

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΣΑΓΓΑΡΗ ΜΑΡΙΑ



«Αξιολόγηση υποστρωμάτων με τον εδώδιμο μύκητα *Pleurotus ostreatus* για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων επιβαρυσμένων με τα μυκητοκτόνα ortho-phenylphenol και imazalil»

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΣΑΓΓΑΡΗ ΜΑΡΙΑ



«Αξιολόγηση υποστρωμάτων με τον εδώδιμο μύκητα *Pleurotus ostreatus* για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων επιβαρυσμένων με τα μυκητοκτόνα ortho-phenylphenol και imazalil»

**«Αξιολόγηση υποστρωμάτων με τον εδώδιμο μύκητα *Pleurotus ostreatus* για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων επιβαρυσμένων με τα μυκητοκτόνα ortho-phenylphenol και imazalil»**

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.
- Ουγαλιώτης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Γονιμότητας και Βιολογίας Εδάφους, Τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

## *Πρόλογος*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Καρπούζα Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθειά του που μου παρείχε κατά την ανάθεση, την διεξαγωγή του πειράματος και την γραπτή παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

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

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική και οικονομική τους υποστήριξη, κατά τη διάρκεια φοίτησής μου στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## Περίληψη

Η μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων περιλαμβάνει την εφαρμογή μυκητοκτόνων όπως τα *ortho*-phenylphenol (OPP) και imazalil (IMZ). Αποτέλεσμα αυτών των μεταχειρίσεων είναι η παραγωγή μεγάλου όγκου υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων με υψηλό φορτίο των συγκεκριμένων μυκητοκτόνων. Τα συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα έχουν πάρει έγκριση χρήσης σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης υπό την προϋπόθεση ότι θα υπάρξει μια αποτελεσματική επεξεργασία των αποβλήτων που δημιουργούνται από την χρήση τους. Παρόλα αυτά δεν υπάρχει ως σήμερα κάποιο τέτοιο σύστημα επεξεργασίας καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη εξεύρεσης μια λύσης. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε σε πείραμα στηλών η ικανότητα υποστρώματος μανιταριών εμβολιασμένων με στέλεχος του μύκητα *P. ostreatus* να κατακρατεί ή να διασπά γενικότερα υψηλά φορτία των μυκητοκτόνων OPP και IMZ που περιέχονται σε υγρά απόβλητα από συσκευαστήρια φρούτων. Για τον σκοπό αυτό προετοιμάστηκαν τρεις στήλες PVC (1 m x 12.5 cm i.d.) που πληρώθηκαν με το παραπάνω υπόστρωμα. Στις στήλες πραγματοποιήθηκε εφαρμογή για διάστημα 71 ημερών διαλύματος OPP συγκέντρωσης 5 g/L και ακολούθως για διάστημα 48 ημερών διαλύματος IMZ συγκέντρωσης 2.5 g/L. Κατά την διάρκεια της εφαρμογής των δύο γεωργικών φαρμάκων δείγματα εκπλύματος συλλέγονταν από τον πυθμένα των στηλών. Με την ολοκλήρωση του πειράματος το περιεχόμενο των στηλών τεμαχίστηκε και ακολούθησε ανάλυση για τον υπολογισμό των υπολειμμάτων του OPP που κατακρατήθηκαν εντός των στηλών. Ανάλυση των εκπλυμάτων έδειξαν ότι το συγκεκριμένο υπόστρωμα περιόρισε σημαντικά την έκπλυση του OPP ώστε μόνο το 0.056% της εφαρμοσθείσας ποσότητας εκπλύθηκε με το αντίστοιχο ποσοστό για το IMZ να είναι 1.56%. Η διαφορά αυτή αποδόθηκε στην ακολουθία εφαρμογής λόγω της πιθανής μειούμενης αποδοτικότητας του υποστρώματος με την πάροδο του χρόνου. Περισσότερο από 60% της αρχικής ποσότητας OPP αποδομήθηκε ή γενικότερα απομακρύνθηκε από τις στήλες με άλλες διεργασίες, βιοτικές ή αβιοτικές. Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου υποστρώματος για την κατακράτηση των OPP και IMZ και η αποδοτικότητα του συστήματος θα ήταν πιθανότερα υψηλότερη για το IMZ εάν πριν την εφαρμογή του πραγματοποιούνταν αντικατάσταση του ήδη χρησιμοποιημένου υποστρώματος των στηλών με φρέσκο υπόστρωμα.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πρόλογος	4
Περίληψη	5
<b>Κεφάλαιο Πρώτο</b>	
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>8</b>
1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση	8
1.2. Περιβαλλοντική ρύπανση από γεωργικά φάρμακα	9
1.3. Υγρά απόβλητα από τη βιομηχανία μεταποίησης φρούτων	12
1.4. Γεωργικά φάρμακα και μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων	14
1.4.1. Ortho-phenyl-phenol	14
1.4.2. Imazalil	17
1.5. Βιοαπορρύπανση	20
1.5.1. Βιοκλίνες	24
1.5.1.1. Τύποι βιοκλινών	25
1.5.1.2. Συστατικά του συστήματος βιοκλίνης	27
1.5.1.3. Η σύσταση του βιομείγματος.	28
1.6. Μύκητες λευκής σήψης	31
1.6.1. Μηχανισμός δράσης του ενζύμου υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP)	36
1.6.2. Μηχανισμός δράσης του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση (MnP)	39
1.6.3. Μηχανισμός δράσης του ενζύμου λακκάση	42
1.7. Αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων με τη βοήθεια μυκήτων λευκής σήψης	46
1.8. <i>Pleurotus ostreatus</i>	48
1.9. Σκοπός του πειράματος	49
<b>Κεφάλαιο Δεύτερο</b>	
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>51</b>
2.1. Μύκητες	51
2.2. Προετοιμασία υποστρωμάτων	
2.2.1. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Malt Extract Agar	51
2.2.2. Παρασκευή του εμβολίου με <i>Pleurotus ostreatus</i>	51

2.2.3. Παρασκευή του υποστρώματος πλήρωσεως των στηλών	52
2.3. Πειραματικός σχεδιασμός	52
2.4. Μέθοδοι ανάλυσης γεωργικών φαρμάκων	54
2.4.1. Μέθοδος εκχύλισης γεωργικών φαρμάκων	54
2.4.1.1. Εκχύλιση των γεωργικών φαρμάκων από το έκπλυμα	54
2.4.1.2. Εκχύλιση των γεωργικών φαρμάκων από το στερεό υπόστρωμα	55
2.4.2. Μέθοδος HPLC.	57
2.4.2.1. Διαλύτες και γεωργικά φάρμακα	57
2.4.2.2. Καμπύλες αναφοράς	57
2.4.2.3. Orthophenylphenol (OPP)	58
2.4.2.4. Imazalil (IMZ)	58
2.5. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της λακκάσης	58
<b>Κεφάλαιο Τρίτο</b>	
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	60
3.1. Γενικά	60
3.2. Έκπλυση OPP στο χρόνο	60
3.3. Κατανομή υπολειμμάτων OPP στην στήλη με την ολοκλήρωση του πειράματος	63
3.4. Έκπλυση IMZ στο χρόνο	66
3.5. Μέτρηση λακκάσης	68
<b>Κεφάλαιο Τέταρτο</b>	
<b>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	70
4.1. Συζήτηση	70
4.1.1. Ortho-phenylphenol	70
4.1.2. Imazalil	71
4.1.3. Δραστηριότητα λακκασών	73
4.2. Συμπεράσματα	73
4.3. Μελλοντική εργασία	74
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	75

# ΠΡΩΤΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση

Κατά τον προηγούμενο αιώνα σημειώθηκε μια τεράστια αύξηση στην παγκόσμια περιβαλλοντική ρύπανση. Η βιομηχανική ανάπτυξη, η αύξηση του πληθυσμού, η αστικοποίηση και η αμέλεια για τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις της απελευθέρωσης χημικών στο περιβάλλον συνεισέφεραν στην υποβάθμιση του περιβάλλοντος που βιώνεται σήμερα. Υπήρξε μια μεγάλη αύξηση στην ποικιλία των οργανικών ενώσεων που παράγονται βιομηχανικά, οι οποίες απελευθερώνονταν αμελώς στο περιβάλλον. Συνεπώς, σήμερα το φυσικό περιβάλλον επιβαρύνεται από πολυάριθμους χημικούς ρύπους, τοξικούς για τα βιολογικά συστήματα, οι οποίοι έχουν προέλθει τόσο από φυσικούς (βιογενείς και γεοχημικούς) όσο και από ανθρωπογενείς παράγοντες (Philp *et al.*, 2005).

Η προστασία της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος από τη βιομηχανική ρύπανση αποτελεί σήμερα κοινωνική απαίτηση. Δεδομένης της τοξικότητας και των περιβαλλοντικών ανησυχιών όσον αφορά τους χημικούς ρύπους, μεγάλη προσπάθεια έχει επικεντρωθεί στις μεθόδους με τις οποίες αυτοί μπορούν να απομακρυνθούν από το περιβάλλον. Αυτές οι τεχνικές ποικίλλουν από την απλή φυσική απομάκρυνση π.χ. σε χώρους ταφής απορριμάτων, μέχρι πιο κοστοβόρους χειρισμούς όπως η αποτέφρωση. Συχνά αυτοί οι χειρισμοί δεν απομακρύνουν τον ρύπο ή μπορεί να αφήνουν ένα τοξικό υπόλειμμα το οποίο μπορεί να απομακρυνθεί με άλλους τρόπους. Σήμερα το αντικείμενο πολλών επιστημονικών ερευνών και εφαρμογών εστιάζει στην ικανότητα των μικροοργανισμών να αποδομούν οργανικούς ρύπους ως μέσο βιολογικής αποκατάστασης ρυπασμένων περιβαλλόντων οδηγώντας στην ανάπτυξη ενός νέου επιστημονικού πεδίου, αυτού της βιοαπορρύπανσης (Philp *et al.*, 2005).



Στα πλαίσια των τροποποιήσεων του 1977 των νομοθετικών πράξεων για τη διασφάλιση καθαρού νερού η EPA (Environmental Protection Agency) των ΗΠΑ δημιούργησε και δημοσίευσε μια λίστα με τους πιο συχνά απαντώμενους βιομηχανικούς ρύπους που προκαλούν άμεση απειλή για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Η λίστα περιέχει 114 οργανικές ενώσεις και 13 μέταλλα από ένα σύνολο 129 ρύπων γνωστών ως ρύποι προτεραιότητας (Philp *et al.*, 2005).

Με την πάροδο του χρόνου, η λίστα των παραγόμενων από τις βιομηχανίες χημικών ουσιών μεγαλώνει συνεχώς, με επακόλουθο αποτέλεσμα τη διαρκώς αυξανόμενη ρύπανση του περιβάλλοντος. Οι ξενοβιοτικές ουσίες που απαντώνται στο περιβάλλον διαφέρουν ως προς τη χημική τους δομή από τις φυσικές οργανικές ουσίες. Τέτοιοι οργανικοί ρύποι είναι τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια, οι πολυχλωριωμένοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες κ.α. (Iwamoto and Nasu 2001: Dua *et al.*, 2002).

Η επιβάρυνση του περιβάλλοντος ή ενός συγκεκριμένου οικοσυστήματος, σχετίζεται άμεσα με τον τύπο των ρύπων που προαναφέρθηκαν, αλλά και με τα επίπεδα συγκέντρωσής τους στο υπό εξέταση περιβάλλον. Η μέτρηση της συγκέντρωσης του ρύπου στο περιβάλλον εξαρτάται κυρίως από την ποσότητα και το ρυθμό με τον οποίο απελευθερώνεται, την σταθερότητά του στο περιβάλλον, την διαλυτότητά του την κινητικότητά του και τέλος το ρυθμό αβιοτικής και βιοτικής αποδόμησής του (Janssen *et al.*, 2001).

## **1.2. Περιβαλλοντική ρύπανση από γεωργικά φάρμακα**

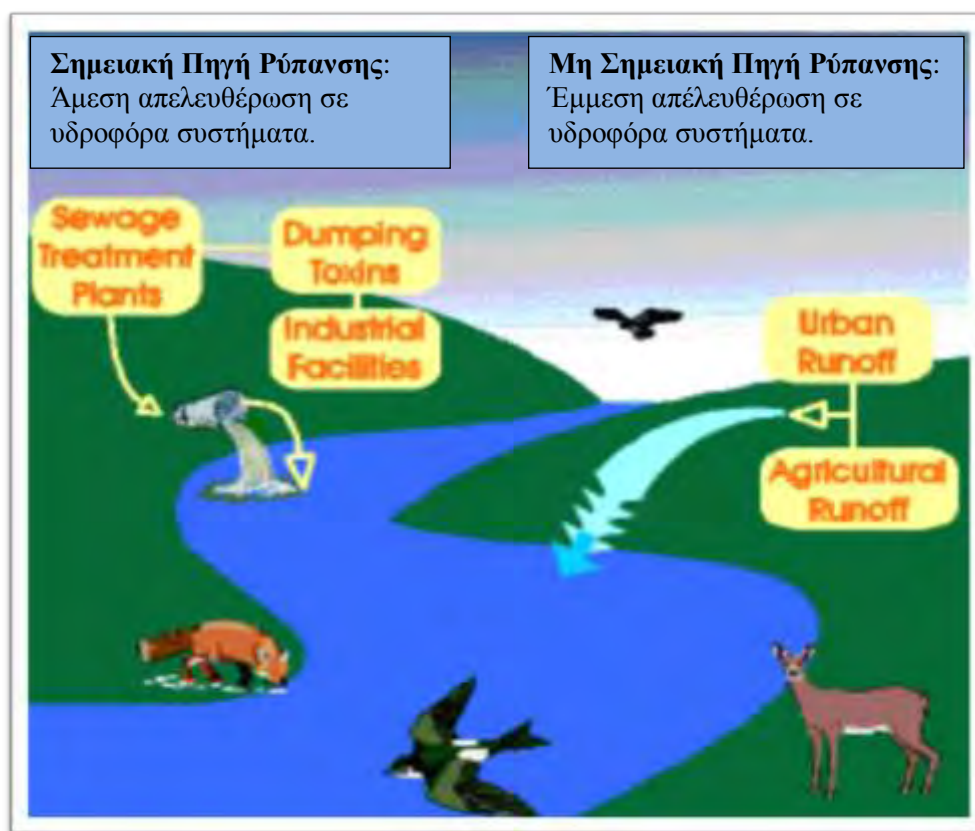
Οι γεωργικές βιομηχανίες αποτελούν σημαντικές πηγές οργανικής ρύπανσης των εδαφικών και υδάτινων οικοσυστημάτων. Στη σύγχρονη συμβατική γεωργία η αυξημένη παραγωγή αγροτικών προϊόντων εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων τα οποία προστατεύουν τα φυτά ενάντια σε προσβολές από μύκητες, βακτήρια, νηματώδεις, και έντομα που περιορίζουν σημαντικά την αγροτική παραγωγή. Οι πιο γνωστές κατηγορίες γεωργικών φαρμάκων είναι τα ζιζανιοκτόνα, τα εντομοκτόνα και τα μυκητοκτόνα (Tortella and Diez 2005: Ζιώγας 2007). Η αναγκαιότητα των γεωργικών φαρμάκων στην αγροτική παραγωγή

θεωρείται αναμφισβήτητη, ωστόσο η αλόγιστη χρήση τους με την πάροδο του χρόνου αποδείχθηκε να επιφέρει σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον και τη δημόσια υγεία (Echols *et al.*, 2008).

Γεωργικές πρακτικές που περιλαμβάνουν συστηματικές εφαρμογές γεωργικών φαρμάκων, όπως τριαζινικά ζιζανιοκτόνα και οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα, για να αυξηθούν οι αποδόσεις των καλλιεργειών, έχουν ως αποτέλεσμα την εισαγωγή στο περιβάλλον ιδιαίτερα υπολειμματικών ρύπων που μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα υγείας και οικολογικά προβλήματα. Η εφαρμογή λιπασμάτων επίσης έχει ως αποτέλεσμα σημαντική ρύπανση επιφανειακών και υπόγειων υδάτων από τις αγροτικές απορροές. Η απορροή φωσφορικών μπορεί να προκαλέσει σημαντικό ευτροφισμό λιμνών και η διαρροή νιτρικών και νιτρωδών σε υπόγεια ύδατα αποτελεί απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Η μη σημειακή ρύπανση από γεωργικές απορροές μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένα περιβαλλοντικά προβλήματα (Philp *et al.*, 2005).

Το περιβάλλον μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από γεωργικά φάρμακα προερχόμενα από μη σημειακές και σημειακές πηγές. Οι μη σημειακές πηγές ρύπανσης σχετίζονται με την κίνηση των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος μέσω αιωρούμενων σωματιδίων, κάθετης απορροής και έκπλυσης ύστερα από την εφαρμογή τους στον αγρό κατά την κοινή γεωργική πρακτική (Accineli *et al.*, 2005: Screpanti *et al.*, 2005). Οι σημειακές πηγές περιλαμβάνουν κάθε ρύπανση που οφείλεται σε δραστηριότητες όπως το γέμισμα της δεξαμενής, τον καθαρισμό της και την απομάκρυνση των απόνερων, διαρροές λόγω ελαττωματικού εξοπλισμού, ατυχήματα κατά την αποθήκευση των γεωργικών φαρμάκων και άλλες ανορθόδοξες γεωργικές πρακτικές όπως η απόρριψη υγρών αποβλήτων, που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων, από την αγροτική βιομηχανία (π.χ. μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων) σε επιφανειακά υδροφόρα συστήματα (Carter, 2000: Reichenberger *et al.*, 2007: de Wilde *et al.*, 2007: Candela *et al.*, 2008: Bourton *et al.*, 2009). Οι σημειακές πηγές ρύπανσης έχουν ταυτοποιηθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας που συνεισφέρει στη ρύπανση των υπόγειων υδάτινων πόρων με γεωργικά φάρμακα (Mason *et al.*, 1999, Helweg *et al.*, 2002, Ramwell *et al.*, 2004). Σε αυτές τις περιπτώσεις, υψηλές δόσεις γεωργικών φαρμάκων απελευθερώνονται σε περιορισμένες περιοχές με την πιθανότητα να εκπλυθούν σε υπόγεια ύδατα. Γι' αυτό το λόγο, σε μία προσπάθεια να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος για σημειακή ρύπανση,

αναπτύχθηκαν συστήματα βιολογικής διήθησης ή βιοφίλτρα (Torstensson *et al.*, 1996).



**Εικόνα 1:** Σημειακή και μη σημειακή ρύπανση.

Η ρύπανση επιφανειακών και υπόγειων υδάτων από γεωργικά φάρμακα εξαιτίας της χρήσης τους στη γεωργία (μη σημειακές πηγές ρύπανσης) είναι πλέον καλά τεκμηριωμένη (Carter, 1999). Η συχνή ανίχνευσή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις σε υδάτινους πόρους έχει επίσης συσχετισθεί με τη λανθασμένη διαχείριση των γεωργικών φαρμάκων είτε στο χωράφι είτε στο χώρο αποθήκευσής τους (Fait *et al.*, 2007). Γενικά, περιοχές όπου απελευθερώνονται υγρά απόβλητα, χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων γεωργικών φαρμάκων συχνά εβρισκόμενων σε μίγματα σε περιορισμένες εδαφικές περιοχές (Gan and Koskinen, 1998). Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι σε επιφανειακά αλλά και υπόγεια νερά ανιχνεύθηκαν ποσότητες ζιζανιοκτόνων (π.χ. diuron), και εντομοκτόνων (π.χ. chlorpyrifos), που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη γεωργική πρακτική πριν τη συγκομιδή (Echols *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009), αλλά και ποσότητες μυκητοκτόνων (π.χ.

imazalil, thiabendazole) που χρησιμοποιήθηκαν κατά τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς των φρούτων (Orteli *et al.*, 2005). Δεδομένης της δημόσιας ανησυχίας όσον αφορά την περιβαλλοντική ρύπανση από γεωργικά φάρμακα, σημειώνεται ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον προς την ανάπτυξη συστημάτων βιοαπορρύπανσης για τη μείωση του κινδύνου για σημειακή ρύπανση των υδάτινων πόρων (Philp *et al.*, 2005).

Η ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων υδροφόρων συστημάτων από τη χρήση των γεωργικών φαρμάκων αποτελεί μείζον πρόβλημα για την Ευρωπαϊκή Ένωση. Για το λόγο αυτό η Ε.Ε., θέσπισε και καθόρισε τα ανώτατα επιτρεπτά όρια ανίχνευσης υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στο νερό που προορίζεται για πόσιμο, στα  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  για ένα φυτοφάρμακο και στα  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  για το σύνολο των γεωργικών φαρμάκων που περιέχονται σε ένα δείγμα νερού (de Wilde *et al.*, 2007; Bourton *et al.*, 2009).

### **1.3. Υγρά απόβλητα από τη βιομηχανία μεταποίησης φρούτων**

Παράσιτα όπως μύκητες, βακτήρια, έντομα, νηματώδεις και τρωκτικά έχει εκτιμηθεί ότι προκαλούν σοβαρές απώλειες στις σοδειές. Αναφέρονται εκτιμήσεις τέτοιου είδους απωλειών περισσότερο από 30% του παραγωγικού δυναμικού παγκοσμίως με τα πρόβλημα να είναι σοβαρότερο στις θερμότερες και με μεγαλύτερη υγρασία περιοχές. Ένα επιπλέον 10% των σοδειών, τυπικά χάνονται εξαιτίας βιολογικής σήψης μετά την συλλογή τους. Σύμφωνα με δεδομένα διαθέσιμα από μια αναφορά του USDA οι απώλειες φρέσκων φρούτων και λαχανικών στις ΗΠΑ κατά την αποστολή και τη λιανική τους πώληση εκτιμάται σε περισσότερο από 200 εκατομμύρια δολάρια ετησίως. Ένα σημαντικό ποσοστό αυτής της απώλειας αποδίδεται σε ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες και βακτήρια. Οι πιο σοβαρές μετασυλλεκτικές ασθένειες είναι αυτές που προκαλούν είδη του γένους *Penicillium* σε εσπεριδοειδή και μηλοειδή, είδη του γένους *Rhizopus* στα πυρηνόκαρπα και τις φράουλες και είδη του γένους *Erwinia* στις πατάτες, τις ντομάτες και άλλα λαχανικά. Η παρεμπόδιση έστω ενός μέρους, αυτών των απωλειών θα αύξανε αξιοσημείωτα το παγκόσμιο απόθεμα τροφής. Έτσι η μετασυλλεκτική μεταποίηση των καρπών ώστε να αποφευχθούν τέτοιου είδους ασθένειες καθίσταται απαραίτητη (Kaplan *et al.*, 1979).

Η βιομηχανία μεταποίησης φρούτων σχετίζεται με τους μετασυλλακτικούς χειρισμούς των φρούτων με κύριο σκοπό τον περιορισμό της ποιοτικής υποβάθμισης των αγροτικών προϊόντων κατά την αποθήκευση. Η μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων όπως μήλων, αχλαδιών, εσπεριδοειδών και μπανανών περιλαμβάνει τη χρήση ιδιαίτερα υπολειμματικών μυκητοκτόνων όπως imazalil, thiabendazole και 2-phenyl-phenol, με σκοπό την προστασία των φρούτων από την προσβολή από μύκητες κατά την αποθήκευση (Orteli *et. al.*, 2005).



**Εικόνα 2:** Μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων.

Κατά την αποθήκευση τα φρούτα είναι ευάλωτα σε μυκητιακούς παρασιτισμούς από είδη *Penicilium* και *Geotrichum* που μειώνουν σημαντικά την αγοραστική τους αξία (El Ghaouth *et al.* 2002). Για να ελαχιστοποιηθούν τέτοιου είδους απώλειες, τα φρούτα υποβάλλονται σε μυκητοκτόνες θεραπείες με 1) ψεκάσμο πυκνών διαλυμάτων μυκητοκτόνων με υψηλή ή χαμηλή ένταση 2) εμβάπτιση σε πυκνά διαλύματα μυκητοκτόνων ή 3) ψεκάσμο με τεχνικές υδρονέφωσης. Οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων κυμαίνονται από  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  στα υδατικά διαλύματα που εφαρμόζονται στα φρούτα ως και  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  όταν η εφαρμογή συνοδεύεται από ταυτόχρονη κήρωση των φρούτων (Ritenour *et al.*, 2003: Mari *et al.*, 2003). Και οι τρεις χειρισμοί οδηγούν σε συσσώρευση μεγάλων όγκων

υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις (50-1000 mg l<sup>-1</sup>) υπολειμματικών χημικών όπως τα thiabendazole (TBZ), imazalil (IMZ), ortho-phenylphenol (OPP), thiophanate methyl (TM) και diphenylamine (DPA). Τα TBZ, IMZ, OPP και TM χρησιμοποιούνται για την προστασία των εσπεριδοειδών και των μηλοειδών ενάντια στον παρασιτισμό από *Penicillium* (Holmes and Eckert 1999; Smilanick *et al.*, 2006), ενώ το DPA χρησιμοποιείται σαν αντιοξειδωτικό για τον έλεγχο του καφετιάσματος των μήλων, μιας φυσιολογικής ασθένειας που μειώνει σημαντικά την αξία των φρούτων (Johnson *et al.*, 2006).

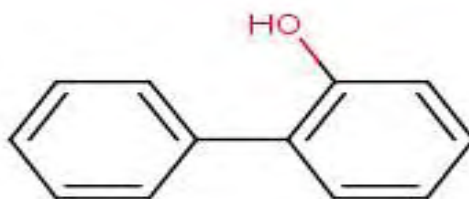
Όπως έχει αποδειχθεί από προηγούμενες μελέτες, η άμεση απελευθέρωση αυτών των υγρών αποβλήτων μέσα σε φυσικούς υδάτινους πόρους, χωρίς προηγούμενη επεξεργασία αποτελεί μια σοβαρή σημειακή πηγή ρύπανσης (Flaim and Toller 1989) και συνεπώς απαιτείται η επεξεργασία τους πριν την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό χρειάζεται επειγόντως μια βιώσιμη και περιβαλλοντικώς αποδεκτή μέθοδος για την αποκατάσταση αυτών των υγρών αποβλήτων. Η μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων θεωρείται η πιο σημαντική διαδικασία για την μη αναστρέψιμη απομάκρυνσή τους από το περιβάλλον (Karpouzas and Singh 2006) και είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι οι μύκητες λευκής σήψης είναι ικανοί να αποδομήσουν ένα ευρύ φάσμα οργανικών ρύπων (Asgher *et al.* 2008).

#### **1.4. Γεωργικά φάρμακα και μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων**

##### **1.4.1 Ortho-phenyl-phenol**

Το ortho-phenyl-phenol (OPP), είναι μια οργανική, φαινολική ένωση που αποτελείται από δύο συνδεδεμένους δακτυλίου βενζενίου και μια φαινολική υδροξυλική ομάδα και ανήκει στην κατηγορία των αρωματικών υδρογονανθράκων (Εικόνα 1). Είναι ένα μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται ως συντηρητικό κάτω από τις εμπορικές ονομασίες, Dowicide, Torsite, Preventol, Nipacide και πολλά άλλα. Η κύρια χρήση του OPP είναι ως γεωργικό μυκητοκτόνο για μετασυλλεκτική εφαρμογή κυρίως σε εσπεριδοειδή με σκοπό την αποτροπή μετασυλλεκτικών ασθενειών από μύκητες όπως οι *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Botrytis cinerea* κ.α.

