phenyl phenol..... | 30 |
| 2.3.7. Εκχύλιση και προσδιορισμός των υπολειμμάτων του Diphenylamine..... | 30 |
| 2.3.8. Εκχύλιση και προσδιορισμός των υπολειμμάτων των Thiophanate methyl και Carbendazim..... | 31 |
| 2.4. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας..... | 31 |
| 2.4.1. Προσδιορισμός δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση..... | 31 |
| 2.4.2. Μελέτη της παρεμβολής του υποστρώματος στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (εξαρτημένου ή μη του Mn)..... | 32 |
| 2.4.3. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένου του Mn)..... | 33 |
| 2.4.4. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση..... | 34 |

| | |
|---|----|
| 2.4.5. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης..... | 35 |
| 2.4.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση..... | 35 |
| 2.5. Πειράματα διάσπασης μυκητοκτόνων..... | 36 |
| 2.5.1 Μελέτη της διάσπασης των Thiophanate methyl και Thiabendazole από τους μύκητες <i>T. versicolor</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>P. chrysosporium</i> , και <i>A. niger</i> | 36 |
| 2.5.2.Αποδόμηση υψηλών συγκεντρώσεων των Thiabendazole, Orthophenylphenol, Imazalil και Diphenylamine από τον μύκητα <i>T. versicolor</i> | 39 |
| 2.5.3. Αποδόμηση μιγμάτων μυκητοκτόνων από τον μύκητα <i>T. versicolor</i> | 40 |
| 2.6. Στατιστική ανάλυση..... | 41 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

| | |
|---|----|
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 42 |
| 3.1. Γενικά..... | 42 |
| 3.2. Αποδόμηση του μυκητοκτόνου Thiabendazole και ενζυμική δραστηριότητα..... | 42 |
| 3.3. Αποδόμηση του μυκητοκτόνου Thiophanate methyl και ενζυμική δραστηριότητα..... | 48 |
| 3.4. Αποδόμηση υψηλών συγκεντρώσεων των μυκητοκτόνων από τον <i>T. versicolor</i> | 54 |
| 3.5. Αποδόμηση μιγμάτων μυκητοκτόνων από τον μύκητα <i>T. versicolor</i> | 55 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

| | |
|-------------------|----|
| 4.1.Συζήτηση..... | 58 |
|-------------------|----|

| | |
|-----------------------------|-----------|
| 4.2.Συμπεράσματα..... | 61 |
| 4.3.Μελλοντική εργασία..... | 62 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 63 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... | 69 |

Πρόλογος

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κύριο Καρπούζα Δημήτριο Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του αναθέτοντας μου την εργασία αυτή, καθώς και για την καθοδήγηση, επίβλεψη και βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της.

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 θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Καρα Παναγιώτη για τη μετάδοση πολύτιμων επιστημονικών γνώσεων, τις πολύ χρήσιμες συζητήσεις που είχαμε και το ασταμάτητο ενδιαφέρον που έδειξε σε όλα τα στάδια της διατριβής μου. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και σε όλα τα μέλη της ομάδας Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για τη βοήθεια και την συμπαράσταση που μου προσέφεραν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη ηθική και υλική υποστήριξη καθώς και για την κατανόηση και την συμπαράστασή τους όλο αυτό το διάστημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Περιβαλλοντική ρύπανση από φυτοπροστατευτικές ουσίες

Με στόχο την αύξηση της απόδοσης της καλλιεργήσιμης γης η χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών (ΦΟ) (εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων, ζιζανιοκτόνων, βακτηριοκτόνων, νηματοδοκτόνων, ακαρεοκτόνων, αυξητικών ορμονών των φυτών, κ.ά.) παρουσιάζει αλματώδη αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες. Η ολοένα και αυξανόμενη όμως χρήση τους, έφερε πολύ γρήγορα στην επιφάνεια τις αρνητικές επιπτώσεις τους στο περιβάλλον και στην υγεία του ανθρώπου, αφού τα περισσότερα είναι ενώσεις υψηλής τοξικότητας και με μεγάλο βαθμό βιολογικής συσσώρευσης (π.χ. εκείνα που περιέχουν χλωριωμένες οργανικές ενώσεις, διάφορες οργανικές και οργανομεταλλικές ενώσεις, φωσφορούχες οργανικές ενώσεις, ανόργανες ενώσεις και κυρίως ανόργανα άλατα των μετάλλων – αρσενικό (As), ψευδάργυρος (Zn), χαλκός (Cu) κ.ά.). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση του εντομοκτόνου DDT κατά τη δεκαετία του '50 και '60 με καταστροφικές συνέπειες για το περιβάλλον αλλά και για την υγεία οργανισμών μη στόχων (Echols et al., 2008).

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (ΦΠ) μετά τη χρήση τους υφίστανται μια σειρά φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών (υδρόλυση, οξείδωση, διάσπαση, μεταφορά, εξάτμιση, κ.ά.) με αποτέλεσμα να ρυπαίνουν το νερό και το έδαφος και να εμφανίζονται σε επικίνδυνες συγκεντρώσεις στα τρόφιμα (λαχανικά, φρούτα, κρέας, κ.λπ.) και στο ανθρώπινο σώμα.

Οι περισσότερες φυτοπροστατευτικές ουσίες (ΦΟ) απορροφώνται από το γαστρεντερικό σωλήνα αλλά και από το δέρμα και τους πνεύμονες και μεταφέρονται στους ιστούς του ανθρώπινου σώματος με την κυκλοφορία του αίματος. Προξενούν χρόνιες δηλητηριάσεις, σοβαρές διαταραχές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος ενώ ορισμένα από αυτά έχουν και καρκινογόνο δράση. Το Εθνικό Συμβούλιο Ερευνών των ΗΠΑ έχει υπολογίσει ότι 20.000 Αμερικανοί ίσως πεθαίνουν από καρκίνο κάθε χρόνο από σχετικά μικρές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων στα φρούτα και λαχανικά (Τσιούρης, 2004).

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην προστασία του περιβάλλοντος και ειδικότερα της προστασίας των υπόγειων και επιφανειακών υδάτινων πόρων από τη χρήση των ΦΠ. Η έγκριση και άδεια χρήσης των ΦΠ από την

Ευρωπαϊκή Ένωση απαιτεί τη διεξαγωγή μακροχρόνιων μελετών σε ότι αφορά την επικινδυνότητα των ουσιών αυτών στο περιβάλλον, στον άνθρωπο καθώς και στο αγροτικό οικοσύστημα γενικότερα κατά τη διάρκεια της χρήσης τους από τους γεωργούς. Η ρύπανση των υδάτινων πόρων με ΦΟ προκαλείται από μη σημειακές και σημειακές πηγές. Μη σημειακή ρύπανση αποτελεί η διάχυση των ΦΟ στα υδάτινα οικοσυστήματα μέσω της κάθετης απορροής τους στο έδαφος ύστερα από την εφαρμογή τους στον αγρό κατά την κοινή γεωργική πρακτική (Reichenberger et al., 2007, Candela et al., 2008). Πειραματικά δεδομένα από χώρες τις Βόρειας Ευρώπης αποδεικνύουν ότι, το πλύσιμο των ψεκαστών αποτελεί σημαντική σημειακή πηγή ρύπανσης με ΦΟ (de Wilde et al., 2007). Η μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων που περιλαμβάνει την εμβάπτιση τους σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων (imazalil, thiabendazol, 2-phenylphenol) οδηγεί στην παραγωγή υγρών αποβλήτων επιβαρυσμένων με τα παραπάνω μυκητοκτόνα και των οποίων η ελευθέρωση στο περιβάλλον αποτελεί σημαντική πηγή σημειακής ρύπανσης των υδάτινων πόρων με ΦΟ (Castillo et al., 2000). Η ασφαλής διαχείριση των παραπάνω υγρών αποβλήτων αποτελεί σημαντικό στοιχείο προστασίας του περιβάλλοντος αλλά και της δημόσιας υγείας.

Από όσα αναφέρθηκαν προκύπτει ότι η εντατική χρησιμοποίηση των ΦΠ έχει προκαλέσει προβλήματα στο περιβάλλον και στην υγεία του ανθρώπου. Ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες το πρόβλημα είναι σοβαρότερο λόγω της ύπαρξης ασθενών θεσμοθετημένων κανόνων προστασίας ή παντελούς ανυπαρξίας αυτών. Η ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων υδροφόρων συστημάτων από τη χρήση των ΦΠ αποτελεί μείζον πρόβλημα για την Ευρωπαϊκή Ένωση. Γύρω στις 300 πηγές που προμηθεύουν νερό στη Μεγάλη Βρετανία είναι ρυπασμένες με ΦΟ πάνω από τα όρια μέγιστης επιτρεπόμενης συγκέντρωσης που έχει θεσπίσει η Ε.Ε, τα οποία είναι 0,1 μg/L για κάθε ΦΟ και 0,5 μg/L για το σύνολο των ανινχευομένων ΦΟ στο ίδιο δείγμα (de Wilde et al., 2007; Bourton et al., 2009; Τσιούρης 2004).

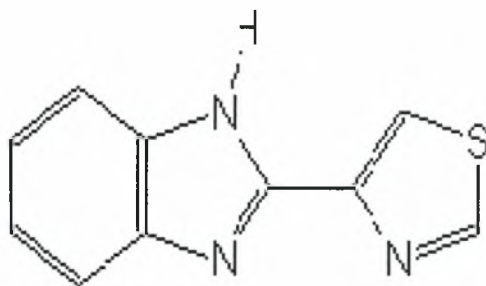
Όπως προαναφέρθηκε, κατά την αποθήκευση τα φρούτα είναι επιρρεπή σε μυκητολογικές μολύνσεις κυρίως από μύκητες του γένους *Penicilium sp.* και *Geotrichum sp.* με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος υποβάθμισης της ποιότητας τους και μείωση της εμπορικής τους αξίας. Γι' αυτό το λόγο η μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων περιλαμβάνει την εμβάπτιση τους σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων. Μυκητοκτόνα όπως τα thiabendazole (TBZ), imazalil (IMZ), thiophanate methyl (TM) και orthophenyl

phenol (OPP) χρησιμοποιούνται για την προστασία των μήλων, αχλαδιών, εσπεριδοειδών και μπανανιών, ενώ το diphenylamine (DPA) χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό για τον έλεγχο της επιφανειακής νέκρωσης (superficial scald) και καστανόχρωσης της επιδερμίδας των καρπών των μηλοειδών.

1.2. Φυτοπροστατευτικές ουσίες

1.2.1 Thiabendazole

Το TBZ (2-(4-thiazolyl)-1H-benz-imidazole, Εικόνα 1), ανήκει στην κατηγορία των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων. Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα είναι τα πρώτα διασυστημικά μυκητοκτόνα που ανακαλύφθηκαν στην περίοδο του '60 και είναι ουσίες με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό.



Εικόνα 1: Χημική δομή του Thiabendazole.

Τα βενζιμιδαζολικά είναι ευρέως φάσματος προστατευτικά και θεραπευτικά μυκητοκτόνα, αποτελεσματικά εναντίον πολλών φυτοπαθογόνων μυκήτων (*Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Nectria galligena*, *Sclerotinia fructicola*, *Verticillium sp.*, *Cercospora sp.* κλπ) εκτός των Φυκομυκήτων και κυρίως των Ωομυκήτων. Εφαρμόζονται προσυλλεκτικά αλλά και μετασυλλεκτικά για την προστασία φρούτων και άλλων αποθηκευμένων προϊόντων (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991).

Το TBZ ανήκει στα μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στην αύξηση και στην ανάπτυξη δια παρεμβολής στις διεργασίες της μίτωσης και της κυτταροδιαίρεσης. Αναστέλλει τη μίτωση διότι παρεμβαίνει στον πολυμερισμό της τουμποουλίνης και συνεπώς εμποδίζει το σχηματισμό της ατράκτου (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991: Danaher et al., 2007)

Το TBZ ήταν το πρώτο βενζιμιδαζόλιο που βγήκε στην αγορά πριν από 40 χρόνια. Στη συνέχεια ακολούθησαν και άλλα εναλλακτικά βενζιμιδαζόλια αλλά το TBZ συνεχίζει να χρησιμοποιείται επειδή είναι σχετικά φθηνό σε σχέση με τα νεότερα σκευάσματα (Cannavan et al., 1998).

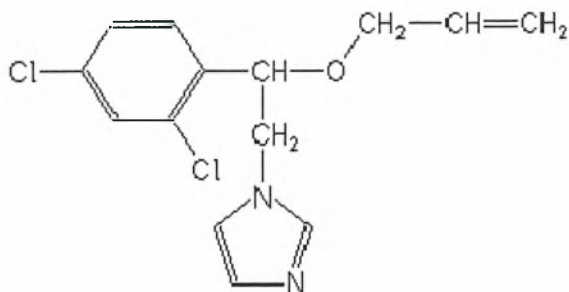
Τα βενζιμιδαζολικά θεωρούνται ασφαλή σε δόσεις 20 με 30 φορές πάνω από τη συνιστώμενη. Αναφορές για οξεία τοξικότητα ζώων από βενζιμιδαζολικά είναι περιορισμένες. Αντίθετα, η κύρια τοξική επίδραση των βενζιμιδαζολικών αποτελεί η τερατογένεση που πρωτοαναφέρθηκε για το σκεύασμα parbendazole (PAR) (Danaher et al., 2007). Το TBZ είναι ύποπτο για καρκινογένεση προκαλώντας αδενώματα του θυροειδή και υπερπλασία των κυτταροιστρογόνων σε αρουραίους (91/414/EEC/Thiabendazole).

Το TBZ διασπάται αργά στο έδαφος, ενώ από μελέτες που έγιναν στα τεύτλα αποδεικνύεται ότι η διάσπασή του επάνω στο φύλλωμα των τεύτλων είναι κυρίως φωτοχημική (91/414/EEC/Thiabendazole). Στα ζώα το TBZ υδροξυλιώνεται ύστερα από υδροξυλίωση του 5 άκρου του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου και σχηματίζεται ο κύριος μεταβολίτης του TBZ, το 5- hydroxythiabendazole (5OH-TBZ) (Cannavan et al., 1998).

1.2.2 Imazalil

Το IMZ (1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxy)ethyl]-1H-imidazole, (Εικόνα 2), είναι μυκητοκτόνο της ομάδας των ιμιδαζολικών τα οποία είναι γνωστά ως αναστολείς βιοσύνθεσης της εργοστερόλης. Οι στερόλες έχουν βασικό ρόλο στη δομική σταθεροποίηση των μεμβρανών. Η σύσταση των μεμβρανών είναι όμοια σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα με μερικές εξαιρέσεις όπως στην περίπτωση των μυκήτων που αντί της χοληστερόλης έχουν εργοστερόλη. Κύτταρα μυκήτων που έχουν εκτεθεί σε μυκητοκτόνα που δρουν ως αναστολείς της εργοστερόλης, χαρακτηρίζονται γενικά από βραχείς βλαστικούς σωλήνες με μορφολογικές ανωμαλίες, όπως διογκώσεις, που συχνά οδηγούν στην εκροή κυτταροπλάσματος. Η βλάστηση των σπορίων και η αρχική ανάπτυξη των βλαστικών σωλήνων δεν επηρεάζονται ορατά. Όμως τελικά η ανάπτυξη σταματά λόγω της αποσύνθεσης και κακής λειτουργίας των κυτταροπλασματικών μεμβρανών. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μυκητοκτόνων της ομάδας των αναστολέων της εργοστερόλης είναι η

παρουσία ενός κορεσμένου ή ακόρεστου πενταμελή ή εξαμελή ετεροκυκλικού δακτυλίου (περιέχει άζωτο), ο οποίος παίζει ρόλο-κλειδί για την δέσμευση του μυκητοκτόνου στο σημείο δράσεως.



Εικόνα 2: Χημική δομή του Imazalil.

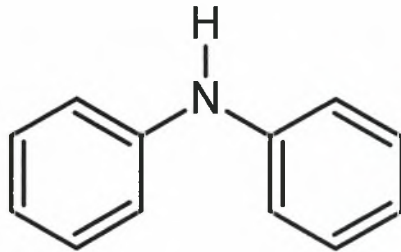
Το IMZ είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο προστατευτικό και θεραπευτικό διασυστημικό μυκητοκτόνο τόσο στην προσυλλεκτική (ωΐδια), όσο και μετασυλλεκτική προστασία φρούτων και λαχανικών (*Penicillium*, *Alternaria*, *Gloeosporium*, *Phomopsis*, *Phoma spp.*) και ως επικαλυπτικό σπόρων (σιτηρά, βαμβάκι) για *Fusarium* και *Helminthosporium spp.* αντικαθιστώντας τα βενζιμιδαζολικά σε περιπτώσεις που η αντοχή των μυκήτων στα βενζιμιδαζόλια μείωσε την αποτελεσματικότητά τους (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991; Maruyama et al., 2007).

Το IMZ παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα στον άνθρωπο και στα θηλαστικά. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση, ότι επηρεάζει την δράση του κυτοχρώματος P450 και ότι έχει ανασταλτική δράση εναντίον της αρωματάσης CYP19, η οποία καταλύει την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (Kodama et al., 2003).

Το IMZ συχνά ανιχνεύεται στα εσπεριδοειδή. Έτσι, σε πολλά εμπορικά δείγματα πρέπει να γίνονται συχνοί έλεγχοι για την επιβεβαίωση της ασφάλειας των τροφίμων. Επιπροσθέτως, το imazalil εύκολα μεταβολίζεται σε R14821 [1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazole-1-yl)-1-ethanol]. Και ο μεταβολίτης αυτός ανιχνεύεται συχνά στα εσπεριδοειδή, επομένως απαιτούνται έλεγχοι και για τυχόν υπολείμματα του συγκεκριμένου μεταβολίτη (Yoshioka et al., 2003).

