



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας: [ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ]**

Μεταπτυχιακή διατριβή

**«Απομόνωση και ταυτοποίηση βακτηρίων με την ικανότητα
αποδόμησης του αντιοξειδωτικού *diphenylamine*»**

ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ ΖΟΥΜΠΟΡΛΗΣ

Λάρισα 2012

**«Απομόνωση και ταυτοποίηση βακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης του
αντιοξειδωτικού diphenylamine.»**

Υπεύθυνος Καθηγητής

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

Τριμελής Επιτροπή

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

Ευχαριστίες

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

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Chiara Perruchon για τη συνεχή επίβλεψη και βοήθεια που μου παρείχε πρόθυμα στα διάφορα πειραματικά στάδια. Ακόμη ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου σ' αυτό.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αντιοξειδωτικό διφαινυλαμίνη (DPA) χρησιμοποιείται εκτεταμένα σε συσκευαστήρια φρούτων για το περιορισμό της εμφάνισης του επιφανειακού καφετιάσματος (apple scald), φυσιολογικής υποβάθμισης της ποιότητας των μήλων και των αχλαδιών από την παρατεταμένη αποθήκευση. Η μετασυσλεκτική εφαρμογή μυκητοκτόνων και αντιοξειδωτικών ουσιών (DPA) οδηγεί στην παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων (100-600 mg/L) τα οποία χρήζουν επεξεργασίας και αποτοξικοποίησης πριν την οριστική απόρριψη τους στο περιβάλλον. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν επαρκής και αποτελεσματικές μέθοδοι για την επεξεργασία αυτών των αποβλήτων.

Έτσι μελετήθηκε η απομόνωση βακτηρίων που θα έχουν τη δυνατότητα να αποδομούν το DPA με βαθύτερο στόχο τους τη χρήση σε μονάδες βιολογικής επεξεργασίας αποβλήτων από συσκευαστήρια. Έτσι με τη μέθοδο των εμπλουτισμένων καλλιέργειών απομονώθηκαν από δείγμα εδάφους από την περιοχή της Αγιάς που είχε ιστορικό απόρριψης αποβλήτων με DPA συνολικά 33 αποικίες. Από το σύνολο των 33 επιλεγμένων αποικιών μετά την καλλιέργεια τους σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο, παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση (>70 % σε λιγότερο από 7 ημέρες) της αρχικής ποσότητας του DPA σε 4 και 11 καλλιέργειες από τα θρεπτικά μέσα MSM + DPA (20 mg/ L) & MSMN + DPA (20 mg/ L) αντίστοιχα, όπου το DPA αποτελούσε τη μοναδική πηγή C και N ή C αντίστοιχα. Επίστρωση των καλλιέργειών σε στερεό θρεπτικό μέσο LB και παρατήρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν έδειξαν ότι όλες οι καλλιέργειες που είχαν την ικανότητα να αποδομούν το DPA αποτελούνταν από τον ίδιο μορφολογικά τύπο αποικιών και ήταν αμιγής. Λόγω της μορφολογικής ομοιότητας που παρουσίαζαν μεταξύ τους οι αποικίες των βακτηρίων που απομονώθηκαν θεωρήθηκε ότι όλες καλλιέργειες αποτελούνταν από το ίδιο βακτηριακό στέλεχος και για τον λόγο αυτό επιλέχθηκαν ένα βακτήριο από κάθε θρεπτικό μέσο (M1 και N4) και μελετήθηκαν παραπέρα ως προς την ταυτότητα τους αλλά και ως προς την κινητική διάσπασης του DPA. Περαιτέρω επιβεβαίωση της αμιγότητας των αποδομητικών βακτηριακών καλλιέργειών επιτεύχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) η οποία όμως δεν αποτέλεσε μέρος της παρούσας εργασίας και πραγματοποιήθηκε από την υποψήφια διδάκτορα Chiara Ferruchon στα πλαίσια της διδακτορικής της διατριβής. Ακολούθησε μοριακή ταυτοποίηση τους μέσω αλληλούχισης του 16S rRNA γονιδίου. Ομοπαράθεση τους στη βάση δεδομένων EMBL με τη βοήθεια του εργαλείου BLAST έδειξε ότι τα δυο βακτήρια είναι συγγενικά στελέχη του είδους *Pseudomonas putida*. Περαιτέρω μελετη της κινητικής διάσπασης του DPA από τα δυο βακτήρια σε θρεπτικό μέσο MSMN και MSM έδειξε πως και τα δυο βακτήρια (MSM 1 και MSMN 4) είχαν την ικανότητα να διασπούν το DPA πλήρως σε 24 ώρες. Περαιτέρω μελέτες θα στοχεύσουν στο χαρακτηρισμό του μεταβολικού μονοπατιού του DPA από τα απομονωθέντα βακτήρια, στην λειτουργική ανάλυση των γονιδίων/ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση του DPA από τα συγκεκριμένα βακτήρια, στην αξιολόγηση της αποδομητικής ικανότητας των συγκεκριμένων βακτηρίων σε υψηλές συγκεντρώσεις του DPA που προσομοιάζουν πραγματικές συνθήκες και στην αξιολόγηση των απομονωθέντων βακτηρίων ως μικροβιακών εμβολίων σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.

ABSTRACT

Diphenylamine (DPA) is widely used as an antioxidant in fruit packaging plants to limit the appearance of apple scald, a physiological disorder of apples and pears occurring at storage. The post-harvest application of fungicides and antioxidants such as DPA leads to the production of a significant volume of wastewaters which contain high concentration (100-600 mg/ L) of these pesticides and there is a need for their treatment and detoxification before final environmental discharge. So far there are not adequate and effective methods for treating such wastewaters.

The aim of the current study was the isolation of bacteria that are able to degrade the DPA with a long-term target their use as inocula in a biological treatment plants. Enrichment cultures from a soil obtained from a wastewater disposal site in Agia, Larisa resulted in the isolation 15 bacterial cultures which were able to rapidly degrade DPA and use it as a C and N or just as carbon. All bacterial cultures produced the same colony morphology in LB and appear to be pure. This was verified by further DGGE screening which was not part of this thesis. Based on this, one bacterium per media (M1 and N4) were selected for further studies. Sequencing analysis of the 16S rRNA gene of the two bacteria showed that were nearly identical and both showed maximum identity (99.8%) to *Pseudomonas putida*. Further studies on the degradation kinetics of DPA in selected media where the antioxidant was used as a sole C or as both C and N source showed that both bacteria were able to degrade completely the DPA within 24 hour. This is only the second report for the isolation of bacteria able to actively degrade DPA. Further studies will aim to characterize the metabolic pathway of DPA from the isolated bacteria, provide a functional analysis of genes / enzymes involved in the degradation of DPA by these bacteria and in the long-term evaluate their use as microbial inocula in wastewater treatment plants.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων.....	7
1.2. Μετασυλλεκτική εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων	8
1.3. Βιολογική απορρύπανση.....	10
1.4. Διφαινυλαμίνη (Diphenylamine, DPA).....	10
1.4.1. Χρήσεις.....	10
1.4.2. Τοξικότητα.....	12
1.4.3. Το DPA στο περιβάλλον	12
1.5. Μικροβιακή αποδόμηση DPA.....	13
1.6. Σκοπός της εργασίας	14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Έδαφος.....	15
2.2. Γεωργικά φάρμακα.....	15
2.3. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης	15
2.3.1. Παρασκευή θρεπτικού μέσου MSM.....	16
2.3.2. Παρασκευή θρεπτικού μέσου MSMN.....	17
2.3.3. Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB (Luria Bertani)	17
2.4. Μέθοδος ανάλυσης DPA.....	18
2.4.1. HPLC-UV	18
2.4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός DPA	18
2.5. Εμπλουτισμένες καλλιέργειες για την απομόνωση βακτηρίων.....	18

2.6. Απομόνωση βακτηρίων που διασπούν το DPA	20
2.7. Εξαγωγή DNA από τις αμιγείς αποικίες των βακτηρίων.....	21
2.8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	21
2.9. Καθαρισμός των προϊόντων PCR.....	22
2.10. Ένθεση.....	23
2.11. Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα <i>E. coli</i>	23
2.12. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και αλληλούχιση	24
2.13. Μελέτη της κινητικής αποδόμησης του DPA από τα βακτήρια.....	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποδόμηση του DPA σε καλλιέργειες εμπλουτισμού.....	26
3.2. Απομόνωση βακτηρίων που διασπούν το DPA.....	28
3.3. Ταυτοποίηση των βακτηρίων που αποδομούν το DPA.....	29
3.4. Μελέτη της κινητικής διάσπασης του DPA από τα στελέχη <i>P. putida</i> MSM1 και <i>P. putida</i> MSMN4.....	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34
-------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ.....	36
---	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	37
---------------------------	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων.

Η χρήση των γεωργικών φαρμάκων στην γεωργική πρακτική μετρά ήδη έναν αιώνα μέσα στον οποίο σημαντικές βελτιώσεις του έχουν επιτευχθεί, αν αναλογιστεί κανείς πως κάποτε το τοξικό και υπολειμματικό DDT αποτελούσε την πρώτη και πιο αποτελεσματική επιλογή για τους παραγωγούς μετά τον Β παγκόσμιο πόλεμο. Κατά τα τελευταία 30 έτη έχουν εισαχθεί στην αγορά και χρησιμοποιούνται νέες ομάδες γεωργικών φαρμάκων που χαρακτηρίζονται από υψηλή αποτελεσματικότητα σε χαμηλές δόσεις και μικρή υπολειμματικότητα. Παρ' όλα αυτά τα περισσότερα γεωργικά φάρμακα ακόμα και σήμερα παρουσιάζουν τοξικότητα σε οργανισμούς μη στόχους. Για τον χρήστη τα προβλήματα προκύπτουν από την μη ορθολογική χρήση τους ενώ για τον καταναλωτή ο κίνδυνος προκύπτει από τα ανώτερα προβλεπόμενα επιτρεπτά όρια υπολειμματικότητας στα τρόφιμα. Σε επίπεδο περιβάλλοντος οι αρνητικές συνέπειες εντοπίζονται στο έδαφος στα υδρόβια συστήματα καθώς και σε οργανισμούς μη στόχους.

Όσον αφορά τη ρύπανση του εδάφους αυτή προέρχεται τόσο από την απευθείας έκθεση του σε ρυπαντές αλλά και από την αποδοχή και των ατμοσφαιρικών ρύπων που κατακρημνίζονται με αργούς ρυθμούς ανάλογα με τις συνθήκες και τη γεωμορφολογία των περιοχών. Οι ρυπαντές καταλήγουν στο έδαφος και μπορούν μετά από έντονες βροχοπτώσεις να καταλήξουν στα επιφανειακά ή στα υπόγεια νερά μέσω επιφανειακής απορροής ή έκπλυσης αντίστοιχα. Οι συντελεστές κατανομής ρύπων μεταξύ εδάφους - νερού, εδάφους - αέρα, νερού - αέρα παίζουν σημαντικό ρόλο για την τελική διασπορά, μεταφορά, επανεξάτμιση και συσσώρευση ρύπων στα εδάφη [1]. Το έδαφος δέχεται όλες αυτές τις τοξικές και επικίνδυνες χημικές ουσίες και παρασκευάσματα ή απόβλητα. Παρόμοια προβλήματα ρύπανσης δημιουργούν ορισμένα από τα γεωργικά φάρμακα και οι μεταβολίτες τους στο έδαφος. Η συσσώρευση των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων σε γεωργικές εκτάσεις έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση τοξικών φαινομένων σε χερσαίους οργανισμούς, γαιοσκώληκες, νηματώδεις και μικροοργανισμούς, οι οποίοι με το χρόνο υποβαθμίζουν την δομή αλλά έχουν και σημαντικές επιπτώσεις στην γονιμότητα του εδάφους. Ιδιαίτερα προβλήματα προκαλούν τα γεωργικά φάρμακα που βιοαποδομούνται με αργούς ρυθμούς ή αυτά που η διάσπαση τους οδηγεί στην παραγωγή και συσσώρευση τοξικών μεταβολικών προϊόντων [2].

Σημαντικό πρόβλημα αποτελεί και η ρύπανση των υδάτινων οικοσυστημάτων και οι αρνητικές επιπτώσεις στα ψάρια και στους υπόλοιπους υδρόβιους οργανισμούς καθώς και στην ποιότητα του νερού από τη στιγμή που χρησιμοποιείται ως πόσιμο από τον άνθρωπο. Η ρύπανση προκύπτει είτε μέσω της άμεσης απόρριψης των αποβλήτων, είτε μέσω της επιφανειακής απορροής και κατάληξης τους σε υδάτινους ταμιευτήρες, είτε μέσω της κατάληξης τους στους υπόγειους υδροφόρους. Οι επιπτώσεις που έχουν τα γεωργικά φάρμακα στους οργανισμούς εξαρτάται από την κατηγορία στην οποία ανήκει το κάθε γεωργικό φάρμακο, τον μηχανισμό και τρόπο δράσης τους και μια γενίκευση θα ήταν επισφαλής. Παρ όλα αυτά οι αρνητικές επιδράσεις που ένα γεωργικό φάρμακο έχει σε έναν οργανισμό προκύπτουν είτε μέσω

οξείας τοξικότητας που εμφανίζεται ύστερα από την έκθεση ενός οργανισμού σε μια υψηλή συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου, είτε ως χρόνια τοξικότητα που εμφανίζεται ύστερα από μακροχρόνια έκθεση σε χαμηλές μη θανατηφόρες συγκεντρώσεις υπό την μορφή καρκίνου, τερατογένεσης υπογονιμότητας, κατάρρευσης του ανοσοποιητικού, μεταλαξίγνεση, τερατογένεση [3].

