

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πτυχιακή Εργασία

<<Χαρακτηρισμός της αποδομητικής ικανότητας και του βιο-αποκαταστατικού δυναμικού ενός στελέχους *Pseudomonas* ως προς το αντιοξειδωτικό γεωργικό φάρμακο Διφαινιλαμίνη>>

Μπατιάνης Χρίστος

Λάρισα, 2015

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Bachelor Thesis

<<Characterization of the degradation capacity and bioremediation potential of
a *Pseudomonas* strain to degrade the antioxidant diphenylamin>>

Batianis Christos

Larisa, 2015

Υπεύθυνος Καθηγητής

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

Τριμελής Επιτροπή:

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριος Καρπούζα, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη και συντονισμό του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα πρυχιακή εργασία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Chiara Perruchon για την καθημερινή επίβλεψη της κατά το πειραματικό κομμάτι και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Διφαινιλαμίνη (DPA) είναι ένα γεωργικό φάρμακο με αντιοξειδωτικές ιδιότητες το οποίο χρησιμοποιείται εκτεταμένα από τα συσκευαστήρια φρούτων, ειδικότερα μήλων και αχλαδιών. Περιορίζει το επιφανειακό καφέτιασμα (scald) το οποίο προκαλείται στα φρούτα μετά από παρατεταμένη περίοδο αποθήκευσης, υποβαθμίζοντας την εμπορική τους αξία. Η μοναδικότητα του σκευάσματος το καθιστά αναπόσπαστο εργαλείο της μετασυλλεκτικής επεξεργασίας φρούτων. Παρόλα αυτά, η χρήση του οδηγεί στην παραγωγή αξιολογών ποσοτήτων υγρών αποβλήτων, καθώς η εφαρμογή του απαιτεί διάλυση του σε μεγάλο όγκο νερού. Η συγκέντρωση του DPA στα απόβλητα κυμαίνεται από 400-2000 mg/L καθιστώντας τα ιδιαίτερα τοξικά για το περιβάλλον. Η ασφαλής απόρριψη του στο περιβάλλον απαιτεί την επεξεργασία του με μια αποτελεσματική μέθοδο αποτοξικοποίησης. Η απουσία μιας τέτοιας μεθόδου ήταν το κίνητρο του εν λόγω πειράματος.

Για την εγκαθίδρυση μιας μεθόδου βιολογικής απορρύπανσης μελετήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν βακτήρια-αποδομητές του DPA. Απομονώθηκαν βακτήρια από δείγμα, μολυσμένου από DPA, εδάφους και αξιολογήθηκαν αρχικά ως προς την ικανότητα του να διασπούν το φάρμακο. Το στέλεχος *Pseudomonas putida*, το οποίο αξιολογήθηκε περαιτέρω στην παρούσα εργασία, φαίνεται ικανό να μεταβολίζει και να αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο όπου το DPA αποτελούσε μοναδική πηγή άνθρακα και αζώτου.

Η αποδομητική του ικανότητα αξιολογήθηκε τόσο σε υγρές όσο και σε στερεές καλλιέργειες εδάφους. Μετά το πέρας των πειραμάτων φανερώθηκε πως το βακτήριο είχε πολύ υψηλή δυναμική αποδόμησης του DPA, προσεγγίζοντας τα 2000 mg/l στις υγρές καλλιέργειες και 1000 mg/l στο έδαφος. Πέρα από το DPA, η διασπαστική ικανότητα του μελετήθηκε και ως προς άλλα τρία δομικά παρόμοια μόρια. Δύο πιθανοί μεταβολίτες της διάσπασης του DPA (ανιλίνη, κατεχόλη) και το μυκητοκτόνο Ortho-phenyl-phenol (OPP). Οι μεταβολίτες διασπάστηκαν εντελώς στις

πρώτες 24 ώρες ενώ στην περίπτωση του OPP το βακτήριο το αποδόμησε με πολύ βραδύτερο ρυθμό.

Με βάση τα αποτελέσματα έγινε σαφές πως το στέλεχος *P. putida* έχει την προοπτική να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για την εγκαθίδρυση μιας μεθόδου βιολογικής απορρύπανσης του DPA. Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειραματικές προσεγγίσεις οι οποίες θα στοχεύουν στο χαρακτηρισμό του μεταβολικού μονοπατιού της διάσπασης και του γενετικού υποβάθρου του στελέχους.

ABSTRACT

Diphenylamine is a pesticide with antioxidant potential which is widely used by the fruit packaging plants. It limits the appearance of apple scald, a physiological disorder of apples and pears which appears after prolonged storage. The uniqueness of the pesticide makes it an integral tool of the post-harvest treatment. However, its use lead to the production of a significant volume of waste water, as the application requires dissolution of it in water. The concentration of DPA in waste water ranges from 100-600 mg/l making them too toxic for the environment. The safe disposal requires treatment with effective detoxification method. The lack of a functional method is the motivation of the current project.

To establish a biological decontamination process, were studied and characterized bacteria-decomposers of DPA. Bacteria were isolated from soil sample from a waste water disposal site and initially evaluated for their ability to degrade the pesticide. The strain *Pseudomonas putida*, which was further evaluated in this thesis, seemed capable to metabolize and grow in media which the DPA was the only source of carbon and nitrogen.

The degradative ability evaluated both in liquid and soil cultivations. The experiments revealed a high potential of the isolate to metabolize DPA, approaching the 2000 mg/l in liquid cultures and 1000 mg/l in soil. Apart from DPA, the degradation ability of the isolate was evaluated for 3 other structural similar molecules. Two possible metabolites of DPA degradation and the fungicide Ortho-phenyl-phenol (OPP). The metabolites were completely degraded in 24 hours while the strain showed a slower degradantion on OPP.

Based on the results, indicated that the bacterium *Pseudomonas putida* has the potential to be used in a future biological decontamination of DPA waste water. Further experimental approaches should be done, aimed at the characterization of the metabolic pathway of degradation and the genetic background of the strain.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Υπεύθυνος Καθηγητής.....	3
Τριμελής Επιτροπή:	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	9
1.1.1 Οφέλη και μειονεκτήματα.....	9
1.1.2 Γεωργικά φάρμακα και περιβάλλον	9
1.1.3 Βιοσυσσώρευση και τοξικότητα	10
1.2 ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΦΡΟΥΤΩΝ	12
1.2.1 Μετασυλλεκτική επεξεργασία	12
1.2.2 Γεωργικά φάρμακα και εφαρμογές.....	12
1.2.3 Απόβλητα	14
1.3 ΔΙΦΑΙΝΙΛΑΜΙΝΗ (DPA).....	14
1.3.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες μορίου	14
1.3.2 Εφαρμογές.....	15
1.3.3 Πορεία του DPA στο περιβάλλον.....	15
1.3.4 Τοξικότητα	16
1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ	17
1.4.1 Μικροβιακή αποδόμηση Διφαινιλαμίνης	17
1.4.2 Σκοπός πειραματικής εργασίας.....	18
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
2.1 Έδαφος.....	19
2.2 <i>Pseudomonas putida</i>	19
2.3 Φυτοφάρμακα και πρότυπες ενώσεις	19
2.4 Θρεπτικά μέσα	20
2.5 Προσδιορισμός υπολειμμάτων DPA και λοιπών ουσιών	22
2.5.3 Προσδιορισμός υπολειμμάτων DPA και λοιπών οργανικών μορίων σε σύστημα HPLC 22	
2.5.4 Καμπύλη ποσοτικοποίησης.....	23
2.6 Αξιολόγηση της αποδομητικής ικανότητας του <i>Pseudomonas putida</i>	23

2.6.1	Διατήρηση και ανακαλλιέργεια στελέχους	23
2.6.2	Προετοιμασία εμβολίου.....	23
2.6.3	Χαρακτηρισμός της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους έναντι υψηλών συγκεντρώσεων DPA.....	24
2.6.4	Χαρακτηρισμός της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους σε έδαφος εμποτισμένο με DPA	25
2.6.5	Χαρακτηρισμός της ικανότητας του στελέχους <i>P. putida</i> να αποδομεί πιθανούς μεταβολίτες του DPA.....	26
2.6.6	Χαρακτηρισμός της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους <i>P. putida</i> ως προς το μυκητοκτόνο ορθο-φαινυλο-φαινόλη (OPP).....	27
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	28
3.1	Αξιολόγηση του στελέχους <i>P. putida</i> να διασπά υψηλές συγκεντρώσεις του DPA	28
3.2	Αξιολόγηση της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους <i>P. putida</i> σε έδαφος εμποτισμένο με DPA	29
3.3	Χαρακτηρισμός της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους <i>P.putida</i> ως προς τους πιθανούς μεταβολίτες του DPA (ανιλίνη, κατεχόλη).....	31
3.4	Αξιολόγηση της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους <i>P.putida</i> ως προς το μυκητοκτόνο Ortho-phenyl-phenol (OPP).....	33
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ	34
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	36