1.2.3. Diphenylamine

Το DPA (Εικόνα 3) παρουσιάζει φυτορυθμιστική δράση και συνήθως χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της επιφανειακής νέκρωσης (superficial scald) και καστανόχρωσης της επιδερμίδας των καρπών των μηλοειδών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους (Saad et al., 2003: Γεωργική φαρμακολογία, Ζιώγας 2007). Το επιφανειακό καφέτιασμα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες φυσιολογικές ανωμαλίες των καρπών μηλιάς. Ο όρος scald (καφέτιασμα ή έγκουμα) χρησιμοποιείται ευρέως για το χαρακτηρισμό διαφόρων φυσιολογικών ανωμαλιών οι οποίες έχουν ως σύμπτωμα την εμφάνιση καφέ χρωματισμού.



Εικόνα 3: Χημική δομή του Diphenylamine.

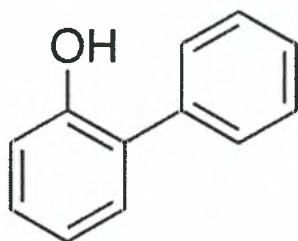
Ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι απόλυτα γνωστός, υποστηρίζεται όμως ότι προσφέρει αντιοξειδωτική δράση στα φυτά. Το DPA χρησιμοποιείται μόνο του ή σε μίγμα με ένα άλλο μυκητοκτόνο της ομάδας των κινολινών, το ethoxyquin (Γεωργική φαρμακολογία, Ζιώγας 2007).

Το DPA είναι τοξικό όταν εισπνέεται και όταν έρχεται σε επαφή με το δέρμα και είναι ιδιαίτερα τοξικό σε υδρόβιους οργανισμούς. Παρουσιάζει νεφροτοξικότητα σε αρσενικούς αρουραίους και πιθανόν να επιφέρει αναστολή στη σύνθεση των καρτενοειδών σε φωτοσυνθετικά βακτήρια. Τα μέγιστα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων (MRLs) για τα μήλα είναι τα 5 mg/kg.

Το DPA παρουσιάζει υψηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος. Πειράματα των Dryzga et al. (1995), όπου εφαρμόστηκε ¹⁴C DPA σε έδαφος σε αεροβικές συνθήκες στους 25°C για 12 μήνες, έδειξαν ότι μόνο το 18% ανοργανοποιήθηκε, ενώ το 15% της δόσης παρέμεινε ως DPA.

1.2.4. Ortho-phenyl-phenol

Το OPP (Εικόνα 4), έχει ευρεία χρήση στη μετασυλλεκτική συντήρηση φρούτων και κυρίως εσπεριδοειδών από *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis citri* κ.λ.π για αποφυγή αλλοίωσης κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και της αποθήκευσης. Άλλη μία χρήση του OPP αποτελεί η απολύμανση αποθηκευμένων υλικών. Επίσης, χρησιμοποιείται ως μυκητοστατικό κερί για την επικάλυψη λαχανικών για την αποφυγή μικροβιακών αλλοιώσεων κατά την αποθήκευση και μεταφορά των λαχανικών (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991: Saad et al., 2003: Zamora et al., 2004).



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

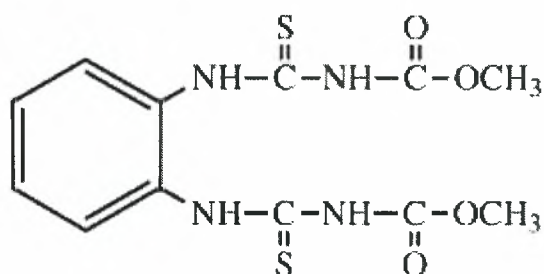
Το OPP είναι ύποπτο για καρκινογένεση στον άνθρωπο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε ζώα, το OPP έδειξε ότι προκαλεί διαταραχή στην ανάπτυξη, μείωση γονιμότητας και βλάβη στα νεφρά (Kolbe et al., 2006). Στην Ισπανία η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει ως ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων (MRL) του OPP τα 12 mg/kg σε εσπεριδοειδή και τα 0,1 mg/kg σε μπανάνες (Zamora et al., 2004).

Έχουν γίνει πολλές μελέτες από τις αρχές της δεκαετίας του 1960 και έχουν διατυπωθεί πολλές θεωρίες για τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του μυκητοκτόνου OPP αλλά δεν φαίνεται να εξηγούν ικανοποιητικά την πρωταρχική δράση του μυκητοκτόνου. Σύμφωνα με μία θεωρία που αναπτύχθηκε στο τέλος της δεκαετίας του '80, το OPP προκαλεί υπεροξειδωση των λιπιδίων στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, στην πυρηνική μεμβράνη και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευαίσθητων μυκήτων. Έτσι με τη δράση του μυκητοκτόνου δημιουργούνται ανοίγματα στην πυρηνική μεμβράνη αφήνοντας ακάλυπτα τα χρωμοσώματα στη δράση ελεύθερων ριζών και ενζύμων (Γεωργική φαρμακολογία, Ζιώγας 2007).

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) με ρυθμούς μέχρι και 0.4 mmol/L την ημέρα.

1.2.5. Thiophanate methyl

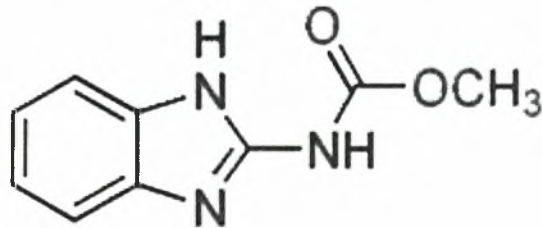
Το TM (1,2-Bis-(3-methoxycarbonyl—2—thioureido) benzene, Εικόνα 5), ανήκει στην κατηγορία των παραγώγων του θειοφανικού οξέος, αλλά ο μηχανισμός δράσης του είναι ανάλογος με τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στην αύξηση και στην ανάπτυξη δια παρεμβολής στις διεργασίες της μίτωσης και της κυτταροδιαίρεσης. Το TM χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση μυκήτων στην προσυλλεκτική και μετασυλλεκτική μεταχείριση μεγάλης ποικιλίας φρούτων και λαχανικών, όπως για την καταπολέμηση του βοτρώτη της αμπέλου (*Botrytis cinerea*), των φουζικλαδίων των μηλοειδών (*Venturia inaequalis*, *V. prina*), του εξώασκου των πυρηνοκάρπων (*Taphrina deformans*) κ.λ.π. (Muccio et al., 1995: Sannino et al., 1995: Veneziano et al., 2004: Γεωργική φαρμακολογία, Ζιώγας 2007).



Εικόνα 5: Χημική δομή του φυτοφαρμάκου Thiophanate methyl.

Το TM έχει ως κύριο μεταβολίτη του τον μεθυλεστέρα του βενζιμιδαζολοκαρβαμιδικού οξέος (MBC) ή carbendazim, το οποίο σε κάποιες περιπτώσεις είναι το ενεργό συστατικό (Muccio et al., 1995: Sannino et al., 1995, Εικόνα 6). Παρατηρήθηκε ότι το MBC σχηματίστηκε πάνω σε φύλλα βάμβακος που ψεκάστηκαν με Thiophanate methyl. Η μετατροπή αυτή έγινε προφανώς μέσω φωτοχημικών αντιδράσεων (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991). Το MBC είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο, αποτελεσματικό σε ευρύ φάσμα φυτοπαθογόνων

μυκήτων, όπως *Venturia*, *Podosphaera*, *Monilia*, *Septoria*, *Fusarium*, *Sclerotinia* κ.α. Χρησιμοποιείται επίσης σε επενδύσεις σπόρων σιτηρών για την προστασία από μύκητες των γενών *Fusarium*, *Septoria*, *Tilletia* και του βαμβακιού από *Rhizoctonia*.



Εικόνα 6: Χημική δομή του φυτοφαρμάκου Carbendazim.

Το MBC είναι ασθενής βάση και η υπολειμματικότητά του στο έδαφος εξαρτάται από το pH του εδάφους. Η ημιπερίοδος ζωής κυμάνθηκε από 26 μήνες σε pH 5,5 μέχρι 3 μήνες σε pH 7,2. Επιπλέον, το MBC σχηματίζει στο έδαφος απλά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα (Ca, Fe, Mn, Al). Το pH του εδάφους επηρεάζει την ταχύτητα πρόσληψης και την περίοδο διαθεσιμότητας του MBC. Σε εδάφη με αλκαλικό pH το MBC είναι πιο εύκολα διαθέσιμο αλλά μεταβολίζεται πιο γρήγορα ενώ σε χαμηλότερα pH η πρόσληψη γίνεται με αργότερο ρυθμό αλλά είναι διαθέσιμο για μακρότερο χρονικό διάστημα (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991).

Ελάχιστες αναφορές υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία για την μικροβιακή αποδόμηση του MBC. Ένα Gram-θετικό, αερόβιο, μεσόφιλο βακτήριο του γένους *djl-6^T* βρέθηκε ότι είναι ικανό να αποδομεί το carbendazim (Xu et al., 2007). Τα αποτελέσματα των ταξονομικών και μορφολογικών ελέγχων έδειξαν ότι ανήκει σε ένα καινούριο είδος του γένους *Rhodococcus*, το *Rhodococcus qingshengii sp.nov.* Επίσης ένα άλλο gram-αρνητικό βακτήριο του γένους *Ralstonia sp.* βρέθηκε ότι μπορεί να χρησιμοποιεί το MBC ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας (Zhang et al., 2004).

Η ευρέως διαδεδομένη χρήση των βενζιμιδαζολικών οφείλεται στο ότι παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά σε συνδυασμό με αποτελεσματική μυκητοτοξική δράση (Bicchi et al., 1989). Όμως, το TM παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα στα ψάρια (Tide international USA, INC). Επίσης, δημιουργεί αλλεργικές αντιδράσεις δια επαφής και για το λόγο αυτό απαιτείται ιδιαίτερη

προσοχή κατά την εφαρμογή του και απαγορεύεται η λήψη αλκοολούχων πριν ή μετά την έκθεση στο ΤΜ (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991). Η επιτρεπόμενη ημερήσια δόση (ADI) έχει καθορισθεί για το ΤΜ και είναι τα 0,02 mg/kg/ημέρα και 0,03 mg/kg/ημέρα για το ΜΒC (Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority, 2007).

1.3 Βιοαπορρύπανση

Η ανεξέλεγκτη ελευθέρωση οργανικών ρύπων στο περιβάλλον αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της εποχής μας. Τα απόβλητα και τα παραπροϊόντα που προέρχονται από γεωργικές δραστηριότητες, από μονάδες επεξεργασίας και παραγωγής τροφίμων και από χημικές βιομηχανίες, αποτελούν μία σημαντική περιβαλλοντική απειλή για εδαφικούς και υδάτινους αποδέκτες. Η συχνή ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων οργανικών ρύπων στο περιβάλλον έχει δημιουργήσει παγκόσμια ανησυχία για τη δημόσια υγεία (Sing and Chen, 2008).

Η απορρύπανση ή εξυγίανση αποσκοπεί στην ανάληψη ενεργειών για την αποκατάσταση των υπόγειων υδάτινων φορέων και γενικότερα φυσικών πόρων που έχουν ρυπανθεί. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τη φύση, τη συγκέντρωση και ποσότητα του ρυπαντή, το είδος της πηγής ρύπανσης (σημειακή ή διάχυτη, συνεχής ή παροδική), το κόστος και τη διαθέσιμη τεχνολογία, καθώς και τη μελλοντική χρήση της γης. Οι μέθοδοι απορρύπανσης περιλαμβάνουν την απομάκρυνση των ρυπαντών ή την επεξεργασία των ρύπων επιτόπου. Η επιτόπια παρακολούθηση αποτελεί το πρώτο βήμα για την επιλογή της τεχνικής απορρύπανσης και περιλαμβάνει χημικές αναλύσεις δειγμάτων νερού και αερίων με σκοπό να καθορισθούν οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ρυπαντών.

Έχει αναγνωρισθεί ότι η βιοαπορρύπανση, δηλαδή η χρήση της μεταβολικής ικανότητας μικροοργανισμών με στόχο την απορρύπανση και αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών, υδροφόρων και λοιπών οικοσυστημάτων, αποτελεί φιλική στο περιβάλλον, αλλά και οικονομικά συμφέρουσα μέθοδο για την απομάκρυνση του οργανικού φορτίου σε αντίθεση με τις παραδοσιακές τεχνικές διαχείρισης (Barr and Aust, 1994). Ανήκει στις μη συμβατικές (εναλλακτικές) τεχνικές επεξεργασίας που εφαρμόζονται επιτόπου και στηρίζεται στην αποδόμηση των οργανικών ουσιών με τη δράση μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες). Βασικό κριτήριο για την εφαρμογή της

μεθόδου αποτελεί η επιδεκτικότητα του ρυπαντή στη βιοδιάσπαση από τους μικροοργανισμούς που ενδημούν ή εμβολιάζονται στη θέση της ρύπανσης.

Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ως καταλύτες κατάλληλα ένζυμα που παράγουν οι ίδιοι (Pointing, 2001). Η δράση των μικροοργανισμών εξαρτάται από το είδος και την πυκνότητα της μικροβιακής κοινότητας, καθώς και τις συνθήκες που ευνοούν ή αναστέλλουν την ανάπτυξή τους (τοξικότητα, pH, θερμοκρασία, υγρασία). Το τελικό προϊόν είναι ανόργανες ουσίες (CO₂, H₂O, H₂S, CH₄, νιτρικά και θειικά άλατα).

Η επιλογή του είδους των μικροοργανισμών (βακτήρια ή μύκητες) που θα χρησιμοποιηθούν εξαρτάται από το είδος του ρύπου που πρέπει να απομακρυνθεί και η παρουσία ή όχι άλλων ρύπων. Μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι οι μύκητες και ιδιαίτερα μία συγκεκριμένη ομάδα μυκήτων, οι μύκητες λευκής σήψης, μπορούν και αποδομούν ένα σημαντικό αριθμό περιβαλλοντικών ρύπων (Barr and Aust, 1994; Paszczynski and Crawford, 1995; Alexander, 1999). Το εξώκυτταρικό, μη εκλεκτικό σύστημα αποδόμησης της λιγνίνης που διαθέτουν οι μύκητες λευκής σήψης, έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να εφαρμοσθεί σε μία μεγάλη ποικιλία υπολειμματικών τοξικών χημικών ενώσεων σε αντίθεση με τα βακτήρια που παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση (Pointing, 2001). Έτσι, ο ρύπος δεν χρειάζεται να εισέλθει στο κυτόπλασμα για τον περαιτέρω μεταβολισμό του και υπάρχει δυνατότητα αποδόμησης και ρύπων που παραμένουν προσροφημένοι σε κάποια εδαφική επιφάνεια.

1.4 Μύκητες λευκής σήψης

Οι μύκητες λευκής σήψης (White rot fungi), αποτελούν μία «βιοχημική» (και όχι ταξινομική) ομάδα, η οποία αποτελείται από είδη που είναι ικανά να αποδομήσουν επιλεκτικά τη λιγνίνη (Pointing, 2001). Η ονομασία, λευκής σήψης, προέρχεται από τα συμπτώματα που δημιουργούν σε προσβεβλημένο ξύλο. Το ξύλο αποτελείται από κυτταρίνη, η οποία έχει λευκό χρώμα και από λιγνίνη που έχει καφέ χρώμα. Οι μύκητες λευκής σήψης αποδομούν τη λιγνίνη και αφήνουν πίσω την κυτταρίνη, προκαλώντας έτσι τη λεγόμενη λευκή σήψη. Η αποδόμηση-ανοργανοποίηση της λιγνίνης είναι μία αυστηρά αερόβια οξειδωτική διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων από

Βασιδιομύκητες και από ορισμένα είδη της οικογένειας *Xylariaceae* που ανήκουν στο φύλλο *Ascomycota* (Rabinovich et al., 2004).

Η λιγνίνη, ένα πολυδιακλαδιζόμενο πολυμερές της φαινυλοπροπανικής ομάδας, αποτελεί μετά την κυτταρίνη την πιο διαδεδομένη οργανική ουσία των φυτών, η οποία από υπολογισμούς που έχουν γίνει το 15-20% του άνθρακα που δεσμεύεται στη βιόσφαιρα ετησίως τελικά ενσωματώνεται σε αυτό το άκαμπτο πολυμερές του κυτταρικού τοιχώματος. Η λιγνίνη βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα των διαφόρων τύπων στηρικτικών αγωγών ιστών. Οι ισχυροί δεσμοί μεταξύ των μονομερών και η τυχαία δομή της λιγνίνης (αποτελείται από φαινολικά-προπανοειδή μονομερή τα οποία συνδέονται τυχαία μεταξύ τους με δεσμούς C-C και C-O), την καθιστούν πολύ ανθεκτική στη διαδικασία μικροβιακής αποικοδόμησης και ενώ πολλοί είναι οι μικροοργανισμοί που μπορούν να αποδομούν μερικά από τα συστατικά του μορίου της, μόνο ένας μικρός αριθμός μπορεί να αποδομεί την εσωτερική δομή της. Οι περισσότεροι από αυτούς είναι μύκητες λευκής σήψης (Singh and Chen, 2008).

Η κατηγορία αυτή των μυκήτων διαθέτει ενζυμικό σύστημα κατά βάση οξειδωτικό και μη εξειδικευμένο, αποτελούμενο από δύο τύπους ενζύμων όπως υπεροξειδάσες και λακκάσες. Σε αντίθεση με τις οξειδάσες, οι υπεροξειδάσες χρειάζονται υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) ως υπόστρωμα. Τέτοιες υπεροξειδάσες είναι η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP). Οι λακκάσες αντιθέτως, είναι χαλκο-οξειδάσες που χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο για την οξείδωση κυρίως φαινολικών ενώσεων προς φαινοξικές ρίζες (Rabinovich et al., 2004, Ward et al., 2004, Hammel and Cullen, 2008).

1.5 Επιλεγμένοι μύκητες που εξετάστηκαν

Στα πειράματα της παρούσας μελέτης εξετάστηκε η αποδομητική ικανότητα τεσσάρων μυκήτων, τριών βασιδιομυκήτων (*Basidiomycetes*), τους *Phanerochaete chrysosporum*, *Pleurotus ostreatus*, και *Trametes versicolor* και ενός ασκομύκητα (*Ascomycete*) τον *Aspergillus niger*.