1.2. Μετασυλλεκτική εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων

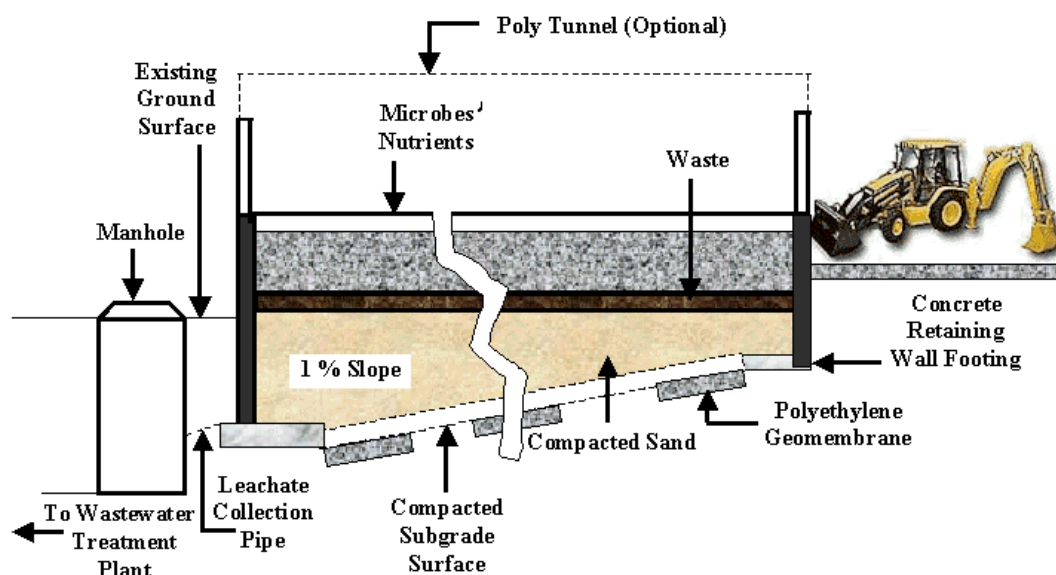
Μετά την συγκομιδή τα φρούτα, κυρίως εσπεριδοειδή και γιγαρτόκαρπα, μεταφέρονται σε συσκευαστήρια όπου υφίστανται διάφορες μεταχειρίσεις με στόχο να περιοριστούν όσο το δυνατόν οι προσβολές από φυτοπαθογόνα (μύκητες και βακτήρια) που οδηγούν σε σημαντική υποβάθμιση της ποιότητας τους. Οι προσβολές κυρίως από μύκητες του γένους *Penicillium* και *Colletotrichum* των φρούτων μπορούν να περιοριστούν σε σημαντικό βαθμό με την εφαρμογή μυκητοκτόνων όπως imazalil (IMZ), thiabendazole (TBZ) και *ortho*-phenylphenol (OPP). Από την άλλη μεριά στα μήλα και τα αχλάδια γίνεται και χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών όπως τα diphenylamine (DPA) και ethoxyquin (EQ) για το περιορισμό της εμφάνισης του επιφανειακού καφετιάσματος (apple scald), φυσιολογικής ασθένειας που οδηγεί σε σημαντική υποβάθμιση της ποιότητας των μήλων ύστερα από παρατεταμένη αποθήκευση.

Οι διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την μετασυλλεκτική επεξεργασία των φρούτων στα συσκευαστήρια, παρουσιάζουν μεγάλες απαιτήσεις σε νερό. Η εφαρμογή μυκητοκτόνων και αντιοξειδωτικών ουσιών οδηγεί στην παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων (100-600 mg/L) τα οποία χρήζουν επεξεργασίας και αποτοξικοποίησης πριν την οριστική απόρριψη τους στο περιβάλλον. Η ανάγκη επεξεργασίας των συγκεκριμένων αποβλήτων έχει επισημανθεί από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα. Έτσι η ΕΕ το 2011 ανανέωσε την έγκριση χρήσης του μυκητοκτόνου IMZ (ως το έτος 2021) υπό την αυστηρή προϋπόθεση να ληφθούν μέτρα από τα κράτη-μέλη ώστε να γίνεται επεξεργασία των υγρών αποβλήτων που παράγονται από την χρήση του [4]. Παρόμοιοι προβληματισμοί έχουν εκφραστεί και για το DPA [5].

Παρόλο που οι εγκρίσεις για αυτά τα γεωργικά φάρμακα από την ΕΕ συνοδεύονται από την απαίτηση της αποτελεσματικής διαχείρισης των αποβλήτων τους, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κανένα καθιερωμένο σύστημα διαχείρισης. Ωστόσο, υπάρχουν μερικά συστήματα κατοχυρωμένα με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (Technidex), όπως αυτό για την διαχείριση υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις TBZ. Η λειτουργία του συγκεκριμένου συστήματος βασίζεται στην προσρόφηση των γεωργικών φαρμάκων στην επιφάνεια κόκκων ενεργού άνθρακα [6]. Παρόλο που το σύστημα αυτό είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό και μειώνει κατά 7000 φορές την συγκέντρωση του TBZ δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω λόγω του ιδιαίτερα υψηλού κόστους εγκατάστασης και λειτουργίας [7].

Σήμερα, η απόρριψη των υγρών αποβλήτων των συσκευαστηρίων φρούτων πραγματοποιείται είτε σε υδάτινους φορείς που γειτνιάζουν τα συσκευαστήρια είτε σε παρακείμενους εγκαταλειμμένους αγρούς είτε στους βόθρους ή στις μονάδες επεξεργασίας αστικών αποβλήτων (βιολογικούς καθαρισμούς). Η άμεση απόρριψη αυτών των υγρών αποβλήτων σε φυσικούς υδάτινους πόρους, χωρίς πρώτα να

υποστούν επεξεργασία, έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί σημαντική πηγή ρύπανσης [8]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ρύπανση ποταμού στην Κόστα Ρίκα στα νερά του οποίου ανιχνεύθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων TBZ και IMZ που χρησιμοποιούνται σε παρακείμενα συσκευαστήρια μπανάνας [9]. Όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν την αναγκαιότητα για ανάπτυξη μεθόδων επεξεργασίας των αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων που θα είναι οικονομικά εφικτές και θα συνάδουν με τις αρχές της αιφόρου ανάπτυξης. Τα παραπάνω κριτήρια πληρούν τα συστήματα βιολογικής επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Η χρήση κατάλληλων μικροοργανισμών με αυξημένες καταβολικές ικανότητες έναντι των ουσιών που περιέχονται στα απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή αποτοξικοποίηση των αποβλήτων. Λαμβάνοντας υπόψη την ιδιαίτερα υψηλή τοξικότητα του DPA στους υδρόβιους οργανισμούς κρίνεται απολύτως αναγκαία η ανάπτυξη και εφαρμογή μονάδων βιολογικής επεξεργασίας των αποβλήτων από συσκευαστήρια μήλων/αχλαδιών όπου χρησιμοποιείται εκτεταμένα το συγκεκριμένο αντιοξειδωτικό.



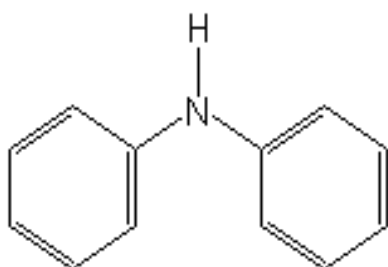
Εικόνα 1.2: Τοπική μονάδα επεξεργασίας αποβλήτων (FRTR, 2006)

1.3. Βιολογική απορρύπανση

Βιολογική απορρύπανση (bioremediation) μπορεί να ορισθεί κάθε μέθοδος που χρησιμοποιεί μικροοργανισμούς ή τα ένζυμα τους ώστε να επιστρέψουν το ρυπασμένο περιβάλλον στην αρχική του κατάσταση. Βιολογική απορρύπανση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ειδικούς ρύπους, όπως τα χλωριωμένα γεωργικά φάρμακα τα οποία διασπώνται από βακτήρια, ή σαν μια πιο γενική προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις όπως οι πετρελαιοκηλίδες στις οποίες χρησιμοποιούνται πολλαπλές τεχνικές όπως η προσθήκη λιπάσματος για τη διευκόλυνση της αποσύνθεσης του αργού πετρελαίου από τα βακτήρια.

Η βιολογική απορρύπανση εφαρμόζεται είτε ενεργοποιώντας την ήδη υπάρχουσα ενδογενή μικροβιακή κοινότητα (biostimulation) είτε με τη μορφή του βιολογικού εμπλουτισμού (bioaugmentation). Η χρήση βιολογικών μεθόδων για περιβαλλοντική εξυγίανση αποτελεί φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο. Έτσι η χρήση μικροοργανισμών ή των ενζύμων που παράγουν στην αποτοξικοποίηση γεωργικών φαρμάκων θεωρείται μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο απορρύπανσης [10].

1.4. Διφαινυλαμίνη (Diphenylamine, DPA)



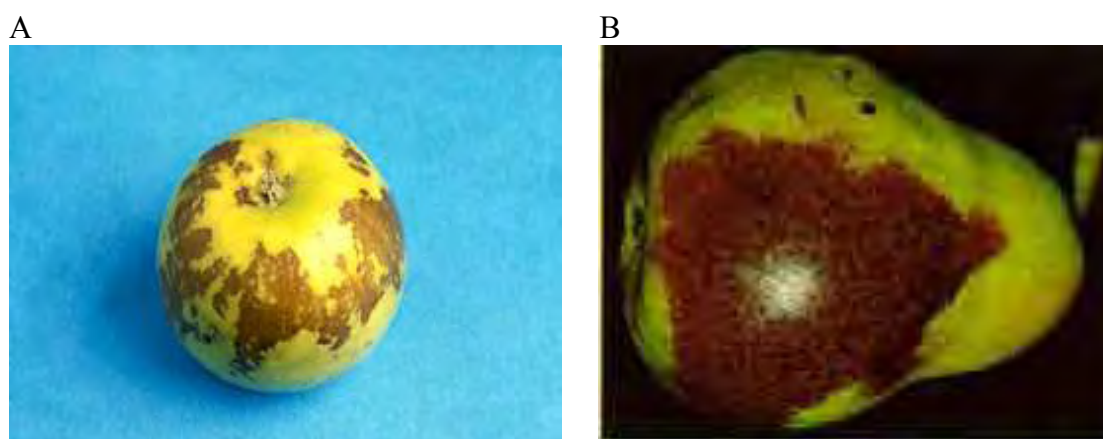
Εικόνα 1.4: Χημική δομή DPA

1.4.1. Χρήσεις

Το DPA είναι μια οργανική ουσία με χημικό τύπο $(C_6H_5)_2NH$ και ανήκει στην τάξη των αρωματικών αμινών λόγω της παρουσίας στο μόριο της δυο βενζοϊκών δακτυλίων και μιας αμινικής ομάδας. Χρησιμοποιείται σαν αντιοξειδωτικό για το καουτσούκ, σαν στερεό προωθητικό για καύσιμα πυραύλων, σαν σταθεροποιητής για εκρηκτικές ύλες, για την προετοιμασία αζωχρωμάτων, σαν αντιδραστήριο στην αναλυτική χημεία, στην παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων και κτηνιατρικών φαρμάκων και σαν γεωργικό φάρμακο.

Ειδικότερα στην γεωργία χρησιμοποιείται μετασυλλεκτικά σαν ρυθμιστής ανάπτυξης, για τον έλεγχο της φυσιολογικής ασθένειας που ονομάζεται καφέτιασμα μήλων (Εικόνα 1.4.1). Υπάρχουν ακόμη ερωτήματα για τα αίτια εμφάνισης του καφετιάσματος στα μήλα αλλά πλέον οι περισσότεροι συμφωνούν ότι αποτελεί μια

μορφή εγκαύματος από την παρατεταμένη αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες. Πιο συγκεκριμένα το DPA φαίνεται ότι παρεμποδίζει την οξείδωση φυσικών τερπενίων που περιέχονται στα μήλα με αποτέλεσμα να περιορίζεται ο σχηματισμός τριενίων που είναι και υπεύθυνα για την εμφάνιση του καφετιάσματος [11]. Το DPA κυκλοφορεί ως γαλακτωματοποιήσιμο συμπύκνωμα (31,8%) με το εμπορικό όνομα No Scald® και εφαρμόζεται κυρίως με ψεκασμό/βρέξιμο (95% των χρήσεων) ή εμβάπτιση (5% των χρήσεων) με μέγιστη συνιστώμενη συγκέντρωση τα 200 g δραστικής ουσίας/100 L ψεκαστικού υγρού [11, 12].



Εικόνα 1.4.1.: Συμπτώματα του καφετιάσματος σε μήλα (αριστερά) και αχλάδια (δεξιά)

Κατά την επανεκτίμηση της έγκρισης χρήσης του DPA, η ΕΕ αποφάσισε να αποκλείσει την συγκεκριμένη ουσία από το Παράρτημα I της κοινοτικής οδηγίας 91/414 για τους παρακάτω λόγους: 1) δεν παρέχεται αξιόπιστη εκτίμηση των επιδράσεων του στους καταναλωτές 2) δεν παρέχεται πλήρη αξιολόγηση και ταυτοποίηση μεταβολιτών που παράγονται στο φρούτο κατά την διάρκεια της αποθήκευσης και 3) δεν παρέχονται πληροφορίες για την πιθανή παραγωγή και συσσώρευση νιτροζαμινών στα φρούτα κατά την διάρκεια της αποθήκευσης ή της επεξεργασίας [5, 11]. Παρόλα αυτά δεδομένης της υψηλής αποτελεσματικότητας του DPA έναντι του καφετιάσματος και της απουσίας εναλλακτικών γεωργικών φαρμάκων στην αγορά ορισμένες χώρες όπως Ισπανία και Πορτογαλία έχουν αποφασίσει την κατ'εξάιρεση άδεια 120 ημερών ώστε να καλυφθούν οι ανάγκες προστασίας της παραγωγής μήλων κατά την αποθήκευση. Ανάλογα αιτήματα έχουν τεθεί και στο Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης στην Ελλάδα.

1.4.2. Τοξικότητα

Γενικότερα το DPA χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς. Ειδικότερα για μικροοργανισμούς όπως τα βακτήρια *Photobacterium phosphoreum* και *Vibrio fischeri* το DPA παρουσιάζει $EC_{50}= 4,75$ [13] και $5,5$ mg/L [14] αντίστοιχα. Το DPA παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή τοξικότητα 1) σε άλγη όπως τα *Pseudokirchneriella subcapitata* και *Selenastrum capricornutum* με $EC_{50} = 0,30$ και $0,18$ mg/L αντίστοιχα, 2) σε υδρόβια ασπόνδυλα όπως *Daphnia magna* με $EC_{50} = 1,2$ mg/L 3) σε ψάρια όπως το *Oncorhynchus mykiss* και το *Lepomis macrochirus* με $LC_{50} = 2,2$ και $1,2$ mg/L αντίστοιχα.