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

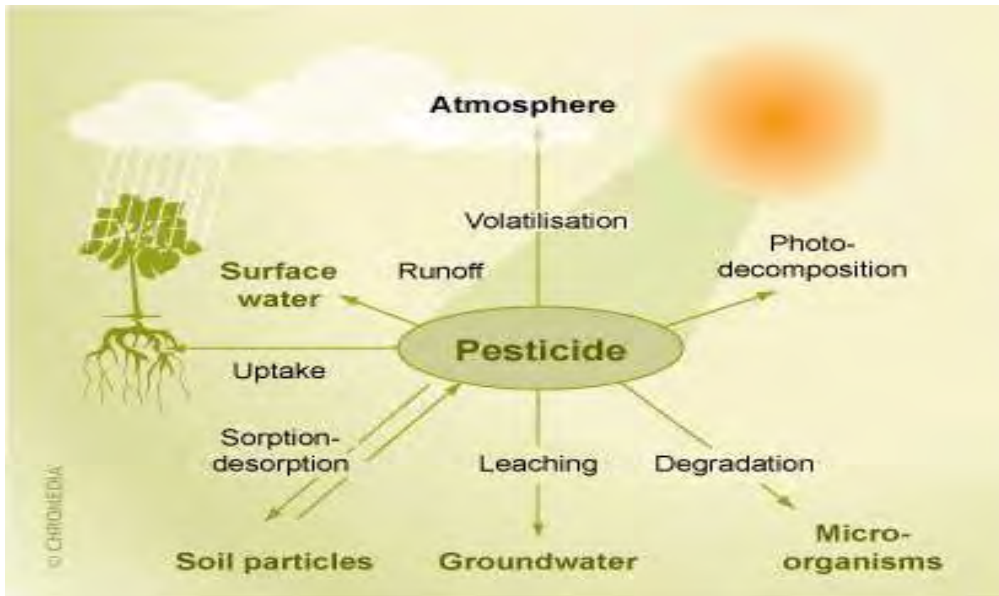
1.1.1 Οφέλη και μειονεκτήματα

Η συνεχής αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού φέρει ως ανάλογο αποτέλεσμα την ανάγκη για επιτακτική αύξηση της παραγωγής τροφίμων. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει χρησιμοποιηθεί κάθε δυνατό μέσο βελτιστοποίησης, τόσο για κτηνοτροφία όσο και για την γεωργική παραγωγή. Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν, έως σήμερα, το πιο διαδομένο μέσο γεωργικής βελτιστοποίησης με εφαρμογές είτε στην αύξηση της παραγωγής είτε στην συντήρηση των προϊόντων. Το χαμηλό τους κόστος και η μεγάλη τους δραστικότητα τα καθιστούν απαραίτητα για κάθε είδους καλλιέργεια ή μετασυλλεκτική επεξεργασία. Η συστηματική και μη ορθολογική χρήση όμως ουσιών, με φυτοπροστατευτικές ή συντηρητικές ιδιότητες, μπορεί να προκαλέσει προβλήματα τόσο στον καταναλωτή όσο και στο περιβάλλον. Σε επίπεδο καταναλωτή ο κίνδυνος προέρχεται από την παραβίαση των προβλεπόμενων ορίων εφαρμογής ενώ η έλλειψη ή η λανθασμένη επεξεργασία αποβλήτων που προέρχονται από την εφαρμογή τους μπορεί να προκαλέσει ρύπανση στο έδαφος και τα υδροφόρα συστήματα [1].

1.1.2 Γεωργικά φάρμακα και περιβάλλον

Τα γεωργικά φάρμακα είτε τοποθετούνται κατ' ευθείαν στο έδαφος, είτε καταλήγουν σ' αυτό αφού πρώτα ψεκαστούν τα υπέργεια τμήματα των φυτών. Όπως και τα λιπάσματα, έτσι και τα γεωργικά φάρμακα ξεφεύγουν από τα όρια των αγρο-οικοσυστημάτων που εφαρμόζονται και ρυπαίνουν ευρύτερα το φυσικό περιβάλλον. Υπάρχουν διάφορες οδοί που μπορεί να ακολουθήσουν μετά την εφαρμογή τους (εικόνα 1). Είσοδος των γεωργικών φαρμάκων στα ύδατα μπορεί να γίνει με την έκπλυση τους από το αγρο-οικοσύστημα λόγω βροχής ή άρδευσης, με

εξάτμιση από το έδαφος του νερού της βροχής που περιέχει γεωργικά φάρμακα, ή με απ' ευθείας εφαρμογή των φυτοφαρμάκων στα νερά [2].



Εικόνα 1. Τύχη γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον (Yolanda Pico, University of Valencia)

Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων ανιχνεύονται σήμερα σε ποτάμια, λίμνες, θάλασσες, υπόγεια νερά, στο νερό της βροχής και το χιόνι και μάλιστα σε μέρη πολύ μακριά από τα σημεία στα οποία είχαν χρησιμοποιηθεί. Μέσω των ποταμών κυρίως, η ρύπανση με φυτοφάρμακα μπορεί να φτάσει ακόμα και σε θαλάσσια οικοσυστήματα.

1.1.3 Βιοσυσσώρευση και τοξικότητα

Βιοσυσσώρευση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο παρατηρείται προοδευτική αύξηση του ποσού μιας ουσίας σε έναν οργανισμό ή σε ένα μέρος του οργανισμού, και που οφείλεται στο γεγονός ότι ο ρυθμός πρόσληψης της ουσίας υπερβαίνει την ικανότητα του οργανισμού να απομακρύνει την ουσία αυτή από το σώμα του [3]. Η βιοσυσσώρευση, δηλαδή η αύξηση της συγκέντρωσης του γεωργικού φαρμάκου στα ανώτερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας, εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των γεωργικών φαρμάκων (διαλυτότητα, πολικότητα, πητικότητα κλπ.). Κύρια οδός της βιοσυσσώρευσης είναι μέσω της διατροφικής αλυσίδας, καθώς η

απόθεση των γεωργικών φαρμάκων στους λιπώδεις ιστούς ορισμένων οργανισμών μεταφέρεται από τα κατώτερα στα ανώτερα μέλη [3].

Μια ουσία μπορεί να είναι τοξική για έναν οργανισμό όταν εισερχόμενη σε αυτόν, δύναται να προκαλέσει βλάβες στον οργανισμό, όπως αλλεργίες, δηλητηρίαση, καρκινογένεση και άλλες παρενέργειες, ακόμα και θάνατο. Η Ευρωπαϊκή Ένωση, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO, World Health Organization) αλλά και ο Αμερικάνικος Οργανισμός Περιβάλλοντος κατατάσσουν τα γεωργικά φάρμακα σε κατηγορίες ανάλογα με την τοξικότητά τους. Η Ευρωπαϊκή Ένωση ταξινομεί τα γεωργικά φάρμακα σε 3 κατηγορίες τοξικότητας [4]. Αυτές είναι:

1. Κατηγορία I – Πολύ τοξικές ενώσεις
2. Κατηγορία II – Τοξικές ενώσεις
3. Κατηγορία III – Βλαβερές ενώσεις

Για όλα τα γεωργικά φάρμακα, κατά τη φάση της ανάπτυξης τους, πραγματοποιούνται τοξικολογικές μελέτες ώστε να καταγραφεί η τοξικότητά τους και να διαπιστωθεί η ασφάλειά τους για τον χρήστη, τον καταναλωτή και το περιβάλλον και εν τέλει να εγκριθεί η χρήση τους ως γεωργικά φάρμακα. Με βάση τα παραπάνω προσδιορίζονται οι τιμές αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης (ADI, Acceptable Daily Intake), αποδεκτού επιπέδου έκθεσης χρήστη (AOEL, Acceptable Operator Exposure Limit) και οξείας δόσης αναφοράς. Σε συνέχεια αυτών καθορίζονται και μέγιστα όρια υπολειμμάτων (MRL, Maximum Residue Levels) για κάθε γεωργικό φάρμακο [4]. Τα MRL ανά δραστική ουσία ή/και ανά τύπο καλλιέργειας έχουν καθοριστεί από τον κανονισμό 396/2005 της Ε.Ε.

1.2 ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΦΡΟΥΤΩΝ

1.2.1 Μετασυλλεκτική επεξεργασία

Από την παραγωγή στην κατανάλωση μεσολαβεί ένα μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα όπου τα προϊόντα δεν είναι ούτε στον αγρό ούτε στο ράφι. Η συντήρηση ενός προϊόντος εξαρτάται στο μεγαλύτερο μέρος της από την δομή και τη φυσιολογία του, αλλά και δευτερευόντως από διάφορους παράγοντες όπως οι κλιματικοί. Η διατήρηση της ποιότητας, είναι το κλειδί για να φτάσει το προϊόν στον καταναλωτή με τη μεγαλύτερη δυνατή εμπορική αξία. Η επιστήμη που μελετάει τη μεταχείριση των προϊόντων μετά τη συγκομιδή και μέχρι να φτάσουν στον καταναλωτή ονομάζεται μετασυλλεκτική τεχνολογία. Βέβαια, μεγάλο ρόλο στην τελική ποιότητα ενός προϊόντος παίζουν και οι προ-συλλεκτικοί παράγοντες όπως η κατάσταση του εδάφους, η θερμοκρασία, οι παγωνιές κ.α. αλλά και κακοί χειρισμοί από τον παραγωγό μπορούν να προκαλέσουν υποβάθμιση ενός προϊόντος. Για να κατανοήσουμε την καταπόνηση που δέχεται ένα προϊόν μέχρι που να φτάσει στον καταναλωτή πρέπει να αναλογιστούμε την διαδικασία από την αρχή.

1.2.2 Γεωργικά φάρμακα και εφαρμογές

Ευρεία εφαρμογή στην μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων βρίσκουν τα μυκητοκτόνα φάρμακα Imazalil (IMZ), Thiabendazole (TBZ) και Ortho-phenylphenol (OPP). Τα τρία αυτά γεωργικά φάρμακα παρουσιάζουν δραστικότητα έναντι των μυκήτων *Penicillium* και *Colletotrichum* τα οποία αποτελούν σημαντικό πρόβλημα κατά την αποθήκευση των φρούτων. Η χρήση αντιοξειδωτικών φαρμάκων είναι εξίσου συνήθεις, ειδικότερα από τα συσκευαστήρια αχλαδιών και μήλων. Αντιοξειδωτικά σκευάσματα όπως η Diphenylamine (DPA) και Ethoxyquin (EQ) μπορούν να αναστείλουν το επιφανειακό καφέτιασμα (εικόνα. 2) που παρουσιάζετε στα μήλα και στα αχλάδια μετά από ένα μεγάλο χρονικό διάστημα αποθήκευσης. Το φαινόμενο του επιφανειακού καφετιάσματος είναι μια φυσιολογική πάθηση η οποία προκύπτει από την οξείδωση του άλφα-φαινεσενίου, ενός πτητικού μόριο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

που συσσωρεύεται στο φρούτο. Τα προϊόντα οξείδωσης του συγκεκριμένου μορίου επιφέρουν κυτταρικό θάνατο και συνεπώς επιφανειακό καφέτιασμα με αποτέλεσμα να πέφτει δραματικά η εμπορική αξία του προϊόντος [5].



