ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

«Τοξικολογία»

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΔΑΦΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

FUNCTIONAL METAGENOMIC ANALYSIS OF SOILS AND MICROBIAL CONSORTIA WHICH ARE CAPABLE OF DEGRADING PESTICIDES

ΤΣΑΔΗΛΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση εδαφών και μικροβιακών κοινοτήτων που παρουσιάζουν ικανότητες αποδόμησης γεωργικών φαρμάκων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων: Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μόσιαλος Δημήτριος: Επίκουρος καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Ευχαριστίες:

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Καρπούζα Δημήτρη για την άψογη συνεργασία και την συνεχή καθοδήγησή του.

Επιπλέον ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη και κ. Μόσιαλο Δημήτρη.

Ευχαριστώ πολύ την μεταδιδακτορική φοιτήτρια Perruchon Chiara που ήταν η υπεύθυνή μου στο εργαστήριο για την πολύτιμη βοήθειά της και για την αστείρευτη διάθεσή της να μου μαθαίνει καινούρια πράγματα και να λύνει της απορίες μου.

Επίσης ευχαριστώ πολύ τα υπόλοιπα μέρη του εργαστηρίου που ήταν πάντα πρόθημα να με βοηθήσουν και να με συμβουλέψουν.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου που για την εμπιστοσύνη που μου δείχνουν και την υποστήριξη τους.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω όσους στάθηκαν δίπλα μου και με βοήθησαν να ολοκληρώσω αυτό τον κύκλο σπουδών μου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη 6
Abstract 8
I. Θεωρητικό Μέρος 9
1. Γεωργικά φάρμακα 10
1.1 Γεωργικά φάρμακα στην αγορά 11
1.2 Οφέλη και κίνδυνοι που σχετίζονται με τη χρήση γεωργικών φαρμάκων 13
1.2.1 Οφέλη από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων 13
1.2.2 Κίνδυνοι από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων 13
1.3 Περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων 14
1.4 Μέθοδοι αποκατάστασης ρυπασμένων με γεωργικά φάρμακα περιοχών 17
2. Βιοκλίνες 18
2.1 Τι είναι οι βιοκλίνες 19
2.2 Τα υλικά της βιοκλίνης 21
2.3 Σύσταση του βιομίγματος 22
2.4 Τροποποιήσεις του συστήματος βιοκλινών σε διάφορες χώρες 24
2.5 Άλλες εφαρμογές συστημάτων βιοκλινών 25
2.6 Το βιομίγμα βιοκλινών ως στόχος μεταγονιδιωματικής ανάλυσης 25
3. Μεταγονιδιωματική 27
3.1 Τι είναι η μεταγονιδιωματική 28
3.2 Λειτουργική μεταγονιδιωματική – μεταγονιδιωματική με βάση την αλληλούχιση 29
3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την μεταγονιδιωματική ανάλυση 33
3.4 Συνεισφορά της μεταγονιδιωματικής 34
3.5 Περιβαλλοντική μεταγονιδιωματική 34
3.6 Μεταγονιδιωματική και Βιοαποκατάσταση- Αποτοξικοποίηση 36
4. Στόχος της παρούσας εργασίας 39
II. Πειραματικό Μέρος 40
1. Εισαγωγικά 41
2. Υλικά και μέθοδοι 43
2.1 Επεξεργασία βιομίγματος 43
2.2 Απομόνωση DNA 43
2.3 Μεταγονιδιωματική ανάλυση βιομίγματος 43
2.3.1 Προετοιμασία των υποστρωμάτων ανάπτυξης για το *E. coli* 43
2.3.2 Δημιουργία βιβλιοθήκης φοσμιδίων 43

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

2.4 Δοκιμές διαλογής με βάση φαινοτυπικά τεστ σε θρεπτικά μέσα..... 44
2.5 Εκχύλιση και έλεγχος μεγέθους των επιλεγμένων φοσμιδίων 49
2.6 Εντοπισμός των γονιδίων *pdmAB* στην βιβλιοθήκη μέσω PCR..... 50
2.7 Αλληλούχιση..... 52
3. Αποτελέσματα..... 53
3.1 Κατασκευή βιβλιοθήκης φοσμιδίων:..... 53
3.2 Δοκιμές διαλογής με βάση φαινοτυπικά τεστ σε θρεπτικά μέσα..... 54
3.3 Απομόνωση φοσμιδίων και έλεγχος μεγέθους τους..... 57
3.4 Διαλογή με PCR για τα γονίδια *pdmAB*..... 59
3.5 Αλληλούχιση..... 61
4. Συζήτηση..... 66
4.1 Φοσμίδια 13-16 67
4.2 Φοσμίδια 1-12 69
4.3 Μελλοντικές προσεγγίσεις 70
ΙΙΙ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 71

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Περίληψη

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν μια σημαντική ομάδα χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται εκτεταμένα σε αγροτικές περιοχές, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην επιτυχία της σύγχρονης γεωργίας και της παραγωγής τροφίμων. Ωστόσο, η απελευθέρωση γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον που προκύπτει από μη εγκεκριμένη χρήση ή λανθασμένη πρακτική μπορεί να οδηγήσει σε ρύπανση των υπόγειων και επιφανειακών υδάτινων πόρων. Κάποιες περιοχές εκτίθενται επαναλαμβανόμενα σε γεωργικά φάρμακα. Αυτή η επαναλαμβανόμενη έκθεσή μπορεί να οδηγήσει στην προσαρμογή των ενδογενών μικροβιακών κοινοτήτων, που αναπτύσσουν ενζυμικούς μηχανισμούς αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων. Τα συγκεκριμένα ένζυμα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές όπως η περιβαλλοντική απορρύπανση ή ως αντίδοτα σε νευροτοξικά φάρμακα (π.χ. εντομοκτόνα παλαιάς γενιάς). Επί του παρόντος υπάρχει μεγάλη ζήτηση για κατάλληλους ενζυμικούς βιοκαταλύτες και η λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση, που επιτρέπει την απομόνωσης, απευθείας από διάφορες περιβαλοντικές πηγές όπως το έδαφος, γονιδίων που κωδικοποιούν βιοκαταλυτικά ένζυμα, χωρίς την ανάγκη απομόνωσης των μικροοργανισμών, αποτελεί μια πολύτιμη, άμεση προσέγγιση.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση σε ένα υπόστρωμα από ένα σύστημα βιοκλίνης από την πειραματική φάρμα INRA (Γαλλία), που παρουσίαζε ενισχυμένη βιοαποδόμηση του ζιζανιοκτόνου isoproturon, για την απομόνωση νέων καταβολικών γονιδίων που εμπλέκονται στην αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων.

Το δείγμα υποβλήθηκε σε επανειλημμένες εφαρμογές isoproturon με σκοπό να μεγιστοποιηθούν οι πιθανότητες εντοπισμού καταβολικών γονιδίων-στόχων και έπειτα πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA υψηλού μοριακού βάρους για την δημιουργία βιβλιοθήκης φοσμιδίων 10.000 κλώνων. Οι κλώνοι ελέγθηκαν για δραστικότητα εστεράση και μονοξυγενάσης μέσω διαφορετικών δοκιμών διαλογής: δοκιμές magenta-caprilate, υδρόλυσης a-napthyl acetate και tributyrin για την δραστικότητα εστεράσης και δοκιμή υδρόλυσης ινδόλης για την δραστικότητα οξυγενάσης. Τρία φοσμίδια εντοπίστηκαν θετικά τόσο στην δοκιμή υδρόλυσης ινδόλης όσο και στην magenta-caprylate, εννέα στην δοκιμή tributyrin και κανένα στην δοκιμή υδρόλυσης a-napthyl acetate. Επιπλέον, η βιβλιοθήκη φοσμιδίων υποβλήθηκε σε διαλογή με PCR για τα γονίδια *pdmAB,* τα οποία είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην αποδόμηση του isoproturon και τέσσερα φοσμίδια βρέθηκαν θετικά.

Τα θετικά φοσμίδια αλληλουχήθηκαν με Illumina Hiseq Rapid Mode 2x250 bp και ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης με κατάλληλα εργαλεία βιοπληροφορικής. Τα θετικά για δραστικότητα εστεράσης φοσμίδια πράγματι έφεραν γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα όπως εστεράσες ή καρβοξυεστεράσες και τα θετικά φορμίδια της δοκιμής υδρόλησης της ινδόλης έφεραν πιθανές εξαρτώμενες της φλαβίνης μονοξυγενάσες που εμπλέκονται στην αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων. Όσο αφορά τα φοσμίδια που ήταν θετικά για τα γονίδια *pdmA,* έδειξαν υψηλή ομολογία με τα προηγούμενα απομονομένα *pdmAB* γονίδια, με διαφορά μόνο ενός αμινοξέος στο γονίδιο *pdmA*.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Μελλοντικές προσπάθειες θα απευθύνονται στον χαρακτηρισμό της δραστικότητα αποδόμησης γεωργικών φαρμάκων των ταυτοποιημένων γονιδίων, μέσω υπερέκφρασής τους, καθαρισμού των αντίστοιχων πρωτεϊνών και δοκιμών αποδόμησης για διάφορες ομάδες γεωργικών φαρμάκων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Abstract

Pesticides play an important role in the success of modern farming and food production. However, their release into the environment because of non-approved use, poor practice, illegal operations, accidental releases from the farmyard and inputs of washings can lead to severe environmental pollution. As a result, some sites are repeatedly exposed to pesticides. This repeated exposure can lead to the adaptation of the indigenous microbial community to pesticide degradation, by the development of specific enzymatic mechanisms. Such enzymes could be useful in different biotechnological applications, including environmental bioremedation or as antidotes to neurotoxic drugs (i.e. old generation pesticides). Nowadays there is an increasing demand of new enzymatic biocatalysts and functional metagenomic analysis, which allows identifying directly from different environmental sources, such as soil, novel catabolic genes that encode for biocatalitic enzymes without the need to isolate microorganisms, could be a valuable straightforward approach.

In the present study, functional metagenomic analysis was performed on a substrate collected from a biobed system located in the experimental farm of INRA (France) that exhibited enhanced biodegradation of isoproturon, in order to isolate novel catabolic genes involved in pesticide degradation.

Repeated applications of isoproturon were performed in order to maximize the possible detection of targeted catabolic genes. After that, high molecular weight DNA was extracted from the sample and a fosmid library of 10.000 clones was created. These clones were screened for esterase and oxygenases activity via different enzymatic assays: magenta-caprilate, a-napthyl acetate and tributyrin assays for esterase activity and indole assay for oxygenase activity. Three fosmids resulted positive to both indole and magenta-caprylate assays, nine fosmids to tributyrin and none to a-napthyl acetate. In addition, the fosmid library was tested through PCR analysis for the presence of the *pdmAB* genes which are known to be involved in isoproturon degradation and four fosmids resulted positive.

The positive fosmids were sequenced by Illumina Hiseq platform and the results were analyzed by suitable bioinformatic tools. Fosmids positive to the esterase assays effectively carried genes encoding for enzymes such as esterases or carboxyesterases as well as fosmids positives to the indole assay carried putative flavono-dependent monoxygenases involved in pesticide degradation. Regarding the *pdmAB* positive fosmids, the genes showed high homology to the previously isolated ones, with only one amino acids difference in the *pdmA* gene.

Further efforts will be directed to the characterization of the pesticide degrading activity of the identified enzymes via overexpression, protein purification and degradation tests on specific pesticide groups.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Ι. Θεωρητικό Μέρος

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

1. Γεωργικά φάρμακα

Ως αποτέλεσμα των ανθρώπινων δραστηριοτήτων, επί του παρόντος μεγάλες ποσότητες αποβλήτων με υψηλό φορτίο ρύπων απορρίπτονται στο περιβάλλον. Εκτιμάται ότι παγκοσμίως πάνω από ένα δισεκατομμύριο λίβρες τοξικών χημικών ουσιών απελευθερώνονται στον αέρα και το νερό. Στο ίδιο πλαίσιο, περίπου $6x10^6$ χημικές ουσίες έχουν παραχθεί, 1.000 νέα χημικά προϊόντα συντίθενται σε ετήσια βάση και μεταξύ 60.000 και 95.000 χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται για εμπορικούς σκοπούς, συμπεριλαμβανομένων των συνθετικών γεωργικών φαρμάκων [Shukla et al., 2010]. Μεταξύ αυτών των βιομηχανικών χημικών ουσιών, τα γεωργικά φάρμακα έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί περιβαλλοντικοί ρύποι [Cerejeira *et al.*, 2003, Konstantinou *et al.*, 2006, Hildebrandt *et al.*, 2008].

Ως γεωργικό φάρμακο ορίζεται κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση, ή τη μείωση κάθε παρασίτου (έντομα, ακάρεα, νηματώδη, ζιζάνια, αρουραίοι, κλπ) που έχει μια επιβλαβή επίδραση στις καλλιέργειες και επιφέρει μείωση στην απόδοσή τους. Ανάλογα με το παράσιτο-στόχο, τα γεωργικά φάρμακα θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, κλπ [FAO, 1989]. Παρά τις μικρές διακυμάνσεις, ο πυρήνας του ορισμού των γεωργικών φαρμάκων παραμένει βασικά ο ίδιος: κάθε χημική ουσία που είναι δηλητηριώδης και αποτελεσματική κατά οργανισμών-στόχων, αλλά δεν συνεπάγεται κανένα κίνδυνο για τους οργανισμούς μη στόχους και το περιβάλλον [Zhang et al, 2011].

Τα γεωργικά φάρμακα δεν είναι καθόλου νέα εφεύρεση. Στην πραγματικότητα, η ιστορία της σκόπιμης χρήσης τους χρονολογείται χιλιάδες χρόνια πίσω, όταν οι Σουμέριοι, Έλληνες και Ρωμαίοι χρησιμοποιούσαν θείο, υδράργυρο, αρσενικό, χαλκό ή φυτικά εκχυλίσματα για προστασία των καλλιεργειών τους. Η ιστορία της χρήσης τους μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: (1) πριν από την δεκαετία του 1870, όπου φυσικά γεωργικά φάρμακα χρησιμοποιούνταν για τον έλεγχο των παρασίτων, (2) 1870-1945, η εποχή των ανόργανων συνθετικών γεωργικών φαρμάκων και (3) 1945 έως σήμερα, η εποχή των οργανικών συνθετικών γεωργικών φαρμάκων [Zhang et al., 2011].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

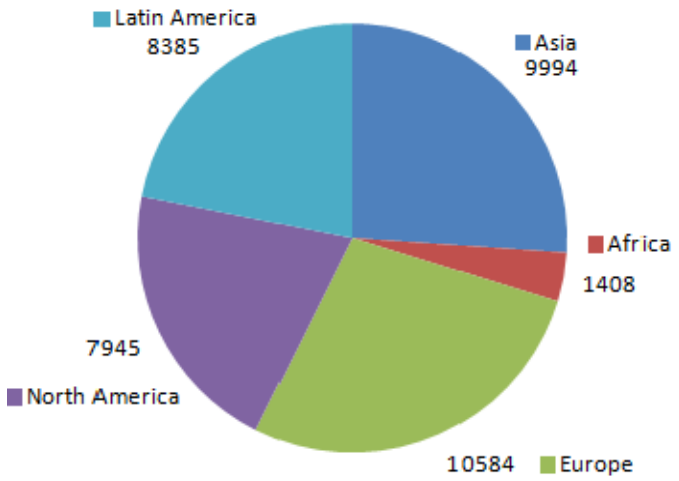
1.1 Γεωργικά φάρμακα στην αγορά

Ο αρχικός ρυθμός παραγωγής γεωργικών φαρμάκων (1940) εκτιμήθηκε σε 600.000 τόνους/έτος και στη δεκαετία του '90 η χρήση τους διευρύνθηκε έντονα, επιτυγχάνοντας ετήσια παραγωγή 3 εκατομμύρια τόνους/έτος (50πλάσια) [Dich et al., 1997]. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990 οι παγκόσμιες πωλήσεις γεωργικών φαρμάκων παρέμειναν σχετικά σταθερές, μεταξύ 27 – 30 δισεκατομμύρια δολάρια, εκ των οποίων το 47,5% ήταν ζιζανιοκτόνα, το 28%, εντομοκτόνα και το 19,6% μυκητοκτόνα/βακτηριοκτόνα (*Πίνακας 1.1*).

Πίνακας 1.1: Αλλαγές στις πωλήσεις γεωργικών φαρμάκων παγκοσμίως, σε εκατομμύρια δολάρια.[Zhang *et al*. (2011)]

Κατηγορία	1960		1970		1990		2005	
	Πωλήσεις	%	Πωλήσεις	%	Πωλήσεις	%	Πωλήσεις	%
Εντομοκτόνα	310	36,5	1002	37,1	7655	29	7798	25
Ζιζανιοκτόνα	170	20	939	34,8	11625	44	14971	48
Μυκητοκτόνα & Βακτηριοκτόνα	340	40	599	22,2	5545	21	7486	24
Άλλα	30	3,5	159	5,9	1575	6	936	3
Σύνολο	850	100	2700	100	26400	100	31191	100

Τα τελευταία χρόνια η αξία της παγκόσμιας αγοράς γεωργικών φαρμάκων ανήλθε σε 38 δισεκατομμύρια Δολάρια ΗΠΑ με τα ζιζανιοκτόνα να είναι η σημαντικότερη ομάδα γεωργικών φαρμάκων που ακολουθείται από τα μυκητοκτόνα [Erbach, 2012]. Η Ευρώπη σήμερα αποτελεί τον μεγαλύτερο καταναλωτή γεωργικών φαρμάκων στον κόσμο ακολουθούμενη από την Ασία (*Εικόνα 1.1*).

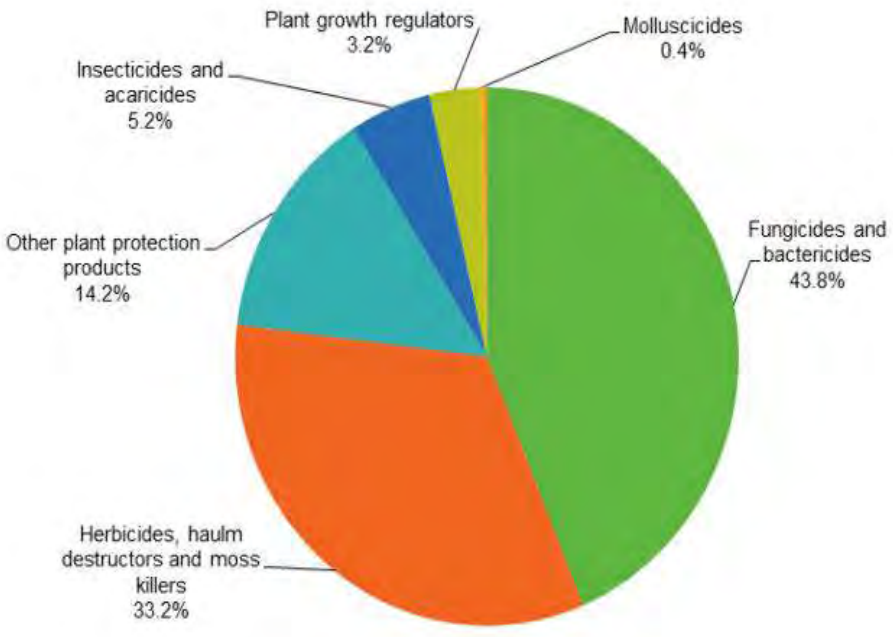


Εικόνα 1.1: Πωλήσεις γεωργικών φαρμάκων ανά ήπειρο (2010) σε εκατομμύρια δολάρια [Erbach (2012)].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Το 2014, η συνολική ποσότητα των πωλήσεων γεωργικών φαρμάκων στην ΕΕ ανήλθε σε περίπου 400.000 τόνους. Η Ισπανία (19,9%), η Γαλλία (19,0%), η Ιταλία (16,2%), η Γερμανία (11,6%) και η Πολωνία (5,9%) ήταν τα κράτη μέλη στα οποία πωλήθηκαν οι μεγαλύτερες ποσότητες γεωργικών φαρμάκων και όλες μαζί συνιστούσαν συνολικά το 72,7% των πωλήσεων γεωργικών φαρμάκων στην ΕΕ [Eurostat, 2016].

Τα μυκητοκτόνα και βακτηριοκτόνα ήταν οι πλέον πωλούμενες ομάδες γεωργικών φαρμάκων με μερίδιο αγοράς 44%, ακολουθούμενες από τα ζιζανιοκτόνα με 33% μερίδιο στην αγορά. Μαζί με την ομάδα "άλλα φυτοπροστατευτικά προϊόντα" (14%), αυτές οι τρεις ομάδες προστίθενται στο 91% των γεωργικών φαρμάκων που πωλήθηκαν στην ΕΕ το 2014. Από τις άλλες τρεις ομάδες γεωργικών φαρμάκων, τα "εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα" με μερίδιο 5%, οι ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών 3% και τα μαλακιοκτόνα που κατέλαβαν το μικρότερο ποσοστό με λιγότερο από 1% (*Εικόνα 1.2*). Οι ποσότητες γεωργικών φαρμάκων που διατίθενται στην αγορά ετησίως μπορούν να συνδεθούν με άλλες στατιστικές που σχετίζονται άμεσα με τη χρήση τους [Eurostat, 2015 και 2016].



Εικόνα 1.2: (%)πωλήσεις των κύριων ομάδων γεωργικών φαρμάκων στην ΕΕ, 2014. [Eurostats, 2016].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

1.2 Οφέλη και κίνδυνοι που σχετίζονται με τη χρήση γεωργικών φαρμάκων

1.2.1 Οφέλη από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων

Στην πραγματικότητα, σε όλο τον κόσμο περίπου 9.000 είδη εντόμων και ακάρεων, 50.000 είδη παθογόνων των φυτών, και 8.000 είδη ζιζανίων απειλούν την απόδοση των καλλιεργειών. Χωρίς εφαρμογές γεωργικών φαρμάκων, η απώλεια φρούτων, λαχανικών και δημητριακών από παράσιτα αναμένεται να φτάσει το 78%, 54% και 32% αντίστοιχα [Cai, 2008]. Άρα το κύριο όφελος της χρήσης γεωργικών φαρμάκων είναι η βελτίωση της απόδοσης των καλλιεργειών, εξαλείφοντας ή περιορίζοντας τον ανταγωνισμό από ζιζάνια και την προσβολή από επιβλαβείς οργανισμούς και η διασφάλιση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων.

Τα γεωργικά φάρμακα διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην εξασφάλιση αξιόπιστων προμηθειών γεωργικών προϊόντων κάθε χρόνο, συμβάλλοντας στην αποφυγή των διακυμάνσεων της ετήσιας απόδοσης και στην εξασφάλιση της διαθεσιμότητας φρούτων και λαχανικών σε χαμηλές τιμές, προσιτών για όλους τους καταναλωτές. Επιπλέον ελαχιστοποιούν τον απαιτούμενο χρόνο εργασίας για τις καλλιέργειες.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα γεωργικά φάρμακα θα μπορούσαν να προστατεύσουν τη δημόσια υγεία. Μια τέτοια περίπτωση είναι η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων για τον έλεγχο των κουνουπιών, τα οποία δρουν ως φορείς της ελονοσίας [Ross, 2005]. Τέλος, η βιομηχανία φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι ένας βασικός οικονομικός παράγοντας στην παγκόσμια αγορά και αποτελεί σημαντικό εργοδότη στην Ευρώπη με περίπου 26.000 εργαζόμενους στην ΕΕ [Cooper and Dobson, 2007; Aktar *et al.*, 2009; EC, 2006].

1.2.2 Κίνδυνοι από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων

Η άναρχη και μη προβλεπόμενη χρήση των γεωργικών φαρμάκων έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον. Το μέγεθος αυτών των επιδράσεων εξαρτάται από το βαθμό ευαισθησίας των εκτεθειμένων οργανισμών και την εγγενή τοξικότητα του γεωργικού φαρμάκου [Agrawal *et al.*, 2010; Piementel, 2009b]. Ιδανικά ένα γεωργικό φάρμακο πρέπει να είναι θανατηφόρο για το παράσιτο-στόχο, αλλά να μην έχει καμία επίδραση στους οργανισμούς μη-στόχους, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Δυστυχώς, αυτό δεν συμβαίνει πάντα [Aktar et al., 2009]. Έχει υπολογιστεί, για παράδειγμα, ότι πάνω από το 98% των ψεκαζόμενων εντομοκτόνων και πάνω από το 95% των ζιζανιοκτόνων καταλήγουν να αποτίθενται εκτός του αρχικού στόχου τους οδηγώντας στην έκθεση άλλων οργανισμών-μη στόχων που διαβιούν στο ίδιο ενδιαίτημα [Miller, 2004].

Οι κίνδυνοι για την υγεία του ανθρώπου από τα γεωργικά φάρμακα μπορεί να εμφανιστούν μέσω άμεσης και έμμεσης έκθεσης. Έτσι, στο φάκελο έγκρισης για κυκλοφορία γεωργικών φαρμάκων στην αγορά σε επίπεδο ΕΕ απαιτούνται επί του παρόντος δεδομένα σχετικά με πιθανές αρνητικές επιπτώσεις των δραστικών ουσιών των γεωργικών φαρμάκων στην ανθρώπινη υγεία. Υπάρχουν μερικές δοκιμές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή

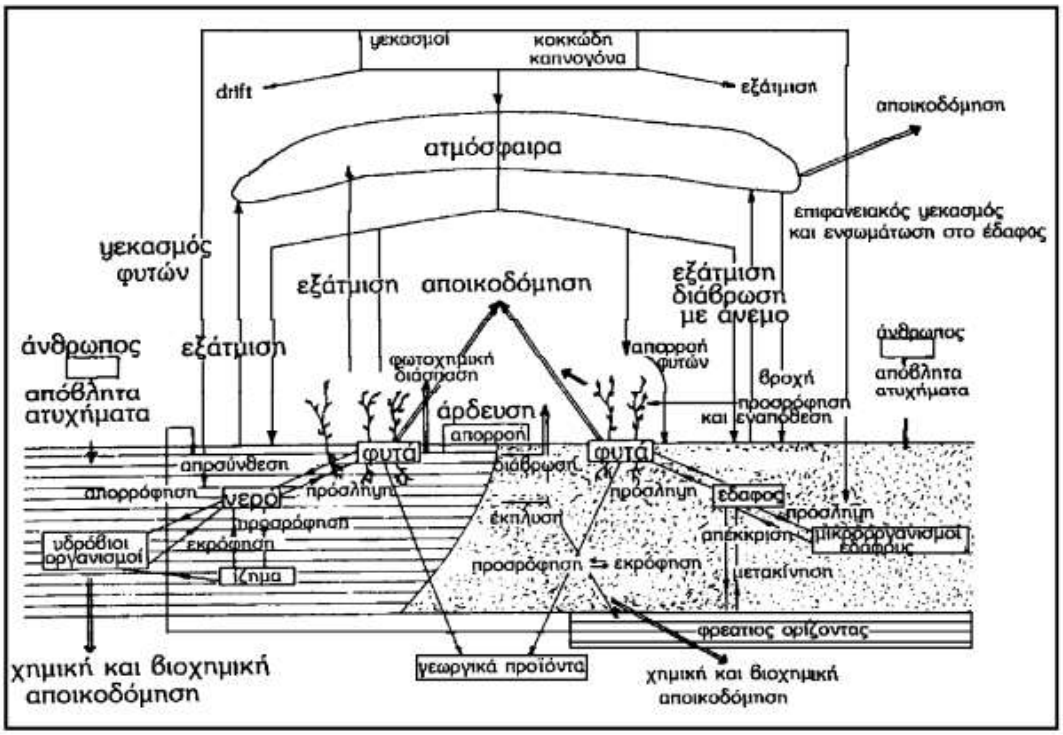
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

αυτών των δεδομένων, π.χ. μεταβολικά πρότυπα, οξείας τοξικότητας, υπο-χρόνιας ή υπο-οξείας τοξικότητας, χρόνιας τοξικότητας, καρκινογένεσης, γονιδιοτοξικότητας, τερατογένεσης, μελέτες αναπαραγωγικότητας και επίσης δοκιμές ερεθισμού χρησιμοποιώντας αρουραίο ως μοντέλο θηλαστικό ή σε μερικές περιπτώσεις σκύλους και κουνέλια [Damalas and Eleftherohorinos, 2011].

Εκτός από την υγεία του ανθρώπου, η απελευθέρωση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στα διάφορα περιβαλλοντικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένου του νερού, του αέρα, και του εδάφους, μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενείς επιπτώσεις σε οργανισμούς μη-στόχους όλων των τροφικών επιπέδων, συμπεριλαμβανομένων των μικροοργανισμών του εδάφους, ευεργετικών αρθρόποδων, φυτών, υδρόβιων οργανισμών και πτηνών ή θηλαστικών [EC, 2006]. Τέλος τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στην καλλιέργεια στην οποία εφαρμόζονται λόγω υψηλών ποσοστών εφαρμογής, κακής εφαρμογής και μη ευνοούμενων περιβαλλοντικών συνθηκών κατά και μετά την εφαρμογή τους [Damalas and Eleftherohorinos, 2011, Palma et al., 2014].

