

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της αποτοξικοποίησης χλωριωμένων οργανικών ρύπων
με μυκητιακούς βιοκαταλύτες θαλάσσιας προέλευσης**



Αγραφιώτης Ανδρέας

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος, επίκουρος καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2017

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της αποτοξικοποίησης χλωριωμένων οργανικών ρύπων
με μυκητιακούς βιοκαταλύτες θαλάσσιας προέλευσης**



Αγραφιώτης Ανδρέας

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος, επίκουρος καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2017

Αφιερωμένη στον αδερφό μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που συνέβαλλαν ουσιαστικά, άμεσα ή έμμεσα, στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή του Ε.Μ.Π κύριο Ευάγγελο Τόπακα, επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Η καθοδήγησή του καθ' όλη την εκπόνηση της διπλωματικής ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη και ένα παράδειγμα προς μίμηση για οποιονδήποτε υπεύθυνο ακαδημαϊκό. Η παροιμιώδης εμπιστοσύνη την οποία επέδειξε προς το πρόσωπό μου αποτέλεσε για μένα πηγή έμπνευσης και εντατικοποίησης των προσπαθειών μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα του Ε.Μ.Π Ευστράτιο Νικολάιβιτς. Η άσπογη συνεργασία μας καθώς και η συνεχής υποστήριξή του ήταν καταλυτικής σημασίας για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Τον ευχαριστώ για το σύνολο των γνώσεων που μου μετέδωσε και το ειλικρινές ενδιαφέρον του για την πρόοδο και τη βελτίωσή μου πάνω στο συγκεκριμένο θέμα. Οι λέξεις είναι φτωχές προκειμένου να εκφράσουν τις ευχαριστίες μου προς το πρόσωπό του, μιας και ήταν πάντα διαθέσιμος να μου προσφέρει τις γνώσεις, την επιστημονική του εμπειρία και την βοήθειά του.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας. Το υπέροχο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν τόσο σε φιλικό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο συντέλεσε στην ομαλή ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και το κοντινό φιλικό μου περιβάλλον για την συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του δυναμικού θαλάσσια προερχόμενων μυκήτων για αποικοδόμηση του 2,4,5-τριχλωροδιφαινύλιου (PCB 29) και της 2,4-διχλωροφαινόλης (2,4-dCP). Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια διαλεύκανσης του μηχανισμού με τον οποίο οι μύκητες αυτοί βιομετατρέπουν τους ρύπους με βάση τους μεταβολίτες που παράγουν καθώς και με τον προσδιορισμό των ενζυμικών ενεργοτήτων που εκφράζουν. Τέλος, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ενός ενζύμου που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της 2,4-dCP.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε διαλογή για την ανάδειξη των αποτελεσματικότερων μικροοργανισμών ως προς την αποικοδόμηση του PCB 29 και της 2,4-dCP σε αντιδράσεις «κυττάρων σε ηρεμία» αρχικής συγκέντρωσης ρύπου 0,97 μM και 1 mM αντίστοιχα. Σε 11 από τα 44 στελέχη που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε μείωση της αρχικής συγκέντρωσης του PCB 29 μεγαλύτερη του 90%, ενώ 5 στελέχη κατάφεραν μείωση της συγκέντρωσης της 2,4-dCP μεγαλύτερη του 50% ύστερα από 10 ημέρες.

Ακολούθησαν μελέτες με τους αποδοτικότερους μικροοργανισμούς για την διαλεύκανση του μηχανισμού με τον οποίο αυτοί βιομετατρέπουν την 2,4-dCP με βάση τους μεταβολίτες που παράγουν. Τα διάφορα μεταβολικά προϊόντα που ανιχνεύτηκαν από την αποικοδόμηση της 2,4-dCP περιλαμβάνουν τις ενώσεις: υδροξυ-υδροκινόλη, 3,5-διχλωροκατεχόλη, χλωροφαινόλη, τετραϋδροξυβενζόλιο και μαλεϊνικό οξύ. Όλα τα προϊόντα είναι πιο υδρόφιλα ή/και λιγότερο τοξικά από την αρχική ένωση ενώ το μαλεϊνικό οξύ αποτελεί το μόνο προϊόν ανοιχτού δακτυλίου και το οποίο ανιχνεύτηκε μόνο στο στέλεχος MLm-197-S3.

Στη συνέχεια έγιναν δοκιμές προσδιορισμού συγκεκριμένων εξωκυτταρικών ενζυμικών ενεργοτήτων, οι οποίες μπορεί να εμπλέκονται στην βιομετατροπή. Οι ενεργότητες που εξετάστηκαν ήταν οι 1,2 και 2,3-διοξυγενάσες της κατεχόλης (1,2-CD και 2,3-CD) και οι αφαλογονάσες. Στα στελέχη που μελετήθηκαν δεν μπόρεσε να μετρηθεί ενεργότητα αφαλογονασών ενώ προσδιορίστηκε πολύ χαμηλή ενεργότητα 2-3-CD (<0,4 Units/mg πρωτεΐνης). Αντίθετα, η ενεργότητα σε 1,2-CD ήταν πιο υψηλή, με το στέλεχος MLm-197-S3 να επιδεικνύει την υψηλότερη δραστηριότητα (41,7 Units/mg πρωτεΐνης στις 63 ώρες).

Ως εκ τούτου, το στέλεχος MLm-197-S3 επιλέχθηκε για την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα και απομόνωση της εξωκυτταρικής ενεργότητας της 1,2-CD. Ο καθαρισμός του ενζύμου πραγματοποιήθηκε σε ένα στάδιο με στήλη χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής (Q-Sepharose) σε pH 6,0. Η έκλυση της πρωτεΐνης από την στήλη έγινε με διάλυμα 1 M χλωριούχου νατρίου με ποσοστιαία ανάκτηση ενζυμικής ενεργότητας ίση με 70,7% της αρχικής. Τέλος, η ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης σε SDS-PAGE έδειξε ότι η πρωτεΐνη ήταν καθαρή και το μοριακό της βάρος περίπου 73 kDa.

ABSTRACT

The purpose of this diploma thesis was the study of the potential of marine-derived fungi for the biodegradation of 2,4,5-Trichlorobiphenyl (PCB 29) and 2,4-Dichlorophenol (2,4-dCP). In addition, experiments were carried out in order to elucidate the degradation pathway of these pollutants based on the produced metabolites and the expression of enzyme activities. Finally, an enzyme, which participates in the degradation of 2,4-dCP, was purified..

The screening of the fungal strains for the degradation of PCB 29 and 2,4-dCP with initial concentrations of 0,97 μM and 1 mM, respectively, was performed with resting cells reactions. 11 of 44 strains showed more than 90% decrease of the initial concentration of PCB 29, whereas 5 strains managed to transform more than 50% of the initial 2,4-dCP concentration, after 10 days of incubation.

For the strains that showed the best potential in the biodegradation of 2,4-dCP, analysis for the identification of metabolites where carried out. The products that were identified include hydroxyquinol, 3,5-dichlorocatechol, chlorophenol, tetrahydroxybenzene and maleylacetate. All products were more hydrophilic or/and less toxic that the starting compound. Strain MLm-197-S3 was the only one found to open the ring of hydroxyquinol and transform it to maleylacetate.

In addition, enzyme assays where performed for extracellular enzymes that might participate in the degradation pathway of 2,4-dCP. The enzyme activities that were tested included catechol dioxygenase enzymes (1,2-CD and 2,3-CD) and dehalogenases. The strains tested did not show any dehalogenase activity while 2,3-CD activity was very low (<0,4 Units/mg of protein). On the contrary, high of 1,2-CD activity was measured, with strain MLm-197-S3 showing the highest (41,7 Units/mg of protein at 63 hours of incubation).

