



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

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

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**“Αποδόμηση του μυκητοκτόνου *ortho-phenylphenol* σε εξαντλημένο
υπόστρωμα μανιταριών από τα βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas*
azelaica PHB-1 και *Pseudomonas stutzeri* OPP26”**

MANIKA ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

Λάρισα 2013

“Αποδόμηση του μυκητοκτόνου *ortho-phenylphenol* σε εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών από τα βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas azelaica* PHB-1 και *Pseudomonas stutzeri* OPP26”

Υπεύθυνος Καθηγητής

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

Τριμελής Επιτροπή:

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

Ευχαριστίες

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

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Chiara Perruchon για την συνεχή επίβλεψη και βοήθεια που μου παρείχε πρόθυμα στα διάφορα πειραματικά στάδια.

Ακόμη, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Κιρά Παναγιώτη που μου παρείχε πληροφορίες σχετικές με το θέμα της εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, για την αρμονική συνεργασία καθόλη τη διάρκεια της παραμονής μου σ' αυτό.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μυκητοκτόνο *ortho-phenylphenol* (OPP) χρησιμοποιείται μετασλλεκτικά σε συσκευαστήρια φρούτων, για την προστασία από μυκητολογικές προσβολές. Η εφαρμογή του οδηγεί στην παράγωγη σημαντικού όγκου υγρών αποβλήτων που χρήζουν επεξεργασία στον τόπο παραγωγής. Οι βιοκλίνες έχουν προταθεί ως συστήματα επεξεργασία των συγκεκριμένων αποβλήτων. Εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών (EYM) είτε αυτούσιο είτε σε μίγματα με έδαφος και άχυρο χρησιμοποιούνται ως πληρωτικά υλικά σε βιοκλίνες στην Ελλάδα. Το υλικό αυτό με την ολοκλήρωση της λειτουργία της βιοκλίνης είναι πιθανό να περιέχει ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις OPP καθιστώντας το τοξικό στερεό απόβλητο που χρήζει αποτοξικοποίησης. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η εφαρμογή βιολογικού εμπλουτισμού σε EYM το οποίο απομακρύνθηκε από μινι-βιοκλίνες και ήταν επιβαρυνμένο με συγκεντρώσεις OPP που κυμαίνονταν από 120000 mg/kg (υψηλό επίπεδο) ως 350 mg/kg (χαμηλό επίπεδο) με τα βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas stutzeri* OPP26 και *Pseudomonas azelaica* PHB-1. Τα συγκεκριμένα στελέχη έχουν την ικανότητα να αποδομούν ταχύτατα το OPP. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δύο βακτήρια ήταν ικανά να επιταχύνουν την αποδόμηση του OPP μόνο στο EYM που ήταν επιβαρυνμένο με χαμηλότερα επίπεδα OPP ενώ δεν παρατηρήθηκε επιτάχυνση της απομάκρυνσης του OPP στο EYM που ήταν επιβαρυνμένο με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις OPP. Εκ των δύο βακτηρίων που αξιολογήθηκαν το *P. azelaica* PHB-1 παρουσίασε μια πιο αποτελεσματική και ταχύτερη απομάκρυνση του OPP. Γενικότερα παρατηρήθηκε μια σχετικά ταχεία μείωση του φορτίου του OPP και στα δύο επίπεδα συγκέντρωσης στα δείγματα EYM που δεν εμβολιάστηκαν με βακτήρια καταδεικνύοντας την περιορισμένη υπολειμματικότητα του OPP στο περιβάλλον και την ικανότητα της ενδογενούς μη εξειδικευμένης μικροβιακής κοινότητας του EYM να αποδομεί το OPP. Συνοπτικά, η χρήση του βιολογικού εμπλουτισμού είναι εφαρμόσιμη σε οργανικά υποστρώματα επιβαρυνμένα με σχετικά υψηλό φορτίο OPP (<350 mg/kg) μόνο εάν υπάρχει πίεση χρόνου για γρήγορη αποτοξικοποίηση του υλικού. Σε αντίθετη περίπτωση η επώαση του υποστρώματος σε συνθήκες βέλτιστες για μικροβιακή διάσπαση (25°C και υψηλή υγρασία) αναμένεται να οδηγήσει σε σταδιακή απομάκρυνση του OPP χωρίς την προσθήκη εξωγενών μικροοργανισμών.

ABSTRACT

The fungicide *ortho-phenylphenol* (OPP) is used extensively in postharvest fruit packaging plants to protect fruits from fungal infestations during storage. The application of OPP leads to the production of large volumes of wastewater requiring treatment on-site. Biobeds have been proposed as a possible mean of wastewater detoxification. Spent mushroom substrate (SMS) either alone or in mixtures with soil and straw are used as packing material in biobeds in Greece. Upon completion of the operation of biobeds the packing substrate may contain particularly high concentrations of OPP making it a toxic solid waste requiring detoxification. In this study, the application of bioaugmentation of SMS which was removed from mini-biobeds and was contaminated with OPP concentrations ranging from 120000 mg / kg (high level) to 350 mg / kg (low level) was assessed using two OPP-degrading bacteria strains, *Pseudomonas stutzeri* OPP26 and *Pseudomonas azelaica* PHB-1. The results showed that both bacteria were capable of accelerating the degradation of OPP only in SMS that was contaminated with the lower levels of OPP while no acceleration of OPP degradation was observed in SMS samples contaminated with high OPP levels. Of the two bacteria assessed, *P. azelaica* PHB-1 showed a more efficient and faster removal of OPP. Generally there was a relatively rapid reduction of the load of OPP in both concentration levels at SMS samples not inoculated with bacteria indicating the low persistence of OPP and the ability of the indigenous non-specific microbial community of SMS to degrade OPP. Overall, the use of bioaugmentation of OPP (<350 mg / kg) is a possible solution only when rapid rapid detoxification is required. Otherwise, the incubation of the substrate in optimal conditions for microbial degradation (25⁰C and high humidity) should lead to a gradual removal of OPP without the addition of exogenous microorganisms.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1.Περιβαλλοντική ρύπανση από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων-μετασυλλεκτική μεταχείριση.....	7
1.2. Βιολογική Απορρύπανση.....	9
1.3. Βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i> sp. στην μικροβιακή αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων.....	10
1.4. <i>Ortho</i> -phenylphenol (OPP).....	10
1.4.1. Χρήσεις.....	10
1.4.2. Τοξικότητα.....	11
1.4.3. Περιβαλλοντική τύχη και μικροβιακός μεταβολισμός OPP.....	11
1.4.4. Αποδόμηση υδρογονανθράκων.....	12
1.5. Εξαντλημένο Υπόστρωμα Μανιταριών (Spent Mushroom Substrate).....	15
1.6. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας.....	16

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
2.1. Γεωργικά φάρμακα.....	17
2.2.Παρασκευή υδατικού διαλύματος <i>ortho</i> -phenylphenol.....	17
2.3. Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.....	17
2.3.1.Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (<i>MSM+N</i>).....	18
2.3.2. Παρασκευή θρεπτικού μέσου <i>LB</i> (<i>Luria Bertani</i>).....	19
2.4. Ανάλυση και προσδιορισμός υπολειμμάτων OPP σε σύστημα HPLC.....	19
2.5. Βακτηριακά στελέχη που αξιολογήθηκαν.....	20
2.6.. Προετοιμασία βακτηριακού εμβολίου.....	20
2.7. Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας.....	21

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	23
3.1 Αποδόμηση του OPP στο ΕΥΜ ύστερα από εμβολιασμό με τα βακτηριακά στελέχη <i>P.azelaica</i> PHB1 και <i>P.stutzeri</i> OPP26.....	23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	26
------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	28
----------------------	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	29
--------------------------	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Περιβαλλοντική ρύπανση από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων-μετασυλλεκτική μεταχείριση

Πολλές από τις σύγχρονες τεχνολογίες έχουν βελτιώσει το βιοτικό επίπεδο και την ποιότητα ζωής του ανθρώπου. Η αύξηση της γεωργικής και βιομηχανικής παραγωγής βοηθά σε πολλούς τομείς τον άνθρωπο, όμως έχουν και παρενέργειες που δύσκολα μπορούν να αγνοηθούν και να προβλεφθούν (Τσιούρης, 2004).

Με την έλευση του 21ου αιώνα, έχουμε επίγνωση των επικίνδυνων ουσιών που χρησιμοποιούνται και παράγονται από τις χημικές διεργασίες. Οι τεχνολογικές εξελίξεις σχετικές με την επεξεργασία υδάτων, τις μεθόδους διάθεσης των αποβλήτων, τα γεωργικά φάρμακα και μυκητοκτόνα, τα πολυμερή, τα απορρυπαντικά, τα πρόσθετα πετρελαίου συνέβαλαν στη βελτίωση της ποιότητας της ζωής μας. Αλλά όλες αυτές οι εξελίξεις έρχονται με το τίμημα της ρύπανσης (Sharma et al., 2008).