1.3 Περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων

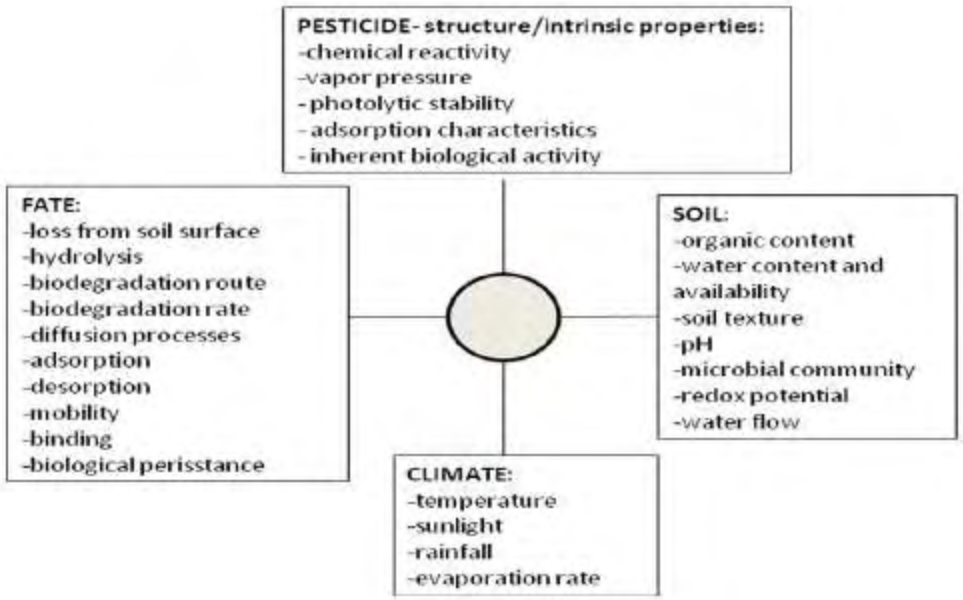
Μετά την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον, τα γεωργικά φάρμακα υφίστανται διαφορετικές διεργασίες που ρυθμίζουν την περιβαλλοντική τους τύχη και συμπεριφορά (*Εικόνα 1.3*).



Εικόνα 1.3: Το σύνολο των διεργασιών που ελέγχουν την περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων [Leonard, 1990].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Διάφοροι παράγοντες καθορίζουν την μοίρα ενός γεωργικού φαρμάκου μετά την απελευθέρωση του στο περιβάλλον. Τέτοιοι είναι, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των γεωργικών φαρμάκων (τάση ατμών, διαλυτότητα στο νερό, και λιποφιλικότητα), τα χαρακτηριστικά του εδάφους (pH, υφή του εδάφους και περιεκτικότητα σε οργανική ύλη) και οι εδαφοκλιματικές συνθήκες (υγρασία του εδάφους, θερμοκρασία) (*Εικόνα 1.4*) [Kellogg *et al.*, 2000].



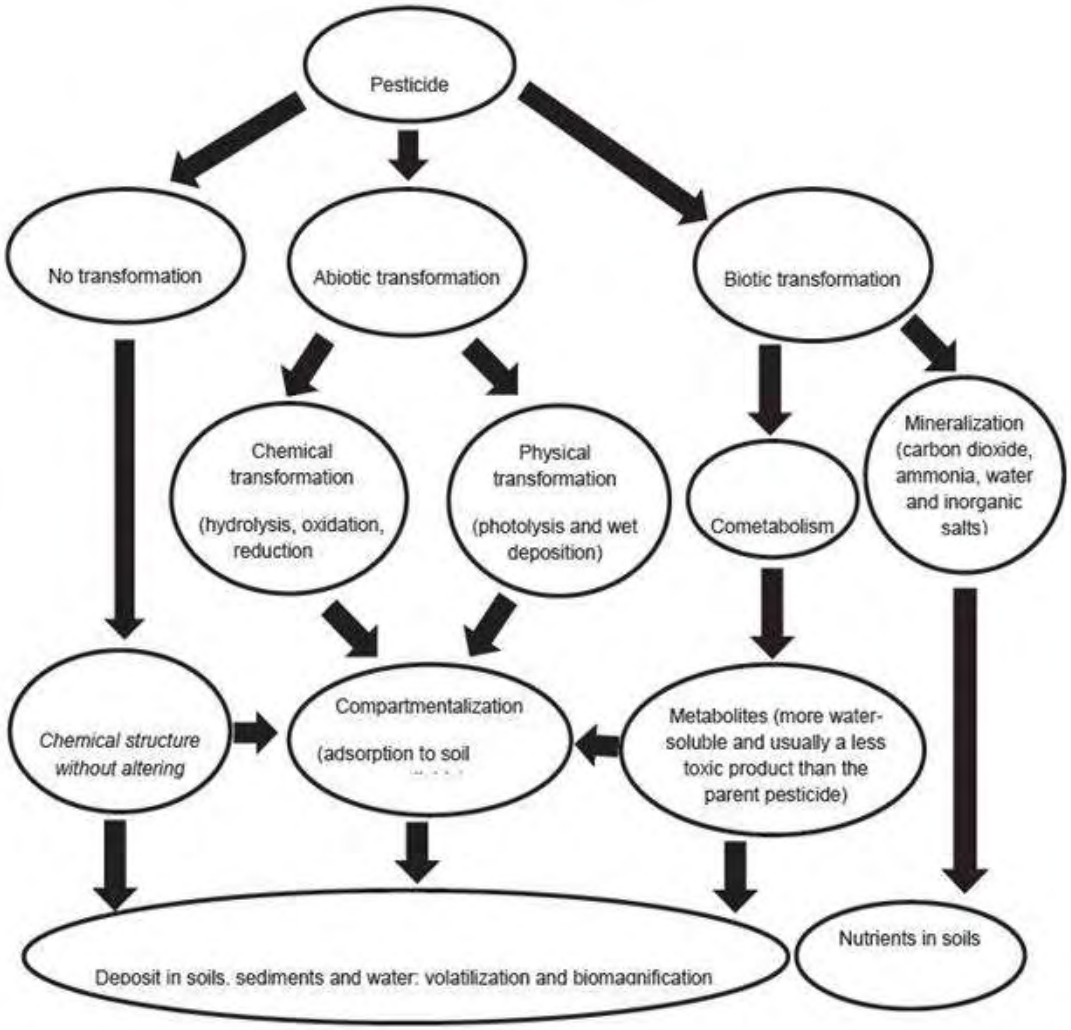
Εικόνα 1.4: Παράγοντες που καθορίζουν την περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων [Arnold & Briggs 1990].

Οι κύριες διεργασίες που ελέγχουν την μετακίνηση των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον είναι η πτητικοποίηση, η έκπλυση και η απορροή. Από την άλλη μεριά οι διαδικασίες που ελέγχουν την απομάκρυνση ενός γεωργικού φαρμάκου από το έδαφος είναι η προσρόφηση και η βιοτική ή αβιοτική αποδόμηση (*Εικόνα 1.5*) [Arnold and Briggs, 1990; Ortiz-Hernandez *et al.*, 2013]. Τα γεωργικά φάρμακα που είναι ανθεκτικά στην βιοτική ή αβιοτική αποδόμηση, είναι πιθανό να συσσωρεύονται στο έδαφος με υψηλή πιθανότητα να κινηθούν στα επιφανειακά και υπόγεια νερά με διαδικασίες επιφανειακής απορροής ή έκπλυσης αντίστοιχα [Fetzner, 2002].

Η βιοτική αποδόμηση αποτελεί πολύ σημαντική διεργασία. Βακτήρια και μύκητες φαίνεται να υιοθετούν διαφορετικές αλλά συμπληρωματικές μεταβολικές οδούς, χρησιμοποιώντας ένα φάσμα ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών ενζύμων αντιστοίχως για την αποδόμηση των υπολειμματικών γεωργικών φαρμάκων [Ronhede et al., 2005, Karigar and Rao, 2011]. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να αποδομούν ενεργά τα γεωργικά φάρμακα και να τα χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας, μια διαδικασία γνωστή ως καταβολισμός ή να τα μετατρέπουν χωρίς κανένα ενεργειακό όφελος, μια διαδικασία γνωστή ως συμμεταβολισμός [Ortiz-Hernandez *et al.*, 2013, Suthersan, 1999]. Ιδανικά, ο μικροβιακός

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

μετασχηματισμός των γεωργικών φαρμάκων θα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή απλούστερων μορίων όπως το CO_2, H_2O, ή ενδιάμεσων που θα μπορούσαν να τροφοδοτούν τον αναβολισμό των μικροοργανισμών (πυροσταφυλικό, ακεταλδεΰδη) [Fetzner, 2002]. Ωστόσο, αυτό δεν συμβαίνει πάντα και η ελλιπής αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων μπορεί να οδηγήσει στην συσσώρευση μεταβολιτών με παρόμοια ή ακόμη υψηλότερη τοξικότητα από τη μητρική ένωση [Navarro *et al.*, 2007, Fetzner, 2002].



Εικόνα 1.5: Μετατροπές των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον [Ortiz-Hernandez *et al.*, 2013].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

1.4 Μέθοδοι αποκατάστασης ρυπασμένων με γεωργικά φάρμακα περιοχών

Η συχνή ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων γεωργικών φαρμάκων, στο περιβάλλον έχει δημιουργήσει παγκόσμια ανησυχία και οδήγησε στην ανάπτυξη τεχνολογιών για αντιμετώπιση με ασφαλή, αποδοτικό και οικονομικό τρόπο. Διαφορετικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί για την αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών και για την εξάλειψη των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων. Οι υπάρχουσες τεχνολογίες θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σε εκείνες που χρησιμοποιούν φυσικές διεργασίες, όπως η προσρόφηση, εκείνες που βασίζονται σε χημικές διεργασίες, όπως η προηγμένη οξείδωση και εκείνες που χαρακτηρίζονται ως «πράσινες τεχνολογίες» όπως η βιοαποκατάσταση [Ortiz-Hernandez *et al.*, 2013].

Οι συμβατικές φυσικοχημικές προσεγγίσεις, όπως η εκσκαφή του ρυπασμένου εδάφους, απομάκρυνση και υγειονομική ταφή ή η κάλυψη και συγκράτηση των ρυπασμένων περιοχών, είναι γενικά δαπανηρές και συχνά ατελείς λόγω της πιθανής μετατροπής της μητρικής ένωσης σε μεταβολίτες περισσότερο ανθεκτικούς και εξίσου ή περισσότερο τοξικούς από την μητρική ένωση. Άλλα μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών είναι η πιθανή μετακίνηση της ρύπανσης και η έλλειψη χώρων υγειονομικής ταφής για την τελική διάθεση του υλικού [Vidali, 2001].

Η βιοαποκατάσταση είναι μια χαμηλού κόστους και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος αποκατάστασης και η εφαρμογή της έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση προϊόντων που είναι αβλαβή για το περιβάλλον. Οι τεχνολογίες βιοαποκατάστασης ταξινομούνται σε *in situ*, που εφαρμόζονται στο έδαφος και το νερό στο ρυπασμένο σημείο με ελάχιστη διαταραχή και σε *ex situ*, που εφαρμόζονται σε έδαφος και νερό αφού απομακρυνθούν μέσω ανασκαφής (έδαφος) ή άντλησης (νερό). Όσον αφορά τις στρατηγικές βιοαποκατάστασης που ακολουθούνται για την αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών, θα μπορούσαν να διακριθούν στη βιολογική ενεργοποίηση και τον βιολογικό εμπλουτισμό. Στη βιολογική ενεργοποίηση η απομάκρυνση του ρύπου εκτελείται από την αυτόχθονη μικροβιακή κοινότητα της οποίας η καταλυτική δράση έχει βελτιστοποιηθεί με την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, τη βελτιστοποίηση του αερισμού κλπ. Αντίθετα, ο βιολογικός εμπλουτισμός βασίζεται στην ενίσχυση του εδάφους με εξωγενείς μικροοργανισμούς που έχουν υψηλή ικανότητα αποδόμησης έναντι του στόχου ρύπανσης [Vidali, 2001].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

2. Βιοκλίνες

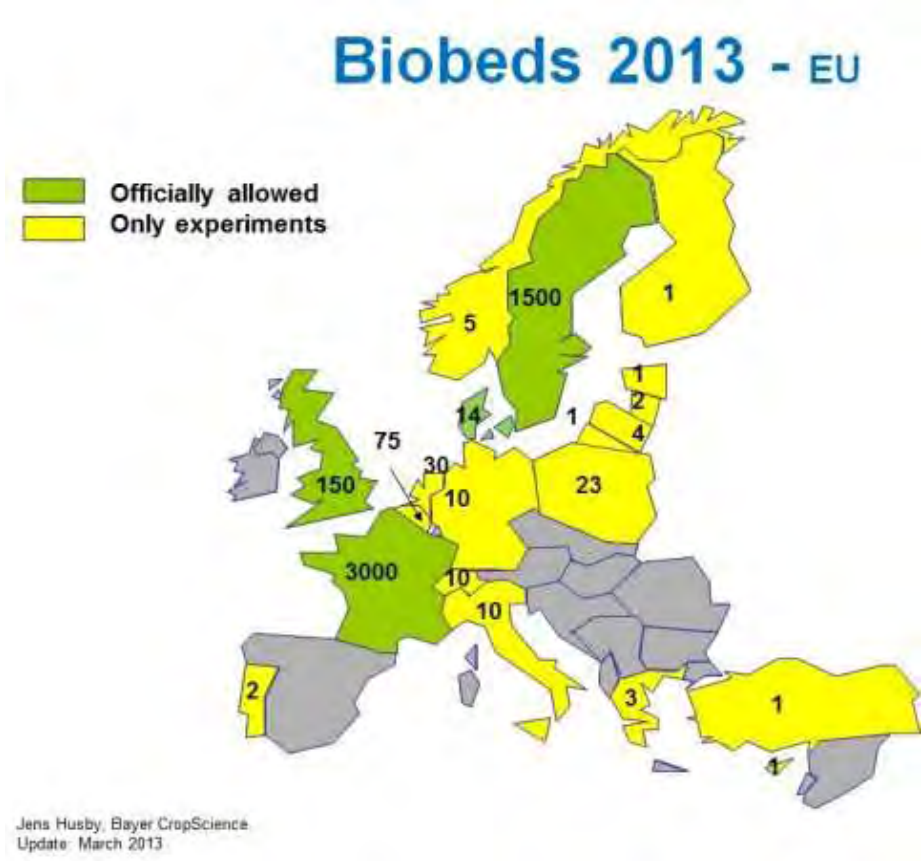
Τα γεωργικά φάρμακα εφαρμόζονται κατά κύριο λόγο για γεωργικούς σκοπούς στο έδαφος, από όπου μπορούν να διαχυθούν σε άλλα περιβάλλοντα. Εντούτοις, υπό συνθήκες κανονικής χρήσης, απώλειες στο περιβάλλον μπορεί να συμβούν λόγω διεργασιών όπως η έκπλυση, η επιφανειακή απορροή και η στράγγιση [Fogg, et. al, 2004(c)]. Τα γεωργικά φάρμακα που φθάνουν στο νερό μπορούν να βλάψουν την υγεία ζώων και ανθρώπων και να επηρεάσουν τις προμήθειες πόσιμου νερού [Góngora et. al, 2017]. Το πρόβλημα εντείνεται όταν δεν ακολουθούνται οι οδηγίες χρήσης και διαχείρισής τους. Έτσι, μη ικανοποιητική διαχείριση, ακατάλληλες διαδικασίες κατά την ανάμειξη γεωργικών φαρμάκων στους χώρους χειρισμού και ακατάλληλη διάθεση των νερών έκπλυσης των ψεκαστήρων, οδηγούν στην συγκέντρωση υπολειμμάτων σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα [Coppola et. al, 2007, Castillo et. al, 2008].

Ο σχεδιασμός, η διαχείριση και η λειτουργία αυτών των περιοχών ανάμιξης/χειρισμού των γεωργικών φαρμάκων, θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικά για τη μείωση της σημειακής ρύπανσης των υδροφόρων συστημάτων με γεωργικά φάρμακα [Coppola et. al, 2007]. Για τον περιορισμό της ρύπανσης των υδροφόρων συστημάτων από αυτές τις σημειακές πηγές, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα βιολογικά συστήματα όπως οι βιοκλίνες [De Wilde et. al, 2007]. Το πληρωτικό υλικό των βιοκλινών ονομάζεται βιομίγμα και αποτελεί ένα βιοοργανικό υλικό, μίγμα οργανικών υπολειμμάτων από τις τοπικές γεωργικές βιομηχανίες [Pinto et. al, 2016].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

2.1 Τι είναι οι βιοκλίνες

Οι βιοκλίνες είναι συστήματα επεξεργασίας γεωργικών εκροών που αναπτύχθηκαν για πρώτη φορά στη Σουηδία το 1993, ως απάντηση στην ανάγκη για απλές και αποτελεσματικές μεθόδους ελαχιστοποίησης της περιβαλλοντικής ρύπανσης από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων [Castillo et al., 2008]. Στη Σουηδία από το 1993 μέχρι σήμερα μετρώνται περισσότερες από 1.000 βιοκλίνες εγκατεστημένες σε αγροκτήματα [Fogg et. al, 2004(b)] Επιπλέον, 5.055 βιοκλίνες έχουν εγκατασταθεί και λειτουργούν στην Ευρώπη (*Εικόνα 1.6*), 1.520 στην Αμερική, 29 στην Αφρική και 1 στην Ιαπωνία (*Εικόνα 1.7*).



Εικόνα 1.6: Χάρτης κατανομής βιοκλινών στην Ευρώπη [www.biobeds.org].

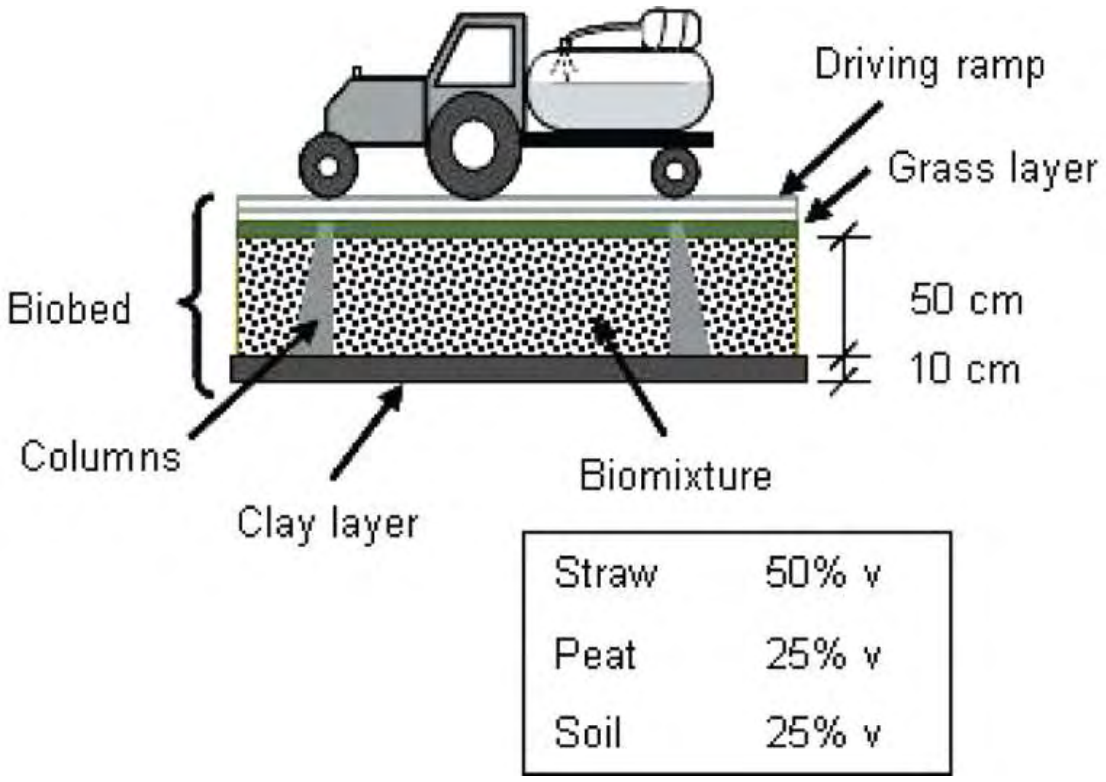
Στην Λατινική Αμερική, πολλές χώρες όπως το Περού, η Γουατεμάλα, η Κόστα Ρίκα και η Χιλή χρησιμοποιούν ήδη βιοκλίνες για τον περιορισμό της σημειακής ρύπανσης των υδάτινων πόρων με γεωργικά φάρμακα [Castillo et al., 2008]. Παρόλα αυτά η χρήση των βιοκλινών έχει εγκριθεί επίσημα μόνο στη Γουατεμάλα και τον Ισημερινό (5η Συνάντηση Biosciences της ΕΕ του Jens Husby 2016). Πολλαπλές έρευνες έχουν υπογραμμίσει την αποτελεσματικότητα των συστημάτων αυτών για την κατακράτηση και αποδόμηση των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων, με τελικό αποτέλεσμα την μειωμένη απορροή τους από την περιοχή ανάμιξης/έκπλυσης των ψεκαστικών [Fogg et. al, 2004(a), Fogg et. al, 2003(a)].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Εικόνα 1.7: Κατανομή συστημάτων βιοκλινών σε χώρες εκτός της Ευρώπης [www.biobeds.org].

Η βιοκλίνη αποτελεί απλή και χαμηλού κόστους κατασκευή στο αγρόκτημα (on-farm) [Castillo et. al, 2007], που προορίζεται να συγκρατήσει τα γεωργικά φάρμακα, ακόμη και υψηλές συγκεντρώσεις τους, σε μικρές επιφάνειες και να τα αποσυνθέσει. Το σύστημα είναι οικονομικά αποδοτικό, απαιτεί χαμηλές τεχνικές εισροές και χρησιμοποιεί υλικά άμεσα διαθέσιμα στον τελικό χρήστη [Fogg, et. al, 2004(c)]. Μπορεί να κατασκευαστεί στο αγρόκτημα χρησιμοποιώντας τοπικά διαθέσιμα υλικά, όπως για παράδειγμα άχυρο, κομπόστ και έδαφος [Góngora et. al, 2017, Fogg et. al, 2004(a)]. Στον αρχικό της σχεδιασμό αποτελείται από τρία βασικά τμήματα: ένα όρυγμα βάθους 60 cm στο έδαφος με μια αδιαπέραστη στρώση αργίλου (10 cm) στον πυθμένα. Ο όγκος του ορύγματος πληρούται με βιομίγμα, αποτελούμενο από άχυρο, τύρφη και έδαφος σε αναλογίες 50:25:25. Τέλος, ένα στρώμα γρασιδιού που καλύπτει την βιοκλίνη ρυθμίζει την υγρασία, πιθανώς με εξατμισοδιαπνοή [Castillo et. al, 2008]. Η βιοκλίνη μπορεί να είναι επίσης εξοπλισμένη με μια ράμπα για να επιτρέψει στον ψεκαστήρα να οδηγείται και να σταθμεύει πάνω από αυτή (*Εικόνα 1.8*).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση του αυθεντικού Σουηδικού συστήματος βιοκλίνη [Castillo et. al, 2008].

2.2 Τα υλικά της βιοκλίνης

Στρώμα αργίλου: Η άργιλος, με την χαμηλή διαπερατότητα και υψηλή ικανότητα προσρόφησης, χρησιμοποιείται ως αδιάβροχο στρώμα για να μειώσει τη ροή του νερού προς τα κάτω και να αυξήσει τον χρόνο κατακράτησης του γεωργικού φαρμάκου στην βιοκλίνη [Castillo et. al, 2008].

Στρώμα γρασιδιού: Συμβάλλει στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της βιοαποδόμησης από τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται εντός της βιοκλίνης. Βοηθά επίσης στην ρύθμιση της υγρασίας της βιοκλίνης και παράγει ριζικά εκκρίματα που υποστηρίζουν συμμεταβολικές διεργασίες. Η απουσία φυτοκάλυψης μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία μιας υδρόφοβης κρούστας στην επιφάνεια της βιοκλίνης, με μειωμένη μικροβιακή δραστηριότητα. [Castillo et. al, 2008].

Βιομίγμα: Η αποτελεσματικότητα των συστημάτων βιοκλινών βασίζεται σε αβιοτικές (προσρόφηση, χημική αποδόμηση) και βιοτικές (μικροβιακή αποδόμηση) διεργασίες [Góngora et. al, 2017], η ένταση των οποίων εξαρτάται από τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του βιομίγματος [De Wilde et. al, 2007].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Η απόδοση μιας βιοκλίνης προσδιορίζεται με βάση την ικανότητά της να επιτυγχάνει υψηλή προσρόφηση και ταυτόχρονα υψηλή βιολογική δραστηριότητα για μέγιστη αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων [Fogg et. al, 2003(a)]. Έτσι, μια βιοκλίνη θα πρέπει να έχει τρία σημαντικά χαρακτηριστικά: υψηλή ικανότητα προσρόφησης, πλούσια μικροβιακή κοινότητα για την βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων και πηγές οργανικού άνθρακα για την υποστήριξη της μικροβιακής δραστηριότητας [Coppola et. al, 2011]. Η προσρόφηση και η βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων από το βιομίγμα των βιοκλινών είναι συνάρτηση της σύνθεσης, της ομοιογένειας και της ηλικίας του βιομίγματος, καθώς και της υγρασίας και της θερμοκρασίας [Castillo et. al, 2008].

2.3 Σύσταση του βιομίγματος

Κατά το σχεδιασμό μιας βιοκλίνης, εκτός από τις βασικές τεχνικές πτυχές, τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση του βιομίγματος αποτελούν κλειδί για τις επιδόσεις των αβιοτικών και βιοτικών διεργασιών που ελέγχουν την απομάκρυνση των γεωργικών φαρμάκων [Góngora et. al, 2017]. Η σύνθεση και ο τύπος του οργανικού υλικού που υπάρχει στην βιοκλίνη είναι ζωτικής σημασίας για τη κατακράτηση των γεωργικών φαρμάκων, καθώς και για τους πληθυσμούς, την δράση και την ποικιλότητα των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι για την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους [Castillo et. al, 2007, Coppola et. al, 2007].

Εικόνα 1.9: Τα συστατικά του σουηδικού βιομίγματος: άχυρο, τύρφη & έδαφος.

Το αρχικό σουηδικό βιομίγμα που χρησιμοποιούνταν για την πλήρωση του σουηδικού τύπου βιοκλινών αποτελείται από άχυρο, τύρφη και έδαφος σε αναλογίες 50:25:25% κατ'όγκο (*Εικόνα 1.9*). Κάθε συστατικό του βιομίγματος παίζει σημαντικό ρόλο:

Το άχυρο είναι το κύριο υπόστρωμα για την μικροβιακή δραστηριότητα, ειδικά για μύκητες που αποδομούν την λιγνίνη (π.χ. μύκητες λευκής σήψης) και οι οποίοι παράγουν φαινολοξειδάσες (υπεροξειδάσες και λακκάσες). Η χαμηλή εξειδίκευση αυτών των ενζύμων τα καθιστά κατάλληλα για αποδόμηση μιγμάτων γεωργικών φαρμάκων [Castillo et. al, 2008]. Η υψηλή διαθεσιμότητα εναλλακτικών λιγνοκυτταρινικών υλικών σε διαφορετικές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

περιοχές, με μειωμένο ή μηδενικό κόστος, οδήγησε στην μερική ή ολική αντικατάσταση του άχυρου από άλλα λιγνιοκυτταρινούχα υλικά όπως ο ηλίανθος, υπολείμματα καλλιεργειών, φύλλα ελιάς, μίσχοι σταφυλιών, φλούδες πορτοκαλιού, στάχια καλαμποκιού, εξαντλημένα υποστρώματα μανιταριών, φελλός, κλαδιά αμπέλου και άλλα, για τα οποία έχει καταγραφεί ικανοποιητική αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων (Karanasios et. al. 2010b, Coppola et. al. 2010, Karas et. al. 2016, Pinto et. al. 2016).

Η τύρφη στο βιομίγμα συμβάλλει στην ικανότητα προσρόφησης, τον έλεγχο της υγρασίας, στην αβιοτική αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων και μειώνει το pH του βιομίγματος. Η υψηλή περιεκτικότητα σε τύρφη προσφέρει έτσι ένα χαμηλό pH ευνοϊκό για τους μύκητες [Castillo et. al, 2008]. Ωστόσο, η χρήση τύρφης έχει επικριθεί λόγω του σχετικά υψηλού κόστους και της περιορισμένης διαθεσιμότητάς της, ειδικά στη νότια Ευρώπη [Coppola et al., 2007]. Μελέτες δείχνουν ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αγροτικά κομπόστ αντί τύρφης, καθώς είναι γνωστό ότι υποστηρίζουν μια πλούσια μικροβιακή κοινότητα με διαφορετικές δυνατότητες αποδόμησης γεωργικών φαρμάκων και έχει αποδειχθεί ότι έχουν καλή ικανότητα προσρόφησης για μια μεγάλη ποικιλία γεωργικών φαρμάκων [Monaci et al., 2009, Vischetti et al., 2004]. Παρόλα αυτά πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα κομπόστ και η τύρφη διαφέρουν ουσιαστικά σε φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και βιολογική δραστηριότητα [Niklasch and Joergensen, 2001]. Υποκατάστατο της τύρφης θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει το εξαντλημένο υπόστρωμα ανάπτυξης μανιταριών (SMS) του εδώδιμου μύκητα *P. ostreatus* [Karanasios et al., 2010], εξαιρετικά αποτελεσματικό στην αποδόμηση μιγμάτων γεωργικών φαρμάκων, με τα ποσοστά αποδόμησης να συσχετίζονται με την αναλογία του SMS στο βιομίγμα.