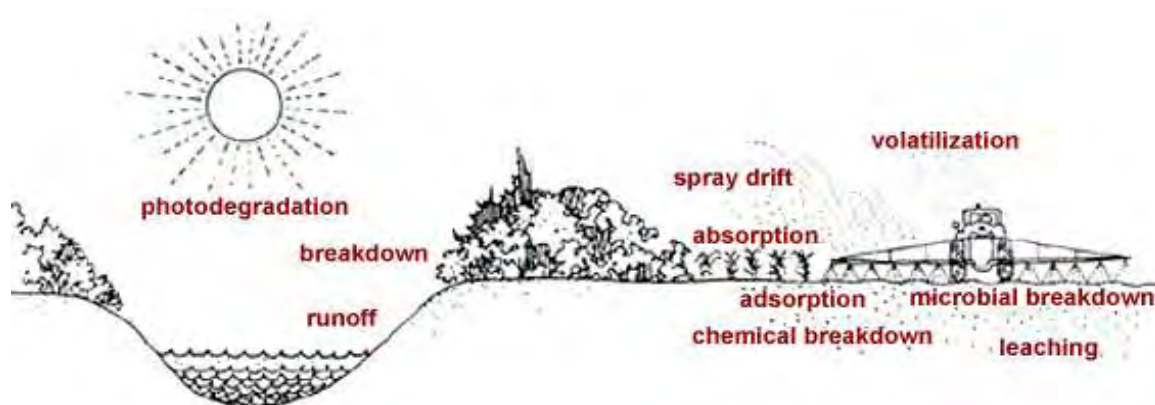
Αντίθετα το DPA παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα σε πουλιά όπως τα *Colinus virginianus* και *Anas platyrhynchos* με ETE >2000 mg/kg bw/day [5] και σε αρουραίους, ποντίκια και ινδικά χοιρίδια όπου η από στόματος LD_{50} ήταν αντίστοιχα 2000, 1750, και 300 mg/kg [15]. Το DPA δεν παρουσιάζει γενοτοξικότητα, νευροτοξικότητα και δεν είναι ύποπτο για καρκινογένεση. Για τον άνθρωπο δεν υπάρχουν δεδομένα για την οξεία τοξικότητα του DPA. Παρ' όλα αυτά υπολογίζεται πως η έμμεση έκθεση σε DPA μέσω του περιβάλλοντος (τροφή, αέρας, πόσιμο νερό) είναι χαμηλή ($0,5$ mg/kg · d) [16]. Η απορρόφηση στον άνθρωπο, στον αρουραίο, στο κουνέλι [17] και στην αγελάδα [18] γίνεται σε τουλάχιστον 68 - 89% της από του στόματος κατανάλωσης.

Ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν στην βιβλιογραφία για την επίδραση του DPA σε μικροοργανισμούς του εδάφους καθώς και άλλους οργανισμούς μη στόχους όπως γαιοσκώληκες και μέλισσες. Το DPA δεν φαίνεται να παρουσιάζει ιδιαίτερη τοξικότητα στους μικροοργανισμούς των συστημάτων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (EC_{50} στις 3 ώρες >1000 mg/L).

Το MRL για το DPA στα μήλα ορίστηκε στα 7 mg/kg. Τα ADI (Acceptable Daily Intake) και AOEL (Acceptable Operator Exposure Level) ήταν 0,075 και 0,01 mg/kg bw/day αντίστοιχα.

1.4.3. Το DPA στο περιβάλλον

Η πορεία που ακολουθεί γενικά ένα γεωργικό φάρμακο ύστερα από την κατάληξη του στο περιβάλλον περικλείεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Εικόνα 1.4.3: Διεργασίες που λαμβάνουν χώρα ύστερα από την ελευθέρωση ενός γεωργικού φαρμάκου στο περιβάλλον.

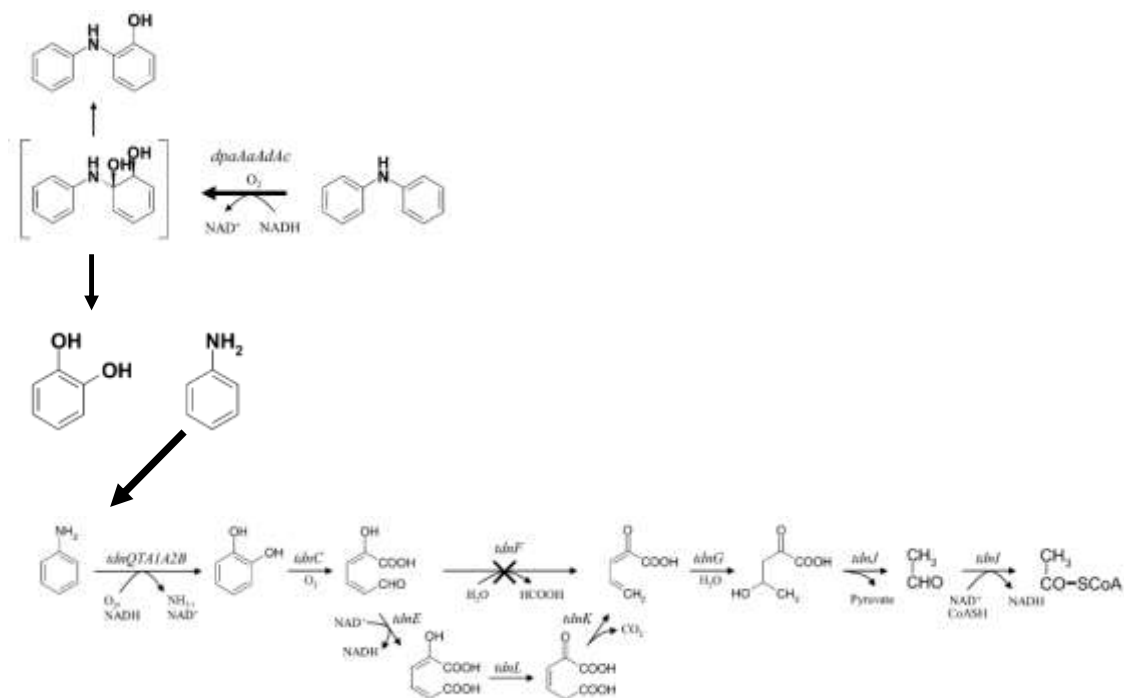
Γενικά μικρός αριθμός δεδομένων είναι διαθέσιμος σχετικά με την περιβαλλοντική τύχη του DPA. Αυτό οφείλεται στην μετασυλλεκτική χρήση του που θεωρητικά περιορίζει την πιθανότητα έκθεσης του εδάφους αλλά και άλλων περιβαλλοντικών υποστρωμάτων στο DPA. Παρόλα αυτά μη ορθές πρακτικές επεξεργασίας και χειρισμού των αποβλήτων που παράγονται από την χρήση του DPA στα συσκευαστήρια φρούτων είναι πιθανό να οδηγήσουν σε εκτεταμένη διάχυση υπολειμμάτων του DPA στο περιβάλλον και σοβαρό κίνδυνο τοξικότητας σε οργανισμούς μη-στόχους.

Το DPA διασπάται ταχύτατα στο έδαφος υπό αερόβιες συνθήκες με $DT_{50} < 1$ d [19]. Πειράματα προσρόφησης σε τέσσερα διαφορετικής μηχανικής σύστασης εδάφη έδειξαν ότι το DPA προσροφάται ισχυρά στα εδαφικά κολλοειδή με τιμές συντελεστή προσρόφησης K_{oc} που κυμάνθηκαν από 1212 ως και 6590 g/ml [20]. Οι τιμές αυτές δείχνουν ότι το DPA στο έδαφος δεν αναμένεται να είναι ιδιαίτερα κινητικό και να καταλήξει στα υπόγεια νερά. Ο περιορισμένος κίνδυνος έκπλυσης και κάθετης μετακίνησης του DPA στο έδαφος επιβεβαιώθηκε και σε πειράματα στηλών (30 cm) όπου το ποσοστό του DPA που δεν κατακρατήθηκε ή διασπάστηκε στο έδαφος των στηλών κυμάνθηκε από 0,12-4,3% της ποσότητας DPA που εφαρμόστηκε στις στήλες [21].

Το DPA είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό στην υδρόλυση στο νερό με τιμές $DT_{50} > 300$ d σε εύρος pH 5 ως 9 [22]. Αντίθετα το DPA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην φωτοδιάσπαση στο νερό με $DT_{50} = 4,39$ h [23]. Η ταχύτατη φωτόλυση του DPA στο νερό οδήγησε στην παραγωγή τριών κυρίων μεταβολικών προϊόντων που ταυτοποιήθηκαν ως carbazole, 4-phenylamino-phenol και ένα τρικυκλικό προϊόν το οποίο και συσσωρεύτηκε στο τέλος του πειράματος. Το DPA γενικά αποδομήθηκε με χαμηλούς ρυθμούς υπό αναερόβιες συνθήκες σε σύστημα νερού/ίζήματος με $DT_{50} = 60$ ημέρες [24].

1.5. Μικροβιακή αποδόμηση DPA

Μέχρι σήμερα ελάχιστα είναι γνωστά για τον μικροβιακό μεταβολισμό του DPA. Αρχικά οι Christodoulatos et al. [25] μελέτησαν την ικανότητα τριών στελεχών του γένους *Pseudomonas* να διασπούν το DPA είτε μεμονωμένα είτε σε μικτές καλλιέργειες. Τα συγκεκριμένα στελέχη ήταν ικανά να διασπούν σχετικά γρήγορα ($DT_{50} = 1,4$ d) συγκεντρώσεις DPA που κυμαίνονται από 15-60 mg/L και να το χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα. Περισσότερες λεπτομέρειες που αφορούν την μικροβιακή διάσπαση του DPA παρουσιάστηκαν από τους Shin & Sprain [26] που αναφέρουν την απομόνωση, ταυτοποίηση και πλήρη χαρακτηρισμό δύο βακτηρίων τους γένους *Burkholderia* sp. και *Ralstonia* sp. που είχαν την ικανότητα να διασπούν ταχύτατα το DPA και να το χρησιμοποιούν ως πηγή C και N.



Εικόνα 1.5: Το μεταβολικό μονοπάτι του DPA στο βακτηριακό στέλεχος *Burkholderia* sp. JS667

Στην ίδια μελέτη οι Shin & Spain επιβεβαίωσαν τον μοριακό και βιοχημικό μηχανισμό με τον οποίο το βακτήριο *Burkholderia* sp. μεταβολίζει το DPA. Συγκεκριμένα, το DPA αρχικά μετατρέπεται με την δράση μιας εξειδικευμένης διοξυγενάσης (DPA dioxygenase) σε ένα δι-υδροξυλιωμένο παράγωγο στις θέσεις 1 και 2 (δράση 1,2-διοξυγενάσης) το οποίο διασπάται περαιτέρω σε κατεχόλη και ανιλίνη (**Εικόνα 1.5**). Τα προϊόντα αυτά διασπώνται περαιτέρω σε πυρουβικό οξύ και ακεταλδεύδη που χρησιμοποιούνται στον αναβολισμό του βακτηρίου για την παραγωγή ενέργειας. Σύμφωνα με τους συγγραφείς η ικανότητα του συγκεκριμένου βακτηρίου να διασπά ταχύτατα το DPA προέκυψε από οριζόντια γονιδιακή μεταφορά του οπερονίου που περιλαμβάνει την DPA-διοξυγενάση καθώς το γειτονικό οπερόνιο που περιλαμβάνει τα γονίδια για την αποδόμηση της ανιλίνης είναι ένα ευρέως διαδεδομένο μονοπάτι που βρίσκεται συχνά σε βακτήρια εδάφους.

1.6. Σκοπός της εργασίας.

Ο βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση, ταυτοποίηση και βασικός χαρακτηρισμός βακτηρίων εδάφους που έχουν την ικανότητα να διασπούν ταχύτατα το αντιοξειδωτικό DPA με την προοπτική να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη βιολογικών συστημάτων απορρύπανσης υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων που είναι επιβαρυνμένα με το συγκεκριμένο γεωργικό φάρμακο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Έδαφος

Το δείγμα εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μικροοργανισμών συλλέχτηκε από αγρό παρακείμενο σε συσκευαστήριο φρούτων της περιοχής της Αγιάς, Λάρισας, που χρησιμοποιούνταν για την απόρριψη απόβλητων από το συσκευαστήριο. Σύμφωνα με τον ιδιοκτήτη του συσκευαστηρίου, τα υγρά απόβλητα που απορρίπτονταν εκεί κατά τα τελευταία έξι έτη περιείχαν εκτός του DPA, το συντηρητικό – αντιοξειδωτικό ethoxyquin και τα μυκητοκτόνα imazalil και thiabendazole.

2.2. Γεωργικά φάρμακα

Για την προετοιμασία των θρεπτικών μέσων αλλά και των πρότυπων διαλυμάτων του DPA για την ανάλυση και των προσδιορισμό των υπολειμμάτων του στα θρεπτικά μέσα χρησιμοποιήθηκε πρότυπη ουσία diphenylamine (99,9 %, Riedel-de Haën-Analytical, Ελβετία).

2.3. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Δυο διαφορετικά θρεπτικά μέσα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των βακτηρίων: α) εκλεκτικό μέσο ανόργανων αλάτων (Mineral Salts Medium, MSM) και β) εκλεκτικό θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (MSMN). Για την επιβεβαίωση της αμιγότητας των βακτηριακών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε επίσης στερεό θρεπτικό μέσο με την προσθήκη άγαρ στα παραπάνω καθώς και το θρεπτικό LB (Luria Bertani) ως γενικό και μη εκλεκτικό μέσο. Τέλος, για τη διαδικασία του μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο LB (Luria Bertani) + ampicillin. Όλες οι προεργασίες έγιναν ασηπτικά σε θάλαμο νηματικής ροής και ακολούθησε αποστείρωση των διαλυμάτων στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Η προετοιμασία θρεπτικών μέσων που να περιέχουν DPA (20 mg/L) βασίστηκε στην παρασκευή υδατικού διαλύματος DPA (100 mg/L) σε αποστειρωμένο νερό και προσθήκη του στα επιλεγμένα θρεπτικά μέσα σε κατάλληλους όγκους.

2.3.1. Παρασκευή θρεπτικού μέσου MSM

Το θρεπτικό μέσο MSM περιείχε εκτός από C και N, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μακροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό 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 (Stock) ανόργανων αλάτων, τα οποία αναμίχτηκαν σε κατάλληλες αναλογίες.

	Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Stock 1/A	KH ₂ PO ₄	22,7
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	59,7
	NaCl	10,0
Stock 2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,0
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,2
Stock 3	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,96

Τα Stock 1 και Stock 2 προετοιμάστηκαν με διάλυση των συστατικών τους σε 1 L αποσταγμένο νερό και ακολούθησε αποστείρωση τους στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Το Stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση από φίλτρα σύριγγας επειδή ο FeSO₄ είναι θερμοευαίσθητος. Για την προετοιμασία 1 L MSM+DPA, 100 ml από το Stock 1/A διαλύθηκαν σε 580 mL αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε εκ νέου. Μόλις το διάλυμα έφτασε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος προστεθήκαν ασηπτικά 100 mL Stock 2 και 20 ml Stock 3. Ακολούθως στο θρεπτικό μέσο προστέθηκαν ασηπτικά 200 ml υδατικού διαλύματος DPA (100 mg/L) ώστε να παρασκευαστεί τελικά το θρεπτικό μέσο MSM+DPA (20 mg/L).

2.3.2. Παρασκευή θρεπτικού μέσου MSMN

Το θρεπτικό μέσο MSMN περιείχε εκτός από C, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μακροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N). Αυτό έγινε ώστε το DPA να αποτελεί τη μοναδική πηγή άνθρακα για τους αναπτυσσόμενους μικροοργανισμούς. Το θρεπτικό αυτό διάλυμα παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα (Stock) ανόργανων αλάτων όπως περιγράφηκε παραπάνω για το MSM με την μοναδική διαφορά ότι στο Stock 1 το NaCl αντικαταστάθηκε από NH₄Cl ως πηγή N.

	Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Stock 1	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O NH ₄ Cl	22,7 59,7 10,0
Stock 2	MgSO ₄ ·7H ₂ O CaCl ₂ ·2H ₂ O MnSO ₄ ·4H ₂ O	5,0 0,1 0,2
Stock 3	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,96

2.3.3. Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB (Luria Bertani)

Για την προετοιμασία 1 L υγρού θρεπτικού μέσου LB, 10 g NaCl, 15 g καζεΐνης και 5 g yeast extract αραιώθηκαν σε 1 L αποσταγμένο νερό, αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Για την προετοιμασία στερεού θρεπτικού μέσου LB στο παραπάνω διάλυμα προστέθηκαν και 15 g άγαρ (1,5%) και μόλις το διάλυμα έφτασε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος ακολούθησε η επίστρωση τριβλίων. Για την προετοιμασία θρεπτικού μέσου LB + ampicillin, για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων στο υγρό θρεπτικό μέσο LB προστέθηκαν 1000 μL αντιβιοτικό ampicillin από υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 100 mg/mL.

2.4. Μέθοδος ανάλυσης DPA

2.4.1. HPLC-UV

Για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του DPA στις υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σύστημα HPLC Marathon III, που ήταν εξοπλισμένο με σύστημα αντλιών βαθμιδωτής έκλουσης, όγκο έγχυσης 20 μL και ανιχνευτή UV, ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό Clarify® για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Ο διαχωρισμός του DPA έγινε σε στήλη αντίστροφης φάσης (RP) C18, Nucleosil (150 x 4,6 mm, 5 μm id) (Macherey – Nagel GmbH, Germany) με ισοκρατική έκλουση με κινητή φάση Ακετονιτρίλιο: 50 %, H₂O: 40 %, MeOH: 10 % (HPLC Grade /Merck GmbH, Germany) και ροή 1 ml/min. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 210 nm και ο χρόνος κατακράτησης του DPA ήταν 7 min.

2.4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός DPA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DPA, πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκε αρχικά πρότυπο διάλυμα DPA, όπου 100 mg πρότυπης ουσίας DPA διαλύθηκαν σε 10 ml ακετόνης (10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Από αυτό το διάλυμα με διαδοχικές αραιώσεις σε μεθανόλη παρασκευαστήκαν πρότυπα διαλύματα DPA συγκέντρωσης 100, 10, 5, 2, 1, 0,5 και 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Από κάθε ένα από τα πρότυπα διαλύματα έγινε έγχυση 20 μL στο σύστημα HPLC. Το εμβαδόν της κορυφής που πρόεκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με τη συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών τους με τη βοήθεια του λογισμικού Clarify®.

2.5. Εμπλουτισμένες καλλιέργειες για την απομόνωση βακτηρίων

Για να ενισχυθεί η δραστηριότητα των μικροοργανισμών που διασπών το DPA στο έδαφος, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή νέας δόσης DPA στο εργαστήριο. Σε 100 g εδάφους έγινε εφαρμογή 1 ml διαλύματος 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DPA σε μεθανόλη με αποτέλεσμα τελική συγκέντρωση DPA στο έδαφος 10 $\mu\text{g}/\text{g}$. Το δείγμα αφέθηκε για διάστημα 2 ωρών ώστε να εξατμιστεί η μεθανόλη και ακολούθως αναμιχθηκε με τα χέρια ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή του DPA στο έδαφος. Το έδαφος στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε πλαστική σακούλα και τοποθετήθηκε στην επώαση στους 26 °C.

Δέκα ημέρες μετά την εφαρμογή του DPA στο έδαφος, ξεκίνησε διαδικασία εμπλουτισμού για την απομόνωση αποδομητικών βακτηρίων. Η διαδικασία περιλάμβανε την υγρή καλλιέργεια δείγματος εδάφους στο οποίο έγινε η εφαρμογή του DPA. Αφού ζυγίστηκαν 1 g εδάφους, σε θάλαμο νηματικής ροής εμβολιάστηκαν ασηπτικά σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη (100 ml) που περιείχε 20 ml MSM + DPA ή MSMN + DPA (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Υπήρχαν τρεις επαναλήψεις για κάθε θρεπτικό μέσο, καθώς και από δυο επαναλήψεις για κάθε θρεπτικό, οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν με έδαφος, και οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C υπό ανάδευση 160 στροφών/min.

Λίγο πριν το εμβολιασμό και 2 ή 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των θρεπτικών μέσων δείγματα (0.5 ml) συλλέχθηκαν από όλες τις υγρές καλλιέργειες και αναλύθηκαν για υπολείμματα του DPA ώστε να μελετηθεί η αποδόμηση του. Η εκχύλιση των υπολειμμάτων του DPA από τα υγρά θρεπτικά μέσα πραγματοποιήθηκε με την παρακάτω διαδικασία:

- i. 0,5 ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωλήνες eppendorf (2 ml).
- ii. Προστέθηκε 1 mL MeOH και ακλούθησε σύντομη ανάδευση σε vortex
- iii. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο για 5 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα.
- iv. Ακολούθησε προσεκτικά λήψη των δειγμάτων με τη βοήθεια πιπέτας αποφεύγοντας την παραλαβή ιζήματος από τον πυθμένα των σωλήνων eppendorf
- v. Τα δείγματα στην συνέχεια αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC-UV όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω.

Μετά την επιβεβαίωση της ταχύτερης αποδόμησης του DPA κατά τον πρώτο κύκλο εμπλουτισμού και όταν το ποσοστό αποδόμησης ξεπέρασε το 90% προετοιμάστηκε ο 2^{ος} κύκλος ανακαλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, 1 ml από τις καλλιέργειες μεταφέρθηκε ασηπτικά σε νέα σειρά των ίδιων θρεπτικών μέσων (20 ml). Στη συνέχεια, και με τον ίδιο τρόπο προετοιμάστηκε ο 3^{ος} και 4^{ος} κύκλος ανακαλλιέργειας για όλα τα θρεπτικά. Σε κάθε κύκλο ανακαλλιέργειας υπήρχαν και από δυο μάρτυρες (controls) για κάθε θρεπτικό μέσο και η αποδόμηση του DPA μετρήθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω για τον πρώτο κύκλο εμπλουτισμού.



Εικόνα 2.6.1.α: Εμπλουτισμένες καλλιέργειες MSM+DPA (20 mg/L)

2.6. Απομόνωση βακτηρίων που διασπών το DPA

Όταν η αποδόμηση του DPA στον τελευταίο κύκλο ανακαλλιέργειας ξεπέρασε το 90 % προετοιμάστηκε σειρά διαδοχικών αραιώσεων ($10^{-1} - 10^{-6}$) για κάθε θρεπτικό μέσο. Οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν ως εξής:

- i. Για κάθε θρεπτικό μέσο (MSM & MSMN) προετοιμάστηκαν 6 αποστειρωμένες σωλήνες falcon (15 mL) σε κάθε μια από τις οποίες προστεθήκαν ασηπτικά 9 mL αποστειρωμένο νερό.
- ii. Οι καλλιέργειες εμπλουτισμού του τελευταίου κύκλου για κάθε θρεπτικό μέσο αναμίχτηκαν .
- iii. Ακολούθησε vortex και όγκος 1 mL βακτηριακής καλλιέργειας από κάθε θρεπτικό μέσο μεταφέρθηκε στο πρώτο σωλήνα falcon.
- iv. Ακολούθησε vortex (αραίωση 10^{-1}), και 1 mL από την συγκεκριμένη αραιώση μεταφέρθηκε στο επόμενο falcon κ.ο.κ.
- v. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις με τον ίδιο τρόπο μέχρι την υψηλότερη αραιώση 10^{-6} .

Στη συνέχεια από κάθε φιάλη falcon με τη βοήθεια πιπέτας μεταφέρθηκαν 0,5 ml σε τριβλία αντίστοιχου στερεού θρεπτικού μέσου (MSM+ και MSMN+DPA) και έγινε επίστρωση έξι τριβλίων ανά θρεπτικό μέσο. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 26 °C. Ύστερα από τρεις ημέρες επώασης, ικανοποιητικός αριθμός βακτηριακών αποικιών είχε αναπτυχθεί στα τριβλία. Ακολούθησε επιλογή αποικιών με βάση τρία κριτήρια, 1) την εμφάνιση περιθωρίου γύρω από την αποικία που καταδεικνύει πιθανότατα την κατανάλωση του DPA από την αποικία, 2) μορφολογικά χαρακτηριστικά και 3) όσο το δυνατόν καλύτερο διαχωρισμό από παρακείμενες αποικίες ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα απομόνωσης αξενικών καλλιιεργειών. Τελικά, επιλέχτηκαν συνολικά 33 αποικίες (17 και 16 από MSM και MSMN αντίστοιχα) με τη βοήθεια αποστειρωμένων ακίδων. Οι επιλεγμένες αποικίες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά μπουκάλια των 30 mL, τα οποία περιείχαν 5 mL από το ίδιο θρεπτικό μέσο με αυτό του τριβλίου από το οποίο επιλέχτηκαν. Ακολούθησε vortex και τοποθέτηση τους σε θάλαμο επώασης με θερμοκρασία 25 °C υπό ανάδευση 160 στροφών/min. Δείγματα θρεπτικού μέσου (0.5 ml) συλλέχτηκαν αμέσως μετά τον εμβολιασμό (χρόνος 0) και 5 ημέρες μετά για την παρακολούθηση της αποδόμησης του DPA στις καλλιέργειες. Για κάθε θρεπτικό μέσο προετοιμάστηκαν και τοποθετήθηκαν στην επώαση και καλλιέργειες των αντίστοιχων θρεπτικών μέσων (MSM+, MSMN+DPA) οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν με βακτήρια για να παρακολουθηθεί η αβιοτική διάσπαση του DPA στις συνθήκες καλλιέργειας. Βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες παρατηρήθηκε >70% διάσπαση του DPA σε διάστημα 5 ημερών θεωρήθηκαν ως θετικές στην αποδόμηση και μελετήθηκαν παραπέρα.

Έτσι αρχικά αξιολογήθηκε η αμιγότητα των επιλεγέντων αποδομητικών βακτηριακών καλλιιεργειών με επίστρωση σε τριβλία MSM(N)+DPA και LB. Καλλιέργειες που αποτελούνταν από μορφολογικά πανομοιότυπες αποικίες θεωρήθηκαν αμιγής, επιστρώθηκαν σε τριβλία MSM+DPA ή MSMN+DPA και τοποθετήθηκαν στην επώαση. Στα παραπάνω τριβλία αφού αναπτύχθηκε επαρκής βακτηριακή βιομάζα προστέθηκε ασηπτικά 0,8 mL αποστειρωμένο νερό και η βακτηριακή μάζα συγκομίστηκε και μεταφέρθηκε σε νέα αποστειρωμένα erpendorfs. Σε αυτά προστέθηκαν 0,2 ml αποστειρωμένου υδατικού διαλύματος γλυκερόλης (80 %). Αφού έγινε vortex και κατάψυξη σε υγρό άζωτο αποθηκεύτηκαν στους -80°C (stock γλυκερόλης).

2.7. Εξαγωγή DNA από τις αμιγείς αποικίες των βακτηρίων

Εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε από αμιγείς βακτηριακές καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί σε τριβλία LB. Η βακτηριακή ανάπτυξη συγκομίστηκε με 1 mL αποστειρωμένο νερό, φυγοκεντρήθηκε και ακολούθησε εξαγωγή DNA με τη χρήση του εμπορικού κίτ Nucleospin® Tissue (Macherey – Nagel, Germany). Τα βήματα του πρωτοκόλλου που ακολούθηθηκαν ήταν τα εξής:

- i. Η βακτηριακή πελέτα επαναδιαλύθηκε με 180 μL Buffer T1 (Lysis Buffer) και το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνίδια.
- ii. Προστέθηκαν 25 mL πρωτεϊνάσης K από πρότυπο διάλυμα 20 mg/mL, επακολούθησε ανάδευση σε vortex και επώαση για 1-3 ώρες στους 56 °C έως ότου επέλθει πλήρης λύση των κυττάρων. Στο διάστημα αυτό, πραγματοποιήθηκε ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα μιας και η διαδικασία αυτή μειώνει το χρόνο λύσης των κυττάρων.
- iii. Μετά την λύση των κυττάρων προστέθηκαν 200 μL από το Buffer B3, ακλούθησε vortex και επώαση των δειγμάτων στους 70°C για 10 λεπτά.
- iv. Προστέθηκαν 210 μL αιθανόλης (96-100%) στα δείγματα και ακολούθησε αμέσως vortex.
- v. Κατόπιν, οι στήλες Nucleospin τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια συλλογής (2 mL), προστέθηκαν τα δείγματα και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για να λεπτό. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφτηκε.
- vi. Προστέθηκαν 500 μL του Wash Buffer (BW) στη στήλη και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απομακρύνθηκε.
- vii. Ακολούθησε αμέσως μια νέα φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της αιθανόλης (BW).
- viii. Τέλος οι στήλες Nucleospin τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα eppendorfs και η έκλυση του DNA έγινε με την προσθήκη 100 μL του Elution Buffer, το οποίο είχε προθερμανθεί στους 70 °C. Οι στήλες αφέθηκαν με το Buffer για 1 λεπτό και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για ένα λεπτό.
- ix. Τα δείγματα του DNA διατηρήθηκαν στους -20 °C.

Το μέγεθος και η καθαρότητα του DNA που παραλήφθηκε από τα βακτήρια ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.7% (0,28 g αγαρόζης σε 40 ml 1x TAE) και 1,5 μL βρωμιούχου αιθιδίου. Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 3 μL DNA αναμειγμένα με 1 μL loading buffer. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100 Volt για 40 min και οι ζώνες του DNA παρατηρήθηκαν μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης σε τράπεζα UV.

2.8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική PCR (Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *-in vitro-* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου. Στο πρώτο στάδιο, το

δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 92-95°C. Στο δεύτερο στάδιο, οι εκκινητές που βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια υβριδίζουν με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στο DNA-στόχο στους 50-65 °C. Κατά το τρίτο στάδιο, το οποίο πραγματοποιείται στους 70-78 °C, συντίθεται DNA αρχίζοντας από τους δυο εκκινητές. Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μετά από μερικούς κύκλους το προϊόν είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθαρίζονται από τους εκκινητές.