Thus, strain MLm-197-S3 was selected for the production on a larger scale and the purification of extracellular 1,2-CD enzyme. A single-step purification protocol was used which included a Q-Sepharose column equilibrated with buffer pH 6.0. The protein was eluted from the column with 1 M sodium chloride solution with an enzyme activity recovery equal to 70.7% of the initial. The SDS-PAGE analysis revealed that the enzyme was pure and its molecular weight was approximately 73 kDa.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1 Χλωριωμένες φαινολικές ενώσεις και έμμονοι οργανικοί ρύποι	3
1.1 Οι χλωροφαινολικές ενώσεις και τα παράγωγά τους	4
1.1.1 Ορισμός	4
1.1.2 Τοξικότητα	5
1.1.3 Πηγές	5
1.1.4 Περιβαλλοντική Συμπεριφορά	6
1.1.5 Επιπτώσεις στην υγεία.....	6
1.1.6 Η 2,4-διχλωροφαινόλη	7
1.2 Οι έμμονοι οργανικοί ρύποι	8
1.2.1 Ορισμός	8
1.2.2 Χαρακτηρίζοντας μια ουσία ως έμμονο οργανικό ρύπο	8
1.2.3 Πηγές	10
1.2.4 Περιβαλλοντική Συμπεριφορά	12
1.2.5 Επιπτώσεις στην υγεία.....	15
1.2.6 Τα πολυχλωριομένα διφαινύλια	15
1.3 Αντιμετώπιση των ρύπων και εμπόδια στην εφαρμογή εναλλακτικών λύσεων	17
1.3.1 Αντιμετώπιση	17
1.3.2 Εμπόδια	18
Κεφάλαιο 2 Βιοεξυγίανση.....	19
2.1 Η ανάγκη για βιοεξυγίανση.....	20
2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοεξυγίανση	21
2.3 Η γενετική μηχανική στα χέρια της βιοεξυγίανσης.....	23
2.4 Βιοαποικοδόμηση αλειφατικών και αρωματικών αλογονούχων ενώσεων	24
2.4.1 Διάσπαση του δεσμού άνθρακα-αλογόνου.....	25
2.4.2 Ένζυμα αφαλογόνωσης	27
2.4.3 Ένζυμα διάσπασης των αρωματικών δακτυλίων	27
Κεφάλαιο 3 Οι βιοτεχνολογικές δυνατότητες των μυκήτων	29
3.1 Βιομηχανικές εφαρμογές μυκητιακών βιοκαταλυτών.....	29
3.2 Περιβαλλοντικές εφαρμογές μυκητιακών βιοκαταλυτών	29
3.3 Θαλάσσια προερχόμενοι μύκητες	31

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4 Υλικά και Μέθοδοι.....	35
4.1 Υλικά.....	35
4.1.1 Μικροοργανισμοί	35
4.1.2 Θρεπτικά Μέσα	35
4.1.3 Οργανικοί Ρύποι.....	35
4.1.4 Συσκευές και όργανα- Αναλώσιμα υλικά.....	36
4.2 Καλλιέργειες κυττάρων.....	37
4.2.1 Στερεές καλλιέργειες.....	38
4.2.2 Υγρές καλλιέργειες.....	39
4.3 Διαλογή μικροοργανισμών για τη δυνατότητα αποικοδόμησης των ρύπων	40
4.3.1 Ανάλυση του PCB 29	40
4.3.1.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	41
4.3.2 Ανάλυση της 2,4-dCP.....	42
4.3.3 Μέθοδοςδιαλογής μικροοργανισμών	44
4.4 Μελέτη του μηχανισμού αποικοδόμησης της 2,4-dCP	45
4.4.1 Ταυτοποίηση των μεταβολιτών από την αποικοδόμηση της 2,4-dCP	45
4.4.2 Βιοκαταλυτικές αντιδράσεις αποικοδόμησης της 2,4-dCP	46
4.5 Μέθοδοι επαγωγής και μέτρησης ενζυμικών ενεργοτήτων.....	47
4.5.1 Επαγωγή ενζυμικών ενεργοτήτων 1,2-CD, 2,3-CD και αφαλογονασών με 2,4-dCP	47
4.5.2 Επαγωγή ενζυμικής ενεργότητας 2,3-CD με βενζοϊκό οξύ.....	48
4.5.3 Επαγωγή ενζυμικής ενεργότητας αφαλογονασών με 2-χλωροβουτάνιο και με 2-χλωροπροπάνιο.....	48
4.5.4 Μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων.....	48
4.6 Μέθοδοι προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών	49
4.7 Μέθοδοι εξισορρόπησης πρωτεϊνών σε ρυθμιστικά διαλύματα	50
4.7.1 Εξισορρόπηση με διαπίδυση (dialysis)	50
4.7.2 Εξισορρόπηση με στήλη αφάλατωσης	51
4.8 Παραγωγή και απομόνωση της 1,2-CD.....	52
4.8.1 Παραγωγή της 1,2-CD σε μεγάλη κλίμακα.....	52
4.8.2 Κλασμάτωση της καλλιέργειας	52
4.8.3 Απομόνωση της 1,2-CD με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής.....	53
4.8.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	56

Κεφάλαιο 5 Διαλογή μικροοργανισμών (screening).....	59
5.1 Μελέτη του δυναμικού βιοαποικοδόμησης της 2,4-dCP από τα μυκητιακά στελέχη...	59
5.2 Μελέτη του δυναμικού βιοαποικοδόμησης του PCB από τα μυκητιακά στελέχη.....	61
Κεφάλαιο 6 Μελέτη μηχανισμού βιοαποικοδόμησης του 2,4-dCP.....	65
6.1 Τα προϊόντα του μεταβολισμού της 2,4-dCP	65
Κεφάλαιο 7 Προσδιορισμός ενζυμικών ενεργοτήτων και πρωτεϊνικού περιεχομένου στο εξωκυτταρικό υγρό.....	67
7.1 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας 2,3-CD	67
7.1.1 Επαγωγή με 2,4-dCP	67
7.1.2 Επαγωγή με βενζοϊκό οξύ	68
7.2 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας αφαλογονασών.....	69
7.3 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας 1,2-CD με επαγωγή την 2,4-dCP	69
Κεφάλαιο 8 Απομόνωση της 1,2-CD	73
8.1 Εντοπισμός ενζυμικής ενεργότητας 1,2-CD στο εξωκυτταρικό και στο εσωκυτταρικό υγρό	73
8.2 Επιλογή του pH ρυθμιστικού διαλύματος για την στήλη χρωματογραφίας.....	73
8.3 Υπολογισμός πρωτεϊνικού φορτίου και ενζυμικής ενεργότητας 1,2-CD	74
8.4 Προσδιορισμός της καθαρότητας και του μοριακού βάρους της 1,2-CD με ανάλυση SDS-PAGE.....	76
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
Κεφάλαιο 9 Συμπεράσματα.....	79
9.1 Διαλογή μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση των 2,4-dCP και PCB 29	79
9.2 Μεταβολικά προϊόντα της αποικοδόμησης της 2,4-dCP.....	81
9.3 Μηχανισμός διάσπασης της 2,4-dCP	82
9.4 Ενζυμικές Ενεργότητες	83
9.4.1 Ενζυμική ενεργότητα αφαλογονασών	83
9.4.2 Ενζυμική ενεργότητα 2,3-CD.....	83
9.5 Απομόνωση 1,2-CD	84
9.6 Προσδιορισμός του μοριακού βάρους του ενζύμου	85
Κεφάλαιο 10 Προτάσεις για το μέλλον.....	87

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1 Χλωριωμένες φαινολικές ενώσεις και έμμονοι οργανικοί ρύποι

Σε παγκόσμιο επίπεδο υπάρχουν ήδη πάνω από 100.000 χημικά προϊόντα στην αγορά (Muir & Howard, 2006) τα οποία και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης ζωής του ανθρώπου. Η επανάσταση των χημικών προϊόντων συνέβαλε σε μεγάλο βαθμό στην ανθρώπινη ευημερία. Οι χημικές ουσίες έχουν αυξήσει τις γεωργικές αποδόσεις μέσω της προστασίας των καλλιεργειών από παράσιτα και έντομα, και έχουν καταστήσει δυνατή τη δημιουργία μιας ατελείωτης σειράς χρήσιμων προς τον άνθρωπο προϊόντων.

Παρόλα αυτά, τα τελευταία 50 χρόνια οι άνθρωποι ζουν ως ανυποψίαστοι παρατηρητές αλλά και συμμετέχοντες σε ένα τεράστιο, ανεξέλεγκτο και παγκόσμιο χημικό πείραμα που εμπλέκει τους ωκεανούς, τον αέρα, τα εδάφη, τα φυτά, τα ζώα και τα ανθρώπινα όντα. Σήμερα, πολλές χημικές ουσίες μπορούν να εντοπιστούν σχεδόν παντού στη φύση, συμπεριλαμβανομένων των ιστών κάθε ανθρώπινου όντος στη Γη. Πολλές από αυτές τις ουσίες είναι ακίνδυνες, ή τουλάχιστον θεωρούνται μέχρι τώρα. Άλλες ωστόσο, μπορεί να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον και στον άνθρωπο, επιπτώσεις που δεν είχαν ποτέ προβλεφθεί ή επιδιωχθεί (UNEP, 2010).