1.5.1 *Aspergillus niger*

Ο *A. niger* είναι ένας νηματοειδής ασκομύκητας και αποτελεί ένα από τα πιο κοινά είδη του γένους *Aspergillus*. Το γένος *Aspergillus* περιλαμβάνει περίπου 200 νηματοειδείς μύκητες, ανήκει στην κλάση *Eurotiomycetes* της τάξης *Eurotiales* και της οικογένειας *Trichocomaceae*. Ο *A. niger* προκαλεί μία ασθένεια, που ονομάζεται "μαύρη μούχλα", σε ορισμένα φρούτα και λαχανικά. Αυξάνεται γρήγορα σε ποικίλα τεχνητά υποστρώματα, παράγοντας αποικίες που αποτελούνται από συμπαγή άσπρη ή κίτρινη βάση, καλυμμένη από πυκνό στρώμα σκούρων καφέ έως μαύρων κονιδίων (Εικόνα 7). Αποτελεί κοινό εδαφογενή μύκητα και οι μαύρες αποικίες του μπορεί εύκολα να μπερδευτούν με αυτές του γένους *Stachybotrys*. (Schuster et al., 2002).



Εικόνα 7: Κονίδια του μύκητα *Aspergillus niger*.

Ως κοινό μέλος της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους ο μύκητας αυτός παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα. (Baker, 2006). Έχει απομονωθεί από όλο τον κόσμο και αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες πάνω σε νεκρή οργανική ύλη αποδομώντας οργανικές ουσίες. Αναπτύσσεται σε μία ευρεία θερμοκρασιακή κλίμακα των 6-47 °C με βέλτιστες τιμές μεταξύ 35-37 °C. Ο *A. niger* είναι ικανός να αναπτύσσεται σε ένα εξαιρετικά μεγάλο εύρος pH: 1,4-9,8. Οι παραπάνω συνθήκες και η άφθονη παραγωγή των κονιδιοσπορίων τα οποία μεταφέρονται με τον άνεμο, καθιστούν ευρέως διαδεδομένη την παρουσία του, ιδίως σε ζεστά και υγρά περιβάλλοντα. (Schuster et al., 2002).

Η βιομηχανική ζύμωση καλλιεργειών *Aspergillus*, παράγει πολυάριθμα και σημαντικά εμπορικά ένζυμα και μεταβολίτες, όπως κιτρικό οξύ, α-αμυλάση, γλυκοαμυλάση, γλυκανάση, λιπάση, ουδέτερες πρωτεάσες και ξυλανάσες. Η ζύμωση του *A. niger* θεωρείται ως "ασφαλής" από το FDA (Food and Drug Administration).

Τα είδη *Aspergillus* είναι από τους σημαντικότερους εμπορικούς μύκητες, που χρησιμοποιούνται σε πληθώρα βιοτεχνολογικών εφαρμογών για την παραγωγή κυρίως αρχικών και δευτερογενών μεταβολιτών και εξωκυτταρικών ενζύμων. Η βασικότερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολικών ουσιών είναι τα οργανικά οξέα, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως βελτιωτικά οσμής, ρυθμιστικά οξίνισης, συντηρητικά, συνεργιστικοί παράγοντες αντιοξειδωτικών, κ.α. (Πίνακας 1).

Την πιο κοινή εφαρμογή αποτελεί χωρίς αμφιβολία, η παραγωγή κιτρικού οξέος από επιλεγμένα στελέχη του μικροοργανισμού. Το κιτρικό οξύ παράγεται σχεδόν αποκλειστικά από τη ζύμωση των *A. niger* και του *A.s wentii*, επειδή η παραγωγή από τους οργανισμούς αυτούς είναι οικονομική και η παραγωγή ανεπιθύμητων δευτερογενών προϊόντων είναι μηδαμινή. (Schuster et al., 2002).

Πίνακας 1: Προϊόντα που παράγονται από τον μύκητα *Aspergillus niger* και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων.

| ΕΝΩΣΕΙΣ | ΧΡΗΣΗ |
|---------------------------------|--|
| ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ | |
| Κιτρικό οξύ | Αναψυκτικά, γαλακτομικά προϊόντα, μαρμελάδες, ζελέδες, γλυκά |
| Γλυκονικό οξύ | Πρόσθετα αρτοποιίας, μίγματα άρτου, επιδόρπια |
| ENZYMA | |
| α-αμυλάση | Σιρόπι αραβοσίτου, δεξτρόζη, σιρόπια σοκολάτας |
| Οξειδάση της γλυκόζης, Καταλάση | Προϊόντα αυγών σε σκόνη, ζυθοποιία, κρασιά, μαγιονέζα |
| Ναργινάση | Αποπίκραση χυμών εσπεριδοειδών |

Ο *A. niger* δεν παράγει λιγνολιτικά ένζυμα. Παρόλο αυτά, πολλές είναι οι μελέτες που αναφέρουν ότι ο μύκητας αυτός έχει την ικανότητα να αποδομεί ρύπους όπως και οι υπόλοιποι μύκητες λευκής σήψης. Η ικανότητα του αυτή σχετίζεται με την παραγωγή διαφόρων ενζύμων, κάποια από τα οποία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί. Έτσι, σύμφωνα με τη μελέτη από τους Liu et al., (2001) το στέλεχος ZHY256 του μύκητα *A. niger* παρουσίαζε αυξημένη ικανότητα να αποδομεί οργανοφωσφορικά parathion, dichlorovos, 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. Παρόμοια μελέτη από τους Qing et al., (2003) οδήγησε στην απομόνωση από το στέλεχος *A. niger* PY168, μιας καρβοξυεστεράσης που μπορούσε και υδρολύει τα καρβαμικά εντομοκτόνα carbaryl, carbofuran, propoxur, isoprocarb, fenobucarb και aldicarb.

1.5.2 *Phanerochaete chrysosporium*

Ο *Phanerochaete chrysosporium* ανήκει στην κλάση *Agaricomycetes*, της τάξης *Corticales*, της οικογένειας *Corticaceae*, του γένους *Phanerochaete*. Αυτός ο μύκητας δε σχηματίζει μανιτάρι για την αναπαραγωγή του, αλλά επίπεδα σώματα καρποφορίας που εμφανίζονται ως κρούστα στην κάτω πλευρά του ξύλου.

Υπάρχουν πολλά είδη μυκήτων που προκαλούν λευκή σήψη, αλλά ο *P. chrysosporium* έχει πολλά χαρακτηριστικά που τον καθιστούν πολύ χρήσιμο. Πρώτα από όλα, αφήνει την κυτταρίνη του ξύλου πραγματικά ανέπαφη. Δεύτερον, έχει πολύ υψηλή βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (περίπου 40°C) γεγονός που σημαίνει ότι του επιτρέπει να αναπτύσσεται σε περιβάλλοντα που διατηρούν πολύ υψηλές θερμοκρασίες (Singh and Chen, 2008).

Ο μύκητας λευκής σήψης *P. chrysosporium*, ο οποίος αποτελεί και τον πιο μελετημένο μύκητα λευκής σήψης, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικός βιοαποδομητής υπολειμματικών αρωματικών ενώσεων με τη βοήθεια μη εξειδικευμένων υπεροξειδασών και λιγνασών οι οποίες επιδρούν πάνω σε οργανικά μόρια διαφορετικά της λιγνίνης. Το λιγνολυτικό σύστημα εξωκυτταρικών ενζύμων που διαθέτει του δίνει τη δυνατότητα να αποδομεί διάφορες ενώσεις όπως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, ΦΟ, κυανίδια, και άλλους οργανικούς ρυπαντές (Kullman and Matsumura, 1996; Mougín

et al., 1997; Fratila Apachitei et al., 1999). Διαθέτει δύο ομάδες ενζύμων και συγκεκριμένα την υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP), την υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) και μία σειρά ενζύμων που καταλύουν το σχηματισμό H₂O₂. (Gold et al., 1989; Kirk and Farrell, 1987).

Ο *P. chrysosporium* είναι ο πρώτος μεταξύ των βασιδιομυκήτων που αποικοδομούν το ξύλο, του οποίου το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί. Έχει παρατηρηθεί ότι στο γονιδιώμα του υπάρχουν τουλάχιστον δέκα LiP, πέντε MnP και έξι γονίδια οξειδασών εξαρτώμενα του χαλκού (Martinez et al., 2004).

1.5.3. *Pleurotus ostreatus*

Ο μύκητας *P. ostreatus* (ή κοινώς *Oyster mushroom*) αποτελεί κοινό εδώδιμο μανιτάρι. Το γένος *Pleurotus* ανήκει στους Βασιδιομύκητες και η ταξινομική του κατάταξη είναι: Κλάση: *Agaricomycetes*, Τάξη: *Agaricales* και Οικογένεια: *Tricholomataceae*. Στους Βασιδιομύκητες περιλαμβάνονται οι πιο εξελιγμένοι μύκητες, αλλά και είδη με απλή οργάνωση. Ο κυριότερος κοινός χαρακτήρας των Βασιδιομυκήτων είναι ο σχηματισμός βασιδίων και βασιδιοσπορίων. Το μανιτάρι έχει ένα φαρδύ πύλο που μπορεί να εκτείνεται από 5-25 cm. Το χρώμα στους φυσικούς πληθυσμούς του μύκητα ποικίλει από άσπρο έως γκρι, ή από ανοιχτό έως σκούρο καφέ. Ο *P. ostreatus* είναι πολύ διαδεδομένος σε εύκρατα και υποτροπικά δάση παντού σε όλο τον κόσμο. Στη φύση αναπτύσσεται πάνω σε νεκρά με σκληρό ξύλο δέντρα ή πάνω σε πεσμένους κορμούς δέντρων (Phillips, 2006) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Ο μύκητας *Pleurotus ostreatus* πάνω σε πεσμένους κορμούς δέντρων.

Το γένος *Pleurotus* περιλαμβάνει είδη μυκήτων, μεταξύ των πιο αποδοτικών όσο αφορά την παραγωγή κυτταρινολιγνινολυτικών ενζύμων, και τα οποία αποτελούν μερικούς από τους πιο αποτελεσματικούς αποικοδομητές της λιγνίνης στη φύση (Kamitsutji et al., 2004). Μύκητες του γένους *Pleurotus* αναφέρονται ως ικανοί αποδομητές βιομηχανικών χρωμάτων, φαινολών, πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAH), και υγρών αποβλήτων (Cohen et al., 2002). Οι Bazalel et al., (1996), έδειξαν ότι ο μύκητας λευκής σήψης *P. ostreatus* έχει την ικανότητα να αποδομεί πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες όπως τα πυρένιο, ανθρακένιο, φλουορένιο και διβενζοθειοφαίνιο.

Τα λιγνολυτικά ένζυμα που παράγει ο μύκητας *P. ostreatus* είναι, η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP, εξαρτώμενη ή μη του Mn), η λακκάση (laccase), αλλά όχι η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) που απαντάται στους περισσότερους μύκητες λευκής σήψης (Sainjust et al., 1991, Tsioulpas et al., 2002, Funtulakis et al., 2002).

1.5.4. *Trametes versicolor*

Ο μύκητας *T. versicolor*, που άλλοτε είναι γνωστός ως *Coriolus versicolor* και *Polyporus versicolor*, είναι ένας πολύ κοινός μύκητας και βρίσκεται σε πολλά μέρη παγκοσμίως. Ανήκει στην κλάση *Agaricomycetes*, της τάξης *Poriales*, της οικογένειας *Poriceae* του γένους *Trametes*. Πήρε το όνομά του, "versicolor", από το γεγονός ότι εμφανίζεται σε μία ευρεία ποικιλία διαφορετικών χρωμάτων (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Ο μύκητας *Trametes versicolor*.

Η ικανότητα του μύκητα *T. 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., 2004). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι ο *T. versicolor* έχει την δυνατότητα να αποδομεί πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Pointing, 2001), και ΦΟ όπως diuron, atrazine, terbuthylazine, chlorpyrifos, simazine, dieldrin και trifluralin (Bending et al., 2002, Fragoeiro and Magan, 2005).

1.6. Σκοπός του πειράματος

Η σύγχρονη φυτοπροστασία στηρίζεται ακόμη σε σημαντικό βαθμό στη χρήση ΦΟ. Τα υγρά απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων, συνιστούν σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα, καθώς παρουσιάζουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων όπως TBZ, IMZ, DPA, OPP και TM. Η συνήθης πρακτική που εφαρμόζεται στην Ελλάδα είναι η απευθείας απόρριψή τους σε υδάτινους αποδέκτες. Η ελευθέρωση στο περιβάλλον αυτών των ΦΟ, ξένων προς το οικοσύστημα, συνεπάγεται σημαντικούς κινδύνους.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της αποδόμησης των ΦΟ TBZ, IMZ, DPA, OPP και TM καθώς και του κυριότερου μεταβολίτη του τελευταίου, MBC, σε ρεαλιστικές συγκεντρώσεις σύμφωνα με την πρακτική τους εφαρμογή. Η μελέτη της αποδόμησης των ΦΟ έγινε με τη χρήση επιλεγμένων μυκήτων λευκής σήψης και ενός ασκομύκητα. Η ανάπτυξη των μυκήτων έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος άχυρου (Straw Extract Media, StEM) και εκχυλίσματος εδάφους (Soil Extract Media, SEM). Ο προσδιορισμός της αποδόμησης 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.

Η παρούσα ερευνητική εργασία αποτελεί συνέχιση των πτυχιακών εργασιών του κ. Π. Καρα και της C. Perucchon που μελέτησαν αρχικά την διάσπαση χαμηλών συγκεντρώσεων των IMZ, chlorpyrifos, DPA, TBZ και OPP σε StEM και SEM και έδωσαν το έναυσμα για την συνέχιση αυτής της μελέτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Μύκητες

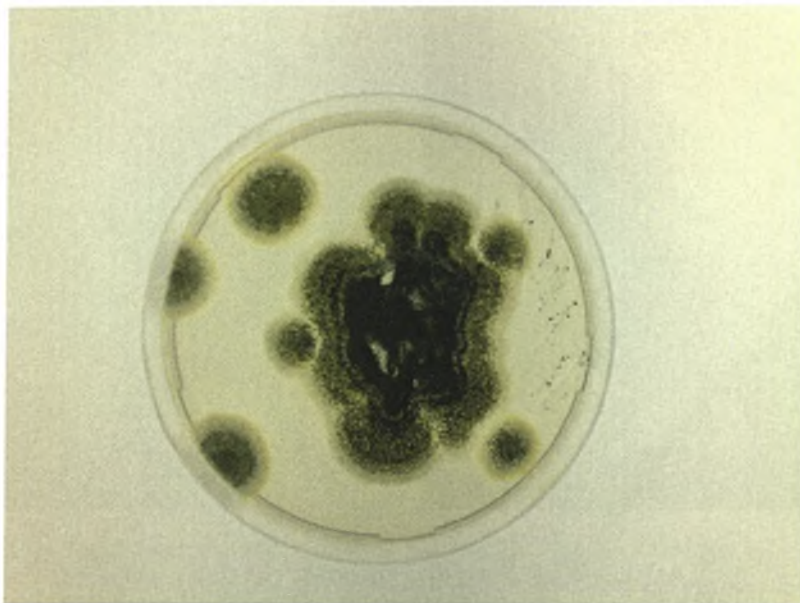
Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τρεις μύκητες λευκής σήψη και ένας ασκομύκητας. Τα στελέχη των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αγοράστηκαν από το τράπεζα μικροοργανισμών DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) και ήταν τα παρακάτω:

- *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 10). Ανακαλλιέργειες του μύκητα πραγματοποιούνταν ανά 20 ημέρες.



Εικόνα 10: Καλλιέργεια του μύκητα *Aspergillus niger* σε PDA.

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

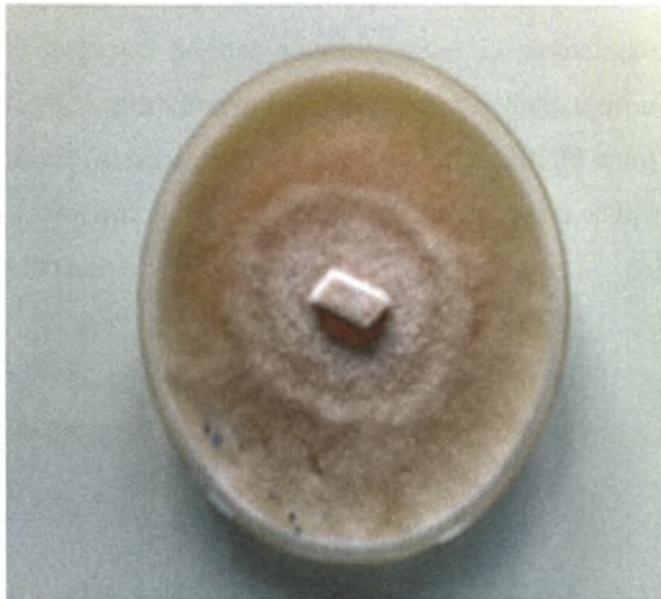
Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος *Malt Extract Agar (MEA)* αναμίχθηκαν 30 g malt extract, 3 g soya peptone, 15 g άγαρ και 1 L απιονισμένο νερό. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C υπό πίεση 2.1 atm για 20 min και στην συνέχεια το θρεπτικό υπόστρωμα επιστρώθηκε σε τριβλία Petri υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τριβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα MEA χρησιμοποιήθηκαν, για την καλλιέργεια των μυκήτων λευκής σήψης *P. ostreatus*, *P.chrysosporium* και *T. versicolor* (Εικόνα 11). Ανακαλλιέργειες των μυκήτων πραγματοποιούνταν ανά 20 ημέρες.



(α)



(β)



γ)

Εικόνα 11: Καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης α) *P. ostreatus*, β) *T. versicolor*, γ) *P. chrysosporium* σε MEA.

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 8 min και το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης διηθήθηκε και επαναπαστευρώθηκε στους 121°C υπό πίεση 2.1 atm για 30 min.

2.2.4. Παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος εκχυλίσματος εδάφους (SEM).