Ειδικά στην περιοχή της Θεσσαλίας το πρόβλημα από την αλόγιστη χρήση των γεωργικών φαρμάκων είναι πιο ανησυχητικό καθώς η έντονη γεωργική δραστηριότητα στον θεσσαλικό κάμπο οδηγεί σε επιβάρυνση των φυσικών υδάτινων πόρων της περιοχής με γεωργικά φάρμακα και λιπάσματα. Η εκτεταμένη παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γεωργικών φαρμάκων στα νερά επιφανειακών υδατικών συστημάτων της Θεσσαλίας όπως ο ποταμός Πηνειός έχει διαπιστωθεί από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία έτη στην περιοχή (Bellos and Sawidis, 2005, Fytianos et al., 2006). Ερευνητικά δεδομένα της τελευταίας εικοσαετίας καταδεικνύουν τη σημαντική συμβολή των σημειακών πηγών στη ρύπανση των φυσικών υδροφόρων συστημάτων από γεωργικά φάρμακα (Helweg et al., 2002). Η σημειακή ρύπανση από γεωργικά φάρμακα προκύπτει από μη ορθολογικούς χειρισμούς των αδιάθετων πλεοναζόντων ψεκαστικών υγρών, ατυχήματα ή διαρροές κατά την προετοιμασία του ψεκαστικού υγρού ή σε απόνερα από το πλύσιμο των ψεκαστικών μηχανημάτων (Castillo et al., 2008).

Εκτός των παραπάνω, η μετασυνλεκτική εφαρμογή μυκητοκτόνων στα συσκευαστήρια φρούτων οδηγεί στην παραγωγή μεγάλων όγκων υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων μυκητοκτόνων και η απόρριψη τους στο περιβάλλον χωρίς προηγούμενη αποτοξικοποίηση αποτελεί σημαντική πηγή σημειακής ρύπανσης για τα επιφανειακά υδροφόρα συστήματα περιοχών με έντονη μετασυνλεκτική δραστηριότητα. Έτσι, σε συσκευαστήρια εσπεριδοειδών εφαρμόζεται στα φρούτα το μυκητοκτόνο *ortho*-phenylphenol με σκοπό να συντηρηθούν παραπάνω στους χώρους αποθήκευσής τους μέχρι την κατανάλωσή τους. Πιο συγκεκριμένα τα φρούτα συλλέγονται και πριν τοποθετηθούν στα ψυγεία για τη συντήρησή τους είτε εμβαπτίζονται σε δεξαμενές που περιέχουν πυκνά υδατικά διαλύματα με το εν λόγω μυκητοκτόνο είτε τοποθετούνται σε λωρίδες και δέχονται εφαρμογή από ειδικό ψεκαστικό μηχάνημα με διάλυμα OPP. Τα υγρά απόβλητα που απορρέουν από την επιφάνεια των φρούτων περιέχουν σημαντικές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου OPP και συχνά απορρίπτονται σε παρακείμενους αγρούς ή χείμαρρους χωρίς καμία προηγούμενη επεξεργασία για μείωση του φορτίου του μυκητοκτόνου. Η απόρριψη των συγκεκριμένων αποβλήτων στο έδαφος αλλά και σε παρακείμενα υδροφόρα συστήματα αλλά ακόμη και στο σύστημα βιολογικού καθαρισμού των αστικών κέντρων αποτελεί σημαντικό πρόβλημα και αποτελεί επιτακτική ανάγκη, σύμφωνα και με τις επιταγές της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η δημιουργία τοπικών μονάδων επεξεργασίας των συγκεκριμένων υγρών αποβλήτων.

Παρά την άμεση ανάγκη για επεξεργασία των αποβλήτων που παράγονται από τα συσκευαστήρια φρούτων δεν έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί συστήματα επεξεργασίας των αποβλήτων αυτών. Προηγούμενες μελέτες οδήγησαν στην ανάπτυξη ενός συστήματος που στηρίζεται στην χρήση φίλτρων ενεργού άνθρακα για την απομάκρυνση του thiabendazole από τα υγρά απόβλητα (Garcia Portillo et al. 2004). Παρά την αποτελεσματικότητα του το υψηλό κόστος του συγκεκριμένου συστήματος δεν ενδείκνυται για χρήση στα Ελληνικά συσκευαστήρια. Η μόνη άλλη περίπτωση που έχει εξεταστεί μέχρι σήμερα είναι η δημιουργία φίλτρων από τύρφη, άργιλο, κοπριά και δολομιτική άμμο που είχε ενθαρρυντικά αποτελέσματα αλλά δεν μπορεί να διαχειριστεί μεγάλους όγκους νερού όπως και απαιτείται (Flaim and Toller 1989). Αναζητείται λοιπόν μια φιλική περιβαλλοντικά μέθοδος και χαμηλού κόστους για την επεξεργασία των εν λόγω αποβλήτων. Ως τέτοια προτάθηκε η χρήση των βιοκλινών με κατάλληλες προσαρμογές (Karanasios et al., 2012). Οι βιοκλίνες είναι απλά και χαμηλού κόστους συστήματα που αποτελούνται από ένα όρυγμα βάθους

0.5-1 m και επιφάνειας που ποικίλει (10-35 m²) το οποίο μπορεί να είναι πλήρως μονωμένο στον πυθμένα και πληρούται με οργανικά υποστρώματα που ονομάζονται βιομίγματα (Castillo et al. 2008). Η αποτελεσματικότητά τους στηρίζεται στην ικανότητα του βιομίγματος να αποδομεί μικροβιακά ή να προσροφά ισχυρά τα γεωργικά φάρμακα. Η σύσταση των βιομιγμάτων διαφοροποιείται από περιοχή σε περιοχή ανάλογα με την διαθεσιμότητα σε οργανικά υλικά αλλά ως γενική αρχή περιλαμβάνει άχυρο – έδαφος – τύρφη ή κομποστοποιημένα υλικά σε ογκομετρικές αναλογίες 50 – 25 – 25%. Μελέτες στην Ελλάδα έδειξαν ότι βιομίγμα που αποτελείται από έδαφος – άχυρο και εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών (EYM) είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην αποδόμηση ποικιλίας γεωργικών φαρμάκων (Karanasios et al., 2010). Οι βιοκλίνες ως τώρα έχουν χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων που παράγονται στον αγρό. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι είναι δυνατή η χρήση τους στην επεξεργασία αποβλήτων από συσκευαστήρια εσπεριδοειδών με ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Omirou et al. 2012).

1.2 Βιολογική Απορρύπανση

Η βιολογική απορρύπανση (bioremediation) είναι η διαδικασία κατά την οποία μικροοργανισμοί ή ένζυμα που παράγουν αυτοί χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση ρύπων από επιβαρυνμένα περιβαλλοντικά υποστρώματα. Η διαδικασία της βιοαποδόμησης συμβάλλει στη διάσπαση μιας ουσίας σε απλούστερα προϊόντα που δεν αποτελούν στις περισσότερες περιπτώσεις περιβαλλοντικούς ρύπους (Aislabie & Loyd-Jones, 1995).

Σε γενικές γραμμές η περιβαλλοντική εξυγίανση επιτυγχάνεται είτε με τη μορφή της βιολογικής ενεργοποίησης όπως μέσω εφαρμογής θρεπτικών συστατικών (biostimulation), και αερισμό (biosparging), είτε με τη μορφή βιολογικού εμπλουτισμού με εμβολιασμό αποδομητικών μικροοργανισμών (bioaugmentation) (Iranzo et al., 2001). Έτσι η χρήση μικροοργανισμών ή των ενζύμων που παράγουν στην αποτοξικοποίηση γεωργικών φαρμάκων θεωρείται μία θεμιτή και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος απορρύπανσης (Lunt & Evans, 1970).

1.3. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* sp. στην μικροβιακή αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων

Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* sp είναι ραβδόμορφα, αρνητικά κατά Gram αερόβια βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια Pseudomonadaceae και κινούνται πολικά με ένα ή περισσότερα μαστίγια (Walker & Roberts, 1993). Βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* sp είναι κατεξοχήν κυρίαρχα στο εδαφικό περιβάλλον και υπεύθυνα για την αποδόμηση πλήθους ξενοβιοτικών ουσιών (Swetha et al., 2005). Στελέχη των ειδών *Pseudomonas stutzeri* και *Pseudomonas azelaica* έχουν απομονωθεί από διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα και έχει βρεθεί ότι έχουν ποικίλες αποδομητικές δυνατότητες έναντι διαφόρων οργανικών ρύπων. Ενδεικτικά βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στο είδος *P. stutzeri* είχαν την ικανότητα αποδόμησης του εντομοκτόνου beta-Cyfluthrin (Tandlich et al.2011) και του μυκητοκτόνου OPP (Kohler et al.,1988). Αντίστοιχα βακτηριακό στέλεχος του είδους *P. azelaica* είχε την ικανότητα να διασπά διάφορα φαινολικά παράγωγα και μεταξύ αυτών το 2,2-dihydroxybiphenyl (Wick & Gschwend 1998)

1.4 *Ortho*-phenylphenol (OPP)

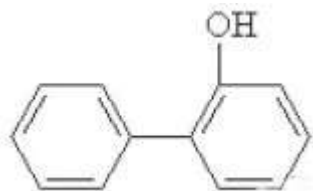
1.4.1. Χρήσεις

Το *Ortho*-phenylphenol χρησιμοποιείται ευρέως ως απολυμαντικό και συντηρητικό, καθώς και ως πρόσθετο στη σύνθεση βαφών, ρητινών και ελαστικών (Eckert 1977), και ως μυκητοκτόνο μετασυλλεκτικά για την προστασία των φρούτων από προσβολές κατά την αποθήκευση από μύκητες τους γένους *Penicillium* (EFSA 2008). Το μόριο του αποτελείται από δύο φαινολικούς δακτυλίους με ένα OH-υποκαταστάτη στην θέση 2 (*ορθό*-) του ενός εκ των δύο δακτυλίων. Εφαρμόζεται ως άλας νατρίου, SOPP (Sodium *Ortho* phenylphenol) στην επεξεργασία των φρούτων. Η εφαρμογή του γίνεται είτε με εμβάπτιση σε διάλυμα του μυκητοκτόνου είτε με ψεκασμό των φρούτων με υδατικά διαλύματα του μυκητοκτόνου (600 mg/L) τα οποία με την ολοκλήρωση της μεταχείρισης θα πρέπει να αποτοξικοποιηθούν πριν ελευθερωθούν στο περιβάλλον. Όπως γίνεται αντιληπτό η εφαρμογή του OPP στην μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων οδηγεί στην παραγωγή υγρών αποβλήτων με υψηλό φορτίο του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου τα οποία, χρήζουν επεξεργασίας σε τοπικό επίπεδο πριν την εφαρμογή τους στο περιβάλλον (EU 2008).