Από τη δεκαετία του 1960, μετά τη δημοσίευση του βιβλίου 'Silent Spring' της Rachel Carson¹, αυξανόμενες επιστημονικές έρευνες έχουν δείξει τους κινδύνους που απορρέουν από ορισμένες χημικές ουσίες (O'Sullivan & Megson, 2013). Το Περιβαλλοντικό Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών (UNEP, United Nations Environmental Programme) αναγνώρισε ορισμένες από αυτές τις χημικές ουσίες ως ουσίες που προκαλούν πολύ μεγάλη ανησυχία (SVHC, substance of very high concern) και τις χαρακτηρίζει ως ανθεκτικές, βιοσυσσωρεύσιμες και τοξικές (PBT, persistent, bioaccumulative, and toxic). Οι χημικές ουσίες που ταξινομούνται ως PBT δεν διασπώνται εύκολα στο περιβάλλον, συσσωρεύονται στους ιστούς οργανισμών και είναι τοξικές. Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των ρύπων απαρτίζεται από οργανικές αλογονούχες ενώσεις όπως οι χλωροφαινόλες. Οι έμμονοι οργανικοί ρύποι (POPs,

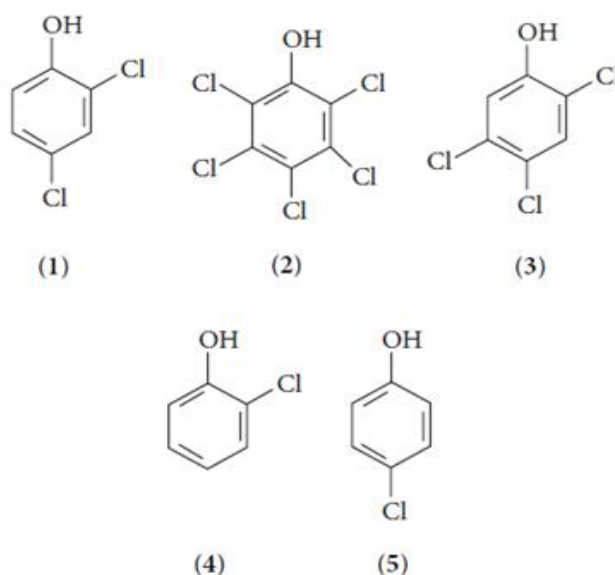
¹ Το Silent Spring είναι ένα βιβλίο περιβαλλοντικής επιστήμης από την Rachel Carson (Dorothy, 2010). Το βιβλίο δημοσιεύτηκε στις 27 Σεπτεμβρίου 1962 και τεκμηρίωσε τις επιζήμιες επιπτώσεις στο περιβάλλον της ακατάπαυστης χρήσης φυτοφαρμάκων. Η Carson κατηγορήσε τη χημική βιομηχανία για παραπληροφόρηση και τους δημόσιους φορείς για την αποδοχή των ισχυρισμών της βιομηχανίας χωρίς αμφιβολία. Το 2006, το Silent Spring ψηφίστηκε ως ένα από τα 25 μεγαλύτερα επιστημονικά βιβλία όλων των εποχών από τους εκδότες του περιοδικού Discover (Mullis, 2006).

persistent organic pollutants) αποτελούν ένα υποσύνολο της κατηγορίας PBT, ενώ άλλες ουσίες που κατηγοριοποιούνται σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνουν ιχνοστοιχεία και οργανομεταλλικές ενώσεις (O'Sullivan & Megson, 2013).

1.1 Οι χλωροφαινολικές ενώσεις και τα παράγωγά τους

1.1.1 Ορισμός

Η φαινόλη είναι μια αρωματική οργανική ένωση που προέρχεται από το βενζόλιο, τον απλούστερο αρωματικό υδρογονάνθρακα, με την προσθήκη μιας υδροξυλομάδας σε έναν άνθρακα αντί για ένα υδρογόνο. Οι χλωροφαινόλες είναι φαινόλες οι οποίες περιέχουν επιπροσθέτως μόρια χλωρίου (από ένα έως πέντε). Υπάρχουν πέντε βασικοί τύποι χλωροφαινολών: μονο-, δι-, τρι-, τετρα- και πενταχλωροφαινόλες. Συνολικά, υπάρχουν 19 διαφορετικές χλωροφαινόλες αν ληφθούν υπόψιν τα διάφορα ισομερή. Στην εικόνα 1.1 παρουσιάζονται οι σημαντικότερες εμπορικά διαθέσιμες χλωροφαινόλες. Οι χλωροφαινόλες τείνουν να είναι πολύ πιο ανθεκτικές, τοξικές και βιοσυσσωρευσιμες από τις μη χλωριωμένες φαινόλες (Murray & Wong, 1999).



Εικόνα 1.1 Οι σημαντικότερες εμπορικά διαθέσιμες χλωροφαινόλες: 2,4-διχλωροφαινόλη (2,4-DCP) (1), πενταχλωροφαινόλη (PCP) (2), 2,4,5-τριχλωροφαινόλη (2,4,5-TCP) (3), 2-χλωροφαινόλη (2-CP) (4), and 4-χλωροφαινόλη (4-CP) (5)(Ighinosa et al., 2013)

1.1.2 Τοξικότητα

Οι περισσότερες φαινόλες, μεταξύ αυτών και οι χλωροφαινόλες, χαρακτηρίζονται από υψηλή τοξική δραστηριότητα. Τοξικότητα εμφανίζουν επίσης και διάφορα παράγωγα των χλωροφαινολών, όπως οι χλωροκατεχόλες (Michałowicz & Duda, 2007; Schweigert, Zehnder, & Eggen, 2001). Η τοξική επίδραση των οργανικών ενώσεων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η ικανότητα διάχυσης της ένωσης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει τη διάχυση είναι ο υδρόφοβος χαρακτήρας της ένωσης. Όσο πιο υδρόφοβη είναι μια ένωση, τόσο αποτελεσματικότερη είναι η διείσδυση της φαινόλης στη μεμβράνη και τόσο πιο ισχυρή η τοξικότητα της (Michałowicz & Duda, 2007; Moridani, Siraki, Chevaldina, Scobie, & O'Brien, 2004).

Ο βασικός παράγοντας που καθορίζει την τοξικότητα μίας φαινόλης είναι η δραστικότητα της ένωσης με τα βιομόρια ενός κυττάρου. Η δραστικότητα αυτή σχετίζεται με την ευκολία αποβολής ελεύθερων ηλεκτρονίων από τις φαινόλες οξειδωμένων υποστρωμάτων. Οι αντιδράσεις ενός ηλεκτρονίου στα κύτταρα συνήθως καταλύονται από οξειδωτικά ένζυμα όπως οι υπεροξειδάσες (peroxidases) που υπάρχουν στο ήπαρ, τους πνεύμονες και σε άλλα όργανα, τις προσταγλανδίνες (prostaglandins) και τις μυελοϋπεροξειδάσες (myeloperoxidases) που περιέχονται στο μυελό των οστών. Το αποτέλεσμα της δράσης τους είναι ο σχηματισμός φαινοξυ-ριζών (phenoxy radicals) και ενδιάμεσων μεταβολιτών, όπως ημικινονών (semiquinones) που αλληλεπιδρούν με τα βιομόρια του κυττάρου. Σε αυτές τις αντιδράσεις σχηματίζονται ασταθείς ενώσεις όπως ρίζες υπεροξειδίου (superoxide radicals) ή υπεροξειδία του υδρογόνου (hydrogen peroxide). Οι φαινόλες υψηλής δραστικότητας υποβάλλονται γρήγορα σε αντιδράσεις ριζών και προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων της μεμβράνης του κυττάρου. Οι φαινόλες χαμηλότερης δραστικότητας διεισδύουν στο εσωκυτταρικό του κυττάρου και βλάπτουν τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων και του πυρήνα καθώς και κάποιων συστατικών των κυττάρων όπως ένζυμα και νουκλεϊνικά οξέα (Michałowicz & Duda, 2007).

1.1.3 Πηγές

Οι χλωριωμένες φαινόλες προέρχονται σχεδόν εξ ολοκλήρου από ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως η χημική και φαρμακευτική βιομηχανία

(Czarlicka, 2004). Η ευρεία εξάπλωση αυτών των ενώσεων στο περιβάλλον σχετίζεται επίσης με την παραγωγή, χρήση και αποικοδόμηση πολλών φυτοφαρμάκων, όπως τα χλωροβενζόλια και τα χλωριωμένα κυκλοεξάνια. Τις τελευταίες δεκαετίες, οι χλωροφαινόλες έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο περιβάλλον και η επεξεργασία τους, η διάθεσή τους και η γενική διαχείριση αποτελούν σοβαρές προκλήσεις για τους ενδιαφερόμενους φορείς στον τομέα του περιβάλλοντος και της υγείας (Czarlicka, 2004; Igbinoso et al., 2013).