Για την προετοιμασία ενός λίτρου υγρού θρεπτικού υποστρώματος SEM, αναμίχθηκαν 500 g ξηρού βάρους εδάφους 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 8 min και το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης διηθήθηκε και επαναπαστευρώθηκε στους 121°C υπό πίεση 2.1 atm για 30 min.

2.3. Μέθοδοι ανάλυσης ΦΟ σε σύστημα HPLC

2.3.1 Σύστημα HPLC

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

2.3.2. Διαλύτες και ΦΟ

Για την προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων ΦΟ και κινητής φάσης για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό HPLC grade (Merck GmbH, Germany), ορθοφωσφορικό οξύ και NH₄OH proAnalysis grade (AppleChem). Για την ανάλυση και τον περαιτέρω πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικά πρότυπα ΦΟ υψηλής καθαρότητας (Riedel-del Haen GmbH, Germany) όπως, TM (99.6%), MBC (99.2%), TBZ (99.9%), IMZ (99.8%), OPP (99.9%), DPA (99.9%).

2.3.3. Καμπύλες αναφοράς

Ο ποσοτικός προσδιορισμός όλων των ΦΟ πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον λόγο αυτό αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 1000 µg/ml για όλα τα ΦΟ που μελετήθηκαν σε μεθανόλη. Ακολούθως παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 10, 5, 2, 1, 0.5 και 0.1 µg/ml σε μεθανόλη με διαδοχικές αραιώσεις, εκτός από το TM όπου τα πρότυπα διαλύματα έγιναν σε διάλυμα ακετονιτρίλιο:νερό (50:50 κ.ο.) 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 της ΦΟ 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 όλες τις ΦΟ και τα προϊόντα μεταβολισμού τους πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (0.5, 2 και 10 µg/ml) ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εκχύλισης και παραλαβής των υπολειμμάτων των ΦΟ από τα δείγματα των υγρών καλλιιεργειών των μυκήτων. Τα επίπεδα ανάκτησης για όλες τις ΦΟ και σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης ήταν > 80%.

2.3.5. Εκχύλιση και προσδιορισμός των υπολειμμάτων του μυκητοκτόνου *Imazalil*.

Για την εκχύλιση των υπολειμμάτων του IMZ από τις υγρές καλλιέργειες των μυκήτων παραλήφθησαν 0.5 ml StEM 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.

Για τον προσδιορισμό του μυκητοκτόνου IMZ κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη όπως έχει ήδη περιγραφεί. Η έκλυση του IMZ στο σύστημα HPLC έγινε ισοκρατικά με κινητή φάση μεθανόλη (80%) + υδατικό διάλυμα NH_3 0.25% (20%). Η ανίχνευση του IMZ πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 204 nm και ο χρόνος κατακράτησης του ήταν 4.7 min.

2.3.6. Εκχύλιση και προσδιορισμός των υπολειμμάτων των *Thiabendazole* και *2-phenyl phenol*.

Η εκχύλιση των υπολειμμάτων των TBZ και OPP από τα δείγματα υγρής καλλιέργειας των μυκήτων ήταν όπως έχει ήδη περιγραφεί για το μυκητοκτόνο IMZ. 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.

2.3.7. Εκχύλιση και προσδιορισμός των υπολειμμάτων του *Diphenylamine*.

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 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.

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

2.3.8. Εκχύλιση και προσδιορισμός των υπολειμμάτων των *Thiophanate methyl* και *Carbendazim*.

Για την εκχύλιση των υπολειμμάτων του μυκητοκτόνου TM από τις υγρές καλλιέργειες των μυκήτων, χρησιμοποιήθηκε η εξής μέθοδος εκχύλισης: 1 ml υποστρώματος απομακρύνθηκε από κάθε κωνική φιάλη και τοποθετήθηκε σε γυάλινα φιαλίδια στα οποία στη συνέχεια προστέθηκε 4 ml οξικού αιθυλεστέρα. Τα δείγματα αναμίχθηκαν σε vortex για 30 sec σε μέγιστη ταχύτητα. Κατόπιν πάρθηκαν 3 ml από την οργανική φάση και αφέθηκαν έως πλήρης εξάτμισης σε σύστημα περιστροφικού εξατμιστήρα. Τέλος τα υπολείμματα επαναδιαλύθηκαν με 1 ml μίγματος ακετονιτρίλιου: νερού (50:50). Το δείγμα συλλέχτηκε σε HPLC φιαλίδια (1.8 ml) και αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC.

Για τον προσδιορισμό του TM και του προϊόντος μεταβολισμού του, MBC κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη όπως έχει ήδη περιγραφεί. Η έκλυση και ο διαχωρισμός των δύο μυκητοκτόνων έγινε ισοκρατικά με κινητή φάση ακετονιτρίλιο (30%) + νερό (70%) + ορθοφωσφορικό οξύ (0.01%). Η ανίχνευση των TM και MBC πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 270 nm και οι χρόνοι κατακράτησης ήταν 11.0 και 1.6 min αντίστοιχα.

2.4. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας

2.4.1. 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 – sulfonic 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)

2.4.2. 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 φασματοφωτομετρικά 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 νατρίου), 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:

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)

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

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση (μη εξαρτημένου του Mn) πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά 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 = Independent peroxidase activity + 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:

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

2.4.4. Προσδιορισμός της δράσεως του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά 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 MnSO_4 συγκέντρωσης 20 mM. 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. 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:

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

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

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

2.4.5. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου οξειδάση της βερατρυλικής αλκοόλης

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της οξειδάσης της βερατρυλικής αλκοόλης πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά 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.

2.4.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου λιγνίνη υπεροξειδάση

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της λιγνίνης υπεροξειδάσης πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά 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 (H₂O₂) 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.

2.5. Πειράματα διάσπασης μυκητοκτόνων

2.5.1. Μελέτη της διάσπασης των *Thiophanate methyl* και *Thiabendazole* από τους μύκητες *T. versicolor*, *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* και *A. niger*

Για την μελέτη της αποδόμησης των μυκητοκτόνων TM και TBZ χρησιμοποιήθηκαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος άχυρου (StEM) και εκχυλίσματος εδάφους (SEM). Αρχικά προετοιμάστηκε πυκνό διάλυμα (10.000 mg/L) σε ακετόνη. 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 1000 ml αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Το διάλυμα που προέκυψε (υπόστρωμα + μυκητοκτόνο) τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για διάστημα 30 λεπτά της ώρας ώστε να επιτευχθεί πλήρης διαλυτοποίηση του μυκητοκτόνων. Από την διαδικασία αυτή προέκυψαν υγρά θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν τα μυκητοκτόνα σε συγκέντρωση 20 mg/L. Για κάθε στέλεχος μύκητα τοποθετήθηκαν 30 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος 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 12).

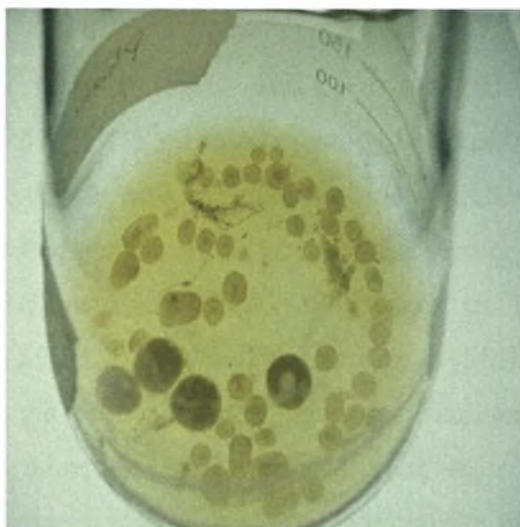
Ύστερα από επώαση τριών ημερών σε όλες τις κωνικές φιάλες προστέθηκαν άλλα 30 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος + μυκητοκτόνο (συγκεντρώσεως 20 mg/L), με αποτέλεσμα την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης των μυκητοκτόνων στην υγρή καλλιέργεια 10 mg/L. Στην συνέχεια, οι κωνικές φιάλες επανατοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στις ίδιες συνθήκες επώασης. Παράλληλα με τις εμβολιασμένες καλλιέργειες των μυκήτων, χρησιμοποιήθηκαν και τρεις κωνικές φιάλες που περιείχαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα + 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 εννιά φιάλες καθώς ο μύκητας *A. niger* δεν

παράγει λιγνολυτικά ένζυμα) που περιείχαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς μυκητοκτόνο για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας από τους μύκητες εν τη απουσία των μυκητοκτόνων.

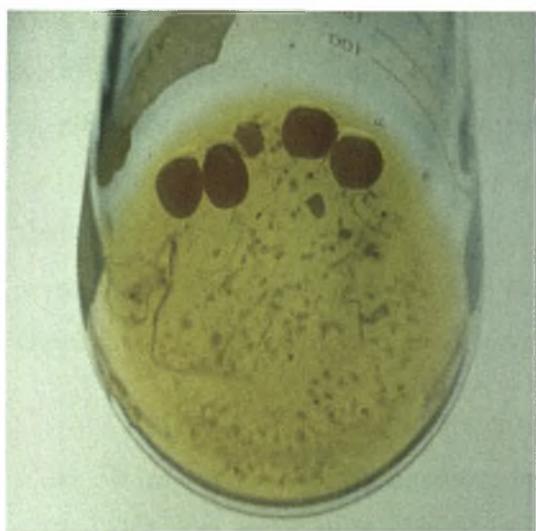
Αμέσως μετά την προσθήκη των μυκητοκτόνων στις καλλιέργειες (χρόνος 0) αλλά και (2 ώρες) 2, 5, 10, 15, 20 και 30 ημέρες αργότερα ελήφθησαν δείγματα της υγρής καλλιέργειας για την μελέτη τόσο της αποδόμησης των μυκητοκτόνων όσο και για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας των μυκήτων. Σε κάθε 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.



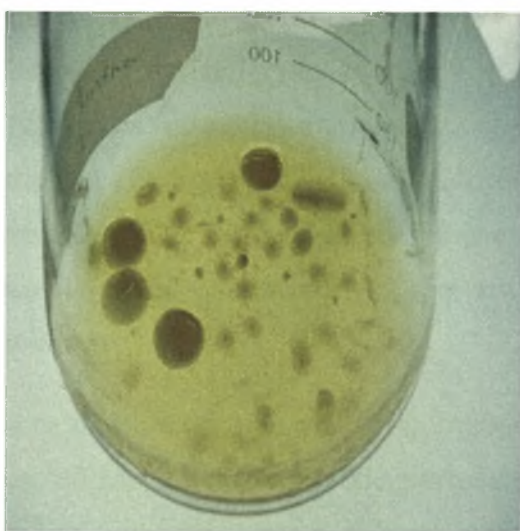
α)



β)



γ)



δ)

Εικόνα 12: Υγρές καλλιέργειες των μυκήτων α) *A. niger*, β) *P. chrysosporium*, γ) *P. ostreatum*, δ) *T. versicolor*.

2.5.2. Αποδόμηση υψηλών συγκεντρώσεων των *Thiabendazole*, *Orthophenylphenol*, *Imazalil* και *Diphenylamine* από τον μύκητα *T. versicolor*.

Αρχικά προετοιμάστηκε πυκνό διάλυμα (10,000 mg/L) για κάθε ένα από τα παραπάνω μυκητοκτόνα σε ακετόνη. Ποσότητα 0.1 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 λεπτά της ώρας ώστε να επιτευχθεί πλήρης διαλυτοποίηση των μυκητοκτόνων. Από την διαδικασία αυτή προέκυψαν υγρά θρεπτικά υποστρώματα StEM που περιείχαν τα μυκητοκτόνα σε συγκέντρωση 100 mg/L. Σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 250 ml σε ασηπτικές συνθήκες τοποθετήθηκαν 30 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος StEM (χωρίς μυκητοκτόνο) και ακολούθησε εμβολιασμός με το μύκητα *T. versicolor* 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.). Προετοιμάστηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε ΦΟ και 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 .

Ύστερα από επώαση τριών ημερών σε όλες τις κωνικές φιάλες προστέθηκαν άλλα 30 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος StEM + μυκητοκτόνο (συγκέντρωσεως 100 mg/L), με αποτέλεσμα την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης των μυκητοκτόνων στην υγρή καλλιέργεια 50 mg/L. 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 και οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν με κανένα από τους μύκητες και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες αβιοτικής αποδόμησης των μυκητοκτόνων. 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 της αποδόμησης των μυκητοκτόνων . Σε κάθε δειγματοληψία παραλαμβάνονταν 0,5 ml για ανάλυση σε σύστημα HPLC.

2.5.3. Αποδόμηση μιγμάτων μυκητοκτόνων από το μύκητα *T. versicolor*

Στο πείραμα αυτό μελετήθηκε η αποδομητική ικανότητα του μύκητα *T. versicolor* σε μίγματα των μυκητοκτόνων έτσι όπως χρησιμοποιούνται στην πράξη. Συνεπώς το πρώτο μίγμα αποτελούνταν από τα TM + DPA ενώ το δεύτερο από τα μυκητοκτόνα TBZ + OPP + IMZ. Για την μελέτη της αποδόμησης των TM + DPA και TBZ + OPP + IMZ χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος άχυρου (StEM). Αρχικά προετοιμάστηκε πυκνό διάλυμα (10,000 µg/ml) για κάθε ένα από τα DPA, TM, IMAZ, OPP και TBZ σε ακετόνη. Ποσότητα 2 ml από τα πρότυπα διαλύματα των TBZ, IMZ και OPP τοποθετήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες στον πυθμένα δοχείου DURAN (1 L) και ποσότητα 2 ml από τα πρότυπα διαλύματα των TM και DPA τοποθετήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες στον πυθμένα ενός δεύτερου δοχείου DURAN (1 L). Τα δύο δοχεία DURAN αφέθηκαν εντός του θαλάμου νηματικής ροής ώστε να εξατμιστούν πλήρως. Με την ολοκλήρωση της εξάτμισης τα υπολείμματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 1000 ml αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα StEM. Τα διαλύματα που προέκυψαν (StEM + μυκητοκτόνα) αναδεύτηκαν με μαγνητάκι για διάστημα μίας ώρας και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για διάστημα 30 λεπτά της ώρας ώστε να επιτευχθεί πλήρης διαλυτοποίηση των μυκητοκτόνων. Από την διαδικασία αυτή προέκυψαν υγρά θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν τα μυκητοκτόνα σε συγκέντρωση 100 mg/L. Τοποθετήθηκαν 30 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος StEM χωρίς μυκητοκτόνο σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 250 ml. Για κάθε μείγμα ΦΟ υπήρχαν 3 κωνικές φιάλες οι οποίες εμβολιάστηκαν με τον μύκητα *T. versicolor* σε ασηπτικές συνθήκες με προσθήκη τεσσάρων εμβολίων από το τρυβλίο. 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 του μύκητα .

Ύστερα από επώαση τριών ημερών σε όλες τις κωνικές φιάλες προστέθηκαν άλλα 30 ml υγρού θρεπτικού StEM + μυκητοκτόνα (συγκεντρώσεως 100 mg/L), με αποτέλεσμα την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης των μυκητοκτόνων στην υγρή καλλιέργεια 50 mg/L. Στην συνέχεια, οι κωνικές φιάλες επανατοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στις ίδιες συνθήκες επώασης. Παράλληλα με τις εμβολιασμένες καλλιέργειες των μυκήτων, χρησιμοποιήθηκαν και τρεις κωνικές φιάλες που περιείχαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα StEM + μυκητοκτόνα (60 ml) και οι οποίες δεν

εμβολιάστηκαν με τον μύκητα και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες αβιοτικής αποδόμησης των μυκητοκτόνων.

Αμέσως μετά την προσθήκη των μυκητοκτόνων στις καλλιέργειες (χρόνος 0) αλλά και 5, 10, 15, 20 και 30 ημέρες αργότερα ελήφθησαν δείγματα της υγρής καλλιέργειας για την μελέτη της αποδόμησης των μυκητοκτόνων. Σε κάθε δειγματοληψία παραλαμβάνονταν για το 1 ml για τα TBZ, OPP, IMZ και TM και 0,5 ml για το DPA από τις κωνικές που περιείχαν ΦΟ και τοποθετούνταν σε γυάλινα φιαλίδια για ανάλυση σε σύστημα HPLC όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

2.6. 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 η παρουσία ή όχι ΦΟ στο θρεπτικό μέσο 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 καλλιεργειών του ίδιου μύκητα παρουσία ή απουσία της ΦΟ, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

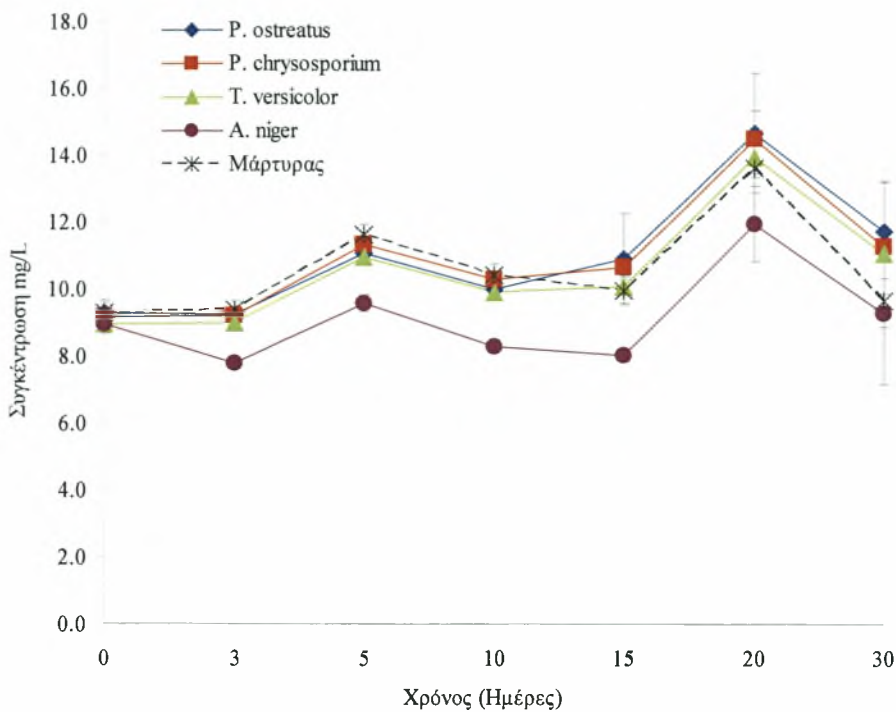
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Γενικά

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των μυκήτων λευκής σήψης *P. ostreatus*, *P. chrysosporium*, *T. versicolor* και του ασκομύκητα *A. niger* για την αποδόμηση των TBZ, IMZ, OPP, DPA και TM.. 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 χαμηλότερες αλλά ανάλογες με της τιμές του ενζύμου MnP. Για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζονται διαγραμματικά τα αποτελέσματα από την δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου.