Χρησιμοποιείται επίσης, στη συσκευασία σπόρων, αλλά και ως μυκητοστατικό κερύ για την επικάλυψη λαχανικών για την αποφυγή μικροβιακών αλλοιώσεων κατά την αποθήκευση και μεταφορά των λαχανικών. Ακόμα, χρησιμοποιείται και ως προσθετικό σε τρόφιμα με τον αριθμό E231. Τέλος χρησιμοποιείται και ως, απολυμαντικό, για οικιακή, νοσοκομειακή και υγιεινής φροντίδας στον καθαρισμό και την απολύμανση μηχανημάτων (Cnubben *et al.*, 2002; Zamora *et al.*, 2004; Γεωργική φαρμακολογία, Ζιώγας 2007).



**Εικόνα 3:** Χημική δομή του γεωργικού φαρμάκου ortho-phenylphenol.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του OPP, αλλά δεν φαίνονται να εξηγούν ικανοποιητικά την πρωταρχική δράση του μυκητοκτόνου. Μια επικρατούσα θεωρία αναφέρει ότι το OPP και γενικά οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες, προκαλούν λιπιδική υπεροξειδωση στην εσωτερική μιτοχονδριακή και πυρηνική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δίκτυο των ευαίσθητων μυκήτων. Έτσι για παράδειγμα, με τη δράση του μυκητοκτόνου δημιουργούνται βλάβες στην πυρηνική μεμβράνη των μυκήτων, αφήνοντας εκτεθειμένα τα χρωμοσώματα στη δράση ελευθέρων ριζών και ενζύμων (Ζιώγας 2007). Όσον αφορά, τον τρόπο δράσης του σε βακτήρια, σε μια μελέτη βρέθηκε ότι το OPP ήταν αρνητικός ρυθμιστής της σύνθεσης αμινοξέων (π.χ. λυσίνη) σημαντικών στην βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου *Streptococcus aureus*. Από αυτό μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο τρόπος δράσης του OPP είναι παρόμοιος με τον τρόπο δράσης ορισμένων αντιβιοτικών (Hyeung-Jin Jang *et al.*, 2008).

Σύμφωνα με την πιστοποίηση του οργανισμού περιβαλλοντικής προστασίας (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) για τη χρήση του OPP, σε τοξικολογικές μελέτες που έγιναν σε ποντίκια και κουνέλια, το OPP βρέθηκε να προκαλεί τοξικότητα με από του στόματος χορήγηση δόσεων μεγαλύτερων μιας οριακής δόσης των 1650 mg/kg, οδηγώντας σε μείωση του σωματικού βάρους, της πρόσληψης τροφής και της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης στα πειραματόζωα. Σύμφωνα με την ίδια αναφορά το OPP δεν φαίνεται να προκαλεί νευροτοξικότητα, αναπτυξιακή τοξικότητα ή αναπαραγωγική τοξικότητα. Το OPP θεωρείται πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο, αλλά σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, σύμφωνα με αποτελέσματα που έδειξαν την εμφάνιση όγκων στην ουροδόχο κύστη σε αρουραίους και όγκων στο ήπαρ σε ποντικούς όταν τους χορηγήθηκε OPP σε δόσεις μεγαλύτερες των 200 mg/kg/day. Έχει αναφερθεί ότι το OPP αύξησε την εμφάνιση όγκων της ουροδόχου κύστης σε αρουραίους όταν χορηγήθηκε μέσω της διατροφής (Hiraga *et al.*, 1984). Ακόμα, το OPP επίσης βρέθηκε να έχει οιστρογονική ή αντιανδρογονική δραστηριότητα και να δεσμεύεται στους υποδοχείς ανδρογόνων ή οιστρογόνων (Routledge *et al.*, 1997). Τέλος, υπάρχουν αναφορές που αποδεικνύουν ότι το OPP δεν παρουσιάζει μεταλλαξιογόνο δράση (Tani *et al.*, 2007).

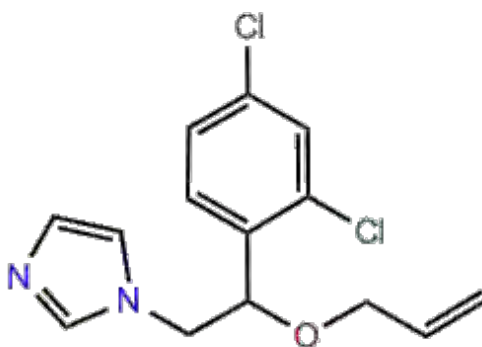
Σύμφωνα πάλι με την αξιολόγηση της EPA για την πιστοποίηση της χρήσης του OPP, το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο είναι σταθερό και υπολειμματικό σε αβιοτικές συνθήκες στο περιβάλλον. Είναι φωτολυτικά ασταθές και στην αέρια μορφή του είναι ασταθές και δεν είναι υπολειμματικό. Ο κύριος τρόπος αποδόμησής του είναι η βιοαποδόμηση σε αερόβια και αναερόβια περιβάλλοντα και ο χρόνος ημιζωής του OPP κυμαίνεται από τρεις ώρες έως τρεις εβδομάδες ανάλογα με την περιοχή έκθεσης (λίμνες, ποτάμια με στάσιμα ή τρεχούμενα νερά) (U.S. Environmental Protection Agency, 2006). Έτσι η Ευρωπαϊκή Ένωση θέσπισε ως ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων (MRL) του OPP σε εσπεριδοειδή και μπανάνες τα 12 mg/kg και 0,1 mg/kg, αντίστοιχα (Zamora *et al.*, 2004). Σύμφωνα με την EPA, οι τεχνικές επεξεργασίας υγρών αποβλήτων παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα 95% στην απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων. Αυτό σε συνδυασμό με την τάση του OPP να αποδομείται κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες στο περιβάλλον, υποδεικνύει ότι η περιβαλλοντική έκθεση σε υγρά απόβλητα τέτοιου είδους είναι πιθανό να ελαττωθεί (U.S. Environmental Protection Agency, 2006).



Ελάχιστες είναι οι αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά 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 τη δυνατότητα να διασπά το OPP (4,2 mmol/L) με ρυθμούς μέχρι και 0,4 mmol/L την ημέρα. Επίσης, σε μια άλλη μελέτη το OPP βρέθηκε να αποδομείται αποτελεσματικά από τους μύκητες λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus* και *Trametes versicolor*, με μέγιστη απόδοση σε θρεπτικό μέσο εκχυλίσματος άχυρου (Karpouzas *et al.*, 2010).

#### 1.4.2 Imazalil

Το imazalil (1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxy) ethyl]-1H-imidazole) είναι ένα διασυστηματικό μυκητοκτόνο (εικόνα 2). Ανήκει στην κατηγορία των ιμιδαζολικών μυκητοκτόνων, που δρουν παρεμποδίζοντας την απομεθυλίωση στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης στους μύκητες (Siegel *et al.*, 1977: 1978 : Buchenauer *et al.*, 1977). Χρησιμοποιείται στην προστασία φρούτων, λαχανικών και διακοσμητικών φυτών εναντίων ενός μεγάλου φάσματος μυκήτων. Επίσης χρησιμοποιείται σαν σποροαπολυμαντικό και κατά τη μετασυλλεκτική μεταχείριση των εσπεριδοειδών, μπανανών και άλλων φρούτων για την προστασία ενάντια σε μετασυλλεκτικές ασθένειες από μύκητες κυρίως του γένους *Penicillium* αλλά και μυκήτων του γένους *Gloeosporium*, *Fusarium* κ.α. κατά την αποθήκευση. Είναι ιδιαίτερος αποτελεσματικό ενάντια στα στελέχη *Penicillium digitatum* και *Penicillium italicum*, την πράσινη και μπλε μούχλα των εσπεριδοειδών αντίστοιχα (Kaplan *et al.*, 1979: Chu *et al.*, 2007: Kodama *et al.*, 2003: Maruyama *et al.*, 2007: Nunes *et al.*, 2001).



**Εικόνα 4:** Χημική δομή του γεωργικού φαρμάκου imazalil.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι λιγότερο πιθανό να αναπτυχθούν ανθεκτικά στελέχη μυκήτων με το IMZ απ' ό τι με άλλα μυκητοκτόνα. Συγκεκριμένα, δοκιμές έχουν δείξει ότι το IMZ είναι εξίσου αποτελεσματικό εναντίων στελεχών του γένους *Penicillium* ανθεκτικών στα παρόντα εμπορικά μυκητοκτόνα (Karlan *et al.*, 1979). Το 1976 ο Harding κατέγραψε την αποτελεσματικότητα του IMZ ενάντια στην μετασυλλεκτική σήψη εσπεριδοειδών από μύκητες του γένους *Penicillium* ανθεκτικούς στα TBZ, benomyl και 2-AB. Το 1977 οι Pierson και Wright ανακάλυψαν ότι το IMZ ήταν αποτελεσματικό ενάντια σε ανθεκτικά στο benzimidazole στελέχη του *Penicillium expansum*. Επίσης αναφέρθηκε ότι οι επαναλαμβανόμενες προσπάθειες να δημιουργηθούν μεταλλαγμένα στελέχη του *Penicillium digitum* ανθεκτικά στο IMZ απέτυχαν προφανώς λόγω των πολλαπλών τρόπων δράσης του (Horn and Eckert, 1977).

Το imazalil παρουσιάζει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, αλλά οι περισσότερες εφαρμογές μυκητοκτόνων για τα εσπεριδοειδή περιλαμβάνουν τη χρήση υδάτινων φορέων. Γι' αυτό έγιναν προσπάθειες να γαλακτοματοποιηθεί το μυκητοκτόνο ώστε να επιτευχθεί η συμβατότητά του με υδάτινα συστήματα (Karlan *et al.*, 1979).

Το 1976 η εταιρία Decco πραγματοποίησε, μελέτες σε υποπροϊόντα πορτοκαλιού, ώστε να καθοριστεί η κατανομή του IMZ σε διάφορα υποπροϊόντα που ελήφθησαν από πορτοκάλια τα οποία είχαν προηγουμένως μεταχειριστεί με IMZ. Σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία, 900 πορτοκάλια μεταχειρίστηκαν με συγκεντρώσεις 0, 2000 και 4000 ppm του IMZ, στη συνέχεια επεξεργάστηκαν για να ληφθεί χυμός, φλούδες και μελάσες τα οποία αναλύθηκαν με τη διαδικασία εκχύλισης

υπολειμμάτων με οξικό αιθυλεστέρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτά τα προορισμένα για κατανάλωση υποπροϊόντα περιείχαν λιγότερο από 5% του συνολικού IMZ που εφαρμόστηκε στα πορτοκάλια (Kaplan *et al.*, 1979).

Όσον αφορά την τοξικότητα του imazalil, σύμφωνα με την EPA (Environmental Protection Agency), δεν υφίσταται κίνδυνος σε καμία πληθυσμιακή υποομάδα από την αθροιστική έκθεση στο imazalil είτε από την διαιτητική έκθεση (τροφή και νερό) είτε από όλες τις υπόλοιπες μη επαγγελματικές πηγές. Έχει καθοριστεί από την EPA ως αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη για τον άνθρωπο η δόση 0-0,01 mg/kg. Σε μια δωδεκάμηνη μελέτη σε σκύλους σε δόσεις επιπέδων 0, 1.25, 2.5 ή 20 mg/kg bw/day που χορηγήθηκαν μέσω κάψουλας προσδιορίστηκε η δόση που δεν προκαλεί αρνητικές επιδράσεις στους οργανισμούς στόχους (Non Observable Adverse Effect Level, NOAEL) στα 2.5 mg/kg bw. Αυτό βασίστηκε σε κλινικά συμπτώματα, μειωμένη αύξηση σωματικού βάρους και αυξημένο βάρος του ήπατος σε υψηλότερες δόσεις (Verstraeten *et al.*, 1989).

Σύμφωνα με εκτιμήσεις της EPA το imazalil είναι πιθανό να είναι καρκινογόνο για τους ανθρώπους. Μελέτες καρκινογένεσης σε τροφικά έδειξαν ότι το imazalil ήταν καρκινογόνο, βάσει της σημαντικής αύξησης ηπατικών αδενωμάτων και μεικτών αδενωμάτων/καρκινωμάτων. Σε μια άλλη μελέτη, αξιολογήθηκε η δυνατότητα του imazalil να προκαλεί βλάβες στο DNA, σε έμβρυα του ψαριού *Danio rerio* και σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και αποδείχθηκε ξεκάθαρα ότι το imazalil προκάλεσε αύξηση στις συχνότητες δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών και μάλιστα με τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση (Sisman and Turkez, 2010). Επίσης έχει βρεθεί ότι προσθήκη του imazalil σε απομονωμένα ηπατοκύτταρα αρουραίου, σε συγκεντρώσεις 0,75 mM, οδήγησε σε οξύ κυτταρικό θάνατο, προκάλεσε λιπιδική υπεροξειδωση και έβλαψε την σχετική με την οξειδωτική φωσφορυλίωση κυτταρική αναπνοή (Nakagawa and Moore, 1995). Το imazalil έχει βρεθεί να επηρεάζει τη δράση του κυτοχρώματος P450 (Muto *et al.* 1997). Αυτός άλλωστε είναι και ένας από τους τρόπους δράσης του, να παρεμβαίνει σε ένα συγκεκριμένο ένζυμο του κυτοχρώματος P450 και έτσι αναστέλλει τη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα (Sisman and Turkez, 2010). Επίσης, έχει αποδειχθεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις σε αναπαραγωγικές παραμέτρους σε ποντικούς (Tanaka, 1995), για παράδειγμα μελέτες έδειξαν ότι το imazalil έχει ανασταλτική δράση εναντίον της

αρωματάσης CYP19, η οποία καταλύει την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (Vinggaard *et al.*, 2000).

Το imazalil έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, είναι πολύ σταθερό στην υδρόλυση, φωτολύεται σχετικά γρήγορα, αποδομείται πολύ αργά στο έδαφος κάτω από αερόβιες συνθήκες, είναι ελάχιστα κινητικό στα εδάφη και δεν είναι ιδιαίτερα πτητικό. Σύμφωνα με τις παραπάνω ιδιότητες και λαμβάνοντας υπόψη τους τύπους του προϊόντος, τις μεθόδους εφαρμογής και τους ρυθμούς εφαρμογής, η ΕΡΑ πιστεύει πως το imazalil δεν είναι πιθανό να βρεθεί σε σημαντικές συγκεντρώσεις στο περιβάλλον. Πρόσφατη αξιολόγηση του imazalil από την Επιστημονική Επιτροπή Φυτών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Scientific Committee on Plants, SCP) κατέληξε ότι η μετασυλλεκτική χρήση του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου σε φρούτα, κηπευτικά και πατάτες θα επιτραπεί στα κράτη μέλη μόνο υπό την προϋπόθεση ότι θα υπάρξει ολοκληρωμένο και κατάλληλο σχέδιο απορρύπανσης των υγρών αποβλήτων που παράγονται από τη συγκεκριμένη χρήση του. Εναλλακτικά θα πρέπει να παρουσιάζονται μελέτες όπου τα υπολείμματα του μυκητοκτόνου δεν προκαλούν βλάβες σε χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα. Θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχουν δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία για τη μικροβιακή αποδόμηση του μυκητοκτόνου imazalil.

## **1.5. Βιοαπορρύπανση**

Οι κύριοι λόγοι για την ανάγκη ελέγχου της ρύπανσης εδαφών και υδάτων και την διερεύνηση της βιοαπορρύπανσης ως λύσης στην αυξανόμενη περιβαλλοντική ρύπανση είναι πρώτα απ' όλα η ανησυχία για τη δημόσια υγεία, δεύτερον, η προστασία του περιβάλλοντος και τέλος, το κόστος της απορρύπανσης. Η βιομηχανία πετρελαίου και αερίου και η αγροτική βιομηχανία αποτελούν κύριες πηγές ρύπανσης, καθώς απελευθερώνουν στο περιβάλλον πληθώρα ξеноβιοτικών ενώσεων όπως γεωργικά φάρμακα, πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις, χλωριωμένα διφαινύλια, πολυχλωριωμένες διβενζοδιοξίνες κ.α. Παραδοσιακές τεχνικές διαχείρισης επικίνδυνων αποβλήτων, όπως φυσικές, χημικές και θερμικές τεχνικές ή διήθηση μέσω του εδάφους δεν είναι πάντοτε αποτελεσματικές και σε πολλές περιπτώσεις αποδεικνύονται δαπανηρές. Λαμβάνοντας υπόψη την τεράστια σημασία που έχει η

διατήρηση καθαρού πόσιμου νερού και υγιούς γόνιμης γης για κάθε χώρα αλλά και τις πολιτικές επιπτώσεις που μπορεί να επιφέρει η ρύπανση όταν διασχίσει τα εθνικά σύνορα, είναι ζωτικής σημασίας η ανάγκη για μια οικονομική και αποτελεσματική τεχνολογία για την απομάκρυνση περιβαλλοντικών ρύπων, όπως η βιοαπορρύπανση (Philp 2005).

Ως βιοαπορρύπανση ορίζεται η χρήση της μεταβολικής ικανότητας των μικροοργανισμών για την αποδόμηση και αποτοξικοποίηση ρύπων, που βασίζεται σε μικροβιακές, ενζυμικές δραστηριότητες. Είναι μια εξελισσόμενη μέθοδος για την απομάκρυνση και καταστροφή πολλών περιβαλλοντικών ρύπων. Η βιοαπορρύπανση ιδιαίτερα όταν μπορεί να διενεργηθεί *in situ*, είναι ένα μέσο για την απομάκρυνση πολλών χημικών ρύπων επιβλαβών για την ανθρώπινη υγεία και την ποιότητα του περιβάλλοντος. Αποτελεί μια διεργασία επιτάχυνσης της φυσικής απομάκρυνσης των βιοδιασπώμενων ρύπων και γι' αυτό είναι μια φυσική ή «πράσινη» λύση στο πρόβλημα των περιβαλλοντικών ρύπων που προκαλεί μηδαμινές, αν όχι καθόλου, επιπλέον οικολογικές επιπτώσεις. Τα τελικά προϊόντα της αποτελεσματικής βιοαπορρύπανσης, δηλαδή της πλήρους ανοργανοποίησης οργανικών ρύπων, όπως νερό και διοξείδιο του άνθρακα, είναι μη τοξικά και μπορούν να αφομοιωθούν χωρίς επιπτώσεις για το περιβάλλον και τους ζωντανούς οργανισμούς (Philp 2005).

Πολλοί παράγοντες τόσο φυσικοί όσο και βιολογικοί επηρεάζουν τη βιοαπορρύπανση. Από τις πιο σημαντικές παραμέτρους είναι η βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου, η οποία εξαρτάται από το αν η μορφή στην οποία βρίσκεται ο ρύπος τον καθιστά άμεσα διαθέσιμο στους αποδομητικούς μικροοργανισμούς. Επίσης, η διαθεσιμότητα μοριακού οξυγόνου είναι ιδιαίτερος σημαντική, καθώς τα αρχικά ενζυμα της αερόβιας διάσπασης είναι οι οξυγενάσες που απαιτούν την παρουσία μοριακού οξυγόνου για τη δράση τους. Η επίτευξη της βέλτιστης θερμοκρασίας για τη δράση των αποδομητικών μικροοργανισμών είναι επίσης μια σημαντική παράμετρος, διότι με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται η διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου και μειώνεται η διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα του οξυγόνου, γεγονός που επηρεάζει τη μικροβιακή κοινότητα. Ακόμα η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών αποτελεί έναν συχνό περιοριστικό παράγοντα στην βιοαπορρύπανση, καθώς επηρεάζει σημαντικά τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας. Άλλες φυσικές παράμετροι που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της

βιοαπορρύπανσης είναι το pH, το αναγωγικό δυναμικό, η υγρασία, η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων, το πορώδες του εδάφους. Ακόμη, βιολογικές παράμετροι, όπως ο παρασιτισμός, ο ανταγωνισμός του ενδογενούς μικροβιακού πληθυσμού για χώρο και θρεπτικά συστατικά επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την αποτελεσματικότητα της *in situ* βιοαπορρύπανσης.

Στα πλαίσια της βιολογικής *in situ* απορρύπανσης εφαρμόζονται δύο κυρίως βιολογικές στρατηγικές, ο βιοεμπλουτισμός (bioaugmentation) και η βιοενεργοποίηση (biostimulation). Ο βιοεμπλουτισμός όπως περιγράφηκε από τον Alexander (1999), μπορεί να θεωρηθεί ως ο εμβολιασμός ρυπασμένων εδαφών ή υδάτων με συγκεκριμένα μικροβιακά στελέχη ή κοινοπραξίες στελεχών για τη βελτίωση της ικανότητας βιοαπορρύπανσης του συστήματος από συγκεκριμένους οργανικούς ρύπους. Η βιοενεργοποίηση από την άλλη στοχεύει στη βελτίωση της δραστηριότητας των ενδογενών μικροοργανισμών που είναι ικανοί να αποδομούν οργανικούς ρύπους. Η βιοενεργοποίηση σε ορισμένες περιπτώσεις περιλαμβάνει την προσθήκη ανόργανων θρεπτικών συστατικών για τη διέγερση της βιοαπορρύπανσης από τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς. Σε άλλες περιπτώσεις είναι η εκούσια διέγερση των ενδογενών αποικοδομητικών βακτηρίων με τη χρήση δεκτών ηλεκτρονίων, νερού, προσθήκης θρεπτικών συστατικών ή δοτών ηλεκτρονίων. Στην πράξη είναι μια πολύ πιο απλή και λιγότερο δαπανηρή τεχνική βιοαπορρύπανσης (Philp, 2005).

Η χρήση των βακτηρίων για την βιοαπορρύπανση οικοσυστημάτων ρυπασμένων με οργανικούς ρύπους (π.χ. γεωργικά φάρμακα) έχει μελετηθεί λεπτομερώς. Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα της χρήσης βακτηρίων για την βιοαποδόμηση οργανικών ρύπων είναι ότι καλλιεργούνται εύκολα, έχουν γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης, χρησιμοποιούν τους οργανικούς ρύπους ως πηγή C και N που συνεπάγεται ταχύτατη αποδόμηση και είναι ευέλικτοι αποδομητές, καθώς μπορούν να αποδομούν πλήθος οργανικών ρύπων τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες, σε αντίθεση με τους μύκητες που είναι υποχρεωτικά αερόβιοι οργανισμοί. Βασικό μειονέκτημα των βακτηρίων είναι ότι είναι εξαιρετικά εξειδικευμένοι μικροοργανισμοί, γεγονός που περιορίζει τη χρήση τους σε περιπτώσεις ρύπανσης με οργανικούς ρύπους διαφορετικής χημικής δομής και σύστασης (Maloney, 2001: Pointing, 2001: Shah *et al* ).

Από την άλλη, οι μύκητες και ιδιαιτέρως η κατηγορία των μυκήτων λευκής σήψης (ΜΛΣ) έχουν κινήσει το ενδιαφέρον διαφόρων ερευνών για την ανάπτυξη τεχνολογίας των ΜΛΣ για την βιοαπορρύπανση περιβαλλοντικών ρύπων εξαιτίας μιας σειράς μοναδικών χαρακτηριστικών και πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν. Πρώτα απ' όλα, είναι οργανισμοί που απαντώνται στη φύση, με την ικανότητα να αποδομούν μια μεγάλη ποικιλία οργανικών ρύπων. Δεύτερον, τα αποδομητικά τους ένζυμα (υπεροξειδάσες της λιγνίνης) εκφράζονται σε απόκριση στην έλλειψη αζώτου, έτσι ο μύκητας δεν χρειάζεται να εγκλιματιστεί για την αποδόμηση του ρύπου. Τρίτον, το ενζυμικό λιγνινολυτικό σύστημα των ΜΛΣ είναι εξωκυτταρικό, συνεπώς δεν είναι απαραίτητη η μεταφορά των ρύπων στο κυτόπλασμα για τον περαιτέρω μεταβολισμό τους. Το χαρακτηριστικό αυτό δίνει την δυνατότητα στους ΜΛΣ να οξειδώνουν υποστρώματα που παρουσιάζουν χαμηλή διαλυτότητα και δεν μπορούν να εισέλθουν με ευκολία διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων αλλά και επίσης να αποδομούν ενώσεις που είναι βιοδιαθέσιμες αλλά παραμένουν προσροφημένες σε κάποια εδαφική επιφάνεια. Επιπλέον, εφόσον οι ΜΛΣ διαθέτουν ενζυμικά συστήματα για την αποδόμηση ενός πολύπλοκου πολυμερούς όπως η λιγνίνη, έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν ένα μεγάλο φάσμα οργανικών ρύπων, παρουσιάζοντας σε αντίθεση με τα βακτήρια, χαμηλή εξειδίκευση. Επίσης, εκκρίνουν  $H_2O_2$ , οργανικά οξέα και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες που συμβάλλουν στη μη ενζυμική αποδόμηση των οργανικών ρύπων. Τέταρτον, οι ΜΛΣ είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση αποδομώντας τη λιγνίνη, αλλά δεν μπορούν να τη χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους, παρά μόνο παρουσία συνυποστρωμάτων, όπως η κυτταρίνη. Έτσι φθηνά υποστρώματα λιγνινοκυτταρίνης (π.χ. άχυρο, υπολείμματα καλαμποκιών κ.α.) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θρεπτικό υπόστρωμα σε ρυπασμένες περιοχές για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών και την αποδόμηση των ρύπων (Barr and Aust, 1994: Fernando and Aust, 1994: Reddy, 1995). Τέλος, οι μύκητες μπορούν να ανταγωνιστούν άλλους μικροοργανισμούς με τη χρήση λιγνινοκυτταρινικών υλικών (πριονίδι, κόνους καλαμποκιού, άχυρο κ.α.) σαν θρεπτικό συστατικό, καθώς η κυτταρίνη αυτών των θρεπτικών μέσων δεν είναι άμεσα διαθέσιμη σε άλλα μικρόβια (Shah *et al*, 1992).