1.1.4 Περιβαλλοντική Συμπεριφορά

Σήμερα διάφορες έρευνες έχουν δείξει την παρουσία χλωροφαινολικών καταλοίπων και άλλων χλωριωμένων αρωματικών παραγώγων, όπως η χλωροκοταχόλη, σε τροφικές αλυσίδες ακόμη και στα πιο παρθένα φυσικά περιβάλλοντα (Ahlborg & Spencer, 1980). Οι περισσότερες χλωροφαινόλες που απελευθερώνονται στο περιβάλλον έχουν την τάση να καταλήγουν στο νερό, ενώ μικρό ποσοστό αυτών καταλήγει στον αέρα. Οι ενώσεις που είναι πιο πιθανό να εισέλθουν στον αέρα είναι οι μονο- και διχλωροφαινόλες επειδή είναι οι πιο πτητικές (Murray & Wong, 1999).

1.1.5 Επιπτώσεις στην υγεία

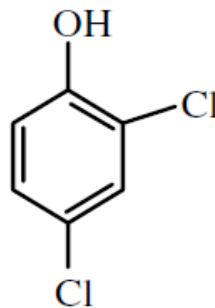
Οι χλωροφαινόλες και τα διάφορα παράγωγά τους έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν ιστοπαθολογικές αλλαγές και μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες επιδράσεις στα ζώα και στον άνθρωπο. Επιπλέον, η προσθήκη ατόμων χλωρίου σε αυτές τις ενώσεις μπορεί να αυξήσει την τοξικότητά τους και να παρατείνει την περίοδο βιοσυσσώρευσης σε ζωντανούς οργανισμούς (Igbinoso et al., 2013). Η δηλητηρίαση από χλωροφαινόλες οδηγεί σε βλάβη στους πνεύμονες, το ήπαρ, τα νεφρά, το δέρμα και το πεπτικό σύστημα. Η συσσώρευση των ενώσεων αυτών γίνεται στα νεφρά, στο σπλήνα, στο ήπαρ, στη καρδιά, στον εγκέφαλο και στον λιπώδη ιστό (Michałowicz & Duda, 2007).

Οι φαινόλες επηρεάζουν επίσης τη λειτουργία του ορμονικού συστήματος. Ορισμένες φαινόλες είναι ικανές να διαταράξουν τη λειτουργία των σεξουαλικών ορμονών, η οποία τελικά μπορεί να οδηγήσει σε στειρότητα των ζώων και των

ανθρώπων. Επηρεάζουν επίσης τη λειτουργία των διαύλων ιόντων στο νευρικό σύστημα (Michałowicz & Duda, 2007). Τέλος, οι χλωροφαινόλες και η κατεχόλη μειώνουν την ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης των ερυθροκυττάρων της ανθρώπινης μεμβράνης (Bukowska & Hutnik, 2006) ενώ προκαλούν βλάβες στις μεμβρανικές πρωτεΐνες (Bukowska & Hutnik, 2006; Bukowska & Kowalska, 2004).

1.1.6 Η 2,4-διχλωροφαινόλη

Η 2,4-διχλωροφαινόλη (2,4-dCP) αποτελεί ίσως την πιο διαδεδομένη χλωροφαινόλη στο εμπόριο (εικόνα 1.2). Παρόλο που οι χλωροφαινόλες με λιγότερα από 3 χλώρια στο μόριο τους δεν χρησιμοποιούνται ευρέως, η 2,4-dCP βρίσκει εφαρμογή στην παραγωγή υψηλότερων χλωροφαινολών και ζιζανιοκτόνων χλωροφαινοξυξικού οξέος (chlorophenoxyacetic acid herbicides). Μάλιστα, εκτιμάται ότι περίπου 40000 τόνοι 2,4-dCP παράγονται ετησίως για την παραγωγή του ζιζανιοκτόνου 2,4-διχλωροφαινοξυξικού οξέος (dichlorophenoxyacetic acid) (Fahr et al., 1999; Khenifi et al., 2009; Vroumsia et al., 2005).



2,4-DCP

Εικόνα 1.2 Χημική δομή της 2,4-διχλωροφαινόλης (Environnement, 2005)

Λόγω της ευρείας διάδοσης της, η 2,4-dCP καταχωρήθηκε το 1978 ως ρύπος προτεραιότητας μαζί με άλλους 128 από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (Vroumsia et al., 2005), ενώ και η Ευρωπαϊκή Ένωση την ταξινομήσε σε μια παρόμοια λίστα το 1980, ορίζοντας ταυτόχρονα ανώτατα αποδεχτά όρια στο πόσιμο νερό. Πολλές μελέτες έχουν γίνει με σκοπό την αποτοξικοποίηση περιοχών μολυσμένες από 2,4-dCP εξαιτίας των επιβλαβών επιπτώσεων της στους

ζώντες οργανισμούς, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (ppb) (Khenifi et al., 2009).

1.2 Οι έμμονοι οργανικοί ρύποι

1.2.1 Ορισμός

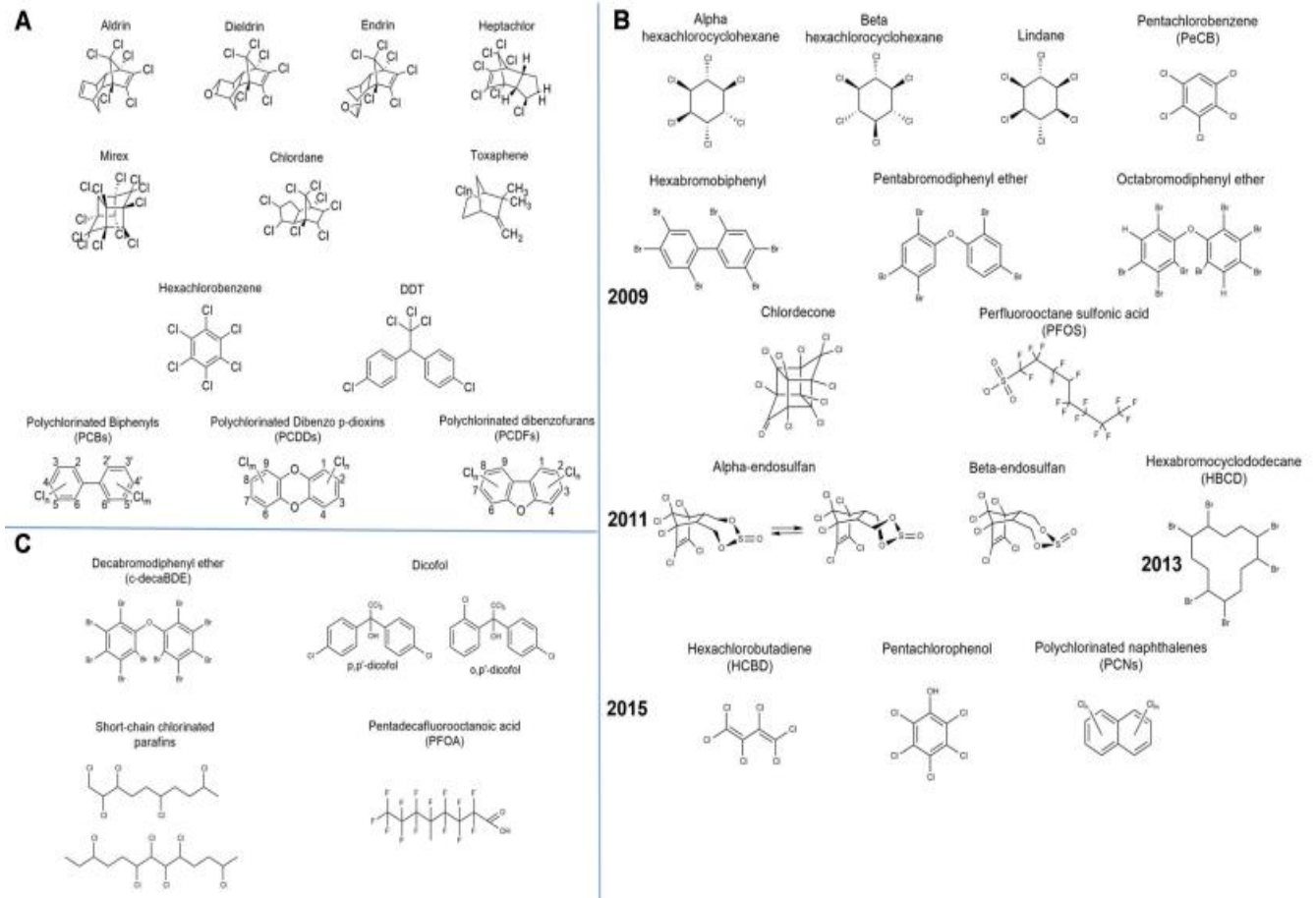
Οι έμμονοι οργανικοί ρύποι (POPs) είναι οργανικές χημικές ουσίες που διαθέτουν ένα συγκεκριμένο συνδυασμό φυσικών και χημικών ιδιοτήτων, έτσι ώστε, μόλις απελευθερωθούν στο περιβάλλον, να:

- Παραμένουν άθικτες για εξαιρετικά μεγάλες χρονικές περιόδους (ως και αρκετά χρόνια),
- Κατανέμονται ευρέως σε ολόκληρο το περιβάλλον ως αποτέλεσμα φυσικών διεργασιών που αφορούν το έδαφος, το νερό και κυρίως τον αέρα,
- Βιοσυσσωρεύονται στον λιπαρό ιστό των ζώντων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, και ανιχνεύονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα υψηλότερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας,
- Είναι τοξικές τόσο για τον άνθρωπο όσο και για την άγρια φύση (UNEP, 2017).