Στην αντίδραση της PCR ενισχύθηκε όλο το 16S rRNA γονίδιο (1500 bp) των βακτηρίων με τους εκκινητές (8f και 1512r) χρησιμοποιώντας ως μήτρα το DNA που εκχυλίστηκε από τις αμιγείς καλλιέργειες. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

<i>Εκκινητές</i>	<i>Αλληλουχία</i>	<i>T_m °C</i>
8f	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'	52
1512r	5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT -3'	52

Πίνακας 2.8.α: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος (μL)</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Buffer (10x optimized)	2,5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	0,75	1.5 mM
Primers: 8f - 1512r	1	0,2 μM
Polymerase	1	1 U/ 25 μL
dNTPs	0,5	200 μM
H ₂ O	17,25	
DNA	1	-

Πίνακας 2.8.β: Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων

Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	25 κύκλοι
Αποδιάταξη	95 °C	1 min	
Υβριδοποίηση	55 °C	1 min	
Επιμήκυνση	72 °C	2 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	

Πίνακας 2.8.γ: Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες PCR με τους εκκινητές 8f - 1512r

Όπως και με το DNA, το μέγεθος και η ποιότητα των προϊόντων PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 5 μl DNA αναμειγμένα με 1 μl loading buffer. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100 Volt για 40 min και οι ζώνες του DNA παρατηρήθηκαν μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης σε τράπεζα UV

2.9. Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR για την περαιτέρω χρήση τους στην αντίδραση ένθεσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού κιτ PCR Purification (Invitrogen). Με τη διαδικασία αυτή γίνεται αποτελεσματική απομάκρυνση της

περίσσειας εκκινητών, dNTPs, αλάτων, και ενζύμων που παραμένουν με την ολοκλήρωση της PCR. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- i. Σε σωλήνες eppendorf έγινε προσθήκη 4 όγκων Binding Buffer σε 1 όγκο προϊόντος PCR και το μίγμα αναμείχθηκε.
- ii. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλη έκλουσης.
- iii. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 10.000 στροφές για ένα λεπτό.
- iv. Το διάλυμα που συλλέχτηκε στο σωλήνα συλλογής απομακρύνθηκε και η στήλη έκλουσης επανατοποθετήθηκε στο σωλήνα συλλογής.
- v. Προστέθηκαν στη στήλη έκλουσης 650 μ L Wash Buffer.
- vi. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρωση σε 10.000 στροφές για ένα λεπτό.
- vii. Το διάλυμα που συλλέχτηκε απομακρύνθηκε και η στήλη έκλουσης επανατοποθετήθηκε στο σωλήνα συλλογής.
- viii. Ακόμη μια φυγοκέντρωση πραγματοποιήθηκε σε μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το Wash Buffer.
- ix. Με προσοχή απομακρύνθηκε ο σωλήνας συλλογής και στήλη έκλουσης τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα έκλουσης.
- x. Προστέθηκαν 50 μ L Elution Buffer στο κέντρο της στήλης και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
- xi. Τέλος έγινε φυγοκέντρωση για 2 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα.
- xii. Η στήλη έκλουσης απομακρύνθηκε.

Στο σωλήνα έκλουσης περιέχεται καθαρισμένο το προϊόν της PCR το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία ένθεσης.

2.10. Ένθεση

Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των δειγμάτων του dsDNA με φωτόμετρο στα 260 nm με χρήση κυψελίδας. Με βάση τις τιμές απορρόφησης και βάσει του τύπου $[25 \text{ ng φορέα} \times 1,5 \text{ kb (DNA)} / 3] \times (3/1)$ υπολογίστηκαν τα μ L DNA κάθε δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία ένθεσης σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα pGEM®-T easy (Promega). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση ένθεσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.10.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος (μL)</i>
2X Buffer	5
Πλασμιδιακός φορέας pGEM	0,5
PCR προϊόν	3,5
T4 λιγάση	1
dd H ₂ O	0
Συνολικός όγκος	10 μL

Πίνακας 2.10: Οι όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση ένθεσης των διάφορων PCR προϊόντων.

Μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων τα δείγματα επώαστηκαν στους 4°C για 16 ώρες.

2.11. Μετασηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*

Με την ολοκλήρωση της ένθεσης ακολούθησε ο μετασηματισμός των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* (DH5a competent cells,

Invitrogen, USA). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη διαδικασία του μετασχηματισμού ήταν τα εξής:

- i. Σε αποστειρωμένα erpendorfs τοποθετήθηκαν 80 μL δεκτικών κυττάρων και 2 μl ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και ανακινήθηκαν ελαφρά. Τα erpendorfs τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά στον πάγο.
- ii. Στη συνέχεια μετά τα 30 λεπτά παραμονής στον πάγο τα erpendorfs μεταφέρθηκαν αμέσως για επώαση στους 42°C (heatshock) για 50 δευτερόλεπτα.
- iii. Προστέθηκαν 200 μL LB υπό φλόγα και τα δείγματα επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37°C .
- iv. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής και ασηπτικά προστέθηκαν 50 μL X GAL (2 %) που φυλάσσονταν στους -20°C και 10 μL IPTG που φυλασσόταν στους 4°C
- v. Τέλος τα δείγματα επιστρώθηκαν σε τριβλία LB + ampicillin και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 16 ώρες.

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε επιλογή πέντε λευκών αποικιών για κάθε βακτήριο με τη χρήση αποστειρωμένων ακίδων και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκάλια (25 mL) που περιείχαν 5 mL LB + ampicillin. Τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με ανάδευση στους 37°C στις 200 στροφές/min για 16 ώρες.

2.12. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και αλληλούχιση

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA με το εμπορικό kit Nucleospin® Plasmid (Macherey – Nagel, Germany). Τα βήματα του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- i. 1,5 mL από τις καλλιέργειες μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο erpendorf και ακολούθησε φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα. Τα κύτταρα ίζηματοποιήθηκαν και το υπερκείμενο διάλυμα απορρίφτηκε.
- ii. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με 250 μL Buffer A1.
- iii. Προστέθηκαν 250 μL Buffer A2 και τα erpendorfs ανακινήθηκαν 6-8 φορές και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- iv. Προστέθηκαν 300 μl Buffer A3 και τα erpendorfs ανακινήθηκαν 6-8 φορές
- v. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 11.000 στροφές για 5 λεπτά.
- vi. Το υπερκείμενο που συλλέχτηκε τοποθετήθηκε σε στήλες έκλουσης οι οποίες ήταν τοποθετημένες σε σωλήνες συλλογής.
- vii. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 11.000 στροφές. Το διάλυμα που συλλέχτηκε στο σωλήνα συλλογής απομακρύνθηκε και η στήλη έκλουσης επανατοποθετήθηκε στο σωλήνα συλλογής.
- viii. Στη στήλη έκλουσης προστέθηκαν 500 μL του Buffer AW το οποίο είχε προθερμανθεί στους 50°C και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό. Το διάλυμα που συλλέχτηκε στο σωλήνα συλλογής απορρίφτηκε.
- ix. Προστέθηκαν στη στήλη 600 μL του Buffer A4 και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό. Το διάλυμα στο σωλήνα συλλογής απορρίφτηκε.
- x. Ακολούθησε νέα φυγοκέντριση στις 11.000 στροφές για 2 λεπτά.

- xι. Στη συνέχεια οι στήλες μεταφέρθηκαν σε νέα αποστειρωμένα eppendorfs και η έκλυση του DNA πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 50 μ L Buffer AE. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και κατόπιν φυγοκέντριση για 1 λεπτό στις 11.000 στροφές.
- xii. Τέλος τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

Το πλασμιδιακό DNA απεστάλη για αλληλούχιση στο εργαστήριο ανοσολογίας του πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας. Οι αλληλουχίες αναγνώστηκαν και προς τις δυο κατευθύνσεις ώστε να πάρουμε πλήρη αλληλουχία (1.500 bp) του 16S rRNA γονιδίου.

2.13. Μελέτη της κινητικής αποδόμησης του DPA από τα βακτήρια

Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να μελετηθεί η κινητική αποδόμησης του DPA από τα βακτήρια που απομονώθηκαν όταν το DPA αποτελούσε τη μοναδική πηγή άνθρακα (MSMN+DPA) ή μοναδική πηγή άνθρακα και αζώτου (MSM+DPA) στην καλλιέργεια. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια των απομονωθέντων βακτηρίων με τη μεταφορά 0,5 mL από υπάρχουσες καλλιέργειες σε νέο θρεπτικό μέσο 10 mL MSM + DPA (20 mg/L) και 10 mL MSMN + DPA (20 mg/L). Για κάθε βακτήριο υπήρχαν τρεις επαναλήψεις. Παράλληλα μετρήθηκε η διάσπαση του DPA σε φιάλες που περιείχαν 10 ml MSM + DPA και 10 mL MSMN + DPA (δυο επαναλήψεις για κάθε μέσο) και οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν με τα βακτήρια, για να μετρήσουμε πιθανή αβιοτική διάσπαση του DPA στα θρεπτικά μέσα. Οι νέες καλλιέργειες και τα δείγματα 'μάρτυρες' τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα στους 25°C και στις 150 στροφές / λεπτό και η αποδόμηση του DPA μετρήθηκε με λήψη δειγμάτων σε χρόνους 0, 4, 8, 12 και 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό και ανάλυση σε σύστημα HPLC-UV.

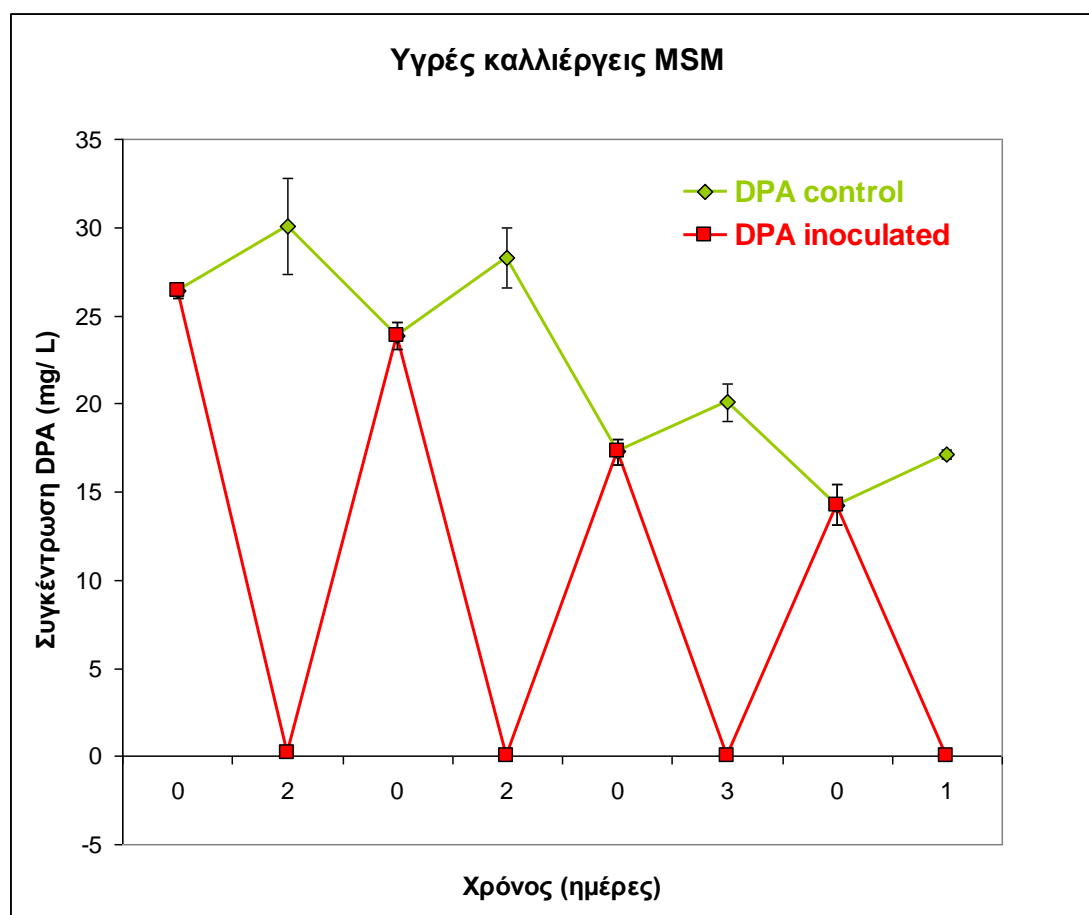
Παράλληλα με την παρακολούθηση της διάσπασης του DPA από τα απομονωθέντα βακτήρια πραγματοποιήθηκε στα ίδια χρονικά σημεία και προσδιορισμός του βακτηριακού πληθυσμού με καταμέτρηση των αποικιών (spread plate technique) με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και επίστρωσης σε τριβλία LB. Οι διαδοχικές αραιώσεις και η επίστρωση στα τριβλία LB πραγματοποιήθηκε και για τους 5 χρόνους. Για κάθε βακτήριο που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκαν για την αραιώση 5 φιάλες falcon στις οποίες τοποθετήθηκαν ασηπτικά 9 ml αποστειρωμένου νερού. Στην πρώτη φιάλη τοποθετήθηκε 1 ml βακτηριακής καλλιέργειας και στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων για τις υπόλοιπες φιάλες με τη μεταφορά ενός mL από την αρχική και έπειτα 1 mL από την προηγούμενη στην επόμενη. Ακολούθησε επίστρωση, σε κάθε χρόνο, τριβλίων LB από τις αραιώσεις 10^{-5} και 10^{-4} για κάθε βακτήριο. Τέλος πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τριβλία και αναγωγή τους στο 1 mL (cfu/ mL).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

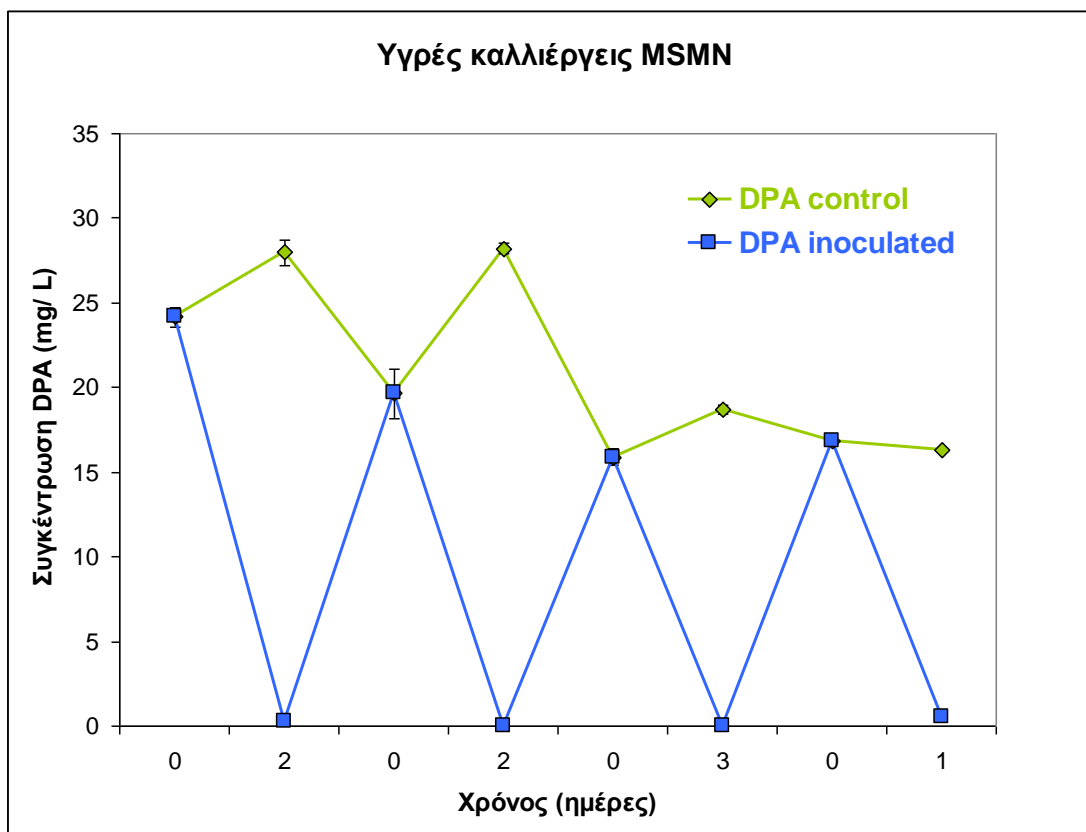
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποδόμηση του DPA σε καλλιέργειες εμπλουτισμού