Το έδαφος αποτελεί την πιο σημαντική πηγή μικροοργανισμών που αποδομούν τα γεωργικά φάρμακα, ειδικά βακτηρίων ικανών να αποδομούν αυτές τις χημικές ουσίες. Για το έδαφος, φυσικοχημικές παράμετροι όπως το pH, η περιεκτικότητα σε οργανική ουσία, η υγρασία, η θερμοκρασία και άλλοι παράγοντες είναι σημαντικοί για την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων [Góngora et. al, 2017].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

2.4 Τροποποιήσεις του συστήματος βιοκλινών σε διάφορες χώρες

Από την πρώτη εισαγωγή στη Σουηδία το αρχικό σύστημα των βιοκλινών τροποποιήθηκε για να ικανοποιήσει τις τοπικές ανάγκες και γεωργικές πρακτικές. Τα αποτελέσματα αυτής της εξέλιξης ήταν η ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος τροποποιημένων συστημάτων που ονομάζονται Phytobac (Γαλλία), Biofilters (Βέλγιο, Pussemier et al., 2004) και Biomassbed (Ιταλία, Vischetti et al., 2004). Ωστόσο, όλα αυτά τα συστήματα θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: α) Άμεσου Τύπου βιοκλίνες που περιλαμβάνει την αρχική σουηδική βιοκλίνη, όπου όλα τα υγρά απόβλητα που παράγονται, καταλήγουν απευθείας στην βιοκλίνη και β) Έμμεσου Τύπου βιοκλίνες που περιλαμβάνει βιοκλίνες του Ηνωμένου Βασιλείου, τα Phytobacs και τα Biofilters (*Εικόνα 1.10*). Σε αυτά τα συστήματα τα υγρά απόβλητα συλλέγονται αρχικά σε μία διαμορφωμένη περιοχή συλλογής και αφού αποθηκευτούν εάν χρειαστεί στην συνέχεια διοχετεύονται στην βιοκλίνη μέσω κατάλληλου συστήματος αντλιών [Castillo et. al, 2007, Góngora et. al, 2017]. Τα τελευταία έμμεσα συστήματα έχουν την δυνατότητα να χειρίζονται μεγαλύτερες ποσότητες υγρών αποβλήτων σε σύγκριση με τα άμεσου τύπου συστήματα τα οποία αρχικά κατασκευάστηκαν για να δέχονται μόνο διαρροές που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια προετοιμασίας ψεκασμών [De Wilde et al., 2007].

Εικόνα 1.10: Φωτογραφίες των κύριων τύπων συστημάτων βιοκλινών στην Ευρώπη.
α) Σουηδική βιοκλίνη, β) Biomassbed (Ιταλία), γ) Phytobac (Γαλλία) και δ) Biofilters (Βέλγιο).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

2.5 Άλλες εφαρμογές συστημάτων βιοκλινών

Πολλές άλλες μεταποιητικές βιομηχανίες παράγουν υγρά απόβλητα επιβαρυμένα με υψηλά φορτία γεωργικών φαρμάκων. Η ανάπτυξη συστημάτων επεξεργασίας των συγκεκριμένων αποβλήτων εξακολουθεί να εκκρεμεί και οι βιοκλίνες θα μπορούσαν να αποτελέσουν πολύτιμη λύση σε αυτές τις περιπτώσεις. Παραδείγματα βιομηχανιών οι οποίες παράγουν εκροές προοριζόμενες για επεξεργασία από βιοκλίνες είναι: α) οι βιομηχανίες παραγωγής σπόρων (π.χ. βαμβακιού) οι οποίες εκτελούν επικάλυψη σπόρων με μυκητοκτόνα, β) μονάδες επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών (συσκευαστήρια) και γ) μονάδες επεξεργασίας πολλαπλασιαστικού υλικού καλλωπιστικών, όπου γίνεται εμβάπτιση των βολβών σε υδατικά διαλύματα μυκητοκτόνων.

2.6 Το βιομίγμα βιοκλινών ως στόχος μεταγονιδιωματικής ανάλυσης

Τα συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων γεωργικής προέλευσης που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων αποτελούν μία βιώσιμη επιλογή όσον αφορά την πρόληψη της ρύπανσης του εδάφους και των υδάτινων συστημάτων από γεωργικά φάρμακα [Góngora et. al, 2017]. Σε τέτοια συστήματα, η επαναλαμβανόμενη απόρριψη συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων μέσω υγρών αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα ποσοστά διάσπασης λόγω της προσαρμογής συγκεκριμένων μικροοργανισμών, οι οποίοι αναπτύσσουν κατάλληλους ενζυμικούς μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να χρησιμοποιούν τα γεωργικά φάρμακα ως πηγή ενέργειας [Fogg et. al, 2003(b)].

Οι περισσότερες από τις γνώσεις μας σχετικά με το πως αποδομούνται οι ρύποι στο περιβάλλον έχουν ληφθεί από εργαστηριακές έρευνες χρησιμοποιώντας απομονωμένους μικροοργανισμούς ή κοινότητες-μοντέλα που αποδομούν ρύπους και μπορούν να καλλιεργηθούν σε γνωστά θρεπτικά μέσα. Παρόλα αυτά σήμερα είναι πλήρως τεκμηριωμένο ότι μόνο το 1-5% των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο περιβάλλον μπορούν να καλλιεργηθούν στα σήμερα γνωστά θρεπτικά μέσα. Η χρήση μοριακών μεθόδων για την διερεύνηση της λειτουργικής ποικιλότητας που κρύβει το 95% των μικροοργανισμών που δεν καλλιεργούνται θα αποτελούσε ένα σημαντικό βήμα για την εκμετάλλευση αυτής της πλούσιας γενετικής δεξαμενής από την βιοτεχνολογία. Στο πλαίσιο αυτό, η μεταγονιδιωματική ανάλυση επιτρέπει τον εντοπισμό νέων ενζύμων μικροβιακής προέλευσης, απευθείας από τα περιβαλλοντικά υποστρώματα χωρίς να απαιτείται η καλλιέργεια του μικροοργανισμού που κατέχει το συγκεκριμένο ένζυμο [Brennerova et. al, 2009, Ferrer et. al, 2016].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Το βιομίγμα των βιοκλινών λόγω της συχνότατης έκθεσης του στα γεωργικά φάρμακα και της ιδιαίτερα πλούσιας μικροβιακής κοινότητας που υποστηρίζει, αποτελεί έναν ιδανικό στόχο για μεταγονιδιωματική ανάλυση με σκοπό την απομόνωση ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων. Η μικροβιακή κοινότητα των βιοκλινών, λόγω της παρατεταμένης έκθεσής της σε γεωργικά φάρμακα, αναμένεται να έχει προσαρμόσει τους ενζυμικούς μηχανισμούς της για την αποδόμηση των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων. Επί του παρόντος υπάρχει μεγάλη ζήτηση για ενζυμικούς βιοκαταλύτες με τη μορφή ελεύθερων ή ακινητοποιημένων ενζύμων, ολόκληρων κυττάρων καταλυτών ή συστημάτων απαλλαγμένων από κύτταρα, που έχουν υψηλές επιδόσεις διεργασιών και αποτελούν "πράσινες" εναλλακτικές και τα περιβαλλοντικά ένζυμα μπορεί να εισαχθούν επιτυχώς στην αγορά ως τέτοιες εναλλακτικές [Brennerova et. al, 2009, Ferrer et. al, 2016].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

3. Μεταγονιδιωματική

Οι μικροοργανισμοί διαδραματίζουν ουσιώδη ρόλο για όλη τη ζωή στη γη. Απαντώνται σχεδόν σε όλους τους βιότοπους που υπάρχουν στη φύση, ακόμα και σε ακραία περιβάλλοντα, όπως είναι οι πόλοι ή οι έρημοι. Η ύπαρξή τους είναι ζωτικής σημασίας για την ανθρώπινη υγεία και διατροφή, την οικολογία, την υγεία του εδάφους και των υδάτων [Rondon et. al., 2000, Henne et. al., 1999, Handelsman, 2004]. Περισσότερο από το 99% των μικροοργανισμών στη φύση δεν μπορεί να καλλιεργηθεί και άρα δεν μπορεί να μελετηθεί με τις κλασικές μεθόδους μικροβιολογίας [Suenaga et. al, 2007]. Μέχρι σήμερα, περίπου 11.000 είδη βακτηρίων και αρχαίων έχουν περιγραφεί. Ωστόσο, με τον τρέχοντα ρυθμό των 600 νέων περιγραφών ετησίως θα χρειαζόταν περισσότερα από 1.000 χρόνια για να ταξινομηθούν τα ήδη γνωστά μικροβιακά είδη [Ferrer et. al, 2016]. Συνεπώς, παραμένει άγνωστο πόσος καιρός θα χρειαζόταν για τη διερεύνηση των γονιδιωματικών πληροφοριών και του ενζυματικού οπλοστασίου αυτών των μικροβιακών ειδών. Έτσι παρά το ότι η μικροβιακή ποικιλότητα αποτελεί ακόμη και σήμερα την σημαντικότερη δεξαμενή γενετικού υλικού για την βιοτεχνολογία, η εκμετάλλευση της έχει περιοριστεί μόνο σε μικροοργανισμούς που μπορούν να καλλιεργηθούν σε γνωστά θρεπτικά μέσα. Πρόσφατες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές που δεν απαιτούσαν την καλλιέργεια των μικροοργανισμών έδειξαν ότι τα γονίδια που απομονώνονται από καλλιεργούμενους μικροοργανισμούς και εμπλέκονται στην αποδόμηση αρωματικών ενώσεων δεν αποδίδουν πλήρως την λειτουργική ποικιλότητα που υπάρχει στο περιβάλλον [Brennerova et. al, 2009, Henne et. al., 1999]. Η πλήρης εκμετάλλευση της λειτουργικής ποικιλότητας των μικροοργανισμών μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση της μεταγονιδιωματικής [Schloss and Handelsman, 2003, Streit and Schmitz, 2004] .

Η μεταγονιδιωματική παρέχει έναν νέο τρόπο εξέτασης του μικροβιακού κόσμου. Συνδυάζει τη δύναμη της γονιδιωματικής, της βιοπληροφορικής και της βιολογίας των συστημάτων. Λειτουργικά, είναι καινοφανής στο ότι περιλαμβάνει τη μελέτη των γονιδιωμάτων πολλών οργανισμών ταυτόχρονα, παρακάμπτοντας την ανάγκη απομόνωσης και καλλιέργειας μεμονωμένων μελών της βακτηριακής κοινότητας, όπως γίνεται παραδοσιακά. Στην πραγματικότητα, η λειτουργική απεικόνιση μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων γονιδίων που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, εστερικές και γλυκοζυλ-υδρολάσες, οξειδάσες και επίσης δίνονται ενδείξεις σχετικά με την ποικιλότητα των διοξυγενασών της εξτραδιόλης και άλλων μεγάλης περιβαλλοντικής σημασίας ενζύμων [Brennerova et. al, 2009, Streit and Schmitz, 2004].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

3.1 Τι είναι η μεταγονιδιωματική

Όπως και η γονιδιωματική, η μεταγονιδιωματική είναι ένα σύνολο τεχνικών έρευνας, που περιλαμβάνει πολλές σχετικές προσεγγίσεις και μεθόδους, καθώς και ένα ερευνητικό πεδίο. Στην ελληνική γλώσσα, το πρώτο συνθετικό της λέξης, το μετα-, σημαίνει «υπερβατικό». Με την προσέγγιση και τις μεθόδους της, η μεταγονιδιωματική ξεπερνά τα δίδυμα προβλήματα της αδυναμίας καλλιέργειας και της γονιδιωματικής ποικιλότητας των περισσότερων μικροοργανισμών, τα μεγαλύτερα εμπόδια στην πρόοδο της κλινικής και περιβαλλοντικής μικροβιολογίας [Schloss and Handelsman, 2003]. Έτσι, η μεταγονιδιωματική είναι η μελέτη ολόκληρου του γενετικού περιεχομένου, όλων των μικροοργανισμών σε ένα περιβαλλοντικό υπόστρωμα με τη αλληλούχιση ολόκληρου του μετα-γονιδιώματος. Η μεταγονιδιωματική επικεντρώνεται στην ανάλυση των μικροβιακών γονιδιωμάτων που περιέχονται σε διάφορα περιβάλλοντα όπως το ανθρώπινο ή ζωικό έντερο, το έδαφος, το νερό και γεωθερμικές πηγές. Προσφέροντας άμεση πρόσβαση σε ολόκληρη τη γενετική πληροφορία των μικροβιακών κοινοτήτων, η μεταγονιδιωματική μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση νέων ενζύμων και βιοκαταλυτών με άμεση βιομηχανική εφαρμογή [Berry et. al, 2003, Steele and Streit, 2005].

Ο όρος «μεταγονιδιωματική» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από την ομάδα του Jo Handelsman το 1988. Μια νέα και πλέον ευρύτερα αποδεκτή έννοια του όρου μεταγονιδιωματική προέκυψε ως αποτέλεσμα των δύο μελετών που δημοσίευσαν το 2004 οι Tyson και Venter, όπου περιγράφουν την εφαρμογή μαζικής αλληλούχισης όλου του μεταγονιδιώματος ενός περιβαλλοντικού δείγματος. Τα τελευταία έτη οι ταχύτατες εξελίξεις με την εμφάνιση των νέων πλατφορμών αλληλούχισης νέας γενεάς και την σημαντική μείωση του κόστους αλληλούχισης έχουν επιταχύνει δραματικά την ανάπτυξη της βασιζόμενης σε αλληλούχιση μεταγονιδιωματικής. Με βάση τα παραπάνω, παρά το ότι η μεταγονιδιωματική αποτελεί νέο επιστημονικό κλάδο, έχει ήδη παράγει πλούσια γνώση που μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην βιοτεχνολογία και την βιομηχανία γενικότερα [Torsten et. al, 2012].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

3.2 Λειτουργική μεταγονιδιωματική – μεταγονιδιωματική με βάση την αλληλούχιση

Όλες οι μελέτες μεταγονιδιωματικής ξεκινούν με το ίδιο πρώτο βήμα: Το DNA εκχυλίζεται από τα περιβαλλοντικά δείγματα και στη συνέχεια μπορεί να αλληλουχηθεί είτε απευθείας (μεταγονιδιωματική με βάση την αλληλούχιση) ή να κλωνοποιηθεί σε κατάλληλους φορείς και ακολούθως η βιβλιοθήκη κλώνων που θα δημιουργηθεί να αξιολογηθεί ως προς την επιθυμητή λειτουργία (λειτουργική μεταγονιδιωματική) (*Εικόνα 1.11*) [Schloss and Handelsman, 2003, Streit and Schmitz, 2004].

Α) Λειτουργική μεταγονιδιωματική:

Στην λειτουργική μεταγονιδιωματική, εκατομμύρια μεγάλου μοριακού βάρους θραύσματα DNA οργανώνονταν σε μια βιβλιοθήκη, η οποία στην συνέχεια μπορεί να μελετηθεί ως προς τον επιθυμητό φαινότυπο που αναζητείται (εστεράση, χιτινάση κλπ.) [Schloss and Handelsman, 2003, Streit and Schmitz, 2004].

Οι βιβλιοθήκες κλώνων που χρησιμοποιούνται στην λειτουργική μεταγονιδιωματική μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τα συστήματα έκφρασης. Τα συστήματα έκφρασης αποτελούν (α) φορείς με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που περιορίζουν το εύρος του ξενιστή, το μέγεθος του ενθέματος, τον αριθμό αντιγράφων και την αποδοτικότητα μετασχηματισμού και (β) οργανισμοί-ξενιστές που μεταφέρουν και εκφράζουν τις γενετικές πληροφορίες που κωδικοποιούνται από τον φορέα [Taupp et. al, 2011].

α) Φορείς: Οι φορείς διαφέρουν ως προς το μέγεθος του ενθέματος το οποίο μπορούν να περιλάβουν. Έτσι υπάρχουν φορείς μικρού ενθέματος (έως 10 kb) που αποτελούν κυρίως πλασμίδια. Η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού με φορείς πλασμίδια είναι υψηλή, αλλά λόγω του μικρού ενθέματος συνήθως είναι χρήσιμα μόνο σε περιπτώσεις όπου ο επιθυμητός φαινότυπος ελέγχεται από ένα ή γενικά μικρό αριθμό γονιδίων που μπορούν να περιέχονται σε ένα ένθεμα 5-10 kbs [Streit and Schmitz, 2004].

Για βιβλιοθήκες μεγάλων ενθεμάτων χρησιμοποιούνται φορείς χαμηλής αντιγραφής ή φορείς επαγόμενου ελέγχου αντιγραφής, όπως φοσμίδια, κοσμίδια και βακτηριακά τεχνητά χρωμοσώματα (BACS). Οι φοσμιδιακές βιβλιοθήκες με μεγέθη ενθέματος που κυμαίνονται μεταξύ 32 και 45 kb συσκευάζονται σε εκχυλίσματα φάγου λ και προσροφώνται απευθείας στα κύτταρα ξενιστές. Παρά το ότι η αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού των μεμονωμένων κλώνων φοσμιδίου είναι χαμηλή, η χρήση φάγων καθιστά αποτελεσματική την δημιουργία της βιβλιοθήκης. Το μεγαλύτερο μέγεθος του ενθέματος των φοσμιδιακών ή BACs φορέων επιτρέπει την έκφραση ολοκληρωμένων βιοσυνθετικών ή αποδομητικών μονοπατιών ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις δίνει την δυνατότητα για την εξαγωγή και ταξινομικών πληροφοριών, λόγω της παρουσίας επί του ενθέματος και ενδογενών γονιδίων (π.χ .16S rRNA, gyrB). Θα πρέπει να τονιστεί ότι η χρήση των BACs φορεών είναι περιορισμένη λόγω προβλημάτων που έχουν παρατηρηθεί με την έκφραση των γονιδίων που περιέχονται στους συγκεκριμένους φορείς [Rondon et. al. 1999, Streit and Schmitz, 2004, Rolf, 2004, Berry et. al. 2003, Be´ja`, 2004].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

β) Ξενιστές: Επί του παρόντος, το *E. coli* αποτελεί τον κύριο μικροοργανισμό-ξενιστή για την αξιολόγηση βιβλιοθηκών λειτουργικής μεταγονιδιωματικής. Πολυάριθμα στελέχη *E. coli* έχουν κατασκευαστεί ώστε να επιτρέπουν σταθερή αναπαραγωγή διαφόρων μονής αντιγραφής ή πολλαπλών αντιγράφων φορέων, ελάχιστο ανασυνδυασμό και προστασία από τον λυτικό φάγο. Η κατάσταση χαμηλού αριθμού αντιγράφων των φοσμιδίων ή των BACs εντός του *E. coli* προάγει σταθερή αναπαραγωγή και ελαχιστοποιεί την υπερέκφραση τοξικών γονιδίων. Ωστόσο, τα ίδια χαρακτηριστικά που κάνουν κλώνους με μεγάλα ενθέματα χρήσιμους για γονιδιωματική αλληλούχιση, μπορεί να αποτελέσουν μειονέκτημα στην αναζήτηση λειτουργίας εντός μιας μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Σήμερα πλέον έχουν αναπτυχθεί συστήματα ελέγχου αντιγραφής επιτρέποντας την επαγωγή κατά παραγγελία ενθέματος φοσμιδίου ή BAC [Rondon et. al. 1999, Streit and Schmitz, 2004, Steele et. al., 2005].

Το *E. coli* ως σύστημα έκφρασης μπορεί να υποστηρίξει την έκφραση γονιδίων από πολλά γονιδιώματα δοτών, όμως ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων δεν μπορεί να εκφραστεί λόγω των διαφορικών μεταγραφικών, μεταφραστικών ή μετα-μεταφραστικών ελέγχων. Μελέτες *in silico* έδειξαν ότι το *E. coli* μπορεί να υποστηρίξει την έκφραση περίπου 40% των γονιδίων μέσα σε ένα υποσύνολο από 32 ταξινομικά διαφορετικά γονιδιώματα. Για την επίλυση του συγκεκριμένου προβλήματος έχουν αξιολογηθεί διάφοροι άλλοι μικροοργανισμοί ως ξενιστές για την αξιολόγηση μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών αλλά και διαφορετικοί φορείς που να δίνουν την δυνατότητα έκφρασης σε ένα μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων πέραν του 40% που έχει εκτιμηθεί αρχικά [Taupp et. al, 2011].

Μέθοδοι διαλογής κλώνων με επιθυμητά χαρακτηριστικά:

Η διαλογή των κλώνων με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά βασίζεται κυρίως σε φαινοτυπικές δοκιμές με απλά υποστρώματα βάση της ενζυμικής δραστικότητας των κλώνων της βιβλιοθήκης. Ωστόσο, το ποσοστό επιτυχίας στην ανεύρεση θετικών στο φαινότυπο-στόχο κλώνων, εξαρτάται από τον φαινότυπο που έχει επιλεχθεί (π.χ. δράση λιπάσης) και από τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές επιλογής [Taupp et. al, 2011].

Το επίπεδο αφθονίας των αντίστοιχων γονιδίων που κωδικοποιούν τις ενζυμικές δραστηριότητες ενδιαφέροντος σε μικροβιακά γονιδιώματα και το επίπεδο δραστηριότητας των ενζύμων είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των διαδικασιών διαλογής. Άλλοι βασικοί δυνητικοί παράγοντες, όπως η πηγή του μεταγονιδιώματος, η μέθοδος εκχύλισης DNA, ο φορέας κλωνοποίησης, το σύστημα έκφρασης ή τα κύτταρα ξενιστές, η τεχνική διαλογής και οι συνθήκες διαλογής, μπορούν να επηρεάζουν την επιτυχία της διαδικασίας ταυτοποίησης του ενζύμου. Σε απλά προγράμματα διαλογής, το υπόστρωμα μπορεί να συμβάλει μεροληπτικά στην επιλογή των δραστηριοτήτων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Σαφώς, η επιλογή του κατάλληλου υποστρώματος συνιστάται ιδιαίτερα. Είναι επίσης πιθανό ότι οι συνθήκες διαλογής συμβάλουν μεροληπτικά στο ρυθμό επιτυχίας, ειδικά όταν οι βιβλιοθήκες κλώνων δημιουργηθούν από μικροβιακές κοινότητες που κατοικούν σε ακραία ενδιαιτήματα. Επομένως, πρέπει να μελετώνται οι φυσικοχημικές παράμετροι για την επιλογή της

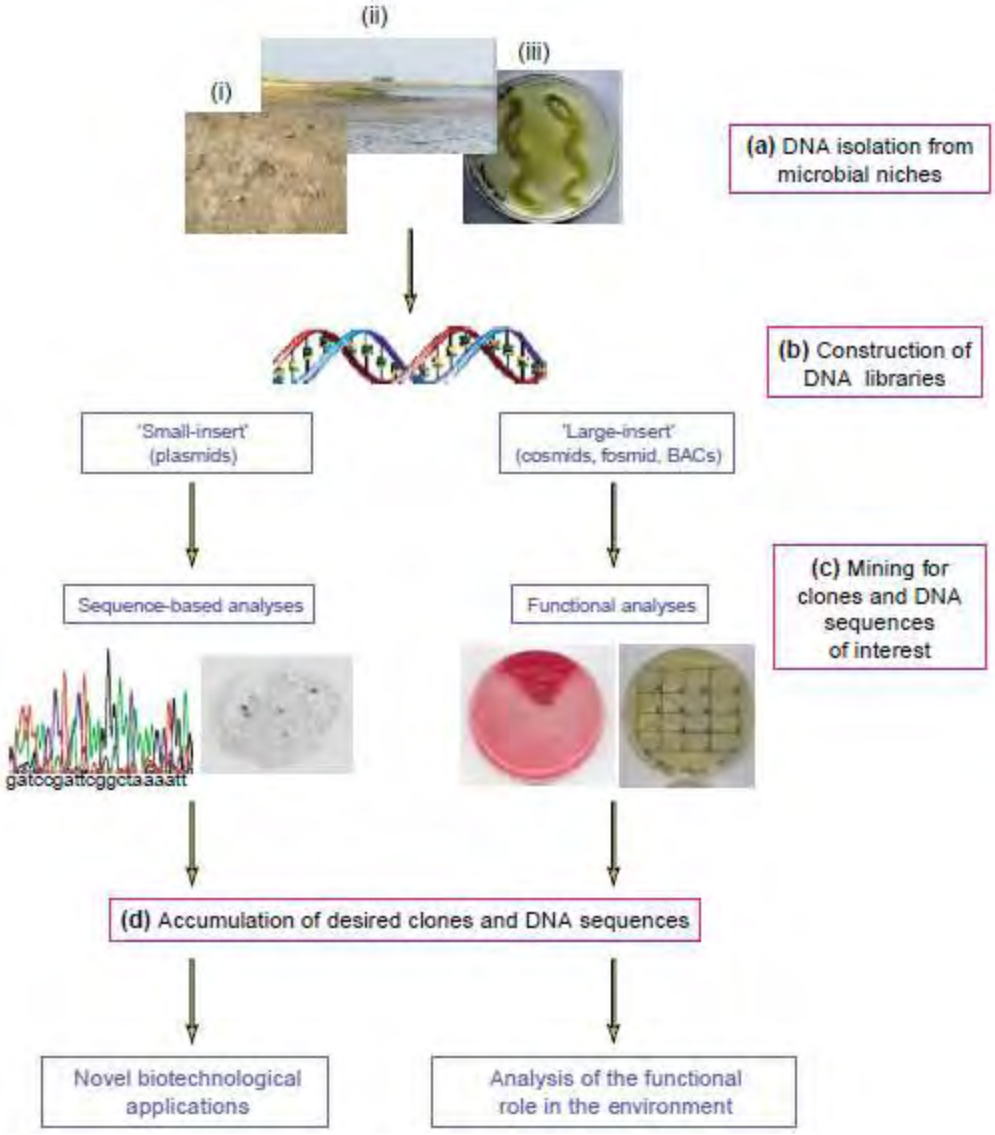
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

μεθόδου διαλογής. Επιπλέον εάν το σήμα-προς-θόρυβο που σχετίζεται με την ανίχνευση αποικιών είναι χαμηλό, οι ασθενώς εκφραζόμενοι θετικοί κλώνοι συχνά χάνονται [Ferrer et. al, 2016, Taupp et. al, 2011].

Β) Μεταγονιδιωματική με βάση την αλληλούχιση:

Η μεταγονιδιωματική με βάση την αλληλούχιση περιλαμβάνει την αλληλούχιση του ολικού DNA που απομονώνεται από ένα περιβαλλοντικό δείγμα. Ακολουθεί επεξεργασία των δεδομένων με κατάλληλα εργαλεία βιοπληροφορικής που επιτρέπουν την συναρμολόγηση μεγάλων ικριωμάτων DNA που αποτυπώνουν τμήματα του γονιδιώματος μικροοργανισμών του συγκεκριμένου περιβαλλοντικού δείγματος. Στα ικριώματα που έχουν σχηματιστεί πραγματοποιείται λειτουργική ανάθεση σε κάθε γονίδιο. Γονίδια με ιδιαίτερο λειτουργικό ενδιαφέρον μπορούν να μελετηθούν περαιτέρω. Η προσέγγιση μεταγονιδιωματικής με βάση την αλληλούχιση έχει ήδη εφαρμοστεί σε πολλά περιβάλλοντα, όπως ο ωκεανός, πολλά εδάφη, κοραλλιογενείς υφάλους και θερμές πηγές. Οι μικροβιακές κοινότητες που σχετίζονται με διαφορετικούς οργανισμούς - συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, τερμίτες, αφίδες και σκουλήκια - έχουν μελετηθεί [Schloss and Handelsman, 2003].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87



Εικόνα 1.11: Μεταγονιδιωματική με βάση την αλληλούχιση (δεξιά) και Λειτουργική Μεταγονιδιωματική (αριστερά). (α) Απομόνωση DNA από (i) εδάφη, (ii) ιζήματα ή (iii) εργαστηριακούς εμπλουτισμούς, (β) Κατασκευή βιβλιοθηκών DNA. (γ) Εξόρυξη κλώνων και αλληλουχιών DNA με ενδιαφέρον και (δ) συσσώρευση επιθυμητών κλώνων και DNA αλληλούχιση [Streit and Schmitz, 2004].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την μεταγονιδιωματική ανάλυση

Το υλικό έναρξης για μια μελέτη μεταγονιδιωματικής είναι το ολικό DNA που μπορεί να περιλαμβάνει βακτήρια, αρχαία, ευκαρυωτικά και ιικά είδη σε διαφορετικά επίπεδα ποικιλότητας και αφθονίας. Η επεξεργασία των δειγμάτων είναι το πρώτο και πιο κρίσιμο βήμα οποιασδήποτε μελέτης μεταγονιδιωματικής. Το DNA που θα εκχυλιστεί θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό όλων των κυττάρων που υπάρχουν στο δείγμα. Η επεξεργασία απαιτεί ειδικά πρωτόκολλα για κάθε τύπο δείγματος και διάφορες αξιόλογες μέθοδοι απομόνωσης του DNA είναι διαθέσιμες. Η ποιότητα και η πληρότητα των δεδομένων που λαμβάνονται από μεταγονιδιωματική ανάλυση οποιασδήποτε κοινότητας θα είναι τόσο καλή όσο οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση του DNA από ένα περιβαλλοντικό δείγμα. [Torsten et. al, 2012].