1.4.2. Τοξικότητα

Δεδομένα για την τοξικότητα του OPP σε ανώτερους οργανισμούς μπορούν να αντληθούν κυρίως από τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την έγκριση χρήσης του στην Ευρωπαϊκή Ένωση (EFSA 2008). Έτσι γενικότερα το OPP παρουσιάζει χαμηλή οξεία και χρόνια τοξικότητα σε θηλαστικά και πουλιά ενώ αντίθετα εμφανίζει σχετικά υψηλή χρόνια και οξεία τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς (άλγη, ψάρια, ασπόνδυλα). Έτσι οι τιμές LC₅₀ για ψάρια (*Onchorychus mykiss*) ήταν 4 mg/L ενώ οι τιμές EC₅₀ για άλγη και ασπόνδυλα (*Daphnia magna*) ήταν 1,35 και 2,42 mg/L αντίστοιχα. Παρόμοια υψηλή χρόνια τοξικότητα του OPP παρατηρήθηκε σε ψάρια (NOEC 21d 0,036 mg/L) και ασπόνδυλα (NOEC 28d, *Chironomus* sp. 1,85 mg/L). Το OPP εμφανίζει μέτρια τοξικότητα στους γαιοσκώληκες (LC₅₀ = 99,1 mg/kg έδαφος) και σχετικά υψηλή τοξικότητα στους μικροοργανισμούς της λυματολάσπης (3 hr IC₅₀ = 56 mg/L) (EFSA 2008)

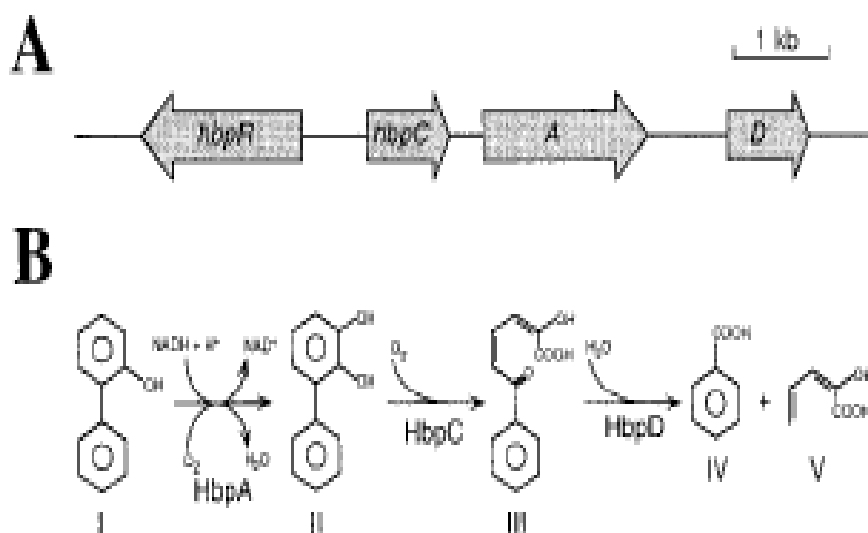
1.4.3. Περιβαλλοντική τύχη και μικροβιακός μεταβολισμός OPP



Εικόνα 1.1: Χημικός τύπος του orthophenylphenol

Προηγούμενες μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το βακτήριο *Pseudomonas azelaica* HBP1 έχει την ικανότητα να μεταβολίζει ταχύτατα το OPP μέσω ενός *meta*-μονοπατιού με τελική παραγωγή απλούστερων οργανικών ενώσεων που αποτελούσαν πηγή C για το συγκεκριμένο βακτήριο (Wick & Gschwend., 1998). Ο αρχικός μεταβολισμός των ενώσεων αυτών καταλύεται μέσω τριών δομικών γονιδίων *hpbA*, *hpbC* και *hpbD*, που κωδικοποιούν τα ένζυμα HPBA, HPBC και HPBD, και ενός ρυθμιστικού γονιδίου *hpbR* (Jaspers et al, 2000). Ως ρυθμιστής κλειδί του μεταβολικού μονοπατιού δρα η πρωτεΐνη HPBB (Jaspers et al, 2000). Το ένζυμο HPBA καταλύει την εξαρτώμενη από NADH υδροξυλίωση, μέσω της ορθο-οδού, του OPP προς 2,3-dihydroxybiphenyl (Kohler et al. 1988, Kohler et al. 1993).

Ακολουθώς, το HBPC, καταλύει μέσω του meta-μονοπατιού τη διάσπαση προς 2-hydroxy-6-oxo-6-phenyl-2,4-hexadienoic acid (Kohler et al.,1993; Schmid,1997). Η τελευταία ένωση υδρολύεται μέσω της μετα- οδού από το ένζυμο HbPD προς 2-hydroxy-2,4-pentadienoic acid και τελικά σε βενζοϊκό οξύ (Kohler et al., 1993). Το τελευταίο μετατρέπεται περαιτέρω από μια διοξυγενάση σε κατεχόλη (Εικόνα 1.2), η οποία είναι το υπόστρωμα για την συνέχεια της meta-διασπάσεως (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.2: Α. Γενετική οργάνωση των γονιδίων *hpbA*, *hpbC* και *hpbD*.

Β. Μεταβολισμός του OPP από το *P. azelaica* και τα ένζυμα που παίρνουν μέρος στη διάσπαση.

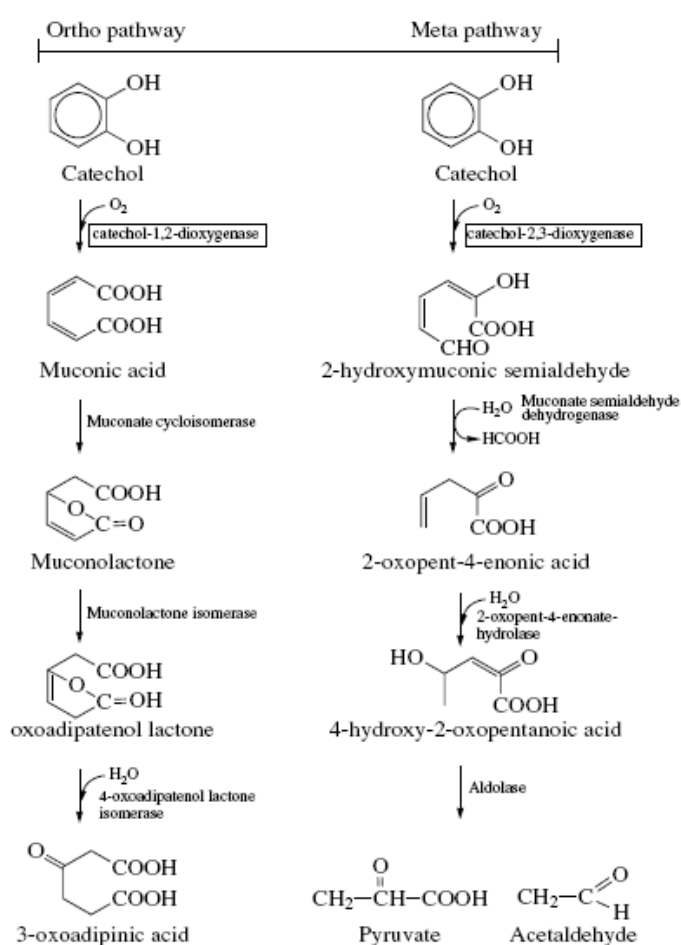
1.4.4. Αποδόμηση υδρογονανθράκων

Οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες συμπεριλαμβανομένου και του OPP, αποτελούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρύπους λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας τους που τους καθιστά ελάχιστα βιοδιαθέσιμους στο περιβάλλον αλλά και ιδιαίτερα ανθεκτικούς στην μικροβιακή διάσπαση. Ανάλογα με τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση των αρωματικών υδρογονανθράκων το μονοπάτι μεταβολισμού τους διαχωρίζεται σε δύο στάδια:

Ανώτερο Στάδιο (Upper pathway): Συμμετέχουν ένζυμα με εξειδίκευση προς τα ξενοβιοτικά μόρια που τα αναγνωρίζουν και τα μετατρέπουν σε ουσίες που διασπώνται μικροβιακά με ευκολία. Σημαντικά ένζυμα για τη μικροβιακή διάσπαση ξενοβιοτικών μορίων είναι οι διοξυ- ή μονοοξυγενάσες. Τα ένζυμα που συμμετέχουν

σε αυτό το στάδιο οδηγούν στην τελική παραγωγή διυδροξυλιωμένων παραγώγων όπως η κατεχόλη, τα οποία διασπώνται περαιτέρω μέσω του επόμενου σταδίου.