Όπως διαπιστώθηκε στις καλλιέργειες εμπλουτισμού το δείγμα εδάφους περιείχε μικροοργανισμούς που είχαν την ικανότητα να διασπούν ταχύτατα το DPA καθώς παρατηρήθηκε πλήρης διάσπαση του αντιοξειδωτικού εντός δύο ημερών στον πρώτο κύκλο εμπλουτισμού και στα δύο θρεπτικά μέσα (Διαγράμματα 3.1α & 3.1β). Συνεχίζοντας στους κύκλους εμπλουτισμού παρατηρήθηκε πλήρης αποδόμηση του DPA εντός δύο, τριών και μίας ημέρας στον δεύτερο, τρίτο και τέταρτο κύκλο αντίστοιχα. Στους μη εμβολιασμένους μάρτυρες τόσο για το MSM όσο και το MSMN δεν παρατηρήθηκε σημαντική αβιοτική αποδόμηση κατά την διάρκεια του κάθε κύκλου επιβεβαιώνοντας τον μικροβιακό μηχανισμό διάσπασης του DPA στις καλλιέργειες εμπλουτισμού. Με το πέρας του τελευταίου κύκλου εμπλουτισμού (4^{ος}) όπου υπήρξε σχεδόν καθολική αποδόμηση του DPA και στα δυο θρεπτικά μέσα (MSM & MSMN) ακολούθησε επίστρωση τριβλίων με τα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα.



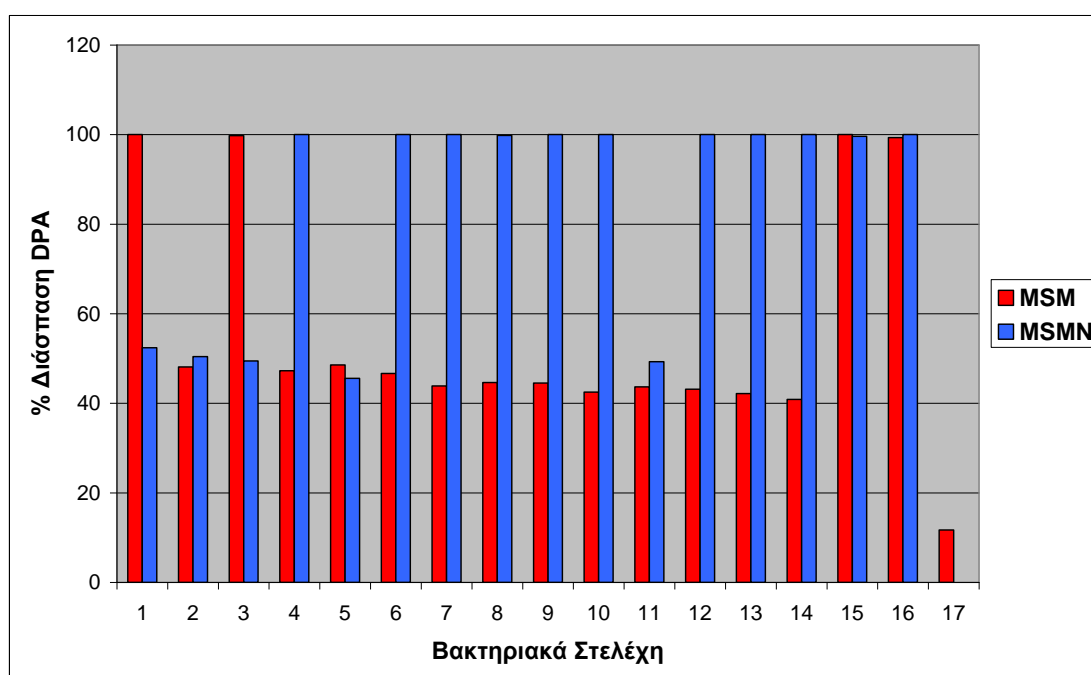
Διάγραμμα 3.1.α: Η αποδόμηση του DPA στους τέσσερις κύκλους εμπλουτισμού σε θρεπτικό μέσο MSM και σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSM (control). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.1.β: Η αποδόμηση του DPA στους τέσσερις κύκλους εμπλουτισμού σε θρεπτικό μέσο MSMN και σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSMN (control). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

3.2. Απομόνωση βακτηρίων που διασπών το DPA

Ύστερα από επώαση των τριβλίων που επιστρώθηκαν με τις καλλιέργειες εμπλουτισμού από τα δύο θρεπτικά μέσα, παρατηρήθηκε σημαντικός αριθμός ευδιάκριτων αποικιών στα τριβλία MSM+DPA και MSMN+DPA που όμως δεν παρουσίαζαν μεγάλη ποικιλομορφία με την κυριαρχία μιας συγκεκριμένης αποικίας και στα δύο θρεπτικά μέσα. Επιλέχθηκαν συνολικά 33 αποικίες και τοποθετήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες MSM + DPA (20 mg/L) και MSMN + DPA (20 mg/L) ώστε να αξιολογηθεί η αποδομητική τους ικανότητα. Από το σύνολο των 33 επιλεγμένων αποικιών μετά την καλλιέργεια τους σε υγρό θρεπτικό μέσο, παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση (>70 %) της αρχικής ποσότητας του DPA σε 4 και 11 καλλιέργειες από τα θρεπτικά μέσα MSM + DPA & MSMN + DPA αντίστοιχα (Διάγραμμα 3.2).

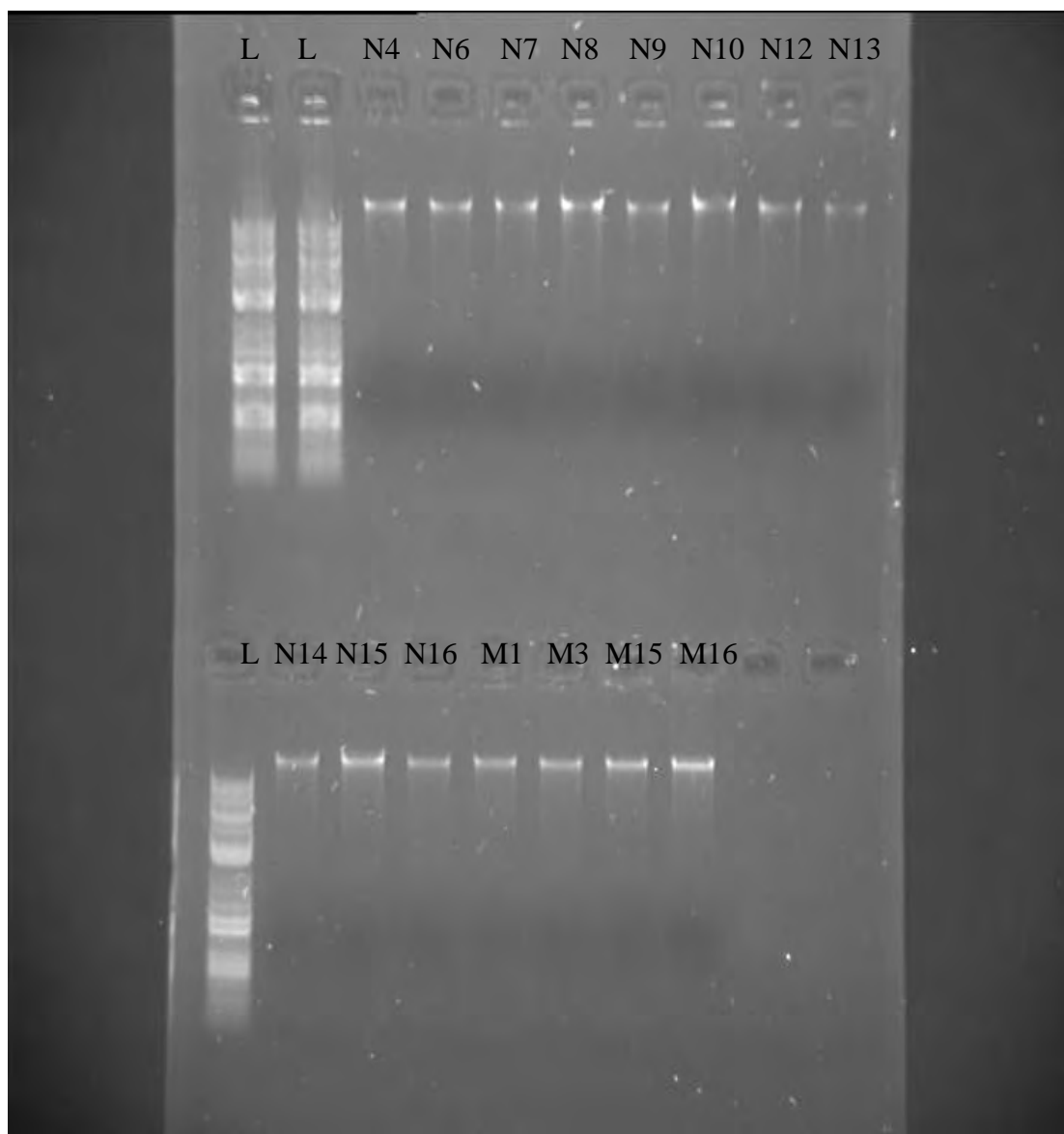


Διάγραμμα 3.2: Η % διάσπαση του DPA στις 33 επιλεγμένες βακτηριακές καλλιέργειες ύστερα από 6 ημέρες καλλιέργειας σε υγρά θρεπτικά μέσα MSM + DPA (20 mg/L) & MSMN + DPA (20 mg/L).

Επίστρωση των αποδομητικών καλλιιεργειών σε στερεό θρεπτικό μέσο LB και παρατήρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν έδειξαν ότι όλες οι καλλιέργειες που είχαν την ικανότητα να αποδομούν το DPA αποτελούνταν από τον ίδιο μορφολογικά τύπο αποικιών (στρογγυλές, λευκές, μικρού μεγέθους) και ήταν αμιγής.

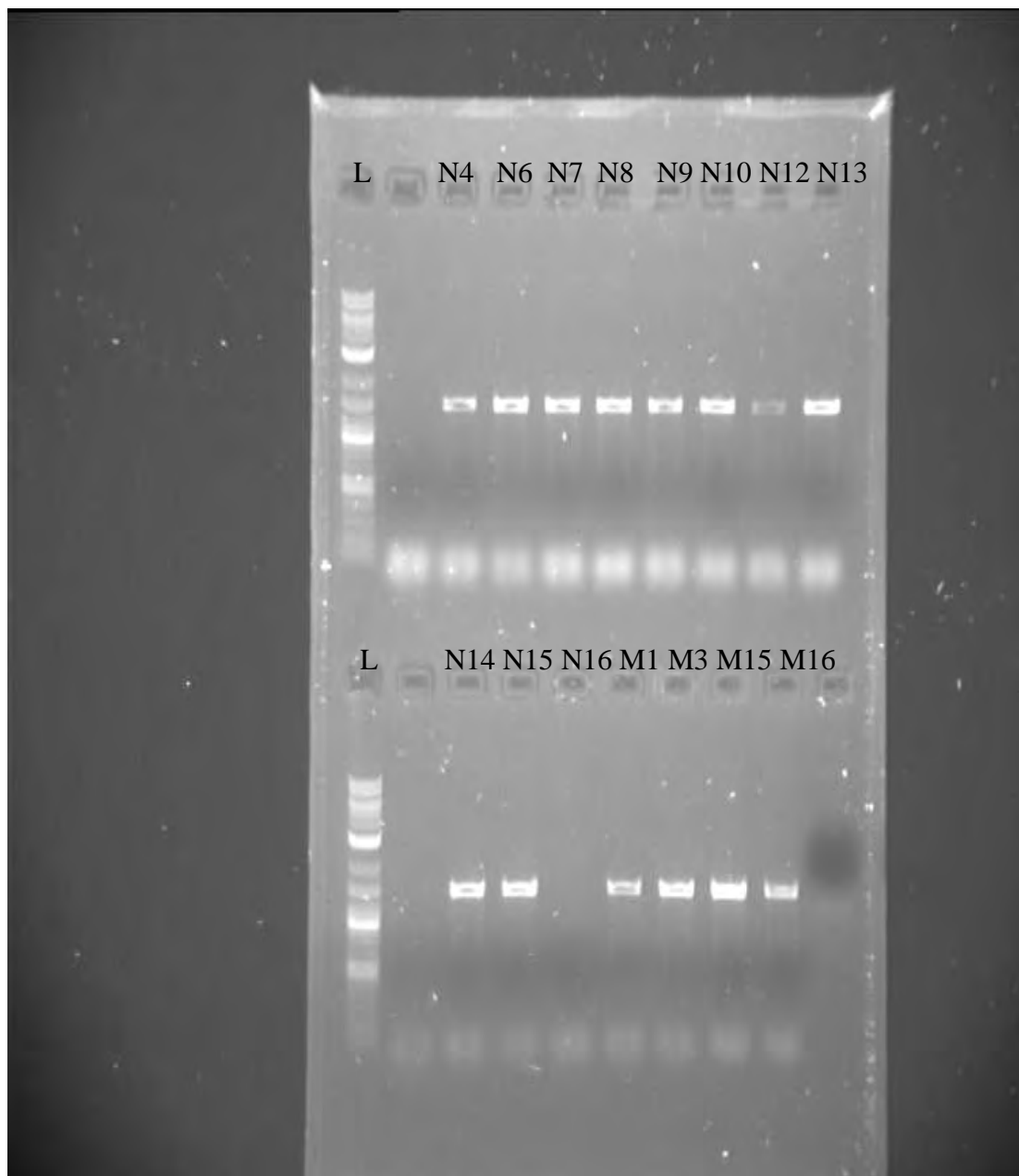
3.3. Ταυτοποίηση των βακτηρίων που αποδομούν το DPA

Από τα στελέχη που διασπούσαν πραγματοποιήθηκε επιτυχής εξαγωγή ολικού DNA (*Εικόνα 3.3.α*).