1.2.2 Χαρακτηρίζοντας μια ουσία ως έμμονο οργανικό ρύπο

Οι POPs έχουν μελετηθεί επιμελώς από τη γνωστή διάσκεψη της Στοκχόλμης του Προγράμματος των Ηνωμένων Εθνών για το Περιβάλλον (UNEP) που πραγματοποιήθηκε το 2001. Η διάσκεψη της Στοκχόλμης είχε αρχικά ως στόχο να αντιμετωπίσει τις 12 από τις πλέον πιο ανθεκτικές και τοξικές χημικές ουσίες που δημιουργήθηκαν ποτέ (Εικόνα 1.3Α). Αυτές περιλαμβάνουν εννέα παρασιτοκτόνα που χρησιμοποιούνταν για σκοπούς γεωργίας και δημόσιας υγείας: αλδρίνη (Aldrin), χλωρδάνη (Chlordane), π,π'-διχλωρο-διφαινυλοτριχλωροαιθάνιο DDT, διελδρίνη (Dieldrin), ενδρίνη (Endrin), επταχλώριο (Heptachlor), εξαχλωροβενζόλιο (HCB), mirex και τοξοφαίνη (Toxaphene). Επιπλέον, στοχεύθηκαν τα πολυχλωριομένα διφαινύλια (PCBs) για τα οποία θα γίνει εκτενέστερη αναφορά σε επόμενη ενότητα. Τέλος, η σύμβαση αντιμετωπίζει κάποια παραπροϊόντα, συμπεριλαμβανομένων των πολυχλωριομένων διβενζοδιοξινών (PCDD) και των πολυχλωριομένων

διβενζοφουρανίων (PCDF), τα οποία προέρχονται από καύσεις και βιομηχανικές διεργασίες αλλά δεν έχουν καμία εμπορική χρήση (UNEP, 2012). Έκτοτε το πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το περιβάλλον έχει στοχεύσει και άλλες πολλές ενώσεις (εικόνα 1.3 Β) ενώ άλλες βρίσκονται υπό εξέταση (εικόνα 1.3 C).



Εικόνα 1.3 Οι χημικοί τύποι των έμμονων οργανικών ρύπων (POPs) από τη διάσκεψη της Στοκχόλμης: (Α) Οι πρώτες δώδεκα ενώσεις "Dirty Dozen" (Β) οι νέοι POPs και το έτος στο οποίο καταγράφηκαν και (Γ) νέες προτάσεις που βρίσκονται υπό εξέταση (Nikolaivits et al., 2017).

Η Διάσκεψη της Στοκχόλμης έγινε με αυστηρά επιστημονικά κριτήρια μετά από πολυάριθμες έρευνες περιβαλλοντικής τοξικολογίας σε υδάτινα συστήματα διαφόρων περιοχών του πλανήτη (UNEP, 2010). Για καθένα από αυτά τα κριτήρια πρέπει να πληρούνται ορισμένοι περιορισμοί προκειμένου μια χημική ένωση να θεωρηθεί ως υποψήφιος POP όπως φαίνεται στον Πίνακας 1.1.

Πίνακας 1.1 Κριτήρια για την εκτίμηση των POPs σύμφωνα με τη σύμβαση για τη διασυννοριακή ατμοσφαιρική ρύπανση σε μεγάλη απόσταση και τη Σύμβαση της Στοκχόλμης. Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού (K_{ow})² πρέπει να είναι περίπου στο 5, ο παράγοντας βιοσυσσώρευσης πάνω από 5.000 (τάση προς συσσώρευση σε ιστούς), και η διάρκεια ημιζωής³ μεγαλύτερη από 2 ημέρες (αέρα), 2 μήνες (νερό), 6 μήνες (έδαφος) και 6 μήνες (ιζήματα) (O’Sullivan & Megson, 2013).

Κατηγορία	Κριτήριο
Εμμόνη	Χρόνος ημιζωής στο νερό > 2 μήνες Χρόνος ημιζωής σε ιζήματα > 6 μήνες Χρόνος ημιζωής στο έδαφος > 6 μήνες
Βιοσυσσώρευση	Log K_{ow} > 5 ή Παράγοντας βιοσυσσώρευσης > 5000
Πιθανή διασυννοριακή ατμοσφαιρική ρύπανση σε μεγάλη απόσταση	Χρόνος ημιζωής στην ατμόσφαιρα > 2 ημέρες (ή ύπαρξη της ουσίας σε απομακρυσμένες περιοχές)

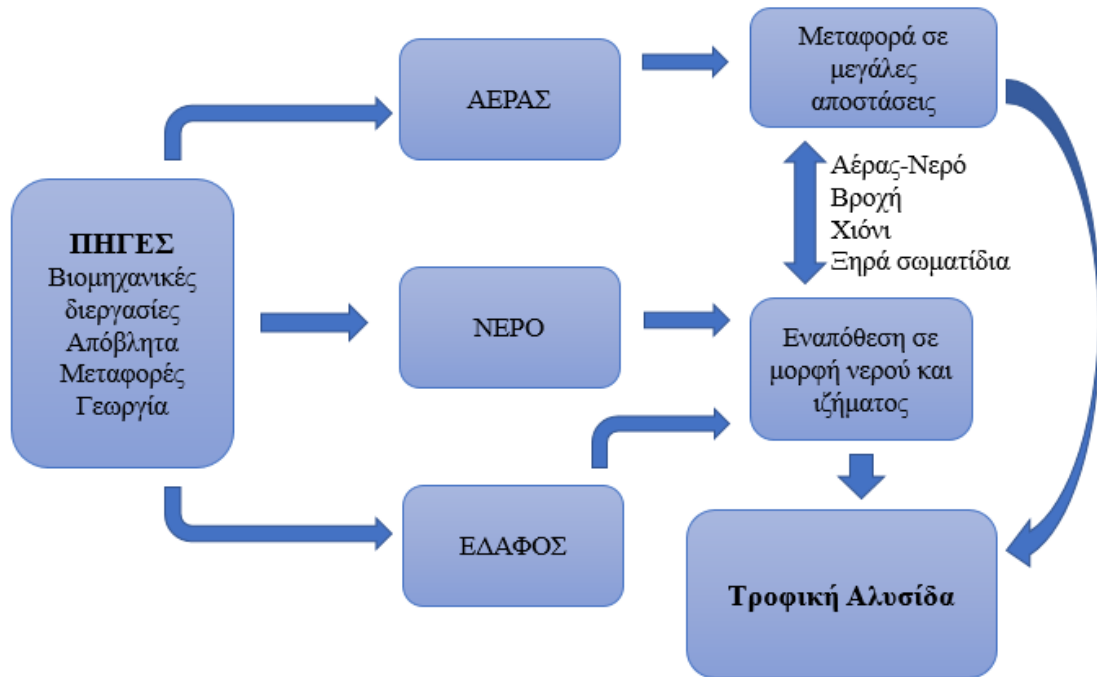
Οι POPs είχαν αναγνωριστεί καιρό πριν από τη συγκεκριμένη διάσκεψη. Ωστόσο οι ενέργειες της διάσκεψης της Στοκχόλμης έχουν καθορίσει με σαφήνεια τα κριτήρια και τις διαδικασίες για την κατηγοριοποίηση μιας ουσίας ως POP και την καταχώρησή της στα παραρτήματα Α (κατάργηση), Β (περιορισμός) ή / και Γ (ακούσια παραγωγή) (Nikolavits et al., 2017).

1.2.3 Πηγές

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως οι άνθρωποι εκτίθενται σε αυτές τις χημικές ουσίες με διάφορους τρόπους, κυρίως μέσω των τροφίμων που τρώνε, αλλά και μέσω του αέρα που αναπνέουν (Εικόνα 1.4). Πολλά προϊόντα που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή ζωή μπορούν να περιέχουν POPs, οι οποίοι έχουν προστεθεί για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών τους, όπως παρασιτοκτόνα και βιομηχανικά χημικά προϊόντα.