Παρότι η βιοαπορρύπανση χρησιμοποιείται από τα τέλη της δεκαετίας του 1980, θεωρείται ακόμα ως καινοτόμα τεχνική από τον Οργανισμό Προστασίας του Περιβάλλοντος των Η.Π.Α. (U.S. Environmental Protection Agency, EPA). Ενώ βιολογικοί χειρισμοί ανθρώπινων και ζωικών λυμάτων (επεξεργασία βωθρολυμάτων και κομποστοποίηση) χρησιμοποιούνται ευρέως, η βιοαπορρύπανση προς το παρόν συνιστά μόνο το 10-15% όλων των μεθόδων αποκατάστασης ρυπασμένων εδαφών και υπόγειων υδάτων στις Η.Π.Α. Η εξάρτηση από την ικανότητα των μικροοργανισμών να βιοδιασπούν ρύπους υστερεί σε σχέση με φυσικές μεθόδους αποκατάστασης, όπως η αποτέφρωση, η θερμική εκρόφηση και η στερεοποίηση. Μια από τις κύριες αιτίες για την απροθυμία να βασιστούμε στη βιοαπορρύπανση είναι η δυσκολία να εγκαθιδρυθούν μηχανικές παράμετροι που να διασφαλίζουν την αξιοπιστία της μεθόδου. Οι ευρείες και ποικίλες μεταβολικές ικανότητες των μικροοργανισμών που φυσιολογικά απαντώνται στο περιβάλλον (τόσο βακτηρίων όσο και μυκήτων) και η πιθανή δημιουργία γενετικώς τροποποιημένων βακτηρίων με αυξημένες καταβολικές ικανότητες και περιορισμένη ικανότητα διασποράς στο περιβάλλον συνεπάγονται σημαντικές προοπτικές για μελλοντική ανάπτυξη των τεχνολογιών βιοαπορρύπανσης. Με καλύτερη κατανόηση της μικροβιακής ποικιλότητας και της περιβαλλοντικής μηχανικής, η βιοαπορρύπανση θα αναδειχθεί σε μια από τις πιο οικονομικές και αποτελεσματικές μεθόδους απορρύπανσης του περιβάλλοντος (Philp 2005).

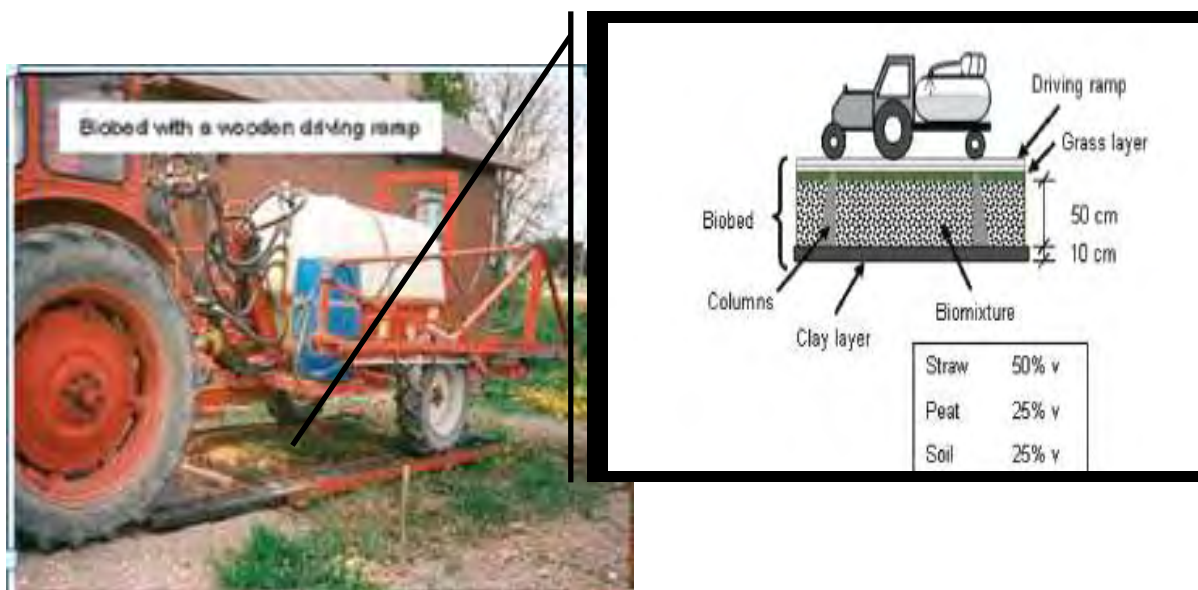
### **1.5.1. Βιοκλίνες**

Οι βιοκλίνες δημιουργήθηκαν για πρώτη φορά στη Σουηδία ως απόκριση στην ανάγκη για απλές και αποτελεσματικές μεθόδους για την ελαχιστοποίηση της περιβαλλοντικής ρύπανσης από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων στη γεωργία (Castillo *et al* 2008). Η αποτελεσματικότητά τους βασίζεται στην αυξημένη ικανότητά τους να προσροφούν γεωργικά φάρμακα ή να διεγείρουν την ταχύτερη βιοαποδόμησή τους προσφέροντας ευνοϊκές φυσικοχημικές και βιολογικές συνθήκες για την μέγιστη μικροβιακή δραστηριότητα (Karanasios *et al.*, 2010). Το σύστημα των βιοκλινών έχει κινήσει το ενδιαφέρον σε διάφορες χώρες, όπου διενεργείται έρευνα ώστε να προσαρμοστεί το σύστημα αυτό στις τοπικές συνθήκες και εφαρμογές. Σαν αποτέλεσμα, το σύστημα των βιοκλινών έχει λίγο ως πολύ τροποποιηθεί και κάποιες φορές μετονομαστεί, όπως για παράδειγμα σαν biomassbed



στην Ιταλία, biofilter στο Βέλγιο, phytobac και biobac στην Γαλλία. Η αποτελεσματικότητα και απλότητα των βιοκλινών τις καθιστούν κατάλληλες για χρήση σε αναπτυσσόμενες (π.χ. Περού, Γουατεμάλα, Εκουαδόρ). Στα πλαίσια της προσαρμογής του συστήματος των βιοκλινών στις εκάστοτε τοπικές συνθήκες και εφαρμογές, σημειώνονται αλλαγές κυρίως στη δομή του συστήματος και στη σύσταση του βιομίγματος (Castillo *et al* 2008).

Η αυθεντική σουηδική βιοκλίνη είναι μια είναι μια απλή και χαμηλού κόστους κατασκευή που στοχεύει στη συλλογή και αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων από διαρροές κατά την διάρκεια των χειρισμών προετοιμασίας του ψεκασμού ή μετά τον ψεκασμό. Αποτελείται από τρία κύρια κομμάτια που τοποθετούνται σε ένα όρυγμα με βάθος 60cm: (i) ένα αργιλικό αδιαπέραστο στρώμα στον πυθμένα (10cm) (ii) ένα βιομίγμα από άχυρο, τύρφη και έδαφος (50:25:25 vol %) πάχους 50cm και (iii) ένα στρώμα γρασιδιού που καλύπτει την επιφάνεια (Torstensson *et al.*, 1997:2000:2002).

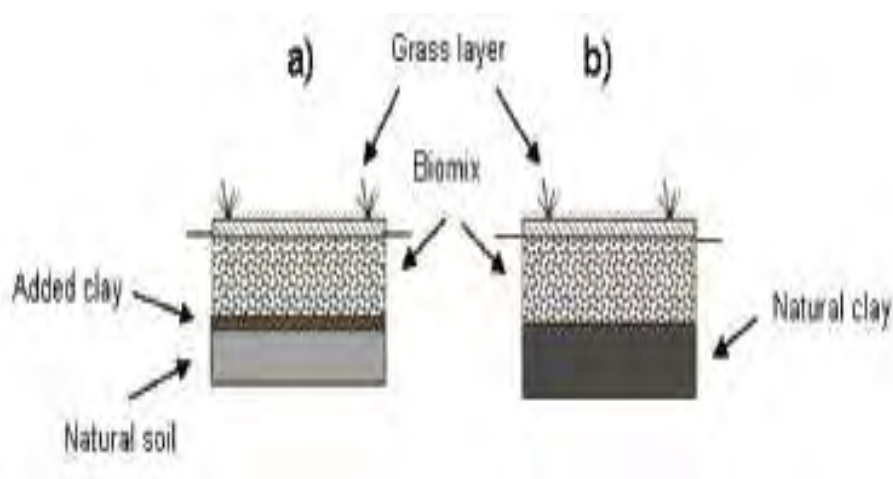


Εικόνα 5: Το σύστημα βιοκλίνης.

#### 1.5.1.1. Τύποι βιοκλινών

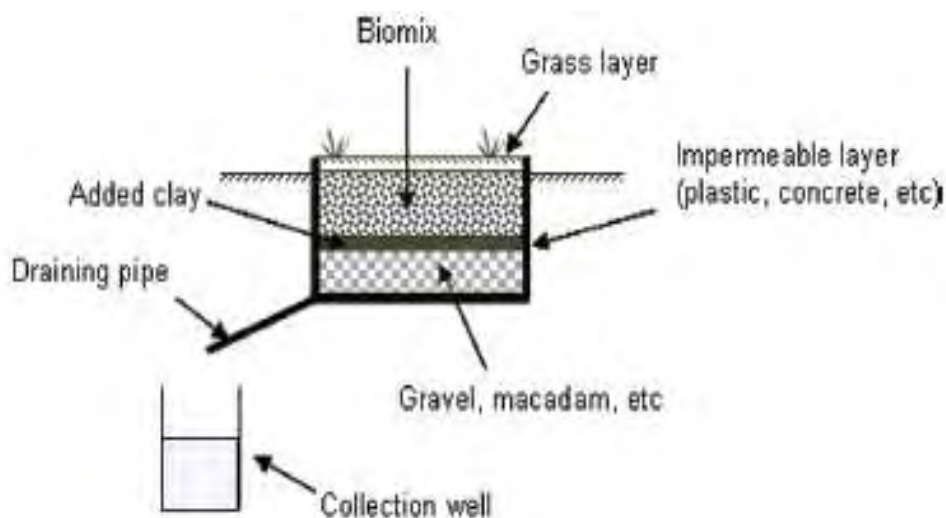
Ανάλογα με το αν ο πυθμένας της βιοκλίνης είναι η όχι απομονωμένος από το περιβάλλον, διακρίνονται δύο τύποι βιοκλίνης: η μη διαχωρισμένη βιοκλίνη και η διαχωρισμένη βιοκλίνη (Castillo *et al* 2008).

Η μη διαχωρισμένη βιοκλίνη δεν διαθέτει αδιαπέραστο συνθετικό υλικό για την απομόνωσή της από το έδαφος. Η αυθεντική σουηδικού σχεδιασμού βιοκλίνη ανήκει σε αυτή την κατηγορία. Σε πολλές περιπτώσεις, ένα φυσικό στρώμα αργίλλου υπάρχει στο πυθμένα της βιοκλίνης. Αν δεν υπάρχει, τότε προστίθεται ένα συνθετικό στρώμα αργίλλου ώστε να περιορίζεται όσο το δυνατό γίνεται η έκπλυση. Δεν πραγματοποιείται συλλογή των απόνερων σε αυτό το σύστημα (Castillo *et al* 2008).



**Εικόνα 6:** Μη διαχωρισμένη βιοκλίνη.

Από την άλλη, η διαχωρισμένη βιοκλίνη μοιάζει με την αυθεντική σουηδική βιοκλίνη αλλά είναι διαχωρισμένη (lined) από το περιβάλλον, με ένα συνθετικό αδιαπέραστο στρώμα (πλαστικό, τσιμέντο, tarpaulin κλπ) που την απομονώνει από τα έδαφος. Αυτός ο σχεδιασμός επιτρέπει τη συλλογή των απόνερων σε ειδικά φρεατια που είναι δομημένα στο πλάι της βιοκλίνης. Αυτός ο σχεδιασμός βιοκλίνης χρησιμοποιείται στο Ηνωμένο Βασίλειο (Castillo *et al* 2008).



**Εικόνα 7:** Διαχωρισμένη βιοκλίνη.

### 1.5.1.2. Συστατικά του συστήματος βιοκλίνης

Η αποτελεσματικότητα της συγκράτησης και αποδόμησης γεωργικών φαρμάκων εξαρτάται από καθένα από τα συστατικά της βιοκλίνης: το στρώμα πηλού, το βιομίγμα και το επιφανειακό στρώμα γρασιδιού (Castillo *et al* 2008).

Όσον αφορά το στρώμα αργίλου, λόγω της χαμηλής διαπερατότητας και την υψηλής ικανότητας απορρόφησής, χρησιμοποιείται σαν ένα αδιαπέραστο στρώμα για τη μείωση της ροής των απόνερων προς το έδαφος και την αύξηση του χρόνου κατακράτησης του μικροβιοκτόνου στη βιοκλίνη. Αναγκαία προϋπόθεση για τη σωστή λειτουργία του στρώματος αργίλου είναι ότι το υλικό πρέπει να είναι υγρό και διογκωμένο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ρωγμών και η επιλεκτική ροή (Castillo *et al* 2008).

Το βιομίγμα θα πρέπει να έχει την ικανότητα να κατακρατεί και να αποικοδομεί τα γεωργικά φάρμακα. Για να επιτευχθεί αυτό, το βιομίγμα θα πρέπει να έχει καλή ικανότητα απορρόφησης και υψηλή μικροβιακή δραστηριότητα. Και τα δύο αυτά χαρακτηριστικά επηρεάζονται από τη σύνθεση, ομοιογένεια, ηλικία, υγρασία

και θερμοκρασία του μίγματος. Το βιομίγμα έχει αποδειχθεί ως ο κυρίως παράγοντας ρύθμισης της αποτελεσματικότητας της βιοκλίνης. Ο κλασικός τύπος βιοκλίνης αποτελείται από τύρφη, άχυρο και έδαφος σε ογκομετρικές αναλογίες 1:2:1 (Castillo *et al* 2008).

Το επιφανειακό στρώμα γρασιδιού συνεισφέρει στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της βιοκλίνης, ιδιαίτερος στα ανώτερα στρώματα όπου τα περισσότερα γεωργικά φάρμακα συγκρατούνται και αποδομούνται. Επίσης βοηθά στη ρύθμιση της υγρασίας της βιοκλίνης, λόγω της ανοδικής μεταφοράς του νερού προς τις ρίζες και επιπλέον μπορεί να παράγει ριζικά εκκρίματα για να υποστηρίξει συμμεταβολικές διεργασίες (π.χ.εκκριση υπεροξειδασών). Το στρώμα γρασιδιού αποτελεί επίσης ένα μέσο απόδειξης διαρροών, καθώς καταστροφή του γρασιδιού παρατηρείται συχνά σε περιοχές όπου μεταχειρίζονται συμπυκνωμένα γεωργικά φάρμακα (Vaughan *et al.*, 1994).

### **1.5.1.3. Η σύσταση του βιομίγματος.**

Το κύριο συστατικό μιας βιοκλίνης, το βιομίγμα, έχει ταυτοποιηθεί ως ένας σημαντικό παράγοντας που ελέγχει την αποτελεσματικότητά της βιοκλίνης. Ένα αποτελεσματικό βιομίγμα, ευνοεί την προσρόφηση του γεωργικού φαρμάκου και υποστηρίζει μια δραστήρια μικροβιακή κοινότητα ικανή να αποδομεί γεωργικά φάρμακα σε υψηλές συγκεντρώσεις (Castillo *et al* 2008: Karanasios *et al.*, 2010). Η αυθεντική Σουηδική βιοκλίνη αποτελείται από άχυρο, τύρφη και έδαφος σε αναλογία 50:25:25 vol %. Κάθε ένα από τα συστατικά του βιομίγματος παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της κατακράτησης και αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων (Castillo *et al* 2008).



**Εικόνα 8:** Μύκητες Λευκής σήψης σε OSB (Original Swedish Biomixture).

Το άχυρο είναι το κύριο υπόστρωμα για την αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων και την μικροβιακή δραστηριότητα, ειδικά από μύκητες που αποικοδομούν λιγνίνη (όπως οι μύκητες λευκής σήψης), οι οποίοι παράγουν φαινολοξειδάσες (υπεροξειδάσες και λακκάσες). Η αποδόμηση μεμονωμένων γεωργικών φαρμάκων από τα ένζυμα αυτά έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες. Επιπλέον, η ευρεία εξειδίκευσή τους τα καθιστά κατάλληλα για αποδόμηση μειγμάτων γεωργικών φαρμάκων. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η ικανότητα του βιομίγματος να αποδομεί γεωργικά φάρμακα σχετίζεται θετικά με το ποσοστό του άχυρου που περιείχε (Castillo and Torstensson, 2007). Γι' αυτό συνιστάται μια υψηλή ποσότητα άχυρου στο βιομίγμα, παρότι στην πράξη δεν χρησιμοποιείται περισσότερο από 50 κ.ο% λόγω της ανάγκης να επιτευχθεί ένα ομοιογενές μίγμα (Torstensson and Castillo 1997, Castillo *et al.*, 2000:2001:2007, von Wiren-Lehr *et al.*, 2001).

Το έδαφος παρέχει ικανότητα προσρόφησης και αποτελεί σημαντική πηγή μικροοργανισμών, ιδιαίτερα βακτηρίων που αποδομούν γεωργικά φάρμακα. Ωστόσο, η υψηλή αναλογία C/N και το χαμηλό pH του βιομίγματος, που ευνοεί την δραστηριότητα των μυκήτων λευκής σήψης, περιορίζει την αποδομητική δραστηριότητα των βακτηρίων του εδάφους. Παρόλα αυτά η παρουσία των βακτηρίων του εδάφους μπορεί να ενισχύσει το βαθμό αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων, αποδομώντας για παράδειγμα πιο πολικούς μεταβολίτες που προκύπτουν από την αποδόμηση ορισμένων γεωργικών φαρμάκων από μύκητες λευκής σήψης (Castillo *et al.*, 2007, Torstensson *et al.*, 1996, Bergstrom *et al.*, 1998, Kotterman *et al.*, 1998). Η επιλογή του εδάφους που θα χρησιμοποιηθεί στις βιοκλίνες δεν

φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της βιοκλίνης και γι' αυτό τα τοπικά εδάφη μπορούν να χρησιμοποιούνται στο βιομίγμα.

Η τύρφη στο βιομίγμα παρουσιάζει αυξημένη ικανότητα προσρόφησης, βελτιώνει το πορώδες του βιομίγατος και διατηρεί βέλτιστες συνθήκες υγρασίας. Επίσης, συμβάλλει στην αβιοτική αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων και μειώνει το pH του βιομίγατος. Έτσι μια υψηλή περιεκτικότητα σε τύρφη δίνει χαμηλό pH ευνοϊκό για την ανάπτυξη μυκήτων. Ένας σημαντικός παράγοντας που συχνά ενεργοποιεί το λιγνινο-αποικοδομητικό σύστημα των μυκήτων είναι ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών, ιδιαιτέρως η ανεπάρκεια αζώτου. Γι' αυτό η προσθήκη θρεπτικών συστατικών στο βιομίγμα δεν συνιστάται (Castillo *et al* 2007:2008: Coppola *et al.*, 2007: Karanasios *et al.*, 2010). Η χρήση της τύρφης στο βιομίγμα έχει επικριθεί, λόγω του σχετικά υψηλού κόστους και της χαμηλής διαθεσιμότητας της, ιδιαίτερα στις χώρες της νότιας Ευρώπης. Για το λόγο αυτό, έχει διερευνηθεί και η χρήση υποκατάστατων τύρφης στα βιομίγματα. (Vischetti *et al.*, 2006: Karanasios *et al*, 2010). Ως τέτοια δοκιμάστηκαν κομποστοποιημένα αγροτικά υλικά τα οποία εκτός από πηγή ενέργειας αποτελούν και επιπλέον πηγή μικροοργανισμών με ικανότητα καταβολισμού γεωργικών φαρμάκων (Vischetti *et al.*, 2006). Σε μία μελέτη, όπου διερευνήθηκε η αντικατάσταση της τύρφης με κομποστοποιημένα αγροτικά υλικά, το βιομίγμα που περιείχε κομποστοποιημένα φύλλα ελιάς αντί τύρφης, έδειξε την υψηλότερη αποδομητική ικανότητα μεταξύ βιομιγμάτων που περιείχαν διάφορα άλλα αγροτικά κομποστοποιημένα υλικά (Coppola *et al.*, 2007: Karanasios *et al*, 2010). Τα κομπόστ διαφέρουν σημαντικά από την τύρφη σε φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και βιολογική δραστηριότητα. Οι διαφορές αυτές μπορεί να αντανακλούν διαφορές στην αποτελεσματικότητα και δραστηριότητα της μικροχλωρίδας που αποδομεί τα γεωργικά φάρμακα και τη συνολική ικανότητα αποδόμησης του βιομίγατος. Γενικά, τα βιομίγματα που περιέχουν τύρφη παρέχουν το ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη μυκήτων λευκής σήψης ενώ τα βιομίγματα που περιέχουν κομποστοποιημένα υλικά ευνοούν την ανάπτυξη και την αποδομητική δράση βακτηρίων (Castillo *et al.*, 2008: Karanasios *et al.*, 2010).

Παρότι το άχυρο και φαίνεται να είναι αποτελεσματικό συστατικό του βιομίγατος, η υψηλότερη διαθεσιμότητα και το χαμηλότερο κόστος άλλων

λιγνινοκυτταρινικών υλικών σε συγκεκριμένες περιοχές έχει οδηγήσει στη χρήση υποκατάστατων του άχυρου στα βιομίγματα. Έτσι, έχει δοκιμαστεί η αντικατάσταση του άχυρου σε συστήματα βιοκλίνης με κλαδιά αμπέλου και φλούδες εσπεριδοειδών, χιτίνη, υποπροϊόντα καρύδας, υπολείμματα ζαχαροκάλαμων κ.α. (Corpola et al., 2007; Genot et al., 2002; Debaer et al., 2006; De Roffignac et al., 2008). Παραπροϊόντα οινοποιίας αποδείχθηκαν να έχουν υψηλότερη αποτελεσματικότητα από το άχυρο, ενώ λιγνινοκυτταρινικά υλικά με υψηλό φαινολικό περιεχόμενο, όπως φύλλα ελιάς και φλούδες πορτοκαλιών οδήγησαν σε εξαιρετικά περιορισμένη αποδομητική ικανότητα (Karanasios *et. al.*, 2010). Στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε ότι το εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών (spent mushroom substrate, SMS) παρουσίαζε υψηλή αποδομητική ικανότητα ανάλογη με την περιεκτότητα του στο βιομίγμα. Μάλιστα, ακόμα και χαμηλές αναλογίες του SMS (5%) ήταν αρκετές για να προάγουν την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων σε σύγκριση με την αποδόμηση σε βιομίγμα που περιείχε μόνο άχυρο αντί SMS (Karanasios *et. al.*, 2010). Το SMS, αποτελείται από παστεριωμένο άχυρο, εμβολιασμένο με τον εδώδιμο μύκητα λευκής σήψης *P. ostreatus*. Αυτό το υπόστρωμα απομακρύνεται σε μεγάλες ποσότητες μετά την ολοκλήρωση της παραγωγής μανιταριών και μπορεί να ληφθεί από όλες τις μονάδες παραγωγής μανιταριών χωρίς καθόλου κόστος αφού δεν είναι πλέον χρήσιμο για περαιτέρω παραγωγή μανιταριών. Ο *P. ostreatus* παράγει μη εξειδικευμένα εξωκυτταρικά ένζυμα που έχουν βρεθεί να καταλύουν τις αρχικές καταβολικές αντιδράσεις δομικά ποικίλων γεωργικών φαρμάκων (Bending *et al.*, 2002). Η ενσωμάτωση του SMS σε έδαφος αποδείχθηκε αποτελεσματική για την αποδόμηση διαφόρων γεωργικών φαρμάκων (Kadian *et al.*, 2008). Μόνο μερικές μελέτες έχουν διερευνήσει τη χρήση του SMS στις βιοκλίνες. Ο Trevisan *et al.* (2007) χρησιμοποίησαν SMS σε ένα πρότυπο σύστημα βιοκλίνης με καλά αποτελέσματα. Σε άλλες μελέτες ο εμβολιασμός των βιομιγμάτων με μύκητες λευκής σήψης βελτίωσε σημαντικά την αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων (Castillo *et al.*, 2001; Bending *et al.* 2002).

## 1.6. Μύκητες λευκής σήψης

Οι μύκητες λευκής σήψης (ΜΛΣ) ανήκουν ταξινομικά κυρίως στο φύλλο *Bacidiomycota* (π.χ. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus*

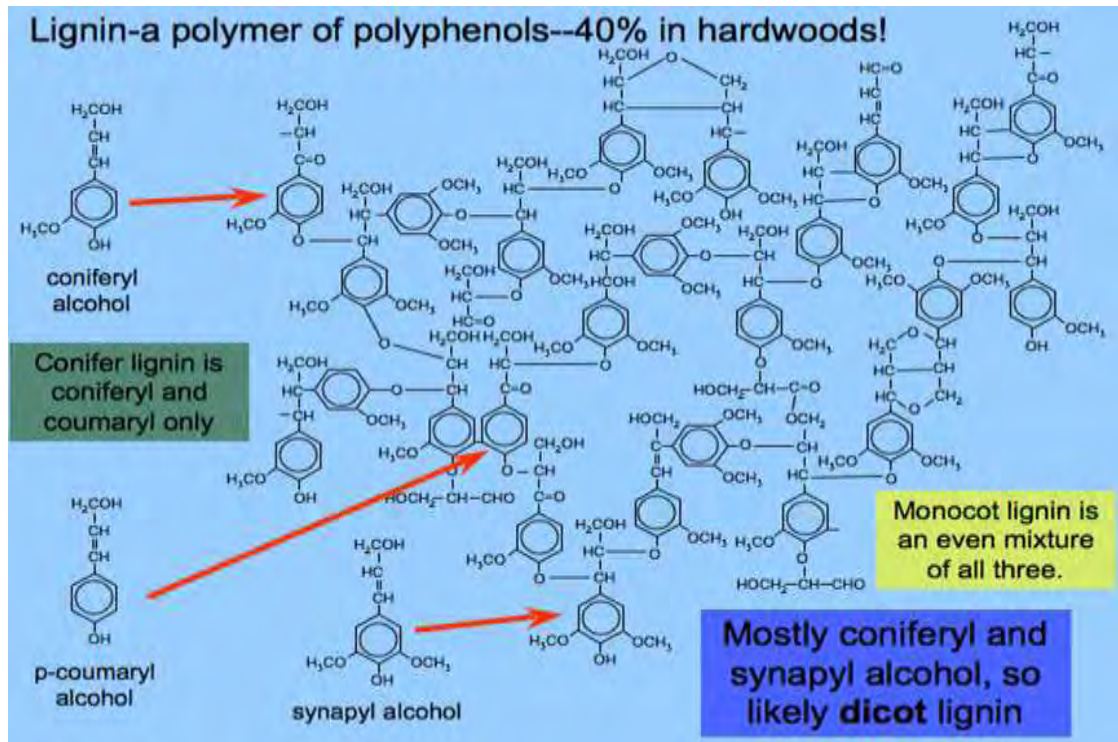
*ostreatus* κ.α.) περιλαμβάνουν όμως και είδη του φύλλου *Ascomycota* (π.χ. *Xylaria polymorpha*, *X. hypoxylon* κ.α). (Rabinovich *et al.*, 2004). Είναι νηματοειδείς σαπροφυτικοί μύκητες που αναπτύσσονται κυρίως στο ξύλο νεκρών δέντρων και ονομάστηκαν ως «λευκής σήψης» λόγω των λευκού χρώματος αποικισμένων νεκρών φυτικών ιστών (Knapp *et al.*, 2001). Αυτοί οι μύκητες, αποικοδομούν κυρίως ξύλο φυλλοβόλων δέντρων (Rypacek 1977).