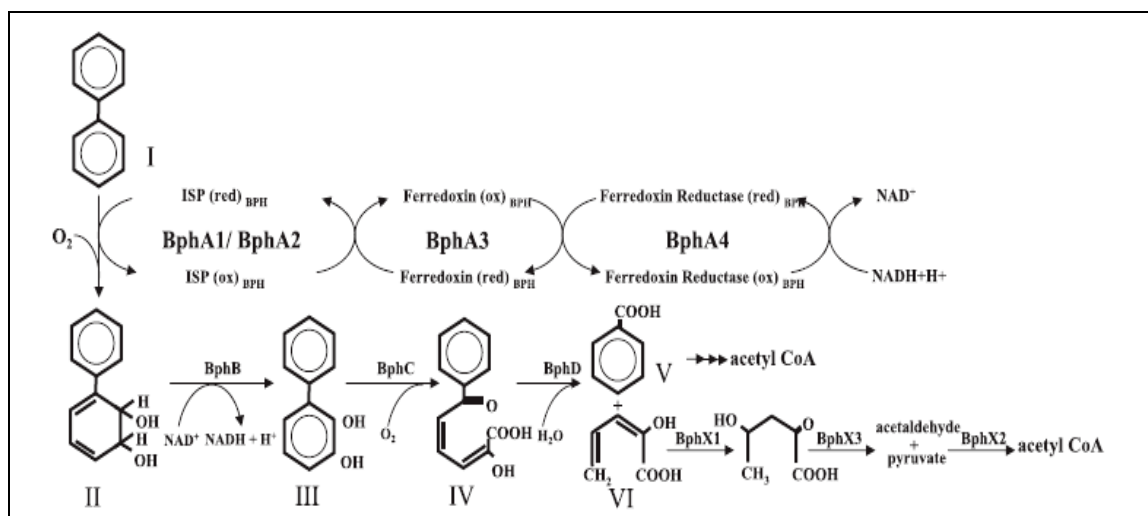
Μονοπάτι διάσπασης δακτυλίου (Ring cleavage pathway): Συμμετέχουν ένζυμα που είναι συνήθως κοινά στο μεταβολισμό πολλών διαφορετικών ξενοβιοτικών μορίων και δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη εξειδίκευση. Στο συγκεκριμένο στάδιο λαμβάνει χώρα η διάσπαση του δακτυλίου της κατεχόλης μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών, *ortho* ή *meta* ανάλογα με το αν η διάσπαση του δακτυλίου ξεκινά από την *ortho* ή *meta* θέση, ως προς τα υδροξύλια του δακτυλίου (Εικ.1.3)



Εικόνα 1.3. Το δεύτερο στάδιο μεταβολισμού των αρωματικών υδρογονανθράκων όπου παρουσιάζεται η διάσπαση της κατεχόλης μέσω του *ortho* ή του *meta* μονοπατιού.

Ο καταβολισμός υποκατεστημένων διφαινυλίων έχει συγκεντρώσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω κυρίως των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCBs) που είναι

ιδιαίτερα υπολειμματικοί ρυπαντές (Furukawa & Fujiwara, 2008). Τα υποκατεστημένα διφαινύλια μεταβολίζονται με την βοήθεια διοξυγενασών σε κατεχόλες που διασπώνται παραπέρα ανάλογα με το είδος των υποκαταστατών τους ακολουθώντας το *ortho* ή το *meta* μονοπάτι. Μέχρι σήμερα έχει απομονωθεί μεγάλος αριθμός βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να διασπούν τα PCBs και γενικότερα διφαινύλια σύμφωνα με το γενικό μονοπάτι που περιγράφεται στην Εικόνα 1.4.



Εικόνα 1.4: Το ανώτερο μονοπάτι μεταβολισμού του διφαινυλίου και τα ένζυμα/γονίδια που εμπλέκονται στη διάσπαση.

1.5. Εξαντλημένο Υπόστρωμα Μανιταριών (Spent Mushroom Substrate)

Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στην ορθή χρήση και διάθεση των οργανικών υπολειμμάτων (των δασών, της γεωργίας, βιομηχανικά κ.α.) Αυτά τα υλικά μπορούν να θεωρηθούν ως ανανεώσιμες πηγές που συμβάλλουν στην επίλυση των περιβαλλοντικών προβλημάτων που προκύπτουν από την ανεξέλεγκτη συσσώρευση τους. Το εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών (EYM) είναι το οργανικό υλικό που παραμένει μετά από μια καλλιέργεια των μανιταριών αφότου γίνει η συγκομιδή. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα αποτελεί ένα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και οργανική ουσία υλικό το οποίο είναι αποικισμένο από τους εδωδιμους μύκητες όπως ο *Pleurotus ostreatus*. Ο τελευταίος αποτελεί έναν από τους πιο αποτελεσματικούς μύκητες στον μεταβολισμό οργανικών ρύπων και δη γεωργικών

φαρμάκων (Karas et al., 2011). Λόγω των φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών το EYM μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες άλλες γεωργικές πρακτικές (Wuest et al., 2004). Ήδη έχει γίνει χρήση του EYM ως βιοκαύσιμο, ζωοτροφή καθώς και στη βιοαποκατάσταση του εδάφους. Η πιο κοινή χρήση του όμως είναι για τον εμπλουτισμό του εδάφους με οργανική ουσία. (Stewart et al., 1998).

Όπως είναι γνωστό, οι κύριες διαδικασίες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος, όπως η προσρόφηση, η κινητικότητα και η υποβάθμιση, σε μεγάλο βαθμό σχετίζονται με την περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία. Αυτό συμβαίνει ειδικά στην περίπτωση όπου τα γεωργικά φάρμακα είναι μη-ιοντικές υδρόφοβες ενώσεις με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Η προσρόφηση των ενώσεων αυτών σχετίζεται με την περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία, υπόψη ότι η κινητικότητα γενικότερα έχει σχέση με την περιεκτικότητα της διαλυμένης οργανικής ουσίας στο έδαφος (Kozak, 1996). Στην πραγματικότητα, η παρουσία των γεωργικών φαρμάκων στα υπόγεια ύδατα είναι πολύ συχνή (Palma et al., 2009), και αυτό προκαλεί σημαντικές περιβαλλοντικές ανησυχίες.

Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση της αδιάλυτης οργανικής ουσίας διαφορετικών οργανικών υπολειμμάτων, όπως λυματολάσπης, αστικών απορριμμάτων, δασών, ή αγρό-βιομηχανικών υποπροϊόντων (Delgado-Moreno et al 2004), και των διαλυμένων κλασμάτων οργανικής ουσίας (Barriuso et al. 2008), στην προσρόφηση και / ή την κινητικότητα των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η εφαρμογή EYM είχε επίδραση στην περιβαλλοντική τύχη επιλεγμένων μυκητοκτόνων. Σε έδαφος αμπελοκαλλιέργειας μελετήθηκε η προσρόφηση του penconazole και του metalaxyl, ύστερα από ενσωμάτωση EYM. Παρατηρήθηκε μείωση της κινητικότητας του metalaxyl (ιδιαίτερα υδατοδιαλυτό) και μια αύξηση της προσρόφησης του penconazole (πιο υδρόφοβο). Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να έχουν θετική επίδραση στην ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων νερών (Marin-Benito et al., 2009). Η επίδραση του EYM στην περιβαλλοντική τύχη των penconazole και metalaxyl μελετήθηκε και σε επίπεδο αγρού και έδειξαν ότι το EYM έχει ευεργετική επίδραση στην πρόληψη της ρύπανσης των υπόγειων υδάτων από τα μυκητοκτόνα (Marin-Benito et al., 2009). Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε έδαφος αμπελοκαλλιέργειας η ταυτόχρονη εφαρμογή του μυκητοκτόνου tebuconazole και

EYM είχε ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της έκπλυσης του μυκητοκτόνου στα υπόγεια ύδατα (Herrero-Hernandez et al. 2011). Η ενσωμάτωση EYM στο έδαφος οδήγησε σε μείωση στην κατακράτηση υδρόφοβων ενώσεων όπως τα linuron, diazinon και myclobutanil (Rodriguez-Cruz et al. 2012). Ακόμη πραγματοποιήθηκαν μελέτες, σχετικές με την επίδραση EYM στην διάσπαση και στο μεταβολισμό διάφορων άλλων οργανικών ρύπων όπως βενζόλιο (Semple, et al. 1998) και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) (Reid et al. 2002).

1.6. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας

Ο βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι ο έλεγχος της ικανότητας των βακτηριακών στελεχών *P.stutzeri* OPP26 και *P.azelaica* PHB1 να διασπούν υψηλές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου OPP το οποίο συσσωρεύτηκε σε υλικό EYM ύστερα από την διοχέτευση σε αυτού για μεγάλο χρονικό διάστημα υγρών αποβλήτων με υψηλές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου. Η δοκιμή αυτή έγινε ώστε να εξεταστεί εάν τα δυο συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απορρύπανση και αποκατάσταση στερεών οργανικών υποστρωμάτων όπως το EYM τα οποία χρησιμοποιούνται ως πληρωτικά υλικά είτε αυτούσια είτε σε ανάμιξη με έδαφος και άχυρο σε συστήματα βιοκλινών για την απορρύπανση υγρών αποβλήτων επιβαρυνμένων με γεωργικά φάρμακα. Τα συστήματα αυτά με την ολοκλήρωση της λειτουργίας τους περιέχουν ένα υλικό που πιθανό να έχει κατακρατήσει υψηλές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου και είναι μείωση του φορτίου τους πριν την εφαρμογή τους στο περιβάλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Γεωργικά φάρμακα

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

2.2. Παρασκευή υδατικού διαλύματος *ortho*-phenylphenol

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL τοποθετήθηκαν 0.01 g OPP και συμπληρώθηκε αποσταγμένο νερό ως τη χαραγή. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω είχαν αποστειρωθεί. Έπειτα το υδατικό διάλυμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 30 min για την επιτυχή διαλυτοποίηση του μυκητοκτόνου και διατηρήθηκε στους 4°C μέχρι την χρήση του.