3.2. Αποδόμηση του μυκητοκτόνου TBZ και ενζυμική δραστηριότητα

α) SEM: Κανένας από τους μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν δεν κατάφερε να αποδομήσει το TBZ στο υπόστρωμα SEM κατά τη διάρκεια των 30 ημερών που διήρκησε το πείραμα (Διάγραμμα 1).

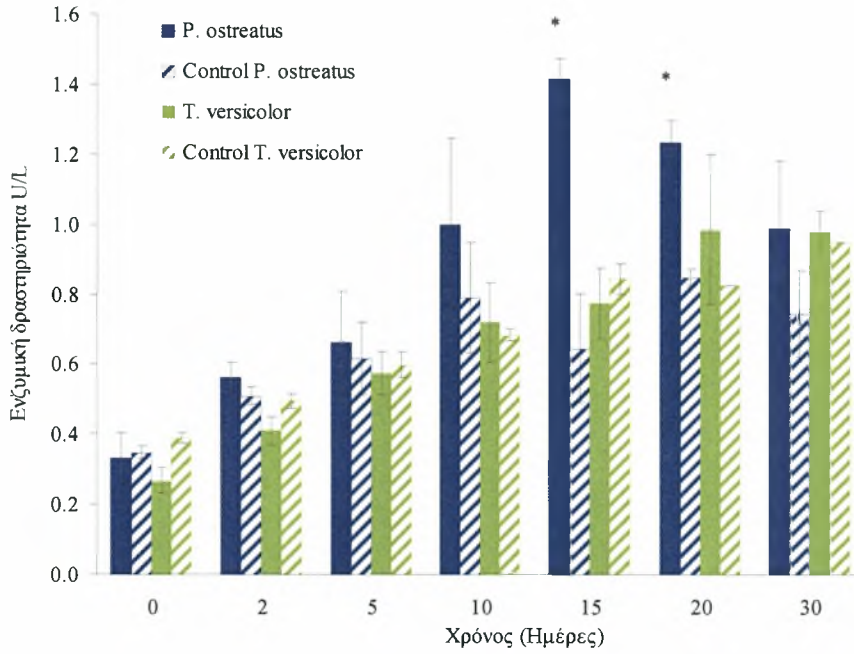


Διάγραμμα 1: Αποδόμηση του TBZ σε καλλιέργειες SEM που εμβολιάστηκαν με τους μύκητες *P. ostreatus*, *P. chrysosporium*, *T. versicolor* και *A. niger* και σε καλλιέργεια SEM χωρίς μύκητα (μάρτυρας). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

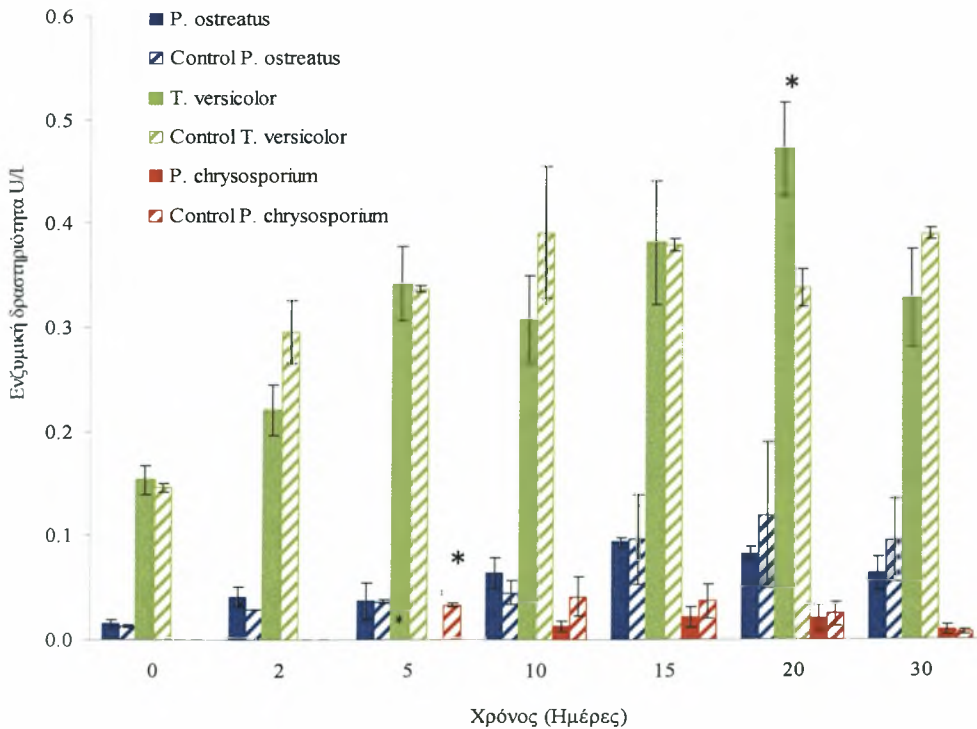
Μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων Lac (Διάγραμμα 2α) και MnP (Διάγραμμα 2β) έδειξαν ότι οι μύκητες *P. ostreatus* και *T. versicolor* παράγουν και τα δύο ένζυμα ενώ στις καλλιέργειες του μύκητα *P. chrysosporium* ανιχνεύτηκε μόνο MnP. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές MnP ($P < 0.05$) στις καλλιέργειες του μύκητα *T. versicolor* σε σχέση με τους υπόλοιπους μύκητες λευκής σήψης και ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι του μυκητοκτόνου TBZ (Διάγραμμα 2β). Ανάλυση παραλλακτικότητας έδειξε ότι ο χρόνος επώασης επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ενζυμική δραστηριότητα των Lac και MnP ($P < 0.001$) με τις μέγιστες τιμές να παρατηρούνται σε όλους τους μύκητες στις 20 ως 30 ημέρες από την προσθήκη της ΦΟ (Παράρτημα Πίνακες 1 και 2). Από την άλλη μεριά, η παρουσία TBZ προκάλεσε σημαντική αύξηση ($P < 0.001$) της ενζυμικής δραστηριότητας της Lac μόνο στην περίπτωση του *P. ostreatus* και ιδιαίτερα στις 15 και 20 ημέρες μετά την προσθήκη του TBZ (Διάγραμμα 2α). Αντίθετα, η παρουσία TBZ προκάλεσε σημαντική μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της MnP στις

καλλιέργειες του *P. chrysosporium* με σημαντικές διαφορές να παρουσιάζονται στις 5 ημέρες μετά την προσθήκη του TBZ (Διάγραμμα 2β).

α)

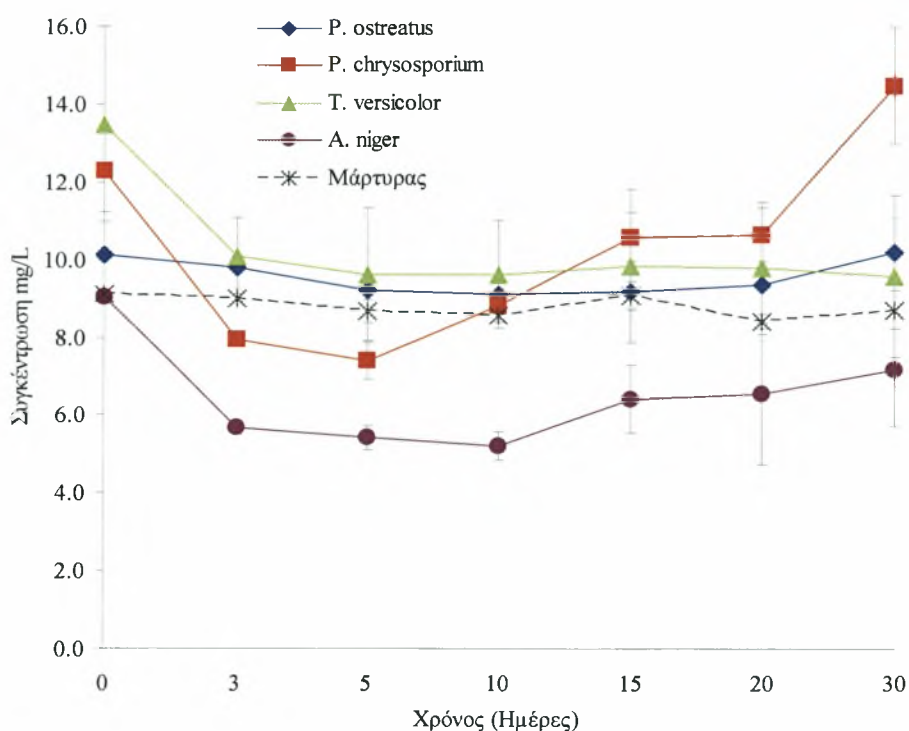


β)



Διάγραμμα 2: Η δραστηριότητα των ενζύμων Lac (α) και MnP (β) στις καλλιέργειες SEM των μυκήτων λευκής σήψης παρουσία ή απουσία του TBZ. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Στήλες που έχουν σημειωθεί με (*) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) στην ενζυμική δραστηριότητα μεταξύ καλλιεργειών με ή χωρίς ΦΟ στον ίδιο χρόνο.

β) StEM: Όπως συνέβη και στο υπόστρωμα SEM, έτσι και στις καλλιέργειες StEM που εμβολιάστηκαν με τους μύκητες *P. ostreatus*, *P. chrysosporium*, *T. versicolor* και *A. niger*, δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση του TBZ (Διάγραμμα 3).

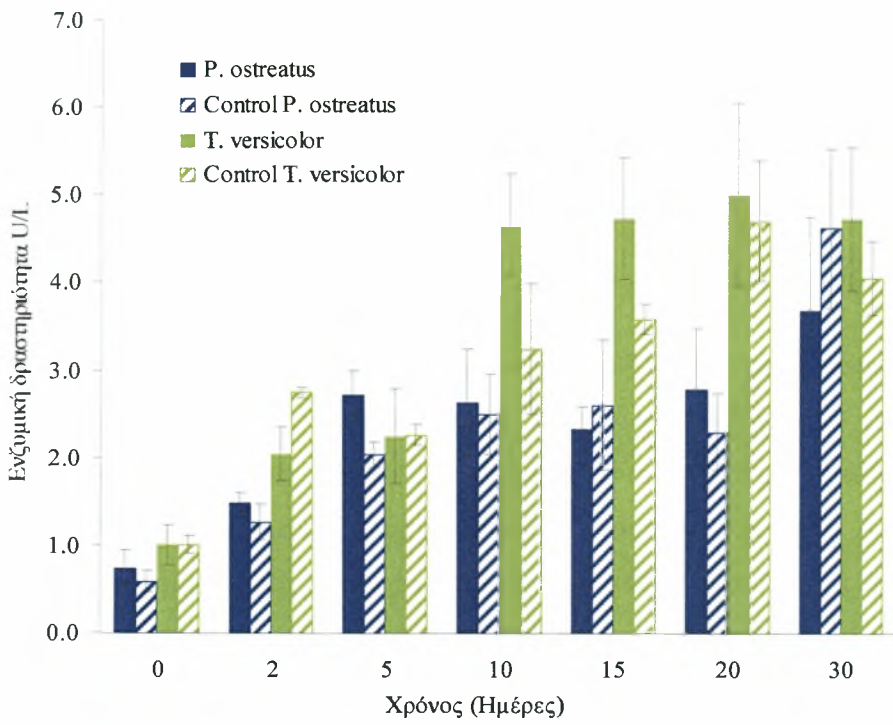


Διάγραμμα 3: Αποδόμηση του TBZ σε καλλιέργειες StEM που εμβολιάστηκαν με τους μύκητες *P. ostreatus*, *P. chrysosporium*, *T. versicolor* και *A. niger* και σε καλλιέργεια StEM χωρίς μύκητα (μάρτυρας). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

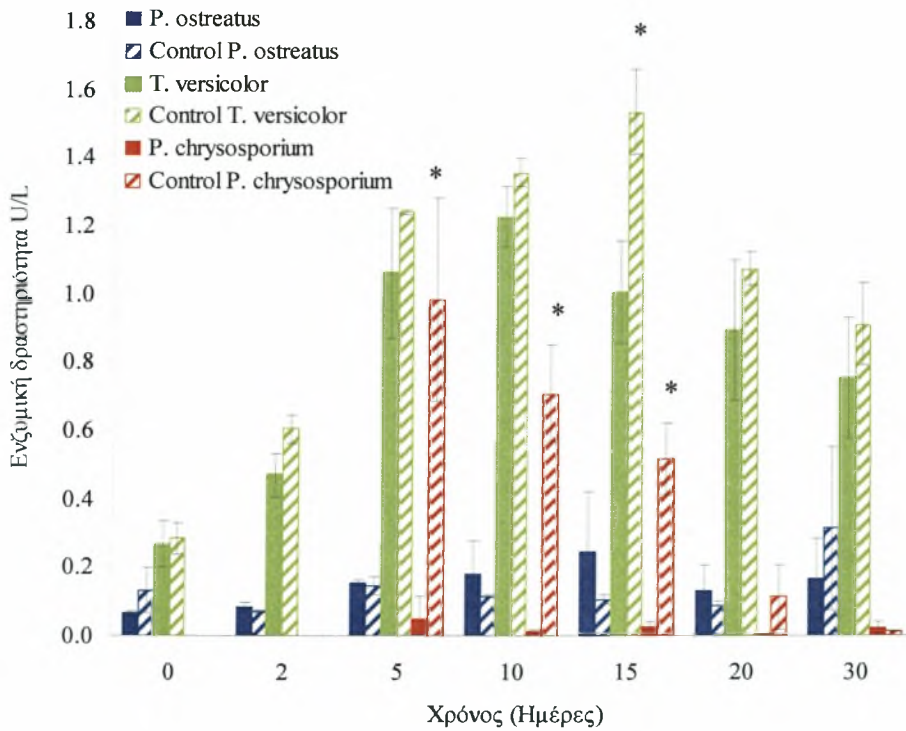
Μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας των Lac (Διάγραμμα 4α) και MnP (Διάγραμμα 4β) έδειξαν ότι οι μύκητες *P. ostreatus* και *T. versicolor* παράγουν και τα

δύο ένζυμα ενώ στις καλλιέργειες του μύκητα *P. chrysosporium* ανιχνεύτηκε μόνο MnP. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές MnP ($P < 0.05$) στις καλλιέργειες του μύκητα *T. versicolor* σε σχέση με τους υπόλοιπους μύκητες λευκής σήψης και ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι του μυκητοκτόνου TBZ (Διάγραμμα 4β). Οι τιμές ενζυμικής δραστηριότητας που ανιχνεύθηκαν στο StEM ήταν πολλαπλάσιες των αντιστοίχων τιμών που μετρήθηκαν σε SEM για τους ίδιους μύκητες (Διάγραμμα 2). Ανάλυση παραλλακτικότητας έδειξε ότι όπως και στο SEM η ενζυμική δραστηριότητα αυξάνεται σημαντικά στις καλλιέργειες όλων των μυκήτων με τον χρόνο επώασης ($P < 0.001$) (Παράρτημα Πίνακες 3 και 4) με τις μέγιστες τιμές και για τα δύο ένζυμα να εμφανίζονται συνήθως στις 20 και 30 ημέρες (Διάγραμμα 4). Η προσθήκη του TBZ δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές ($P > 0.05$) στη δραστηριότητα των ενζύμων MnP και Lac στις περισσότερες περιπτώσεις με εξαίρεση την σημαντική αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της Lac που παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες του μύκητα *T. versicolor* ($P < 0.001$) και την σημαντική μείωση της MnP στις καλλιέργειες των *T. versicolor* και *P. chrysosporium* (Παράρτημα Πίνακες 3 και 4). Ιδιαίτερα για τον μύκητα *P. chrysosporium* η προσθήκη TBZ προκάλεσε σημαντική ανάσχεση της δραστηριότητας του ενζύμου MnP από τις 5 μέχρι και τις 15 ημέρες (Διάγραμμα 4β).

α)



β)

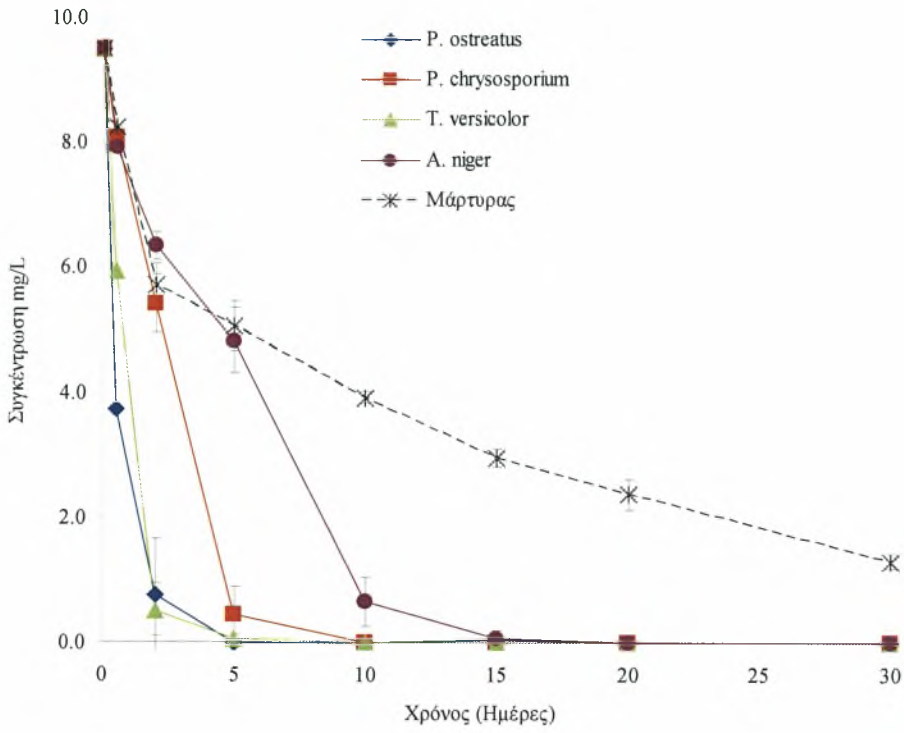


Διάγραμμα 4: : Η δράση των ενζύμων λακκάση (α) και MnP (β) στις καλλιέργειες StEM των μυκήτων λευκής σήψης παρουσία ή απουσία του TBZ. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Στήλες που έχουν σημειωθεί με (*) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) στην ενζυμική δραστηριότητα μεταξύ καλλιεργειών με ή χωρίς ΦΟ στον ίδιο χρόνο.