**Εικόνα 9:** Ανάπτυξη ΜΛΣ σε νεκρό δέντρο.

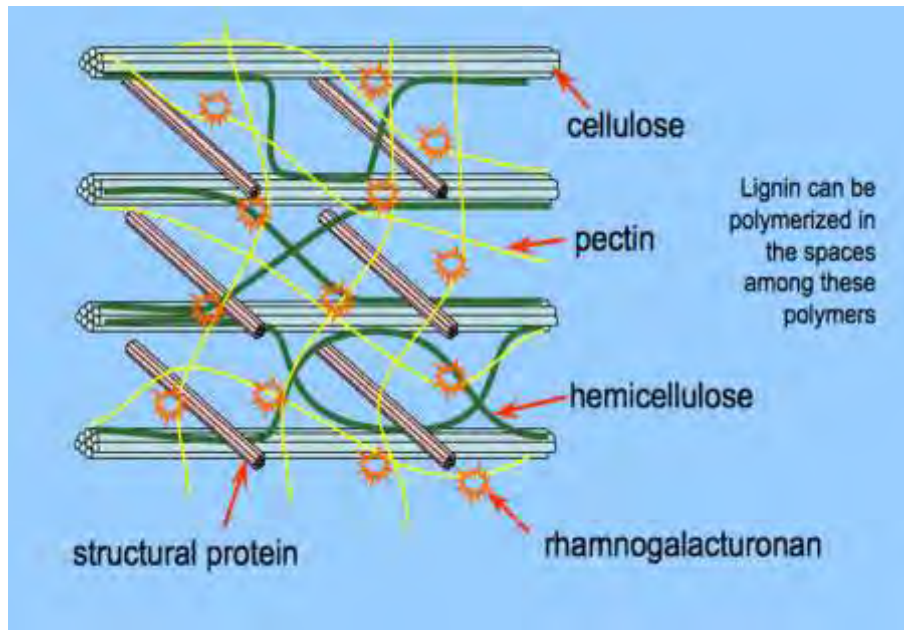
Οι ΜΛΣ είναι οι μόνοι γνωστοί οργανισμοί που μπορούν να διασπάσουν πλήρως την λιγνίνη σε  $\text{CO}_2$  και  $\text{H}_2\text{O}$  (Kirk and Farrell 1987). Η λιγνίνη είναι ένα φαινολοπροπανοϊκό πολυμερές που αποτελείται από φαινολικά προπανοειδή μονομερή (Sarkanen and Ludwig, 1971). Είναι ένα ετερογενές, άμορφο, ιδιαίτερος διακλαδισμένο πολυμερές στο οποίο τα μονομερή συνδέονται τυχαία μεταξύ τους με δεσμούς C-C και C-O (Singh and Chen, 2008). Αυτά τα δομικά χαρακτηριστικά επιβάλλουν σημαντικούς περιορισμούς στη βιοαποδομησιμότητα του μορίου αυτού που είναι κατά συνέπεια από τα πιο δύσκολα βιοδιασπώμενα πολυμερή (Hatakka 1994: Higuchi 1990: Kirk and Farrell 1987). Η περιπλοκότητα του πολυμερούς της λιγνίνης υποδηλώνει ότι δεν μπορεί να υπόκειται σε ενζυμική υδρόλυση και ότι η αρχική διάσπαση πρέπει να είναι οξειδωτική, μη εξειδικευμένη και εξωκυτταρική (Hatakka 1994: Higuchi 1990: Kirk and Farrell 1987).





**Εικόνα 10:** Η δομή της λιγνίνης: ένα πολυμερές πολυφαινολών που αποτελεί μέχρι και το 40% του σκληρού ξύλου.

Η λιγνίνη συνδέεται με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη προς σχηματισμό λιγνινο-κυτταρινών, οι οποίες αποτελούν ενώσεις των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών και των δέντρων. Μπορεί να αποτελεί μέχρι και το 40% του σκληρού ξύλου. Ο ρόλος της είναι να παρέχει σταθερότητα, προστασία από τη μικροβιακή αποσύνθεση και λειτουργεί ως ενδιάμεση βαλβίδα μεταφοράς νερού μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και του ξυλώματος των φυτών (Hammel and Cullen, 2008; Ward *et al.*, 2004). Εφόσον η λιγνίνη είναι ιδιαίτερος περίπλοκη για να αποδομηθεί, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη με τις οποίες η λιγνίνη είναι στενά συνδεδεμένη, προστατεύονται από την αποδόμηση και σαν αποτέλεσμα η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι πολύ χαμηλή (Ward *et al.*, 2004). Η λιγνίνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα και ενέργειας από τους ΜΛΣ, αλλά η αποικοδόμησή της από αυτούς, καθιστά δυνατή την πρόσβασή τους στην κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, τις βασικές πηγές άνθρακα και ενέργειας των ΜΛΣ (Ward *et al.*, 2004). Με άλλα λόγια η διάσπαση της λιγνίνης από τους ΜΛΣ, αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης.

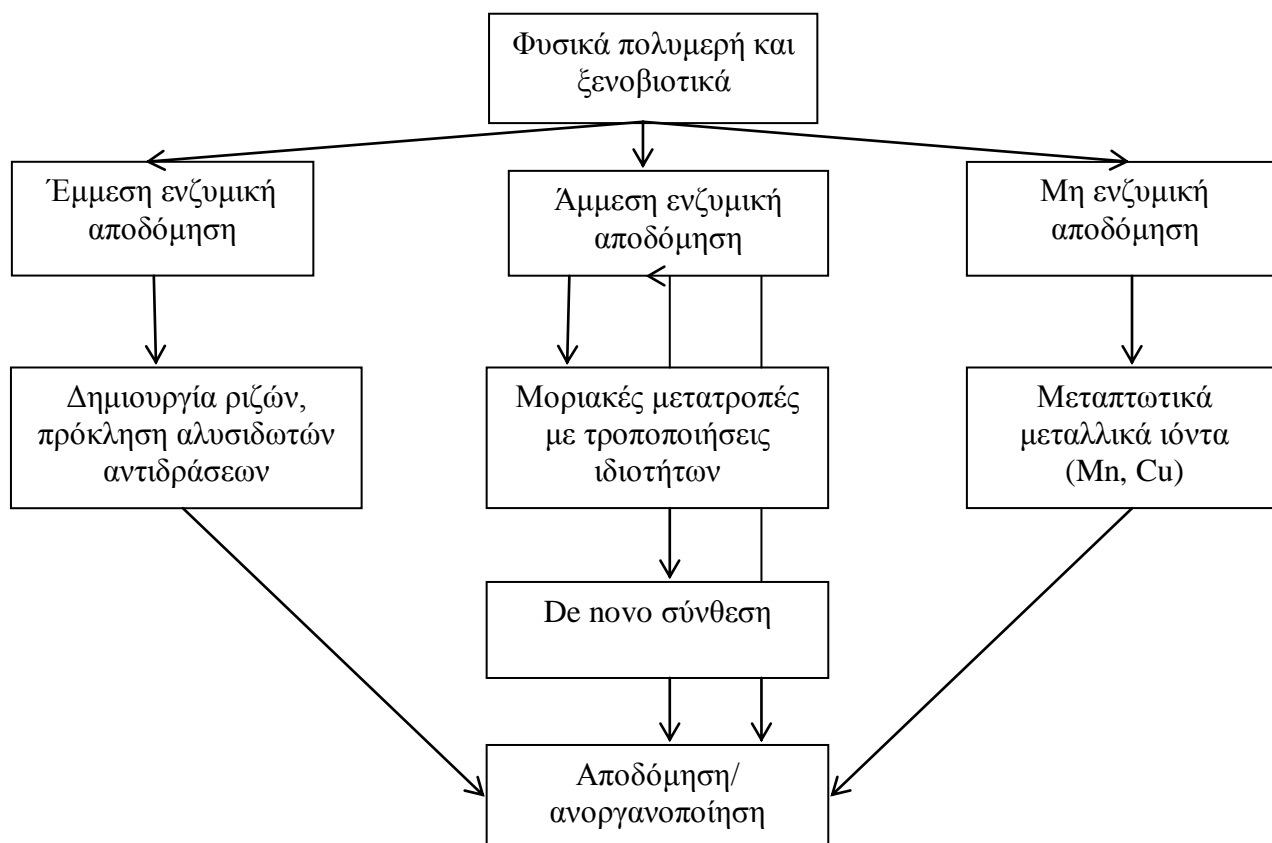


**Εικόνα 11:** Πρωτογενές φυτικό κυτταρικό τοίχωμα: διασταυρωμένα πολυμερή διαφόρων σακχάρων και πρωτεϊνών. Η λιγνίνη μπορεί να πολυμεριστεί στα διαστήματα ανάμεσα σε αυτά τα πολυμερή.

Οι ΜΛΣ αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μυκήτων εκ των οποίων μερικά είδη αποικοδομούν επιλεκτικά τη λιγνίνη του ξύλου αφήνοντας κοιλότητες λευκών αποδομημένων κυττάρων που αποτελούνται εξολοκλήρου από κυτταρίνη (π.χ. *Phanerochate chrisosporium*, *Phlebia radiata*). Αυτό αναφέρεται ως επιλεκτική απολιγνίνωση (Blanchette 1995; Eriksson *et al.* 1990). Άλλα είδη αποδομούν ταυτόχρονα λιγνίνη και κυτταρίνη, γεγονός που αναφέρεται σαν μη επιλεκτική απολιγνίνωση (π.χ. *Trametes versicolor*). Υπάρχουν επίσης είδη ικανά να επιτελούν και τους δύο αυτούς τύπους αποδόμησης (π.χ. *Ganoderma applanatum*, *Heterobasidion annosum*) (Blanchette 1995; Eriksson *et al.* 1990).

Έχει αποδειχτεί ότι η αποδόμηση ξενοβιοτικών και λιγνινοκυτταρινικών υλικών από ΜΛΣ περιλαμβάνει τη δράση ενός πολυενζυμικού συμπλόκου, η σύνθεση του οποίου εξαρτάται από το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσεται ο μύκητας. Η αποτελεσματικότητα της αποδόμησης διασφαλίζεται από έναν συνδυασμό εξωκυτταρικών λιγνινολυτικών ενζύμων, οργανικών οξέων, και σχετικών ενζύμων. Σύμφωνα με σύγχρονες αντιλήψεις, υπάρχουν τρία κύρια μονοπάτια για την αποδόμηση φυσικών πολυμερών και ξενοβιοτικών από μύκητες λευκής σήψης: α) η

άμεση ενζυμική αποδόμηση β) η έμμεση ενζυμική αποδόμηση και γ) η μη ενζυμική αποδόμηση. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι διεργασίες αποδόμησης από μύκητες λευκής σήψης είναι πολυσταδιακές και κατά κανόνα περιλαμβάνουν και τους τρεις παραπάνω μηχανισμούς (εικόνα 9). Ωστόσο η ενζυμική αποδόμηση είναι μεγαλύτερης πρακτικής σημασίας (Kulikova *et al.*, 2011)



**Εικόνα 12:** Κύρια μονοπάτια της αποδόμησης φυσικών πολυμερών και ξενοβιοτικών από μύκητες λευκής σήψης.

Οι ΜΛΣ έχουν αναπτύξει ένα μη εξειδικευμένο, εξωκυτταρικό, λιγνινολυτικό ενζυμικό σύστημα, γνωστό ως ενζυμικό σύστημα ανοργανοποίησης της λιγνίνης (lignin mineralizing enzyme system, LME), αποτελούμενο από υπεροξειδάσες και λακκάσες, που διασπούν τη λιγνίνη μέσω οξειδωτικών μηχανισμών (Hatakka 1994: Kumar *et al.*, 2008: Baldrian *et al.*, 2008). Οι υπεροξειδάσες είναι ένζυμα που περιέχουν αίμη και απαιτούν την παρουσία  $H_2O_2$  για να οξειδώσουν τη λιγνίνη. Τρεις τύποι υπεροξειδασών έχουν ανακαλυφθεί στους ΜΛΣ: η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LIP), η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) και πιο πρόσφατα η πολυλειτουργική

υπεροξειδάση (VP) (Camarero *et al.* 1999: Mester and Field 1998: Ruiz – Duenas *et al.* 1999: 2001: Kulikova *et al.*, 2011). Οι λακκάσες είναι χαλκοξειδάσες πολλαπλών ενεργών κέντρων, που οξειδώνουν φαινόλες και αρωματικές αμίνες. Αντίθετα με τις υπεροξειδάσες, οι λακκάσες αντί του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> χρησιμοποιούν και O<sub>2</sub> σαν οξειδωτικό, ανάγοντάς το κατά 4e<sup>-</sup> σε H<sub>2</sub>O (Coll and Mucke 1997). Η ευρεία εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, που χαρακτηρίζει αυτά τα ένζυμα, τους επιτρέπει να αποδομούν οργανικές ενώσεις όχι μόνο φυσικής προέλευσης, αλλά επίσης διάφορες ξενοβιοτικές ουσίες. Η μειωμένη εξειδίκευση και η εξωκυτταρική φύση του συστήματος LME των ΜΛΣ έχει ως αποτέλεσμα την εφαρμογή τους σε διάφορες βιομηχανικές διεργασίες αλλά επίσης και σαν παράγοντες βιοαπορρύπανσης για την προστασία ενάντια στην περιβαλλοντική ρύπανση (Pointing 2001: Gao *et al.* 2010). Οι πιο επικίνδυνοι οργανικοί ρύποι των οποίων η αποδόμηση μπορεί να επιταχυνθεί μέσω της δράσης μυκήτων λευκής σήψης είναι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, χλωροφαινόλες, πολυχλωριωμένα διφαινόλια, γεωργικά φάρμακα και αστικά λύματα (Kulikova *et al.*, 2011).

### 1.6.1. Μηχανισμός δράσης του ενζύμου υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP)

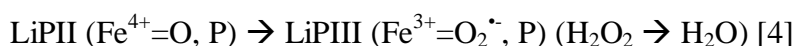
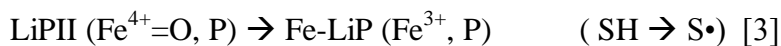
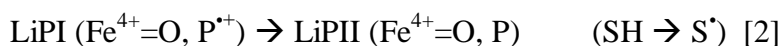
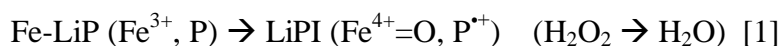
Η υπεροξειδάση της λιγνίνης είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην κατηγορία των αιμοϋπεροξειδασών και εκκρίνεται εξωκυτταρικά ως σειρά γλυκοζυλιωμένων ισοενζύμων με pI που κυμαίνεται από 3,2 ως 4,0 και μοριακές μάζες από 38 ως 43 kDa. Το κάθε ισοένζυμο περιέχει 1 mole αίμης (σιδηροπρωτοπορφυρίνης IX) ανά mole ενζύμου (Farrell *et al.* 1989: Gold and Alic 1993: Leisola *et al.* 1987: Kulikova *et al.*, 2011 ). Η LiP έχει απομονωθεί από πολλούς μύκητες λευκής σήψης (π.χ. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* κ.α) και έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να οξειδώνει πληθώρα πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και συγγενικών δομών (Kirk *et al.*, 1990: Johanson *et al.*, 1993: Kulikova *et al.*, 2011).

Η LiP είναι μη εξειδικευμένη όσον αφορά τα υποστρώματα και οξειδώνει ένα ευρύ φάσμα αρωματικών υποστρωμάτων φαινολικής φύσεως και μη φαινολικών συστατικών της λιγνίνης με αναγωγικό δυναμικό μικρότερο από 1,4 V παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kulikova *et al.*, 2011 ). Όπως άλλες υπεροξειδάσες, η LiP είναι ικανή να οξειδώνει τα περισσότερα φαινολικά συστατικά μέσω της παραγωγής φαινοξυ ριζών.

Ωστόσο, επειδή διαθέτει υψηλότερο αναγωγικό δυναμικό και χαμηλότερο βέλτιστο pH από κάθε άλλη απομονωμένη υπεροξειδάση και οξειδάση (Call and Mucke 1997: Hammel et al. 1986: Kersten et al. 1990) είναι ικανή να οξειδώνει και μη φαινολικά αρωματικά υποστρώματα, που τυπικά δεν οξειδώνονται από άλλες υπεροξειδάσες, συμπεριλαμβανομένων των μη φαινολικών φαινυλοπροπανοϊκών υπομονάδων της λιγνίνης (Hammel et al. 1986: Hatakka 1994: ten Have et al. 1998b: Kersten et al. 1990). Η ικανότητα της LiP να καταλύει πληθώρα αντιδράσεων υποδεικνύει ότι παίζει ρόλο-κλειδί στη διάσπαση της λιγνίνης.

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της LiP, που την ξεχωρίζει από τις άλλες υπεροξειδάσες, είναι η ικανότητα να οξειδώνει μεθοξυλιωμένες δομές λιγνίνης με υψηλά αναγωγικά δυναμικά. Για φαινολικά υποστρώματα, ο ρυθμός οξείδωσης είναι υψηλότερος απ' ό,τι για μη φαινολικά υποστρώματα. Σαν αποτέλεσμα της οξείδωσης σχηματίζονται φαίνοξυ ρίζες. Παρουσία οξυγόνου, οι φαίνοξυ ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με διάφορες ενώσεις, οδηγώντας σε ρήξη του αρωματικού δακτυλίου και/ή πολυμερισμό (Kulikova *et al.*, 2011).

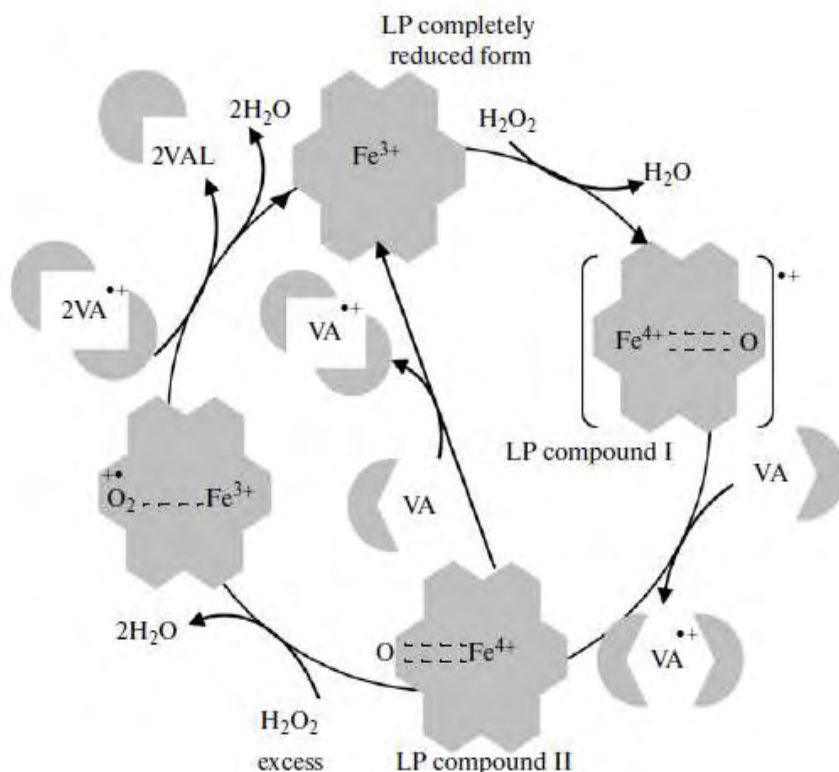
Ο καταλυτικός κύκλος της LiP είναι παρόμοιος με άλλων αίμο-υπεροξειδασών (Renganathan and Gold 1986: Tien *et al.*, 1986: Kulikova *et al.*, 2011).



Ο καταλυτικός κύκλος της LiP ξεκινά με την οξείδωση ενός σιδηρούχου ενζύμου LiP [Fe – LiP: Fe<sup>3+</sup>, P (πορφυρίνη)] με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προς σχηματισμό του LiP – συστατικού I (LiPI), που είναι ένα σύμπλοκο όξο – σιδήρου και κατιονικής ρίζας πορφυρίνης (Fe<sup>4+</sup> = O, P<sup>\*+</sup>) (1). Ακολουθεί οξείδωση 1e<sup>-</sup> του αναγόμενου υποστρώματος (SH) από το LiPI, προς σχηματισμό μιας κατιονικής ρίζας (S<sup>•</sup>) και του

οξειδωμένου κατά  $1e^-$  ενδιάμεσου ενζύμου, του LiP – συστατικού II (LiPII) (LiPII:  $Fe^{4+}=O$ , P) (2). Στη συνέχεια, μια οξείδωση κατά  $1e^-$  ενός δεύτερου μορίου υποστρώματος (SH) επαναφέρει το ένζυμο στην αρχική μη οξειδωμένη μορφή του Fe–LiP, ολοκληρώνοντας τον καταλυτικό κύκλο (3). Ωστόσο, απουσία κατάλληλου αναγωγικού υποστρώματος ή σε υψηλές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ , το LiPII οξειδώνεται περαιτέρω από το  $H_2O_2$  στο LiP – συστατικό III (LiPIII:  $Fe^{3+} = O_2^{\cdot-}$ , P) (4) μια ενζυμική μορφή με περιορισμένη καταλυτική δραστηριότητα (Ward et al., 2004).

Η υπεροξειδάση της λιγνίνης είναι η μόνη από τις υπεροξειδάσες που εκθέτει μια ασυνήθιστα υψηλή αντιδραστικότητα μεταξύ LiPII και  $H_2O_2$  (Cai and Tien 1989: 1992: Wariishi and Gold 1990: Wariishi et al, 1990). Συνεπώς η ανενεργή μορφή LiPIII σχηματίζεται ταχύτατα σε περίσσεια  $H_2O_2$ . Έχει αποδειχθεί ότι το LiPIII επανέρχεται αμέσως στην αρχική σιδηρούχα μορφή παρουσία  $H_2O_2$  και βερατρυλικής αλκοόλης (3,4 διμεθυλοξυ βενζυλική αλκοόλη, VA) (Barrand and Aust 1994: Cai and Tien 1989: 1992: Wariishi and Gold 1990).



**Εικόνα 13:** Μηχανισμός δράσης του ενζύμου υπεροξειδάση της λιγνίνης.

Η βερατρυλική αλκοόλη (VA), η οποία παράγεται από λιγνινολυτικούς μύκητες σαν δευτερογενής μεταβολίτης, είναι ιδιαίτερης σημασίας για τη λειτουργία των λιγνινολυτικών ενζύμων. Αυτή η ένωση προστατεύει τα λιγνινολυτικά ένζυμα από την εξαρτώμενη από  $H_2O_2$  απενεργοποίηση. Μπορεί επίσης να επάγει την σύνθεση λιγνινολυτικών ενζύμων σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και εξυπηρετεί ως αναγωγικός μεσολαβητής κατά την οξειδωση διαφόρων υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένης και της λιγνίνης (Tonon et al., 1995). Κατά την κατάλυση, σχηματίζονται κατιονικές ρίζες βερατρυλικής αλκοόλης, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή αντιδραστικότητα και εισέρχονται στις μη ενζυμικές αντιδράσεις (Rabinovich et al., 2001; Wong et al., 2009; Ruiz-Duenas, 2009; Kulikova 2011).

Έχει αποδειχθεί ότι λιγνινολυτικές καλλιέργειες του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* παράγουν φυσιολογικά VA, ένας εκ των φυσιολογικών ρόλων της οποίας είναι να προστατεύει τη LiP από την εξαρτώμενη από  $H_2O_2$  απενεργοποίηση μέσω επαναφοράς του LiPIII στην αρχική κατάσταση. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι η VA ενεργεί ως μεσολαβητής στις καταλυτικές αντιδράσεις της LiP (Goodwin et al, 1995; Harvey et al, 1986) και ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην διάσπαση της λιγνίνης συμβάλλοντας στη διήθηση των υπεροξειδασών και λακκασών στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων του ξύλου (Call and Mucke 1997).

### **1.6.2. Μηχανισμός δράσης του ενζύμου Mn-υπεροξειδάση (MnP)**

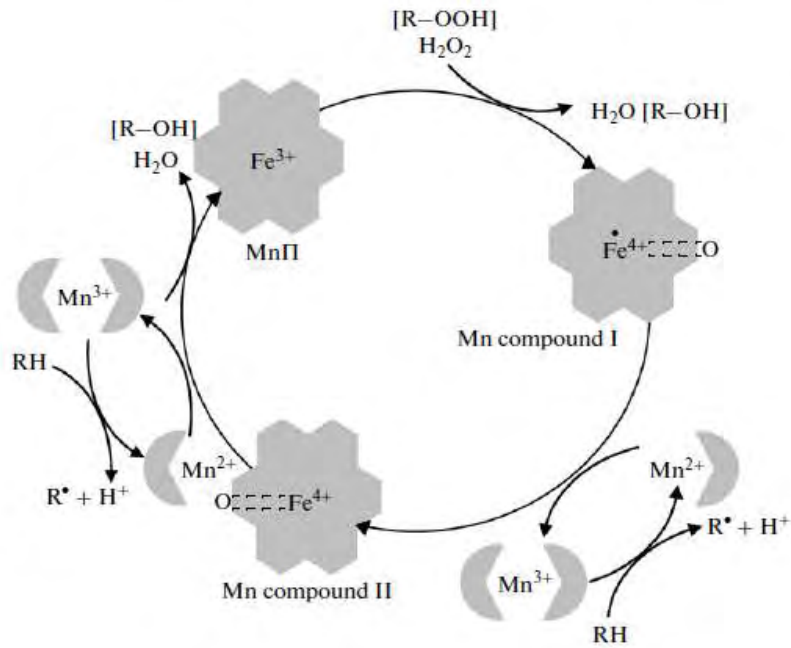
Η MnP είναι μια υπεροξειδάση που η δράση της εξαρτάται από την παρουσία Mn και διασπά φαινολικές και άλλες αρωματικές ενώσεις. Η MnP εκκρίνεται εξωκυτταρικά ως σειρά γλυκοζυλιωμένων ισοενζύμων με pI που κυμαίνεται από 4,2 ως 4,9 και μοριακές μάζες από 45 ως 47 kDa. Παρόμοια με τη LiP, κάθε ισοένζυμο περιέχει 1 mole αίμης (σιδηροπρωτοπορφυρίνης IX) ανά mole ενζύμου (Leisola et al.1987; Paszczynski et al, 1986). Η MnP παράγεται από την πλειοψηφία των μυκήτων λευκής σήψης και από συγκεκριμένους μύκητες που διαβιούν στο έδαφος (Hofrichter et al., 2002). Διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι μύκητες λευκής σήψης, όπως ο *Phanerochaete chrysosporium*, με τη βοήθεια της MnP που παράγουν, παρουσιάζουν την ικανότητα να αποδομούν πλήθος ενώσεων με ρυπογόνο δράση, συμπεριλαμβανομένων και φαινολικών ενώσεων (Serguei et al. 1998).