Εικόνα 2. Επιφανειακό καφέτιασμα

Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων της μετασυλλεκτικής επεξεργασίας, απαιτεί τη διάλυση τους σε τεράστιους όγκους νερού με το οποίο ξεπλένουν το προϊόν. Μετά την έκπλυση του προϊόντος, τα υγρά απόβλητα που δημιουργούνται απορρίπτονται στο περιβάλλον, οι υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων (400-2000 mg/L) [6] που περιέχονται στα υγρά απόβλητα απαιτούν την επεξεργασία και την από-τοξικοποίηση τους. Η έλλειψη κατάλληλων μέτρων από-τοξικοποίησης, σε πολλές περιπτώσεις, έχει οδηγήσει την Ευρωπαϊκή Ένωση στην αναστολή της έγκρισης κυκλοφορίας ενός γεωργικού φαρμάκου. Η Διφαινιλαμίνη ανήκει σε μια από της περιπτώσεις αυτές. Πιο συγκεκριμένα, το 2009 η Ευρωπαϊκή Ένωση απαγόρευσε την κυκλοφορία του βασιζόμενη στην πιθανή ύπαρξη τοξικών μεταβολιτών και τη δημιουργία νιτροζαμινών κατά την διάρκεια αποθήκευσης των προϊόντων.

1.2.3 Απόβλητα

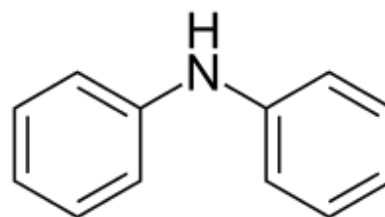
Η έλλειψη αποτελεσματικής και οικονομικά προσιτής μεθόδου επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων που προέρχονται από τα συσκευαστήρια φρούτων, έχει προκαλέσει αναστάτωση και προβλήματα στη διαχείριση τους. Τα συσκευαστήρια αναγκάζονται να απορρίπτουν τα απόβλητα σε γειτονικούς υδάτινους φορείς ή αγρούς, με αποτέλεσμα τα υγρά απόβλητα να καταλήγουν είτε και υδροφόρους ορίζοντες είτε σε ποτάμια και λίμνες. Έχει αποδειχτεί πως η άμεση απόρριψη των συγκεκριμένων αποβλήτων μπορεί να προκαλέσει μεγάλη περιβαλλοντική ρύπανση αλλά και προβλήματα στην κοινωνική υγεία, αν συλλογιστούμε ότι το 80% του πόσιμου νερού στην Ελλάδα προέρχεται από υδροφόρους ορίζοντες. Αναλυτικότερα για την Διφαινιλαμίνη, το φάρμακο που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες καθιέρωσης κατάλληλης μεθόδου απορρύπανσης χωρίς όμως κάποια ικανοποιητικά αποτελέσματα. Φίλτρα που εμπεριείχαν μίγμα από τύρφη, κοπριά, πηλό και δολομίτη ή η χρήση μυητικών λακασών [7], έδειξαν αδυναμία και υψηλό κόστος στη διαχείριση μεγάλων όγκων αποβλήτων. Οι παραπάνω απόπειρες υποδεικνύουν πως μια μέθοδος βασισμένη στην βιολογική απορρύπανση, ίσως να ήταν η καλύτερη προσέγγιση του προβλήματος. Η υψηλή τοξικότητα που παρουσιάζει το μόριο στους υδρόβιους οργανισμούς [8], οδηγεί στην άμεση θέσπιση μιας αποτελεσματικής βιολογικής μεθόδου απορρύπανσης, η οποία θα είναι εφαρμόσιμη σε κάθε συσκευαστήριο το οποίο χρησιμοποιεί μεγάλες ποσότητες διφαινιλαμίνης.

1.3 ΔΙΦΑΙΝΙΛΑΜΙΝΗ (DPA)

1.3.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες μορίου

Η Διφαινιλαμίνη είναι ένα οργανικό μόριο με μοριακό τύπο $(C_6H_5)_2NH$ και χημική δομή, *εικόνα 3.1*. Η αρωματική αυτή ένωση αποτελείται από 2 βενζοϊκούς δακτυλίους και μία αμινική ομάδα. Η παραγωγή του γίνεται από θερμική απαμίνωση της ανιλίνης και είναι άχρωμο σε στερεή κατάσταση. Αναλυτικότερα:

- Μοριακό βάρος: 169.23 Da
- Πυκνότητα: 1,2 g/cm³
- Σημείο τήξεως: 53 °C (326 K)
- Σημείο βρασμού: 302 °C (575 K)
- Διαλυτότητα: 40 mg/l στους 25°C



Εικόνα 3. Διφαινιλαμίνη

Επίσης η χημική ανάλυση του μορίου μπορεί να γίνει με την χρήση UV, IR, NMR, MS.

1.3.2 Εφαρμογές

Λόγω της μεγάλης δραστηριότητας που παρουσιάζει μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών εφαρμογών. Συνήθως χρησιμοποιείται για την κατασκευή εκρηκτικών υλών και πυραύλων, ως σταθεροποιητής ή ως αντιοξειδωτικό κατά την αποθήκευση μήλων και αχλαδιών. Επίσης παρουσιάζει εφαρμογές στην αναλυτική χημεία, στην παραγωγή πολυμερών και καουτσούκ και για την παραγωγή αντιφλεγμονωδών φαρμάκων.

Η ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση το καθιστά απαραίτητο στην μετασυλλεκτική επεξεργασία των μήλων και των αχλαδιών. Δρα ως κατασταλτικός παράγοντας του επιφανειακού καφετιάσματος που παρουσιάζουν τα συγκεκριμένα προϊόντα μετά από μεγάλο διάστημα αποθήκευσης του [9]. Επιπλέον, στην γεωργία, χρησιμοποιείται και ως μυκητοκτόνο. Αν και παρουσιάζει προβλήματα όσον αφορά την διαχείριση των αποβλήτων, η χρήση της Διφαινιλαμίνης είναι ευρέως διαδεδομένη λόγω του γεγονότος ότι μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποιο άλλο υποκατάστατο σκεύασμα με ίδια λειτουργικότητα.

1.3.3 Πορεία του DPA στο περιβάλλον

Η διφαινιλαμίνη παρουσιάζει πολύ αυξημένη ανθεκτικότητα στην υδρόλυση, με χρόνο ημιζωής $t_{1/2} = 300-350d$ για τιμές pH 5,7 και 9 [10]. Αντιθέτως είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην φωτόλυση στα υδάτινα σύστημα με $t_{1/2} = 4,39h$. Το DPA προσροφάτε πολύ ισχυρά από το έδαφος (συντελεστής προσρόφησης $K_{oc} = 1212-$

6590 g/ml) με αποτέλεσμα να παρουσιάζει μειωμένη κινητικότητα στο έδαφος [10]. Πρακτικά ένα πολύ μικρό ποσοστό του μορίου μπορεί να καταλήξει σε υπόγειους υδροφόρους ορίζοντες, ιδιαίτερα αν συλλογιστούμε και την ταχύτατη διάσπαση σου στο έδαφος υπό αναερόβιες συνθήκες $t_{1/2} < 1d$ [10].

1.3.4 Τοξικότητα

Η αυξημένη τοξικότητα που εμφανίζει στα υδρόβια συστήματα, είναι αυτή που το καθιστά απειλή για το περιβάλλον. Άλγη, βακτήρια, υδρόβια ασπόνδυλα και ψάρια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην Διφαινιλαμίνη [11]. Αναλυτικότερα:

- Άλγη: *Pseudokirchneriella subcapitata* $EC_{50} = 0,30$ mg/L, *Selenastrum capricornutum* $EC_{50} = 0,18$.
- Βακτήρια: *Photobacterium phosphoreum* $EC_{50} = 4,75$ mg/L, *Vibrio fischeri* $EC_{50} = 5,5$ mg/L.
- Υδρόβια ασπόνδυλα: *Daphnia magna* $EC_{50} = 1,2$ mg/L.
- Ψάρια: *Oncorhynchus mykiss* $EC_{50} = 2,3$ mg/L, *Lepomis macrochirus* $EC_{50} = 1,2$ mg/L.

Πειράματα σε ζώα απέδειξαν πως το μόριο έχει χαμηλή τοξικότητα με τιμές να φτάνουν $LD50 > 2000$ mg/kg bw/day στα πουλιά και $LD50 > 15000$ mg/kg bw/day για θηλαστικά (*Oryctolagus cuniculus*) [11]. Το DPA έχει χαρακτηριστεί ως καρκινογενετικός παράγοντας στα ποντίκια και στους αρουραίους αλλά για τον άνθρωπο έχει κατηγοριοποιηθεί ως μη καρκινογενετικό λόγω έλλειψης απαραίτητων ενδείξεων [11]. Παρόλα αυτά η diphenylnitrosamine (παραπροϊόν κατά την παραγωγική διαδικασία του DPA) έχει χαρακτηριστεί ως πιθανός καρκινογενετικός παράγοντας καθώς παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα εμφάνισης όγκων της ουροδόχου κύστης σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους, σαρκώματα δίκτυο κυττάρων σε ποντικούς και για δομική σχέση συγγένεια με καρκινογόνες νιτροζαμίνες [10]. Ο διατροφικός κίνδυνος πρόσληψης diphenylnitrosamine είναι 2.8×10 mg/kg/day. Επίσης σε πειράματα που έγιναν δεν παρουσίασε καμία

αναπτυξιακή τοξικότητα σε αρουραίους και λαγούς. Όσον αφορά την τοξικότητα του στους μικροοργανισμούς του εδάφους και άλλους οργανισμούς μη στόχους, ελάχιστες πληροφορίες υπάρχουν έως τώρα.