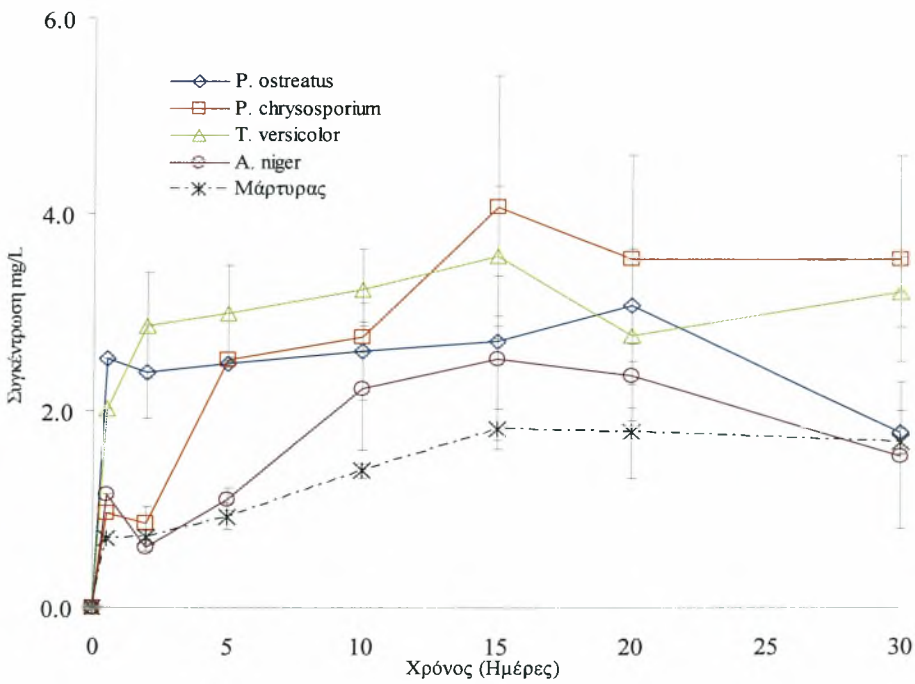
3.3. Αποδόμηση του μυκητοκτόνου TM και ενζυμική δραστηριότητα

α) SEM: Το TM αποδομήθηκε αποτελεσματικά από όλους τους μύκητες (Διάγραμμα 5α). Συγκεκριμένα, οι *P. ostreatus* και *T. versicolor* ολοκλήρωσαν την αποδόμηση του TM μέσα σε 5 μέρες, ενώ οι *P. chrysosporium* και *A. niger* χρειάστηκαν 10 και 15 μέρες αντίστοιχα για την πλήρη αποδόμηση του μυκητοκτόνου. Αποδόμηση του TM παρατηρήθηκε και στις καλλιέργειες χωρίς μύκητα αλλά με σημαντικά βραδύτερους ρυθμούς. Η αρχικά γρήγορη αποδόμηση του TM συμπίπτει με το γρήγορο σχηματισμό του μεταβολίτη του MBC (Διάγραμμα 5β). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στις καλλιέργειες του *P. chrysosporium* (4.1 mg/L) την 15^η ημέρα, ενώ χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στις καλλιέργειες των *T. versicolor* (3.6 mg/L), *P. ostreatus* (2.7 mg/L) και *A. niger* (2.5 mg/L) και στις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες (1.8 mg/L).

α)



β)

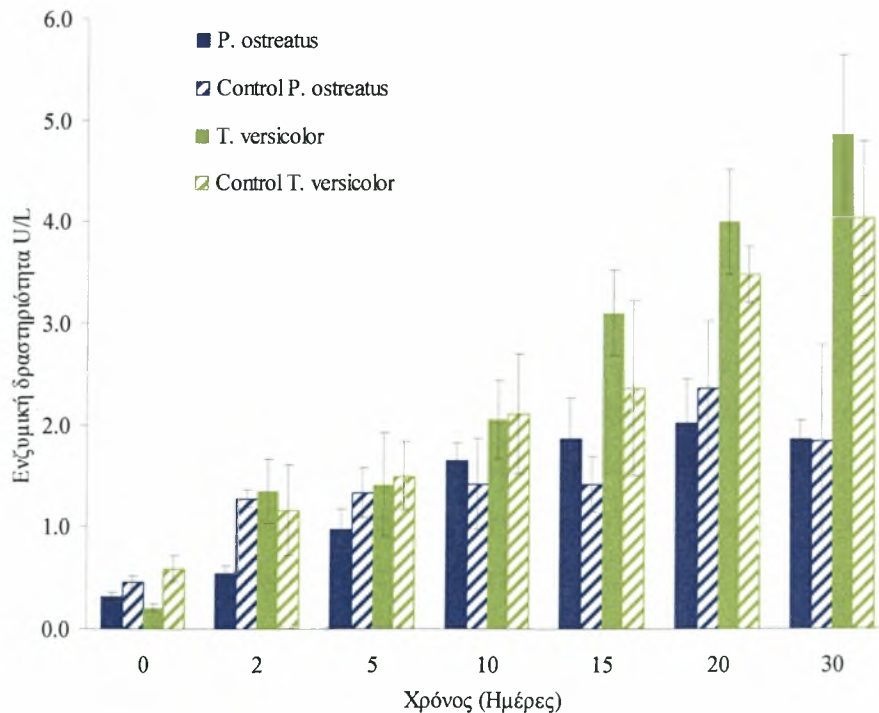


Διάγραμμα 5: Αποδόμηση του TM (α) και του μεταβολίτη του MBC (β) σε καλλιέργειες SEM που εμβολιάστηκαν με τους μύκητες *P. ostreatus*,

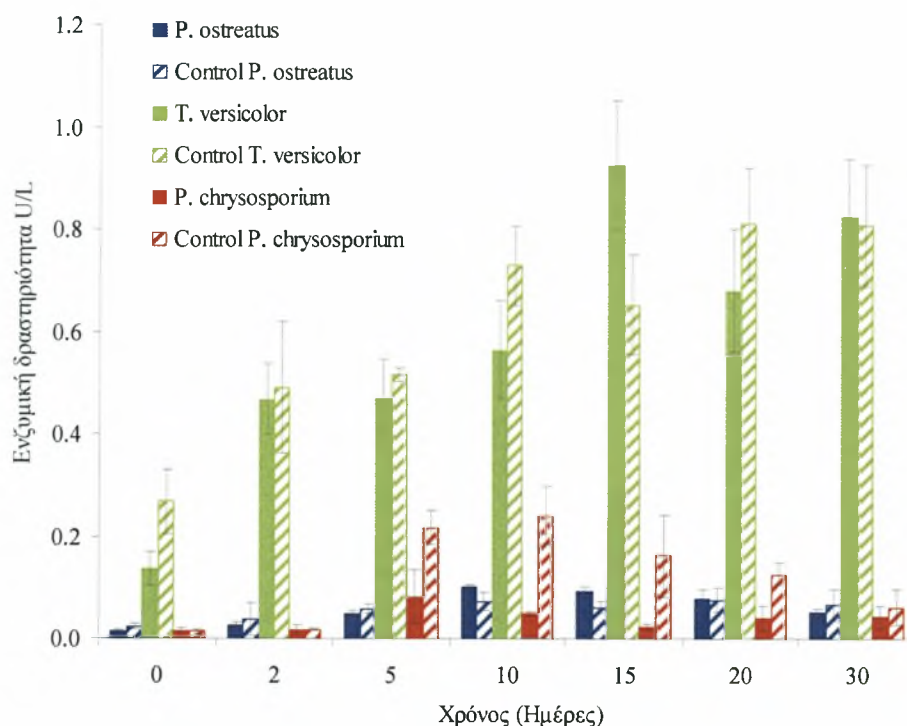
P. chrysosporium, *T. versicolor* και *A. niger* και σε καλλιέργεια SEM χωρίς μύκητα (μάρτυρας). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Αναφορικά με την ενζυμική δραστηριότητα, ανάλυση παραλλακτικότητας έδειξε ότι και πάλι ο χρόνος επώασης επηρέασε σημαντικά ($P < 0.001$) την δραστηριότητα και των δύο ενζύμων (Παράρτημα Πίνακες 5 και 6) με τις μέγιστες τιμές για Lac και MnP να παρατηρούνται μεταξύ 20-30 και 5-15 ημερών αντίστοιχα. (Διάγραμμα 6). Η παρουσία του TM δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην δραστηριότητα των ενζύμων ($P > 0.05$) Lac και MnP σε όλους του μύκητες που μελετήθηκαν (Παράρτημα Πίνακες 5 και 6). Η παρουσία του TM στις καλλιέργειες του μύκητα *P. chrysosporium* προκάλεσε μία εμφανή αλλά μη στατιστικά σημαντική ($P > 0.05$) μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου MnP σε σύγκριση με τις καλλιέργειες χωρίς TM την 5^η, 10^η και 15^η ημέρα (Διάγραμμα 6β).

α)



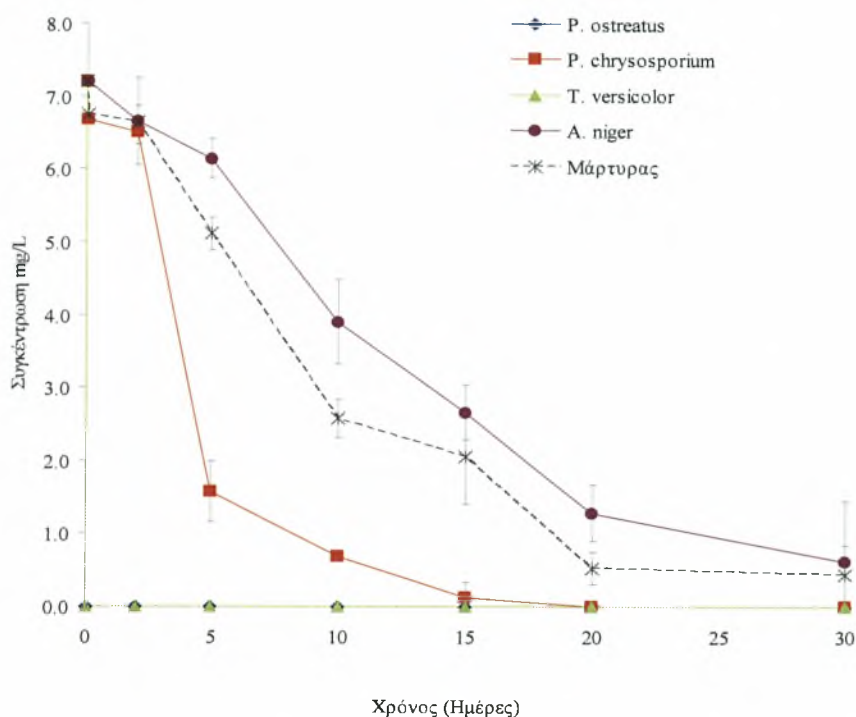
β)



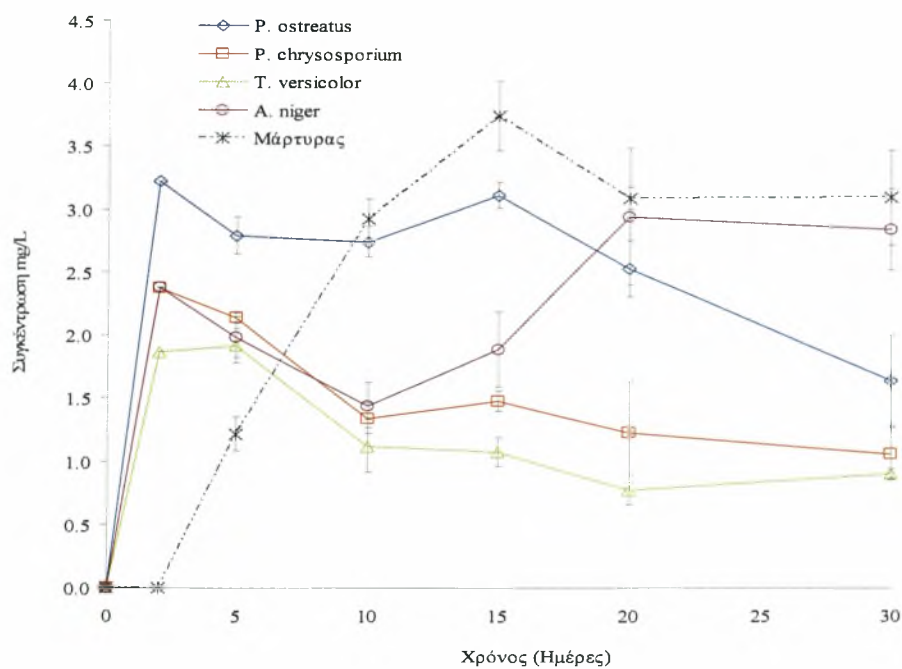
Διάγραμμα 6: Η δράση των ενζύμων Lac (α) και MnP (β) στις καλλιέργειες SEM των μυκήτων λευκής σήψης παρουσία ή απουσία του TM. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Στήλες που έχουν σημειωθεί με (*) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) στην ενζυμική δραστηριότητα μεταξύ καλλιεργειών με ή χωρίς ΦΟ στον ίδιο χρόνο.

β) StEM: Οι μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* αποδόμησαν πλήρως το TM εντός 2 ωρών από την προσθήκη του μυκητοκτόνου, ενώ ο *P. chrysosporium* χρειάστηκε 20 μέρες για να αποδομήσει πλήρως το TM (Διάγραμμα 7α). Βραδύτερη αποδόμηση του TM παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες που εμβολιάστηκαν με τον *A. niger* και στις καλλιέργειες χωρίς μύκητα (μάρτυρας). Ο κύριος μεταβολίτης του TM, το MBC, ανιχνεύθηκε σε όλες τις καλλιέργειες των μυκήτων αλλά επίσης και στις καλλιέργειες χωρίς μύκητα (Διάγραμμα 7β). Η μέγιστη συγκέντρωση του MBC παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες των *P. ostreatus* (3.2 mg/L), *T. versicolor* (2.9 mg/L) και *P. chrysosporium* (2.4 mg/L) και ο πρώιμος σχηματισμός του συμπίπτει με την γρήγορη αποδόμηση του TM.

α)



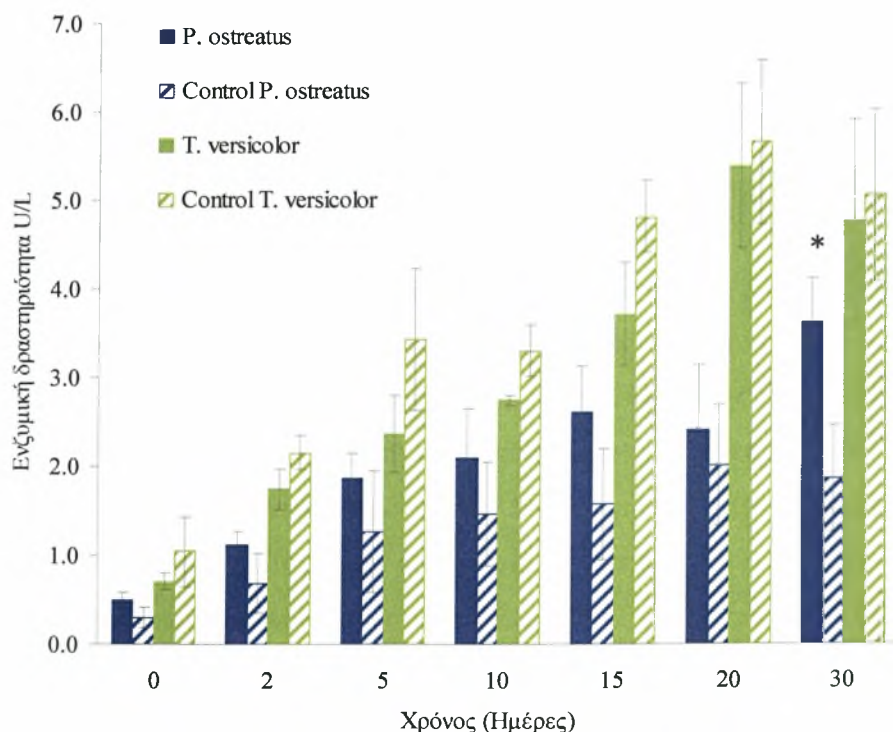
β)