Η MnP καταλύει την οξειδωση του  $Mn^{2+}$  σε  $Mn^{3+}$  παρουσία  $H_2O_2$ . Ο καταλυτικός κύκλος της MnP παρουσία ενός χηλικού παράγοντα (οξαλικό, μαλονικό, μαλικό, ταρταρικό και λακτικό) οδηγεί στο σχηματισμό υψηλής δραστηριότητας συμπλόκου  $Mn^{3+}$ -χηλικού παράγοντα, το οποίο μπορεί να οξειδώσει πολλά φαινολικά υποστρώματα μέσω του μηχανισμού οξειδωσης κατά  $1e^-$ , συμπεριλαμβανομένων φαινολικών ενώσεων με το σχηματισμό φαινολικών ριζών λιγνίνης (Kulikova et al., 2011).

Η MnP έχει καταλυτικό κύκλο παρόμοιο με των άλλων υπεροξειδασών. Η αντίδραση αρχίζει με τη δέσμευση του  $H_2O_2$  στο φυσικό ένζυμο προς σχηματισμό ενός συμπλόκου σιδήρου-υπεροξειδίου. Επακόλουθη ρήξη του δεσμού O-O οδηγεί σε οξειδωση  $2e^-$  της αίμης του μορίου της MnP και σχηματισμό του συστατικού MnP I, το οποίο είναι ένα σύμπλοκο  $Fe^{4+}$ -οξο-πορφυρινικής ρίζας, και ενός μορίου νερού (Kulikova et al., 2011). Ακολουθούν δύο διαδοχικές αναγωγές  $1e^-$  πρώτα η αναγωγή του MnP συστατικού I σε ένα συστατικό γνωστό στη βιβλιογραφία ως MnP συστατικό II και έπειτα η αναγωγή του MnP συστατικού II στην αρχική μορφή του ενζύμου. Για την πραγματοποίηση των δύο διαδοχικών αυτών αναγωγών είναι απαραίτητη η παρουσία Mn, γι' αυτό η MnP θεωρείται απόλυτα εξαρτώμενη από το Mn (Serguei et al, 1998). Πιο συγκεκριμένα, το μονοχηλικό ιόν  $Mn^{2+}$  λειτουργεί σαν δότης ενός ηλεκτρονίου για την αναγωγή του MnP I στο συστατικό MnP II και οξειδώνεται σε  $Mn^{3+}$  και η αναγωγή του MnP-συστατικού II πραγματοποιείται παρομοίως και ένα ακόμα ιόν  $Mn^{3+}$  σχηματίζεται από  $Mn^{2+}$ , οδηγώντας στο σχηματισμό της φυσικής μορφής του ενζύμου και την απελευθέρωση ενός ακόμα μορίου νερού (Kulikova et al., 2011).

Κάτω από ορισμένες συνθήκες, το  $H_2O_2$  μπορεί να οξειδώνει το MnP συστατικό II προς σχηματισμό ενός υπεροξικού συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου, γνωστού ως MnP-συστατικό III. Το MnPIII αποτελεί ένα απενεργοποιημένο καταλυτικά σύμπλοκο. Η επιπλέον οξειδωση του MnP-συστατικού III από το  $H_2O_2$  οδηγεί στην απενεργοποίηση της MnP. Το MnP III μπορεί να επανέρθει στην αρχική σιδηρούχα μορφή του είτε με προσθήκη  $3e^-$  είτε με απομάκρυνση  $1e^-$ . Έχει αποδειχθεί, ότι η προσθήκη ενώσεων ικανών να σχηματίσουν σύμπλοκα όπως τα οξαλικά και γαλακτικά οξέα διευκολύνουν την οξειδωση του MnP II σε MnP III (Serguei et al, 1998).





**Εικόνα 14:** Μηχανισμός δράσης του ενζύμου Mn υπεροξειδάση.

Τα ιόντα  $Mn^{3+}$  που προκύπτουν από την αναγωγή των MnPI και MnPII από το  $Mn^{2+}$  σταθεροποιούνται από οργανικά οξέα όπως, το οξαλικό και λειτουργούν σαν μικρού μοριακού βάρους αναγωγικοί μεσολαβητές που οξειδώνουν μη ειδικά τα υποστρώματα. Οι φαινολικές και αρωματικές ενώσεις οξειδώνονται προς σχηματισμό φαίνοξυ και άμινο ριζών, αντίστοιχα (Hofrichter et al., 2002). Το οξειδωτικό δυναμικό του συμπλόκου  $Mn^{3+}$ -χηλικού παράγοντα (π.χ.  $Mn^{3+}$ -οξαλικού) είναι ανεπαρκές για την οξείδωση μη φαινολικών δομών λιγνίνης. Μη φαινολικά υποστρώματα μπορούν να οξειδωθούν από την MnP μόνο παρουσία ενός δεύτερου αναγωγικού μεσολαβητή με το σχηματισμό δραστικών ριζών. Οργανικά οξέα όπως το οξαλικό και το μαλονικό, λειτουργούν ως τέτοιοι αναγωγικοί μεσολαβητές (Kulikova et al., 2010). Έτσι, παρότι η MnP δεν οξειδώνει μη φαινολικές δομές λιγνίνης κατά τον φυσιολογικό καταλυτικό κύκλο, έχει αποδειχθεί ότι αυτές οι δομές συν-οξειδώνονται όταν η MnP υπεροξειδώνει ακόρεστα λιπαρά οξέα (Jensen et al 1996: Karich et al, 1999a). Μάλιστα, η λιπιδική υπεροξειδωση έχει προταθεί ως μηχανισμός που εμπλέκεται στην οξείδωση μη φαινολικών δομών λιγνίνης από μύκητες λευκής σήψης που δεν παράγουν LiP (Ward et al.). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι απουσία ενζυμικού συστήματος για την παραγωγή  $H_2O_2$  οι ρίζες που έχουν σχηματισθεί μπορούν να χρησιμοποιηθούν από την MnP ως πηγή υπεροξειδίου του

υδρογόνου και να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα αποικοδόμησης της λιγνίνης από τον μύκητα (Kulikova et al., 2011).

### 1.6.3. Μηχανισμός δράσης του ενζύμου λακκάση

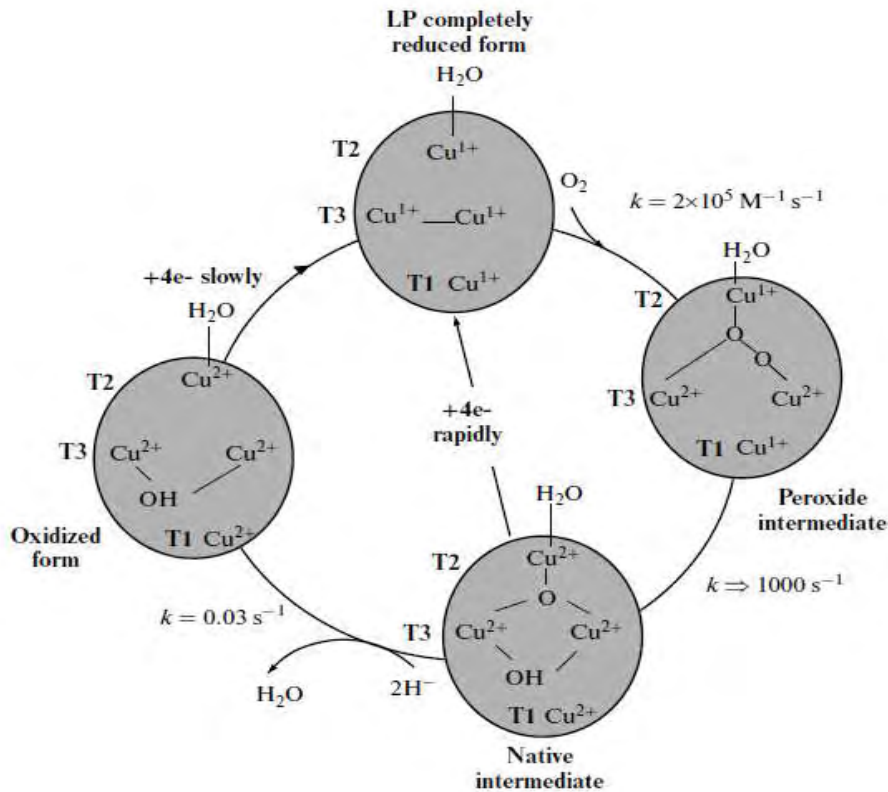
Οι λακκάσες είναι χαλκοξειδάσες πολλαπλών ενεργών κέντρων που οξειδώνουν φαινόλες και αρωματικές αμίνες. Αντί του  $H_2O_2$ , οι λακκάσες χρησιμοποιούν το  $O_2$  ως οξειδωτικό, ανάγοντάς το κατά  $4e^-$  σε  $H_2O$  (Call and Muke 1997). Οι λακκάσες είναι γενικά μεγαλύτερες από τις υπεροξειδάσες με μοριακά βάρη από περίπου 60 kDa και πάνω και ισοηλεκτρικό σημείο σε pH 3-5 (Call and Muke 1997). Όπως και τα υπόλοιπα εξωκυτταρικά λιγνινολυτικά ένζυμα οι λακκάσες είναι γλυκοσυλιωμένες. Λακκάσες έχουν βρεθεί σε μύκητες, βακτήρια και έντομα (Baldrian et al., 2006), με κύρια πηγή του συγκεκριμένου ενζύμου, συμπεριλαμβανομένου και του ενζύμου που χρησιμοποιείται για βιομηχανικούς σκοπούς, τους μύκητες και τον *Pleurotus ostreatus* να αποτελεί από τους πιο μεγάλου εύρους παραγωγούς λακκάσης (Youn et al., 1995). Όλες σχεδόν οι προερχόμενες από μύκητες λακκάσες είναι μονομερή ή διμερή και η πλειοψηφία των μυκήτων παράγει τόσο εσωκυτταρικές όσο και εξωκυτταρικές λακκάσες (Kulikova et al., 2011).

Το ένζυμο διαθέτει τέσσερα ενεργά κέντρα χαλκού (T1, T2, T3, T4) μέσω των οποίων ανάγεται το οξυγόνο. Η οξείδωση των υποστρωμάτων πραγματοποιείται στο ενεργό κέντρο T1, με ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίων στα T2 και T3 άτομα χαλκού (Crestini et al., 2003) μέσω μιας διαδικασίας μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την οποία, με την αφαίρεση ενός πρωτονίου σχηματίζεται μια φαίνοξυ ρίζα. Πιο συγκεκριμένα, ο καταλυτικός κύκλος της λακκάσης περιλαμβάνει την οξείδωση του υποστρώματος (δότη ηλεκτρονίων) και τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου T1. Η μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων από το ιόν χαλκού του συμπλέγματος T1 στο σύμπλεγμα T2/T3 ακολουθείται από μία διαδοχική ανάκτηση και των τριών ιόντων χαλκού στο σύμπλεγμα. Το ιόν χαλκού T3α, το οποίο έχει και τη μεγαλύτερη συγγένεια για ηλεκτρόνια, ανάγεται πρώτο. Η αναγωγή του T3α συνοδεύεται από πρωτονίωση του μ3-οξο κέντρου και του μOH-προσδέτη, με πρωτόνια που αποσυνδέονται από το ανηγμένο κέντρο T3. Το επόμενο στάδιο είναι η αναγωγή του κέντρου T2. Το βήμα κλειδί στη διαδικασία είναι ο σχηματισμός μιας υδροξυλικής γέφυρας μεταξύ των T2 και T3β, μέσω της οποίας τα ηλεκτρόνια μπορούν ταχύτατα να μεταφέρονται στο κέντρο T2. Γι' αυτό, αυτό το μοντέλο

προτείνει το σχηματισμό ενός ζεύγους ιόντων χαλκού μικτού σθένους. Απαιτείται περεταίρω αναγωγή του ιόντος χαλκού T3β, ως μια ταχεία διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά μήκος του διπεπτιδίου κυστεϊνης-ιστιδίνης μεταξύ των T1 και T3, η οποία συνοδεύεται από πρωτονίωση της υδροξυλικής γέφυρας ακολουθούμενη από τον διαχωρισμό δύο μορίων νερού από το σύμπλεγμα (Kulikova *et al.*, 2011). Συνεπώς, μπορεί να υποθεθεί ότι λακκάση οξειδώνει το υπόστρωμα για να σχηματίσει μια φαίνοξυ ρίζα, η οποία εισέρχεται στις μη ενζυμικές αντιδράσεις της διμεθοξυλίωσης της λιγνίνης και των μεθοξυφαινολικών οξέων, όπως επίσης και στην αντίδραση σχηματισμού κινονών και στην οξειδωτική εξάλειψη των καρβοξυλικών ομάδων (Kulikova *et al.*, 2011).

Τα τυπικά υποστρώματα της δράσης του ενζύμου λακκάση είναι φαινολικές ενώσεις. Οι λακκάσες έχουν μια ευρεία εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και καταλύουν την οξείδωση διαφόρων ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των ο,ρ διφαινολών, αμινοφαινολών, πολυφαινολών, πολυαμινών, λιγνίνης, συγκεκριμένων ανόργανων ιόντων και αρυλ διαμιनों, με επακόλουθη αναγωγή μοριακού οξυγόνου σε νερό (Xu *et al.*, 1996; Quintanar *et al.*, 2007). Οι λακκάσες έχουν την ικανότητα άμεσης βιοηλεκτροκατάλυσης, δηλαδή άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων στο ενεργό κέντρο (Kulikova *et al.*, 2011). Η λακκάση ως ένζυμο έχει υψηλή θερμική αντοχή (σταθερή στους 60°C), με ικανότητα να δρα σε μεγάλο εύρος υποστρωμάτων (σχετικά μικρή εκλεκτικότητα στο υπόστρωμα), οξειδώνοντας έτσι ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών αρωματικών ενώσεων (Crestini *et al.*, 2003).

Η λακκάση, παρουσιάζει διαφορετικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό από είδος σε είδος, γεγονός που οφείλεται στη γενετική διαφοροποίηση των μυκήτων από τους οποίους παράγεται. Ο μικρός αριθμός ουσιών που αναστέλλουν τη δράση της και η υψηλή οξειδωτική δράση της (10-100 φορές υψηλότερη από τη δράση των ενζύμων LiP ή MnP), καθιστούν τη λακκάση ιδανικό ένζυμο για την αποδόμηση φαινολικών και άλλων αρωματικών συστατικών (Crestini *et al.*, 2003).



**Εικόνα 15:** Μηχανισμός δράσης του ενζύμου λακκάση.

Εντούτοις η λακκάση αυτή καθεαυτή παρουσιάζει χαμηλή λιγνολυτική δράση, διότι μπορεί να οξειδώνει άμεσα τα φαινολικά συστατικά της λιγνίνης (Kawai *et al.*, 1988) άλλα το αναγωγικό της δυναμικό είναι πολύ χαμηλό για να οξειδώνει άμεσα τα μη φαινολικά συστατικά της λιγνίνης. Ωστόσο η χρησιμοποίηση ενεργοποιητών (π.χ. διαφόρων ριζών), όπως η προσθήκη της 1-υδροξυ-βενζο-τριαζόλης (HBT), συμβάλλει σημαντικά στην βελτίωση της δράσης της. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι οι λακκάσες διέσπασαν τη λιγνίνη αποτελεσματικά στον μύκητα λευκής σήψης *Rychnoropus cinabarinus*, ο οποίος δεν παράγει LiP ή MnP, λόγω της παραγωγής από τον μύκητα ενός μεταβολίτη-ενεργοποιητή της Lac, του 3-υδροξυλανθραυλικού οξέος που μπορεί να μεσολαβήσει στην οξείδωση μη φαινολικών υποστρωμάτων από τη Lac (Eggert *et al.*, 1996:1997). Το μεγάλο ποσοστό της λιγνολυτικής δράσης που παρουσιάζει η λακκάση με την χρήση ενεργοποιητών, οφείλεται κυρίως στην αυξημένη οξείδωση των παράπλευρων ως προς τον αρωματικό δακτύλιο υποομάδων (Crestini *et al.*, 2003). Παρουσία των μεσολαβητών 3-υδροξυλανθραυλικό οξύ, υδροξυβενζοτριαζολη ή ABTS, η Lac έχει αποδειχθεί ότι οξειδώνει μη φαινολική λιγνίνη, βερατρυλική αλκοόλη και PAHs (Bourbonnais *et al.*, 1995: Collins *et al.*, 1996: Eggert *et al.*, 1996: Majcherczyk *et al.*, 1998:1999).

ENZYMΟ	ΔΟΜΗ ΕΝΕΡΓΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ	ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	MW kDa	ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗ	ΒΕΛΤΙΣΤΟ pH	ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ
Lac	σιδήρου: Π ενεργό κέντρο χαλκού και το σύμπλεγμα ιόντων χαλκού αποτελούμενο από το T2 ιόν χαλκού και το T3 αντιισιδιρομαγνητικό	Εσωκυτταρικό και/ή εξωκυτταρικό ένζυμο	$4 \text{ benzene diol} + \text{O}_2 = 4 \text{ benzene semiquinone} + 2\text{H}_2\text{O}$	50-70	N- γλαυκοζυλίωση	2-10	ABTS, GBT, TM-PO, transition metal complexes
LiP	Σιδηροπορφωρίνη IX	Εξωκυτταρικό ένζυμο	1. $\text{LP}[\text{Fe}(\text{III})] + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{LP}^* - \text{I}[\text{Fe}(\text{IV}) = \text{O}^{*+}] + \text{H}_2\text{O}$ 2. $\text{LP} - \text{I} + \text{AH} \rightarrow \text{LP} - \text{II}[\text{Fe}(\text{IV}) = \text{O}^{*+}] + \text{A}^{*+}$ $\text{LP} - \text{II} + \text{AH} \rightarrow \text{LP} + \text{A}^{*+}$	39-43	N- γλαυκοζυλίωση	1-5	Βερστρολική αλκοόλη
MnP	Σιδηροπορφωρίνη IX	Εξωκυτταρικό ένζυμο	$\text{MP} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{MP} - \text{I} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{MP} - \text{I} + \text{Mn}^{2+} = \text{MP} - \text{II} + \text{Mn}^{3+}$ $\text{MP} - \text{II} + \text{Mn}^{2+} = \text{MP} + \text{Mn}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	38-62,5	N- γλαυκοζυλίωση	2,5-6,5	Οργανικά οξέα ως χηλικοί παράγοντες, toles, ακόρεστα λιπαρά οξέα
VP	Αίμη	Εξωκυτταρικό ένζυμο	$\text{Δότης} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Δότης} (\text{οξειδωμένος}) + 2\text{H}_2\text{O}$	42-45	Δεν έχει καθοριστεί ακόμη ο τύπος γλαυκοζυλίωσης	3-5	ΟΙ ΤΙΤΕΣ ΕΝΟΣΕΙΣ με αυτές που αποτελούν μεσολαβητές για τις LiP και MnP

Πίνακας 1: Γενικά χαρακτηριστικά των λιγνινολυτικών ενζύμων.

## 1.7 Αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων με τη βοήθεια μυκήτων λευκής σήψης

Οι γεωργικές βιομηχανίες αποτελούν σημαντικές πηγές οργανικής ρύπανσης των εδαφικών και υδάτινων οικοσυστημάτων. Στη σύγχρονη συμβατική γεωργία η αυξημένη παραγωγή αγροτικών προϊόντων εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων. Η αναγκαιότητα των γεωργικών φαρμάκων στην αγροτική παραγωγή θεωρείται αναμφισβήτητη, ωστόσο η αλόγιστη χρήση τους με την πάροδο του χρόνου αποδείχθηκε να επιφέρει σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον και τη δημόσια υγεία (Echols *et al.*, 2008). Η μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων θεωρείται η πιο σημαντική διαδικασία για την μη αναστρέψιμη απομάκρυνσή τους από το περιβάλλον (Karpouzas and Singh 2006) και είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι οι μύκητες λευκής σήψης είναι ικανοί να αποδομήσουν ένα ευρύ φάσμα οργανικών ρύπων (Asgher *et al.* 2008).

Επειδή οι ΜΛΣ μπορούν να παράγουν ένζυμα, όπως η λακάση, απαραίτητα για τη διάσπαση της λιγνίνης και άλλων σύνθετων οργανικών μορίων, έχει διερευνηθεί η χρήση τους σε εφαρμογές βιοαπορρύπανσης. Η λιγνίνη και η κυτταρίνη είναι οργανικά συστατικά αποτελούμενα από μακριές αλυσίδες άνθρακα και υδρογόνου, δομικά παρόμοια με πολλούς οργανικούς ρύπους. Το κλειδί στη βιοαπορρύπανση είναι ο καθορισμός του σωστού είδους μύκητα ώστε να στοχευθεί ένας συγκεκριμένος ρύπος. Συγκεκριμένα είδη έχουν αναφερθεί ως επιτυχή στην αποδόμηση των νευροτοξικών αερίων VX και sarin. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι οι ΜΛΣ μπορούν να αποδομήσουν εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, πενταχλωροφαινόλη, creosote, πίσσα και βαρέα καύσιμα και να τα μετατρέψουν σε CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O και λοιπά μονομερή (Eggen *et al.*, 1999).

Μεταξύ των ΜΛΣ που έχουν εξεταστεί ως προς την ικανότητά τους να διασπούν οργανικούς ρύπους, οι *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* και *Trametes versicolor*, έχουν αποδειχθεί πολλά υποσχόμενοι για την βιοαπορρύπανση εστιών ρύπανσης με γεωργικά φάρμακα. Ο *P. chrysosporium*, μάλιστα είναι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος για την αποδόμηση διαφόρων ξενοβιοτικών (Kulikova *et al.*, 2010). Διάφορα στελέχη του *P. chrysosporium* είχαν την ικανότητα να διασπούν ταχύτατα το ζιζανιοκτόνο diuron (Fratila-Apachitei *et al.* 1999) ή το οργανοχλωρινικό εντομοκτόνο lindane (Mougin *et al.* 1996). Οι *P.*

*chrysosporium* και *T. versicolor* αποδείχθηκαν ικανοί να αποδομήσουν πλήρως μίγμα από simazine, dieldrin και trifluralin (Fragoeiro and Magan 2005). Επίσης στελέχη των μυκήτων *T. versicolor* και *P. ostreatus* είχαν την ικανότητα να διασπών αποτελεσματικά τα γεωργικά φάρμακα diphenylamine, ortho-phenylphenol, imazalil και thiophanate methyl σε υγρές καλλιέργειες σε εκχύλισμα άχυρου (Karas *et al.* 2010). Επίσης ο *P. ostreatus* ήταν μεταξύ των πιο αποτελεσματικών ΜΛΣ στην αποδόμηση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων (Jauregui *et al.* 2003). Σε διάφορες μελέτες έχει αποδειχθεί η άμεση εμπλοκή του συστήματος LME στην αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων (Fratila-Apachitei *et al.* 1999; Castillo *et al.* 2001) ενώ διάφορες άλλες μελέτες προτείνουν την εμπλοκή άλλων ενζύμων στη διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων (Kullman and Matsumura 1996; Mougin *et al.* 1997).

Οι Karas *et al.* (2010) εξέτασαν την ικανότητα των ΜΛΣ *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* και *Pleurotus ostreatus* και του μύκητα *Aspergillus niger* να αποδομούν τα γεωργικά φάρμακα thiabendazole, imazalil, ortho-phenylphenol, diphenylamine, thiophanate methyl και του εντομοκτόνου chlorpyrifos σε θρεπτικό μέσο εκχυλίσματος άχυρου και θρεπτικό μέσο εκχυλίσματος εδάφους. Οι *Trametes versicolor* και *Pleurotus ostreatus* βρέθηκαν να είναι οι πιο αποτελεσματικοί αποδομητές όλων των γεωργικών φαρμάκων εκτός από το thiabendazole, με μέγιστη αποτελεσματικότητα στο θρεπτικό μέσο από εκχύλισμα άχυρου. Επίσης εξετάστηκε η ικανότητα του *Trametes versicolor* στην αποδόμηση υψηλών συγκεντρώσεων γεωργικών φαρμάκων και μειγμάτων γεωργικών φαρμάκων. Έτσι βρέθηκε ότι ο *Trametes versicolor*, ήταν ικανός να αποδομήσει υψηλές συγκεντρώσεις των γεωργικών φαρμάκων είτε πλήρως (diphenylamine, ortho-phenylphenol) είτε μερικώς (thiabendazole, imazalil) και επίσης ήταν ικανός να αποδομήσει ταχύτατα μείγμα των thiophanate-methyl/diphenylamine ενώ δεν κατάφερε να αποδομήσει τα imazalil και thiabendazole όταν χορηγήθηκαν σε μίγμα με το ortho-phenylphenol (Karas *et al.* 2011).

## 1.8 *Pleurotus ostreatus*

Ο μύκητας λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus* ανήκει στο φύλο *Basidiomycota*, της κλάσης *Agaricomycetes*, της τάξης *Agaricales*, της οικογένειας *Tricholomataceae*, του γένους *Pleurotus* και το μανιτάρι που παράγει είναι ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα εδώδιμα μανιτάρια. Το χρώμα των μανιταριών στους φυσικούς πληθυσμούς του μύκητα ποικίλλει από λευκό έως γκρι ή από ανοιχτό έως σκούρο καφέ. Ο *Pleurotus ostreatus* εκφύεται σε πολλά εύκρατα και υποτροπικά δάση παγκοσμίως. Είναι ένα σαπρότροφο που δρα σαν πρωτογενής αποικοδομητής ξύλου, αναπτύσσεται σε ομάδες πάνω σε νεκρά ή ζωντανά δέντρα προτιμώντας τα δέντρα με σκληρό ξύλο ειδικά τα φυλλοβόλα δέντρα αλλά εμφανίζεται και σε κωνοφόρα (Phillips, 2006). Είναι ένα από τα άγρια μανιτάρια που συναντώνται πιο συχνά στη φύση, ωστόσο μπορεί επίσης να καλλιεργηθεί σε άχυρο και διάφορα άλλα λιγνινοκυτταρινικά υλικά.



**Εικόνα 16:** *Pleurotus ostreatus* στο φυσικό του ενδιαίτημα.



**Εικόνα 17:** Καλλιέργεια *Pleurotus ostreatus*

Ο μύκητας *P. ostreatus* είναι ένας από τους πιο δραστικούς μικροοργανισμούς στην αποδόμηση της λιγνίνης (Kirk and Farrell 1987). Αυτός ο μύκητας παράγει λιγνινολυτικά, οξειδωτικά ένζυμα, με ευρεία εξειδίκευση, τα οποία εμπλέκονται στην αποδόμηση ενός μεγάλου φάσματος τοξικών αρωματικών ρύπων (Hammel *et al.* 1995; Rodriguez *et al.* 1999). Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι ο *P. ostreatus* παράγει λιγνινολυτικά ένζυμα όπως λακκάση και Mn-υπεροξειδάση (εξαρτώμενη ή μη του Mn), αλλά δεν μπορεί να παράγει LiP (Hatakka, 1990). Έχει επίσης



αποδειχθεί ότι ο *P. ostreatus* έχει την ικανότητα να αποδομεί πολλές ξενοβιοτικές ενώσεις, όπως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs). Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στελέχη του συγκεκριμένου μύκητα σε πειράματα με PAHs με τρεις, τέσσερις και πέντε αρωματικούς δακτυλίους οδήγησε στην αποδόμηση του 89%, 87% και 48% της αρχικής τους ποσότητας, αντίστοιχα (Eggen, 1999). Αντίστοιχα και οι Bazalel *et al.* (1996), έδειξαν ότι ο *P. ostreatus* έχει την ικανότητα να αποδομεί πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως τα πυρένιο, ανθρακένιο, φλουορένιο και διβενζοθειοφαίνιο. Επίσης ο *P. ostreatus* βρέθηκε να είναι μεταξύ των πιο αποτελεσματικών μυκήτων λευκής σήψης στην αποδόμηση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων (Jauregui *et al.* 2003). Αντίστοιχα, οι Karas *et al.* (2011), έδειξαν ότι ο *P. ostreatus* ήταν εξαιρετικά αποτελεσματικός στην αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων thiabendazole, imazalil, ortho-phenylphenol, diphenylamine, thiophanate methyl και του εντομοκτόνου chlorpyrifos, με μέγιστη αποτελεσματικότητα σε θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος άχρου. Συνεπώς, ο *P. ostreatus* μπορεί με επιτυχία να χρησιμοποιηθεί σε συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.