Ο προσδιορισμός του καλύτερου τρόπου δειγματοληψίας μιας μικροβιακής κοινότητας για τη μεταγονιδιωματική είναι επίσης γεμάτος προκλήσεις. Για να ληφθούν αντιπροσωπευτικά δείγματα, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η κλίμακα και το εύρος των μεταβολών στο περιβάλλον που μελετάται. Οι μεταβολές στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας σε ένα περιβάλλον με την πάροδο του χρόνου είναι μία από τις πιο ενδιαφέρουσες πτυχές των κοινοτήτων και η ανταπόκρισή τους στις μεταβαλλόμενες συνθήκες αποτελεί κλειδί για την κατανόηση της δομής, της λειτουργίας και της ευρωστίας της κοινότητας. Οι κοινότητες των εδαφών, για παράδειγμα, μεταβάλλονται σε κλίμακα μικρομέτρων, ακολουθώντας τη φυσική και χημική ετερογένεια των συστατικών του εδάφους [Taupp et. al, 2011].

Δείγματα χαμηλής βιομάζα που συντέθηκαν από την παρουσία ανασταλτικών ουσιών μπορεί επίσης να βλάψουν την κατασκευή μιας μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Οι καλλιέργειες εμπλουτισμού προσφέρουν μια στρατηγική για να αυξάνουν επιλεκτικά τη βιομάζα που σχετίζεται με ένα επιθυμητό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό με ταυτόχρονη μείωση των ανασταλτικών ουσιών [Taupp et. al, 2011].

Υπάρχουν κυριολεκτικά εκατομμύρια πιθανών ερευνητικών προσεγγίσεων μεταγονιδιωματικής και άρα τεράστιες ποσότητες αλληλουχίας DNA και λειτουργικών δεδομένων. Οι καινοτομίες στην ανάπτυξη εναλλακτικών τεχνολογιών προσδιορισμού αλληλουχίας εμφανίστηκαν υποσχόμενες μια σημαντικά υψηλότερη απόδοση και σημαντικά μειωμένο κόστος αλληλούχισης, παρέχοντας έτσι την απαραίτητη πλατφόρμα για ακόμη ταχύτερη απόκτηση μεταγονιδιωματικών δεδομένων. Αυτές οι νέες τεχνολογίες αλληλούχισης (γνωστές ως τεχνολογίες νέας γενεάς), μερικές από τις οποίες χρησιμοποιούνται ήδη ευρέως (όπως Illumina Hiseq, Miseq, Pacific Biosciences, Nanopore) θα καθορίσουν το μέλλον της μεταγονιδιωματικής. Η πρόσφατη επανάσταση στις τεχνολογίες ανάλυση αλληλουχιών DNA υψηλής απόδοσης έχει οδηγήσει σε σημαντική μείωση του κόστους της αλληλούχισης, οδηγώντας σε έκρηξη της in silico παραγωγής δεδομένων και τη δραματική επέκταση των βάσεων δεδομένων. Παρόλα αυτά, απαιτείται οι τεχνολογίες αλληλούχισης να εξελίσσονται ολοένα και περισσότερο και ο σχεδιασμός κατάλληλων εργαλείων βιοπληροφορικής ανάλυσης όλων αυτών των δεδομένων και για την σωστή και εύκολη αξιοποίησή τους [Ferrer et. al, 2016, Torsten et. al, 2012, Cowan et. al, 2004].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

3.4 Συνεισφορά της μεταγονιδιωματικής

Εμφανής είναι η συνεισφορά της μεταγονιδιωματικής σε διάφορα πεδία. Η περιγραφή, σε παγκόσμια κλίμακα, του ρόλου του ανθρώπινου μικροβιώματος στην υγεία και στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών διάγνωσης και θεραπείας αποτελεί την συνεισφορά της στις βιοϊατρικές επιστήμες. Μια άλλη εφαρμογή της αφορά την ανάπτυξη μικροβιακών συστημάτων και διεργασιών για νέους πόρους βιοενέργειας πιο οικονομικούς και περιβαλλοντικά βιώσιμους, καθώς και την ανάπτυξη εργαλείων για την παρακολούθηση περιβαλλοντικών αλλαγών σε όλα τα επίπεδα και μεθόδους με βάση τα μικρόβια για την αποκατάσταση υγιών οικοσυστημάτων. Όσο αφορά τον γεωργικό τομέα, η μεταγονιδιωματική έχει συμβάλλει στην ανάπτυξη αποτελεσματικότερων μεθόδων για την έγκαιρη ανίχνευση απειλών κατά την παραγωγή τροφίμων και στην ασφάλεια των τροφίμων. Τέλος, ο προσδιορισμός και αξιοποίηση των εξαιρετικά ευέλικτων και ποικίλων βιοσυνθετικών δυνατοτήτων των μικροβιακών κοινοτήτων για τη δημιουργία ωφέλιμων βιομηχανικών προϊόντων, τροφίμων και προϊόντων υγείας συνδέουν την μεταγονιδιωματική στενά με την βιοτεχνολογία [Steele and Streit, 2005].

3.5 Περιβαλλοντική μεταγονιδιωματική

Τα μεταγονιδώματα των μικροβιακών κοινοτήτων στο περιβάλλον μπορούν να οδηγήσουν στην απομόνωση νέων ενζυμικών συστημάτων, χρήσιμων στην παραγωγή βιοκαυσίμων, στην περιβαλλοντική αποκατάσταση και στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης. Η μικροβιακή ποικιλότητα σε οικότοπους όπως το έδαφος είναι σημαντικά υψηλότερη από οποιοδήποτε άλλο οικοσύστημα. Η ανάλυση του μεταγονιδιώματος του εδάφους μέχρι στιγμής έχει βοηθήσει στην αποκάλυψη νέων μικροβιακών πόρων, συμπεριλαμβανομένου ενός αριθμού μικροβιακών γονιδίων που κωδικοποιούν νέα ένζυμα ή βιοδραστικές ενώσεις [Knupp dos Santos et.al., 2015, Sulaiman et. al. (2012), Ohlhoff et. al., 2015]. Η μεταγονιδιωματική έχει οδηγήσει πρόσφατα και στην ανακάλυψη νέων ενζύμων που έχουν την δυνατότητα να αποδομούν πολύπλοκους οργανικούς ρύπους συμπεριλαμβανομένων και γεωργικών φαρμάκων:

1) <u>Καινοφανές ομόλογο κουτινάσης με ικανότητα διάσπασης Polyethylene-Terephthalate:</u>

Οι Sulaiman et. al. (2012) κατάφεραν να απομονώσουν ένα νέο ομόλογο κουτινάσης που διασπά Polyethylene-Terephthalate από κομπόστ φύλλων και κλαδιών μέσω λειτουργικής μεταγονιδιωματικής. Η κουτινάση (EC 3.1.1.74) είναι ένα λιπολυτικό/εστερολυτικό ένζυμο που υδρολύει υδατοδιαλυτούς εστέρες και αδιάλυτα τριγλυκερίδια. Η κουτινίνη έλαβε πρόσφατα μεγάλη προσοχή λόγω της ενδεχόμενης εφαρμογής της για επιφανειακή τροποποίηση και υποβάθμιση αλειφατικών και αρωματικών πολυεστέρων, ιδιαίτερα τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (PET), το οποίο είναι ένας συνθετικός αρωματικός πολυεστέρας αποτελούμενος από τερεφθαλικό οξύ (TPA) και αιθυλενογλυκόλη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε LC-κουτινάση (Leaf-branch Comrost) και αποτελείται από 293 αμινοξέα με μοριακή μάζα 31,494 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο (pI) 9,3. Αξιολόγηση της ομολογίας της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με γνωστές πρωτεΐνες στην βάση δεδομένων του NCBI έδειξε ότι η LC-κουτινάση παρουσιάζει σχετικά υψηλή ομολογία στην αλληλουχία της (54 έως 60 %) με λιπάσες της οικογένειας III, και κουτινάσες. Το PET χρησιμοποιείται ευρέως για βιομηχανικούς σκοπούς, κυρίως ως ίνες πολυεστέρα, δοχεία ποτών και συσκευασίες τροφίμων. Χαρακτηρίζεται από υψηλή αντοχή σε χημικές, φυσικές και μηχανικές ιδιότητες. Ωστόσο, χαμηλή υδροφιλικότητα, χαμηλή διαβρεξιμότητα και χαμηλή αύξηση υγρασίας των πολυεστερικών ινών προκαλούν διάφορα προβλήματα στην κατασκευή και στην καταναλωτική χρήση. Υδρόλυση και των ινών πολυεστέρα με λιπολυτικά και εστερολυτικά ένζυμα πιστεύεται ότι είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος βελτίωσης των επιφανειακών ιδιοτήτων των ινών πολυεστέρα.

2) Διοξυγενάσες εξτραδιόλης (EDO):

Οι διοξυγενάσες εξτραδιόλης (EDO) καταλύουν την διάσπαση του δακτυλίου κατεχολικών ενώσεων. Οι Suenaga et. αl. (2007) χρησιμοποίησαν λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση για τον εντοπισμό νέων καταβολικών οπερονίων που εμπλέκονται στην αποδόμηση αρωματικών ενώσεων που περιέχονται σε ενεργοποιημένη λάσπη. Συνολικά 38 κλώνοι της μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης που προηγουμένως είχαν εξεταστεί για την παρουσία EDO, υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση. Κάθε ένθεμα περιείχε τουλάχιστον ένα γονίδιο EDO και συνολικά 34 τέτοια γονίδια ταυτοποιήθηκαν. Περισσότερα από τα μισά ανήκαν σε μια νέα υποοικογένεια διοξυγενασών της εξτραδιόλης: I.1.C (2 κλώνοι), I.2.G (20 κλώνοι), I.3.M (2 κλώνοι) και I.3.N (1 κλώνος). Πραγματικά, αυτά τα νέα γονίδια της οικογένειας I.2.G υπερεκπροσωπούνταν σε αυτούς τους κλώνους, προτείνοντας ότι παίζουν ένα συγκεκριμένο ρόλο στην αποδόμηση αρωματικών ενώσεων στο συγκεκριμένο περιβάλλον.

3) Εξαρτώμενες της Φλαβίνης μονοξυγενάσες:

Οι Ajit Singh et. αl. (2010) εντόπισαν δύο εξαρτώμενες της φλαβίνης μονοξυγενάσες σε μια μεταγονιδιωματική βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε με ενεργοποιημένη λάσπη από μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Οι μονοξυγενάσες είναι σημαντικοί βιοκαταλύτες που εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της βιοαποδόμησης ή της αποτοξικοποίησης των αρωματικών ενώσεων και της βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών. Αυτά τα ένζυμα ταξινομούνται ευρέως ως μονοοξυγενάσες και διοξυγενάσες ανάλογα με το αν ενσωματώνουν ένα ή δύο άτομα οξυγόνου στο υπόστρωμα. Αρκετές διοξυγενάσες και μονοοξυγενάσες, έχουν αναφερθεί ότι καταλύουν την παραγωγή indigo και indirubin. Το Indigo είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες βαφές στις βιομηχανίες κλωστοϋφαντουργίας και εκτύπωσης. Η Indirubin, ένα κόκκινο δομικό ισομερές του indigo είναι ένα ενεργό συστατικό της παραδοσιακής κινεζικής ιατρικής που χρησιμοποιείται κατά της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας και έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδη δράση. Σε μια προσπάθεια να βρεθούν νέα ένζυμα που θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα στην παραγωγή χρωστικών, εξετάστηκε η παραπάνω

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

μεταγονιδιωματική βιβλιοθήκη, η οποία οδήγησε στον εντοπισμό δύο κλώνων που παρήγαγαν μπλε χρωστική όταν οι κλώνοι αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο LB. Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε μια πρώτη ένδειξη για την παρουσία στα ενθέματα των συγκεκριμένων κλώνων οξυγενασών, οι οποίες μετατρέπουν την ενδογενή ινδόλη που παράγεται σε *E. coli* σε indigo και indirubin. Η υποτιθέμενη πρωτεΐνη έδειξε 80% ταυτότητα με μια υποθετική πρωτεΐνη από το *Mesorhizobium loti* και 76-79% ταυτότητα με εξαρτώμενες της φλαβίνης μονοξυγενάσες.

3.6 Μεταγονιδιωματική και Βιοαποκατάσταση-Αποτοξικοποίηση

Μια "πράσινη" εναλλακτική για την αποκατάσταση περιβαλλοντικών υποστρωμάτων και οικοτόπων που έχουν ρυπανθεί με γεωργικά φάρμακα ή απόβλητα είναι η βιοαποκατάσταση. Η βιοαποκατάσταση ορίζεται ως η διαδικασία με την οποία οργανικοί ή ανόργανοι ρύποι υποβαθμίζονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες από μικροοργανισμούς ή ένζυμα τους προς λιγότερο τοξικές ή διαθέσιμες μορφές [De Wilde et. al, 2007, Mueller et al., 1996]. Η βιοαποκατάσταση βασίζεται στην ικανότητα των μικροοργανισμών να μετατρέπουν οργανικούς ρυπαντές σε απλές και μη επικίνδυνες ενώσεις και μπορεί να προσφέρει μια αποτελεσματική και οικονομική λύση για την αποκατάσταση οικοτόπων ρυπασμένων με γεωργικά φάρμακα [Singh and Walker, 2006, Vidali, 2001, Singleton, 1994, Blackburn and Hafker, 1993, Dua *et al.*, 2002].

Η συντριπτική πλειοψηφία των μικροοργανισμών που έχουν ταυτοποιηθεί ως αποδομητές γεωργικών φαρμάκων έχει απομονωθεί από εδάφη ρυπασμένα με γεωργικά φάρμακα [Ortiz Hernández et al., 2011]. Θεωρητικά, η ανάπτυξη της καταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών του εδάφους έναντι στα γεωργικά φάρμακα αποτελεί διαδικασία προσαρμογής και το διάστημα που χρειάζεται στους μικροοργανισμούς για να αναπτύξουν αυτή την ικανότητα αποικοδόμησης θα μπορούσε να αντανακλά: (I) αύξηση στην δραστικότητα αποδόμησης ενός περιορισμένου αριθμού ενδογενών μικροοργανισμών που βασίζεται στην αύξηση της έκφρασης ειδικών καταβολικών γονιδίων, (II) αύξηση του αριθμού των ενδογενών αποδομητών λόγω μικροβιακής ανάπτυξης και/ή οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, (III) εξέλιξη νέων ενζύμων αναγκαίων για τη χρήση των χημικών ως πηγή ενέργειας.

Σε γενικές γραμμές, οι μικροοργανισμοί του εδάφους προσαρμόζονται ταχύτατα στην αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων των οποίων η χημική δομή είναι παρόμοια με φυσικές ουσίες που απαντούν οι μικροογρανισμοί. Αντίθετα, γεωργικά φάρμακα με δομές διαφορετικές από τα περισσότερα φυσικά απαντώμενα μόρια συχνά αποδομούνται αργά, καθώς οι μικροοργανισμοί δεν διαθέτουν κατάλληλα γονίδια αποδόμησης ή χρειάζονται χρόνο για την ανάπτυξη νέων καταλυτικών ικανοτήτων. Στην τελευταία περίπτωση, η αποδόμηση από μη ειδικά ένζυμα μπορεί να συμβεί με αργό ρυθμό [Arbeli and Fuentes, 2007]. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις μετά την εισαγωγή του ξενοβιοτικού στο έδαφος, τα ποσοστά αποδόμησης θα μπορούσαν να επιταχυνθούν προφανώς λόγω της εξέλιξης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

μιας νέας οδού αποδόμησης [van der Meer, 1997, Seffernick and Wackett, 2001, Johnson and Spain, 2003].

Τα πλασμίδια παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διασπορά νέων καταβολικών γονιδίων [van der Meer and Sentchilo, 2003, Top and Springael, 2003]. Καταβολικά γονίδια έχουν εντοπιστεί πολύ συχνά σε τρανσποζόνια ή πλασμίδια τα οποία μπορούν να ελέγχουν την μεταφορά τους από το ένα βακτήριο στο άλλο προσδίδοντας στα βακτήρια-δέκτες πλεονέκτημα ως προς την ανάπτυξη τους σε οικοτόπους που εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ρύπανσης [Arbeli and Fuentes, 2007].

Οι μύκητες λευκής σήψης έχουν προταθεί ως πολλά υποσχόμενοι βιολογικοί παράγοντες βιοαποκατάστασης, ειδικά για ενώσεις που δεν αποδομούνται εύκολα από τα βακτήρια. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα που δρουν σε ένα ευρύ φάσμα αρωματικών οργανικών ενώσεων. Ορισμένα από αυτά τα εξωκυτταρικά ένζυμα εμπλέκονται στην αποδόμηση της λιγνίνης, όπως η υπεροξειδάση της λιγνίνης, η εξαρτώμενη του Mn υπεροξειδάση και η λακκάση. Οι μύκητες γενικά βιομετατρέπουν τα γεωργικά φάρμακα και άλλες ξενοβιοτικές ουσίες με την εισαγωγή μικρών δομικών αλλαγών στο μόριο, καθιστώντας το μη τοξικό. Το βιο-μετασχηματισμένο γεωργικό φάρμακο στην συνέχεια είναι επιρρεπές σε περαιτέρω μετασχηματισμό από βακτήρια [Diez, 2010, Pinto et al., 2012].

Τα ένζυμα που εμπλέκονται σε βιολογικούς μετασχηματισμούς οργανικών ενώσεων ταξινομούνται κυρίως σε τρεις ευρύτερες ομάδες με βάση την αντίδραση που καταλύουν: οξειδοαναγωγάσες, υδρολάσες και τρανσφεράσες [Velázquez-Fernández et al., 2012].

• Οι οξειδοαναγωγάσες είναι μια ευρεία ομάδα ενζύμων που καταλύουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα μόριο (δότης ηλεκτρονίων) σε άλλο (δέκτης ηλεκτρονίων). Πολλά από αυτά τα ένζυμα απαιτούν επιπλέον συμπαράγοντες, που δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, δέκτες ηλεκτρονίων ή και τα δύο. Ορισμένα ένζυμα καταλύουν μια αντίδραση οξείδωσης/αναγωγής χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο (O_2) ως δέκτη ηλεκτρονίων. Σε αυτές τις αντιδράσεις, το οξυγόνο μετατρέπεται σε νερό (H_2O) ή υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) [Scott et al., 2008]. Το κυτόχρωμα P450 αποτελεί μια υπεροικογένεια ευέλικτων μονοοξυγενασών της αίμης που μπορούν να καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης, αναγωγής ή οξειδωτικής διάσπασης αρωματικών ή αλεικυκλικών ενώσεων. Η δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450 σε ξενοβιοτικά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της τοξικότητάς τους [Velázquez-Fernández et al., 2012]. Οι υπεροξειδάσες και οι οξειδάσες περιλαμβάνουν μερικές οικογένειες ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Αν και παράγονται από βακτήρια, μύκητες, φυτά και ζώα, αναφορές για τη συμμετοχή τους στη βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων υπάρχουν μόνο για τους μύκητες. Είναι γνωστό ότι οι λιγνινολυτικοί μύκητες εκκρίνουν τις υπεροξειδάσες και τις οξειδάσες για να αποσυνθέσουν την λιγνίνη [Aust, 1995; Yadav et al., 2009].

• Οι υδρολάσες είναι μια ευρεία ομάδα ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοαποδόμηση και γεωργικών φαρμάκων. Οι υδρολάσες καταλύουν την υδρόλυση αρκετών ομάδων γεωργικών φαρμάκων και γενικά λειτουργούν απουσία οξειδοαναγωγικών συμπαραγόντων, γεγονός που τις καθιστά ιδανικούς υποψήφιους για στρατηγικές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

βιοαποκατάστασης [Scott et al., 2008]. Μεταξύ των υδρολασών που εμπλέκονται στην αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων, τα πλέον καλά μελετημένα ένζυμα είναι οι φωσφοτριεστεράσες που εξειδικευμένα διασπούν τους δεσμούς P-O, P-F, P-NC και P-S οι οποίοι απαντώνται σε οργανοφωσφορικές ενώσεις [Ortiz-Hernández et al., 2003] και οι εστεράσες που καταλύουν την υδρόλυση διαφόρων εστερικών δεσμών που περιλαμβάνουν καρβοξυλεστεράσες, αμιδάσες, φωσφατάσες κλπ.

• Μεταξύ όλων των γνωστών τρανσφεράσεων, η τρανσφεράση S της γλουταθειόνης (GST) είναι αυτή που εμπλέκεται κυρίως στη βιοαποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών. Παρόλο που καταλύουν τη μεταφορά γλουταθειόνης σε ηλεκτρονιόφιλα γεωργικά φάρμακα, μπορούν επίσης να εμφανίσουν δραστηριότητες υδρολάσης και υπεροξειδάσης [Toribio et al., 1996]. Είναι ενδιαφέρον ότι η GST μπορεί επίσης να καταλύσει την απαλογόνωση χλωροαρωματικών ξενοβιοτικών ουσιών [Habig et al.].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

4. Στόχος της παρούσας εργασίας

Η βιοαποδόμηση οργανικών ρύπων πραγματοποιείται συνήθως από σύνθετες και δυναμικές μικροβιακές κοινότητες. Εδάφη και λοιπά υποστρώματα που έρχονται σε τακτική επαφή με γεωργικά φάρμακα ευνοούν την ανάπτυξη και τον εμπλουτισμό της μικροβιακής κοινότητας με βακτήρια που έχουν αναπτύξει νέες καταβολικές ικανότητες έναντι των γεωργικών φαρμάκων στα οποία συστηματικά εκτίθενται. Τέτοια υποστρώματα αποτελούν ιδανικές πηγές για την απομόνωση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα για την αποδόμηση οργανικών ρύπων όπως τα γεωργικά φάρμακα. Σε τέτοια περιβάλλοντα η εφαρμογή της λειτουργικής μεταγονιδιωματικής μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση νέων γονιδίων που κωδικοποιούν νέα ένζυμα με ιδιαίτερα θεμιτά χαρακτηριστικά για την περαιτέρω χρήση τους σε βιομηχανικές διεργασίες ή ακόμη σε στρατηγικές απορρύπανσης εδαφών και λοιπών οικοσυστημάτων.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν **η λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση βιομιγμάτων που συλλέχθηκαν από βιοκλίνες με εκτεταμένη έκθεση σε πλήθος διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων, στοχεύοντας στον εντοπισμό νέων καταβολικών γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα, όπως υδρολάσες και οξυγενάσες, που εμπλέκονται στην αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων**. Για τον λόγο αυτό κατασκευάστηκε βιβλιοθήκη κλώνων με φοσμίδια η οποία αξιολογήθηκε με φαινοτυπική επιλογή ύστερα από επίστρωση σε θρεπτικά μέσα για την επιλογή εστερασών (λιπάσες, καρβοξυεστεράσες) και μονοξυγενασών, αλλά και μέσω δοκιμών PCR στοχεύοντας στην ανίχνευση γνωστών γονιδίων (*pdmAB*) που εμπλέκονται στην αποδόμηση των φαινυλουρικών ζιζανιοκτόνων.

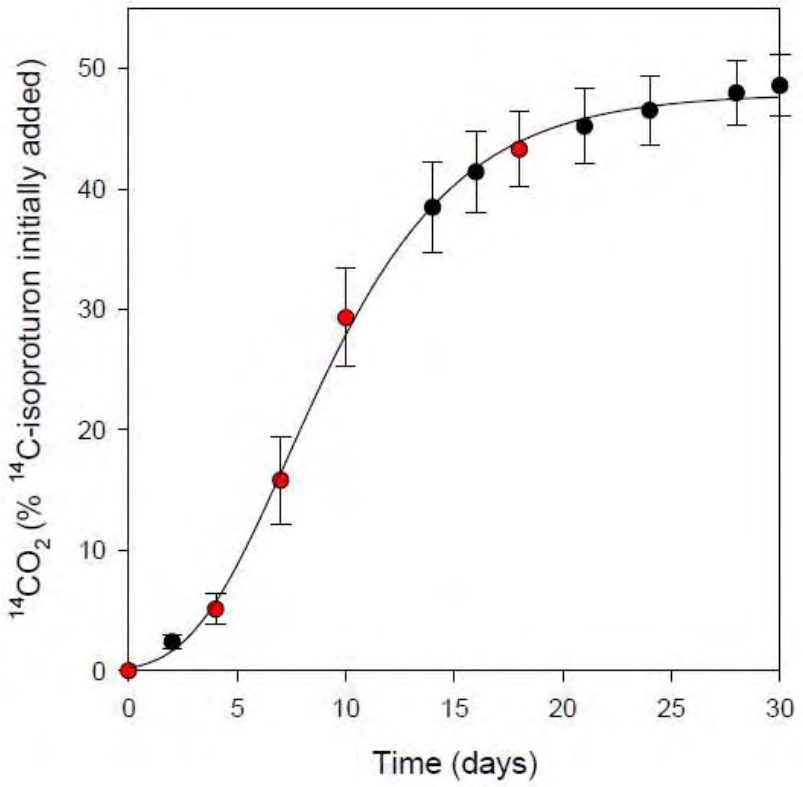
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

ΙΙ. Πειραματικό Μέρος

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

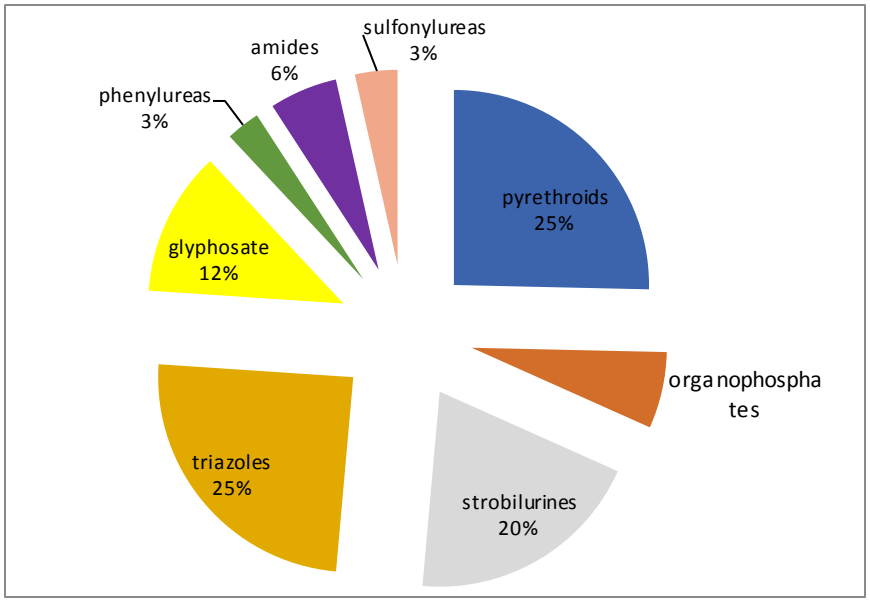
1. Εισαγωγικά

Τα δείγματα βιομίγματος που μελετήθηκαν, συλλέχθηκαν από σύστημα βιοκλίνης στο πειραματικό αγρόκτημα του INRA στην πόλη Ντιζόν, Γαλλία και απεστάλησαν στο εργαστήριο από τον Δρ F. Martin Laurent. Προηγούμενες μελέτες στο συγκεκριμένο βιομίγμα είχαν δείξει την ικανότητά του να ανοργανοποιεί ταχύτατα το ζιζανιοκτόνο isoproturon (*Εικόνα 2.1*). Το ιστορικό έκθεσης του βιομίγματος σε γεωργικά φάρμακα κατά την τελευταία διετία έδειξε ότι το συγκεκριμένο υπόστρωμα είχε εκτεθεί σε μια σειρά άλλων γεωργικών φαρμάκων όπως φαίνεται στην *Εικόνα 2.2*. Ειδικότερα το βιομίγμα είχε ιστορικό έκθεσης σε πυρεθροειδή, τριαζόλια, στρομπιλουρίνες, glyphosate και οργανοφωσφορικά. Με βάση αυτό το ιστορικό της έκθεσης, επιδιώχθηκε απομόνωση εστερασών, αρωματικών μονοξυγενασών και απομεθυλασών-μονοξυγενασών που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην αποδόμηση πυρεθροειδών [Li et al., 2008], οργανοφωσφορικών [Singh and Walker 2006], τριαζολών και φαινυλουριών αντίστοιχα [Gu et al 2013].