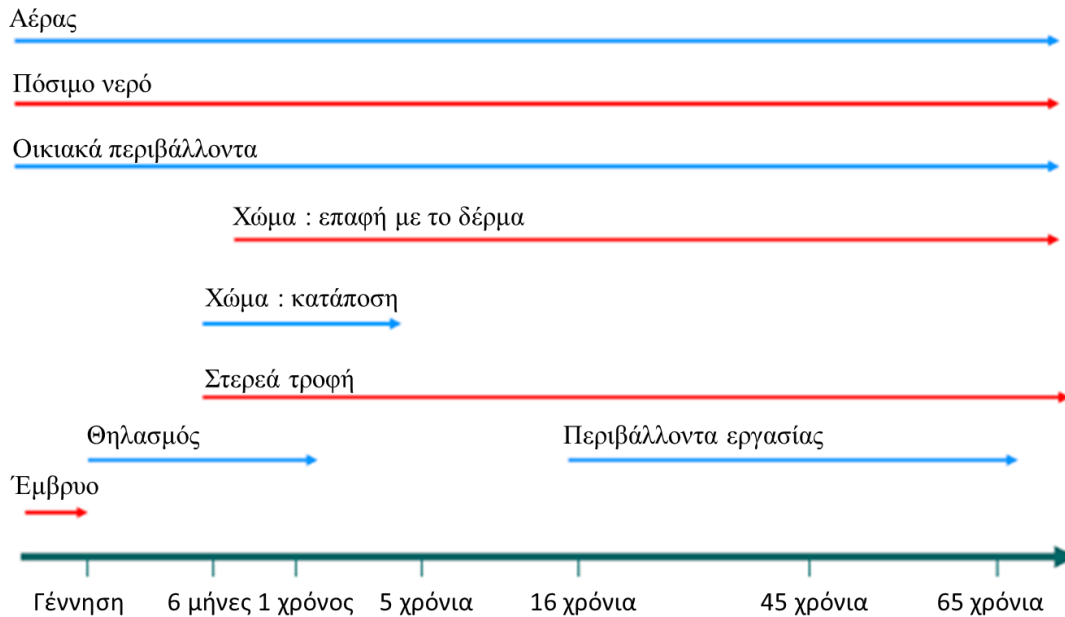
² Η λιποφιλία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό όλων των οργανοχλωριωμένων ενώσεων και εκφράζεται ως συντελεστής καταμερισμού (partition coefficient) σε n-οκτανόλη/νερό.

³ Η διάρκεια ημιζωής αποτελεί μέτρο για την εμμόνη (ή διάρκεια παραμονής ή ανθεκτικότητα) των ενώσεων



Εικόνα 1.4 Πηγές έμμονων οργανικών ρύπων. Οι POPs έχουν κυρίως ανθρωπογενή προέλευση: βιομηχανικές διεργασίες, απόβλητα (π.χ. ιατρικά), μεταφορές και γεωργία. Μερικοί μπορεί να είναι φυσικής προέλευσης, π.χ. από ηφαιστειακές εκρήξεις. Εκλύονται στον αέρα, στο νερό και στη γη και εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα. Διανέμονται παγκοσμίως μέσω των ρευμάτων του αέρα και των ωκεανών - ταξιδεύουν πολύ μεγάλες αποστάσεις και βρίσκονται σε μέρη μακριά από βιομηχανικούς χώρους ή αγροτικές περιοχές, όπως ο κύκλος της Αρκτικής. Εισέρχονται σε ατμοσφαιρικές διεργασίες, ανταλλαγές αέρα-νερού και κύκλους που περιλαμβάνουν βροχή, χιόνι και ξηρά σωματίδια. Αυτές οι διεργασίες οδηγούν στην έκθεση ανθρώπινων και ζωικών πληθυσμών που βρίσκονται σε απομακρυσμένες περιοχές και που εξαρτώνται από θαλασσινά (WHO, 2008).

Η έκθεση των ανθρώπων στους ρύπους αυτούς, καθώς και στους αντίστοιχους χλωροφαινολικούς ρύπους, μπορεί να γίνει σε όλη την διάρκεια της ζωής τους όπως φαίνεται στην εικόνα 1.5 (WHO, 2017). Οι άνθρωποι και τα υπόλοιπα θηλαστικά εκτίθενται στα υψηλότερα επίπεδα αυτών των ρύπων κατά τη βρεφική και παιδική ηλικία, όταν και είναι πιο ευάλωτοι καθώς ο εγκέφαλος, το νευρικό σύστημα και το ανοσοποιητικό σύστημα δεν έχουν ακόμα αναπτυχθεί πλήρως. Ακόμα χειρότερα, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και του θηλασμού, αυτές οι ενώσεις μπορούν να μεταφερθούν από γενιά σε γενιά. Πράγματι μελέτες έχουν δείξει την πιθανή μεταφορά των POPs μέσω του μητρικού γάλακτος στα βρέφη εκθέτοντάς τα σε ανιχνεύσιμες ποσότητες POPs στα πολύ πρώιμα στάδια της ζωής τους (Y. Chen et al., 2015; Croes et al., 2012).



Εικόνα 1.5 Ποιοτική απεικόνιση του φορτίου των έμμονων οργανικών ρύπων (αλλά και άλλων χημικών ουσιών) που δέχεται ένας άνθρωπος καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του. Η έκθεση μπορεί να ξεκινήσει από τη μήτρα, μέσω της έκθεσης της μητέρας σε ρύπους που υπάρχουν στα τρόφιμα ή στον αέρα. Μετά τη γέννηση, η έκθεση εκδηλώνεται πρώτα μέσω του θηλασμού (μέχρι 12-18 μήνες γενικά) και στη συνέχεια η μόλυνση συνεχίζεται μέσω των στερεών τροφίμων των οποίων η κατανάλωση ξεκινάει μετά τους 6 μήνες. Λόγω του μεγάλου χρόνου που ζοδεύουν τα παιδιά στο πάτωμα, μπορούν να εκτεθούν σε μολυσμένο χώμα μέσω της επαφής με το δέρμα (dermal) τους ή λόγω κατάποσης (ingestion). Μετά την εφηβική ηλικία μπορεί να ξεκινήσει η έκθεση στον επαγγελματικό χώρο. Τέλος, ο μολυσμένος αέρας, το νερό και οι εσωτερικοί χώροι συμβάλλουν στην αύξηση της έκθεσης του σώματος σε όλη την διάρκεια της ζωής (WHO, 2008).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η πρόσληψη των POPs από τους ανθρώπους οφείλεται κυρίως στη διατροφή τους και ιδιαίτερα στην κατανάλωση ζωικών τροφών (M. L. Chen et al., 2012). Πράγματι, η κατανάλωση θαλασσινών (Perelló et al., 2015) που προέρχονται από μολυσμένες πηγές, και ιδιαίτερα ψαριών (Deribe et al., 2014), έχει βαρύνουσα σημασία στην πρόσληψη τους ενώ άλλες πιθανές πηγές αποτελούν το κρέας (Hernández et al., 2017) και τα λαχανικά (Khan & Cao, 2012).

1.2.4 Περιβαλλοντική Συμπεριφορά

Η έλξη των POPs λόγω της υδρόφοβης φύσης σε λιπώδεις ιστούς, γνωστή ως βιοσυσώρευση, σημαίνει ότι η έκθεση ακόμα και σε ασήμαντες συγκεντρώσεις μπορεί μακροπρόθεσμα να έχει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία. Πράγματι, σταδιακά οι συγκεντρώσεις των ρύπων μέσα στους οργανισμούς αυξάνονται χωρίς απαραίτητα

να μεταβάλλεται η συγκέντρωση έκθεσης. Οι POPs απορροφούνται εύκολα στους λιπώδεις ιστούς των οργανισμών που βρίσκονται στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας (ψάρια, αρπακτικά πουλιά, θηλαστικά, άνθρωποι), όπου οι συγκεντρώσεις τους μπορούν μέχρι και να εκατονταπλασιαστούν με την πάροδο των χρόνων (UNEP, 2010, 2017).

Οι POPs όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως αποτελούν υδρόφοβες και λιπόφιλες ενώσεις. Στο έδαφος τείνουν να δεσμεύονται με την οργανική ύλη και να παραμένουν εντοπισμένες στο ίδιο σημείο καθώς η μεταφορά μέσω των υπόγειων υδάτων είναι ελάχιστη. Σε υδάτινα περιβάλλοντα, τείνουν να δεσμεύονται έντονα σε στερεά σωματίδια και συνεπώς ανιχνεύονται μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις στη διαλυμένη φάση. Λόγω του πτητικού χαρακτήρα τους, αυτές οι ενώσεις μπορούν να βρίσκονται στην αέρια φάση, σε συνδυασμό με ατμοσφαιρικά σωματίδια ή κατανεμημένες μεταξύ αυτών των δύο φάσεων (O'Sullivan & Megson, 2013). Η ατμόσφαιρα αποτελεί και το κύριο μέσο μεταφοράς για την παγκόσμια κατανομή των POPs (Lammel et al., 2015; Ruiz-Fernández et al., 2014).