### 1.9. Σκοπός του πειράματος

Οι βιομηχανίες μεταποίησης φρούτων παράγουν μεγάλες ποσότητες υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις πληθώρας γεωργικών φαρμάκων, μεταξύ των οποίων τα OPP και IMZ τα οποία χρησιμοποιούνται σε μίγματα μαζί και με το TBZ στη μετασυλλεκτική επεξεργασία μηλοειδών και εσπεριδοειδών. Η διαχείριση των υγρών αποβλήτων από τις βιομηχανίες γίνεται κυρίως με την εναπόθεσή τους σε ανοιχτές δεξαμενές εξάτμισης, αλλά και με την απόρριψή τους σε επιφανειακά υδροφόρα συστήματα ή ακόμη και στα συστήματα επεξεργασίας αστικών αποβλήτων. Αυτό έχει ως συνέπεια τη συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων στα επιφανειακά αλλά και υπόγεια νερά προκαλώντας σημαντική περιβαλλοντική ρύπανση. Τα OPP και IMZ ανήκουν στην κατηγορία των μυκητοκτόνων των οποίων η χρήση είναι επιτρεπτή στις χώρες-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης υπό την προϋπόθεση να υπάρχει ένα αποτελεσματικό αλλά και λειτουργικό από άποψη κόστους σύστημα επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων που προκύπτουν από τη χρήση τους. Μέχρι σήμερα υπάρχει

έλλειψη ερευνητικών δεδομένων για την ανάπτυξη και αξιολόγηση τέτοιων συστημάτων.

Έτσι σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση του μύκητα *P. osteratus* όταν εμβολιαστεί σε κατάλληλο υπόστρωμα ανάπτυξης τους (παστεριωμένο υπόστρωμα αχύρου) για την αποδόμηση και κατακράτηση των μυκητοκτόνων OPP και IMZ που περιέχονται στα υγρά απόβλητα από συσκευαστήρια φρούτων. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα στηλών έκπλυσης και αποτέλεσε μέρος ευρύτερου πειραματικού σχεδιασμού για την αξιολόγηση υποστρωμάτων του μύκητα *Pleurotus ostreatus* για την απορρύπανση υγρών αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων. Επιπλέον, μελετήθηκε η δραστηριότητα της παραγόμενης από τον *P. ostreatus* λακκάσης ώστε να διαπιστωθεί εάν η Lac συμμετέχει στην αποδόμηση των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής θα συμβάλλουν στην ανάπτυξη συστημάτων βιοφίλτρων για τη διαχείριση των συγκεκριμένων υγρών αποβλήτων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1. Μύκητες

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το εργαστηριακό στέλεχος του μύκητα λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus*. Το στέλεχος του μύκητα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία αγοράστηκε από την τράπεζα μικροοργανισμών DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) ως ενεργή καλλιέργεια του *Pleurotus ostreatus* DSMZ 1020.

#### 2.2. Προετοιμασία υποστρωμάτων

##### 2.2.1. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Malt Extract Agar (MEA)

Για την παρασκευή του στερεού θρεπτικού υποστρώματος Malt Extract Agar (MEA) αναμείχθηκαν 30g malt extract agar, 3g soya peptone, 15g αγαρ και 1L απιονισμένο νερό. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 20 min και στη συνέχεια το θρεπτικό υπόστρωμα επιστρώθηκε σε τριβλία Petri υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τριβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα MEA χρησιμοποιήθηκαν, για την καλλιέργεια του μύκητα *Pleurotus ostreatus*. Ανακαλλιέργειες του μύκητα πραγματοποιούνταν ανά 20 μέρες.

##### 2.2.2. Παρασκευή του εμβολίου με *Pleurotus ostreatus*

Για την παρασκευή του εμβολίου του μύκητα *P. ostreatus* που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό του υποστρώματος αχύρου ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: 1 Kg σιτάρι αναμίχθηκε με 1.5L νερό και ακολούθησε βρασμός για 15 min. Στη συνέχεια το σιτάρι στραγκίστηκε και το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε σακούλα πολυπροπυλαινίου (αποστείρωσης). Ακολούθησε

προσθήκη 12g CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O και 3g CaCO<sub>3</sub>, ανάδευση και αποστείρωση της σακούλας (20 min 121°C). Από τριβλίο στο οποίο είχε αναπτυχθεί φρέσκια καλλιέργεια του μύκητα *P. ostreatus* απομακρύνθηκαν με φελοτρυπητήρα τμήματα αναπτυσσόμενου μυκηλίου του μύκητα και εμβολιάστηκαν στο παραπάνω υπόστρωμα εντός της σακούλας. Ακολούθησε επώαση στους 25°C για διάστημα 3 εβδομάδων, αναδεύοντας περιοδικά για να μην δημιουργηθούν συσσωματώματα. Σταδιακά η επιφάνεια των σπόρων καλύφθηκε από λευκό μυκήλιο.

### 2.2.3. Παρασκευή του υποστρώματος πληρώσεως των στηλών

Για την προετοιμασία του υποστρώματος επι του οποίου θα εμβολιαζόταν σε τελική φάση ο μύκητας και το οποίο υλικό θα χρησιμοποιούνταν ως υλικό πλήρωσης των στηλών χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα για καλλιέργεια μανιταριών το οποίο προμηθευτήκαμε από την εταιρία του κ. Λαχουβάρη που βρίσκεται στη Χαλκίδα και το προμηθεύει σε μανιταροπαραγωγούς. Το υπόστρωμα περιέχει άχυρο και λίγη μηδική, ήταν παστεριωμένο και δεν είχε εμβολιαστεί με κάποιο μύκητα. Στο 1 kg υπόστρωμα εμβολιάστηκε ποσότητα 3% κ.β. από το εμβόλιο (το σιτάρι με το μύκητα). Το εμβολιασμένο υπόστρωμα αφέθηκε να επωαστεί για 3-4 εβδομάδες μέχρι να αποικήσει επαρκώς ο μύκητας και το επίπεδο υγρασίας διατηρούταν σταθερό με προσθήκη νερού και ανάδευση ανά διαστήματα. Στη συνέχεια το αποικισμένο πλέον με τον *Pleurotus ostreatus* υπόστρωμα, τεμαχίστηκε σε μπλέντερ χρησιμοποιήθηκε για την πλήρωση των στηλών έκπλυσης.

### 2.3. Πειραματικός σχεδιασμός

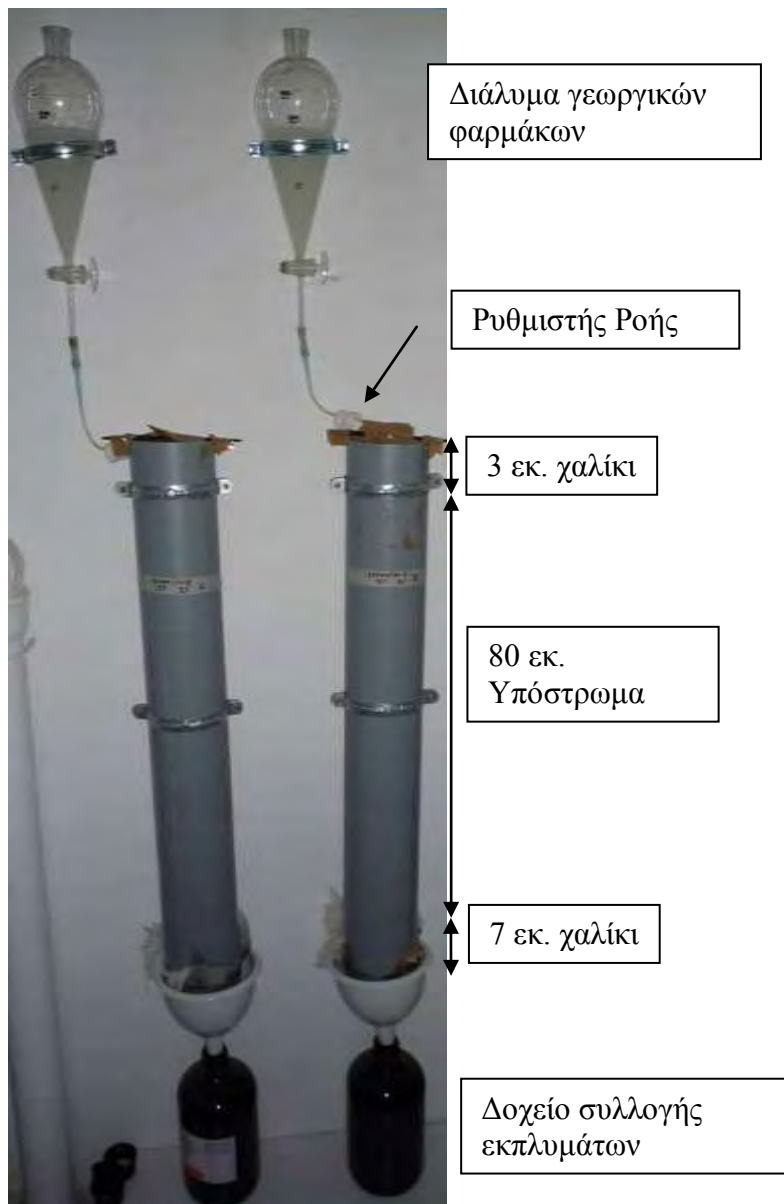
Για την αξιολόγηση του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκαν τρεις στήλες από PVC μήκους 90 cm και διαμέτρου 12.5 cm. Στο εσωτερικό κάθε στήλης τοποθετήθηκαν από κάτω προς τα πάνω και διαδοχικά: 7 cm στρώμα χαλίκι (διαμέτρου 2-3 cm), 80 cm το εμβολιασμένο με το εργαστηριακό στέλεχος *P. ostreatus* υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών και 3 cm στρώμα χαλικιού. Επάνω από κάθε στήλη τοποθετήθηκε από μία διαχωριστική χοάνη, η απόληξη της οποίας ήταν συνδεδεμένη με σωληνάκι το οποίο κατέληγε πάνω ακριβώς από το κέντρο της στήλης (εικόνα 1).

Για διάστημα 71 ημερών οι διαχωριστικές χωάνες συμπληρώνονταν με διάλυμα OPP συγκέντρωσης 5 g/L ανά τέσσερις μέρες. Συνολικά έγινε εφαρμογή 1,148 L διαλύματος OPP. Η ροή εφαρμογής του διαλύματος ήταν ρυθμισμένη στα 20ml/h μέσω ροοστάτη που βρισκόταν εγκαταστημένος πάνω στο σωληνάκι. Ανά τρεις μέρες συλλεγόταν το έκπλυμα από τις στήλες, ακολουθούσε ογκομέτρηση του εκπλύματος και τέλος λήψη ενός δείγματος από το έκπλυμα σε πλαστικά μπουκάλια των 200 ml τα οποία εν συνεχεία αποθηκεύονταν σε καταψύκτη στους -20°C.

Μετά την πάροδο των 71 ημερών, το πείραμα συνεχίστηκε με εφαρμογή διαλύματος IMZ (imazalil) για επιπλέον 48 μέρες. Κάθε δεύτερη μέρα οι διαχωριστικές χωάνες συμπληρώνονταν με 450 ml διαλύματος IMZ συγκέντρωσης 2,5g/L. Η ροή παρέμεινε ρυθμισμένη στα 20ml/h. Ανά τέσσερις μέρες συλλεγόταν το έκπλυμα από τις στήλες, ακολουθούσε ογκομέτρηση του εκπλύματος και τέλος λήψη ενός δείγματος από το έκπλυμα σε πλαστικά μπουκάλια των 200ml τα οποία εν συνεχεία αποθηκεύονταν σε καταψύκτη στους -20°C.

Η επιλογή τόσο των ποσοτήτων εφαρμογής των δύο μυκητοκτόνων όσο και η αλληλουχία εφαρμογής στηρίχτηκε σε πραγματικό σενάριο εφαρμογής των δύο αυτών γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια εσπεριδοειδών. Έτσι σε αυτά τα συσκευαστήρια πορτοκάλια δέχονται εφαρμογή OPP οδηγώντας στην παραγωγή ποσοτήτων υγρών αποβλήτων τόσο από την εφαρμογή (αραιό απόβλητο, μεγάλοι όγκοι) όσο και από το ανακυκλούμενο διάλυμα εφαρμογής (πυκνό απόβλητο, χαμηλότεροι όγκοι). Ακολούθως και προς το τέλος της περιόδου μανταρίνια δέχονται εφαρμογή imazalil.

Με την ολοκλήρωση της εφαρμογής των OPP και IMZ το περιεχόμενο των τριών στηλών απομακρύνθηκε από τις στήλες και διαχωρίστηκε σε τρεις ζώνες (0-20, 20-50 και 50-80 cm) (Εικόνα 2). Στην συνέχεια από κάθε ζώνη και στήλη συλλέχθηκε δείγμα 1 kg. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους -20°C μέχρι να αναλυθούν για υπολείμματα OPP και IMZ.



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση των συστημάτων στηλών.

## 2.4. Μέθοδοι ανάλυσης γεωργικών φαρμάκων

### 2.4.1. Μέθοδος εκχύλισης γεωργικών φαρμάκων

#### 2.4.1.1. Εκχύλιση των γεωργικών φαρμάκων από το έκπλυμα

Η εκχύλιση των γεωργικών φαρμάκων OPP και IMZ από το έκπλυμα που λήφθηκε από τις στήλες πραγματοποιήθηκε με το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο. Τα δείγματα εκπλύματος από τις στήλες αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να

αποψυχθούν. Στη συνέχεια αφού αναμιγνύονταν επιμελώς λαμβάνονταν 2ml από κάθε δείγμα και μεταφέρονταν σε γυάλινα φιαλίδια. Έπειτα προσθέτονταν σε κάθε δείγμα 8ml MeOH και ακολουθούσε καλή ανάδευση σε συσκευή vortex. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονταν σε σωλήνες φυγοκέντρησης teflon και ακολουθούσε φυγοκέντριση (7.500 στροφές/min, 17°C, 10min). Μετά τη φυγοκέντριση γινόταν λήψη του υπερκειμένου και επιστροφή του στα αντίστοιχα φιαλίδια. Ακολουθούσε φιλτράρισμα των δειγμάτων σε καινούρια φιαλίδια με φίλτρα σύριγγας 0,45 μm (Whatman PS). Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύονταν στον καταψύκτη στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυσή τους μέσω HPLC.

Για να ακολουθηθεί το συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο εκχύλισης από το έκπλυμα, προηγήθηκαν δοκιμές ανάκτησης των υπολειμμάτων του OPP από νερό (0.5, 5 και 20 mg/L). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα ανάκτησης του OPP σε δείγματα νερού σε συγκεντρώσεις 0.5, 5 και 20 mg/L ήταν 87.9, 92.7 και 85% αντίστοιχα. Τα επίπεδα ανάκτησης του IMZ σε υδατικά δείγματα για συγκεντρώσεις 0, 0.5 και 5 mg/L και έφτασε στο 100, 94.4 και 92.1% αντίστοιχα.



**Εικόνα 19:** Ανοιγμένη στήλη μετά το τέλος του πειράματος

#### 2.4.1.2. Εκχύλιση των γεωργικών φαρμάκων από το στερεό υπόστρωμα

Στο πρώτο πειραματικό πρωτόκολλο, σε κωνικές φιάλες προστέθηκαν 10 g από το υπόστρωμα που λήφθηκε από τις στήλες και 25 ml ACN. Πραγματοποιήθηκαν τρεις εκχυλίσεις για κάθε ζώνη από κάθε στήλη. Ακολούθησε ανάδευση (1h σε 25°C

και 200rpm) και μετά το πέρας της ανάδευσης, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης Teflon και φυγοκεντρήθηκαν (5min, 18°C, 7500rpm). Στη συνέχεια το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε γυάλινα φιαλίδια, ακολούθησε φιλτράρισμα (φίλτρα σύριγγας 0,45 μm, Whatman PS) σε νέα φιαλίδια και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C πριν αναλυθούν σε σύστημα HPLC. Σε δείγματα που από προκαταρκτικές μετρήσεις έδειξαν την παρουσία ιδιαίτερα υψηλών συγκεντρώσεων των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκαν απαραίτητες αραιώσεις πριν την ανάλυση σε σύστημα HPLC.

Στο δεύτερο πρωτόκολλο εκχύλισης, σε falcon προστέθηκαν 4 g από το υπόστρωμα και 40 ml απιονισμένο νερό. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε ορίζοντα κάθε στηλής. Ακολούθησε ανάδευση (30min, 25°C, 200rpm) και μετά το πέρας της ανάδευσης, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (5min, 18°C, 7500rpm). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε κωνικές φιάλες. Στη συνέχεια προστέθηκε στα falcon επιπλέον 40 ml απιονισμένο νερό και η ίδια διαδικασία εκχύλισης επαναλήφθηκε για δύο ακόμη φορές. Τα υδατικά εκχυλίσματα από τους τρεις κύκλους εκχύλισης συνενώθηκαν (120 ml) και τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων σε αυτό εκχυλίστηκαν παραπέρα με προσθήκη μεθανόλης όπως περιγράφηκε παραπάνω για τα δείγματα έκπλυσης. Από την άλλη μεριά στα δείγματα στα οποία είχε ήδη πραγματοποιηθεί τριπλή εκχύλιση με νερό ακολούθησε προσθήκη 10 ml ACN, ανάδευση και φυγοκέντρηση υπό τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε γυάλινα φιαλίδια. Τέλος τα δείγματα φιλτραρίστηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυσή τους σε σύστημα HPLC. Με το παραπάνω δεύτερο πρωτόκολλο εκχύλισης έγινε προσπάθεια ώστε να διαχωριστεί α) η ποσότητα των OPP και IMZ που ήταν άμεσα διαθέσιμη στο υπόστρωμα των στηλών και εκχυλίζονταν με υδατικά μέσα (δηλαδή και εύκολα μετακινούμενη κάθετα εντός των στηλών) β) από την ποσότητα των OPP και IMZ που παρέμεινε στο υπόστρωμα μετά τις υδατικές εκχυλίσεις (άμεσα διαθέσιμη) και εκχυλίστηκε μόνο με οργανικό διαλύτη (λιγότερο διαθέσιμη).

Για να ακολουθηθούν τα δύο αυτά πειραματικά πρωτόκολλα εκχύλισης από το υπόστρωμα πλήρωσης των στηλών, προηγήθηκαν δοκιμές ανάκτησης των υπολειμμάτων του OPP από στερεά υποστρώματα σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (0,5, 5 και 20 mg/Kg). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα ανάκτησης του OPP στερεά



υποστρώματα για επίπεδα συγκεντρώσεων 0.5, 5 και 20 mg/kg ήταν 87.3, 87.8 και 81% αντίστοιχα.

#### **2.4.2. Μέθοδος HPLC.**

Για την ανάλυση και προσδιορισμό των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων στα εκχυλίσματα τόσο των εκπλυμάτων όσο και του υποστρώματος από τις στήλες, χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σύστημα HPLC Marathon III, που ήταν εξοπλισμένο με σύστημα αντλιών gradient, όγκο έκχυσης 20μl, ανιχνευτή UV ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό Clarify® για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Ο διαχωρισμός των διαφόρων γεωργικών φαρμάκων 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.

##### **2.4.2.1. Διαλύτες και γεωργικά φάρμακα**

Για την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων γεωργικών φαρμάκων και των κινητών φάσεων για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό HPLC grade (Merk GmbH, Germany). Για την ανάλυση και τον πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικά πρότυπα γεωργικών φαρμάκων υψηλής καθαρότητας (Riedel Haen GmbH, Germany), ortho-phenylphenol (OPP 99 %) και imazalil (IMZ 99,8%).

##### **2.4.2.2. Καμπύλες αναφοράς**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός όλων των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για το λόγο αυτό αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 1000 μg/ml για όλα τα γεωργικά φάρμακα 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 και στη συνέχεια, με διαδοχικές εγχύσεις των πρότυπων διαλυμάτων στο σύστημα HPLC, από το μικρότερης στο μεγαλύτερης συγκέντρωσης πρότυπο διάλυμα προέκυψε η πρότυπη καμπύλη. Συγκεκριμένα, το εμβαδόν της

κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με τη συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών τους με τη βοήθεια του λογισμικού Clarify®.

#### **2.4.2.3. Orthophenylphenol (OPP)**

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μυκητοκτόνου ortho-phenylphenol (OPP) προετοιμάστηκαν καμπύλες αναφοράς όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω. Η έκλυση και ο διαχωρισμός του OPP πραγματοποιήθηκαν ισοκρατικά με κινητή φάση με σύσταση:

Νερό 50,5% + Ακετονιτρίλιο 49% + Αμμωνία 0,5%

Η ανίχνευση του OPP πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 254nm και ο χρόνος κατακράτησης για την ουσία ήταν 4,5min.

#### **2.4.2.4. Imazalil (IMZ)**

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μυκητοκτόνου imazalil (IMZ) προετοιμάστηκαν καμπύλες αναφοράς όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω. Η έκλυση και ο διαχωρισμός του IMZ πραγματοποιήθηκαν ισοκρατικά με κινητή φάση με σύσταση:

Μεθανόλη (80%) + Υδατικό δ/μα NH<sub>3</sub> 0,25% (20%)

Η ανίχνευση του IMZ πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 204nm και ο χρόνος κατακράτησης για την ουσία ήταν 3,4 min.

### **2.5. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηκότητας λακκάσης**

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηκότητας της λακκάσης πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά με την προσθήκη σε κυψελίδα 1,2 ml

τρυγικού νατρίου συγκέντρωσης 0,1 M και 0,8 ml από το δείγμα εκπλύματος από τις στήλες. Για την εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης προστέθηκαν 0,4 ml ABTS (2,2 - azinobis - 3 - ethylbenzothiazolin - 6 - sulfonic acid) συγκέντρωσης 1,5 mM (0,0205 gr σε 25 ml H<sub>2</sub>O), 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 δράσης 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)

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

$V_{\text{sample}}$  : είναι ο αρχικός όγκος του εκπλύματος από το οποίο πάρθηκε το δείγμα (σε ml)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Γενικά

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του υποστρώματος για καλλιέργεια μανιταριών, εμβολιασμένου με το εργαστηριακό στέλεχος του μύκητα λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus*, για την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων orthophenylphenol και imazalil που χρησιμοποιούνται στη μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων. Σε κάθε μία από τρεις στήλες, που χρησιμοποιήθηκαν ως μίνι συστήματα βιοκλίνης πληρούμενα με υπόστρωμα για καλλιέργεια μανιταριών εφαρμόστηκε συνολική ποσότητα 49,4 g OPP και 13,5 g IMZ μέσα σε διάστημα 120 ημερών. Πραγματοποιήθηκαν εκχύλιση και ανάλυση HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων σε εκπλύματα που λαμβάνονταν από τις στήλες. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν εκχύλιση του OPP από το υπόστρωμα και ανάλυση HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό του OPP που κατακρατήθηκε στο υπόστρωμα, σε τρεις ορίζοντες του υποστρώματος (0-20 cm, 20-50 cm, 50-80 cm), ώστε να μελετηθεί η κατανομή των υπολειμμάτων του OPP στο υπόστρωμα εντός των στηλών. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών υπολογίστηκε η ποσότητα των γεωργικών φαρμάκων που διασπάστηκε καθώς και η ποσότητα που απλά κατακρατήθηκε στην στήλη. Παράλληλα παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου λακκάση.

#### 3.2. Έκπλυση OPP στο χρόνο

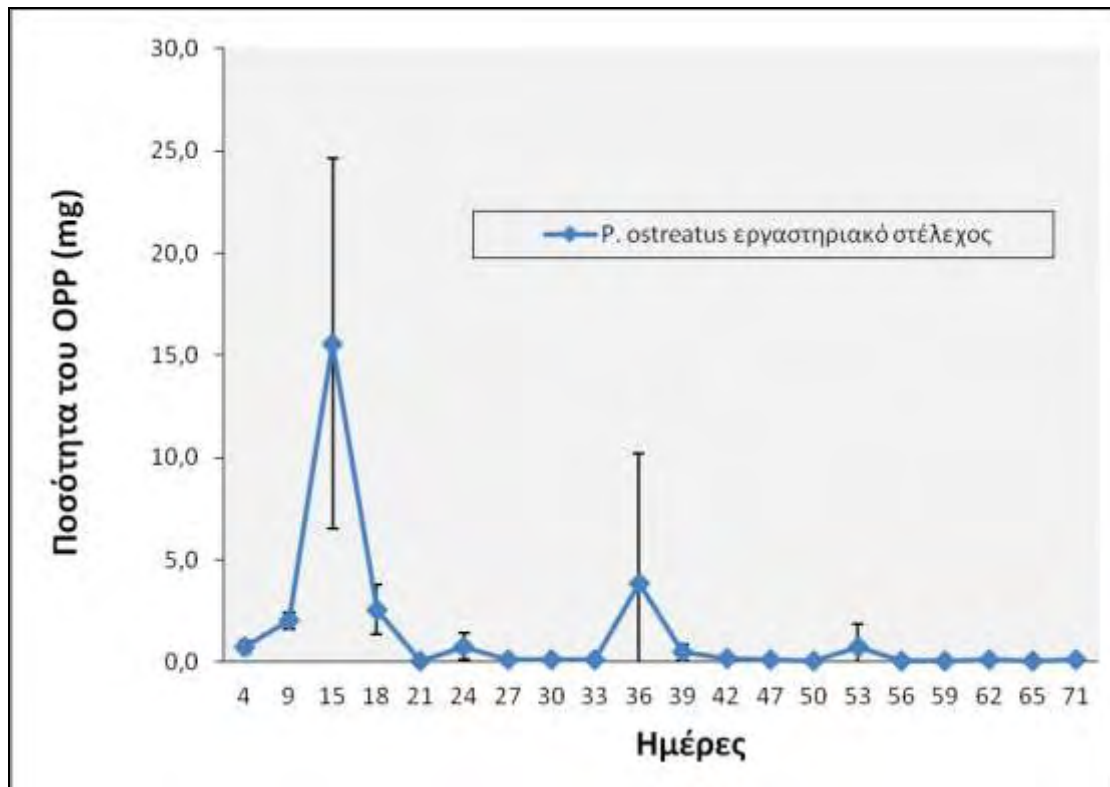
Για διάστημα 71 ημερών σε κάθε μία από τις τρεις στήλες χορηγούνταν 1148ml διάλυμα OPP (orthophenylphenol). Ανά τρεις μέρες γινόταν δειγματοληψία

και ογκομέτρηση του εκπλύματος από τις στήλες, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στον Πίνακα 2. Για κάθε ημέρα δειγματοληψίας (T4-T71) αναφέρεται ο όγκος εκπλύματος (σε ml) για κάθε μία από τις στήλες.