Εικόνα 2.1: Ανοργανοποίηση ^{14}C-σημανσμένου isoproturon στο υπό μελέτη βιομίγμα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87



Εικόνα 2.2: Ιστορικό προηγούμενης έκθεσης του βιομίγματος σε διάφορες ομάδες γεωργικών φαρμάκων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Επεξεργασία βιομίγματος

Προκειμένου να μεγιστοποιηθούν οι πιθανότητες εντοπισμού καταβολικών γονιδίων-στόχων προηγήθηκε της εξαγωγής DNA μια περίοδος εμπλουτισμού με επαναλαμβανόμενες εφαρμογές isoproturon δεδομένων των στοιχείων που παρουσίαζαν αυξημένη ανοργανοποίηση του συγκεκριμένου ζιζανιοκτόνου από τους μικροοργανισμούς του βιομίγματος.

2.2 Απομόνωση DNA

Ύστερα από την πέμπτη κατά σειρά εφαρμογή του isoproturon στο βιομίγμα, πραγματοποιήθηκε συλλογή υπο-δείγματος και εξαγωγή ολικού DNA υψηλού μοριακού βάρους χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο των Zhou et. al. (1996).

2.3 Μεταγονιδιωματική ανάλυση βιομίγματος

2.3.1 Προετοιμασία των υποστρωμάτων ανάπτυξης για το *E. coli*

- Υπόστρωμα ανάπτυξης *E. coli*: LB broth + 10mM $MgSO_4$ + 0,2% Maltose
- L-αραβινόζη (stock 10% σε dH_2O)→ 0,01% αποστειρώθηκε με φιλτράρισμα (0,22μm, sterile MS®PES Syringe Filter). Αποτελεί επαγωγέα ενίσχυσης της αντιγραφής του φοσμιδίου.
- Luria-Bertani (LB) medium-Miller: αποτελεί πλούσιο σε θρεπτικά υπόστρωμα ανάπτυξης με σύνθεση: 10 g/l NaCl, 10 g/l bacteriological peptone, 5 g/l yeast extract. Το μέσο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο για 25 λεπτά στους 120°C.
- Chloramphenicol (stock 25.000μg/ml αιθανόλης): Αντιβιοτικό. Αποστειρώθηκε με φιλτράρισμα (0,22μM, PTFE Syringe Filter, sterilized)
- Γλυκερόλη: 10%. Αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο για 25 λεπτά στους 120°C

2.3.2 Δημιουργία βιβλιοθήκης φοσμιδίων

Το DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση για το μέγεθος και την ακεραιότητά του σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλής θερμοκρασίας τήξης (70V, 6 ώρες στους 4°C) και στη συνέχεια απομακρύνθηκε από το πήκτωμα με επεξεργασία με gelase και καθαρίστηκε με καθίζηση με αιθανόλη. Το καθαρισμένο DNA κλωνοποιήθηκε εντός φορέα ελέγχου αντιγραφής

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

pCC1FOS™ (Epicentre®). Η σύνδεση, το πακετάρισμα σε σωματίδια φάγου και η επιμόλυνση σε *E. coli* EPI300-T1R πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το συνιστώμενο πρωτόκολλο (Epicentre®). Οι βιβλιοθήκες αποθηκεύτηκαν επιμολυσμένες σε *E. coli* EPI300-T1K. Τα διαμολυνθέντα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τριβλία LB άγαρ που περιείχαν chloramphenicol (15 mg/L) και 0,01% L-αραβινόζη. Τα τριβλία στην συνέχεια επωάστηκαν για 16h στους 37°C. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν, επιλέχθηκαν με την βοήθεια αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων και μεταφέρθηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων που περιείχαν 200 μl από το ίδιο μέσο εμπλουτισμένο με γλυκερόλη 10%, οι οποίες επωάστηκαν και πάλι για 16h στους 37°C. Ακολούθως φυλάχθηκαν στους -80°C για μελλοντική διαλογή (δύο αντίγραφα κάθε πλάκας). Μόλις συλλέχθηκε ένας ικανοποιητικός αριθμός κλώνων στις πλάκες 96 φρεατίων, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές λειτουργικής διαλογής.

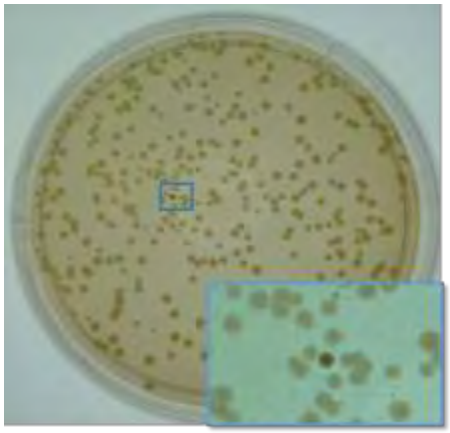
2.4 Δοκιμές διαλογής με βάση φαινοτυπικά τεστ σε θρεπτικά μέσα

Τα stock γλυκερόλης των κλώνων της μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης αποψύχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε νέες πλάκες 96 φρεατίων που περιείχαν το ίδιο μέσο ανάπτυξης με το προηγούμενο, χωρίς την γλυκερόλη, με έναν ειδικό αντιγραφέα πλακών 96 φρεατίων (replicator). Οι νέες πλάκες επωάστηκαν για 16h στους 37°C. Μετά την επώαση το περιεχόμενο κάθε πλάκας μεταφέρθηκε και πάλι με αντιγραφέα σε τετράγωνα τριβλία με άγαρ που περιείχαν το επιλεγμένο μέσο για κάθε δοκιμή διαλογής. Συνολικά, 10.000 κλώνοι επιλέχθηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικές δοκιμές διαλογής με βάση τον επιλεγμένο φαινότυπο.

A) <u>Δοκιμή υδρόλυσης a-napthyl acetate</u>:

Η δράση εστερασών και συγκεκριμένα καρβοξυεστερασών αξιολογήθηκε με επίστρωση με τον ειδικό αντιγραφέα των κλώνων της βιβλιοθήκης από τις πλάκες 96 φρεατίων σε τριβλία με θρεπτικό μέσο LB με chloramphenicol (15 mg/L) και L-αραβινόζη 0,01%, τα όποια στην συνέχεια επιστρώθηκαν με top agar που περιείχε a-naphtyl acetate + Fast blue RR, σύμφωνα με την μέθοδο προσδιορισμού ενζυμικής δραστικότητας εστερασών που ανέπτυξαν οι Miller και Karn (1980). Ακολούθησε επώαση 16h στους 37°C και στην συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου. Γινόταν καθημερινά έλεγχος και θετικοί θεωρήθηκαν οι κλώνοι που είχαν αναπτύξει καφέ χρώμα. Το χρώμα προκύπτει λόγω της υδρόλυσης του a-napthyl acetate προς a-napthol, το οποίο στην συνέχεια αντιδρά με το fast blue RR και παράγει ένα έγχρωμο σύμπλοκο (*Εικόνα 2.3*), ορατό κατά την καλλιέργεια κλώνων με δράση εστεράσης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

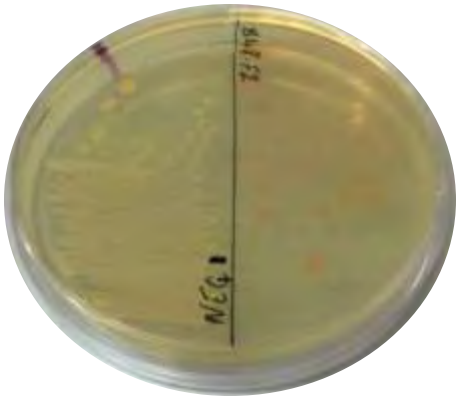


Εικόνα 2.3: Θετικός κλώνος σε δοκιμή υδρόλυσης a-napthyl acetate για δραστικότητα καρβοξυεστεράσης.

Το ίδιο σκεπτικό ακολουθήθηκε σε όλες τις δοκιμές. Δηλαδή, επίστρωση με ειδικό αντιγραφέα των κλώνων της βιβλιοθήκης από τις πλάκες 96 φρεατίων σε τριβλία με θρεπτικό μέσο LB με chloramphenicol (15 mg/L) και L-αραβινόζη 0,01% και ένα συστατικό που επέτρεπε την οπτικοποίηση της ενζυμικής δραστικότητας. Τα τρυβλία επωάζονταν για 16h στους 37°C και στην συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου, όπου γινόταν καθημερινά έλεγχος για θετικούς κλώνους.

Β) <u>Δοκιμή Mangenta caprylate</u>:

Αυτή η δοκιμή στοχεύει σε ένζυμα που εμφανίζουν δραστηριότητα εστεράσης-υδρολάσης. Χρησιμοποιήθηκαν τριβλία LB που εμπλουτίστηκαν με με xmangenta-caprylate. Κλώνοι θετικοί ως προς την έκφραση εστεράσης/υδρολάσης μεταχρωματίστηκαν σε mangenta. Το χρώμα αυτό προήλθε από την υδρόλυση από εστεράσες του περιεχόμενου στα τρυβλία mangenta caprylate, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση caprylate και 5-Bromo, 6-Chloro-indoxy, το οποίο στην συνέχεια διμερίστηκε σε 5,5-dibromo-6,6-dichloro-indigo, υπεύθυνο για τον χρωματισμό mangenta των θετικών κλώνων (*Εικόνα 2.4*).



Εικόνα 2.4: Θετικός κλώνος για την δοκιμή mangenta caprylate (δεξιά), συγκρινόμενος με αρνητικό (αριστερά).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Γ) Δοκιμή Tributyrin:

Λειτουργική διαλογή για τα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα με λιπολυτική /εστερολυτική δραστικότητα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα υπόστρωμα LB άγαρ + chloramphenicol + L-αραβινόζη και tributyrin, σύμφωνα με τους Sulaiman et. al, 2012. Ως θετικοί επιλέχθηκαν οι κλώνοι που σχημάτισαν μια διάφανη ζώνη γύρω τους.
Η tributyrin είναι ένα ανάλογο τριακυλογλυκερόλης του βουτυρικού που διασπάται από εστεράσες και λιπάσες σε βουτυρικό άλας. Οι αποικίες με φοσμίδια που φέρουν γονίδια που επιδεικνύουν δραστικότητα εστεράσης παράγουν μία διαφανή ζώνη γύρω τους, ως σημάδι υδρόλυσης tributyrin (*Εικόνα 2.5*).

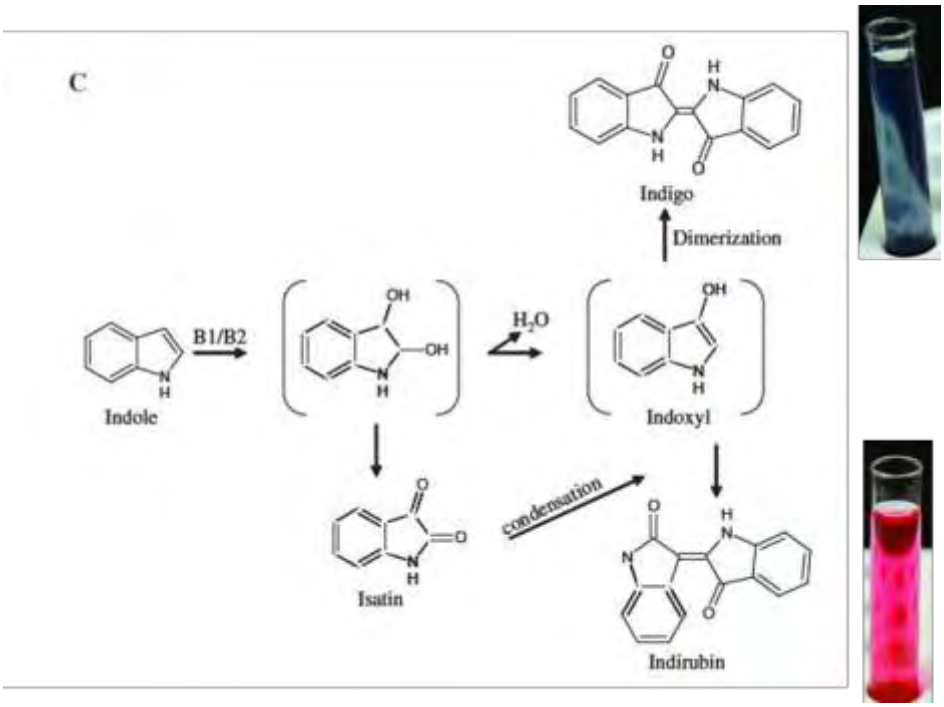
Εικόνα 2.5: Ένα παράδειγμα εμφάνισης θετικού κλώνου φωσμιδίου στην δοκιμασία τριβουτυρίνης.

Δ) Δοκιμή οξείδωσης Ινδόλης:

Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση δραστηριοτήτων αρωματικής μονοξυγενάσης. Οι οξυγενάσες είναι σημαντικοί βιοκαταλύτες που εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της βιοαποδόμησης ή αποτοξικοποίησης των αρωματικών ενώσεων και της βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών. Αυτά τα ένζυμα ταξινομούνται ευρέως ως μονοοξυγενάσες και διοξυγενάσες ανάλογα με το αν ενσωματώνουν ένα ή δύο άτομα οξυγόνου στο υπόστρωμα. Αυτές οι αντιδράσεις οξυγόνωσης είναι συχνά δύσκολο, αν όχι αδύνατο, να επιτευχθούν χρησιμοποιώντας χημικές προσεγγίσεις. Αρκετές διοξυγενάσες και μονοοξυγενάσες, έχουν αναφερθεί ότι καταλύουν την παραγωγή indigo και indirubin. Μονοξυγενάσες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των αρωματικών ενώσεων έχει επίσης δειχθεί ότι παράγουν indigo. Το Indigo είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες βαφές στις βιομηχανίες κλωστοϋφαντουργίας και εκτύπωσης. Η Indirubin, ένα κόκκινο δομικό ισομερές του indigo είναι ένα ενεργό συστατικό της παραδοσιακής κινεζικής ιατρικής που χρησιμοποιείται κατά της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, είναι ένας ισχυρός αναστολέας εξαρτώμενων από την κυκλίνη κινασών, γεγονός που την κάνει μια πολλά υποσχόμενη αντικαρκινική ένωση και έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδη δράση (Singh et. al 2010, Kimura et. al 2010).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

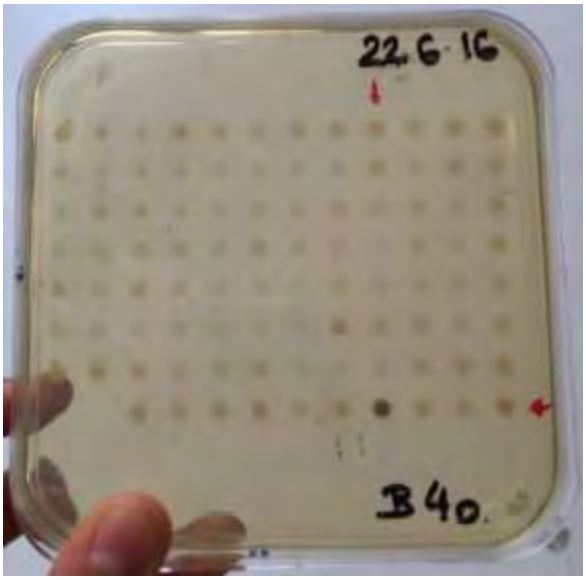
Ο προτεινόμενος μηχανισμός με τον οποίο τα βακτηριακά ένζυμα σχηματίζουν indigo από την ινδόλη υποθέτει ότι το indroxyl είναι ένα ενδιάμεσο που διμερίζεται χημικά για να σχηματίσει indigo. Η ινδόλη οξειδώνεται από οξυγενάσες και από αυτή την ενζυμική δραστηριότητα παράγεται ένα ενδιάμεσο προϊόν, το cis-indole 2,3-dihydrodiol, που στην συνέχεια αφυδατώνεται για να σχηματίσει indroxyl. Αυτό, με τη σειρά του, προτείνει ότι το μοριακό οξυγόνο έχει εισαχθεί στην ινδόλη. Στη συνέχεια το indroxyl διμερίζεται αυθόρμητα για να σχηματίσει indigo, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε indirubin. Άρα συνοπτικά η ινδόλη οξειδώνεται προς indroxyl που διμερίζεται για την παραγωγή indigo. Η indirubin παράγεται με συμπύκνωση οξυγονωμένων μορίων ινδόλης, isatin και indroxyl (*Εικόνα 2.6*). Μελέτες σχετικά με τον βακτηριακό βιομετασχηματισμό ινδόλης και παραγώγων ινδόλης έχουν αποκαλύψει η διοξυγενάση, η μονοοξυγενάση, και το P450 να είναι τα ένζυμα που καταλύουν την παραγωγή indigo.



Εικόνα 2.6: Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα παρουσία αρωματικών μονο-οξυγενασών κατά την οξείδωση της ινδόλης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Οι θετικοί κλώνοι οξειδώνουν την ινδόλη σε ένα μείγμα χρωστικών indigo και indirubin εμφανίζοντας χαρακτηριστικό φαινότυπο (*Εικόνα 2.7*).



Εικόνα 2.7: Τρυβλίο στο οποίο εντοπίζεται ένας θετικός κλώνος για δραστικότητα (μονοξυγενάσης) οξείδωσης ινδόλης (κόκκινο βέλος).

Οι θετικοί κλώνοι της πρώτης διαλογής ελέγχθηκαν ξανά, μεμονωμένα αυτή την φορά για επαλήθευση του φαινοτύπου τους, με καλλιέργεια σε τριβλίο Petri (LB + Chloramfenicol + L-αραβινόζη) στους 37°C για 16 ώρες. Μόνο όσοι κλώνοι εντοπίστηκαν ως θετικοί και στον δεύτερο έλεγχο επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Τα κύτταρα στη συνέχεια συλλέχθηκαν, ιζηματοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση φοσμιδίων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

2.5 Εκχύλιση και έλεγχος μεγέθους των επιλεγμένων φοσμιδίων

Μετά την επαλήθευση των φαινοτύπων των θετικών κλώνων, τα φοσμίδια εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας το εμπορικό κιτ ISOLATE II Plasmid Mini Kit (BIOLINE) ακολουθώντας το πρωτόκολλο απομόνωσης high-copy plasmid DNA από το *E. coli* και το μέγεθος τους ελέγχθηκε με πέψη με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, όπως το EcoRI που έχει μία θέση περιορισμού στην αλληλουχία του φοσμιδιακού φορέα και το NotI που έχει δύο θέσεις περιορισμού που πλαισιώνουν το ένθεμα (*Πίνακας 2.1*). Στην *Εικόνα 2.8* παρουσιάζεται ο χάρτης του φοσμιδίου.

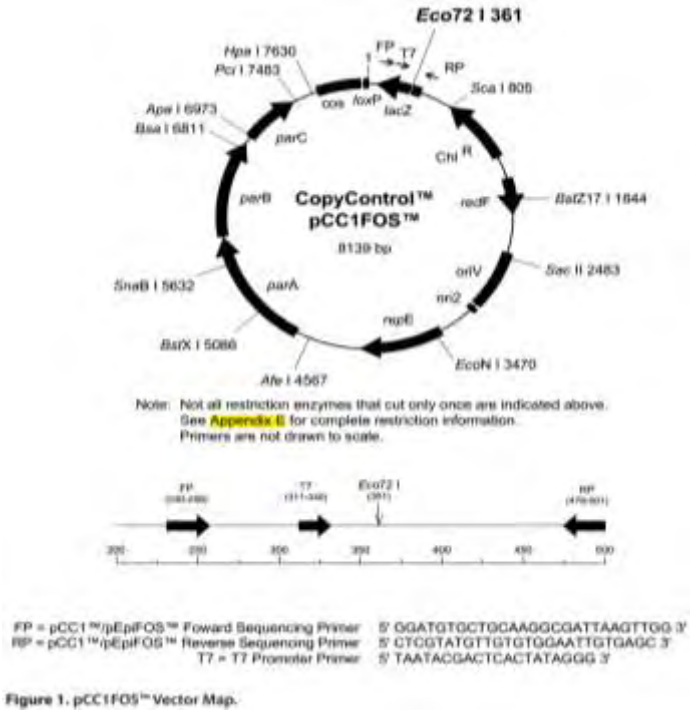


Figure 1. pCC1FOS™ Vector Map.

Εικόνα 2.8: Χάρτης φοσμιδίου pCC1FOS™.

Πίνακας 2.1: Περιοριστικά ένζυμα EcoRI και NotI.

Ένζυμο	Αριθμός θέσεων περιορισμού	Θέσεις περιορισμού
EcoRI	1	332
NotI	2	2 και 643

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

2.6 Εντοπισμός των γονιδίων *pdmAB* στην βιβλιοθήκη μέσω PCR

Εκτός της επιλογής κλώνων με βάση φαινοτυπικές δοκιμές σε τριβλία, η βιβλιοθήκη φοσμιδίων υποβλήθηκε σε δοκιμές PCR για τον εντοπισμό των γονιδίων *pdmAB,* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που αναπτύχθηκαν από τους Gu et al. (2013) (*Πίνακας2. 2*). Αυτό έγινε για να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τον εντοπισμό των γονιδίων και των πλευρικών περιοχών των γονιδίων *pdmA* και *pdmB* στο συγκεκριμένο περιβαλλοντικό δείγμα, καθώς και να διαπιστωθούν πιθανοί πολυμορφισμοί στα συγκεκριμένα γονίδια που να σηματοδοτούν μεταβολές στο φάσμα δράσης τους έναντι μελών της ομάδας των φαινυλουρικών ζιζανιοκτόνων.

Πίνακας 2.2: Εκκινητές για τα γονίδια *pdmAB* [Gu et al. (2013)].

Εκκινητές	Αλληλουχίες
pudmF2	5'-GGAATTCCATATGTTTCGCTACGATCAAGTA-3'
pudmR2	5'-CCGGAATTCCTAAAGAAAGATGGCCAGGTT-3'

Τα stock γλυκερόλης αποψύχθηκαν για άλλη μία φορά και μεταφέρθηκαν με τον ειδικό αντιγραφέα σε τετράγωνα τριβλία με θρεπτικό μέσο LB με chloramphenicol (15 mg/L) και 0,01% L-αραβινόζη. Τα τριβλία επωάστηκαν 16h στους 37°C και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε συλλογή όλων των βακτηρικών κλώνων που αναπτύχθηκαν στο κάθε τριβλίο με προσθήκη 2ml ddH_2O. Έτσι η βακτηριακή βιομάζα από κάθε τριβλίο (pool 96 κλώνων) συλλέχθηκε ξεχωριστά και ακολούθησε απομόνωση των φοσμιδίου από κάθε pooled δείγμα με το εμπορικό κιτ ISOLATE II Plasmid Mini Kit (BIOLINE), όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ακολούθως το DNA που εκχυλίστηκε από κάθε pool, υποβλήθηκε σε διαγνωστική PCR για τον εντοπισμό των γονιδίων *pdmAB*. Το πρόγραμμα και τα αντιδραστήρια της PCR παρουσιάζονται στους *Πίνακες 2.3* και *2.4* αντίστοιχα. Τα προϊόντα PCR οπτικοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,5%.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Πίνακας 2.3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ενίσχυσης των *pdmAB* γονιδίων.

Συστατικό	Συγκέντρωση
10X buffer A με Mg^{2+}	1X
dNTPs (10mM)	0,2 mM
Primers (20μM)	0,4 μM
Template	ποικίλει
KapaTaq polymerase (5U/μl)	1 U/50 μl
PCR grade water	Μέχρι 30 μl

Πίνακας 2.4: Το πρόγραμμα της PCR για τον εντοπισμό των γονιδίων *pdmAB*.

Βήματα	Θερμοκρασία °C	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95	2΄	1
Αποδιάταξη	95	30΄΄	38
Πρόσδεση εκκινητών	60	30΄΄	
Επιμήκυνση	72	40΄΄	
Τελική επιμήκυνση	72	5΄	1

Οι πλάκες 96 φρεατίων που αντιστοιχούσαν στα τρυβλία που ήταν θετικά για την ενίσχυση των γονιδίων *pdmA* και *pdmB* ελέγχθηκαν περαιτέρω με colony PCR για την ταυτοποίηση των κλώνων σε κάθε μία από τις παραπάνω πλάκες που φέρουν αυτά τα γονίδια. Αρχικά αποψύχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε νέες πλάκες 96 φρεατίων που περιείχαν το ίδιο μέσο ανάπτυξης με το προηγούμενο, χωρίς την γλυκερόλη, με έναν ειδικό αντιγραφέα πλακών 96 φρεατίων. Οι νέες πλάκες επωάστηκαν για 16h στους 37°C και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε colony PCR για τα *pdmAB*. Οι εκκινητές, το πρόγραμμα και τα υλικά ήταν ίδια με παραπάνω.

Οι θετικοί κλώνοι για τα γονίδια *pdmAB* που προέκυψαν από την colony PCR υποβλήθηκαν σε απομόνωση όπως περιγράφηκε παραπάνω και στην συνέχεια τα φοσμίδια αυτά εστάλησαν μαζί με εκείνα που είχαν επιλεχθεί από τις δοκιμές διαλογής για αλληλούχιση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

2.7 Αλληλούχιση

Τα εκχυλισμένα φοσμίδια (*Πίνακας 2.*5) υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό αλληλουχίας μέσω Illumina Hiseq Rapid Mode 2x250 bp. Τα δεδομένα που ελήφθησαν από την αλληλούχιση των φοσμιδίων υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με κατάλληλα εργαλεία βιοπληροφορικής για να επιτραπεί η όσο το δυνατόν πληρέστερη συναρμολόγηση των φοσμιδίων και η ανίχνευση, με βάση τον λειτουργικό χαρακτηρισμό, των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης που βρέθηκαν σε κάθε φοσμίδιο.

Πίνακας 2.5: Αρίθμηση των φοσμιδίων που εστάλησαν για αλληλούχιση.

Φοσμίδια	Δείγμα (φαινότυπος)
1	F7 (Tributyrin)
2	F8 (Tributyrin)
3	F9 (Tributyrin)
4	F10 (Tributyrin)
5	F11 (Indole and Mag-Caprylate)
6	F12 (Tributyrin)
7	F13 (Tributyrin)
8	F14 (Tributyrin)
9	F16 (Indole and Mag-Caprylate)
10	F17 (Tributyrin)
11	F18 (Indole and Mag-Caprylate)
12	F19 (Tributyrin)
13	pl. 13, 2F (pdmAB)
14	pl. 24, 1C (pdmA)
15	pl. 28, 6A (pdmAB)
16	pl. 29, 4A (pdmAB)

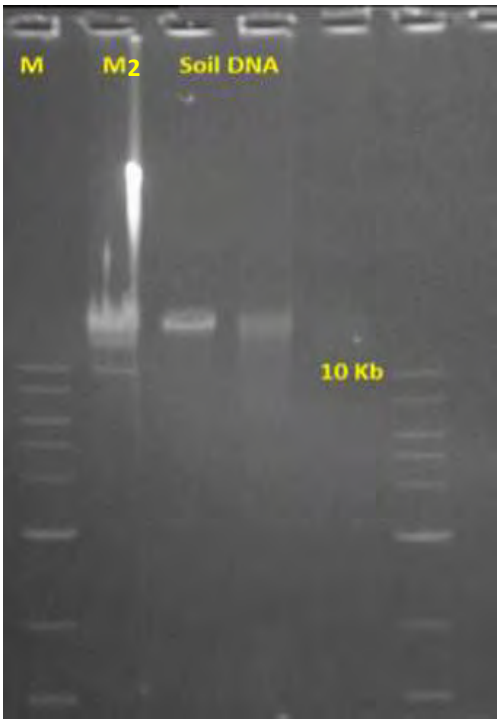
Τα θραύσματα DNA που αλληλουχήθηκαν συναρμολογήθηκαν με το λογισμικό MIRA v4.0.2_0 + g29f87d4 και πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη και λειτουργικός χαρακτηρισμός των γονιδίων με το Prokka v1.7 wrapper (χρησιμοποιεί το Prodigal v2.60 για ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης - πρόβλεψη ORF). Το Contiguator v2.7.0 wrapper με το BLAST v2.2.30+ χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση της πλήρους αλληλουχίας pSH του πλασμιδίου (accession No. KU237244) με τα ικριώματα που ελήφθησαν για καθένα από τα φοσμίδια. Το Protein-protein BLAST πρωτεΐνης-πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση παρόμοιων αλληλουχιών μεταξύ των *pdmA/B* και των μεταφρασμένων προβλεπόμενων ORFs του Prodigal, ενώ το Muscle v3.8.31 χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των ευθυγραμμίσεων. Το SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org) χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη των τριτοταγών πρωτεϊνικών δομών της *pdmA* και της προβλεπόμενης πρωτεΐνης ORF FOS13_00028. Οι παραγόμενες πρωτεϊνικές δομές συγκρίθηκαν με το λογισμικό Chimera v1.11.2.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

3. Αποτελέσματα

3.1 Κατασκευή βιβλιοθήκης φοσμιδίων:

Για τον έλεγχο του μεγέθους και της ποιότητας του απομονωμένου DNA, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλής θερμοκρασίας τήξης και μία ζώνη μεγέθους περίπου 40 kb αποκόπηκε και χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της φοσμιδικής βιβλιοθήκης (*Εικόνα 3.1*).