2.3. Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των βακτηρίων ήταν το υπόστρωμα ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (*MSM+N Mineral Salts Medium supplemented with Nitrogen*) το οποίο αποτελεί εκλεκτικό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Για την επιβεβαίωση της αμιγότητας των βακτηριακών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο *LB* (*Luria Bertani*) ως γενικό και μη εκλεκτικό μέσο. Όλες οι προεργασίες έγιναν ασηπτικά σε θάλαμο νηματικής ροής και ακολούθησε αποστείρωση των διαλυμάτων στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Η προετοιμασία θρεπτικών μέσων που να περιέχουν OPP (20 µg/ml) βασίστηκε στην παρασκευή υδατικού διαλύματος OPP (100 mg/L) σε αποστειρωμένο νερό όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η περαιτέρω αποστείρωση των θερμικά ευαίσθητων υδατικών διαλυμάτων του OPP πραγματοποιήθηκε με διήθηση διαμέσου φίλτρου σύριγγας (Acrodisk Syringe Filters, 0.2µm HT Tuffryn Membrane).

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

Το θρεπτικό μέσο MSM+N περιείχε εκτός από C, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μικροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N). Αυτό έγινε ώστε το μυκητοκτόνο να αποτελεί τη μοναδική πηγή C για τους αναπτυσσόμενους μικροοργανισμούς. Το θρεπτικό αυτό διάλυμα παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα (Stock) ανόργανων αλάτων, τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες και έδωσαν το τελικό MSM+N (Πίνακας 2.1). Τα Stock 1 και 2 προετοιμάστηκαν με διάλυση των συστατικών τους σε 300 mL αποσταγμένο νερό και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Το Stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση από ειδικά φίλτρα επειδή ο FeSO_4 είναι θερμοευαίσθητος. Για την προετοιμασία 300 mL MSM+N, 30 mL από το stock 1 διαλύθηκαν σε 234 mL αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε εκ νέου. Μόλις το διάλυμα έφτασε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκαν ασηπτικά 30 mL stock 2 και 6 mL stock 3. Για την προετοιμασία θρεπτικού διαλύματος MSMN + OPP (20 mg/L) καθώς και των αντίστοιχων στερεών θρεπτικών μέσων πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί παραπάνω για την παρασκευή του όμως προστίθενται 60 mL υδατικού διαλύματος ortho-phenylphenol (100μg/mL) και 174 mL αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό στο μίγμα των τριών πυκνών διαλυμάτων.

Πίνακας 2.1: Συστατικά στοιχεία του θρεπτικού μέσου MSM+N

	Συστατικά	g/L
Stock 1	KH_2PO_4	22,7
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	59,7
	NH_4Cl	10,0
Stock 2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,2
Stock 3	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,96

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

Για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού μέσου LB, 10 g NaCl, 10 g καζεΐνης και 5 g yeast extract αραιώθηκαν σε 1 L απεσταγμένο νερό, αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min.. Για την προετοιμασία στερεού θρεπτικού μέσου LB, απλά προστέθηκαν στο 1L νερό και 15g άγαρ (1,5%) και τέλος ακολούθησε η επίστρωση τριβλίων.

2.4. Ανάλυση και προσδιορισμός υπολειμμάτων OPP σε σύστημα HPLC

Για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του OPP στις υγρές καλλιέργειες των βακτηριών και στο EYM, χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σύστημα HPLC Marathon III, που ήταν εξοπλισμένο με σύστημα αντλιών βαθμιδωτής έκλουσης, όγκο έγχυσης 20 μ L και ανιχνευτή UV, ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό Clarify® για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Ο διαχωρισμός του OPP έγινε σε στήλη αντίστροφης φάσης (RP) C18, Nucleosil (150 x 4.6 mm, 5 μ m id) (Macherey-Nagel GmbH, Germany) με ισοκρατική έκλουση με κινητή φάση 49% ACN: 50,5% H₂O: 0,5% NH₃ και ροή 1ml/min. Η ανίχνευση τους πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 254 nm. Ο χρόνος κατακράτησης του OPP ήταν 4,5 min. Για την προετοιμασία της κινητής φάσης για τη χρωματογραφική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν αμμωνία (NH₃), ακετονιτρίλιο (ACN) και νερό HPLC grade (Merck GmbH, Germany).

Η εκχύλιση του OPP από το EYM πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Ζυγίστηκαν 5 g EYM
- Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης Teflon και αναμίχθηκαν με 20 mL ακετονιτρίλιο.
- Οι πλαστικές φιάλες ανακινήθηκαν για 1 ώρα και 30 min σε μέτρια ταχύτητα και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 8 min σε 24000 στροφές/min.
- Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στην συνέχεια διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας σε μικρό γυάλινο φιαλίδιο (1,8 mL). Σε ορισμένα δείγματα, που κρίθηκε απαραίτητο εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης σε OPP, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις με ακετονιτρίλιο.
- Ακολούθησε ανάδευση σε vortex και κατόπιν ανάλυση των δειγμάτων σε σύστημα HPLC-UV.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του OPP, πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον λόγο αυτό, αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα OPP συγκέντρωσης 1000 µg/mL σε μεθανόλη. Ακολούθως, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 100, 10, 5, 2, 1, 0,5 και 0,1 µg/mL με διαδοχικές αραιώσεις σε μεθανόλη και έγινε έγχυση από κάθε ένα από τα πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC. Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών τους με την βοήθεια του λογισμικού Clarify®.

2.5. Βακτηριακά στελέχη που αξιολογήθηκαν

Τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν α) το στέλεχος *Pseudomonas stutzeri* OPP26 το οποίο είχε την ικανότητα να διασπά ταχύτατα το μυκητοκτόνο OPP και απομονώθηκε στα πλαίσια του διδακτορικού της Chiara Perruchon από δείγμα εδάφους που συλλέχθηκε από την περιοχή Αγιάς, Λάρισας, β) το στέλεχος *P. azelaica* PHB1 που είχε επίσης την ικανότητα να διασπά το OPP και αγοράστηκε από την τράπεζα μικροοργανισμών DSMZ (www.dsmz.org). Από stock γλυκερόλης των παραπάνω βακτηρίων προετοιμάστηκαν νέες καλλιέργειες των βακτηρίων σε γυάλινα φιαλίδια με 10 ml εκλεκτικού θρεπτικού μέσου MSMN+OPP (20mg/L) τα οποία επωάστηκαν σε αναδευόμενο επωαστικό θάλαμο στους 26°C και 180 στροφές/min για 4 μέρες.

2.6.. Προετοιμασία βακτηριακού εμβολίου

Αρχικά επιβεβαιώθηκε η ικανότητα των *P. stutzeri* OPP26 και *P. azelaica* PHB-1 να αποδομούν το μυκητοκτόνο OPP στο εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MSMN+OPP. Η αποδομητική ικανότητα του κάθε βακτηρίου ξεχωριστά επιβεβαιώθηκε με τη λήψη δειγμάτων από υγρές καλλιέργειες του βακτηρίου ανά τακτά χρονικά διαστήματα και την ανάλυση τους σε σύστημα HPLC. Παράλληλα επιβεβαιώθηκε η αμιγότητα των καλλιεργειών με επίστρωση σε τριβλία LB (δύο τριβλία για κάθε βακτήριο).

Ακολούθως ξεκίνησε η διαδικασία προετοιμασίας του βακτηριακού εμβολίου για τον εμβολιασμό των υποστρωμάτων που είχαν ρυπανθεί με το μυκητοκτόνο OPP. Έτσι από την αρχική καλλιέργεια των δύο βακτηρίων σε MSMN+OPP απομακρύνθηκαν 2 ml και εμβολιάστηκαν σε νέες καλλιέργειες (40 ml) του ίδιου

θρεπτικού μέσου. Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στην ανάδευση στους 26°C και 180 στροφές/min για 2 μέρες και όταν η αποδόμηση του OPP είχε ξεπεράσει το 50% της αρχικής ποσότητας η καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για εμβολιασμό των ρυπασμένων στερεών υποστρωμάτων όπως περιγράφεται παρακάτω. Το επίπεδο του βακτηριακού πληθυσμού που εμβολιάστηκε υπολογίστηκε με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων σε τριβλία LB.

2.7. Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας

Στα πλαίσια του πειραματισμού μελετήθηκε η ικανότητα των βακτηριακών στελεχών *P. stutzeri* OPP26 και *P. azelaica* PHB-1 να αποδομούν το μυκητοκτόνο OPP σε EYM το οποίο είχε απομακρυνθεί από σύστημα μίνι-βιοκλινών που χρησιμοποιούνταν για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων με υψηλές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου. Πιο συγκεκριμένα, το EYM που χρησιμοποιήθηκε απομακρύνθηκε από στήλες έκπλυσης (60 cm μήκους) που περιείχαν το EYM ως πληρωτικό υλικό. Οι στήλες έκπλυσης δέχτηκαν εφαρμογή διαλύματος OPP καθημερινά για διάστημα 2 μηνών με αποτέλεσμα την κατακράτηση υψηλών συγκεντρώσεων OPP από το EYM. Προηγούμενες μετρήσεις οι οποίες είχαν γίνει στα πλαίσια του διδακτορικού του κ. Παναγιώτη Καρά έδειξαν ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις OPP βρίσκονταν στο επιφανειακό ορίζοντα (0-20cm) και οι χαμηλότερες στο κατώτερο ορίζοντα (40-60cm).