Κάνοντας ανάγωγή της ποσότητας του OPP που βρέθηκε με τη μέθοδο HPLC, στη συνολική ποσότητα του εκπλύματος από κάθε στήλη (βλ. πίνακα 2), προκύπτει η συνολική ποσότητα του OPP που εκπλύθηκε από κάθε στήλη. Στο Διάγραμμα 1 απεικονίζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων της ανάλυσης HPLC (ποσότητα του OPP) των εκπλυμάτων από τις τρεις στήλες για κάθε ημέρα δειγματοληψίας. Κατά μέσο όρο και από τις τρεις στήλες καθ' όλο το διάστημα των 71 ημερών εκπλύθηκε συνολική ποσότητα 27,8 mg OPP, δηλαδή το 0,056% της ποσότητας του OPP που προστέθηκε συνολικά σε κάθε στήλη (49,4 gr). Οι δύο ιδιαίτερες υψηλές τιμές που καταγράφονται στο διάγραμμα πιθανότατα οφείλονται σε τεχνικά προβλήματα που προέκυψαν κατά την εφαρμογή του διαλύματος του γεωργικού φαρμάκου στην στήλη. Έτσι στην δειγματοληψία 9 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος παρατηρήθηκε μια αυξημένη ανάκτηση υπολειμμάτων OPP στο έκπλυμα που οφείλεται σε πρόβλημα στον ροοστάτη που οδήγησε σε εφαρμογή των 1148 ml διαλύματος OPP σε δύο αντί σε τέσσερις ημέρες (όπως προβλέπονταν από τον αρχικό σχεδιασμό) και αυτό αποτυπώνεται και στα αποτελέσματα της ογκομέτρησης του εκπλύματος και από τις τρεις στήλες (βλ. πίνακα 2). Η δεύτερη υψηλότερη τιμή OPP στο έκπλυμα ανιχνεύτηκε στις 36 ημέρες και πάλι σε ανάλογο πρόβλημα με τον ρυθμιστή ροής που οδήγησε σε εφαρμογή των 1148 ml διαλύματος OPP σε μια μόνο μέρα αντί τέσσερις (βλ. Πίνακα 2).

**Πίνακας 2:** Ο όγκος (ml) των εκπλυμάτων που συλλέχθηκαν από κάθε στήλη μετά σε κάθε δειγματοληψία κατά την διάρκεια της περιόδου εφαρμογής του γεωργικού φαρμάκου orthophenylphenol.

	<b>T4</b>	<b>T9</b>	<b>T15</b>	<b>T18</b>	<b>T21</b>	<b>T24</b>	<b>T27</b>	<b>T30</b>	<b>T33</b>	<b>T36</b>	<b>T39</b>	<b>T42</b>	<b>T47</b>	<b>T50</b>	<b>T53</b>	<b>T56</b>	<b>T59</b>	<b>T62</b>	<b>T65</b>	<b>T71</b>
<b>Στήλη 1</b>	480	790	130	960	850	750	880	640	500	1020	390	570	1380	700	835	870	860	735	430	565
<b>Στήλη 2</b>	440	920	540	540	765	670	1040	680	630	960	300	670	1420	730	660	620	850	755	550	455
<b>Στήλη 3</b>	450	850	520	660	705	930	960	520	570	1420	70	750	1310	760	1050	425	770	970	520	380



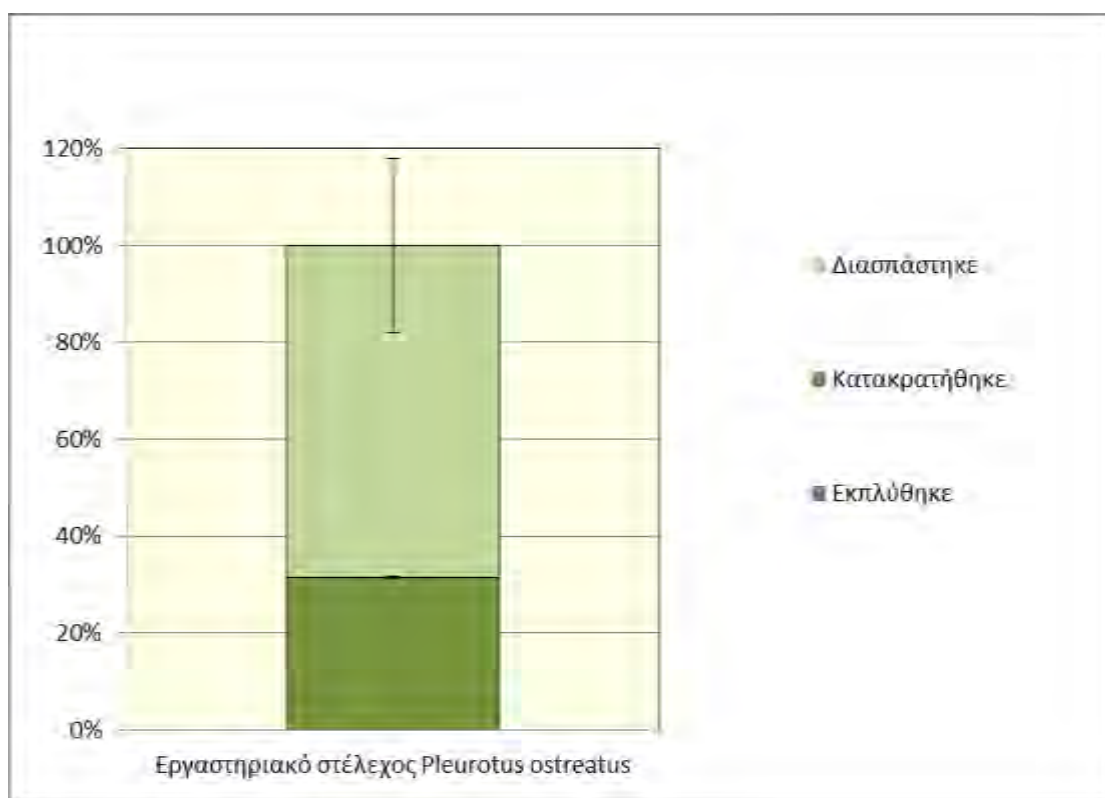
**Διάγραμμα 1:** Οι ποσότητες του μυκητοκτόνου OPP στο έκπλυμα των στηλών που είχαν πληρωθεί με υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών εμβολιασμένο με το εργαστηριακό στέλεχος του μύκητα λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus*. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση.

### 3.3 Κατανομή υπολειμμάτων OPP στην στήλη με την ολοκλήρωση του πειράματος

Η κατανομή υπολειμμάτων του OPP στο υπόστρωμα εντός των τριών στηλών μελετήθηκε σε τρεις οριζόντες υποστρώματος 0-20, 20-50 και 50-80 cm χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά πρωτόκολλα εκχύλισης για το OPP. Το πρώτο πειραματικό πρωτόκολλο περιελάμβανε διαδοχικές εκχυλίσεις μόνο με οργανικό διαλύτη (ακετονιτρίλιο) με στόχο την μέγιστη ανάκτηση υπολειμμάτων από το υπόστρωμα. Το δεύτερο πρωτόκολλο περιελάμβανε τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις με απιονισμένο νερό ώστε να ανακτηθεί αρχικά το άμεσα διαθέσιμο και εκχυλίσιμο

κομμάτι της ποσότητας του OPP που έχει κατακρατηθεί εντός της στήλης και στην συνέχεια εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (ακετονιτρίλιο) ώστε να παραλάβουμε το υπόλοιπο του OPP που είναι λιγότερο διαθέσιμο προς έκπλυση αλλά εκχυλίσιμο με οργανικό διαλύτη.

Γενικά όταν ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο εκχύλισης μόνο με ακετονιτρίλιο το 31.1% της συνολικής ποσότητας του OPP που εφαρμόστηκε κατακρατήθηκε στα πρώτα 20 cm, ενώ μόνο 0.3 και <0.01% κατακρατήθηκε στα 20-50 και 50-80 cm αντίστοιχα. Συνολικά, το 31,4% της συνολικής ποσότητας OPP κατακρατήθηκε στην στήλη, 0.056% εκπλύθηκε και το υπόλοιπο 68.5% αποδομήθηκε με διάφορες διεργασίες (βιοτικές ή αβιοτικές). Η πιθανότητα μέρος αυτού του ποσοστού να περιλαμβάνει και έκπλυση κατά την διάρκεια της ακόλουθης περιόδου εφαρμογής του IMZ δεν μπορεί να αποκλειστεί αλλά είναι λιγότερο πιθανή ανα δούμε την περιορισμένη έκπλυση του OPP από τις στήλες από τις 36 ημέρες και μετά..

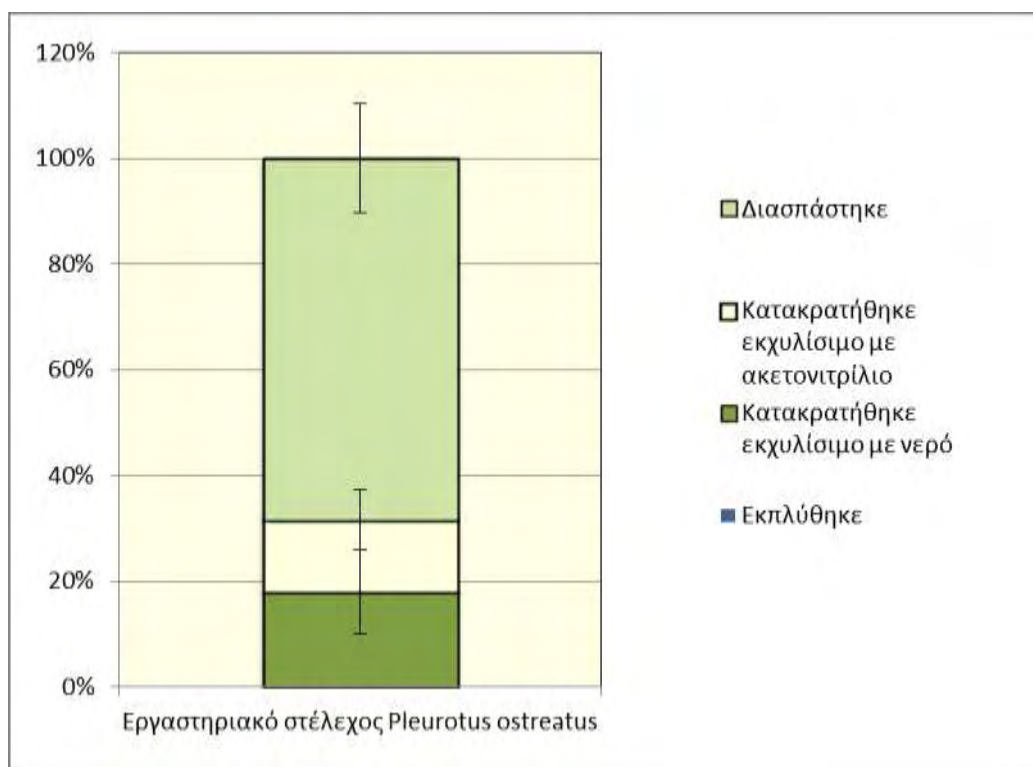


**Διάγραμμα 2:** Το ποσοστό του OPP που διασπαστήκε, κατακρατήθηκε στις στήλες ή εκπλύθηκε από αυτές. Το ποσοστό του κατακρατημένου στο υπόστρωμα OPP βρέθηκε με εκχύλιση μόνο με ακετονιτρίλιο. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών



επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση. Η έννοια ‘διασπάστηκε’ περιλαμβάνει όλες τις διεργασίες, βιοτικές και αβιοτικές που οδηγούν σε απομάκρυνση με οποιαδήποτε μορφή του γεωργικού φαρμάκου από το υπόστρωμα (δηλ. φωτόλυση, εξάτμιση, μικροβιακή διάσπαση, χημική υδρόλυση, μη αντιστρεπτή προσρόφηση).

Όταν ακολουθήθηκε το δεύτερο πρωτόκολλο για την εκχύλιση το OPP από τα υπόστρωμα των στηλών παρατηρήθηκαν σχετικά παρόμοια αποτελέσματα. Έτσι, το 17,7% της συνολικής ποσότητας OPP που διοχετεύτηκε σε κάθε στήλη κατακρατήθηκε στο ορίζοντα 0-20 cm και ήταν εκχυλίσιμο με υδατικά μέσα (δηλαδή άμεσα διαθέσιμο) και μόνο το 0,2% και 0.1% κατακρατήθηκαν στους επόμενους ορίζοντες 20-50 cm και 50-80 cm αντίστοιχα. Ακόλουθη εκχύλιση με ακετονιτρίλιο οδήγησε σε περαιτέρω εκχύλιση 13,2% από τον ορίζοντα 0-20 cm, 0,5% από τον ορίζοντα 20-50 cm και 0% από τον ορίζοντα 50-80 cm. Δηλαδή συνολικά με το δεύτερο πρωτόκολλο εκχύλιστηκε το 31,6% της συνολικής ποσότητας OPP που διοχετεύτηκε σε κάθε στήλη (18% με νερό και 13,6% με ακετονιτρίλιο) που είναι παρόμοιο με το 31.4% που ανακτήθηκε μόνο με εκχύλιση με ακετονιτρίλιο.



**Διάγραμμα 3:** Το ποσοστό του OPP που διασπάστηκε, κατακρατήθηκε στις στήλες ή εκπλύθηκε από αυτές. Το ποσοστό του κατακρατημένου στο υπόστρωμα OPP

βρέθηκε με εκχύλιση μόνο με νερό και ακολούθως με εκχύλιση με ακετονιτρίλιο. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση. Η έννοια 'διασπάστηκε' περιλαμβάνει όλες τις διεργασίες, βιοτικές και αβιοτικές που οδηγούν σε απομάκρυνση με οποιαδήποτε μορφή του γεωργικού φαρμάκου από το υπόστρωμα (δηλ. φωτόλυση, εξάτμιση, μικροβιακή διάσπαση, χημική υδρόλυση, μη αντιστρεπτή προσρόφηση).

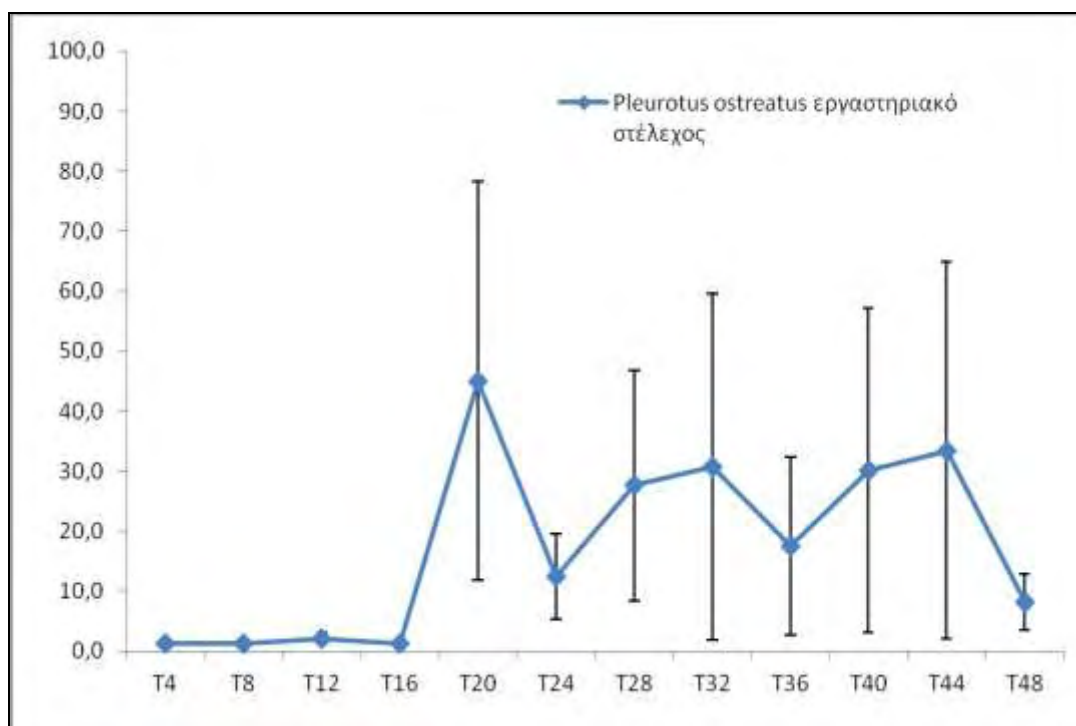
### 3.4 Έκπλυση IMZ στο χρόνο

Μετά την πάροδο των 71 ημερών χορήγησης OPP στις στήλες, το πείραμα συνεχίστηκε με διάλυμα IMZ για επιπλέον 48 μέρες. Κάθε δεύτερη μέρα οι διαχωριστικές χωάνες συμπληρώνονταν με 405ml διάλυμα IMZ. Στο διάστημα των 48 ημερών, χορηγήθηκε σε κάθε μία από τις τρεις στήλες συνολική ποσότητα 13,5 g IMZ. Ανά τέσσερις μέρες γινόταν δειγματοληψία και ογκομέτρηση του εκπλύματος από τις στήλες, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στον Πίνακα 3.

Στο Διάγραμμα 2 απεικονίζεται η ποσότητα του IMZ που ανακτήθηκε στο έκπλυμα των τριών στηλών (μέσος όρος) κατά την διάρκεια της περιόδου εφαρμογής του μυκητοκτόνου στις στήλες. Παρατηρήθηκε μια σταθερή ανίχνευση του IMZ στα εκπλύματα των στηλών από τις 20 ημέρες και μετά με υψηλότερες τιμές στις 20 ημέρες όπου και ανακτήθηκαν κατά μέσο όρο 45 mg IMZ από το έκπλυμα των στηλών. Οι υψηλές τιμές τυπικής απόκλισης οφείλονται στην αυξημένη έκπλυση από την στήλη 2 που λόγω προβλήματος του ροοστάτη οδήγησε σε ταχύτερη εφαρμογή του διαλυματος IMZ και συνεπώς αυξημένο όγκο έκπλυσης όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3 στις ημέρες 20, 32 και 44 και κατά συνέπεια και σε μεγαλύτερες ποσότητες IMZ στο έκπλυμα. Κατά μέσο όρο και από τις τρεις στήλες εκπλύθηκε συνολική ποσότητα 211,1 mg IMZ, δηλαδή το 1,56% της ποσότητας του IMZ που προστέθηκε σε κάθε στήλη (13,5 gr).

**Πίνακας 3:** Ο όγκος (ml) των εκπλυμάτων που συλλέχθηκαν από κάθε στήλη μετά σε κάθε δειγματοληψία κατά την διάρκεια της περιόδου εφαρμογής του γεωργικού φαρμάκου imazalil.

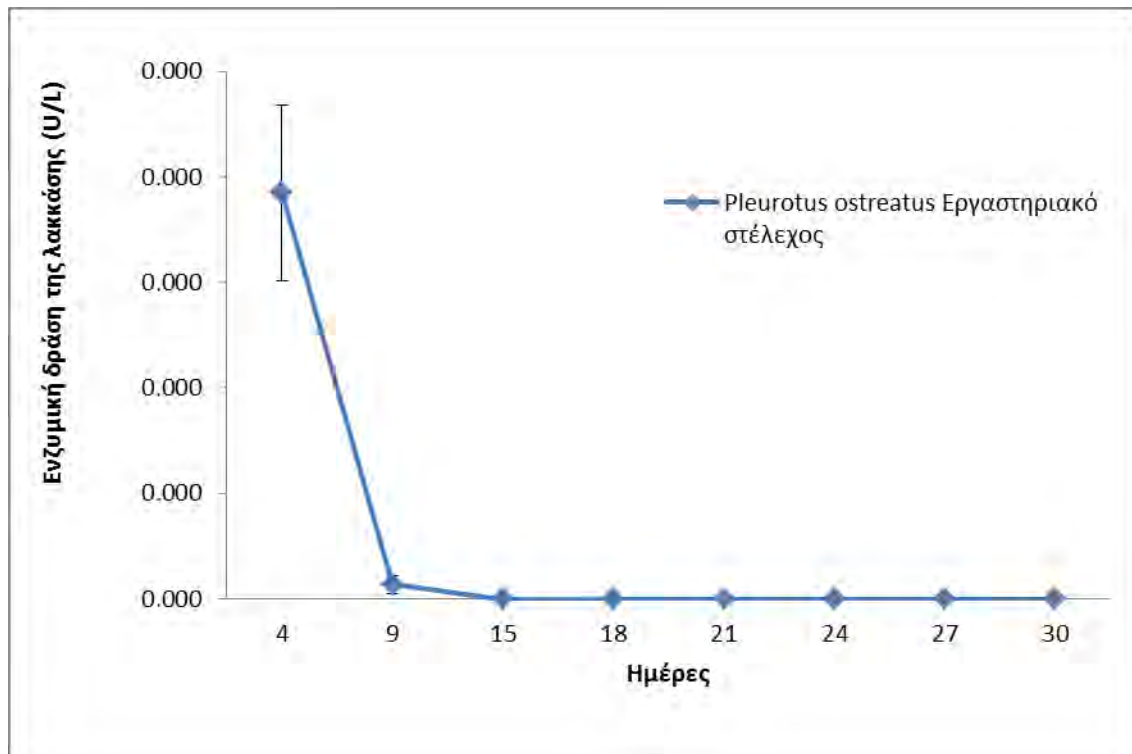
	<b>T4</b>	<b>T8</b>	<b>T12</b>	<b>T16</b>	<b>T20</b>	<b>T24</b>	<b>T28</b>	<b>T32</b>	<b>T36</b>	<b>T40</b>	<b>T44</b>	<b>T48</b>
<b>Στήλη 1</b>	360	410	400	340	580	630	880	790	765	830	520	700
<b>Στήλη 2</b>	430	520	680	160	820	690	750	880	730	800	800	450
<b>Στήλη 3</b>	580	590	840	400	470	760	780	720	740	815	460	790



**Διάγραμμα 4:** Οι ποσότητες του μυκητοκτόνου IMZ στο έκπλυμα των στηλών που είχαν πληρωθεί με υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών εμβολιασμένο με το εργαστηριακό στέλεχος του μύκητα λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus*. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση.

### 3.5 Μέτρηση λακκάσης

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της λακκάσης έγινε με φασματοφωτομετρική μέτρηση του προϊόντος της αντίδρασής της με το ABTS στα 425 nm. Τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων απεικονίζονται στο Διάγραμμα 5.



**Διάγραμμα 5:** Η ενζυμική δραστηριότητα λακάσης στα εκπλύματα των στηλών που είχαν πληρωθεί με υπόστρωμα εμβολιασμένο με τον μύκητα *P. ostreatus*. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική απόκλιση.

Γενικότερα παρατηρήθηκε σημαντική ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου λακάση στα εκπλύματα των στηλών μόνο κατά την πρώτη δειγματοληψία στις 4 ημέρες μετά την έναρξη εφαρμογή του μυκητοκτόνου. Η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται σημαντικά στις 9 ημέρες και φτάνει σε μη ανιχνεύσιμες τιμές από την 15 ημέρα και μετά.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 4.1. Συζήτηση

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε πείραμα στηλών για την αξιολόγηση του υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών, εμβολιασμένου με τον εδώδιμο μύκητα *Pleurotus ostreatus* ως βιοτεχνολογική προσέγγιση για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων απο συσκευαστήρια φρούτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων όπως orthophenylphenol και imazalil. Παράλληλα, μελετήθηκε η δράση του ενζύμου λακκάση ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη πιθανής συσχέτισης μεταξύ αποδόμησης των μυκητοκτόνων και ενζυμικής δραστηριότητας.

##### 4.1.1. Ortho-phenylphenol

Το OPP είναι μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται ευρέως στην μετασυλλεκτική μεταχείριση εσπεριδοειδών. Κατά συνέπεια ανιχνεύεται σε μεγάλες ποσότητες στα υγρά απόβλητα συσκευαστηρίων φρούτων. Συνεπώς είναι επιτακτική η ανάγκη να βρεθεί μία μέθοδος διαχείρισης και απορρύπανσης των αποβλήτων αυτών από τέτοιου είδους γεωργικά φάρμακα. Για να είναι αποτελεσματική μια τέτοια μέθοδος επεξεργασίας πρέπει α) να παρουσιάζει όσο το δυνατόν μεγαλύτερα ποσοστά διάσπασης και συγκράτησης του ρύπου στο υπόστρωμα και β) όσο το δυνατόν μικρότερα ποσοστά έκπλυσης του ρύπου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η ποσότητα του OPP που εκπλύθηκε αποτέλεσε μόλις το 0,056% της συνολικά προστεθειμένης ποσότητας που συνολικά χορηγήθηκε σε κάθε στήλη αποδεικνύοντας την ιδιαίτερα ικανοποιητική αποτελεσματικότητα του υποστρώματος να περιορίζει την έκπλυση

του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου. Σε προηγούμενες μελέτες σε πειράματα στηλών με διάφορα βιομύγματα οι Omírou et al (2012) παρατήρησαν ότι το OPP αποτέλεσε το πιο κινητικό γεωργικό φάρμακο από αυτά που δοκιμάστηκαν (imazalil, thiabendazole και διάφορα εντομοκτόνα πυρεθροειδή και οργανοφωσφορικά) με ποσοστό 5.6 – 8.1% της ποσότητας που εφαρμόστηκε να ανιχνεύεται στο έκπλυμα των στηλών. Παρά το υψηλότερο φορτίο νερού και OPP στις στήλες στο πείραμα της συγκεκριμένης διατριβής σε σύγκριση με το πείραμα στηλών που παρουσιάζεται από τους Omírou et al. (2012), το εμβολιασμένο υπόστρωμα μανιταριών περιόρισε πιο αποτελεσματικά την έκπλυση του OPP.

Από τα πειράματα ανάκτησης του OPP από το υπόστρωμα πληρώσεως των στηλών προέκυψε ότι και με τα δύο πειραματικά πρωτόκολλα ανακτήθηκε ποσοστό περίπου 31,5% της συνολικής ποσότητας OPP που προστέθηκε σε κάθε στήλη. Μάλιστα, σχεδόν ολόκληρη αυτή η ποσότητα βρέθηκε να έχει κατακρατηθεί στον επιφανειακό ορίζοντα των στηλών (0-20 cm) από την κορυφή της στήλης. Προηγούμενες μελέτες σε σύστημα βιοκλίνης αγρού έδειξαν ότι το OPP αποδομήθηκε σχετικά γρήγορα με αποτέλεσμα <13% της αρχικής ποσότητας του μυκητοκτόνου να ανιχνευθεί στα πρώτα 40 cm της βιοκλίνης 21 ημέρες μετά την εφαρμογή, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα του μυκητοκτόνου στην βιοκλίνη μετά από τις 70 ημέρες. Τέλος και με τα δύο πειραματικά πρωτόκολλα ανάκτησης του OPP προκύπτει ότι το 68,4% της συνολικής προστεθήμενης ποσότητας OPP απομακρύνθηκε με βιοτικές ή αβιοτικές διεργασίες χωρίς να είμαστε σε θέση να προσδιορίσουμε την συμμετοχή της κάθε διεργασίας στην απομάκρυνση του μυκητοκτόνου από τις στήλες.