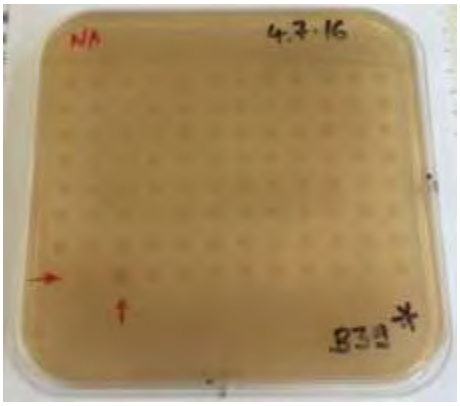
Εικόνα 3.1: Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης LMT όπου φαίνονται, Διαδρομή M: lader χαμηλού μοριακού βάρους [α) Quick-load 2 log DNA ladder (0,1-10kb) (100μg/mL) – BioLabs], Διαδρομή M2: lader υψηλού μοριακού βάρους [β) 'HMW ladder': lambda DNA MonoCut Mix (500μg/mL) – BioLabs] , Διαδρομές Soil DNA: το απομονωμένο DNA.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

3.2 Δοκιμές διαλογής με βάση φαινοτυπικά τεστ σε θρεπτικά μέσα

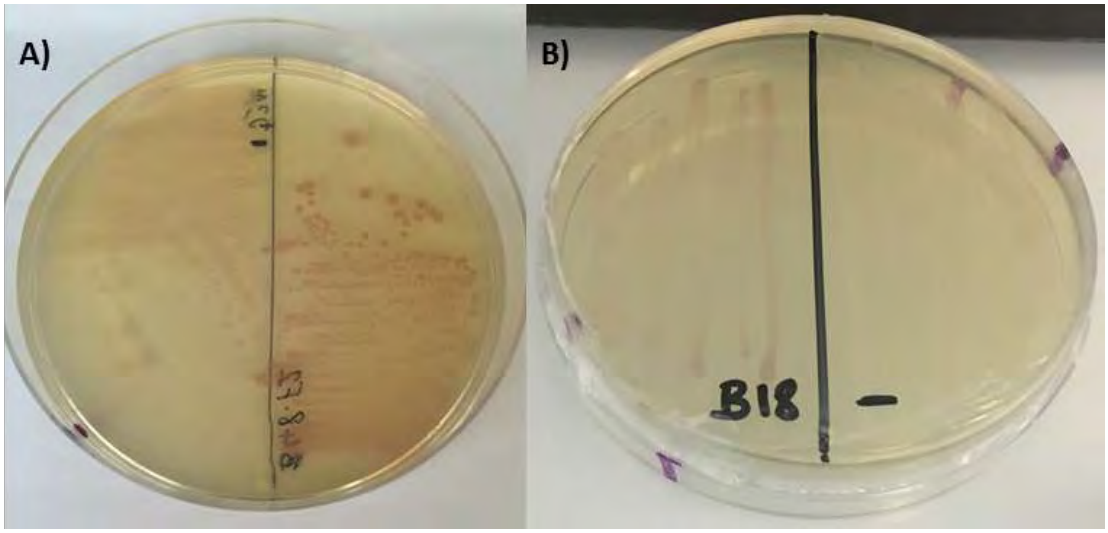
Α) Δοκιμή υδρόλυσης a-napthyl acetate:

Με την ολοκλήρωση της πρώτης δοκιμής εντοπίστηκε μόνο ένας θετικός κλώνος από την πλάκα Β12 (*Εικόνα 3.2*). Παρόλα αυτά επανάληψη της δοκιμής με τον συγκεκριμένο θετικό κλώνο για επιβεβαίωση του φαινοτύπου δεν έδωσε θετικό αποτέλεσμα. Με βάση τα παραπάνω δεν μελετήθηκε περαιτέρω ο συγκεκριμένος κλώνος.



Εικόνα 3.2: Δοκιμή υδρόλυσης a-napthyl acetate. Ο θετικός κλώνος καταδεικνύεται με κόκκινα βέλη.

Β) Δοκιμή Mangenta caprylate:
Κατά την δοκιμή αυτή εντοπίστηκαν τρείς θετικοί κλώνοι, οι Β11, Β16 και Β18. Η θετική απόκκριση τους επιβεβαιώθηκε και στην δεύτερη δοκιμή (*Εικόνα 3.3*) και μελετήθηκαν περαιτέρω.

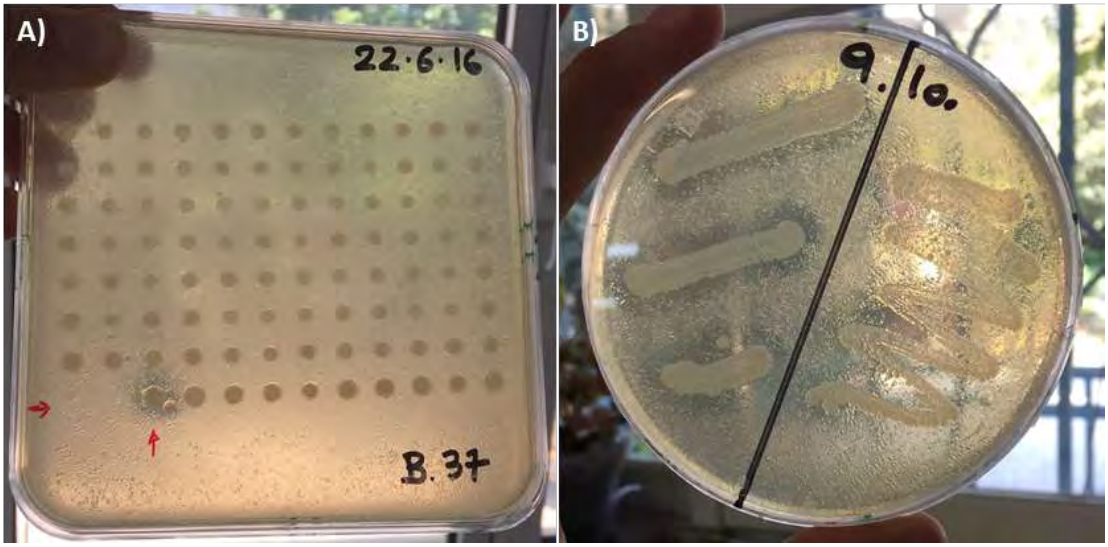


Εικόνα 3.3: Δοκιμή Mangenta caprylate. Β) Αποτέλεσμα επιβεβαίωσης φαινοτύπου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Γ) Δοκιμή Tributyrin:

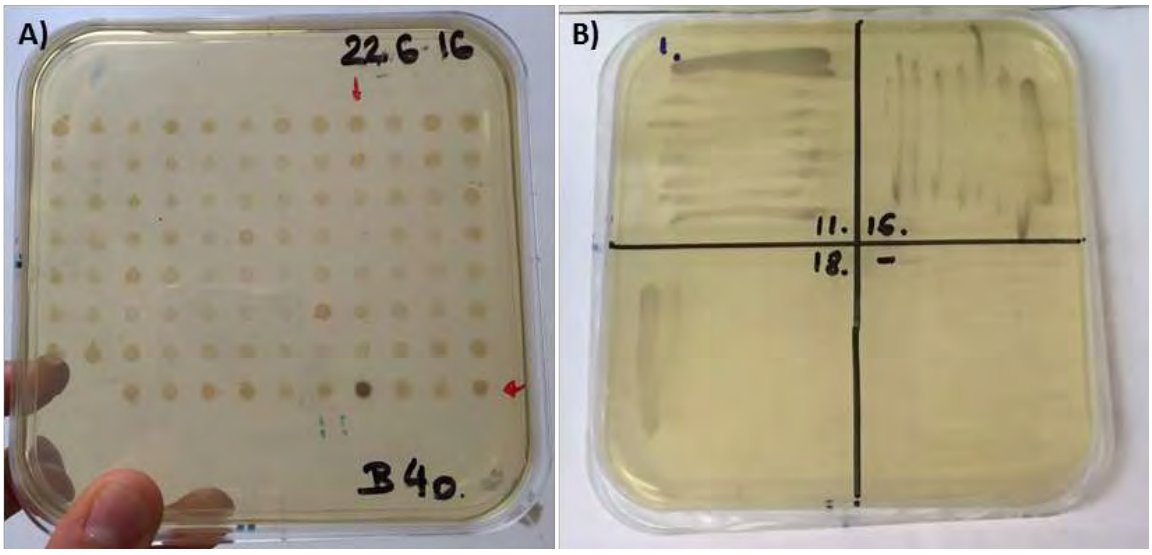
Εννέα θετικοί κλώνοι εντοπίστηκαν για την δοκιμή αυτή και στις δύο επαναλήψεις, αλλά και στην τελική δοκιμή επιβεβαίωσης (*Εικόνα 3.4*). Αυτοί ήταν οι B07, B08, B09, B10, B12, B13, B14, B17 και B19. Όλοι οι παραπάνω 9 κλώνοι μελετήθηκαν περαιτέρω.



Εικόνα 3.4: Δοκιμή Tributyrin. Θετικοί κλώνοι εντοπίζονται αριστερά με τα κόκκινα βέλη ενώ δεξιά παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της επιβεβαίωσης του φαινοτύπου.

Δ) Δοκιμή οξείδωσης Ινδόλης:

Η δοκιμή αυτή κατέδειξε τα ίδια ακριβώς αποτελέσματα με την δοκιμή Mangenta caprylate, με αποτέλεσμα οι ίδιοι κλώνοι που εμφανίστηκαν θετικοί στην δοκιμή mangenta caprylate εμφάνισαν και θετική απόκριση στην δοκιμή οξείδωσης ινδόλης (*Εικόνα 3.5*).



Εικόνα 3.5: Δοκιμή οξείδωσης Ινδόλης. Α) Θετικός κλώνος (κόκκινα βέλη), Β) Αποτέλεσμα επιβεβαίωσης φαινοτύπου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Συνολικά, από τις φαινοτυπικές δοκιμές και ύστερα από επιβεβαίωση των φαινοτύπων εντοπίστηκαν 9 κλώνοι θετικοί στη δοκιμή Tributyrin , 3 κλώνοι θετικοί στη δοκιμή Mangenta caprylate και οι ίδιοι τρείς κλώνοι θετικοί στη δοκιμή οξείδωσης ινδόλης (*Πίνακας 3.1*).

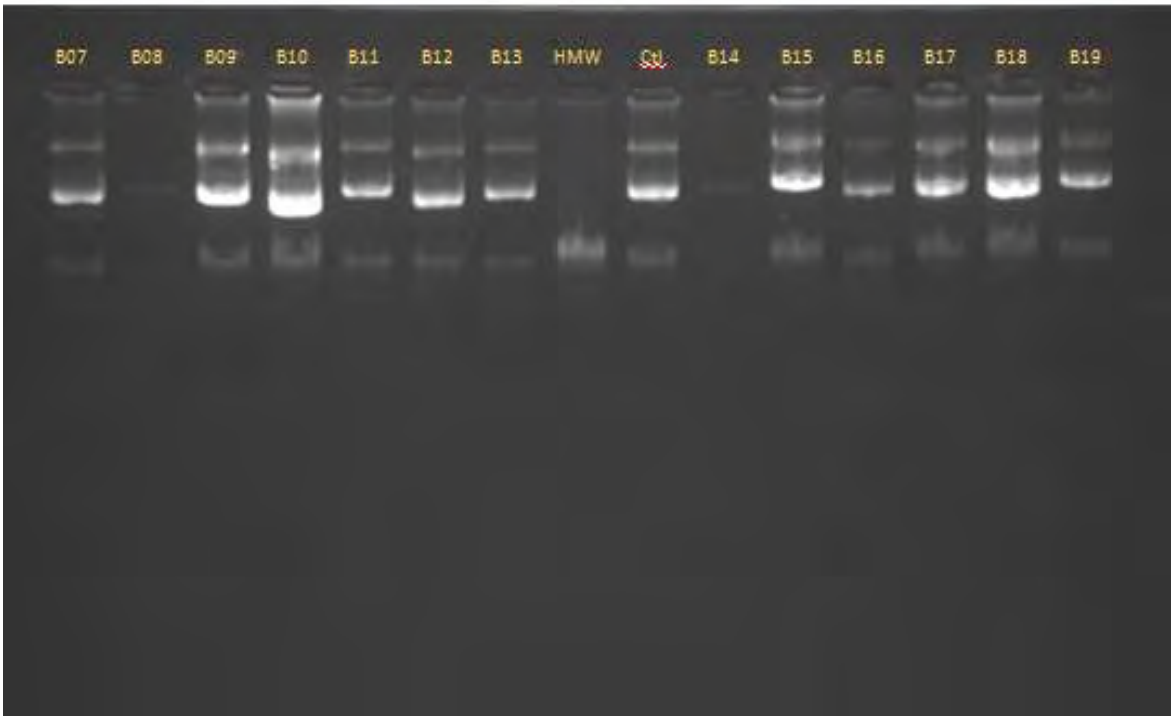
Πίνακας 3.1: Συνολικά αποτελέσματα των δοκιμών διαλογής με βάση φαινοτυπικά τεστ σε θρεπτικά μέσα.

Πλάκα 96 φρεατίων	Φρεάτιο	Θετικό	Tributyrin	Ινδόλη	Mag-Cap	aNA
B05	H7	**B07**	+	-	-	-
B12	E5	**B08**	+	-	-	-
B16	B3	**B09**	+	-	-	-
B17	A9	**B10**	+	-	-	-
B17	B7	**B11**	-	+	+	-
B17	B11	**B12**	+	-	-	-
B17	D4	**B13**	+	-	-	-
B37	H10	**B14**	+	-	-	-
B39	H10	**B15**	-	-	-	+
B40	H4	**B16**	-	+	+	-
B41	F1	**B17**	+	-	-	-
B48	F2	**B18**	-	+	+	-
B55	H1	**B19**	+	-	-	-
		Σύνολο	9	3	3	1

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

3.3 Απομόνωση φοσμιδίων και έλεγχος μεγέθους τους

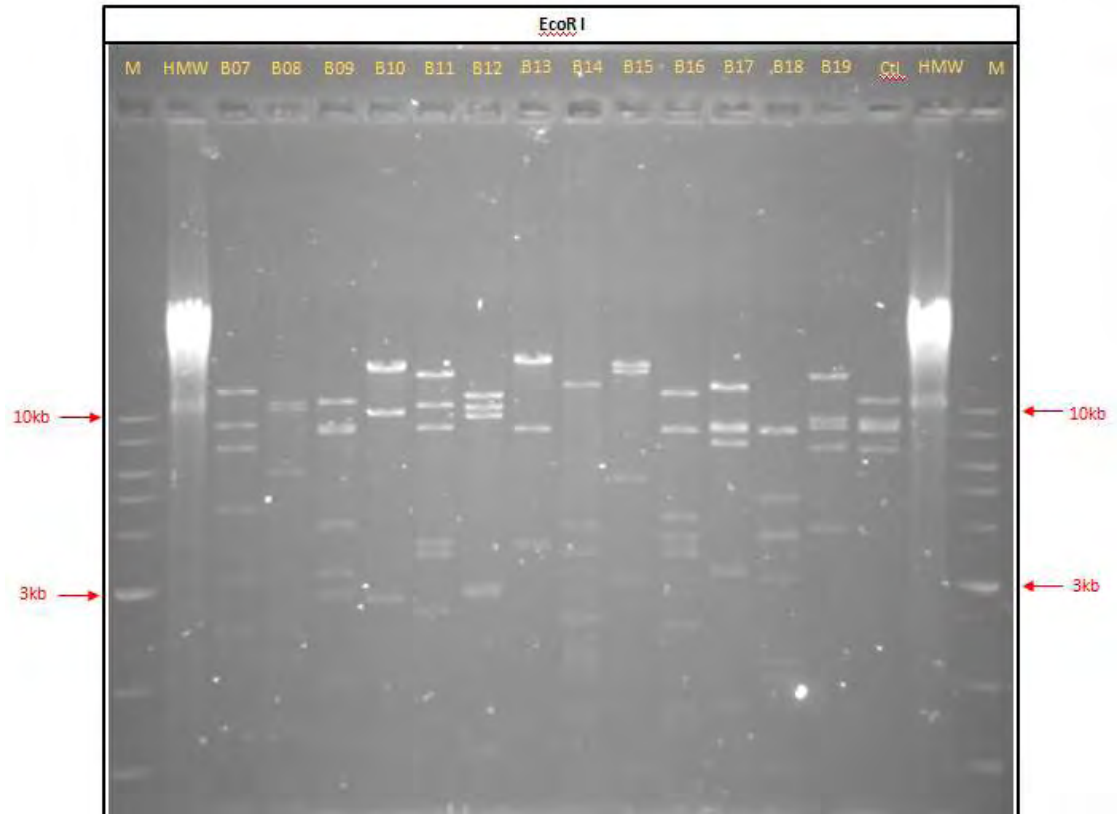
Η *Εικόνα 3.6* παρουσιάζει ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, όπου φαίνονται τα φοσμίδια που απομονώθηκαν.



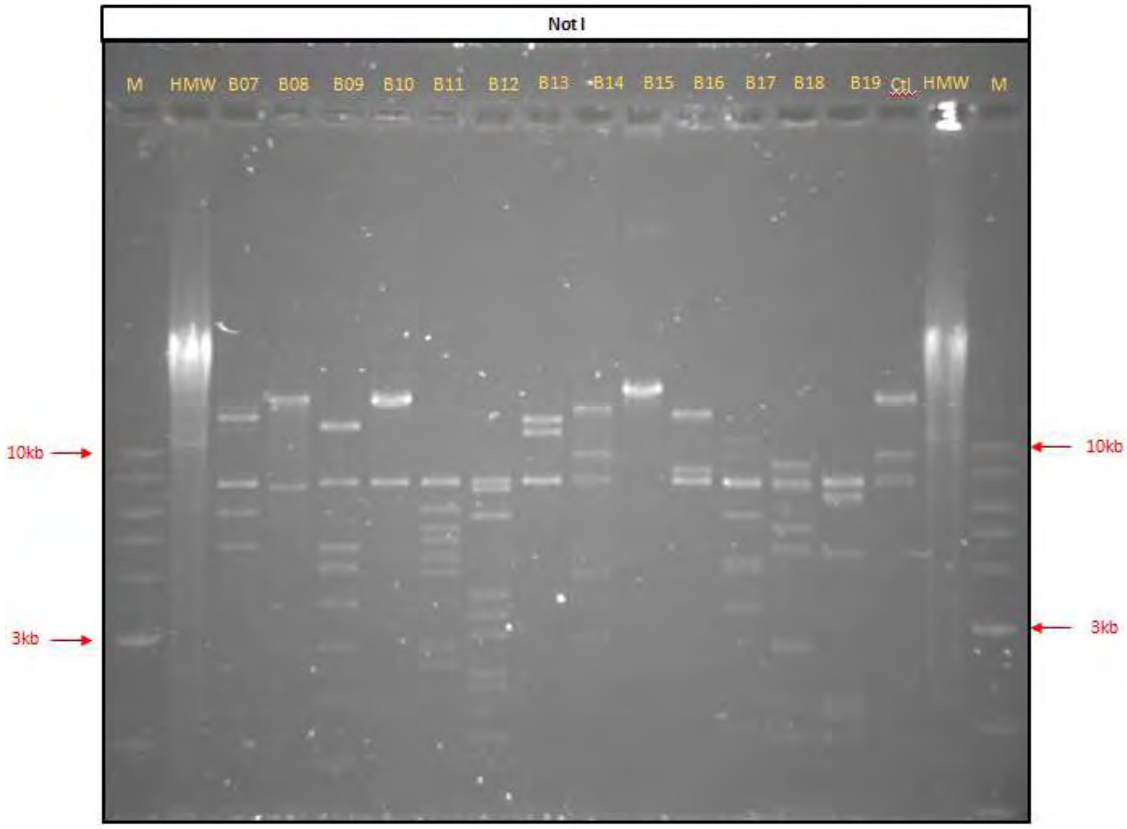
Εικόνα 3.6: Φωτογραφία της πηκτής αγαρόζης της ηλεκτροφόρισης των απομονωμένων φοσμιδίων. Ο Lader που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 'HMW ladder': lambda DNA MonoCut Mix (500μg/mL) - BioLabs και ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε ένα κομάτι 42kb DNA του ανθρώπινου X-χρωμοσώματος, το οποίο είχε μετασχηματιστεί σε κύτταρα EPI300-T1R *E.coli* με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως control για την απομόνωση των φοσμιδίων και την ανάλυση με ένζυμα περιορισμού.

Μετά την απομόνωση, το μέγεθος των ενθεμάτων στα φοσμίδια ελέγχθηκε με πέψη με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (EcoRI που έχει μία θέση περιορισμού και NotI που έχει δύο θέσεις περιορισμού που πλαισιώνουν το ένθεμα) (*Εικόνες 3.7 & 3.8*).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87



Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της πέψης με EcoRI. Διαδρομή M: lader χαμηλού μοριακού βάρους [Quick-load 2 log DNA ladder (0,1-10kb) (100μg/mL) – Bio Labs], Διαδρομή HMW: lader υψηλού μοριακού βάρους ['HMW ladder': lambda DNA MonoCut Mix (500μg/mL) – BioLabs].

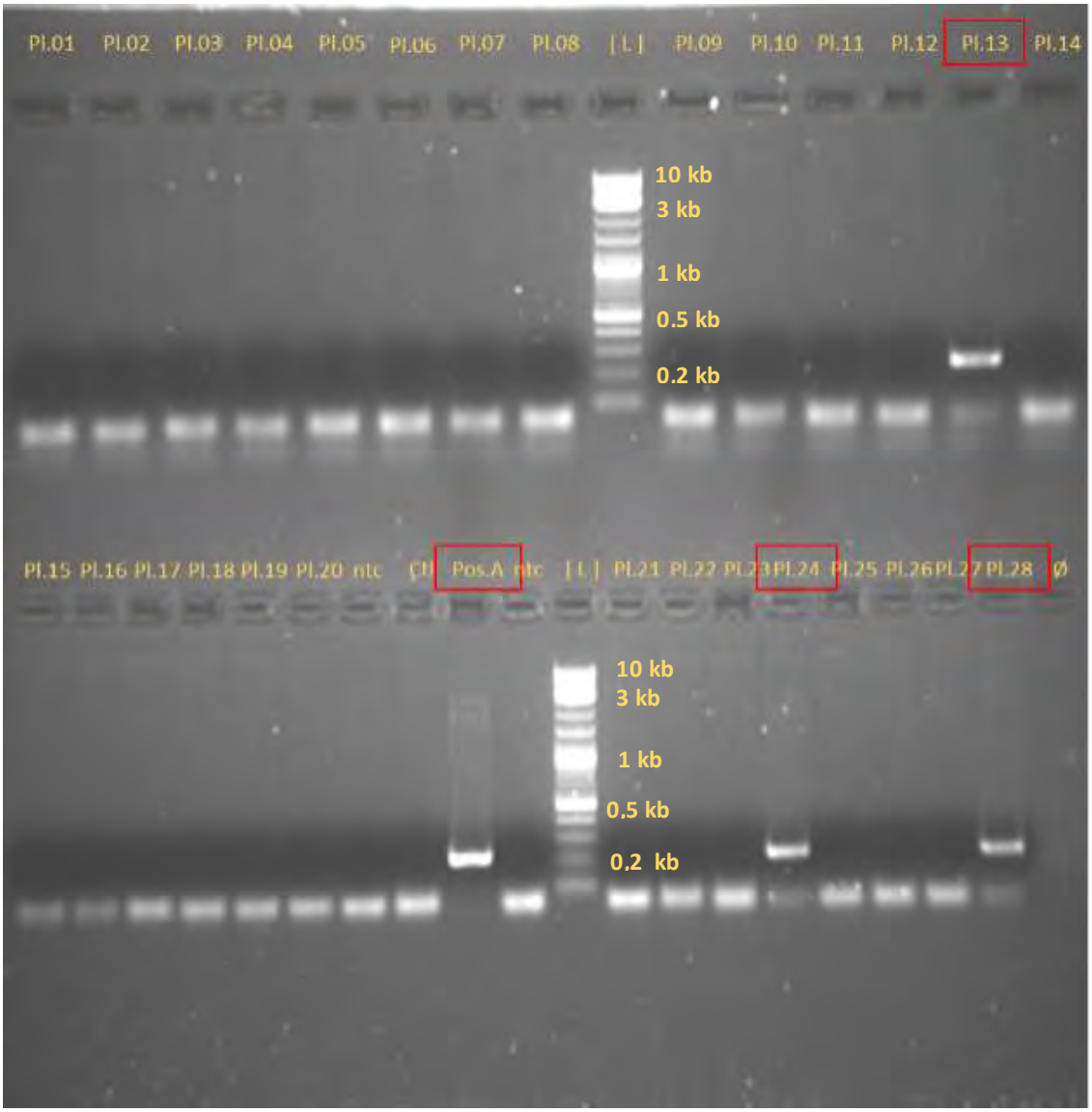


Εικόνα 3.8: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της πέψης με NotI.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

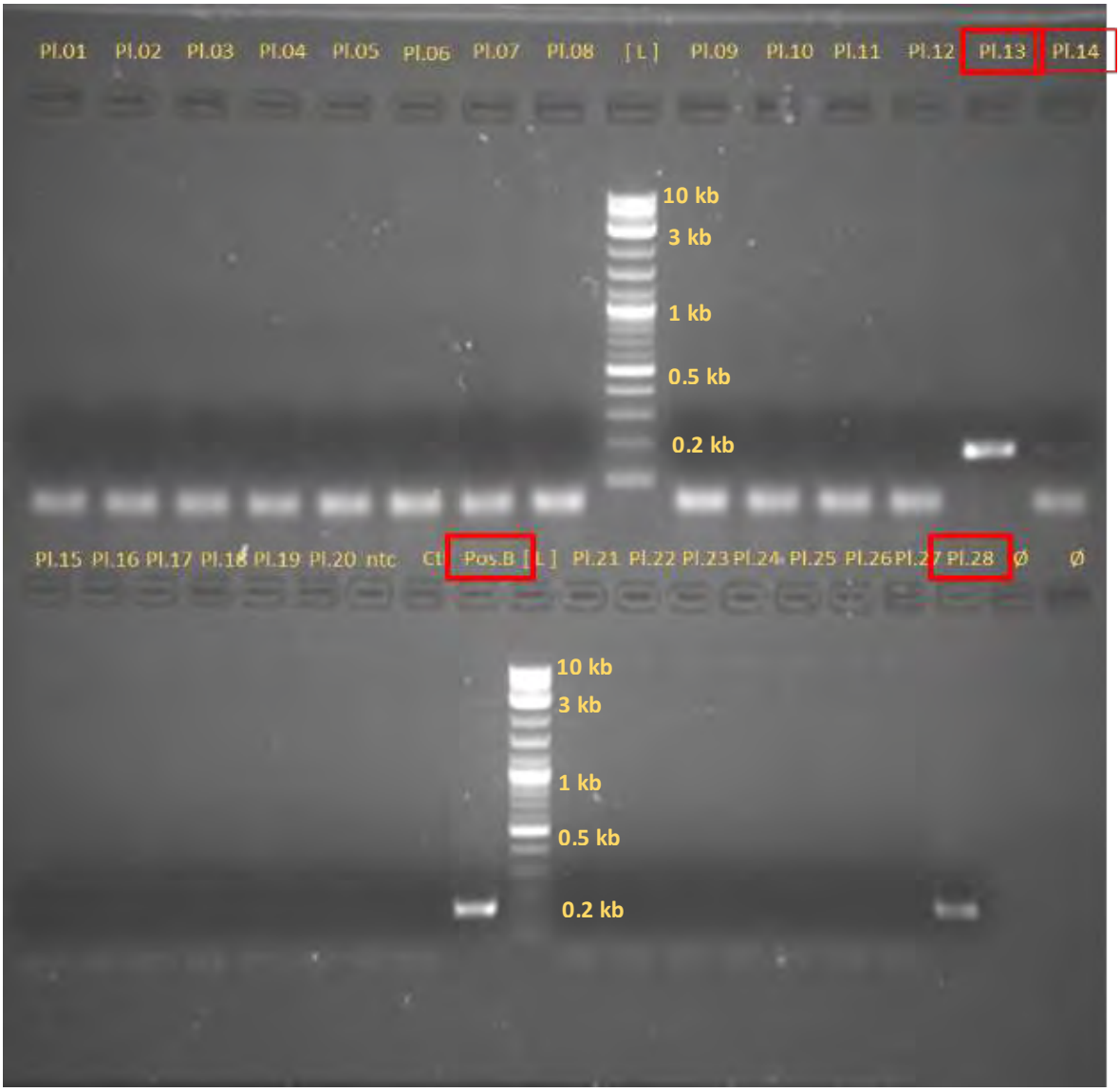
3.4 Διαλογή με PCR για τα γονίδια *pdmAB*

Ο εντοπισμός των γονιδίων *pdmAB* στα φοσμίδια της μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε με PCR και οδήγησε στο εντοπισμό τεσσάρων πλακών 96 θέσεων που έδειξαν θετική ενίσχυση για το *pdmA* (PL13, 24, 28, 29) και τριών πλακών 96 θέσεων που ήταν θετικές για το *pdmB* (PL13, 28, 29) (*Εικόνες 3.9 & 3.10*).