1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

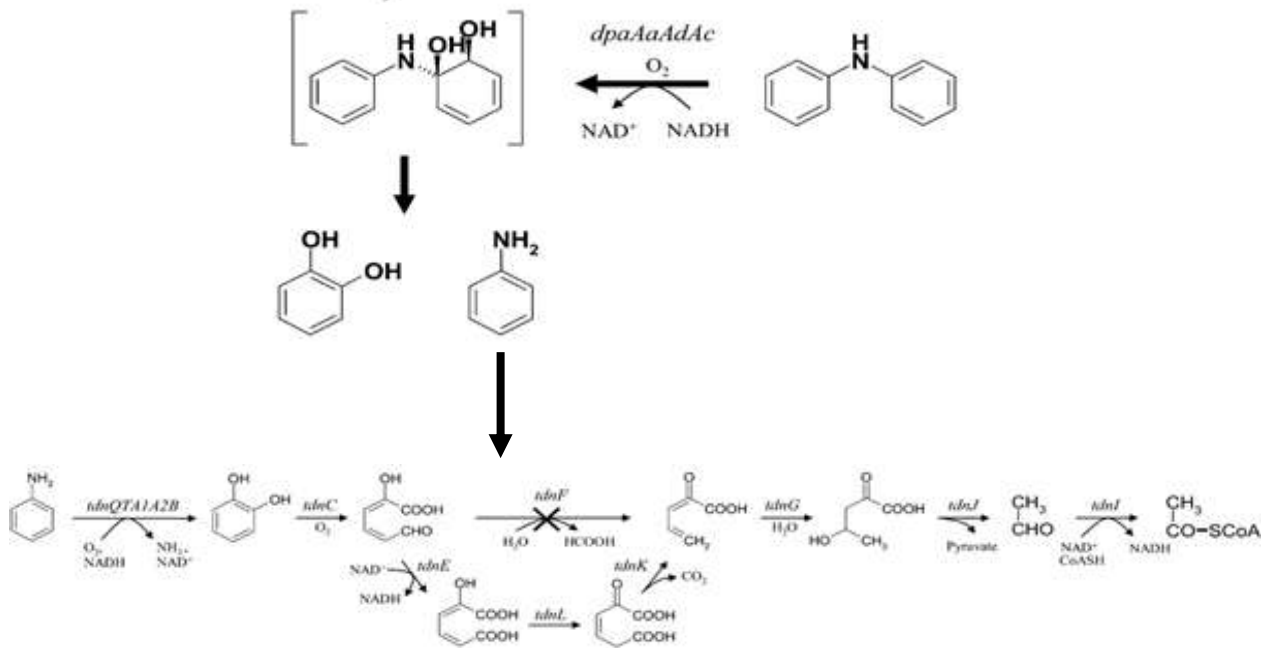
Η βιολογική επεξεργασία αποβλήτων είναι η διαδικασία κατά την οποία χρησιμοποιείται η μεταβολική δραστηριότητα μικροοργανισμών με σκοπό την μείωση του οργανικού φορτίου των λυμάτων. Η επιλογή του ή των μικροοργανισμών που θα χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο σε τέτοια συστήματα γίνεται με βάση της φύση των λυμάτων. Βασική προϋπόθεση για την επιτυχία της απορρύπανσης είναι η απουσία υψηλών συγκεντρώσεων ρύπων που παρουσιάζουν τοξικότητα στους μικροοργανισμούς. Η επεξεργασία μπορεί να λάβει μέρος σε αερόβιο είτε αναερόβιο περιβάλλον, αρχικά γίνεται η αποδόμηση των οργανικών ρύπων και στην συνέχεια η δευτεροβάθμια καθίζηση για την απομάκρυνση της βιομάζας. Η βιολογική επεξεργασία μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του οργανικού φορτίου μέχρι και 80-90% μέσο όρο.

1.4.1 Μικροβιακή αποδόμηση Διφαινιλαμίνης

Η πρώτη εργασία που αναφέρθηκε στην απομόνωση βακτηρίων αποδομητών του DPA έγινε από τον Christodoulatos *et al*, 1997 [12], ο οποίος κάνει αναφορά μόνο για την αποδομητική ικανότητα ενός στελέχους *Pseudomonas* χωρίς να δίνει περαιτέρω λεπτομέρειες για τον μηχανισμό. Η μεταβολική ικανότητα του συγκεκριμένου στελέχους οδήγησε σε $t_{1/2}=1.4$ μέρες σε πρότυπες συνθήκες βιοαντιδραστήρα. Η απόδοση όμως αυτή φαίνεται να μην επαρκή για την αποτελεσματική και άμεση αποδόμηση των λυμάτων Διφαινιλαμίνης. Οι Spin και Spain (2009) παρουσίασαν το μεταβολικό μονοπάτι της αποδόμησης του DPA από δύο άλλα βακτηριακά στελέχη, το *Burkholderia* και το *Ralstonia* (εικόνα 4) [13]. Αναφέρουν λοιπόν πως η Διφαινιλαμίνη μεταβολίζεται σε ανιλίνη και κατεχόλη τα οποία στην συνέχεια αποδομούνται με την σειρά τους από τους ίδιους ή άλλους μικροοργανισμούς του

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

εδάφους. Στην συγκεκριμένη μελέτη οι συγγραφείς δίνουν δεδομένα από το μεταβολικό μονοπάτι της συγκεκριμένης αντίδρασης και τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται.



Εικόνα 4. Διάσπαση του DPA από το βακτηριακό στέλεχος *Burkholderia* sp. JS667

Μία εξειδικευμένη διοξυγενάση διασπά και μετατρέπει το μόριο στους τελικούς μεταβολίτες. Πιθανότατα αυτή η ικανότητα να οφείλεται σε οριζόντια γονιδιακή μεταφορά του οπερονίου που περιλαμβάνει την εξειδικευμένη διοξυγενάση, καθώς και το οπερόνια για την αποδόμηση της ανιλίνης [13].

1.4.2 Σκοπός πειραματικής εργασίας

Βασιζόμενοι στην υπάρχουσα βιβλιογραφία στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της Δρ Chiara Perruchon που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας απομόνωσε και ταυτοποίησε βακτήρια που έχουν την ικανότητα να αποδομούν ταχύτατα το DPA. Η παρούσα πτυχιακή εργασία παρουσιάζει το χαρακτηρισμό της αποδομητικής ικανότητας ενός στελέχους *Pseudomonas putida* ως προς το DPA και τους μεταβολίτες του (κατεχόλη, ανιλίνη).

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Έδαφος

Το έδαφος το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αναπτυξιακό περιβάλλον, για τα υπό μελέτη βακτήρια αποδομητές, συλλέχτηκε από αγρό της ευρύτερης περιοχής της Αγιάς. Ο συγκεκριμένος αγρός χρησιμοποιούνταν ως χώρος απόρριψης υγρών αποβλήτων, από συσκευαστήριο φρούτων της περιοχής. Το συσκευαστήριο απέρριπτε υγρά απόβλητα, τα οποία πέρα των άλλων περιείχαν και το αντιοξειδωτικό DPA.

2.2 *Pseudomonas putida*

Το βακτήριο αυτό απομονώθηκε από δείγματα εδάφους τα οποία είχαν συλλεχθεί από την περιοχή της Αγιάς, Λάρισα. Τα εδαφικά δείγματα από τα οποία συλλέχθηκε ήταν επιβαρυμένα με υγρά απόβλητα Διφαινιλαμίνης. Η περιοχή αυτή επιλέχτηκε γιατί με βάση την αυξημένη συγκέντρωση γεωργικών φαρμάκων, θεωρήθηκε ιδανικό περιβάλλον για μικροοργανισμούς οι οποίοι θα είχαν την δυνατότητα να αποδομούν και να χρησιμοποιούν τα φάρμακα για να καλύψουν τις μεταβολικές του ανάγκες. Πιο συγκεκριμένα η διφαινιλαμίνη μπορεί παρέχει άνθρακα και άζωτο στη παρακείμενη μικροβιακή κοινότητα. Αφού λοιπόν απομονώθηκε και εξακριβώθηκε η διασπαστική δράση του στελέχους ως προς το DPA, ταυτοποιήθηκε και καλλιεργήθηκε. Στην παρούσα εργασία τα κύτταρα πάρθηκαν από stock γλυκερόλης που είχε αποθηκευθεί στους -20°C και ανα-καλλιεργήθηκαν.

2.3 Φυτοφάρμακα και πρότυπες ενώσεις

Πρότυπες δραστικές ουσίες Διφαινιλαμίνης (DPA) και η ορθο-φαινυλοφαινόλης (OPP) (Pestanal®, analytical standard, 99.9% purity) αγοράστηκαν από την Fluka, Sigma-Aldrich. Χρησιμοποιώντας ως αρχικό stock διάλυμα 1000 mg/L σε μεθανόλη, προετοιμάστηκαν stock διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων για την κατασκευή πρότυπη καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε για το προσδιορισμό των

υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων στα διάφορα πειράματα. Ένα άλλο διάλυμα 100 mg/L Διφαινιλαμίνης ή ορθο-φαινυλοφαινόλης, σε κάθε περίπτωση, σε νερό προετοιμάστηκε και αποστειρώθηκε με σκοπό τον εμπλουτισμό του θρεπτικού μέσου. Για την δημιουργία διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης Διφαινιλαμίνης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα (NoScaldDPA 31.8 EC, Deccolberica, Post-Cosechas. a. u., Paterna, Valencia, Spain).

Για την προετοιμασία των υπόλοιπων πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε κατεχόλη (99.9% purity, Sigma-Aldrich) και ανιλίνη (99.9% purity, ChemLabSupply). Τα stock διαλύματα προετοιμάστηκαν όπως και το πρότυπο διάλυμα DPA.

2.4 Θρεπτικά μέσα

Για την καλλιέργεια του υπό μελέτη βακτηριακού στελέχους χρησιμοποιήθηκε ένα θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων MSM (Mineral Salts Medium) το οποίο δεν περιέχει καμία πηγή άνθρακα ή αζώτου και το DPA όταν προστέθηκε σε συγκέντρωση 20 mg/L αποτελούσε την μοναδική πηγή C και N. Για την επιβεβαίωση της αμιγότητας των καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το γενικό και μη εκλεκτικό θρεπτικό μέσο LB (Luria Bertani). Όλες οι διεργασίες για την παρασκευή των θρεπτικών μέσων έγιναν σε θάλαμο νηματικής ροής και όλα τα σκεύη εργασίας ήταν αποστειρωμένα. Η αποστείρωση γινόταν με την χρήση αυτόκαυστου και πιο συγκεκριμένα για 25 min σε συνθήκες 120 C⁰ και 2,1 atm.