Εικόνα 3.3.α: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 0,7% δειγμάτων ολικού DNA από βακτήρια τα οποία απομονώθηκαν σε θρεπτικό μέσο MSM (δείγματα M) ή MSMN (δείγματα N). Ladder 10 kb (γραμμή L)

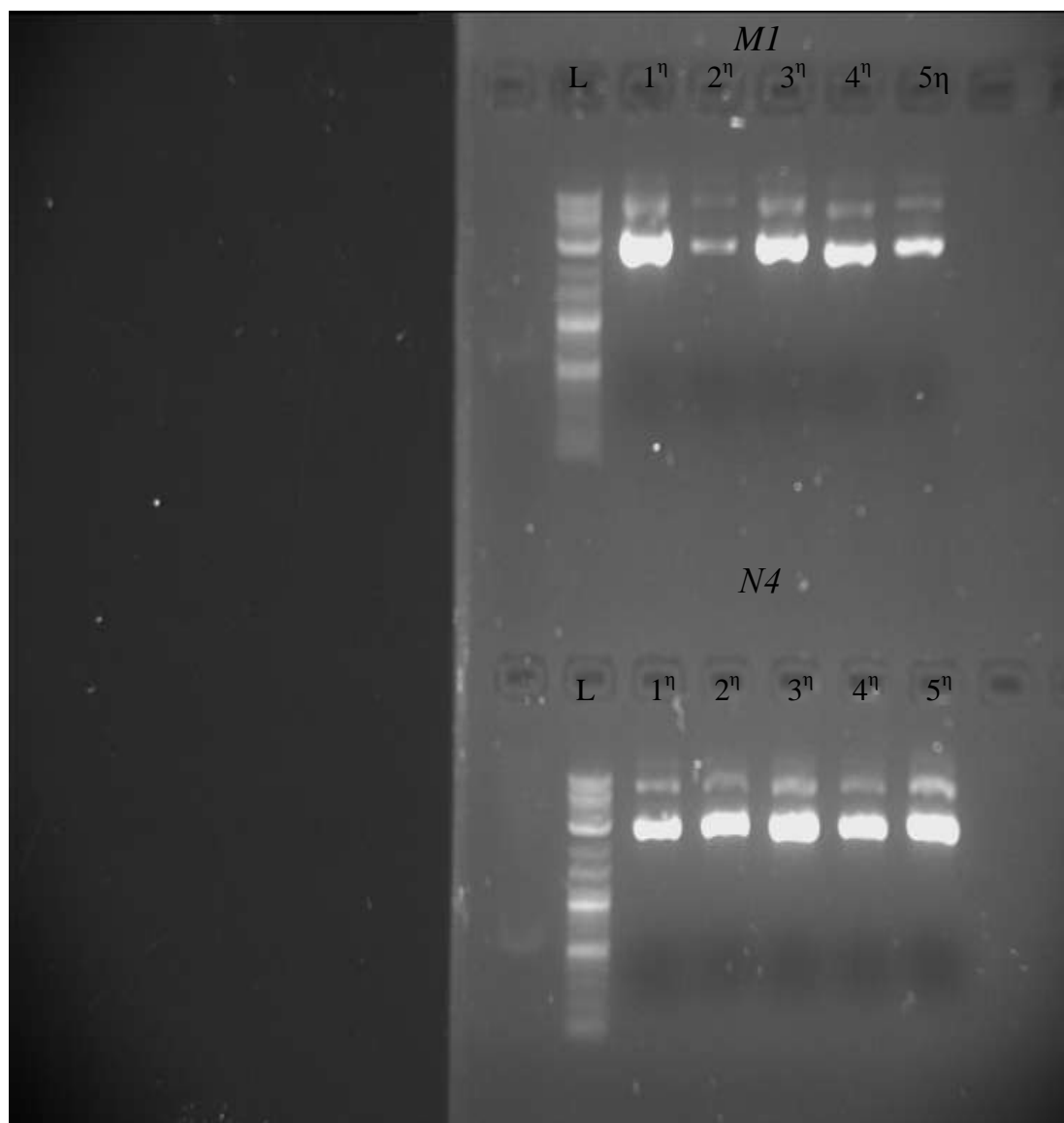
Ακολούθησε PCR για την ενίσχυση του 16S rRNA (1500 bp) γονιδίου των βακτηρίων χρησιμοποιώντας κατάλληλους παγκόσμιους εκκινητές (8f και 1512r) για το συγκεκριμένο γονίδιο. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για επιβεβαίωση της ενίσχυσης του σωστού μεγέθους προϊόντος (*Εικόνα 3.3.β*).



Εικόνα 3.3.β: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% PCR προϊόντων (1.5 kb) που προήλθαν από την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των απομονωθέντων βακτηρίων. Βακτήρια που απομονώθηκαν σε MSM (δείγματα M), βακτήρια που απομονώθηκαν σε MSMN (δείγματα N) και Ladder 10 kb (γραμμή L)

Λόγω της μορφολογικής ομοιότητας που παρουσίαζαν μεταξύ τους οι αποικίες των βακτηρίων που απομονώθηκαν θεωρήθηκε ότι όλες καλλιέργειες αποτελούνταν από το ίδιο βακτηριακό στέλεχος και για τον λόγο αυτό επιλέχθηκαν ένα βακτήριο από κάθε θρεπτικό μέσο (MSM1 και MSMN4) και μελετήθηκαν παραπέρα ως προς την ταυτότητα τους αλλά και ως προς την κινητική διάσπασης τους DPA. Περαιτέρω επιβεβαίωση της αμιγότητας των αποδομητικών βακτηριακών καλλιεργειών επιτεύχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) η οποία όμως δεν αποτέλεσε μέρος της παρούσας εργασίας και πραγματοποιήθηκε από την υποψήφια διδάκτορα Chiara Perruchon στα πλαίσια της διδακτορικής της διατριβής.

Για τα επιλεγέντα βακτήρια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων PCR, ένθεση σε πλασμιδιακό φορέα pGEM και μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα DH5A *E. coli*. Ακολούθησε επιλογή πέντε αποικιών για κάθε βακτήριο με το κατάλληλο ένθεμα, απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και αλληλούχιση του ενθέματος για ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών που αποδομούν το DPA.



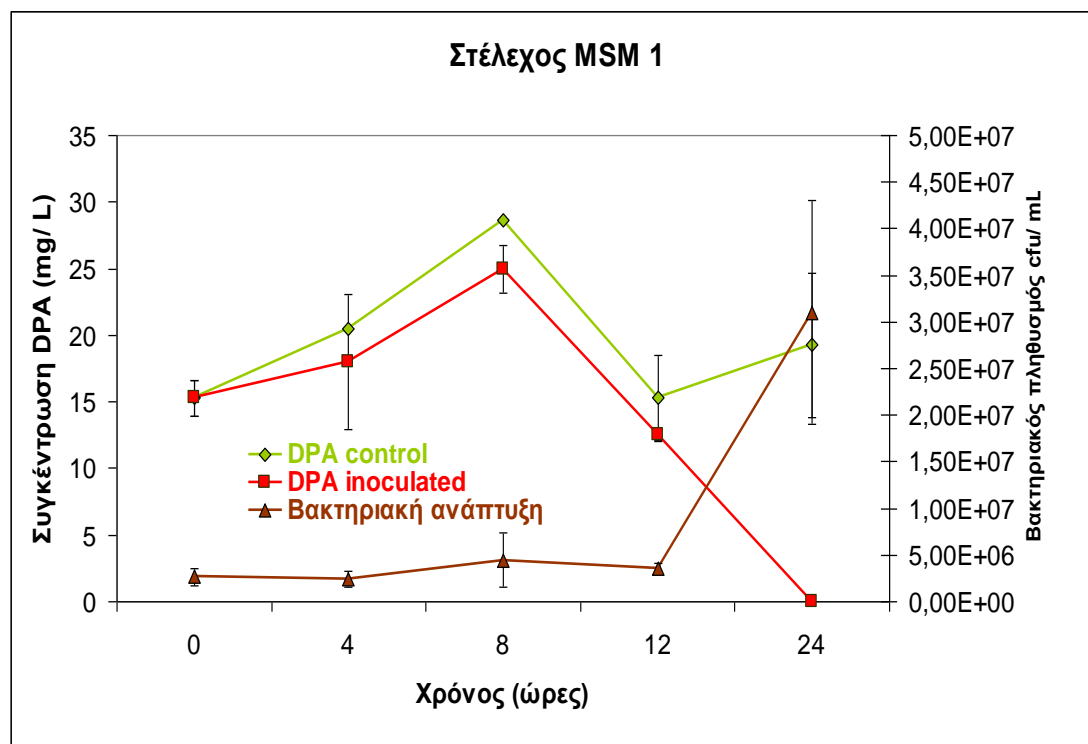
Εικόνα 3.3.γ: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την εξαγωγή πλασμιδίων από τις πέντε επιλεγμένες αποικίες με το κατάλληλο ένθεμα για καθένα από τα δύο στελέχη MSM1 και MSMN4.

Ανάλυση των αλληλουχιών των ενθεμάτων από τους πέντε κλώνους που απεστάλησαν για αλληλούχιση έδειξαν την ύπαρξη σημειακών μεταλλαγών σε δύο θέσεις οι οποίες αποδίδονται στην ύπαρξη διαφορών στις αλληλουχίες των αντιγράφων του γονιδίου 16S rRNA που κατέχει το ίδιο βακτήριο. Το παραπάνω επιβεβαιώθηκε και από την εμφάνιση τριών ζωνών στο μοριακό αποτύπωμα των συγκεκριμένων βακτηρίων στο πήκτωμα DGGE.

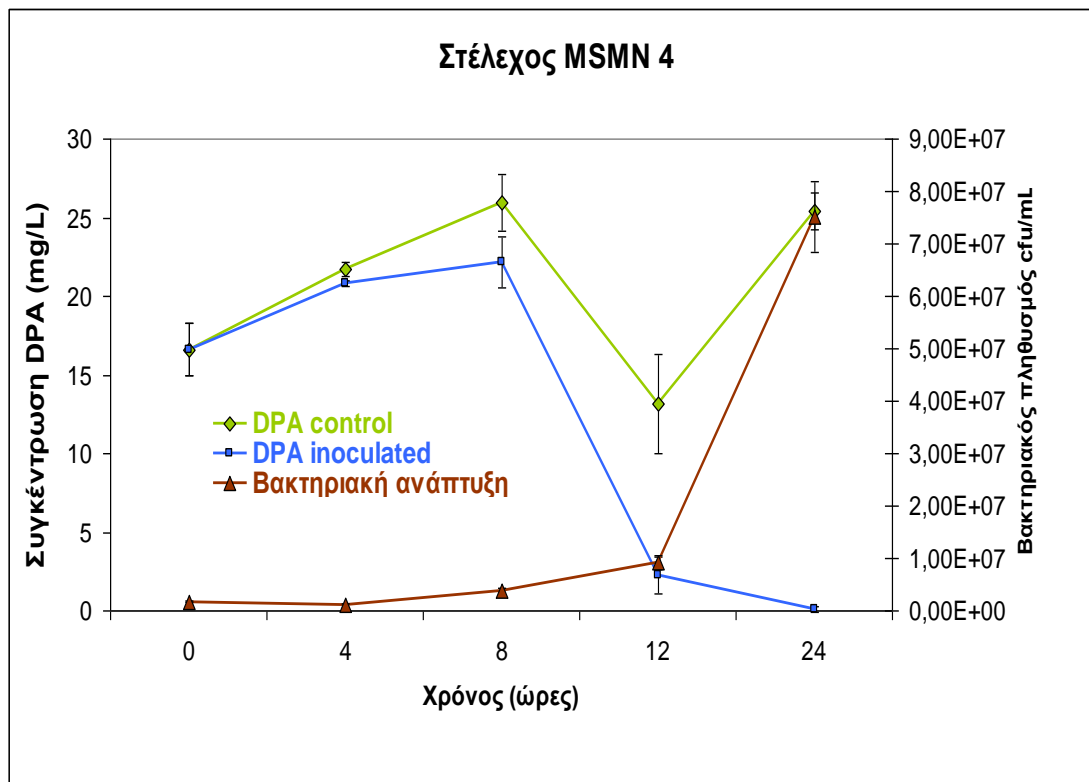
Παρόλα αυτά, ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του 16S rRNA των βακτηρίων που αποδομούσαν το DPA και ομοπαράθεση τους στη βάση δεδομένων EMBL (BLAST) έδειξε ότι τα δυο στελέχη ανήκουν στο είδος *Pseudomonas putida*. Πιο συγκεκριμένα το στέλεχος MSM1 παρουσίασε υψηλή ομολογία 99.9% (1461/1462 bp) με τα στελέχη *Pseudomonas putida* ND6, *Pseudomonas sp. HY* και *Pseudomonas putida GB-1* και το MSMN4 ομολογία 100% (1462/1462 bp) με τα στελέχη *Pseudomonas putida BIRD-1* και *Pseudomonas putida KT2440*.

3.4. Μελέτη της κινητικής διάσπασης του DPA από τα στελέχη *P. putida* MSM1 και *P. putida* MSMN4

Η πυκνότητα του μικροβιακού εμβολίου που προστέθηκε στις νέες καλλιέργειες για το στέλεχος MSM1 ήταν $2,6 \times 10^6$ cfu/ml και για το στέλεχος MSMN4 ήταν $1,7 \times 10^6$ cfu/ml. Και για τα δυο στελέχη η αποδόμηση του DPA είχε ολοκληρωθεί εντός 24 ωρών. Όσον αφορά τους μάρτυρες στο διάστημα αυτό δεν παρουσιάστηκε σημαντική μείωση της αρχικής ποσότητας DPA και στα δυο θρεπτικά μέσα καταδεικνύοντας τον μικροβιακό ρόλο στην αποδόμηση του DPA.