Έτσι μελετήθηκε η ικανότητα των δύο βακτηρίων να διασπούν τα υπολείμματα του OPP που είχαν κατακρατηθεί στο EYM που πάρθηκε από τους δύο ορίζοντες των στηλών έκπλυσης: 0-20 cm και 40-60 cm. Αρχικά προσδιορίστηκε η υγρασία των δειγμάτων EYM από τους δύο ορίζοντες με ξήρανση δείγματος 10 g από κάθε ορίζοντα σε κλίβανο στους 110°C για 16 ώρες. Ακολούθως η υγρασία των δειγμάτων προσαρμόστηκε στο 70% της υδατοχωρητικότητας του EYM με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού. Ακολούθως τα δείγματα EYM από τους δύο ορίζοντες χωρίστηκαν σε τρία ίσα τμήματα. Τα δύο πρώτα εμβολιάστηκαν με 6 ml υγρής καλλιέργειας των *P. stutzeri* ($2,8 \times 10^7$ cfu/ml) ή *P. azelaica* ($5,2 \times 10^7$ cfu/ml) και το τρίτο δείγμα δέχθηκε την ίδια ποσότητα νερού χωρίς βακτήρια ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας. Αρχικά προετοιμάστηκε το μη εμβολιασμένο δείγμα και στην συνέχεια ακολούθησαν τα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή βακτηριακού εμβολίου ώστε να αποφευχθεί πιθανή επιμόλυνση του μάρτυρα. Όλα τα δείγματα αναμίχθηκαν καλά ώστε να υπάρξει ομοιόμορφη κατανομή του εμβολίου. Το κάθε

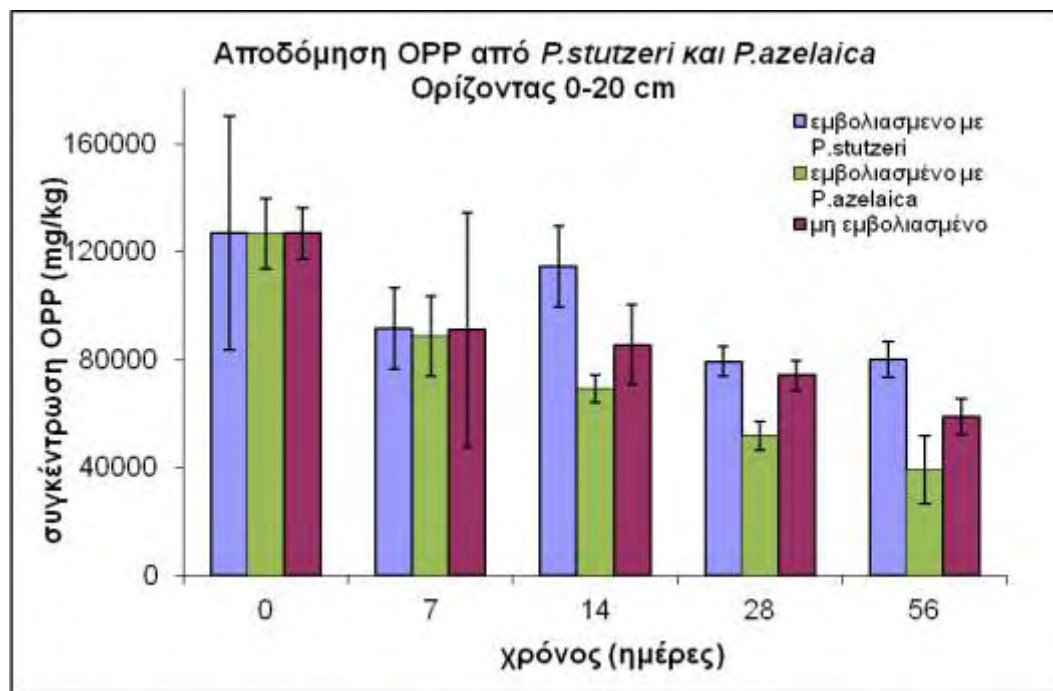
ένα από τα τρία τμήματα των δυο οριζόντων, χωρίστηκε σε δείγματα των 5g τα οποία ακολούθως τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια στα οποία έγινε τρύπα ώστε να διασφαλίσουμε αερόβιες συνθήκες και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 26 °C. Στα δείγματα από τον ορίζοντα 0-20 cm (υψηλές συγκεντρώσεις OPP) αμέσως μετά την εφαρμογή και 7, 14, 28 και 56 ημέρες αργότερα απομακρύνθηκαν τρία δείγματα από κάθε εφαρμογή και αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC-UV όπως έχει ήδη περιγραφεί. Αντίστοιχα, στα δείγματα από τον ορίζοντα 40-60 cm (χαμηλές συγκεντρώσεις OPP) δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά την εφαρμογή, 3 και 7 ημέρες αργότερα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

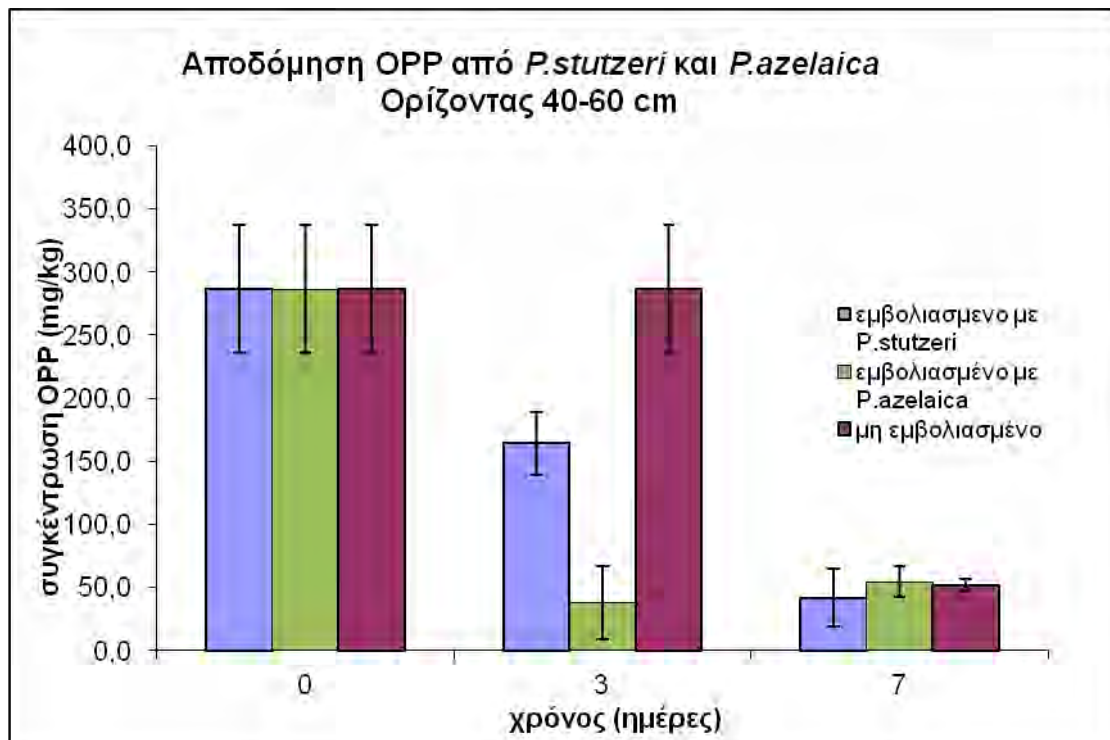
3.1 Αποδόμηση του OPP στο EYM ύστερα από εμβολιασμό με τα βακτηριακά στελέχη *P.azelaica* PHB1 και *P.stutzeri* OPP26

Αρχικά παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση του OPP στους δύο ορίζοντες. Έτσι στον επιφανειακό ορίζοντα στον χρόνο 0 ημέρες παρατηρήθηκαν συγκεντρώσεις 120000 mg/kg υποστρώματος σε αντίθεση με τον κατώτερο ορίζοντα (40-60 cm) όπου οι συγκεντρώσεις του OPP κυμάνθηκαν από 220 ως 350 mg/kg υποστρώματος. Στον επιφανειακό ορίζοντα παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης του OPP κατά την διάρκεια της επώασης ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό με αποδομητικά βακτήρια που έφτασε το 50% της αρχικής συγκέντρωσης OPP σε διάστημα 56 ημερών. Η εφαρμογή των βακτηρίων στο EYM από τον επιφανειακό ορίζοντα που περιείχε και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις OPP δεν οδήγησε σε ταχύτερη αποδόμηση του OPP σε σχέση με τον μη εμβολιασμένο μάρτυρα όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1 και για τα δύο βακτήρια που αξιολογήθηκαν. Η χαμηλότερες συγκεντρώσεις OPP που καταμετρήθηκαν στο EYM που εμβολιάστηκε με το στέλεχος *P. azelaica* PHB-1 στις 28 και 56 ημέρες σε σχέση με τα δείγματα-μάρτυρες δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.