2.4.1 Θρεπτικό μέσο MSM

Το θρεπτικό μέσο MSM περιέχει εκτός από C και N, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μακροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό την μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S). Αυτό έγινε ώστε το DPA να αποτελεί τη μοναδική πηγή άνθρακα και αζώτου για τους αναπτυσσόμενους μικροοργανισμούς. Το θρεπτικό αυτό διάλυμα παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα ανόργανων αλάτων, τα οποία αναμίχτηκαν σε κατάλληλες αναλογίες.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

	Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Stock 1/A	KH_2PO_4	22,7
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	59,7
	H_2O	10,0
	NaCl	
Stock 2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,2
Stock 3	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,96

Τα stock 1 και stock 2 προετοιμάστηκαν με διάλυση των συστατικών τους σε 1 L απεσταγμένο νερό και ακολούθησε αποστείρωση τους στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Το stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση με την χρήση φίλτρου σύριγγας επειδή το FeSO_4 είναι θερμοευαίσθητο. Για την προετοιμασία 1L MSM + DPA, 100 ml από το Stock 1/A διαλύθηκαν σε 580 mL αποστειρωμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε εκ νέου. Μόλις το διάλυμα έφτασε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκαν ασηπτικά 100 ml Stock 2 και 20 ml Stock 3. Ακολούθως στο θρεπτικό μέσο προστέθηκαν ασηπτικά 200 ml υδατικού διαλύματος DPA (100mg/L) ώστε να παρασκευαστεί τελικά το θρεπτικό μέσο MSM+DPA (20mg/L).

2.4.2 Θρεπτικό μέσο LB (*Luria Bertani*)

Για την προετοιμασία 1L υγρού θρεπτικού μέσου LB, 10 g NaCl, 15 g καζεΐνης και 5g yeast extraction αραιώθηκαν σε 1L απεσταγμένο νερό, αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν στους 121 C° υπό πίεση 2,1 atm για 25min. Για την προετοιμασία στερεού θρεπτικού μέσου LB στο παραπάνω διάλυμα προστέθηκαν και 15 g άγαρ (1,5%) και μόλις το διάλυμα έφτασε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος ακολούθησε η επίστρωση τριβλίων. Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο

χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αμιγότητας της stock καλλιέργειας και για την καταμέτρηση των βακτηριακών κυττάρων πριν από κάθε εμβολιασμό.

2.5 Προσδιορισμός υπολειμμάτων DPA και λοιπών ουσιών

2.5.1 Εκχύλιση DPA από το έδαφος

Για την εκχύλιση του DPA από το έδαφος, 10 g εδάφους αναμείχθηκαν με 25ml ακετονιτρίλιο και επώαστηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα στα 200 rpm για 1,5 h. Στη συνέχεια το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 1100rpm για 5 λεπτά. Στο τελικό στάδιο της προετοιμασίας των δειγμάτων, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και φιλτραρίστηκε (45μm, PTFESyringeFilter) ώστε να είναι έτοιμο προς ανάλυση στο σύστημα HPLC-UV.

2.5.2 Εκχύλιση DPA και λοιπών οργανικών μορίων από υγρές καλλιέργειες

Στην περίπτωση των υγρών καλλιεργειών, 0,5 ml αναμείχθηκαν με 1ml μεθανόλη (HPLCGrade, Merck). Το διάλυμα αυτό ανακινήθηκε σε vortex για 30 secs στην μέγιστη ισχύς και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 min. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20°C (όπως και τα εκχύλιμα του εδάφους) μέχρι να αναλυθεί.

2.5.3 Προσδιορισμός υπολειμμάτων DPA και λοιπών οργανικών μορίων σε σύστημα HPLC

Τα υπολείμματα του DPA που εκχυλίστηκαν από δείγματα υγρών καλλιεργειών βακτηρίων ή από το έδαφος προσδιορίστηκαν σε σύστημα HPLC (Marathon III, RigasLabs, Greece). Πιο συγκεκριμένα το DPA εκλούστηκε σε σύστημα HPLC με στήλη CNW Athena RPC18 150 mm x 4.6 mm και η ανίχνευση του πραγματοποιήθηκε ανιχνευτή UV σε μήκος κύματος 210nm. Το HPLC σύστημα ήταν συνδεδεμένο με λογισμικό Clarity (LA2903 Data Apex Clarity HPLC Integration Software), το οποίο χρησιμοποιείται για χρωματογραφικές αναλύσεις. Η σύσταση της κινητής φάσης ήταν ογκομετρικά 60:30:10, ακετονιτρίλιο:νερό:μεθανόλη με ρυθμό ροής 1ml/min.

Με βάση αυτές τις συνθήκες ο χρόνος κατακράτησης για το DPA ήταν 3.5 min. Για την κατεχόλη η κινητική φάση 60:40 νερό:ACN (ογκομετρικά) + 0,1% οξικό οξύ και η ανίχνευση γινόταν στα 276nm (χρόνος κατακράτησης = 2,5 min). Η κινητική φάση για την έκλουση της ανιλίνης ήταν 60:40 οξικό αμμώνιο (0.4 g L⁻¹ σε pH 4.2): ACN (ογκομετρικά) ενώ για το OPP 70:29,5:0,5 ACN:νερό:25% διάλυμα NH₃ (ογκομετρικά). Στις δύο αυτές περιπτώσεις η ανίχνευση γινόταν στα 254 nm μετά από χρόνο κατακράτησης 3.4 min. Σε όλες τις περιπτώσεις ο ρυθμός ροής της κινητικής φάσης ήταν 1 ml min⁻¹.

2.5.4 Καμπύλη ποσοτικοποίησης

Για την κατασκευή της καμπύλης ποσοτικοποίησης του DPA, προετοιμάστηκαν πρότυπα διαλύματα του μορίου σε μεθανόλη. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ήταν 50, 10, 5, 2, 1, 0,5 και 0,1 µg/ml.

2.6 Αξιολόγηση της αποδομητικής ικανότητας του *Pseudomonas putida*

2.6.1 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια στελέχους

Για την συντήρηση του στελέχους προετοιμάστηκαν stock γλυκερόλης. Ο εμβολιασμός της καλλιέργειας έγινε από βακτηριακά κύτταρα φυλασσόμενα σε γλυκερόλη, στους -80°C. Το θρεπτικό μέσο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν MSM+DPA και η επώαση έγινε σε περιστροφικό επωαστήρα στους 26°C και 180 rpm.

2.6.2 Προετοιμασία εμβολίου

Οι εμβολιασμοί, σε κάθε περίπτωση, έγιναν όταν το στέλεχος είχε ήδη προσαρμοστεί στο να μεταβολίζει το DPA. Συνεπώς τα κύτταρα, για να χρησιμοποιηθούν, θα έπρεπε να έχουν καταναλώσει τουλάχιστον το 50% του DPA της stock καλλιέργειας. Η αμιγότητα και ο αριθός των βακτηριακών κυττάρων προσδιορίστηκαν, σε κάθε περίπτωση, με επίστρωση LB τριβλίων (εικόνα 5), πριν

από κάθε εμβολιασμό. Σε κάθε περίπτωση η συγκέντρωση του εμβολίου κυμαίνονταν από 10^6 ως $2,8 \times 10^6$ cfu ml⁻¹.



Εικόνα 5. Έλεγχος αμιγότητας στελέχους

2.6.3 Χαρακτηρισμός της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους έναντι υψηλών συγκεντρώσεων DPA

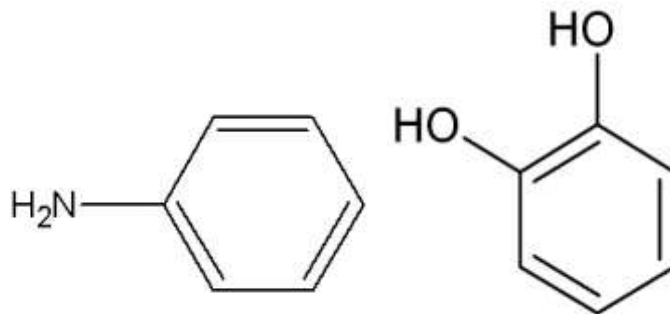
Το στέλεχος έχει ήδη αξιολογηθεί, από προηγούμενα πειράματα, ως προς την ικανότητα του να αναπτύσσεται παρουσία DPA. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε ώστε να χαρακτηριστεί και ποσοτικά η ικανότητα αυτή. Για τον λόγο αυτό προετοιμάστηκαν θρεπτικά μέσα MSM με διαφορετικές συγκεντρώσεις DPA (20, 100, 500, 1000 και 2000 mg/l). Λόγω των ιδιαίτερα υψηλών συγκεντρώσεων DPA (υψηλότερες από την υδατοδιαλυτότητα του) για την παρασκευή των παραπάνω διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε εμπορικό σκεύασμα DPA (No Scald DPA 31.8 EC, Deccolberica, Spain). Το θρεπτικό μέσο εμβολιάστηκε με το υπό μελέτη βακτήριο όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Προετοιμάστηκαν τρία δείγματα εμβολιασμένης καλλιέργειας για κάθε διαφορετική συγκέντρωση DPA ξεχωριστά και δύο μη εμβολιασμένα (control) δείγματα - μάρτυρες. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν σε περιστροφικό επωαστήριο στους 26° C/ 180 rpm. Η πορεία αποδόμησης του DPA παρακολούθηθηκε με την λήψη δειγμάτων σε 0,2 και 5 μέρες μετά το εμβολιασμό και μέτρησης τους σε σύστημα HPLC όπως έχει ήδη περιγραφεί.