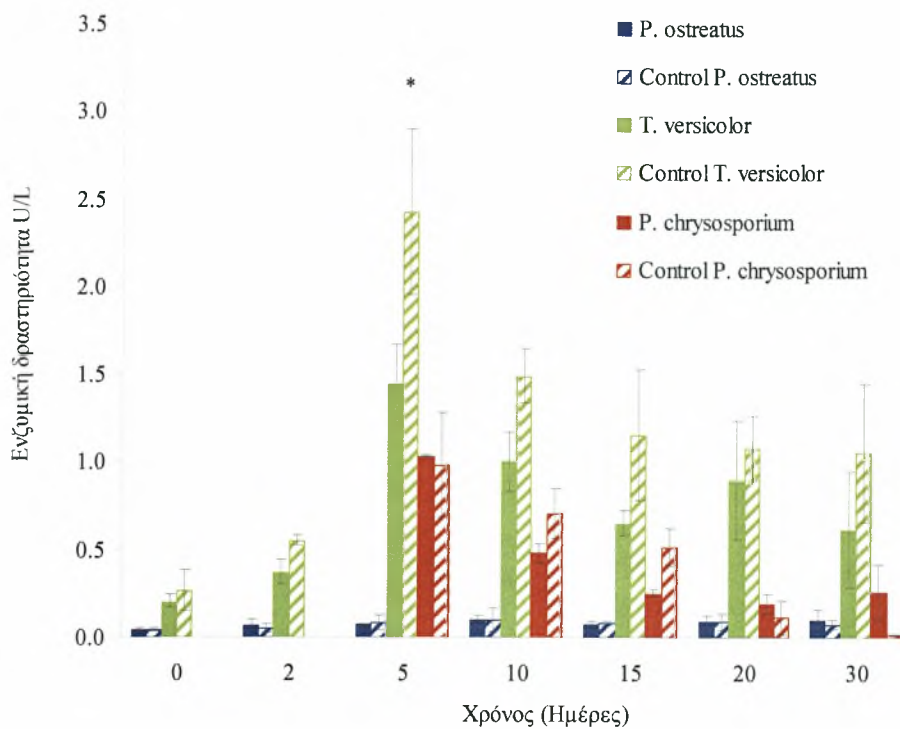
Διάγραμμα 7: Αποδόμηση του TM (α) και του μεταβολίτη του MBC (β) σε καλλιέργειες StEM που εμβολιάστηκαν με τους μύκητες *P. ostreatus*, *P. chrysosporium*, *T. versicolor* και *A. niger* και σε καλλιέργεια StEM χωρίς μύκητα (μάρτυρας). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Αναφορικά με την ενζυμική δραστηριότητα, ο χρόνος επώασης επηρέασε σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα των Lac και MnP ($P < 0.001$) (Παράρτημα Πίνακες 7 και 8) με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται μεταξύ 20-30 ημερών για την Lac και μεταξύ 5-10 ημερών για την MnP (Διαγράμματα 8α και 8β). Από την άλλη μεριά η παρουσία του TM προκάλεσε συνολικά μια σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της Lac ($P < 0.05$) στις καλλιέργειες του *P. ostreatus* και αντίθετα μια σημαντική μείωση του ίδου ενζύμου στις καλλιέργειες του *T. versicolor* (Παράρτημα Πίνακες 7 και 8). Από την άλλη μεριά η παρουσία TM προκάλεσε σημαντική μείωση της δραστηριότητας της MnP ($P < 0.001$) μόνο στις καλλιέργειες του *T. versicolor* (Παράρτημα Πίνακες 7 και 8) όπου παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου MnP ($P < 0.05$) στις 5 ημέρες μετά την προσθήκη του TM, σε σύγκριση με την δραστηριότητα του ενζύμου MnP στις καλλιέργειες των μυκήτων χωρίς TM (Διάγραμμα 8β). Γενικότερα, όπως και για το TBZ έτσι και εδώ παρατηρήθηκε μια αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα και των δύο ενζύμων στις καλλιέργειες σε υπόστρωμα StEM (Διάγραμμα 8) σε σχέση με τις αντίστοιχες καλλιέργειες των μυκήτων σε SEM (Διάγραμμα 6).

α)



β)



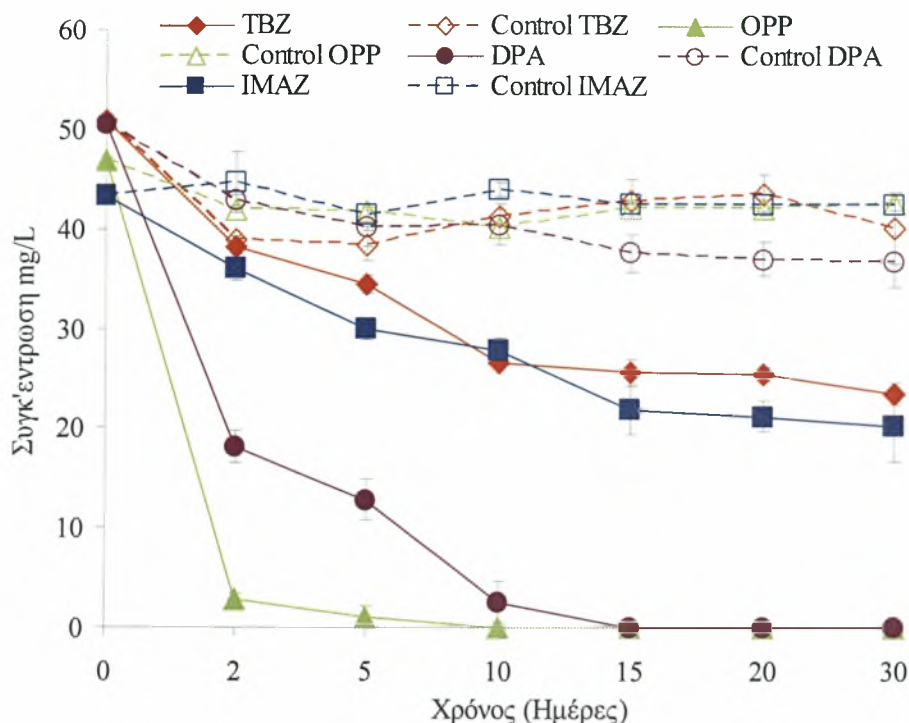
Διάγραμμα 8: Η δράση των ενζύμων λακκάση (α) και MnP (β) στις καλλιέργειες StEM των μυκήτων λευκής σήψης παρουσία ή απουσία του TM. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Στήλες που έχουν σημειωθεί με (*) παρουσιάζουν μία στατιστικά σημαντική διαφορά στην ενζυμική δραστηριότητα μεταξύ καλλιεργειών με ή χωρίς ΦΟ στον ίδιο χρόνο.

3.4. Αποδόμηση υψηλών συγκεντρώσεων των μυκητοκτόνων από τον *T. versicolor*.

Προηγούμενες πτυχιακές εργασίες από τους Π. Καρά και C. Perruchon, έδειξαν ότι η αποδόμηση των μυκητοκτόνων IMZ, OPP, DPA και του εντομοκτόνου Chlorpyrifos από τους μύκητες ήταν πιο αποδοτική στο υπόστρωμα StEM απ'ότι στο SEM και επίσης ότι ο μύκητας *T. versicolor* ήταν ο πιο αποτελεσματικός στην αποδόμηση των φυτοφαρμάκων. Γι'αυτό το λόγο στο πείραμα αυτό εκτιμήθηκε η ικανότητα του *T. versicolor* να αποδομεί υψηλότερες συγκεντρώσεις (50 mg/L) των ΦΟ TBZ, OPP, IMZ και DPA σε υπόστρωμα StEM. Οι συγκεντρώσεις αυτές ανταποκρίνονται σε ρεαλιστικά επίπεδα συγκεντρώσεων των μυκητοκτόνων σε περιβαλλοντικά δείγματα

που έχουν ρυπανθεί από υγρά απόβλητα που περιέχουν τα συγκεκριμένα μυκητοκτόνα.

Πράγματι, ο *T. versicolor* αποδόμησε πλήρως τα OPP και DPA μέσα σε 10 και 15 μέρες αντίστοιχα (Διάγραμμα 9). Αντίθετα, ο μύκητας αποδόμησε περισσότερο από 50% της αρχικής ποσότητας των TBZ και IMZ εντός 30 ημερών. Η διάσπαση όλων των μυκητοκτόνων στις καλλιέργειες του StEM που δεν εμβολιάστηκαν με μύκητα (αβιοτικός μάρτυρας) ήταν αμελητέα.



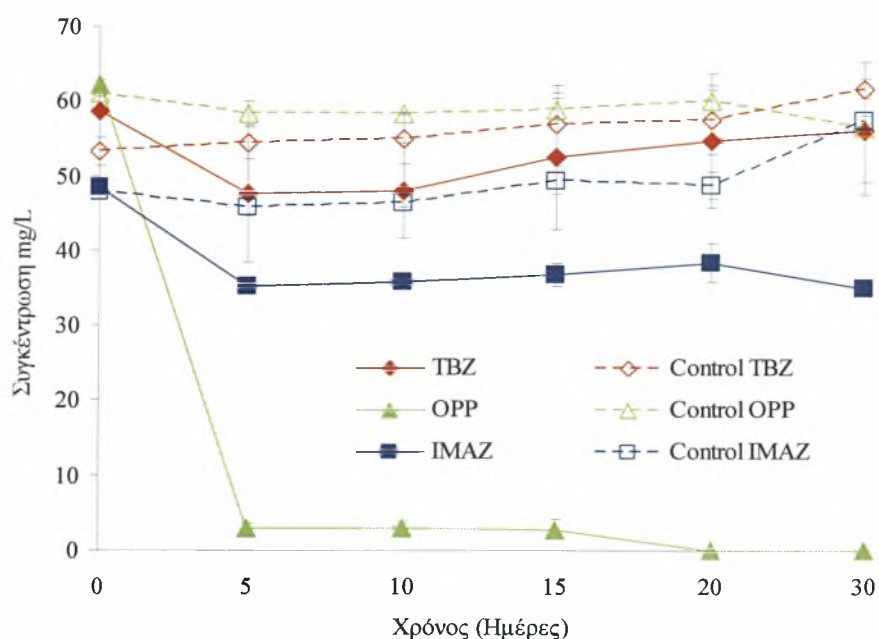
Διάγραμμα 9: Η αποδόμηση υψηλών συγκεντρώσεων (50 mg/L) των TBZ, OPP, IMZ και DPA σε καλλιέργειες StEM που εμβολιάστηκαν με τον *T. versicolor* και σε καλλιέργεια StEM + ΦΟ χωρίς μύκητα. (Control). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

3.5. Αποδόμηση μιγμάτων μυκητοκτόνων από τον μύκητα *T. versicolor*

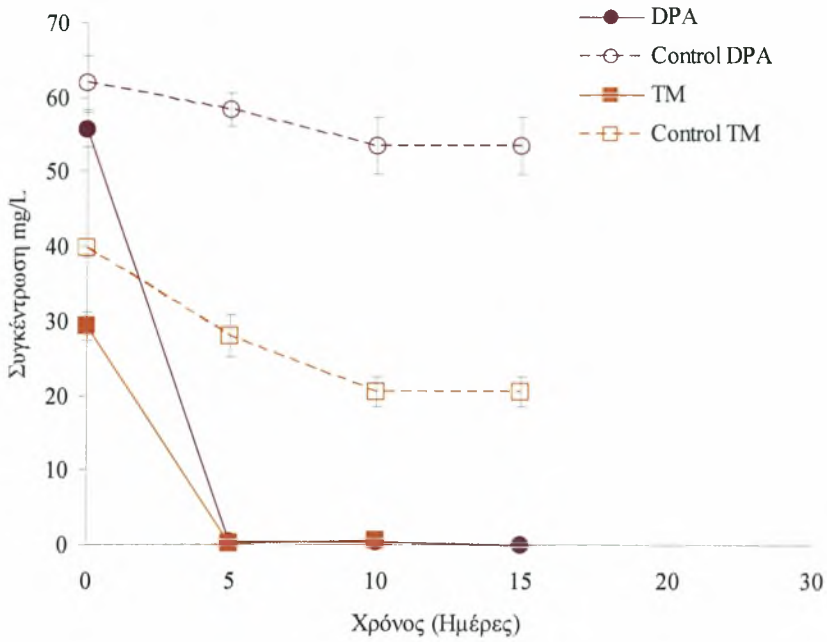
Ο μύκητας *T. versicolor* εξετάστηκε επίσης για την αποδομητική ικανότητα απέναντι σε μείγματα μυκητοκτόνων έτσι όπως αυτά εφαρμόζονται στην πράξη. Συνεπώς τα TBZ, OPP και IMZ συμπεριλήφθηκαν στο πρώτο μίγμα ΦΟ ενώ το DPA και το TM

στο δεύτερο. Έτσι λοιπόν σύμφωνα με το Διάγραμμα 10α, ο μύκητας αποδόμησε σχεδόν πλήρως το OPP μέσα σε 2 ημέρες. Αντίθετα, παρατηρήθηκε αμελητέα αποδόμηση του TBZ και μόνο μερική αποδόμηση του IMZ κατά τη διάρκεια της επώασης των 30 ημερών. Στην περίπτωση των TM και DPA, ο μύκητας αποδόμησε πλήρως και τα δύο ΦΟ εντός 5 ημερών (Διάγραμμα 10β). Περιορισμένη αποδόμηση όλων των μυκητοκτόνων παρατηρήθηκε στις μη εμβολιασμένες με τον μύκητα καλλιέργειες του StEM (μάρτυρας).

α)



β)



Διάγραμμα 10: Αποδόμηση μιγμάτων των μυκητοκτόνων α) OPP, TBZ και IMZ και β) TM, DPA σε καλλιέργειες StEM που εμβολιάστηκαν με τον *T. versicolor* και σε καλλιέργεια StEM χωρίς μύκητα. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4.1. Συζήτηση

Τα υγρά απόβλητα που παράγονται κατά την μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων και των λαχανικών περιέχουν υψηλό φορτίο μυκητοκτόνων και η απόρριψή τους σε επιφανειακά υδροφόρα συστήματα χωρίς καμία προηγούμενη επεξεργασία είναι πιθανό να προκαλέσει σημαντική περιβαλλοντική ρύπανση. Η βιολογική αποδόμηση των μυκητοκτόνων αποτελεί μία επιθυμητή και οικονομικά αποδοτική προσέγγιση για την απομάκρυνση των συγκεκριμένων υγρών αποβλήτων. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι μύκητες λευκής σήψης μπορούν να αποδομήσουν αποτελεσματικά τα περισσότερα από τα μυκητοκτόνα που περιέχονται στα υγρά απόβλητα σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με εκείνες που υπάρχουν στο περιβάλλον.

Οι μύκητες *T. versicolor* και *P. ostreatus* έδειξαν τη υψηλότερη αποδομητική ικανότητα ενώ ο έτερος μύκητας λευκής σήψης που αξιολογήθηκε, *P. chrysosporium* αποδόμησε με βραδύτερους ρυθμούς το μυκητοκτόνο TM. Πράγματι, οι *T. versicolor* και *P. ostreatus* αποδόμησαν πλήρως το TM μέσα σε λίγες ώρες στο υπόστρωμα StEM. Πολλές μελέτες που ασχολούνται με αποδόμηση ΦΟ έχουν εστιάσει στον μύκητα *P. chrysosporium* (Kullman and Matsumura 1996; Mougin et al. 1996; 1997; Fratila-Apachitei et al. 1999), ενώ λιγότερες μελέτες έχουν εξετάσει την αποδομητική ικανότητα του *T. versicolor* (Hiratsuka et al. 2001; Bending et al. 2002) και ακόμη λιγότερες του μύκητα *P. ostreatus* (Jauregui et al. 2003; Rigas et al. 2005).

Κανένας από τους μύκητες που εξετάστηκαν δεν κατάφεραν να αποδομήσουν το μυκητοκτόνο TBZ σε κανένα από τα δύο θρεπτικά υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Αντίθετα, η αποδόμηση του TM συνοδεύτηκε από τον γρήγορο σχηματισμό του μεταβολίτη του, MBC, σε όλες τις καλλιέργειες των μυκήτων, ενώ παρατηρήθηκε βραδύτερος σχηματισμός του MBC και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στις καλλιέργειες που δεν εμβολιάστηκαν με μύκητες, γεγονός που υποδεικνύει την συμμετοχή των μυκήτων σε αυτή τη μετατροπή. Τα παραπάνω ευρήματα συνάδουν με προηγούμενες μελέτες όπου αναφέρεται ότι το TM μετατρέπεται ταχύτατα στο έδαφος σε MBC και ότι αυτή η μετατροπή ενισχύεται με τη μεσολάβηση μυκήτων (Fleeker et al. 1974).

Η ενζυμική δραστηριότητα των λιγνολυτικών ενζύμων προσδιορίστηκε σε όλες τις καλλιέργειες των μυκήτων λευκής σήψης προκειμένου να εξετασθεί πιθανή εμπλοκή αυτών των ενζύμων στην αποδόμηση των μυκητοκτόνων που εξετάστηκαν. Δραστηριότητα των ενζύμων MnP και Lac σημειώθηκε σε όλες τις καλλιέργειες των *T. versicolor* και *P. ostreatus*. Προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι οι *T. versicolor* και *P. ostreatus* παράγουν κυρίως MnP και Lac (Leatham and Kirk 1983; Waldner et al. 1988; Hatakka 1994). Δεν παρατηρήθηκε ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου LiP σε καμία από τις μεταχειρίσεις του πειράματος, αν και ο *P. chrysosporium* είναι γνωστό ότι παράγει συνήθως το συγκεκριμένο εξωκυτταρικό ένζυμο (Tien and Kirk 1988). Μελέτες των Castilo et al. (1997) αναφέρουν ότι η δράση της LiP δεν μπορεί να μετρηθεί σε υποστρώματα πλούσια σε λιγνοκυτταρικά υλικά, λόγω παρεμβολής φυσικών φαινολικών συστατικών τα οποία δρουν ως υπόστρωμα για την οξειδωση της βερατρυλικής αλκοόλης παρεμποδίζοντας την αντίχνευση της LiP.