Διάγραμμα 1: Η αποδόμηση του OPP που περιέχεται σε EYM από τον ορίζοντα 0-20cm σε υπόστρωμα εμβολιασμένο με *P.stutzeri* OPP26, υπόστρωμα εμβολιασμένο με *P.azelaica* PHB-1 καθώς και σε μη εμβολιασμένο EYM (Μάρτυρας). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Αντίθετα, ο εμβολιασμός του EYM από τον ορίζοντα 40-60 cm, που περιείχε χαμηλότερη επιβάρυνση με OPP, με τα δύο βακτήρια οδήγησε σε ταχύτερη διάσπαση του OPP σε σχέση με τον μη εμβολιασμένο μάρτυρα στις 2 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος (Διάγραμμα 2). Ιδιαίτερα στα δείγματα που εμβολιάστηκαν με το βακτήριο *P. azelaica* PHB-1 παρατηρήθηκε διάσπαση του 85% της αρχικής ποσότητας του OPP εντός 2 ημερών από τον εμβολιασμό σε σχέση με τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με το *P. stutzeri* OPP26 και τον μη εμβολιασμένο μάρτυρα όπου παρατηρήθηκε διάσπαση 50 και 5% αντίστοιχα (Διάγραμμα 2). Παρόλα αυτά στις 7 ημέρες μετά την εφαρμογή των βακτηρίων η συγκέντρωση του OPP σε όλες τις μεταχειρίσεις ήταν παρόμοια (<10% της αρχικής συγκέντρωσης).



Διάγραμμα 2: Η αποδόμηση του OPP που περιέχεται σε EYM που συλλέχθηκε από τον ορίζοντα 40-60cm σε υπόστρωμα εμβολιασμένο με *P.stutzeri* OPP26, υπόστρωμα εμβολιασμένο με *P.azelaica* PHB-1, καθώς και σε μη εμβολιασμένο EYM (μάρτυρας). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σημαντικός αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί με την απομόνωση μικροοργανισμών υπεύθυνων για τη βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων και την χρήση των μικροοργανισμών αυτών ως φορείς βιολογικής αποκατάστασης ρυπασμένων εδαφών ή οικοσυστημάτων (Karpouzas and Walker 2000; Singh et al., 2004). Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η ικανότητα δύο βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* sp. που είχαν την ικανότητα να αποδομούν το OPP σε υγρές καλλιέργειες να αποδομούν υψηλές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου σε στερεά υποστρώματα όπως EYM.

Το EYM χρησιμοποιείται ως πληρωτικό υλικό ή ως συστατικό των βιομιγμάτων σε συστήματα βιοκλινών για την επεξεργασία αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων όπου και εφαρμόζεται το OPP. Η διοχέτευση από συστήματα βιοκλινών μεγάλων όγκων αποβλήτων που περιέχουν OPP είναι δυνατό να οδηγήσει, με την ολοκλήρωση του κύκλου λειτουργίας του συστήματος, σε κατακράτηση υψηλών συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου από το βιομίγμα το οποίο αφού αντικατασταθεί από φρέσκο υλικό θα πρέπει να αποτοξικοποιηθεί (να μειωθεί το φορτίο του σε OPP) πριν την ελευθέρωση του στο περιβάλλον. Σε αντίθετη περίπτωση το υλικό αυτό θεωρείται τοξικό στερεό απόβλητο. Η αποτοξικοποίηση των εξαντλημένων υποστρωμάτων που απομακρύνονται από τις βιοκλίνες και τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων αποτελεί ένα πρακτικό πρόβλημα για την πλήρη εφαρμογή των βιοκλινών (Karanasios et al., 2012). Μελέτες από την Β. Ευρώπη έδειξαν ότι η κομποστοποίηση του υποστρώματος κατά την διάρκεια της χειμερινής περιόδου μπορεί να μειώσει σε σημαντικό βαθμό το φορτίο των γεωργικών φαρμάκων στο υπόστρωμα (Torstensoon 2000; De Wilde et al., 2010). Η διαδικασία αυτή είναι χρονοβόρα και σε αρκετές περιπτώσεις απαιτείται άμεση αποτοξικοποίηση των υλικών αυτών. Η επιλογή του βιολογικού εμπλουτισμού των ρυπασμένων υποστρωμάτων με εξειδικευμένους αποδομητικούς μικροοργανισμούς αποτελεί μια εφαρμόσιμη μέθοδο στις περιπτώσεις όπου τα βιομίγματα είναι επιβαρυνμένα με περιορισμένο αριθμό γεωργικών φαρμάκων. Το παραπάνω ισχύει απόλυτα για τα βιομίγματα που απομακρύνονται από βιοκλίνες που δέχονται εφαρμογή αποβλήτων συσκευαστηρίων όπου ο αριθμός των γεωργικών φαρμάκων που απορρίπτονται είναι ιδιαίτερα περιορισμένος (1-2 δραστικές ουσίες σε

κάθε συσκευαστήριο). Με βάση τα παραπάνω αξιολογήθηκε η ικανότητα των δύο βακτηρίων αποδομητών του OPP να μειώνουν το φορτίο του μυκητοκτόνου σε EYM το οποίο απομακρύνθηκε από σύστημα μίνι-βιοφίλτρων – στηλών έκπλυσης και το οποίο ήταν επιβαρυνμένο με υψηλές συγκεντρώσεις OPP. Επιλέχθηκαν να εμπλουτιστούν με τα δύο βακτήρια δύο διαφορετικοί ορίζοντες των στηλών οι οποίοι περιείχαν διαφορετικά επίπεδα OPP ώστε να μελετηθεί και η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του OPP στην ικανότητα των βακτηρίων να δρουν ως φορείς αποτοξικοποίησης.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι κανένα από τα δύο βακτήρια που χρησιμοποιήσαμε δεν ήταν ικανά να επιταχύνουν την διάσπαση του OPP στα EYM όταν αυτό βρέθηκε σε ιδιαίτερα υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις (120000 mg/kg). Αντίθετα τα δύο βακτήρια και ιδιαίτερα το *P. azelaica* PHB-1 και σε μικρότερο βαθμό το *P. stutzeri* OPP26 ήταν ικανά να επιταχύνουν την αποδόμηση χαμηλότερων συγκεντρώσεων του OPP (300 mg/kg). Τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που επιβεβαιώνουν την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των οργανικών ρύπων στην αποτελεσματικότητα του βιολογικού εμπλουτισμού (Struthers et al., 1998; Singh et al., 2006). Πιθανότατα η ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση OPP στο EYM από τον επιφανειακό ορίζοντα των στηλών ήταν τοξική για τα βακτήρια που εμβολιάστηκαν.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι παρατηρήθηκε μια σημαντική αποδόμηση του OPP και στα μη εμβολιασμένα δείγματα EYM και στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων κάτι που καταδεικνύει την ικανότητα της ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας του EYM να αποδομεί έστω και με βραδύτερους ρυθμούς ακόμη και τις πού υψηλές συγκεντρώσεις OPP όταν βρεθούν σε βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας όπως αυτές που επικρατούσαν κατά την επώαση. Πράγματι, προηγούμενες μελέτες υπολειμματικότητας σε ανάλογες συνθήκες έχουν δείξει ότι το OPP δεν αποτελεί ιδιαίτερα υπολειμματικό μόριο στο περιβάλλον και αποδομείται ταχύτατα με χρόνους ημιζωής που κυμαίνονταν από 1 ημέρα στο έδαφος (EFSA 2008) ως και 4,9-31 ημέρες σε διάφορα βιομίγματα από βιοκλίνες (Omirou et al., 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα μας μπορούμε να καταλήξουμε στα παρακάτω συμπεράσματα

- 1) Τα βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas azelaica* PHB-1 και *Pseudomonas stutzeri* OPP26 δεν κατάφεραν να επιταχύνουν αποδόμηση του μυκητοκτόνου OPP σε ΕΥΜ όταν οι συγκεντρώσεις του ήταν >100000 mg/kg ενώ κατάφεραν να επιταχύνουν την αποδόμηση του OPP σε ΕΥΜ όταν οι συγκεντρώσεις του ήταν <350 mg/kg
- 2) Το OPP παρουσίασε σημαντική αποδόμηση ακόμη και σε μη εμβολιασμένα δείγματα ΕΥΜ τα οποία επώαστηκαν σε σταθερή θερμοκρασία (25°C) καταδεικνύοντας την χαμηλή υπολειμματικότητα του OPP στο περιβάλλον