2.6.4 Χαρακτηρισμός της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους σε έδαφος εμποτισμένο με DPA

Για να χαρακτηριστεί η ικανότητα του στελέχους ως φορέας αποκατάστασης εδαφών που έχουν δεχτεί απόθεση υγρών αποβλήτων επιβαρυμένων με DPA πραγματοποιήθηκε πείραμα εργαστηρίου. Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε συλλέχθηκε από εδαφική έκταση του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε). Συλλέχθηκαν 3 δείγματα εδάφους 500g στα οποία και έγινε εφαρμογή κατάλληλων υδατικών διαλυμάτων DPA που παρασκευάστηκαν από εμπορικό σκεύασμα DP με στόχο την επίτευξη τελικών συγκεντρώσεων στο έδαφος 10, 100 και 500 mg/kg. Πρέπει να σημειωθεί πως στο συγκεκριμένο εδαφικό δείγμα δεν είχε γίνει εφαρμογή κάποιου άλλου γεωργικού φαρμάκου κατά τα τελευταία 10 έτη. Αμέσως μετά την εφαρμογή του DPA τα δείγματα αποθηκεύτηκαν για 2 βδομάδες στους 4° C με σκοπό να μιμηθούμε όσο το δυνατό πιο αποτελεσματικά συνθήκες ρεαλιστικής ρύπανσης του εδάφους όπου τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων έχουν υποστεί παλαίωση και είναι λιγότερο διαθέσιμα για αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς. Μετά το πέρας της παραπάνω περιόδου το κάθε δείγμα χωρίστηκε σε 2 τμήματα. Το πρώτο υπο-δείγμα εμβολιάστηκε με κατάλληλη ποσότητα καλλιέργειας του στελέχους *P. putida* με τελικό πληθυσμό εμβολίου στο έδαφος 2×10^6 κύτταρα ανά γραμμάριο εδάφους (ξηρό βάρος). Το δεύτερο υπο-δείγμα δέχτηκε αντίστοιχη ποσότητα νερού χωρίς βακτήρια και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Αφότου τα δείγματα αναμίχθηκαν εκ νέου διαχωρίστηκαν σε υπο-δείγματα των 20g και επώαστηκαν στους 25°C. Η υγρασία του εδάφους ήταν διατηρούνταν σταθερή στο 40% της υδατοχωρητικότητας του εδάφους με προσθήκες νερού όποτε χρειαζόταν. Τρία δείγματα εμβολιασμένου και δύο δείγματα μη εμβολιασμένου δείγματος (μάρτυρας) πάρθηκαν σε 2, 5, 10, 20 και 30 ημέρες από την ημέρα του εμβολιασμού και αναλύθηκαν με HPLC με σκοπό τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του DPA.

2.6.5 Χαρακτηρισμός της ικανότητας του στελέχους *P. putida* να αποδομεί πιθανούς μεταβολίτες του DPA

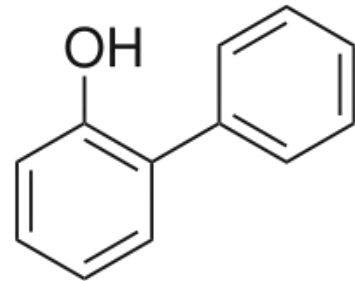
Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να εξακριβωθεί αν το στέλεχος *P. putida* είχε την ικανότητα να αποδομεί πιθανούς μεταβολίτες του DPA, όπως ανιλίνη και κατεχόλη. Για το παρόν πείραμα προετοιμάστηκαν υγρές καλλιέργειες που περιείχαν ανιλίνη και το θρεπτικό μέσο MSM, ενώ για τις καλλιέργειες κατεχόλης χρησιμοποιήθηκε MSMN καθώς η κατεχόλη, σε αντίθεση με την ανιλίνη, δεν περιέχει άζωτο που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί από το βακτήριο. Σε κάθε περίπτωση, προετοιμάστηκαν τρεις εμβολιασμένες και τρεις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες (control) για κάθε μεταβολίτη. Οι καλλιέργειες που περιείχαν κατεχόλη περιτυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο λόγω της φωτοευαισθησίας που παρουσιάζει το συγκεκριμένο μόριο. Με τον τρόπο αυτό περιορίστηκε σημαντικά η αβιοτική διάσπαση του μεταβολίτη. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν και η συγκέντρωση των μεταβολιτών ποσοτικοποιήθηκε με HPLC σε δείγματα που ελήφθησαν από τις καλλιέργειες 0, 12 και 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό.



Εικόνα 6. Η χημική δόμη της ανιλίνης και της κατεχόλης

2.6.6 Χαρακτηρισμός της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους *P. putida* ως προς το μυκητοκτόνο ορθο-φαινυλο-φαινόλη (OPP)

Η παρόμοια δομή του OPP (εικόνα 7) σε σχέση με το ίδιο το DPA αλλά και τους πιθανούς μεταβολίτες του DPA (ανιλίνη, κατεχόλη) μας οδήγησε στο να αξιολογήσουμε την ικανότητα του απομονωθέντος βακτηρίου να αποδομεί το μυκητοκτόνο OPP. Η ικανότητα αποδόμησης του OPP από το στέλεχος *P. putida* αξιολογήθηκε σε εκλεκτικό μέσο MSMN καθώς όπως και



Εικόνα 7. OPP

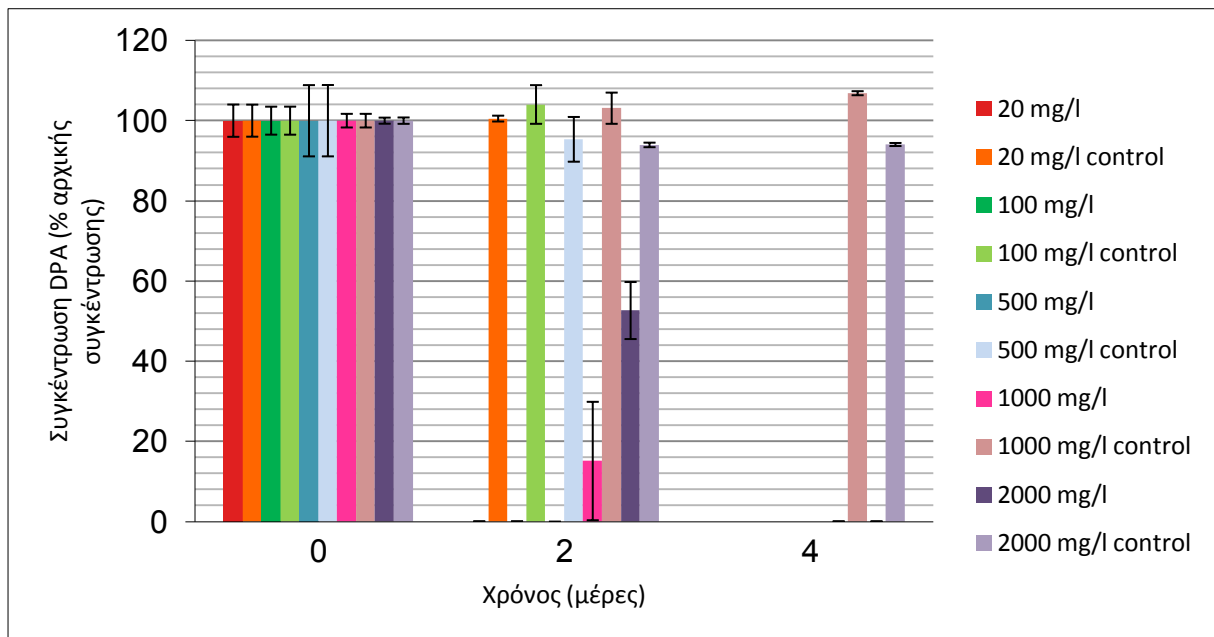
η κατεχόλη, το OPP δεν περιέχει άζωτο. Έτσι όπως και στα προηγούμενα πειράματα, τρία δείγματα MSMN+OPP (30 mg/L) εμβολιάστηκαν με καλλιέργεια του *P. putida* όπως έχει ήδη περιγραφεί ενώ τρεις αντίστοιχες καλλιέργειες δεν εμβολιάστηκαν με βακτήρια και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Αμέσως μετά την εφαρμογή και σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή δείγματα των καλλιεργειών απομακρύνθηκαν και αναλύθηκαν για υπολείμματα OPP ώστε να διαπιστωθεί ένα το βακτήριο που αποδομεί το DPA είχε την ικανότητα να διασπά και το OPP.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Αξιολόγηση του στελέχους *P. putida* να διασπά υψηλές συγκεντρώσεις του DPA

Το στέλεχος *P. putida* είχε την ικανότητα να μεταβολίζει υψηλές συγκεντρώσεις DPA σε πολύ μικρή χρονική περίοδο. Η αποδόμηση του DPA, στο θρεπτικό μέσο MSM, παρουσιάζεται αναλυτικά στα Διαγράμματα 1 και 2. Το βακτήριο είχε την ικανότητα να αποδομεί ως και 500 mg/L σε διάστημα λιγότερο των 2 ημερών (Διάγραμμα 1) ενώ παράλληλα κατάφερε να αποδομήσει πλήρως ως και 2000 mg/l σε 4 ημέρες (Διάγραμμα 2). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα το στέλεχος *P. putida* αποτελεί το πιο αποτελεσματικό βακτηριακό στέλεχος που αποδομεί το DPA. Έτσι τα μέχρι σήμερα βακτήρια που έχουν απομονωθεί ως αποδομητές του DPA είχαν την ικανότητα να μεταβολίζουν ως και 60 mg/l DPA [Christodoulatos *et al.*, 1997; Shin and Spain, 2009] χωρίς όμως να έχει αξιολογηθεί η ικανότητα τους σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Τα παραπάνω δεδομένα αποτελούν σοβαρή ένδειξη ότι το στέλεχος *P. putida* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων που δέχονται υγρά απόβλητα επιβαρυμένα με DPA. Η περιορισμένη αποδόμηση του DPA στα δείγματα - μάρτυρες επιβεβαιώνει τον σημαντικό ρόλο του *P. putida* στην αποδόμηση του DPA.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Διάγραμμα 1. Αποδόμηση DPA από το στελέχος *P. putida* σε υγρές καλλιέργειες (20, 100, 500, 1000 και 2000 mg/l)