Διάγραμμα 3.4.α: Η αποδόμηση του DPA σε θρεπτικό μέσο MSM που εμβολιάστηκε με το στέλεχος MSM1 καθώς και σε καλλιέργεια μάρτυρα που δεν εμβολιάστηκε. Παράλληλα μετρήθηκε και η βακτηριακή βιομάζα κατά την διάρκεια της αποδόμησης του DPA από το στέλεχος MSM1



Διάγραμμα 3.4.β: Η αποδόμηση του DPA σε θρεπτικό μέσο MSMN που εμβολιάστηκε με το στέλεχος MSMN4 καθώς και σε καλλιέργεια μάρτυρα που δεν εμβολιάστηκε. Παράλληλα μετρήθηκε και η βακτηριακή βιομάζα κατά την διάρκεια της αποδόμησης του DPA από το στέλεχος MSMN4

Κατά την διάρκεια της αποδόμησης του DPA από τα δύο βακτηριακά στελέχη παρατηρήθηκε μια στοιχειομετρική αύξηση του πληθυσμού των δύο βακτηρίων στις 12 ώρες όπου και παρατηρήθηκε και η μέγιστη διάσπαση του DPA. Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν έχουν την ικανότητα να διασπούν το DPA και να το χρησιμοποιούν αποτελεσματικά ως πηγή C ή ως πηγή C και N.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας απομονώθηκαν αρχικά 15 βακτηριακά στελέχη που είχαν την ικανότητα να διασπών πλήρως και ταχύτατα το αντιοξειδωτικό DPA. Έντεκα από αυτά τα στελέχη χρησιμοποιούσαν το DPA ως πηγή C και 4 από αυτά ως πηγή C και N. Περαιτέρω μελέτες τόσο σε επίπεδο μορφολογικό όσο και σε μοριακό έδειξαν ότι όλα τα βακτήρια που απομονώθηκαν από το εκλεκτικό υπόστρωμα MSM ήταν πανομοιότυπα και το ίδιο ίσχυε για όλα τα βακτήρια που απομονώθηκαν από το εκλεκτικό υπόστρωμα MSMN. Έτσι στην συνέχεια επιλέχθηκε να μελετηθούν ένα στέλεχος από κάθε υπόστρωμα. Ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου έδειξε ότι τα δύο αυτά βακτηριακά στελέχη ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* και ειδικότερα στο είδος *P. putida*. Βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* είναι κατ' εξοχήν κυρίαρχα στο εδαφικό περιβάλλον και υπεύθυνα για την αποδόμηση πλήθους γεωργικών φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων των οργανοφωσφορικών ethoprophos, methyl parathion, dimethoate, isofenphos και monocrotophos [27] αλλά και ποικίλων διφαινυλικών οργανικών ρυπαντών [28, 29, 30, 31]. Ειδικότερα βακτήρια του είδους *P. putida* έχουν αναφερθεί να εμπλέκονται στη διάσπαση διαφόρων οργανικών ρύπων όπως p-nitrophenol [32], chlorpyrifos [33], chlorpyrifos και pentachlorophenol [34], ethoprophos [35], glyphosate [36] και paraoxon [37].

Όσον αφορά τη μικροβιακή διάσπαση του DPA υπάρχουν ελάχιστες αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία. Αρχικά οι Gardner et al. (1982) έδειξαν ότι το DPA διασπάται ταχύτατα από τους μικροοργανισμούς που περιέχονται σε ενεργοποιημένη λάσπη χωρίς όμως να παρέχουν πληροφορίες για την ταυτότητα των αποδομητικών μικροοργανισμών. Ακολούθως οι Christodoulatos et al. (1997) παρατήρησαν μικροβιακή διάσπαση του DPA από μεικτές και αμιγής καλλιέργειες βακτηρίων των ειδών *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas resinovorans*. Πιο πρόσφατες μελέτες από τους Shin & Spain, (2009) οδήγησαν στην απομόνωση δύο βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν ως *Burkholderia* sp. και *Ralstonia* sp. τα οποία είχαν την ικανότητα να διασπών ταχύτατα το DPA και να το χρησιμοποιούν ως πηγή C και N για την αύξηση και ανάπτυξη τους. Στην ίδια μελέτη προσδιορίστηκε πλήρως το μεταβολικό μονοπάτι του DPA από τα δύο βακτήρια καθώς και τα γονίδια που εμπλέκονται στην αποδόμηση της συγκεκριμένης ουσίας. Έτσι το DPA μετατρέπεται αρχικά σε ανιλίνη και κατεχόλη τα οποία στην συνέχεια διασπώνται πλήρως σύμφωνα με τα ήδη αναγνωρισμένα μονοπάτια μεταβολισμού των δύο αυτών αρωματικών μορίων προς πυρουβικό οξύ και ακεταλδεύδη τα οποία εισέρχονται στον αναβολισμό των βακτηρίων για παραγωγή ενέργειας.

Η παρούσα εργασία αποτελεί ουσιαστικά την δεύτερη αναφορά απομόνωσης και χαρακτηρισμού βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να διασπών ταχύτατα το DPA. Και τα δυο στελέχη (MSM1 & MSMN4) που μελετήθηκαν περισσότερο είχαν την ικανότητα να χρησιμοποιούν το DPA ως πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους και ταυτόχρονα αποδομούσαν συγκέντρωση 20 mg/L DPA εντός 24 ωρών. Αξίζει να αναφερθεί πως κατά την διάρκεια του πειράματος μελέτης της κινητικής διάσπασης του DPA από το στέλεχος MSM1 παρατηρήθηκε ελαφρώς ροζ χρωματισμός του θρεπτικού μέσου στις 12 ώρες μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 4.1)

πράγμα το οποίο πιθανότατα οφείλεται στον σχηματισμό ανιλίνης στο θρεπτικό μέσο [38] σε συμφωνία με το μονοπάτι μεταβολισμού που προτείνουν οι Shin & Sprain[26].



Εικόνα 4.1: Φωτογραφία από τις φλάσκες που περιέχουν καλλιέργειες του στελέχους MSM1 και μη εμβολιασμένες φλάσκες μάρτυρες (CONTR) κατά το πείραμα της κινητικής διάσπασης του DPA όπου και φαίνεται ο ροζ χρωματισμός του θρεπτικού μέσου στις φλάσκες που έχουν εμβολιαστεί με το βακτηριακό στέλεχος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Συνολικά η παρούσα εργασία οδήγησε στην απομόνωση 15 βακτηριακών στελεχών από έδαφος που είχε χρόνια επιβάρυνση με υγρά απόβλητα από συσκευαστήρια που περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις του αντιοξειδωτικού DPA. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν με μοριακές τεχνικές ως στελέχη του είδους *Pseudomonas putida* και τα οποία είχαν την ικανότητα να αποδομούν ταχύτατα το DPA και να το χρησιμοποιούν ως πηγή C ή ως πηγή C και N. Περαιτέρω μελέτες στο εργαστήριο θα στοχεύσουν:

- i. Στον χαρακτηρισμό του μεταβολικού μονοπατιού του DPA από τα απομονωθέντα βακτήρια με συνδυασμό μοριακών και αναλυτικών τεχνικών
- ii. Στην λειτουργική ανάλυση των γονιδίων/ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση του DPA από τα συγκεκριμένα βακτήρια με την χρήση γονιδιωματικής και πρωτεομικής ανάλυσης
- iii. Στην αξιολόγηση της αποδομητικής ικανότητας των συγκεκριμένων βακτηρίων σε υψηλές συγκεντρώσεις του DPA που προσομοιάζουν πραγματικές συνθήκες στα συσκευαστήρια.
- iv. Στην ανάπτυξη μικροβιακών εμβολίων που θα βασίζονται στα συγκεκριμένα αποδομητικά βακτήρια και τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων κάτι που δεν έχει δοκιμαστεί μέχρι σήμερα και κρίνεται απολύτως απαραίτητο λόγω της υψηλής τοξικότητας της διφαινυλαμίνης στους υδρόβιους οργανισμούς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Siegrist, H., McCarty PL., 1987. Column methodologies for determining sorption and biotransformation potential of chlorinated aliphatic compounds in aquifers. *Journal of Contaminant Hydrology* 2: 31-50.
2. Martin, A., 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 29: 2713-2717.
3. Food and Agriculture Organization (FAO) 1996. Control of water pollution from agriculture, Issued in Rome. FAO Irrigation and drainage paper 55 : 37-51.
4. European Commission (E.C) 2010. Draft Review report for the active substance imazalil finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 9 July 2010 in view of the renewal of inclusion of Imazalil in Annex I of Directive 91/414/EEC. SANCO/11318/2010 rev.2.
5. European Food Safety Authority (EFSA) 2008. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance diphenylamine, Issued on 30 September 2008. EFSA Scientific Report 188: 1-60.
6. Garcia Portillo, M., Avino, ES., Vicente, J.O., De Andres, R.L., Jimenez, MdlAS., Blanco JPL (2004) Purification system for wastewater coming from fruit and vegetable processing plants and phytosanitary treatments in the field. United States Patent, US 6,709,585 B1, p 9.
7. European Union (2000) Opinion of the scientific committee on plants regarding the evaluation of thiabendazole in the context of council directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market-The Scientific Committee on Plants, SCP/THIABEN/002-Final, p 7
8. Flaim, G.M., Toller, G., 1989. Treatment of postharvest pesticide residues. *Agricultural Ecosystem and Environment* 27: 505-511.
9. Castillo, L.E., Reupert, C., Solis, F., 2000. Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the North Atlantic Zone of Costa Rica. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:1942-1950.
10. Lunt, D., Evans, W.C., 1970. The microbial metabolism of biphenyl. *Biochemistry Journal* 118: 54-55.
11. European Food Safety Authority (EFSA) 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance diphenylamine. *EFSA Journal* 10: 2486.
12. United States Environmental Protection Agency (USEPA) 1998. Reregistration Eligibility Decision for Diphenylamine, Issued on April 1998. EPA-738-F-97-010.
13. Kaiser, K.L.E., Ribo, J.M., 1988. *Photobacterium phosphoreum* toxicity bioassay. II. Toxicity data compilation. *Toxicity Assessment* 3: 195–237.
14. Drzyzga, O., Janssen, S., Blotvogel, K.H., 1995. Toxicity of diphenylamine and some of its nitrated and aminated derivatives to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Ecotoxicology and Environment Safety* 31: 149–152.

15. Drzyzga, O., 2003. Diphenylamine and derivatives in the environment: a review. *Chemosphere* 53: 809-818.
16. European Commission (EC) 2008. Risk Assessment Report on Diphenylamine, Human Health Part. CAS No.: 122-39-4 EINECS No.: 204-539-4.
17. Alexander, W.E., Ryan, A.J., Wright, S.E., 1965. Metabolism of diphenylamine in rat, rabbit, and man. *Food Cosmetology and Toxicology* 3: 571-579.
18. Gutenmann, W. H., and Lisk, D. J., 1975. A feeding study with diphenylamine in a dairy cow. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 13: 177-180.
19. Liu, D.D.W. 1993a. Aerobic soil metabolism of 14C-ringdiphenylamine. Project XBL 92082. Report RPT00139. XenoBiotic Labs, Inc., USA. Unpublished. Issued in European Union Risk Assessment Report for diphenylamine, printed in Italy on May 2008. CAS No. 122-39-4.
20. Reynolds, J.L. 1994. Adsorption and desorption of 14Cring- diphenylamine in four soils and one sediment. Study 92086. Report RPT00163XenoBiotic Labs, Inc., USA. Unpublished. Issued in European Union Risk Assessment Report for diphenylamine, printed in Italy on May 2008. CAS No. 122-39-4.
21. Kammerer, R.C. 1994. Aged leaching of 14C-ringdiphenylamine in four soils. Study XBL94011. Report RPT00184. XenoBiotic Labs, Inc., USA. Unpublished. Issued in European Union Risk Assessment Report for diphenylamine, printed in Italy on May 2008. CAS No. 122-39-4.
22. Baur, L. 1993. Hydrolysis of 14C-ring-diphenylamine in water at pH 5, 7, and 9. Project . XBL 92084: RPT00119. XenoBiotic Labs, Inc. USA. Unpublished. Issued in European Union Risk Assessment Report for diphenylamine, printed in Italy on May 2008. CAS No. 122-39-4.
23. Baur, L. and Robinson, R. 1993. Aqueous photolysis of 14C-ring-diphenylamine. Project XBL 92087, RPT00123. XenoBiotic Laboratories, Inc. USA. Unpublished. Issued in European Union Risk Assessment Report for diphenylamine, printed in Italy on May 2008. CAS No. 122-39-4.
24. Liu, D.D.W. 1993b. Anaerobic aquatic metabolism of 14C-ring-diphenylamine. Study 92083. Report RPT00140. XenoBiotic Labs, Inc., USA. Unpublished. Issued in European Union Risk Assessment Report for diphenylamine, printed in Italy on May 2008. CAS No. 122-39-4
25. Christodoulatos, C., Koutsospyros, A., Brodman, B., Korfiatis, G., 1997. Biodegradation of diphenylamine by selected microbial cultures. *Journal of Environmental Science and Health . Environmental Science and Engineering and Toxicology* 32: 15-30.
26. Shin, K., Spain, J. C., 2009. Pathway and Evolutionary Implications of Diphenylamine Biodegradation by *Burkholderia sp.* Strain JS667. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2694-2704.
27. Karpouzias, D.G. & Singh, B.K., 2006. Phosphorus containing xenobiotics: microbial degradation, metabolic pathways and molecular basis. *Advances in microbial physiology* 51: 119-186.
28. Hayase, N., Taira, K., Furukawa, K., 1990. *Pseudomonas putida* KF715 bphABCD operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation: cloning, analysis, and expression in soil bacteria. *Journal of Bacteriology* 172: 1160-1164.

29. Higson, F.K., Focht, D.D., 1989. Degradation of 2-bromobenzoic acid by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1615-1619.
30. Kimbara, K., 1989. Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas sp.* strain KKS102. *Journal of Bacteriology*, 171: 2740-2747
31. Catelani, D., Colombi, A., Sorlini, C., Treccani, V., 1973. Metabolism of biphenyl. 2-Hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate: the meta-cleavage product from 2,3-dihydroxybiphenyl by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry Journal* 134: 1063–1066.
32. Kulkarni, M., Chaudhari, A., 2006. Efficient *Pseudomonas putida* for degradation of p-nitrophenol. *Indian Journal of Biotechnology* 5: 411-415.
33. Ajaz, M., Jabeen, N., Ali, T.A., Rasool, S.A., 2009. Split role of plasmid genes in the degradation of chlorpyrifos by indigenously isolated *Pseudomonas putida* MAS-1. *Pakistan Journal of Botany*, 41: 2055-2060.
34. Arunachalam, C., Velmurugan, A.M., 2010. Assessment And Optimization Of Pesticide Degradation By *Pseudomonas Putida*. *Current Research Papers*. http://tradescienceinc.com/index.php?option=com_content&view=article&id=3458:vol-5-issue-1-2010-05&catid=377:vol-5-issue-1&Itemid=478
35. Karpouzias, D.G., Walker, A., 2000. Aspects of the enhanced biodegradation and metabolism of ethoprophos in soil. *Pest Management Science* 56: 540-548.
36. Kolawole, O.A., Akinsoji, A.O., 2011. Biodegradation of glyphosate pesticide by bacteria isolated from agricultural Soil. www.sciencepub.net
37. Iyer, B., Iken, B., Tamez, T., 2011. Isolation, Molecular and biochemical identification of paraoxon – metabolizing *Pseudomonas* species. *Journal of Bioremediation and biodegradation*. <http://www.omicsonline.org/2155-6199/2155-6199-2-132.digital/2155-6199-2-132.html>
38. Walker, A., 1987. Enhanced degradation of iprodione and vinclozolin ins soil: A simple colorimetric test for identification of rapid-degrading soils. *Pesticide Science* 21: 233-240.