Εικόνα 3.9: Διαλογή PCR των συγκεντρωμένων (pooled) βιβλιοθηκών φοσμιδίου για *pdmA*. Διαδρομή L: lader χαμηλού μοριακού βάρους [Quick-load 2 log DNA ladder (0,1-10kb) (100μg/mL) – BioLabs]. Διαδρομή Pos A: θετικό control για το γονίδιο *pdmA* (≈0,2 kb).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87



Εικόνα 3.10: Διαλογή PCR των συγκεντρωμένων (pooled) βιβλιοθηκών φοσμιδίου για *pdmB*. Διαδρομή L: ladder χαμηλού μοριακού βάρους [Quick-load 2 log DNA ladder (0,1-10kb) (100μg/mL) – BioLabs]. Διαδρομή Pos B: θετικό control για το γονίδιο *pdmA* (≈0,2 kb).

Στις πλάκες 96 θέσεων των οποίων τα ολικά δείγματα (pool) έδειξαν θετικά ως προς την ενίσχυση των *pdmA* και *pdmB* γονιδίων ακολούθησε νέα επίστρωση των επιμέρους αποικιών και εντοπίστηκαν οι συγκεκριμένοι κλώνοι που ήταν θετικοί στην παρουσία των δύο αυτών γονιδίων μέσω colony PCR. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι μόνο ένας κλώνος από κάθε πλάκα που εξετάστηκε ήταν θετικός στην παρουσία των δύο αυτών γονιδίων.

Συνοψίζοντας από όλη την μεταγονιδιωματική βιβλιοθήκη 10.000 κλώνων που εξετάστηκε εντοπίστηκαν 4 κλώνοι θετικοί στο *pdmA* εκ των οποίων 3 ήταν θετικοί και στο *pdmB*, και 12 άλλοι κλώνοι που ήταν θετικοί στις φαινοτυπικές δοκιμές για δράση εστεράσης-λιπάσης και μονοξυγενάσης. Ακολούθησε εξαγωγή των φοσμιδίων και αλληλούχιση τους σε πλατφόρμα Illumina Hiseq. Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω.

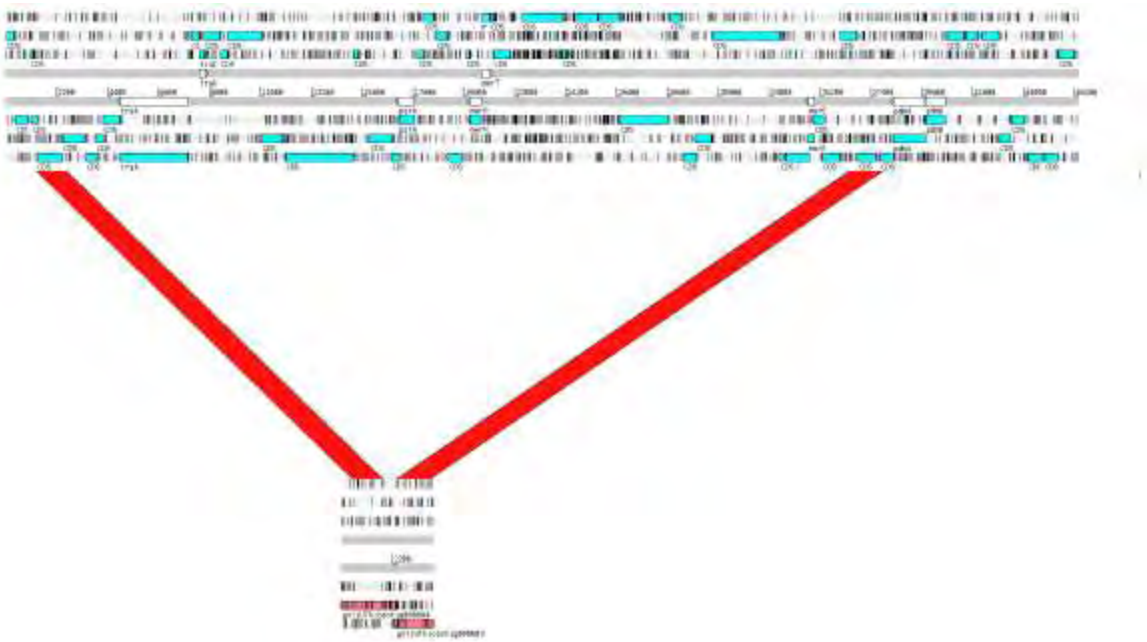
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

3.5 Αλληλούχιση

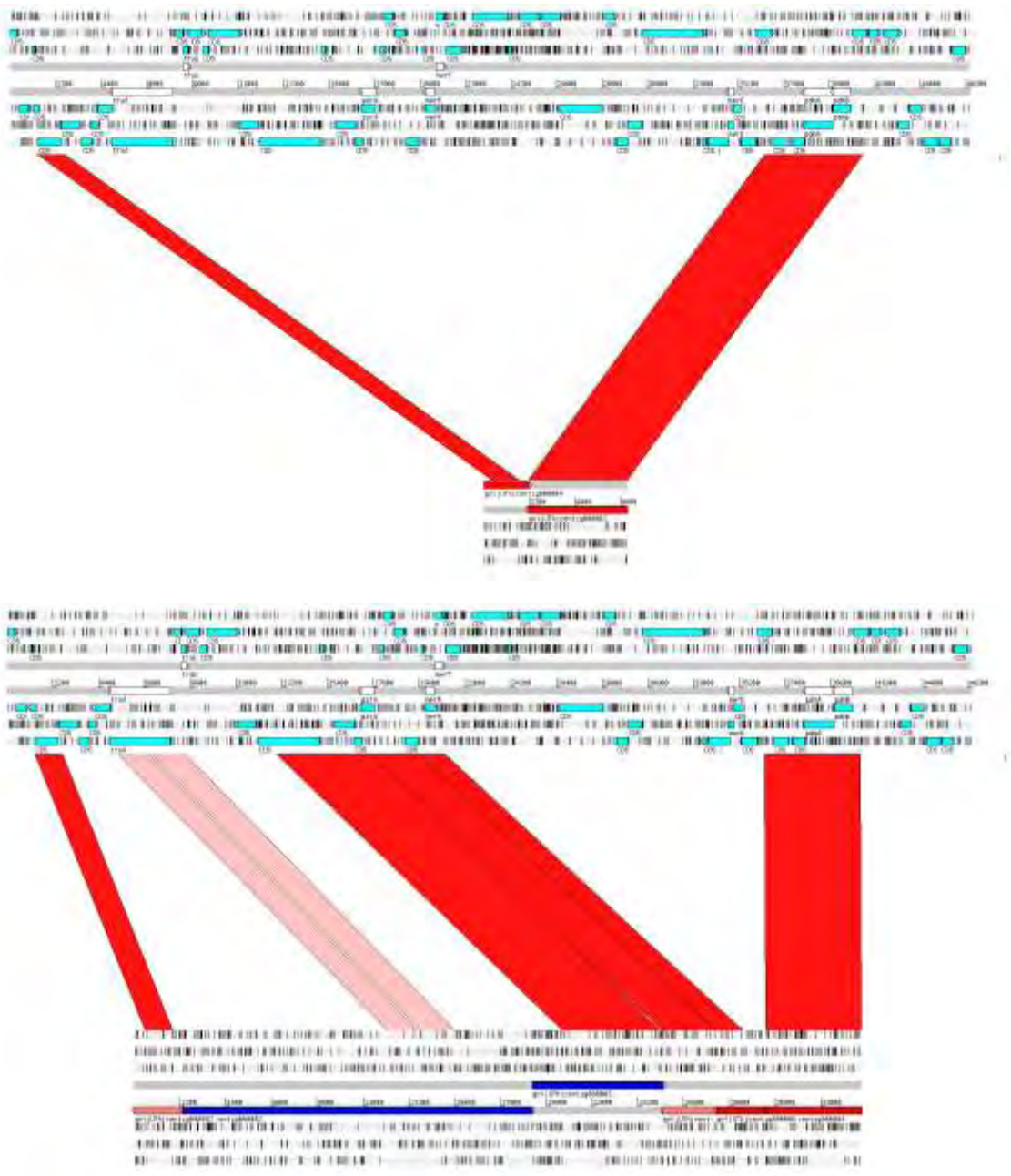
Α) Φοσμίδια 13-16 που ήταν θετικά για τα γονίδια *pdmAB*

Τα φοσμίδια 13, 14, 15 και 16 που βρέθηκαν θετικά ως προς τα γονίδια *pdmAB* έφεραν ενθέματα μεγέθους 39.1, 34, 46.1 και 41.5 kb αντίστοιχα, με βάση την συναρμολόγηση τους ύστερα από αφαίρεση του φορέα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ενθέματα των τεσσάρων αυτών πλασμιδίων έφεραν γονίδια που εμφάνιζαν υψηλή ομολογία με τα γονίδια *pdmAB* αλλά και ευρύτερες περιοχές του πλασμιδίου psH που είχε απομονώθει από ένα βακτηριακό στέλεχος *Sphingomonas* το οποίο είχε την ικανότητα να αποδομεί το isoproturon (*Εικόνα 3.11*).

Από τα παραπάνω φοσμίδια, το 14 έφερε μόνο το γονίδιο *pdmA*, σύμφωνα με την δοκιμή διαλογής PCR. Αντίθετα τα ενθέματα των φοσμιδίων 13, 15 και 16 έδειξαν υψηλή ομολογία με μια περιοχή περίπου 4.460 bp που βρέθηκε στο πλασμίδιο psH. Η ομόλογη περιοχή περιελάμβανε τα γονίδια *pdmAB* καθώς και ένα αριθμό υποθετικών πρωτεϊνών και μία διοξυγενάση-β υδροξυλίωσης αρωματικού δακτυλίου που βρέθηκε επίσης στην κασέτα γονιδίων *pdmAB* στο πλασμίδιο psH. Εκτός από την περιοχή αυτή τα φοσμίδια 13, 14 και 15 έδειξαν ομολογία με το πλασμίδιο psH και σε μία ακόμη περιοχή περίπου 1.000 bp. Το φοσμίδιο 16 έδειξε την πιο εκτεταμένη ομολογία με το πλασμίδιο psH και εκτός από τις δύο περιοχές που αναφέρθηκαν παραπάνω έδειξε υψηλή ομολογία με μια περιοχή 8 kbs ανοδικά του *pdmAB* που κωδικοποίησε αρκετές υποθετικές πρωτεΐνες και επίσης μια πρωτεΐνη διαχωρισμού πλασμιδίου (*parA*) και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντοχή στον υδράργυρο (*merT*, *merR*).



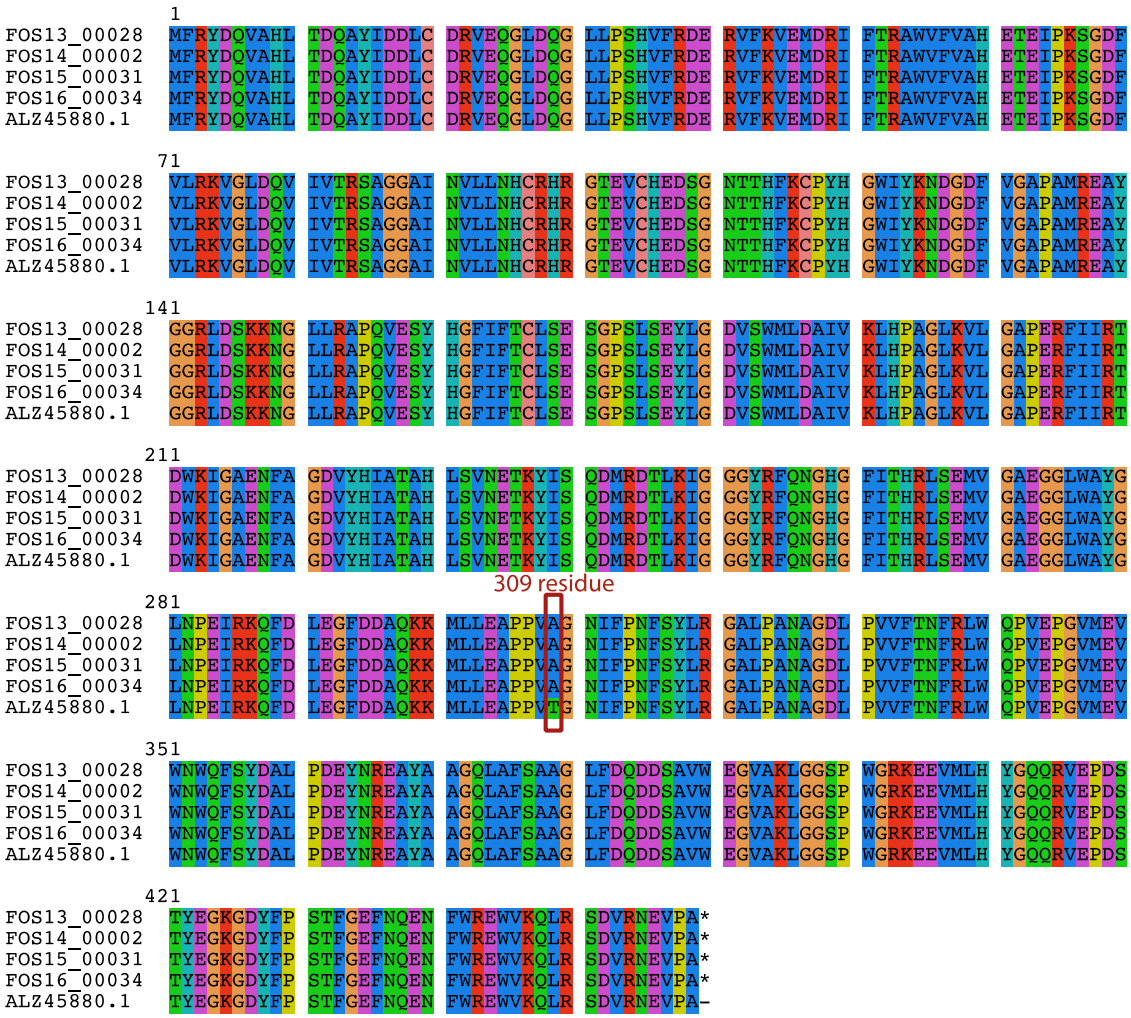
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87



Εικόνα 3.11: Τα αποτελέσματα ομοπαράθεσης των γονιδίων στα φοσμίδια 13, 14, 15 και 16 (κάτω πάνελ) επί του πλασμιδίου psH από βακτηριακό στέλεχος Sphingomonas (άνω πάνελ) που είχε την ικανότητα να αποδομεί το ζιζανιοκτόνο isoproturon. Με κόκκινες γραμμές συνδέονται περιοχές που εμφανίζουν ομολογία >97% ενώ με ροζ γραμμές συνδέονται περιοχές που εμφανίζουν ομολογία 70%.

Ομοπαράθεση των αλληλουχιών των πρωτεινών που κωδικοποιούνται από το υποθετικό γονίδιο *pdmA* στα τέσσερα φοσμίδια σε σχέση με την αλληλουχία του *pdmA* από το πλασμίδιο psH έδειξε την ύπαρξη μιας μόνο υποκατάστασης στην αλληλουχία της υποθετικής πρωτείνης των τεσσάρων πλασμιδίων στο αμινοξικό κατάλοιπο 309 (θρεονίνη έναντι αλανίνη) (*Εικόνα 3.12*).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87



Εικόνα 3.12: Ομοπαράθεση της υποθετικής πρωτεΐνης *PdmA* που βρίσκεται στα φοσμίδια 13, 14, 15 και 16 και της πρωτείνης *PdmA* που κωδικοποιείται στο πλασμίδιο pSH του στελέχους Sphingomonas.

B) Τα φοσμίδια 1-12:

Η συναρμολόγηση των γονιδίων που εντοπίστηκαν στα φοσμίδια 1 έως 12 έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα φοσμίδια περιείχαν ενθέματα μεγεθούς από 32,8 kb στο φοσμίδιο 6 έως 41,9 kb στο φοσμίδιο 3. Τα περισσότερα ενθέματα περιείχαν υψηλό αριθμό επαναλήψεων (repeats) κάτι που αποτελεί χαρακτηριστικό πλασμιδιακής προέλευσης. Γονίδια υποθετικού ενδιαφέροντος για περαιτέρω έρευνα όπως εστεράσες και μονοξυγενάσες εντοπίστηκαν ύστερα από λειτουργικό χαρακτηρισμό και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 1. Αρκετά από τα φοσμίδια έφεραν γονίδια που κωδικοποιούν εστεράσες ή καρβοξυεστεράσες (Φοσμίδια 1, 2, 3, 4 και 10). Άλλα φοσμίδια όπως το 5 και το 9 φάνηκε να φέρουν εξαρτώμενες της φλαβίνης μονοξυγενάσες. Στα φοσμίδια 3 και 5 βρέθηκαν οπερόνια που περιέχουν γονίδια γνωστά για τον ρόλο τους στο *μετα*-μονοπάτι καταβολισμού αρωματικών ενώσεων (πχ. 4-carboxymuconolactone decarboxylase, 3-oxoadipate enol lactonase) (*Πίνακας 3.2*).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Πίνακας 3.2: Κατάλογος γονιδίων που εντοπίστηκαν στα φοσμίδια 1-12 που αναγνωρίστηκαν ως θετικά στα φαινοτυπικά τεστ για εστεράσες, υδρολάσες και μονοξυγενάσες.

Φοσμίδια	**Ικρίωμα**	**Λειτουργικός χαρακτηρισμός**
1	2	nlhH carboxylesterase
2	3	nlhH carboxylesterase
3	1	L-aminopeptidase/D-esterase
	1	putative metal-dependent hydrolase of the TIM-barrel fold protein
	1	4-carboxymuconolactone decarboxylase
	1	3-oxoadipate enol-lactonase 2
	1	3-carboxy-cis%2Ccis-muconate cycloisomerase
4	1	Esterase (estB)
5	2	Flavin-dependent monooxygenase oxygenase subunit HsaA
	2	2-hydroxyhexa-2,4-dienoate hydratase
	2	Acetaldehyde dehydrogenase
	2	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase
	2	Fumarate reductase flavoprotein subunit precursor
	2	NADH oxidase
	2	2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-diol dehydrogenase
8	1	Nicotinamide-nucleotide amidohydrolase PncC
	1	Methionine aminopeptidase
	1	6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolase
9	2	Flavin-dependent monooxygenase oxygenase subunit HsaA
10	1	Esterase (estB)
	2	2-octaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase
	2	2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-benzoquinol hydroxylase
11	1	Phenoxybenzoate dioxygenase subunit beta
	1	3-oxoadipate enol-lactonase
	1	2,5-dihydroxypyridine-dioxygenase
	1	p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase reductase component
12	2	Alpha/beta hydrolase fold protein

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Τα φοσμίδια 5, 9 και 11 ήταν θετικά στη δοκιμή φαινοτύπου Mangenta caprylate που στοχεύει ένζυμα με δραστικότητα εστεράσης-υδρολάσης. Το αποτέλεσμα αυτό για τα φοσμίδια 5 και 11 συνάδει με τον εντοπισμό γονιδίων εστερασών-υδρολασών μετά την αλληλούχιση των φοσμιδίων αυτών. Όσο αφορά το φοσμίδιο 9, τα αποτελέσματα της δοκιμής φαινοτύπου δεν συμφωνούν με αυτά της αλληλούχισης, καθώς στο φοσμίδιο αυτό δεν εντοπίστηκε κάποιο γονίδιο που να κωδικοποιεί εστεράση-υδρολάση.

Τα ίδια φοσμίδια εμφάνισαν θετικό φαινότυπο και στην δοκιμή οξείδωσης ινδόλης που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση δραστικότητας μονοξυγενάσης. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν πλήρως με τον εντοπισμό οξυγενασών μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης.

Όλα τα υπόλοιπα φορμίδια βρέθηκαν θετικά στην δοκιμή Tributyrin που πραγματοποιείται για την διαλογή γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα με λιπολυτική-εστερολυτική δραστικότητα. Αυτά τα ευρύματα συμφωνούν με τον εντοπισμό καρβοξυεστερασών, εστερασών και λιπασών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

4. Συζήτηση

Στην παρούσα πτυχιακή χρησιμοποιήθηκε λειτουργική μεταγονιδιωματική σε δείγματα βιομίγματος από σύστημα βιοκλίνης που είχε εκτεθεί συστηματικά σε πλήθος γεωργικών φαρμάκων. Η υπόθεση ήταν ότι η συστηματική αυτή έκθεση του βιομίγματος σε διάφορες ομάδες γεωργικών φαρμάκων αναμένεται, με βάση την πλαστικότητα του γενετικού υλικού των βακτηρίων, να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων καταβολικών μηχανισμών στα μέλη της βακτηριακής κοινότητας. Με βάση την παραπάνω υπόθεση θεωρήθηκε ότι το συγκεκριμένο υπόστρωμα αναμένεται να αποτελεί μια πλούσια δεξαμενή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα με ρόλο στον καταβολισμό γεωργικών φαρμάκων. Πράγματα προηγούμενες και πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει ότι οι βιοκλίνες λόγω της συστηματικής τους έκθεσης σε γεωργικά φάρμακα αποτελούν ένα τεχνητό οικοσύστημα που υποστηρίζει μια μικροβιακή κοινότητα με υψηλή καταβολική δραστηριότητα [Sniegowski et al., 2011] και αποτελούν hot-spot ανταλλαγής γενετικού υλικού μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς [Jehalke et al., 2013].

Από την λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση της βιβλιοθήκης φοσμιδιακών κλώνων που δημιουργήθηκε προέκυψαν μέσω φαινοτυπικών τεστ και PCR συνολικά 12 φοσμίδια θετικά σε δράση εστερασών και/ή μονοξυγενασών και 4 φοσμίδια που περιείχαν τα γονίδια *pdmAB* αντίστοιχα. Αλληλούχιση των ενθεμάτων από τα παραπάνω φοσμίδια και συναρμολόγηση τους έδειξε μεγάλο αριθμό επαναλήψεων και πλασμιδιακών γονιδίων καταδεικνύοντας την πλασμιδιακή προέλευση των φοσμιδίων που εμφάνισαν θεμιτούς φαινότυπους. Η πλασμιδιακή προέλευση των ενθεμάτων βρίσκεται σε συμφωνία με τις παραπάνω μελέτες που έδειξαν την σημαντική δυναμική των πλασμιδίων σε συστήματα βιοκλινών [Dunon et al., 2013, Dealtry et al., 2014] αλλά και τον εντοπισμό των γονιδίων *pdmAB* σε πλασμίδια διαφόρων βακτηριακών στελεχών [Yan et al., 2016]. Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το πλασμιδίωμα από βιομίγμα βιοκλινών περιείχε μεγάλο αριθμό γονιδίων (*atzA, tfdA, tfdB*) με πιθανό ρόλο στην αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων [Martini et al., 2016].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

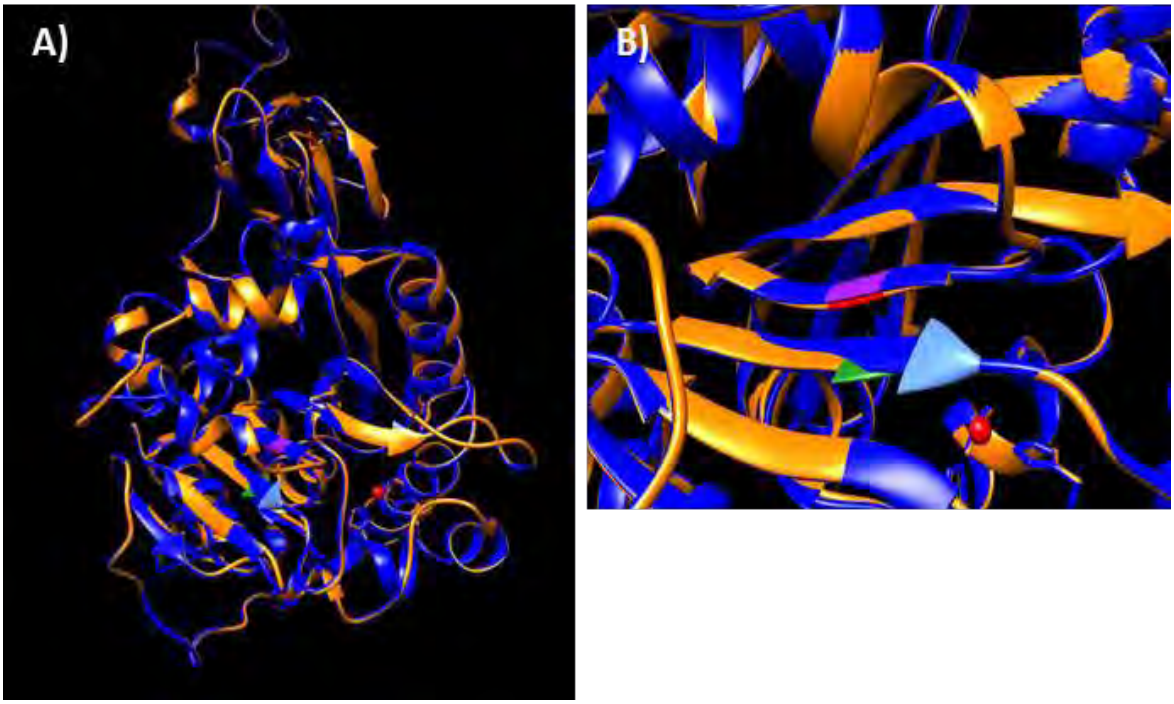
4.1 Φοσμίδια 13-16

Στα φοσμίδια αυτά εντοπίστηκαν τα γονίδια *pdmAB*. Είναι η πρώτη αναφορά εντοπισμού των συγκεκριμένων γονιδίων μέσω μεταγονιδιωματικής ανάλυσης. Μέχρι σήμερα τα γονίδια αυτά έχουν εντοπιστεί σε διάφορα βακτηριακά στελέχη του γένους Sphingomonas τα οποία έχουν την ικανότητα να αποδομούν το isoproturon [Yan et al., 2016, Gu et. al 2013]. Τα συγκεκριμένα γονίδια βρέθηκε ότι κωδικοποιούν τις δύο υπομοναδες μιας N-απομεθυλάσης η οποία καταλύει τα δύο βήματα απομεθυλίωσης N,N-διμέθυλο υποκατεστημένων ζιζανιοκτόνων της ομάδας των φαινυλουριών ενώ ταυτόχρονα φαίνεται ότι έχει και την ικανότητα να υδροξυλιώνει το μόνο-μέθυλο παράγωγο από την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι μεταβολισμού [Yan et al., 2016]). Στη πρώτη αναφορά του *pdmAB* οι Gu et. al (2013) διαπίστωσαν ότι το γονίδιο *pdmA* βρισκόταν καθοδικά 23 bp του orf1, και υπήρχε μια αλληλοεπικάλυψη 4-bp ανάμεσα στα γονίδια *pdmA* και *pdmB*. Οι αμινοξικές αλληλουχίες των *PdmA* και *PdmB* αποτελούνταν από 459 και 176 κατάλοιπα αμινοξέων, αντίστοιχα. Επιπλέον η πρωτείνη *PdmA* έδειξε χαμηλή ομολογία με άλλες Rieske non-heme iron oxygenases (ROs) αλλά και με μονοξυγενάσες που συμμετέχουν σε O- και N-απομεθυλάσες καταδεικνύοντας ότι τα *PdmAB* αποτελούν μια καινούργια ομάδα N-απομεθυλάσων. Τα δύο αυτά γονίδια εντοπίστηκαν και στο πλασμίδιο psH του βακτηριακού στελέχους *Sphingomonas* SH το οποίο απομονώθηκε από εδάφη στην Γαλλία και είχε την δυνατότητα να αποδομεί ταχύτατα το isoproturon [Hussain et al., 2011].