#### **4.1.2. Imazalil**

Το IMZ είναι ένα μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων και λαχανικών και κυρίως εσπεριδοειδών. Έχει αποδειχθεί ως αποτελεσματικότερο σε σχέση με την πλειοψηφία αντίστοιχων γεωργικών φαρμάκων, κατά συνέπεια η χρήση του να είναι ευρέως διαδεδομένη. Επίσης έχει αποδειχθεί να είναι εξαιρετικά υπολλειματικό (EPA, 2003) με

αποτέλεσμα να ανιχνεύονται σημαντικές ποσότητες του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου στο περιβάλλον. Είναι λοιπόν επιτακτική η ανάγκη εύρεσης μιας αποτελεσματικής μεθόδου αποτοξικοποίησης των υγρών αποβλήτων της βιομηχανίας μετασυλλεκτικής μεταχείρισης φρούτων από το μυκητοκτόνο imazalil.

Τα αποτελέσματα του πειράματος έκπλυσης έδειξαν ότι το υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών εμβολιασμένο με το εργαστηριακό στέλεχος του εδώδιμου μύκητα *P. ostreatus* είχε την ικανότητα να κατακρατά σε σημαντικό βαθμό το IMZ με αποτέλεσμα μόνο το 1,56 % της συνολικά προστεθειμένης ποσότητας IMZ να εκπλυθεί. Σε αντίστοιχη μελέτη οι Omirou et al (2012) παρατήρησαν περιορισμένη έκπλυση του IMZ σε στήλες που είχαν πληρωθεί με βιομίγμα με την ποσότητα που εκπλύθηκε να μην ξεπερνά το 0.1% της ποσότητας που εφαρμόστηκε στις στήλες. Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα δύο πειράματα δεν είναι ακριβώς συγκρίσιμα καθώς στο παρόν πείραμα εφαρμόστηκαν σημαντικά υψηλότερες ποσότητες IMZ με σημαντικά υψηλότερη υδατική επιβάρυνση των στηλών ευνοώντας την έκπλυση του.

Συγκριτικά για τα δύο γεωργικά φάρμακα που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο υπόστρωμα μανιταριών εμβολιασμένο με εργαστηριακό στέλεχος του μύκητα *P. ostreatus* ήταν πιο αποτελεσματικό στην κατακράτηση του OPP παρά του IMZ. Το παραπάνω αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με την γενικότερα υψηλότερη υδατοδιαλυτότητα και κινητικότητα του δεύτερου σε σχέση με το πρώτο όπως έχει καταγραφεί και από τους Omirou et al (2012) σε αντίστοιχα πειράματα. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αποδοθεί στην σειρά με την οποία εφαρμόστηκαν τα δύο μυκητοκτόνα στις στήλες. Έτσι, η πρότερη εφαρμογή του OPP στις στήλες όταν το υπόστρωμα ήταν ακόμη φρέσκο, μη υδατικά κορεσμένο και αποικισμένο από τον μύκητα πιθανότατα εννόησε την αποτελεσματική απομάκρυνση ή κατακράτηση του γενικότερα περισσότερο ευκίνητου OPP. Αντίθετα, η ακόλουθη εφαρμογή του IMZ σε ήδη κορεσμένες υδατικά στήλες και επιβαρυνμένες με την εφαρμογή του OPP για 70 ημέρες οδήγησαν στην λιγότερο αποτελεσματική κατακράτηση από το υπόστρωμα του λιγότερο υδατοδιαλυτού και ευκίνητου IMZ. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μια πρώτη ένδειξη ότι μεταξύ των δύο διαφορετικών μεταχειρίσεων (OPP και IMZ) θα πρέπει να γίνεται αλλαγή του υποστρώματος ώστε να έχουμε αποτελεσματική κατακράτηση και των δύο διαφορετικών μυκητοκτόνων.



### 4.1.3. Δραστηριότητα λακκασών

Οι λακκάσες αποτελούν μια κατηγορία των εξωκυτταρικών λιγνινολυτικών ενζύμων που παράγονται από τους μύκητες λευκής σήψης. Ο μύκητας λευκής σήψης *Pleurotus ostreatus* διακρίνεται για την παραγωγή λακκασών. Στην παρούσα εργασία, σημαντική ενζυμική δραστηριότητα λακκάσης ανιχνεύθηκε μόνο στις 4 ημέρες μετά την έναρξη εφαρμογής του OPP στις στηλές. Ακολούθως η ενζυμική δραστηριότητα μειώθηκε σημαντικά και ήταν μη ανιχνεύσιμη από τις 15 ημέρες και μετά. Κατά συνέπεια η δραστηριότητα των λακκασών είναι πιθανό να συνέβαλλε στην αποδόμηση του OPP μόνο κατά τις πρώτες ημέρες. Η ραγδαία μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας των λακκασών μετά την τέταρτη μέρα μπορεί να αποδοθεί στην σταδιακή επικράτηση συνθηκών εντός των στηλών (χαμηλές συγκεντρώσεις διαλυτού C και διαλυτού O<sub>2</sub>) που να ευνόησαν την επικράτηση άλλων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών όπως βακτήρια ή άλλοι μύκητες στο υπόστρωμα σε βάρος του *P. ostreatus* με αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων. Περαιτέρω μελέτες που θα πραγματοποιηθούν στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του κ. Π. Καραά θα διερευνήσουν την σύσταση της μικροβιακής κοινότητας στα υποστρώματα των στηλών με την ολοκλήρωση των πειραμάτων.

### 4.2. Συμπεράσματα

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

- Το υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών εμβολιασμένο με τον μύκητα *P. ostreatus* παρουσίασε ικανοποιητική ικανότητα κατακράτησης και απομάκρυνσης (βιοτικά ή αβιοτικά) των μυκητοκτόνων OPP και IMZ.
- Το μεγαλύτερο ποσοστό του OPP απομακρύνθηκε με βιοτικές ή αβιοτικές διεργασίες ενώ το 1/3 περίπου της συνολικής ποσότητας που εφαρμόστηκε κατακρατήθηκε εντός των στηλών.

- Σε γενικές γραμμές δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της δράσης των παραγόμενων από το εργαστηριακό στέλεχος του μύκητα λευκής σήψης *P. ostreatus* λακασών και της διάσπασης των υπό εξέταση γεωργικών μυκητοκτόνων. Μόνο κατά τις τέσσερις πρώτες μέρες της πειραματικής διαδικασίας ίσως να συνεισέφεραν οι λακκάσες στην αποδόμηση του μυκητοκτόνου OPP.

#### 4.3. Μελλοντική εργασία

Θα ακολουθήσουν πειράματα ανάκτησης του μυκητοκτόνου imazalil από το υπόστρωμα πλήρωσης των στηλών, από τα οποία θα αξιολογηθεί η ικανότητα του συγκεκριμένου υποστρώματος να συγκρατεί το μυκητοκτόνο. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών σε συνδιασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για το βαθμό έκπλυσης του imazalil από τις στήλες, θα εκτιμηθεί ο βαθμός διάσπασης του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου από το εργαστηριακό στέλεχος του μύκητα λευκής σήψης *P.ostreatus* σε υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών.

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, θα συγκριθούν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα πειραμάτων που διενεργήθηκαν παράλληλα από τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Καρα με υπόστρωμα άχυρου και εδάφους, ώστε να επιλεγεί το αποτελεσματικότερο υπόστρωμα για την αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία μετασυλλεκτικής μεταχείρισης φρούτων. Θα ακολουθήσουν πειράματα εφαρμογής του επιλεγμένου υποστρώματος σε μοντέλα συστημάτων βιοκλινών για την αποδόμηση μιας σειράς γεωργικών φαρμάκων. Οι βιοκλίνες θα αποτελούνται από το επιλεγμένο υπόστρωμα που θα έχει εμβολιαστεί και αποικιστεί επαρκώς με το μυκήλιο του *P.ostreatus*.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Accinelli C., Screpanti C., Vicari A. (2005) Influence of flooding on the degradation of linuron, isoproturon and metolachlor in soil, *Agronomy for Sustainable Development* **25**, 401-406
2. Alexander M. (1999). Bioremediation Technologies: In situ and solid phase. In: Biodegradation and Bioremediation, second ed. Academic Press, New York, USA. P. 349.
3. Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., Legge, R.L. (2008). *Biodegradation*, **19**, 771-783.
4. Baldrian, P. (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 215-242.
5. Baldrian, P. and Valaskova (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. V., *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. **32**, pp. 501-521.
6. Barr D.P. and Aust S.D. (1994). Pollutant degradation by white rot fungi. *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, **138**, 49-72.
7. 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.
8. Bergstrom L.; Stenstrom J. (1998). Environmental fate of chemicals in soil. *Ambio*, **27**, 16-23.
9. Bourton O., Gouy V., Touze-Foltz N., Benoit P., Chovelon M.J. and Margouma C. (2009) Geotextile fibres retention properties to prevent surface water non-point contamination by pesticides in agricultural areas. *Geotextiles and Geomembranes*, **27**, 254-261.
10. Buchenauer, H. (1977). Mechanism of action of the fungicide imazalil in *Ustilago avenae*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **84**, 440-450.
11. Candela L., Wallis J.K. and Mateos M.R. (2008). Non-point source pollution of groundwater from agricultural activities in Mediterranean Spain: the Balearic Islands case study. *Environmental Geology*, **54**, 587-595.

12. Carter A.D. (2000) How pesticides get into water and proposed reduction measures, *Pesticide Outlook* **11**, 149-157.
13. Carter, A.D. (1999). Pesticide contamination of water sources and the monitoring data across the E.U. XI Symposium on Pesticide Chemistry. La Goliardica Pavese: Cremona, Italy, pp 11-20.
14. Castillo M.d.P.; Torstensson L. (2008). Biobeds-Biotechnology for environmental protection from pesticide pollution. In *Methods and Techniques for Cleaning-up Contaminated Sites*; Anable, M. D., Teodorescu, M., Hlavinek, P., Diels, L., Eds.; Springer: Berlin.
15. Castillo, M.d.P.; Torstenson, L. and Stenstrom J. (2008). Review: Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Use. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 6206-6219.
16. Castillo, M.d.P; Ander, P.; Stenstrom, J.; Torstensson, L. (2000) Degradation of the herbicide bendazon as related to enzyme production by *Phanerochatae chrysosporium* in a solid substrate fermentation system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**, 289-295
17. Castillo, M.d.P; Andersson, A.; Ander, P.; Stenstrom, J; Torstensson, L. (2001) Establishment of the white rot fungus *Phanerochatae chrysosporium* on unsterile straw of solid substrate fermentation systems intended for degradation of pesticides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**, 627-633.
18. Castillo, M.d.P; Torstensson L. (2007). Effect of biobed composition, moisture and temperature on the degradation of pesticide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 5725-57-33.
19. Castillo, M.d.P; von Wiren-Lehr, S.; Scheunert, I.; Torstensson, L. (2001). Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochatae chrysosporium*. *Biology and Fertility of Soils*, **33**, 521-528.
20. Chu B.L, Guo B.L., Peng Z., Wang Z., Guo G. and Lin J.M. (2007). Studies on degradation of imazalil enantiomers in soil using capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* **30**, 323-329.
21. Cnubben N., Elliot G.R., Hakkert B.C., Meuling W.J. and van de Sandt J.J. (2002). Comparative in Vitro- in Vivo Percutaneous Penetration of the

- Fungicide ortho-phenylphenol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **35**, 198-208.
22. Coppola L., Castillo M.d.P., Monaci E. and Vischetti C. (2007). Adaptation of the Biobed Composition for Chlorpyrifos Degradation to Southern Europe Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 396-401.
  23. Crestini, C., Jurasek, L. and Argyropoulos D.S. (2003). On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. *Chemical European Journal*, **9**, 5371-5378.
  24. 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.
  25. Debaer, C.; Jaeken, P. (2006) Modified biofilters to clean up leftovers from spray loading and cleaning; experience from pilot installations. *Aspects of Applied Biology* **77**, 247-252.
  26. Dua M., Singh A., Sethunathan N., and Johri K.A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**, 143-152.
  27. 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 off the Lower Missouri River, USA. *Archives in Environmental Contamination and Toxicology*, **55**, 161-172.
  28. Eckert, J. W. (1967). In *Fungicides*, Volume 1. Torgeson, D. C. (E.d.), Academic Press, New York, p. 287.
  29. Eggen T. (1999). Application of fungal substrate from commercial mushroom production *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of creosote contaminated soil. *International biodeterioration and Biodegratation*, **44**, 117-126.
  30. Environmental Protection Agency (EPA) USA, 2003. Reregistration eligibility decision for imazalil Case No. 2325. p. 74

31. Fait, G.; Nicelli, M.; Fragoulis, G.; Trevisan, M.; Capri, E. Reduction of point contamination sources of pesticide from a vineyard farm. *Environmental Science and Technology* **2007**, 41, 3302-3308.
32. Ferguson, C.C., Darmendrail, K. Freier, B.K. Jensen, J. Jensen, H. Kasamas, A. Urzelai, and Vegter (e.d.) 1998. *Risk Assessment for Contaminated Sites in Europe, vol.1 Scientific Basis*. LQM press, Nottingham, United Kingdom.
33. Fernando T. and Aust S.D. (1994). Biodegradation of toxic chemicals by white rot fungi. In *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*, 386-402.
34. 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.
35. 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.
36. Gan, J.Y., Koskinen, W.C. (1998). Pesticide fate and behavior in soil at elevated concentrations. In: Kearney, P.C., Roberts, T.R. (Eds), *Pesticide Remediation in soil and water*. Wiley, Chichester, pp. 59-84.
37. Genot, P.; Huynh, N. v.; Debongnie, P.; Pussemier, L. (2002). Effects of addition of straw, chitin and manure to new or recycled biofilters on their pesticides retention and degradation properties. *Mededelingen-Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen*, **67**, 117-128.
38. Hammel K.E. and Cullen D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 349-355.
39. Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **13**, 125-135.
40. Helweg, A.; Bay, H.; Hansen, H.P.B.; Raboelle, M.; Sonnenborg, A.; Stenvang, L.; (2002) Pollution at and bellow sites used for mixing and loading of pesticides. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* **82**, 583-590.

41. Hiraga K., Fujii T. (1984). Introduction of tumours of the urinary bladder in F344 rats by dietary administration of o-phenylphenol. *Food Chemistry and Toxicology* **22**, 865-870.
42. Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbiology and Technology*. **30**, 454-466.
43. Hu W., Lu Y., Wang G., Wang T., Luo W., Shi Y., Zhang X. and Jiao W. (2009). Organochlorine Pesticides in Soils around Watersheds of Beijing Reservoirs: A Case Study in Guanting and Miyun Reservoirs. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, **82**, 694-700.
44. Hu Y., Yang X., Wang C., Zhao J., Li W. and Wang Z. (2009). A sensitive determination method for carbendazim and thiabendazole in apples by solid phase microextraction high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*, **25**, 314-319.
45. Iwamoto T. and Nasu M. (2001). Current Bioremediation Practice and Perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92**, 1-8.
46. Jang, H.-J., Nde, C., Toghrol, F. and Bentley, W.E. (2008). Microarray analysis of toxicogenomic effects of Ortho-phenylphenol in *Staphylococcus aureus*. *BMG Genomics*, **9**, 411.
47. Janssen D.B., Oppentocht J.E. and Poelarends G. (2001). Microbial dehalogenation. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**, 254-258.
48. Jauregui J., Valderrama B., Albores A. and Vasquez-Duhalt A. (2003). Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. *Biodegradation*, **14**, 397-406.
49. Johanson, T., Welinder, K.G. and Nyman, P.O. (1993). *Archives in Biochemistry and Biophysics* **300**, 57-62.
50. Kadian, N., Gupta, A., Satya, S., Mehta, R. K., Malik, A. (2008). Biodegradation of herbicide (atrazine) in contaminated soil using various bioprocessed materials. *Bioresource Technology*, **99**, 4642-4647.
51. Kaplan J.H., Dave B.A. (1979). The current status of imazalil: A post harvest fungicide for citrus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, **92**, 37-43.
52. Karanasios E., Tsiropoulos N. G., Karpouzas D. and Ehaliotis C. (2010). Degradation and Adsorption of Pesticides in Compost-Based Biomixtures

- as Potential Substrates for Biobeds in Southern Europe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 9147-9156.
53. Karanasios E., Tsiropoulos N. G., Karpouzas D. G. and Menkissoglu-Spirodi U. (2010). Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: Evaluation for use in biobed systems. *Chemosphere*, **80**, 914-921.
  54. Karas P.A., Perruchon C., Exarhou K., Ehalotis C. and Karpouzas D.G. (2011). Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. *Biodegradation*, **22**, 215-228.
  55. Karpouzas D. and Singh B. K. (2006). Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis. *Advances in Microbial Physiology*, **51**, 119-185.
  56. Kersten, P.J., Kalyanaraman, B., Hammel, K.E., and Reinhammar, B. (1990). vol 268, pp. 475-480.
  57. Kirk T. K. and Farrell R. L. (1987). Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annual Reviews of Microbiology*, **41**, 465-505.
  58. Kirk T.K., Tien M., Kersten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E. and Farrell R.L. (1990). Lignin peroxidase from Fungi: *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, **188**, 159-171.
  59. Knapp J.S., Vantoch-Wood E.J. and Zhang F. (2001). Use of wood-rotting fungi for the decolorization of dyes and industrial effluents. In: Fungi in Bioremediation. Gadd M.G. (ed.), Cambridge University Press, 241-304.
  60. Kodama S., Yamamoto A., Ohura T., Matsunaga A. and Kanbe T. (2003). Enantioseparation of imazalil residue in orange by Capillary Electrophoresis with 2-hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin as a chiral selector. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **51**, 6128-6131.
  61. Kotterman, M. J. J.; Vis, E. H.; Field, J.A. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera sp.* Strain BOS55 and indigenous microflora. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2853-2858.
  62. Kravvariti K., Tsiropoulos N. G. and Karpouzas D. (2010). Degradation and adsorption of terbuthylazine and chlorpyrifos in biobed biomixtures



- from composted cotton crop residues. *Pest Management Science* **66**, 1122-1128.
63. Kulikova N.A., Klein O.I., Stepanova E.V., and Koroleva O.V. (2011). Review: Use of Basidiomycetes in Industrial Waste Processing and Utilization Technologies: Fundamental and Applied Aspects. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **47**, 565-579.
64. 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.
65. Kummar, R., Singh, S., and Singh, O.V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology* **35**, 377-391.
66. Lettera V., Del Vecchio C., Piscitelli A. and Sannia G. (2011). Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: The case of leccase in *Pleurotus ostreatus*. *C.R. Biologies*, **334**, 781-788.
67. Maloney S.E. (2001). Pesticide degradation. In: *Fungi in Bioremediation*. Gadd M.G. (ed.), Cambridge University Press, 188-223
68. Mari M., Bertolini P. and Pratella G.C. (2003). Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases: a review. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 761-766.
69. 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.
70. Mason, P.J.; Foster, I.D.L.; Carter, A.D.; Walker, A.; Higginbotham, S., Jones, R.L.; Hardy, I.A.J. Relative importance of point source contamination of surface waters: river Cherwell catchment monitoring study. In *XI Pesticide Chemistry Conference*, Cremona, Italy, Sept. 1999; La Goliardica Pavese: Pavia, Italy, 1999; pp 405-412.
71. 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.

72. Mougin C., Pericaud C., Malosse C., Laugero C. and Asther M. (1996). Biotransformation of the insecticide lindane by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Pesticide Science*, **47**, 51-59.
73. Muto N., Hirai H., Tanaka T., Itoh N. and Tanaka K. (1997). Induction and inhibition of cytochrome P450 isoforms by imazalil, a food contaminant, in mouse small intestine and liver. *Xenobiotica*, **27**, 1215-1223.
74. Nakagawa Y. and Moore G.A. (1995). Cytotoxic effects of post-harvest fungicides, ortho-phenylphenol, thiabendazol and imazalil, on isolated rat hepatocytes. *Life Sciences*, **57**, 1433-1440.
75. Nunes C., Usall J., Teixido N. and Vinas I. (2001). Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology*, **70**, 53-61.
76. Omirou M, Dalias P., Costa C., Papastefanou C., Dados A., Ehaliotis C., Karpouzas D.G., (2012) Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production industry: laboratory, column and field studies. *Environmental Pollution* 166, 31-39
77. Orтели D., Edder P. and Corvi C. (2005). Pesticide residues survey in citrus fruits. *Food Additives and Contaminants*, **22**, 423-428.
78. Philips, Roger (2006). Mushrooms. Pub. McMillan, ISBN 0-330-44237-6.
79. Philp C.J., Bamforth M.S., Singleton I. and Atlas M.R. (2005). Environmental pollution and restoration: a role for bioremediation. In: *Bioremediation: Applied microbial solution for real-world environmental cleanup*. Atlas M.R. and Philp J. (ed), ASM press Washington, 1-48.
80. Pointing S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**, 20-33.
81. Quintanar, L., Stoj, C., Taylor, A.B., Hart, P.J., Kosman, D.J., AND Solomon, E.I. (2007). *Acc. Chem. Res.*, vol. **277**, no 40, pp. 37663-37669.
82. Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V., and Kondrashchenko, V.I., (2001). Drevesina i razrushayushchie ee griby (Wood and Wood-Degrading Fungi), Moscow: Nauka

83. Ramwell, C.T.; Johnson, P.D.; Boxal, A.B.A.; Rimmer, D.A. (2004) Pesticide residues on the external surfaces of field-crop sprayers: environmental impact. *Pest Management Science* **60**, 795-802.
84. Reddy C.A. (1995). The potential for white rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, **6**, 320-328.
85. 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.
86. Ritenour M.A., Zhang J., Wardowski F.W. and Brown G.E. Postharvest Decay Control Recommendations for Florida Citrus Fruit. University of Florida IFAS extension, circular 359A.
87. Routledge E.J., Sumpter J.P. (1997). Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 3280-3288.
88. Ruiz-Duenas, F.J. and Martinez, A.T. (2009). *Microbiology Biotechnology* **2**, 164-177.
89. Screpanti C., Accinelli C., Vicari A., Catizone P. (2005) Glyphosate and glufosinate-ammonium runoff from a corn-growing area in Italy, *Agronomy for Sustainable Development* **25**, 407-412.
90. Serguei L., Timofeevski N., Reading S. Aust, S.D. (1998). Mechanisms for Protection against Inactivation of Manganese Peroxidase by Hydrogen Peroxide 1. *Biochemistry and Biophysics*, **356**, 287-295.
91. Shah M.M., Barr D.P., Chung N. Aust S. D. (1992). Use of white rot fungi in the degradation of environmental chemicals. *Toxicology Letters*, **64/65**, 493-501.
92. Siegel, M.R., A. Kerkenaar and A.K. Sijpesteijn (1977). Anti-fungal activity of the systemic fungicide imazalil. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **83**, 121-133.
93. 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.

94. 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.
95. Sisman T. and Turkez H. (2010). Toxicologic evaluation of imazalil with particular reference to genotoxic and teratogenic potentials. *Toxicology and Industrial Health*, **26**, 641-648.
96. Tanaka T. (1995). Reproductive and neurobehavioural toxicity study of imazalil administered to mice. *Reproductive Toxicology*, **9**, 281-288.
97. Tani S., Yonezawa Y., Morisawa S. and Nishioka H. (2007). Development of a new *E. coli* strain to detect oxidative mutation and its application to the fungicide o-phenylphenol and its metabolites. *Mutation Research*, **628**, 123-128.
98. Torstenson, L. Experiences of biobeds in practical use in Sweden. (2000). *Pesticide Outlook*, **11**, 206-212.
99. Torstenson, L.; Borjesson, E. Elvarmd biobadd skyddar grundvatten vid vaxthuset. (2002). *Fakta Tradgard 1*; Swedish University of Agricultural Sciences: Uppsala, Sweden.
100. Torstenson, L.; Castillo M.d.P. (1997). Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spraying equipment. *Pesticide Outlook*, **8**, 24-27.
101. Torstenson, L.; Castillo, M.d.P. (1996). Biobeds minimize environmental risks when filling agricultural spraying equipment. Proceedings of the COST 66 Workshop, Stratford on Avon, May 13-15, U.K.; pp 223-224.
102. Torstensson, L. (1996) Herbicides in the environment. *Proceedings of the Second International Weed Control Congress*, Copenhagen, Denmark, 25-28 June, Vol. 1-4, 267-274.
103. Tortella R. G. and Diez M. C. (2005). Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. *Critical Reviews in Microbiology*, **31**, 197-212.
104. Trevisan ,M., Capri, E., Fait, G., Merli, A. (2007). An improved prototype of biomassbed, Preliminary evaluation in lab conditions. In: 2<sup>nd</sup> European Biobed Workshop, Ghent, Belgium.

105. U.S. Environmental Protection Agency, EPA. Registration Eligibility Decision for 2-phenylphenol and Salts (Orthophenylphenol or OPP). 739-R-06-004, July 2006.
106. U.S. Environmental Protection Agency, EPA. Registration Eligibility Decision for imazalil (IMZ). 738-F-04-011, February 2005.
107. Vaugan, D.; Cheshire, M. V.; (1994) Ord, B. G. Exudation of peroxidase from roots of *Festuca rubra* and its effects on exuded phenolic acids. *Plant Soil*, **164**, 153-155.
108. Vingaard A.M., Hnida C., Breinholt V. and Larsen J.C. (2000). Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, **14**, 227-234.
109. Vischetti C., Coppola L., Monaci E., Cardinali A. and Castillo M.d.P. (2007). Microbial impact of the pesticide chlorpyrifos on Swedish and Italian biobeds. *Agronomy for Sustainable Development* **27**, 267-272.
110. von Wiren-Lehr, S.; Castillo, M.d.P; Torstensson, L.; Scheunert, I. (2001). Degradation of isoproturon in biobeds. *Biology and Fertility of Soils* **33**, 535-540.
111. 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.
112. Wong, D.W.S. (2009). Structure and Action Mechanism of Lignolytic Enzymes. *Enzymes Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol **157**, pp. 174-209.
113. Xu, F. and Shin, W., Brown, S.H., Wahleithner J.A., Sundaram U.M., Solomon, E.I. (1996), Targeted Mutations in a *Trametes villosa* Laccase axial perturbations of the T1 copper. *Biochim. Biophys. Acta*, vol **1292**, no 2, pp. 303-311.
114. Youn, H.-D., Kim, K.-J., Maeng, J.-S., Han, Y.H., Jeong, I.-B., Jeong, G., Kang, S.-O., and Hah, Y.C. (1995). Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* *Archives in Microbiology* **141**, 393-398.

115. 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.
116. Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α. (2007). Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, φυσιολογία, μηχανισμοί δράσης και χρήσεις των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, Αθήνα.
117. <http://database.portal.modwest.com>