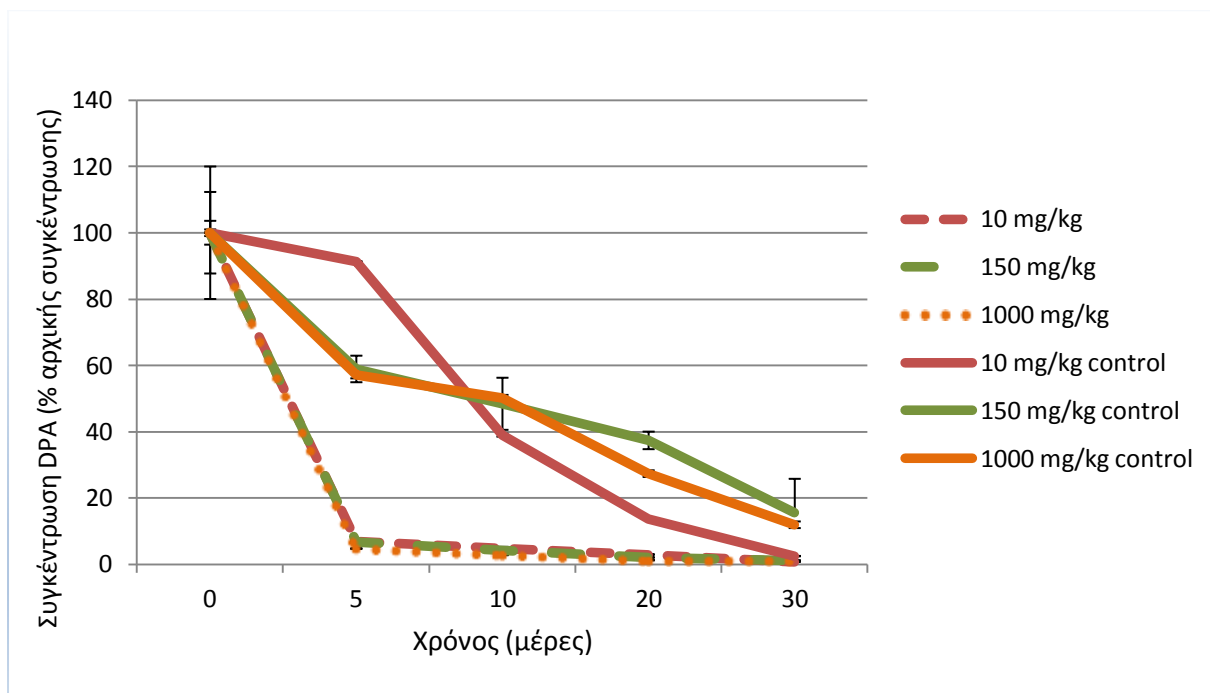
3.2 Αξιολόγηση της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους *P. putida* σε έδαφος εμποτισμένο με DPA

Η ικανότητα του στελέχους *P. putida* DPA στην αποκατάσταση εδάφων ρυπασμένων με DPA εξετάστηκε σε δείγματα εδάφους εμποτισμένα με διαφορετικές συγκεντρώσεις DPA (10, 150 και 1000 mg/kg). Παρατηρήθηκε μια ταχύτερη αποδόμηση του DPA στα εμβολιασμένα δείγματα εδάφους συγκριτικά με τα μη εμβολιασμένα (control) δείγματα (Διάγραμμα 3). Πιο συγκεκριμένα, στα εμβολιασμένα δείγματα το DPA είχε αποδομηθεί κατά 95% (σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης) μετά από πέντε μέρες ενώ, στον ίδιο χρόνο, στα μη εμβολιασμένα δείγματα παρατηρήθηκε αντίστοιχη αποδόμηση 9, 41 και 43% για τις συγκεντρώσεις 10, 150 και 1000 mg/l. Την ταχεία φάση αποδόμησης του DPA κατά τις πρώτες 5 ημέρες ακολούθησε μια επιβράδυνση της αποδόμησης με αποτέλεσμα το υπόλοιπο 5% του DPA να αποδομηθεί σε διάστημα 25 ημερών. Αυτή η διαφορά στις δύο φάσεις της αποδόμησης πιθανά να οφείλεται σε περιορισμένη διαθεσιμότητα του

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

DPA που έχει απομείνει στο έδαφος μετά την αρχική ταχεία φάση διάσπασης λόγω προσρόφησης στα εδαφικά κolloειδή. Στα μη εμβολιασμένα δείγματα η αποδόμηση πραγματοποιήθηκε με βραδύτερους ρυθμούς σταδιακά με αποτέλεσμα στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή συγκεντρώσεων 10, 150 και 1000 mg/l να έχουν παραμείνει στο έδαφος 4, 6 και 12% αντίστοιχα μετά από 30 ημέρες. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε αντιστοιχία με τον ήδη καταγεγραμμένο χρόνο ημιζωής ($t_{1/2}$ = 7-28 μέρες) του DPA σε έδαφος υπό αερόβιες συνθήκες [Howard,1991].

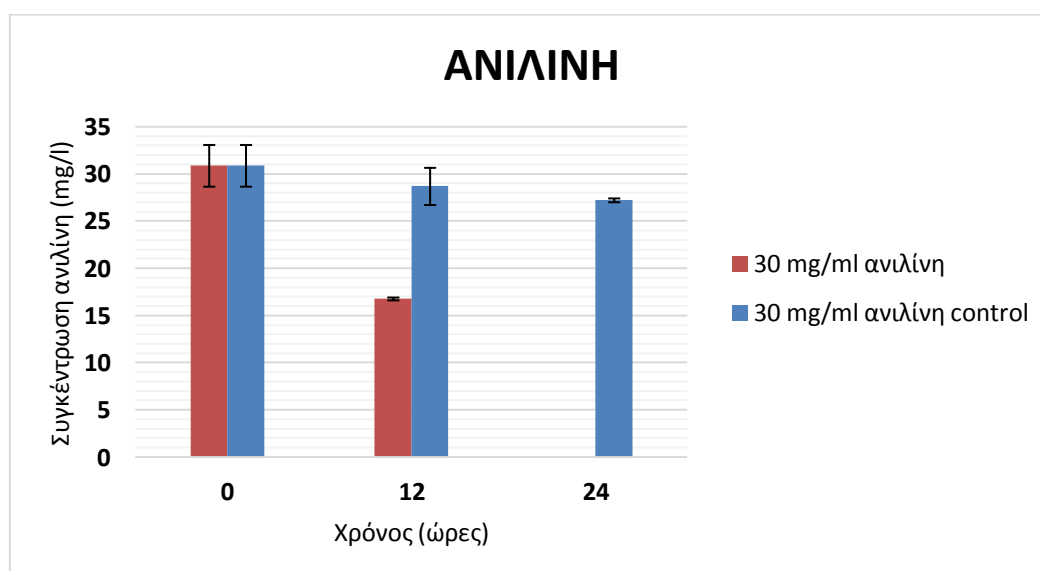
Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος υποδεικνύουν την αυξημένη ικανότητα του *P. putida* να βιο-αποδομεί υψηλές συγκεντρώσεις DPA (1000 mg/l) στο έδαφος. Συγκεντρώσεις επιπέδου 1000 mg/kg μπορεί να παρατηρηθούν σε εδάφη μετά από χρόνια απόρριψη υγρών αποβλήτων που περιείχαν DPA. Με βάση τα αποτελέσματα μπορούμε να καταλήξουμε ότι το στέλεχος *P. putida* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την βιολογική αποκατάσταση εδαφών ρυπασμένων με DPA.



Διάγραμμα 2. Αποδόμηση DPA από το στέλεχος *P.putida* σε εδαφικές καλλιέργειες (10, 150, 1000,mg/l)

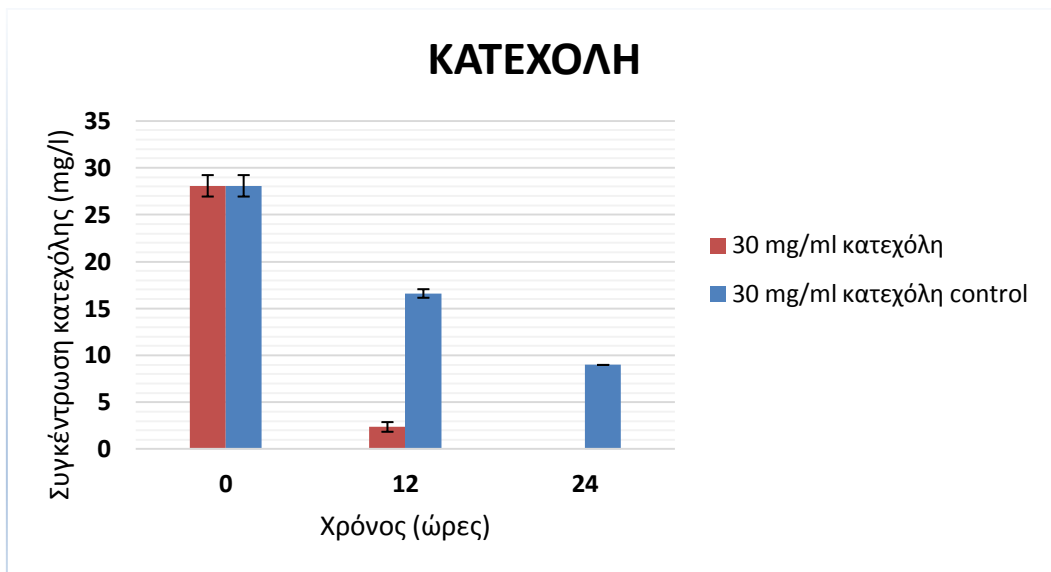
3.3 Χαρακτηρισμός της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους *P.putida* ως προς τους πιθανούς μεταβολίτες του DPA (ανιλίνη, κατεχόλη)

Η ικανότητα του στελέχους *P. putida* να αποδομεί πιθανά ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού του DPA όπως είναι η ανιλίνη και η κατεχόλη, αξιολογήθηκε σε υγρές καλλιέργειες με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το βακτήριο είχε την ικανότητα να αποδομεί πλήρως εντός 24 ωρών, τόσο την ανιλίνη όσο και την κατεχόλη (διαγράμματα 4 και 5). Η αποδόμηση της ανιλίνης στα μη εμβολιασμένα δείγματα μάρτυρες ήταν περιορισμένη καταδεικνύοντας την ικανότητα του *P. putida* να αποδομεί την ανιλίνη (Διάγραμμα 4). Από την άλλη μεριά, παρατηρήθηκε σημαντική αβιοτική διάσπαση της κατεχόλης στα μη εμβολιασμένα δείγματα η οποία όμως σε κάθε περίπτωση ήταν χαμηλότερη από την αντίστοιχη αποδόμηση που παρατηρήθηκε στα εμβολιασμένα δείγματα (Διάγραμμα 5). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η κατεχόλη αποδομείται αβιοτικά παρουσία φωτός και οξυγόνου [Thomson,1964] παρά τα μέτρα που πήραμε να περιορίσουμε τουλάχιστον την φωτολυτική αποδόμηση της.