Η ικανότητα των POPs να αντιστέκονται στην αποικοδόμηση και ο μεγάλος χρόνος ημιζωής τους, τους παρέχει τη δυνατότητα μεταφοράς σε περιοχές όπου δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ποτέ αυτές οι ουσίες (Z. Zhao et al., 2012) και σε ορισμένες περιπτώσεις ανιχνεύονται σε όλο τον κόσμο, ακόμη και στις αλπικές και ορεινές περιοχές, στην Αρκτική, στην Ανταρκτική και στα απομακρυσμένα νησιά του Ειρηνικού (Ruiz-Fernández et al., 2014; X. Zhao et al., 2015).

Η μεταφορά των POPs εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Σε μια διαδικασία γνωστή ως «φαινόμενο της ακρίδας» (grasshopper effect), αυτά τα χημικά μεταπηδούν γύρω από τον πλανήτη. Μέσω της εξάτμισης, που συμβαίνει στους θερμούς χώρους, παρασύρονται από τον άνεμο και τα σωματίδια σκόνης και μεταφέρονται σε άλλες περιοχές. Εν συνεχεία, συμπυκνώνονται σε δροσερά σημεία ξανά μολύνοντας τη Γη. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επαναληφθεί εκ νέου, όσο της το επιτρέπουν οι θερμοκρασιακές συνθήκες. Καθώς οι POPs απομακρύνονται από τον ισημερινό, συναντούν ψυχρότερα κλίματα όπου η εξάτμιση τους γίνεται πιο δύσκολη. Το αποτέλεσμα είναι μια γενική συσσώρευση αυτών των ρύπων προς τους πόλους και τις ορεινές περιοχές όπως απεικονίζεται στην εικόνα 1.6 (O'Sullivan & Megson, 2013; UNEP, 2010).



Εικόνα 1.6 Πολλαπλοί κύκλοι εξάτμισης, μεταφορά μέσω αέρα και συμπύκνωση των POPs (φαινόμενο της ακρίδας, grasshopper effect). Λόγω της ημι-πτητικής τους φύσης, οι ρύποι μεταφέρονται σε πολύ μεγάλες αποστάσεις. Αυτή η πτητικότητα είναι μεγαλύτερη στα ζεστά τροπικά απ' ό τι στα ήπια ή κρύα κλίματα, με αποτέλεσμα να καταλήγουν παγιδευμένοι στα πιο κρύα μέρη του πλανήτη (O'Sullivan & Megson, 2013).

Η ζωή γίνεται επίσης πιο «λιπαρή» σε ψυχρότερα κλίματα. Πράγματι, τα ψάρια, τα πουλιά και τα θηλαστικά χρειάζονται παχύτερα στρώματα λίπους ως φυσική μόνωση για να αντιμετωπίσουν τις εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες. Κατά συνέπεια, η συγκέντρωση των ρύπων φτάνει σε υψηλότερα επίπεδα σε αυτούς τους οργανισμούς. Οι αυτόχθονες πληθυσμοί στην Αρκτική, των οποίων οι παραδοσιακές δίαιτες είναι πλούσιες σε λιπαρά τρόφιμα και οι οποίοι συχνά δεν έχουν άλλες εναλλακτικές για να τραφούν, παρουσιάζουν μερικά από τα υψηλότερα επίπεδα POPs. Παρόλο που βρίσκονται εκατοντάδες ή και χιλιάδες χιλιόμετρα μακριά από τα σημεία όπου απελευθερώθηκαν αυτά τα χημικά προϊόντα, και σίγουρα ελάχιστα ωφελήθηκαν από την αρχική χρήση τους, αποτελούν την ομάδα ανθρώπων που έχει υποστεί την μεγαλύτερη ζημιά (UNEP, 2010).

1.2.5 Επιπτώσεις στην υγεία

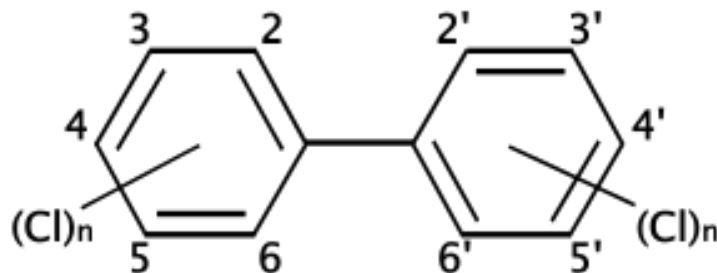
Πέραν των επιπτώσεων που έχουν αυτοί οι ρύποι στα οικοσυστήματα και στην βιοποικιλότητα, πολλές είναι και οι ανησυχίες για την υγεία του ανθρώπου. Όπως συμβαίνει με πολλούς περιβαλλοντικούς ρύπους, είναι πολύ δύσκολο να αποδειχθεί ότι κάποια ασθένεια αποδίδεται άμεσα στην έκθεση σε κάποιον ή κάποιους συγκεκριμένους POPs. Η δυσκολία αυτή υπογραμμίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι οι ρύποι αυτοί σπάνια ανιχνεύονται μόνοι τους αλλά αντίθετα κυκλοφορούν πολλοί μαζί, και οι διάφορες μελέτες πεδίου είναι ανεπαρκείς για να παράσχουν αυτοτελή αποδεικτικά στοιχεία αιτίου και αποτελέσματος (Van et al., 2011; WHO, 2008).

Η έκθεση των βρεφών σε τέτοιες χημικές ουσίες, προγεννητικά ή μεταγεννητικά, έχει συνδεθεί με διάφορα προβλήματα υγείας, από υπανάπτυξη (Iszatt et al., 2015) και παχυσαρκία, μέχρι και διαταραχές της υψηλής αρτηριακής πίεσης (Vafeiadi et al., 2015) και επιπτώσεις στην ανάπτυξη των νευρικών (Nikolaivits et al., 2017), ανοσοποιητικών και αναπνευστικών συστημάτων (Gascon et al., 2013). Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η ηλικία αυτή αποτελεί την πιο επικίνδυνη φάση της ζωής του ανθρώπου, καθώς όλα τα όργανα και συστήματα του είναι υπό ανάπτυξη. Εκτός από τα βρέφη, οι POPs προκαλούν αρκετά προβλήματα υγείας και στους ενήλικες. Η έκθεση σε αυτούς τους ρύπους έχει συνδεθεί με την καρκινογένεση (Boada et al., 2012; Lim et al., 2015; Mitro et al., 2016) και διάφορες μεταβολικές ασθένειες (Reaves et al., 2015; Ruzzin, 2012) όπως διαβήτη τύπου 2 (Jaacks & Staimez, 2015), ενώ έχουν αναφερθεί και πολυάριθμες συνδέσεις με αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία όπως αλλεργίες και υπερευαισθησία, βλάβη στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα, αναπαραγωγικές διαταραχές και διατάραξη του ανοσοποιητικού συστήματος (Arrebola et al., 2015; Grindler et al., 2015; Vested et al., 2014).

1.2.6 Τα πολυχλωριομένα διφαινύλια

Τα πολυχλωριομένα διφαινύλια (PCBs, Polychlorinated biphenyls) είναι μια ομάδα χλωριομένων αρωματικών υδρογονανθράκων συνθετικής προέλευσης που ανήκουν στην κατηγορία των POPs. Παράγονται με χλωρίωση του διφαινυλίου, το οποίο έχει συνολικά δέκα διαθέσιμες θέσεις για την προσθήκη των ατόμων χλωρίου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία συνολικά διακοσίων εννιά (209) διαφορετικών ενώσεων (εικόνα 1.7). Οι ενώσεις αυτές καλούνται συμπαράγωγα και η

διαφορά τους από τα ισομερή είναι ότι, ισομερή καλούνται μόνο τα συμπαράγωγα που έχουν τον ίδιο αριθμό ατόμων χλωρίου (δηλ. ίδιο συντακτικό τύπο), αλλά σε διαφορετικές θέσεις (Carpenter, 2006; Kimbrough, 2015; Safe & Hutzinger, 2017). Για παράδειγμα, το PCB 29 ή 2,4,5-Τριχλωροδιφαινύλιο αποτελεί ένα από τα 209 συμπαράγωγα για τα οποία οι υποκατάστατες χλωρίου βρίσκονται στις θέσεις 3, 4 και 6 όπως αυτές απαριθμούνται στην εικόνα 7.