Η αποδόμηση του μυκητοκτόνου TM δε συνοδεύτηκε από αντίστοιχη και ταυτόχρονη αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων λακκάση και MnP στις καλλιέργειες των μυκήτων, σε σχέση με αυτές που δεν ήταν εμβολιασμένες με μύκητα.. Η αύξηση που παρατηρήθηκε στην δραστηριότητα του MnP στις καλλιέργειες του *P. ostreatus* παρουσία TM δεν σχετίζονται χρονικά με την ταχύτατη διάσπαση του μυκητοκτόνου καθώς καταγράφηκαν μετά τις πρώτες 20 ημέρες της επώασης. Από την άλλη μεριά παρατηρήθηκε μια σημαντική αρνητική επίδραση του TBZ στην δραστηριότητα του ενζύμου MnP στις καλλιέργειες του μύκητα *P. chrysosporium* και στα δύο θρεπτικά μέσα. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα παραπέμπουν στην εμπλοκή άλλων ενζυμικών συστημάτων, εκτός των λιγνολυτικών ενζύμων, στη διάσπαση του TM. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες όπου δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ αποδόμησης ΦΟ και λιγνολυτικών ενζύμων. Πράγματι, οι Hiratsuka et al. (2001) αναφέρουν ότι ο *T. versicolor* ήταν ικανός να αποδομεί μία σειρά από ζιζανιοκτόνα της ομάδας των διφαινυλαιθέρων χωρίς τη συμμετοχή των λιγνολυτικών ενζύμων. Οι μονοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 βρέθηκαν ότι μεσολαβούν στη υδροξυλίωση των ζιζανιοκτόνων αυτών. Επίσης οι Kullman και Matsumura (1996) προτείνουν ότι οι μονοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 και όχι τα λιγνολυτικά ένζυμα εμπλέκονται στην αποδόμηση του endosulfan από τον μύκητα *P. chrysosporium*. Οι Fragoeiro and Magan (2005) έδειξαν ότι ο *T. versicolor* κατάφερε να αποδομήσει μίγμα ΦΟ σε

SEM, με παραγωγή πρωτεασών, β-γλυκοσιδασών και μονοφωσφοεστερασών εκτός των λιγνολυτικών ενζύμων.

Ο μύκητας *A. niger* δεν ήταν τόσο αποτελεσματικός όσο οι μύκητες λευκής σήψης στην αποδόμηση των μυκητοκτόνων που δοκιμάστηκαν. Έτσι λοιπόν ο *A. niger* δεν μπόρεσε να αποδομήσει το μυκητοκτόνο TBZ και παρουσίασε αργή αποδόμηση του TM. Η μειωμένη ικανότητα του μύκητα να αποδομήσει τα μυκητοκτόνα TBZ και TM ακόμη και στο υπόστρωμα SEM, εφόσον αποτελεί μύκητα εδάφους, δεν ήταν αναμενόμενο. Αρκετές προηγούμενες μελέτες τεκμηριώνουν την αυξημένη αποδομητική ικανότητα του μύκητα για πλήθος οργανικών ρυπαντών συμπεριλαμβανομένων και ΦΟ (Liu et al. 2001; Bhalerao and Puranik 2007). Αυτή η μειωμένη αποδομητική ικανότητα του *A. niger* μπορεί να αποδοθεί σε τοξική επίδραση από τα μυκητοκτόνα. Πράγματι, προηγούμενες μελέτες από τους Karas et al. (2010) έδειξαν ότι ο συγκεκριμένος μύκητας ήταν ικανός να αποδομεί εξίσου ταχύτητα με τους μύκητες λευκής σήψης τα DPA και chlorpyrifos που δεν παρουσιάζουν μυκητοκτόνο δράση αλλά αντιοξειδωτική και εντομοκτόνο αντίστοιχα ενώ παρουσίαζε μειωμένη αποδομητική ικανότητα απέναντι στα μυκητοκτόνα IMZ, TBZ, OPP. Η υψηλή φυλογεννητική συγγένεια των μυκήτων του γένους *Aspergillus* με τους μύκητες του γένους *Penicillium* που αποτελούν τους στόχους των παραπάνω μυκητοκτόνων επιβεβαιώνει περαιτέρω την παραπάνω υπόθεση μας. Πράγματι, *Aspergillus* και *Penicillium* ανήκουν στην οικογένεια Trichocomaceae και παρουσιάζουν κοινά οικοφυσιολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά (Ogawa and Sigiayama 2000)

Επιπλέον μελέτες με τον πιο αποτελεσματικό αποδομητικό μύκητα *T. versicolor* επαλήθευσαν την αποδομητική του ικανότητα. Ο *T. versicolor* αποδόμησε πλήρως και ταχύτητα υψηλές συγκεντρώσεις των OPP και DPA (50 mg/L), ενώ αποδόμησε μερικώς τα μυκητοκτόνα TBZ και IMZ όταν χρησιμοποιήθηκαν στις ίδιες υψηλές συγκεντρώσεις. Η μερική αποδόμηση υψηλών συγκεντρώσεων του IMZ (50 mg/L), σε υπόστρωμα StEM από τον μύκητα *T. versicolor* έρχεται σε αντίθεση με την πλήρη αποδόμησή του σε χαμηλότερη συγκέντρωση (10 mg/L), από τον ίδιο μύκητα και στο ίδιο υπόστρωμα σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο εργαστήριο (Karas et al., 2010). Αυτή η ασυμφωνία μπορεί να αποδοθεί σε πιθανή τοξική επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης του μυκητοκτόνου, ή σε ενδιάμεσα προϊόντα τα οποία παρήχθησαν κατά τη διάρκεια της αποδόμησης. Το TBZ επίσης αποδομήθηκε μερικώς από τον *T. versicolor* στο υπόστρωμα StEM όταν

χρησιμοποιήθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις (50 mg/L). Αντίθετα, δε σημειώθηκε αποδόμηση του TBZ σε καλλιέργειες StEM του *T. versicolor* όταν δοκιμάστηκε χαμηλότερη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου (10 mg/L), ή όταν 50 mg/L TBZ χρησιμοποιήθηκε μαζί με OPP και IMZ. Ο λόγος για αυτή τη διαφορά είναι επί του παρόντος άγνωστος.

Άλλες μελέτες που διεξήχθησαν εξέτασαν την ικανότητα του μύκητα *T. versicolor* να αποδομεί μίγματα ΦΟ έτσι όπως αυτά χρησιμοποιούνται στην πράξη. Ο μύκητας αποδόμησε ταχύτατα τα DPA και TM τα οποία χρησιμοποιούνται στη μετασυλλεκτική μεταχείριση των μηλοειδών. Μόνο λίγες μελέτες μέχρι στιγμής έχουν εξετάσει την αποδομητική ικανότητα των μυκήτων λευκής σήψης έναντι μιγμάτων ΦΟ. Για παράδειγμα οι Bending et al. (2002) αναφέρουν ότι μύκητες λευκής σήψης αποδόμησαν ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των terbutylazine, atrazine και diuron σε υγρή καλλιέργεια που συμπληρώθηκε από μίγματα των terbutylazine, atrazine, metalaxyl και diuron. Πιο πρόσφατη μελέτη από τους Fragoeiro και Magan (2005) έδειξε ότι οι μύκητες *T. versicolor* και *P. chrysosporium* μπόρεσαν να αποδομήσουν μίγματα των simarizine, dieldrin, και trifluralin σε υπόστρωμα SEM.

Γενικότερα, οι μύκητες λευκής σήψης που αξιολογήθηκαν και ιδιαίτερα οι *T. versicolor* και *P. ostreatus* παρουσίασαν μια υψηλή αποδομητική δραστηριότητα έναντι των φαινολικών κατά βάση ουσιών DPA και OPP ανεξάρτητα εάν αυτές βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις μεμονωμένα ή σε μίγμα με άλλες ΦΟ. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες από τους Karas et al. (2010) που παρατήρησαν επίσης ότι οι μύκητες λευκής σήψης παρουσίασαν αυξημένη αποδομητική ικανότητα κατά των φαινολικών ουσιών DPA, OPP με ταυτόχρονη αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας των Lac και MnP. Η συγγένεια των παραπάνω ενζύμων με φαινολικούς δακτυλίους της λιγνίνης έχει αποδειχθεί στο παρελθόν (Hattaka 1994).

4.2. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής ο *T. versicolor* παρουσιάζει υψηλή ικανότητα για βιοαπορρύπανση των υγρών αποβλήτων από τη βιομηχανία μεταποίησης μηλοειδών. Αντίθετα, απέτυχε να αποδομήσει το TBZ, αποδόμησε μόνο

μερικώς το IMZ ενώ αποδόμησε ταχύτατα το φαινολικό OPP. Αυτά τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία μεταποίησης των εσπεριδοειδών και αναμένεται να εμφανίζονται μαζί ή σε συνδυασμούς στα υγρά απόβλητα. Η αδυναμία του *T. versicolor* να αποδομήσει αποτελεσματικά υψηλές συγκεντρώσεις των TBZ και IMZ είναι σύμφωνη με την μερική αποδόμηση αυτών των μυκητοκτόνων από τον ίδιο μύκητα όταν χρησιμοποιήθηκαν μεμονωμένα και όχι ως μίγμα.

4.3. Μελλοντική εργασία

Μελέτες που έχουν ήδη ξεκινήσει στο εργαστήριο θα αξιολογήσουν την χρήση των μυκήτων *P. ostreatus* και *T. versicolor* για την παρασκευή πιλοτικών βιοφίλτρων για την επεξεργασία και αποδόμηση υψηλών συγκεντρώσεων μυκητοκτόνων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα από την μετασυλλεκτική βιομηχανία φρούτων.

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. Barr D.P. and Aust S.D. (1994). Pollutant degradation by white rot fungi. *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, **138**, 49-72.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Bicci C., Belliardo F., Cantamessa L. (1989). Simultaneous determination of benzimidazole fungicides by HPLC on apples, pears and their pulps. *Pesticide Science* **25**, 3550360.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

10. Castillo MdP., Ander P., Stenstrom J., (1997). Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations. *Biotechnology Techniques* **11**, 701-706.
11. Castilo L.E., Ruepert C., Solis F. (2000). Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the North Atlantic Zone of Costa Rica. *Environ. Toxicol. Chem.*: 19, 1942-1950.
12. Cohen R., Persky L. & Hadar Y. (2002). Biotechnological applicatins and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**, 582-594.
13. 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.
14. 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.
15. Di Muccio A., Camoni I., Ventriglia M., Attard Barbini D., Mauro M., Pelosi P., Generali T. Ausili A., Girolimetti S. (1995). Simplified clean-up for the determination of benzimidazolic fungicides by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, **697**, 145-152.
16. 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.
17. 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. *Archives of Environmental Contaminanion and Toxicology*, **55**, 161–172.
18. Fleeker JR., Lacy HM., Schultz IR., Houkom EC. (1974). Persistence and metabolism of thiophanate methyl in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **22**, 592_595.
19. Fountulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Ageelis G.G. & Lyberatos G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* **36**, 4735-4744.

20. 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.
21. 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.
22. Gold M.H., Wariishi H., Valli K. (1989). Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. American Chemical Society, Washington, **389**, 127-140.
23. Hammel K.E. and Cullen D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 349–355.
24. Hatakka A., (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **13**, 125-135.
25. 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.
26. Jauregui J., Valderrama B., Albores A., Vazquez-Duhalt A. (2003). Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. *Biodegradation*, **14**,397-406.
27. Karas P. A., Perruchon C., Exarhou K., Exalotis C., Karpouzas D.G. (2010). Degradation of pesticides contained in post-harvest agro-industrial effluents by selected fungi: a potential bioremediation application. *Biodegradation in press*
28. Kamitsuji H., Honda Y., Watanabe T. & Kuwahara M. (2004). Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology Biotechnology* **65**, 287-294.
29. Kirk T.K. and Farrell R.L. (1987). Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annual Reviews in Microbiology* **41**, 465-505.
30. 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.
31. Kolbe N. and Andersson J.T. (2006). Simple and Sensitive Determination of o-Phenylphenol in Citrus Fruits Using Gas Chromatography with Atomic Emission

- or Mass Spectrometric Detection. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **54**, 5736-5741.
32. 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.
 33. Leatham GF., Kirk TK. (1983). Regulation of lignolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiology Letters* **16**, 65-67.
 34. 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.
 35. 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.
 36. 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.
 37. Mougín 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.
 38. Mougín 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.
 39. Ogawa H., Sugiyama J. (2000). Evolutionary relationships of the cleistothecial genera with *Penicillium*, *Geosmithia*, *Meribla* and *Sarophorum* anomorphs as inferred from 18s rDNA sequence divergence. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification, Sampson RA, Pitt JA (Eds), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 149-161.
 40. Paszczyński A. and Crawford R.L. (1995). Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology progress*, **11**, 368-379.
 41. Phillips, Roger (2006), Mushrooms. Pub. McMillan, [ISBN 0-330-44237-6](https://doi.org/10.1080/00975300600555555).

42. Pointing S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**, 20-33.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Rigas F., Dritsa V., Marchant R., Papadopoulou K., Avramides E.J., Hatzianestis I. (2005). Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design. *Environment International* **31**, 191-196.
47. Saad B., Haniff N.H., Saleh M.I., Hashim N.H. Abu A., Ali N. (2004). Determination of ortho-phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, **84**, 313-317.
48. Sainjust E., Pompei R., Rescingo A., Rinaldi A. & Ballero M. (1991). Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **31**, 223-235.
49. Sannino A. (1995). Investigation into contamination of processed fruit products by carbendazim, methyl thiophanate and thiabendazole. *Food Chemistry*, **52**, 57-61.
50. Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C. and van Dijck P.W.M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**, 426–435.
51. Sembiring T. and Winter J. (1989). Anaerobic degradation of o-phenylphenol by mixed and pure cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **31**, 89-92.
52. 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.
53. Tien M., Kirk TK. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* **161**, 238-249.

54. Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D. & Aggelis G. (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus spp.* In respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology* **84**, 251-257.
55. Veneziano A., Vacca G., Arana S., De Simone F., Rastrelli L. (2004). Determination of carbendazim, thiabendazole and Thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples imported to Italy. *Food Chemistry*, **87**, 383-386.
56. Waldner R., Leisola MSA., Fiechter A. (1988). Comparison of lignolytic activities of selected white-rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **29**, 400-407.
57. 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.
58. Xu JL., He J., Wang ZC., Wang K., Li WJ., Tang SK., Li SP. (2007). *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim degrading bacterium. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* **57**, 2754-2757
59. Yoshioka N., Akiyama Y., Teranishi K. (2004). Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *Journal of Chromatography A.*, **1022**, 145-150.
60. Zamora T., Hidalgo C., Lopez F.J. and Hernandez F. (2004). Determination of fungicide residues in fruits by coupled-column liquid chromatography. *Journal of Separation Science* **27**, 645-652.
61. Zhang GS., Jia XM., Cheng TF., Ma XH., Zhao YH. (2005). Isolation and characterization of a new carbendazim-degrading *Ralstonia* sp. strain. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, **21**, 265-269.
62. 91/414/EEC/ Thiabendazol-7603/VI/97-Final.
63. Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α. (2007). Γεωργική φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί δράσης και χρήσεις των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, Αθήνα.
64. Παπαδοπούλου-Μουρκίδου Ε. (1991). Γεωργικά Φάρμακα Μέρος ΙΙ, Θεσσαλονίκη.
64. Τσιούρης Σ. (2004). Θέματα Προστασίας Περιβάλλοντος, Θεσσαλονίκη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας λακκάσης από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία TBZ σε SEM.

| Παράγοντες | <i>T. versicolor</i> | <i>P. ostreatus</i> |
|---------------|----------------------|---------------------|
| Φ.Ο. | 0.654 | <0.001 |
| Χρόνος | <0.001 | <0.001 |
| Φ.Ο. * Χρόνος | 0.068 | <0.001 |

Πίνακας 2: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας MnP από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία TBZ σε SEM.

| Παράγοντες | <i>T. versicolor</i> | <i>P. chrysosporium</i> | <i>P. ostreatus</i> |
|---------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| Φ.Ο. | 0.351 | <0.001 | 0.517 |
| Χρόνος | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| Φ.Ο. * Χρόνος | <0.001 | 0.004 | 0.449 |

Πίνακας 3: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας λακκάσης από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία TBZ σε StEM.

| Παράγοντες | <i>T. versicolor</i> | <i>P. ostreatus</i> |
|---------------|----------------------|---------------------|
| Φ.Ο. | 0.026 | 0.691 |
| Χρόνος | <0.001 | <0.001 |
| Φ.Ο. * Χρόνος | 0.037 | 0.205 |

Πίνακας 4: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας MnP από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία TBZ σε StEM.

| Παράγοντες | <i>T. versicolor</i> | <i>P. chrysosporium</i> | <i>P. ostreatus</i> |
|---------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| Φ.Ο. | <0.001 | <0.001 | 0.775 |
| Χρόνος | <0.001 | <0.001 | 0.093 |
| Φ.Ο. * Χρόνος | 0.027 | <0.001 | 0.220 |

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

| Παράγοντες | <i>T. versicolor</i> | <i>P. ostreatus</i> |
|---------------|----------------------|---------------------|
| Φ.Ο. | 0.124 | 0.302 |
| Χρόνος | <0.001 | <0.001 |
| Φ.Ο. * Χρόνος | 0.323 | 0.195 |

Πίνακας 6: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας ΜnΡ από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία ΤΜ σε SEM.

| Παράγοντες | <i>T. versicolor</i> | <i>P. chrysosporium</i> | <i>P. ostreatus</i> |
|---------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| Φ.Ο. | 0.320 | 0.150 | 0.532 |
| Χρόνος | <0.001 | 0.492 | <0.001 |
| Φ.Ο. * Χρόνος | 0.008 | 0.918 | 0.075 |

Πίνακας 7: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας λακκάσης από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία ΤΜ σε StEM.

| Παράγοντες | <i>T. versicolor</i> | <i>P. ostreatus</i> |
|---------------|----------------------|---------------------|
| Φ.Ο. | 0.006 | <0.001 |
| Χρόνος | <0.001 | <0.001 |
| Φ.Ο. * Χρόνος | 0.823 | 0.187 |

Πίνακας 8: Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two-Way-ANOVA) της ενζυμικής δραστηριότητας MnP από τους μύκητες λευκής σήψης παρουσία ή απουσία ΤΜ σε StEM.

| Παράγοντες | <i>T. versicolor</i> | <i>P. chrysosporium</i> | <i>P. ostreatus</i> |
|---------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| Φ.Ο. | <0.001 | 0.608 | 0.622 |
| Χρόνος | <0.001 | <0.001 | 0.079 |
| Φ.Ο. * Χρόνος | 0.077 | 0.004 | 0.926 |