Συνολικά τα αποτελέσματα μας καταδεικνύουν ότι τα συγκεκριμένα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιτάχυνση της αποτοξικοποίησης βιομιγμάτων με υψηλή επιβάρυνση OPP, ενώ η χρήση τους δεν είναι πιθανότατα απαραίτητη όταν δεν υπάρχει πίεση χρόνου καθώς το OPP, όπως αποδεικνύεται και από τα αποτελέσματα μας, αποδομείται σχετικά γρήγορα ακόμη και από μη εξειδικευμένα μέλη της μικροβιακής κοινότητας των οργανικών υποστρωμάτων (natural attenuation effect).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aislabie J., Loyd-Jones G. (1995). A review of bacterial degradation of pesticides, *Australian Journal of Soil Research* 33: 925-942
- Barriuso E., Baer U., Calvet, R. (1992). Dissolved organic matter and adsorption-desorption of dimefuron, atrazine, and carbetamide by soils, *Journal of Environmental Quality* 21: 359–367.
- Bellos D, Sawidis T (2005). Chemical pollution monitoring of the river Pinios (Thessalia-Greece), *Journal of Environmental Management* 76: 282-292
- Castillo P., Torstensson L., Stenstrom J. (2008). Biobeds for environmental protection from pesticides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6206-6219.
- Delgado-Moreno L., Almendros G.,Pena A. (2007). Raw or incubated olive-mill wastes and its biotransformed products as agricultural soil amendments effect on sorption-desorption of triazine herbicides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 836–843.
- De Wilde T, Debaer C, Ryckeboer J, Springael D, Spanoghe P (2010) The influence of small-and large-scale composting on the dissipation of pesticide residues in a biopurification matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 90:1113–1120
- Eckert J.W. (1977). Control of post harvest diseases. In M.R. Siegel and H.D. Sisler(ed.), *Antifungal compounds*, vol.1.Discovery, development, and uses, p.269-352.
- EFSA(2008).Conclusion on the pesticide peer review of 2-phenylphenol. Summary of the EFSA Scientific Report 215: 1-67.
- European Food Safety Authority (EFSA), (2008). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 2-phenylphenol. *EFSA Journal* 217: 1-67
- EU(2008) Draft assessment report, Initial risk assessment provided by the Rapporteur member state of the substance 2-phenylphenol.
- Flaim G.M., Toller G. (1989). Treatment of postharvest pesticide residues, *Journal Agriculture, Ecosystems & Environment* 27:505-511
- Furukawa K. and Fujiyama H., (2008).Microbial degradation of polychlorinated biphenyls:Biochemical and molecular features, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105: 433-449
- Fytianos et al. (2006). Monitoring of N-methylcarbamate pesticides in the Pinios river (and Central Greece) by HPLC. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 86: 131-145.
- Garcia Portillo M., Avino E.S., Vicente J.O., (2004). Purification system for wastewater coming from fruit and vegetable processing plants and phytosanitary treatments in the field. *United States Patent*, US 6,709,585 B1, p. 9.
- Helweg A., Bay H., Hansen H.P.B., Rabolle M., Sonnenborg A., Stenvang, L., (2002). Pollution at and below sites used for mixing and loading of pesticides. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 82, 583-590

- Herrero-Hernandez E., Soledad Andrades M., Marin-Benito J.M., Sanchez-Martina M.J., Rodriguez-Cruz M.S. (2011). Field-scale mushroom substrate and its potential environmental impact, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 1480–1488
- Iranzo, M., Sain-Pardo, I., Boluda, R., Sanchez, J., Mormeneo, S. (2001). The use of microorganisms in environmental remediation, *Annals of Microbiology* 51, 135–143.
- Jaspers M. C. M., Suske W. A., Schmid A., Goslings D. A.M., Kohler H.-P. E. & van der Meer J. R. (2000). HbpR, a new member of the XylR-DmpR subclass within the NtrC family of bacterial transcriptional activators, regulates expression of 2-hydroxybiphenyl metabolism in *Pseudomonas azelaica* HBP1, *Journal of Bacteriology* 182: 405-417.
- Karanasios E., Tsiropoulos N., Karpouzas D.G., Menkissoglu-Spiroudi U. (2010). Novel biomixtures based on local Mediterranean ligninocellulosic materials: evaluation for use in biobeds. *Chemosphere* 80 (8): 914-921.
- Karanasios E., Tsiropoulos N., Karpouzas D.G., (2012) On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide-wastewaters: recent advances and future perspectives, *Biodegradation* 23(6): 787-802
- Karas P., Perucchon C., Exarhou C., Ehaliotis C., Karpouzas DG. (2011). Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi, *Biodegradation* 22: 215-228
- Karpouzas, D.G., and Walker, A. (2000). Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epI to degrade ethoprophos in soil, *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1753-1762
- Kohler H.P.E., Kohler-Staub D., Focht D.D. (1988). Degradation of 2-Hydroxybiphenyl and 2,2'-Dihydroxybiphenyl by *Pseudomonas* sp. Strain HBP1, *Applied and Environmental Microbiology* 54:2683-2688
- Kohler H.P.E., Kohler-Staub D., and Focht D. D. (1988). Degradation of 2-hydroxybiphenyl and 2,29-dihydroxybiphenyl by *Pseudomonas* sp. strain HBP1, *Applied and Environmental Microbiology* 54:2683–2688
- Kohler H.P. E., Schmid A. and van der Maarel M. (1993). Metabolism of 2,29-dihydroxybiphenyl by *Pseudomonas* sp. strain HBP1: production and consumption of 2,29,3-trihydroxybiphenyl, *Journal of Bacteriology* 175:1621–1628.
- Kohler H.P. E. and van der Meer J. R. (2000). HbpR, a new member of the XylR/DmpR subclass within the NtrC family of bacterial transcriptional activators, regulates expression of 2-hydroxybiphenyl, *Journal of Bacteriology* 182(2):405-17
- Kozak J. (1996). Soil organic matter as a factor influencing the fate of organic chemicals in the soil environment, *Humic Substances in Terrestrial Ecosystem* pp 625-664
- Lunt D., Evans W.C (1970). The microbial metabolism of biphenyl, *Biochemical Journal* 118:54-55
- Marin-Benito J.M., Sanchez-Martin M., Soledad-Andrades M., Perez-Clavijo M., Rodriguez-Cruz M.S. (2009). Effect of spent mushroom substrate amendment of vineyard soils on the behavior of fungicides. Adsorption-desorption of penconazole and metalaxyl by soils and subsoils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9634–9642

- Marin-Benito J.M., Rodriguez-Cruz M.S., Soledad-Andrades M., Sanchez-Martin M.(2009). Effect of spent mushroom substrate amendment of vineyard soils on the behavior of fungicides.Mobility of penconazole and metalaxyl in undisturbed soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9643–9650
- 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
- Palma P.,Kuster M.,Alvarenga P.,Palma V. L., Fernandes R. M.,Soares A. M.V.M. (2009). Risk assessment of representative and priority pesticides, in surface water of the Alqueva reservoir (south of Portugal) using on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal Environment International* 35: 545–551.
- Reid B. J., Fervor T. R., Semple K. T. (2002). Induction of PAHcatabolism in mushroom compost and its use in the biodegradation of soil-associated phenanthrene, *Journal Environmental Pollution* 118: 65–73
- Rodriguez-Cruz M.S., Andrades M.S., Parada A.M., Sanchez-Martin M.J.(2008). Effect of different wood pretreatments on the sorption-desorption of linuron and metalaxyl by woods. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7339–7346
- Rodriguez-Cruz M.S.,Herrero-Hernandez E.,Ordaxa J., Marin-Benito J.M., Draouib K. and Sanchez-Martin M.J. (2012). Adsorption of pesticides by sewage sludge, grape marc, spent mushroom substrate and by amended soils, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 92: 933–948
- Sanchez-Camazano M., Iglesias-Jimenez E., Sanchez-Martin M. J. (1997). City refuse compost and sodium dodecyl sulphate as modifiers of diazinon leaching in soil, *Chemosphere* 35: 3003–3012
- Sanchez C.(2004). Modern aspects of mushroom culture technology, *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 756–762
- Semple K.T., Watts N.U., Fermor T.R. (1998). Factors affecting the mineralization of [U-14C]benzene in spent mushroom substrate, *Journal FEMS Microbiology Letters* 164: 317–321
- Sharmaa S.K., Chaudhary A. and Singh R.V. (2008). Gray Chemistry Verses Green Chemistry: Challenges and opportunities, *Rasayan Journal Of Chemistry* 1(1):168-92
- Singh B.K., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D. (2004). Biodegradation of chlorpyrifos by enterobacter strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils, *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4855-4863
- Singh B.K., Walker A., Wright D. (2006). Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: Influence of different environmental conditions, *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2682–2693
- Stewart D. P. C., Cameron K. C., Cornforth I. S. (1998). Effects of spent mushroom substrate on soil chemical conditions and plant growth in an intensive horticultural system: A comparison with inorganic fertiliser., *Australian Journal of Soil Research* 36: 185–198
- Struthers J.K., Jauachandran K. and Moorman T.B. (1998). Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil, *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3368-3375

- Swetha V.P., Phale P.S.(2005). Metabolism of carbaryl via 1,2-dihydroxynaphthalene by soil isolates *Pseudomonas* sp. strains C4,C5 and C6, *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5951-5956
- Tandlich R., Vrana B., Payne S., Dercová K., Balaz S.(2011). Biodegradation mechanism of biphenyl by a strain of *Pseudomonas stutzeri*, *Journal of Environmental Science and Health* 46(4):337-44
- Torstensson L (2000). Experiences of biobeds in practical use in Sweden—a method for elimination of point-source contamination. *Pest Outlook* 11:206–211
- Τσιούρης Σ. (2004). Θέματα Προστασίας Περιβάλλοντος
- Undabeytia T., Sanchez-Verdejo T., Morillo E., Maqueda C. (2004). Effect of organic amendments on the retention and mobility of imazaquin in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4493–4500
- Walker A.,Roberts S.J.(1933).Degradation biodegradation and enhanced biodegradation. *Mobility and Degradation of Xenobiotics*, p357-370
- Wick L.Y., and Gschwend P.M.(1998). Source and chendynamic behaviour of diphenyl sulfon and ortho- and para-hydrobiphenyl in a small lake receiving discharges from an adjacent *Journal Environmental Science & Technology* 32:1319-1328
- Wuest P. J., Levanon D., Hadar Y. (1995). Environmental, agricultural and industrial uses for spent mushroom substrate from mushroom farms, JG Press, Inc.: Emmaus