Ομοπαράθεση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *pdmA* που εντοπίστηκε στα ενθέματα των φοσμιδίων και του γονιδίου *pdmA* που βρέθηκε στο πλασμίδιο psH έδειξε την ύπαρξη μιας μόνο υποκατάστασης στη θέση 309 (θρεονίνη έναντι αλανίνη). Η υψηλή ομολογία μεταξύ των *pdmA* γονιδίων που εντοπίστηκαν στην μεταγονιδιωματικής μας βιβλιοθήκη και του γονιδίου *pdmA* από το πλασμίδιο psH είναι σε συμφωνία με την υψηλή συντήρηση του συγκεκριμένου γονιδίου σε όλα τα βακτηριακά στελέχη που έχει εντοπιστεί [Yan et al., 2016]. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός παρατηρείται για πρώτη φορά και δεν είναι γνωστό εάν έχει επίδραση στο φάσμα των υποστρωμάτων που καταλύει η συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Ο αμινοξικός πολυμορφισμός στη θέση 309 δεν φαίνεται να προκαλεί σημαντικές διαρθρωτικές διαφορές μεταξύ της μητρικής πρωτείνης *PdmA* και της αντίστοιχης πρωτεΐνης που βρέθηκε στο φοσμίδιο 13 (*Εικόνα 4.1α*). Εντούτοις, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 4.1β*, η υποκατάσταση βρίσκεται σε μία δομή τύπου β-α-β μοτίβου κοντά στην περιοχή που περιέχει σίδηρο (πιθανώς την ενεργή περιοχή) που βρίσκεται σε μια δομή φακέλου. Αν και η υποκατάσταση δεν οδηγεί σε διαφορές στην δομή των πρωτεϊνών, επηρεάζει πιθανώς τη δέσμευση υδρογόνου μεταξύ των β-φύλλων, καθώς οδηγεί στην επέκταση ενός κλώνου β-φύλλου της κωδικοποιημένης στο φοσμίδιο πρωτεΐνης σε σύγκριση με τον κλώνο β-φύλλου της *pdmA* με μήκος ενός αμινοξέος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87



Εικόνα 4.1: Α) Μοντέλο τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης *PdmA* που κωδικοποιείται από τα φοσμίδια (πορτοκαλί χρώμα) και το *PdmA* που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο psH του στελέχους *Sphingomonas* (μπλέ χρώμα). Η δομή δεν φαίνεται να έχει επηρεαστεί από τον αμινοξικό πολυμορφισμό στην θέση 309. Β) Μοντέλο τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης *PdmA* που κωδικοποιείται από τα φοσμίδια (μοβ χρώμα) και το *PdmA* που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο psH του στελέχους *Sphingomonas* (κόκκινο χρώμα). Το γαλάζιο βέλος απεικονίζει επέκταση ενός κλώνου β-φύλλου της κωδικοποιημένης στο φοσμίδιο πρωτεΐνης σε σύγκριση με τον κλώνο β-φύλλου της *pdmA* με πράσινο βέλος.

Ο μεγάλος αριθμός επαναλήψεων στις αλληλουχίες που ελήφθησαν για τα φοσμίδια 13-16 δεν επέτρεψε την πλήρη συναρμολόγηση των φοσμιδίων. Οι διάφορες επαναλήψεις που εντοπίστηκαν σε αυτά τα φοσμίδια συνδυάστηκαν με την παρουσία αρκετών γονιδίων που συνήθως βρίσκονται σε πλασμίδια όπως οι τρανσποζάσες (*TnpA, IS66*), πρωτεΐνες συζευγμένης μεταφοράς (*traG, traA, traD*) και πρωτεΐνες διαχωρισμού πλασμιδίων. Η πλήρης συναρμολόγηση των τεσσάρων φοσμιδίων θα επιτρέψει εκτεταμένη σύγκριση μεταξύ των αλληλουχιών των ενθεμάτων των φοσμιδίων και του πλασμιδίου psH.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

4.2 Φοσμίδια 1-12

Όπως και στην περίπτωση των φοσμιδίων 13-16, και τα ενθέματα των φοσμιδίων 1-12 περιείχαν μεγάλων αριθμό επαναλήψεων που δεν επέτρεψαν την πλήρη συναρμολόγηση των ενθεμάτων σε ένα ικρίωμα. Ο μεγάλος αριθμός επαναλήψεων αποτελεί ένδειξη της πλασμιδιακής προέλευσης των ενθεμάτων στα φοσμίδια 1-12.

Στα ενθέματα των περισσοτέρων από τα παραπάνω φοσμίδια εντοπίστηκαν γονίδια με πιθανό ρόλο στην αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων. Έτσι στα φοσμίδια 5 και 9 εντοπίστηκαν γονίδια που κωδικοποιούν εξαρτώμενες της φλαβίνης μονοξυγενάσες, ένζυμα που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων που περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους στο μόριο τους [Suske et al., 1999 , van Berkel et al., 2006]. Επιπλέον, στα φοσμίδια 3 και 5 βρέθηκαν οπερόνια γονιδίων που εμπλέκονται στο μετα-μονοπάτι μεταβολισμού αρωματικών ουσιών [Franklin et al., 1981, Mars et al. 1997] .

Στα ενθέματα των φοσμιδίων 1 και 2 εντοπίστηκαν γονίδια που κωδικοποιούν καρβοξυεστεράσες. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει το σημαντικό ρόλο των καρβοξυεστερασών στην αποδόμηση καρβαμιδικών εντομοκτόνων [Hashimoto et al. 2002]. Αντίστοιχα στα φοσμίδια 4 και 10 βρέθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν εστεράσες. Ανάλογες εστεράσες έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην αποδόμηση πυρεθροειδών εντομοκτόνων στα οποία είχε εκτεταμένη και πολυετή έκθεση το βιομίγμα από όπου δημιουργήθηκε η μεταγονιδιωματική βιβλιοθήκη. Προηγούμενες λειτουργικές μεταγονιδιωματικές μελέτες έχουν οδηγήσει στην απομόνωση δύο εστερασών από δείγματα εδάφους που είχαν την ικανότητα να υδρολύουν πυρεθροειδή εντομοκτόνα [Li et al., 2008, Fan et al., 2012]. Αυτές ως σήμερα είναι οι μοναδικές αναφορές ενζύμων που έχουν απομονωθεί από μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες και αποδομούν γεωργικά φάρμακα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

4.3 Μελλοντικές προσεγγίσεις

Η εφαρμογή της λειτουργικής μεταγονιδιωματικής σε περιβαλλοντικά δείγματα επιτρέπει την απομόνωση καταβολικών γονιδίων με πιθανό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, αλλά προσδίδει και νέες πληροφορίες σχετικά με τα εξελικτικά πρότυπα αυτών των γονιδίων. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης στο μέλλον θα:

1. Μελετηθεί σε μεγαλύτερο βάθος η καταλυτική ικανότητα ενζύμων που κωδικοποιούνται από πρωτεΐνες στα φοσμίδια 1-12. Ειδικότερα πιθανές πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στα φοσμίδια και εμφανίζουν λειτουργικό χαρακτηρισμό σχετικό με την αποδόμηση οργανικών ρύπων (π.χ εστεράσες, μονοξυγενάσες) θα χαρακτηριστούν φυλογενετικά ώστε να ταξινομηθούν ως προς την οικογένεια και το είδος των υποστρωμάτων που μπορούν να χρησιμοποιούν ένζυμα της συγκεκριμένης οικογένειας. Ακολούθως θα πραγματοποιηθεί απομόνωση, υπερέκφραση και χαρακτηρισμός της αποδομητικής ικανότητας των συγκεκριμένων ενζύμων που εντοπίστηκαν στα φοσμίδια 1-12.

2. Θα διευρυνθεί το μέγεθος της μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης ώστε να εξεταστούν περισσότεροι από τους 10.000 κλώνους που αξιολογήθηκαν σε πρώτη φάση. Εναλλακτικά θα ληφθούν νέα δείγματα βιομίγματος από άλλες βιοκλίνες και θα δημιουργηθούν νέες μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι τέτοια βιομίγματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν πολύτιμη πηγή απομόνωσης νέων καταβολικών ενζύμων έναντι γεωργικών φαρμάκων χρησιμοποιώντας λειτουργική μεταγονιδιωματική.

3. θα πραγματοποιηθεί επανασυναρμολόγηση των φοσμιδίων 13-16 όπου εντοπίστηκαν τα γονίδια *pdmAB* χρησιμοποιώντας πλατφόρμα αλληλούχισης Pacific Biosciences που επιτρέπει την αλληλούχιση μεγάλων θραυσμάτων DNA (5-10 kb). Η πλήρης συναρμολόγηση σε ένα ικρίωμα των φοσμιδίων 13-16 θα δώσει πολύτιμες πληροφορίες για τον μηχανισμό εξέλιξης και διασποράς των συγκεκριμένων καταβολικών γονιδίων. Επιπροσθέτως, τα γονίδια *pdmAB* θα απομονωθούν με ετερόλογη έκφραση σε κατάλληλους φορείς και θα αξιολογηθεί in vitro εάν οι πολυμορφισμοί που παρατηρούνται στο μεταφρασμένο προϊόν των γονιδίων *pdmAB* έχουν επιπτώσεις στην εξειδίκευση του υποστρώματος του ενζύμου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

ΙΙΙ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrawal A., Pandey R. S., Sharma B., 2010. "Water Pollution with Special Reference to Pesticide Contamination in India". JWARP, 2: 432-448.
- Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A. 2009. ''Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards.'' Interdisciplinary toxicology, 2(1): 1-12.
- Andrew E. Berry, Claudia Chiocchini, Tina Selby, Margherita Sosio, Elizabeth M.H. Wellington, 2003 ''Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors.'' FEMS Microbiology Letters 223 15-20
- Anke Henne, Rolf Daniel, Ruth A. Schmitz, and Gerhard Gottschalk, 1999, ''Construction of Environmental DNA Libraries in Escherichia coli and Screening for the Presence of Genes Conferring Utilization of 4-Hydroxybutyrate.'' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p. 3901–3907
- Arbeli Z., Fuentes C. L., 2007. "Accelerated biodegradation of pesticides: an overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension". Crop prot., 26: 1733-1746.
- Arnold D. J., Briggs G. G., 1990. "Fate of pesticides in soil: predictive and practical aspects". In: Environmental Fate of Pesticides, Hutson D. H , Roberts T. R. eds., Chapter 5.
- Benedikt Leis, Angel Angelov, Wolfgang Liebl, 2013. ''Screening and Expression of Genes from Metagenomes.'' Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, Freising, Bavaria, Germany
- Blackburn J. W., Hafker W. R., 1993. "The impact of biochemistry, bioavilability, and bioactivity on the selection of bioremediation technologies". Trends Biotechnol., 11 (8): 328-333.
- Brennerova, M.V., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D.H., Junca, H. 2009. ''Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation.'' Environmental Microbiology, 11 (9), pp. 2216-2227.
- Cai D.W., 2008. "Understand the role of chemical pesticides and prevent misuses of pesticides". Bulletin of Agricultural Science and Technology, 1: 36-38.
- Castillo, M.D.P., Torstensson, L. 2007. ''Effect of biobed composition, moisture, and temperature on the degradation of pesticides.'' Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (14), pp. 5725-5733.
- Castillo, M.D.P., Torstensson, L., Stenström, J. 2008. ''Biobeds for environmental protection from pesticide use - A review.'' Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56 (15), pp. 6206-6219.
- Cerejeira M. J., Viana P., Batista S., Pereira T., Silva E., Valerio M. J., Silva A., Fereira M., Silva-Fernandes A. M., 2003. "Pesticides in Portuguese surface and ground waters". *Water Res.*, 37: 1055-1063.
- Colin W. Ohlhoff, Bronwyn M. Kirby, Leonardo Van Zyl, David L.R. Mutepfa, Ana Casanueva, Robert J. Huddy, Rolene Bauer, Don A. Cowan, Marla Tuffin, 2015, ''An unusual feruloyl esterase belonging to family VIII esterases and displaying a broad substrate range.'' Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 118 79–88
- Cooper J., Dobson H., 2007. "The benefits of pesticides to mankind and the environment". Crop Prot., 26 (9): 1337-1348.
- Coppola, L., Castillo, M.D.P., Monaci, E., Vischetti, C. 2007. ''Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to Southern Europe conditions.'' Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (2), pp. 396-401.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

- Coppola, L., Pilar Castillo, M.D., Vischetti, C. 2011. ''Degradation of isoproturon and bentazone in peat- and compost-based biomixtures.'' Pest Management Science, 67 (1), pp. 107-113.
- D.A. Cowan, A. Arslanoglu, S.G. Burton, G.C. Baker, R.A. Cameron, J.J. Smith and Q. Meyer, 2004, '' Metagenomics, gene discovery and the ideal biocatalyst.'' Biochemical Society Transactions Volume 32, part 2
- Damalas C. A. and Eleftherohorinos I. G., 2011. "Pesticide exposure, safety issues and risk assessment indicators". Int. J. Environ. Res. Public Health, 8: 1402-1419.
- Damalas, C.A. 2009. ''Understanding benefits and risks of pesticide use.'' Sci. Res. Essays, 4, 945-949
- De Wilde, T., Spanoghe, P., Debaer, C., Ryckeboer, J., Springael, D., Jaeken, P. 2007. ''Overview of on-farm bioremediation systems to reduce the occurrence of point source contamination.'' Pest Management Science, 63 (2), pp. 111-128.
- De´bora Farage Knupp dos Santos . Paula Istvan . Eliane Ferreira Noronha Betaˆnia Ferraz Quirino . Ricardo Henrique Kru¨ger, 2015, '' New dioxygenase from metagenomic library from Brazilian soil: insights into antibiotic resistance and bioremediation.'' Biotechnol Lett 37:1809–1817
- Dealtry S., et al., 2014. ''Cultivation-Independent Screening Revealed Hot Spots of IncP-1, IncP-7 and IncP-9 Plasmid Occurrence in Different Environmental Habitats.'' PlosOne 9(2): e89922. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089922
- Dich J., Zahm S. H., Hanberg A., Adami H. O., 1997. "Pesticides and cancer". Cancer Causes Control, 8: 420-443.
- Dua M., Singh A., Sethunathan N., Johri A. K., 2002. "Biotechnology and bioremediation: successes and limitations". Appl. Microbiol. Biotechnol., 59: 143–152.
- Dunon et al., 2013. ''High prevalence of IncP-1 plasmids and IS1071 insertion sequences in on-farm biopurification systems and other pesticide-polluted environments.'' FEMS Microbiology Ecology 86:415-431
- Erbach G., 2012. "Pesticides legislation in the EU- towards sustainable use of plant protection products". Library Briefing, Library of the European Parliament. http://www.library.ep.ec.
- European Commission (EC), 2006. "Executive Summary of The impact assessment of the thematic strategy on the sustainable use of pesticides". Commission Staff Working Document, SEC(2006) 914.
- Eurostat Statistic Explained 2016. Pesticide sale statistics. Available at http://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/index.php/Pesticide_sales_statistics#Data_sources_and_availability
- Fan et al., 2012. ''Identification and characterization of a novel thermostable pyrethroid-hydrolyzing enzyme isolated through metagenomic approach.'' Microbial Cell Factories 11:33 http://www.microbialcellfactories.com/content/11/1/33
- FAO, 1989. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides, Rome, Italy.
- Ferrer, M., Martínez-Martínez, M., Bargiela, R., Streit, W.R., Golyshina, O.V., Golyshin, P.N. 2016. ''Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: Current status and future trends.'' Microbial Biotechnology, 9 (1), pp. 22-34.
- Fetzner S., 2002. "Biodegradation of Xenobiotics". In: Biotechnology, Doelle and Da Silva eds., Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

- Fogg, P., Boxall, A.B.A., Walker, A. 2003. ''Degradation of pesticides in biobeds: The effect of concentration and pesticide mixtures.'' Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 (18), pp. 5344-5349. (a)
- Fogg, P., Boxall, A.B.A., Walker, A., Jukes, A. 2004. ''Degradation and leaching potential of pesticides in biobed systems.'' Pest Management Science, 60 (7), pp. 645-654. (b)
- Fogg, P., Boxall, A.B.A., Walker, A., Jukes, A. 2004. ''Effect of different soil textures on leaching potential and degradation of pesticides in biobeds.'' Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (18), pp. 5643-5652.(a)
- Fogg, P., Boxall, A.B.A., Walker, A., Jukes, A. 2004. ''Leaching of pesticides from biobeds: Effect of biobed depth and water loading.'' Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (20), pp. 6217-6227. (c)
- Fogg, P., Boxall, A.B.A., Walker, A., Jukes, A.A. 2003. ''Pesticide degradation in a 'biobed' composting substrate.'' Pest Management Science, 59 (5), pp. 527-537. (b)
- Franklin FCH, Bagdasarian M., et al. 1981. ''Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from Pseudomonas putida and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway.'' PNAS 78:7458-7462
- Góngora-Echeverría, V.R., Martin-Laurent, F., Quintal-Franco, C., Giácoman-Vallejos, G., Ponce-Caballero, C. 2017. ''Agricultural effluent treatment in biobed systems using novel substrates from southeastern Mexico: the relationship with physicochemical parameters of biomixtures.'' Environmental Science and Pollution Research, 24 (10), pp. 9741-9753.
- Hashimoto M, Fukui M, Hayano K et al. 2002. ''Nucleotide sequence and genetic structure of a novel carbaryl hydrolase gene (cehA) fromRhizobium sp. strain AC100.'' Appl Environ Microbiol;68:1220–7.
- Helen L. Steele, Wolfgang R. Streit, 2005, ''Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology.'' FEMS Microbiology Letters 247 (2005) 105–111
- Henriksen, V.V., Helweg, A., Spliid, N.H., Felding, G., Stenvang, L. 2003. ''Capacity of model biobeds to retain and degrade mecoprop and isoproturon.'' Pest Management Science, 59 (10), pp. 1076-1082.
- Hildebrandt A., Guillamon M., Lacorte S., Tauler R., Barcelo D., 2008. "Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain)". *Water Res.*, 42 (13): 3315-3326.
- Hussain S., et al., 2011. ''Isolation and characterization of an isoproturon mineralizing Sphingomonas sp. strain SH from a French agricultural soil.'' Biodegradation 22(3) 637-650
- Jechalke et al., 2013. ''Quantification of IncP-1 Plasmid Prevalence in Environmental Samples.'' Applied and Environmental Microbiology 79:1410-1413
- Jo Handelsman, 2004, '' Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms.'' MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, p. 669–685
- Johnson G. R., Spain J. C., 2003. "Evolution of catabolic pathways for synthetic compounds: bacterial pathways for degradation of 2,4-dinitrotoluene and nitrobenzene". Appl. Microbiol. Biotechnol., 62: 110-123.
- Karanasios E., Tsiropoulos N., Karpouzas D. G., Menkissoglu-Spiroudi U., 2010b. "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., Ehaliotis C., 2010b.'' Degradation and adsorption of pesticides in compost-based biomixtures as potential substrates for biobeds in south Europe.'' J. Agric. Food Chem.58, 9147-9156

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

- Karanasios, E., Tsiropoulos, N., Karpouzas, D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U., 2010a. ''Novel biomixtures based on local Mediterranean ligninocellulosic materials: evaluation for use in biobeds.'' Chemosphere 80, 914-921
- Karas P., Perruchon C., Exarhou C., Ehaliotis C., Karpouzas D. G., 2011. "Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi". Biodegradation, 22: 215-228.
- Karigar C. S., Rao S. S., 2011. "Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review". Enzyme Res., Article ID 805187, 11 pages.
- Kellogg R. L., Nehring R., Grube A., Goss D. V., Plotkin S., 2000. "Environmental indicators of pesticide leaching and runoff from farm fields". Presented in the Conference: "Agricultural Productivity: Data, Methods, and Measures". March 9-10, 2000, Washington DC.
- Kimura, N., Sakai, K., Nakamura, K. 2010. ''Isolation and characterization of a 4-nitrotoluene-oxidizing enzyme from activated sludge by a metagenomic approach.'' Microbes and Environments, 25 (2), pp. 133-139.
- Kontantinou I. K., Hela D. G., Albanis T. A., 2006. "The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels". Environ. Pollut., 141: 555-570.
- Leonard RA, 1990. ''Moment of Pesticides into surface waters. In: Pesticides in the soil environment.'', Book series No 2, Soil Science Society of America, Madison. U.S.A. pp. 303-349.
- Li G et al., 2008. ''Molecular cloning and characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase originating from the Metagenome.'' Microbial Cell Factories 7:38 doi:10.1186/1475-2859-7-38
- Mars AE, Kasberg T., et al., 1997. ''Microbial Degradation of Chloroaromatics: Use of the metaCleavage Pathway for Mineralization of Chlorobenzene.'' Applied and Environmental Microbiology 179: 4530-4537
- Martini MC 2016. ''Genomics of high molecular weight plasmids isolated from an on-farm biopurification system.'' Scientific Reports 6:28284, DOI: 10.1038/srep28284
- Michelle R. Rondon, Paul R. August, Alan D. Bettermann, Sean F. Brady, Trudy H. Grossman, Mark R. Liles, Kara A. Loiacono, Berkley A. Lynch, Ian A. Macneil, Charles Minor, Choi Lai Tiong, Michael Gilman, Marcia S. Osburne, Jon Clardy, Jo Handelsman and Robert M. Goodman, 2000, ''Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms.'' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p. 2541–2547 Vol. 66, No. 6
- Miller G. T., 2004. "Sustaining the Earth", 6th edition. Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California, Chapter 9: 211-216.
- Monaci E, Coppola L, Casucci C, Perucci P and Vischetti C, 2009. ''Retention capacity of an organic bio-mixture against different mixtures of fungicides used in vineyards." J Environ Sci Health B 44:724–729.
- Navarro S. , Vela N., Navarro G., 2007. "Review. An overview on the environmental behaviour of pesticide residues in soils". Span. J. Agric. Res., 5 (3): 357-375.
- Niklasch H and Joergensen RG 2001. ''Decomposition of peat, biogenic municipal waste compost, and shrub/grass compost added in different rates to a silt loam.'' *J Plant Nutr Soil Sci* 164:365–369
- Oded Beja`, 2004, ''To BAC or not to BAC: marine ecogenomics.'' Current Opinion in Biotechnology, 15:187–190
- Ortiz-Hernández M. A., Sánchez-Salinas E., Olvera-Velona A., Folch-Mallol J. L., 2011. "Pesticides in the Environment: Impacts and its Biodegradation as a Strategy for

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

Residues Treatment". In: Pesticides - Formulations, Effects, Fate, Stoytcheva M. ed., InTech, Chapter 27, pp.551-575.

- Ortiz-Hernandez M. L., Sanchez-Salinas E., Dantan-Gonzalez E., Castrejon-Godinez M. L., 2013. "Pesticide biodegradation: mechanisms, genetics, and strategies to enhance the process". In: Biodegradation- Life of Science, Dr. Rolando Chamy ed., InTech, Chapter 10, pp. 251-287.
- Palma P, Köck-Schulmeyer M, Alvarenga P, Ledo L, Barbosa IR, López de Alda M and Barceló D 2014. ''Risk assessment of pesticides detected in surface water of the Alqueva reservoir (Guadiana basin, southern of Portugal)''. Science of Total Environment, (488-499), 208-219.
- Patrick D Schloss and Jo Handelsman, 2003, ''Biotechnological prospects from metagenomics.'' Current Opinion in Biotechnology, 14:303–310
- Pimentel D., 2009b. "Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States". In: Integrated Pest Management: Innovation-Development Process, Vol. 1, Rajinder P., Dhawan A. eds., Springer, 88-111.
- Pinto, A.P., Rodrigues, S.C., Caldeira, A.T., Teixeira, D.M. 2016.''Exploring the potential of novel biomixtures and Lentinula edodes fungus for the degradation of selected pesticides. Evaluation for use in biobed systems.'' The Science of the total environment, 541, pp. 1372-1381.
- Robert B. Miller and Robert C. Karn, 1980. ''A rapid spectrophotometric method for the determination of esterase activity.'' *Journal of Biochemical and Biophysical Methods,* 3 345--354 345
- Rolf Daniel, 2004 ''The soil metagenome –a rich resource for the discovery of novel natural products.'' Current Opinion in Biotechnology, 15:199–204
- Ronhede S., Jensen B., Rosendahl S., Kragelund B. B., Juhler R. K., Aamand J., 2005. "Hydroxylation of the herbicide isoproturon by fungi isolated from agricultural soil". Appl. Environ. Microbiol., 71 (12): 7927-7932.
- Ross G., 2005. ''Risks and benefits of DDT.'' The Lancet 366 (9499): 1771.
- Seffernick J. L., Wackett L. P., 2001. "Rapid evolution of bacterial catabolic enzymes: a case study with atrazine chlorohydrolase". Biochemistry, 40: 12747-12753.
- Shukla KP, Singh NK, Sharma S, 2010. ''Bioremediation: developments, current practices and perspectives.'' Genet. Eng. Biotechnol. J., 3: 1-20.
- Singh B. K., Walker A., 2006. "Microbial degradation of organophosphorus compounds". FEMS Microbiol. Rev., 30 (3): 428–471.
- Singh, A., Singh Chauhan, N., Thulasiram, H.V., Taneja, V., Sharma, R. 2010. ''Identification of two flavin monooxygenases from an effluent treatment plant sludge metagenomic library.'' Bioresource Technology, 101 (21), pp. 8481-8484.
- Singleton I., 1994. "Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research". J. Chem. Tech. Biotechnol., 59 (1): 9–23.
- Sniegowski K, Bers K, Van Goetem K, Ryckeboer J, Jaeken P, Spanoghe P & Springael D 2011. ''Improvement of pesticide mineralization in on-farm biopurification systems by bioaugmentation with pesticide-primed soil.'' FEMS Microbiol Ecol 76: 64–73.
- Spliid, N.H., Helweg, A., Heinrichson, K. 2006. ''Leaching and degradation of 21 pesticides in a full-scale model biobed.'' Chemosphere, 65 (11), pp. 2223-2232.
- Suenaga, H., Ohnuki, T., Miyazaki, K. 2007. ''Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds.'' Environmental Microbiology, 9 (9), pp. 2289-2297.
- Sulaiman, S., Yamato, S., Kanaya, E., Kim, J.-J., Koga, Y., Takano, K., Kanaya, S. 2012. ''Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate -degrading

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87

activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach.'' Applied and Environmental Microbiology, 78 (5), pp. 1556-1562.

- Suske, W. A., van Berkel, W. J. H. & Kohler, H.-P. E. 1999. ''Catalytic mechanism of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase, a flavoprotein from Pseudomonas azelaica HBP1.'' J. Biol. Chem. 274, 33355-33365
- Suthersan S. S., 1999. "In situ bioremediation". In: Remediation engineering: design concepts, Suthersan S. S. ed., Boca Raton: CRC Press LLC, Chapter 5.
- Tao Gu,a Chaoyang Zhou,a Sebastian R. Sψrensen,b Ji Zhang,a Jian He,a Peiwen Yu,a Xin Yan,a Shunpeng Lia, 2013. ''The Novel Bacterial N-Demethylase PdmAB Is Responsible for the Initial Step of N,N-Dimethyl-Substituted Phenylurea Herbicide Degradation.'' Applied and Environmental Microbiology 79:24, p. 7846–7856
- Taupp, M., Mewis, K., Hallam, S.J. 2011. ''The art and design of functional metagenomic screens.'' Current Opinion in Biotechnology, 22 (3), pp. 465-472.
- The new science of metagenomics Revealing the Secrets of Our Microbial Planet, Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications, Board on Life Sciences, Division on Earth and Life Studies, National research counsil of the natiomal academy THE NATIONAL ACADEMIES PRESS, Washington, DC, www.nap.edu
- Top E. M., Springael D., 2003. "The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds". Curr. Opin. Biotechnol., 14: 262-269.
- Torsten Thomas, Jack Gilbert and Folker Meyer. 2012. ''Metagenomics - a guide from sampling to data analysis.'' Microbial Informatics and Experimentation., 2:3 http://www.microbialinformaticsj.com/content/2/1/3
- Uroz, S., Ioannidis, P., Lengelle, J., Cébron, A., Morin, E., Buée, M., Martin, F. 2013. ''Functional Assays and Metagenomic Analyses Reveals Differences between the Microbial Communities Inhabiting the Soil Horizons of a Norway Spruce Plantation'' PLoS ONE, 8 (2), art. no. e55929
- van der Meer J. R., 1997. "Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds". A. Van. Leeuw. J. Microb., 71, 159-178.
- van der Meer J. R., Sentchilo V., 2003. "Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria". Curr. Opin. Biotechnol., 14: 248-254.
- Vidali M., 2001. "Bioremediation. An overview". Pure Appl. Chem., 73 (7): 1163–1172.
- Vischetti C, Capri E, Trevisan M, Casucci C and Perucci P 2004. ''Biomassbed: A biological system to reduce pesticide point contamination at farm level.'' Chemosphere, 55, 823–828
- Von Wirén-Lehr, S., Del Pilar Castillo, M., Torstensson, L., Scheunert, I. 2001. ''Degradation of isoproturon in biobeds.'' Biology and Fertility of Soils, 33 (6), pp. 535-540.
- Wolfgang R Streit and Ruth A Schmitz, 2004 ''Metagenomics – the key to the uncultured microbes.'' Current Opinion in Microbiology, 7:492–498
- Yan X., et al., 2016. ''Comparative genomic analysis of isoproturon mineralizing sphingomonads reveals the isoproturon catabolic mechanism.'' Environmental Microbiology 18(12) 4888-4906
- Zhang W., Jiang F., Feng Ou J., 2011. "Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus". Proc. Intern. Acad. Ecol. Environ. Sci., 1 (2): 125-144.
- Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M. 1996. ''DNA recovery from soils of diverse composition." Applied and Environmental Microbiology, 62 (2), pp. 316-322.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/04/2024 14:55:55 EEST - 3.133.147.87