Διάγραμμα 3. Αποδόμηση ανιλίνης από το στέλεχος *P.putida* σε υγρές καλλιέργειες (30 mg/l)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ



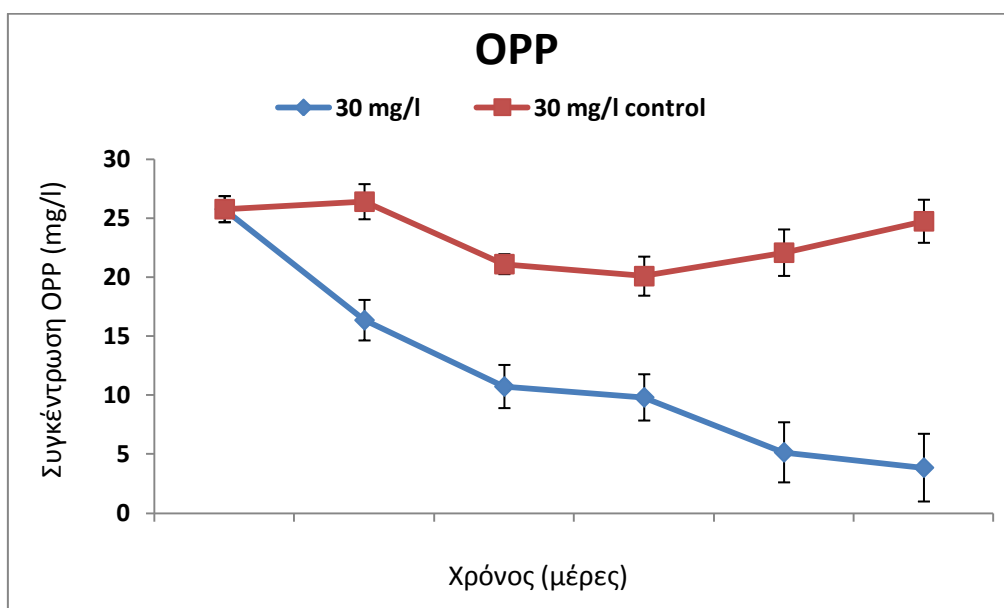
Διάγραμμα 4. Αποδόμηση κατεχόλης από το στέλεχος *P.putida* σε υγρές καλλιέργειες (30 mg/l)

Συνεπώς το στέλεχος *P. putida* έχει την ικανότητα να μεταβολίζει το DPA αλλά και πιθανά ενδιάμεσα προϊόντα που παράγονται κατά την αποδόμηση του από το βακτήριο. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η βιολογική αποδόμηση του DPA από το στέλεχος *P. putida* δεν οδηγεί στην συσσώρευση ενδιάμεσων παραπροϊόντων με υψηλή τοξικότητα, ένα χαρακτηριστικό θεμιτό σε εφαρμογές βιολογικής αποκατάστασης.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι κατά την διάρκεια της αποδόμησης του DPA δεν παρατηρήθηκε παραγωγή ή συσσώρευση κάποιου εκ των ανιλινής ή κατεχόλης κάτι που δεν σημαίνει απαραίτητα ότι δεν παράγονται κατά την πορεία αποδόμησης του DPA αλλά πιθανότατα επικρατούν παράλληλα μεταβολικά βήματα που παράγουν και αποδομούν περαιτέρω τα εν λόγω μεταβολικά προϊόντα. Κάτι αντίστοιχο είχαν παρατηρήσει και οι Shin and Spain (2009) που ανέφεραν ότι δεν παρατήρησαν συσσώρευση και παραγωγή κανενός εκ των δύο αυτών μεταβολικών προϊόντων κατά την διάρκεια της αποδόμησης του DPA από το άγριο στέλεχος *Burkholderia* sp.

3.4 Αξιολόγηση της αποδομητικής ικανότητας του στελέχους *P.putida* ως προς το μυκητοκτόνο Ortho-phenyl-rehnlol (OPP)

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το στέλεχος *P. putida* είχε την ικανότητα να αποδομεί έστω και με βραδύτερους ρυθμούς το OPP το οποίο έχει παρόμοια χημική δομή και χρησιμοποιείται επίσης στα συσκευαστήρια φρούτων αρκετές φορές παράλληλα με το DPA. Πιο συγκεκριμένα το βακτήριο κατάφερε να αποδομήσει 90% της αρχικής συγκέντρωσης OPP στην καλλιέργεια σε 37 ημέρες (Διάγραμμα 6). Η περιορισμένη αποδόμηση του OPP στον μη εμβολιασμένο μάρτυρα καταδεικνύει το σημαντικό ρόλο του στελέχους *P. putida* στην αποδόμηση του OPP. Η ικανότητα αυτή του συγκεκριμένου στελέχους να αποδομεί έστω και με βραδείς ρυθμούς το OPP εκτός του DPA αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα και θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.



Διάγραμμα 6. Αποδόμηση OPP από το στέλεχος *P.putida* σε υγρές καλλιέργειες (30 mg/

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Η Διφαινιλαμίνη είναι ένα γεωργικό φάρμακο το οποίο βρίσκει εφαρμογή στα συσκευαστήρια φρούτων. Χάρη στις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες μπορεί να προστατεύσει τα μήλα και αχλάδια από μία παθολογική κατάσταση η οποία ονομάζεται επιφανειακό καφέτιασμα (scald) και προκαλείται στα φρούτα μετά από μεγάλη διάρκεια αποθήκευσης τους. Το επιφανειακό καφέτιασμα οδηγεί σε σημαντική υποβάθμιση της εμπορικής αξίας των προϊόντων. Το DPA έχει κριθεί ακατάλληλο για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση [EC, 2012], κυρίως λόγω προβλημάτων σχηματισμού τοξικών προϊόντων κατά την αποθήκευση αλλά και στο φρούτο για τα οποία προϊόντα δεν υπήρξε κατάλληλη αξιολόγηση της τοξικότητας τους. Παρόλα αυτά το πρόβλημα επεξεργασίας των αποβλήτων που παράγονται από την χρήση του παραμένει ως έχει και είχε αναδειχθεί από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα στο πλαίσιο της αξιολόγησης.

Έτσι στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας αξιολογήθηκαν τα αποδομητικά χαρακτηριστικά και η αποδομητική ικανότητα ενός βακτηριακού στελέχους *P. putida* που είχε απομονωθεί από ρυπασμένο με DPA έδαφος. Όπως αποδείχθηκε από τις μελέτες της παρούσας εργασίας το συγκεκριμένο βακτήριο είχε την ικανότητα να αποδομεί με αποτελεσματικά και με ταχείς ρυθμούς ως και 2000mg/l DPA σε υγρές καλλιέργειες και 1000mg/L σε ρυπασμένο έδαφος. Παράλληλα η ικανότητα του αυτή συνδυάστηκε με την μη συσσώρευση ενδιάμεσων τοξικών προϊόντων όπως ανιλίνη και κατεχόλη τα οποία αποδομούνται εξίσου αποτελεσματικά από το συγκεκριμένο βακτήριο. Τέλος το συγκεκριμένο βακτήριο είχε την ικανότητα να αποδομεί έστω και με βραδύτερους ρυθμούς το μυκητοκτόνο OPP που χρησιμοποιείται επίσης στα συσκευαστήρια φρούτων. Όλα τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν πως το συγκεκριμένο βακτήριο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές εφαρμογές βιολογικού εμπλουτισμού για την αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών ή βιολογική αποτοξικοποίησης υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Περαιτέρω μελέτες θα στοχεύουν στην αξιολόγηση του μεταβολικού μονοπατιού της διάσπασης του DPA και στην γενετική αναγνώριση της διαδικασίας.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators*. **Damalas, C. A. και Eleftherohorinos, I. G.** 2011, International Journal of Environmental Research and Public Health , σσ. 1402–19.
2. **Bingham, S.** *Pesticides in rivers and groundwater*. s.l. : Environment Agency, UK, 2007.
3. *Bioaccumulation of Marine Pollutants*. G. W. **Bryan, M. Waldichuk, R. J. Pentreath and Ann Darracott**. s.l. : The Royal Society, 1979.
4. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/pesticides.htm>. <http://www.efsa.europa.eu/>. [Ηλεκτρονικό] EFSA.
5. *Commercial scale catalytic oxidation of ethylene as applied to fruit stores*. **Dover, C.J. London** : Ethylene and Plant Development, 1985.
6. *Evaluation of diphenylamine derivatives in apple peel using gradient reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet–visible absorption and atmospheric pressure chemical ionization mass selective detection*. **Rudell D. R., Mattheis J. P., Fellman J. K.** s.l. : J. Chromatogr, 2005.
7. **Flaim G. M., Toller G.** *Treatment of post-harvest pesticide residue*. s.l. : Agric. Ecosystems Environ., 1989.
8. *Diphenylamine and derivatives in the environment: a review*. **O., Drzyzga.** s.l. : Diphenylamine and derivatives in the environment: a review, 2003.
9. *Physiology and control of superficial scald of apples: a review*. Ingle, M και D'Souza, M. C. s.l. : Hort Science, 1989.
10. EPA, US. 1998.
11. EFSA. 2012.
12. *Biodegradation of diphenylamine by selected microbial cultures*. **Christodoulatos C., Koutsospyros A. D., Brodman B. W., Korfiatis G. P.** s.l. : J. Environ. Sci. Health A, 1997.
13. *Pathway and evolutionary implications of diphenylamine biodegradation by Burkholderia sp. Strain JS667*. **Shin K. A., Spain J. C.** s.l. : Appl. Environ. Microbiol., 2009.