Εικόνα 1.7 Χημική δομή του μορίου PCB. Οι 10 θέσεις αριθμούνται από 2 έως 6 στον ένα δακτύλιο (αριστερά) και 2' έως 6' στον δεύτερο δακτύλιο (δεξιά). Τα μόρια χλωρίου μπορούν να αντικαταστήσουν τα υδρογόνα σε οποιαδήποτε από αυτές τις δέκα θέσεις. Εάν δεν υπάρχουν χλώρια σε ορθο θέσεις (2,2', 6,6'), τότε το μόριο υπάρχει κυρίως σε επίπεδη μορφή, ενώ αν υπάρχουν δύο ή περισσότερα χλώρια σε ορθο-θέσεις, τότε το μόριο λαμβάνει μια τρισδιάστατη διαμόρφωση. Θεωρητικά υπάρχουν 209 διαφορετικές ενώσεις PCBs, ανάλογα με τον αριθμό και την θέση των χλωρίων στο μόριο (Carpenter, 2006).

Τα PCBs είχαν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό εφαρμογών, μέχρι την απαγόρευσή τους στα μέσα της δεκαετίας του '70, και για το λόγο αυτό ανιχνεύονται σε πολλά βιολογικά και περιβαλλοντικά δείγματα ακόμη και σήμερα. Μερικές από τις εφαρμογές αυτές ήταν η χρήση τους σαν διηλεκτρικά υγρά σε πυκνωτές και ηλεκτρικούς μετασχηματιστές, σαν πρόσθετα χρωμάτων, μελανιών και πλαστικών, σαν υδραυλικά υγρά και άλλα. Τα PCBs ήταν τόσο διαδεδομένα που υπολογίζεται ότι το 96% του παγκόσμιου πληθυσμού έχει εκτεθεί σε αυτά είτε μέσω μολυσμένων τροφίμων ή άλλων διεργασιών όπως μέσω της συντήρησης ηλεκτρικών μετασχηματιστών (Carpenter, 2006; Safe & Hutzinger, 2017).

1.3 Αντιμετώπιση των ρύπων και εμπόδια στην εφαρμογή εναλλακτικών λύσεων

1.3.1 Αντιμετώπιση

Οι κυβερνήσεις αναπτύσσουν κανονισμούς και συστάσεις για την προστασία της δημόσιας υγείας. Οι κανονισμοί και οι συστάσεις αυτές μπορούν να εκφράζονται ως 'επιτρεπτά επίπεδα' στον αέρα, το νερό, το έδαφος ή τα τρόφιμα (Murray & Wong, 1999). Γίνονται συνεχώς προσπάθειες εξάλειψης της παραγωγής, χρήσης, απελευθέρωσης και αποθήκευσης των διάφορων έμμονων ρύπων.

Οι περισσότεροι από αυτούς τους παραγόμενους οργανικούς ρύπους έχουν σταματήσει άμεσα να χρησιμοποιούνται με ελάχιστες εξαιρέσεις. Τα PCBs αποτελούν μια σημαντική εξαίρεση. Ενώ η παραγωγή τους έχει σταματήσει, η χρήση τους επιτρέπεται μέχρι και το 2025 για να διασφαλιστεί ότι τα PCBs θα απορριφθούν με περιβαλλοντικά ορθό τρόπο. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να εξαλειφθούν, αλλά αυτό απαιτεί πρόσθετα χρήματα και τεχνογνωσία. Σε ορισμένες περιπτώσεις, πολύ περιορισμένη και προσεκτικά ελεγχόμενη χρήση ορισμένων ρύπων είναι επιτρεπτή. Για παράδειγμα, το DDT επιτρέπεται να χρησιμοποιείται μόνο για την αντιμετώπιση φορέων ασθενειών όπως τα κουνούπια που μεταδίδουν την ελονοσία. Σήμερα, σχεδόν καμία χώρα δεν ψεκάζει το DDT σε καλλιέργειες, αλλά πάνω από 20 χώρες το χρησιμοποιούν για τον έλεγχο και περιορισμό της ελονοσίας. Σε αυτή την περίπτωση, μια υπερβολικά γρήγορη απαγόρευση του DDT θα μπορούσε να έχει υψηλό κόστος σε ανθρώπινες ζωές.

Τέλος, η έρευνα και η στόχευση νέων επικίνδυνων ουσιών αποτελεί πολύ σημαντικό έργο για της αρμόδιες αρχές. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας επιστημονικά αυστηρής διαδικασίας και εξασφαλίζει ότι οι χημικές αυτές προτεινόμενες ουσίες θα εξεταστούν ακόμη και αν υπάρχει έλλειψη επιστημονικών στοιχείων σχετικά με τη βλάβη που προκαλούν (UNEP, 2012). Σε αντίθεση με το τι συμβαίνει στο δικαστήριο, όπου ένα άτομο είναι αθώο μέχρι να αποδειχθεί ένοχος, οι χημικές ουσίες που είναι ύποπτες για βιοσυσσώρευση, εκτεταμένη παρουσία στο περιβάλλον και πιθανή διαταραχή της υγείας των ανθρώπων και των ζώων δεν αξίζουν αυτό το είδος προστασίας.

1.3.2 Εμπόδια

Για ορισμένους POPs, η μετάβαση σε ασφαλέστερες λύσεις απαιτεί περισσότερη προσπάθεια. Οι εναλλακτικές λύσεις μπορεί να είναι ακριβότερες και η κατασκευή και η χρήση τους πιο περίπλοκη. Αυτό θα μπορούσε να θέσει τις αναπτυσσόμενες χώρες σε μια δυσχερή θέση καθώς τείνουν να χρησιμοποιούν αυτό που είναι διαθέσιμο και απέναντι στο οποίο μπορούν να ανταπεξέλθουν οικονομικά. Πρέπει επίσης να εξασφαλισθεί ότι οι εναλλακτικές λύσεις δεν έχουν τις ίδιες ιδιότητες με τους POPs που αντικαθιστούν. Αν και είναι δύσκολο να εκτιμηθούν πλήρως οι δυνητικοί κίνδυνοι των εναλλακτικών λύσεων, η αντικατάσταση των POPs δεν θα πρέπει να οδηγήσει στη δημιουργία ενός άλλου προβλήματος (UNEP, 2010).

Άλλα εμπόδια στην υιοθεσία εναλλακτικών λύσεων περιλαμβάνουν την ενημέρωση, την εκπαίδευση και την κατάρτιση των εμπλεκόμενων φορέων. Πράγματι, η εκπαίδευση και η κατάρτιση για τις παλαιότερες ενώσεις όσο και για τις πιθανές εναλλακτικές λύσεις είναι απαραίτητες για όλους στην αλυσίδα παραγωγής, συμπεριλαμβανομένων των μεμονωμένων χρηστών και πωλητών. Πολλά άτομα δεν συνειδητοποιούν πόσο επικίνδυνα είναι τα παλαιότερα χημικά προϊόντα, ποιες εναλλακτικές είναι διαθέσιμες και πώς μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτές τις εναλλακτικές λύσεις αποτελεσματικά (Van et al., 2011). Μόνο με την συμμετοχή όλων των εμπλεκόμενων παραγόντων σε μια ενοποιημένη εκστρατεία θα μπορέσει ο κόσμος να απαλλαγεί από αυτούς τους επικίνδυνους ρύπους (UNEP, 2010).

Κεφάλαιο 2 Βιοεξυγίανση

Από τη δεκαετία του 1970 δημιουργήθηκε μια παγκόσμια επιθυμία για την εύρεση περιβαλλοντικών πρακτικών που μειώνουν τη ρύπανση ενώ παράλληλα υπήρχε μια αυξανόμενη ζήτηση για την αποκατάσταση των ήδη μολυσμένων περιοχών. Η προστασία της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος από τη βιομηχανική ρύπανση αποτελεί σήμερα μια κοινωνική επιταγή. Δεδομένης της τοξικότητας και των περιβαλλοντικών ανησυχιών που συνδέονται με τους χημικούς ρύπους, έχει καταβληθεί μεγάλη προσπάθεια για την εύρεση τρόπων απομάκρυνσης διάφορων ρύπων από τα οικοσυστήματα. Αυτές οι τεχνικές ποικίλουν από την απλή φυσική απομάκρυνση (π.χ. υγειονομική ταφή) μέχρι και πιο δαπανηρές επεξεργασίες όπως η αποτέφρωση. Συχνά αυτές οι τεχνικές δεν αφαιρούν πλήρως την ρυπογόνο ουσία ή μπορεί να αφήσουν πίσω κάποιο τοξικό υπόλειμμα που πρέπει να απορριφθεί με άλλους τρόπους. Η ικανότητα των μικροβίων να βιοαποικοδομούν⁴ οργανικές ρυπαντικές ουσίες και να τις μετατρέπουν σε ακίνδυνα συστατικά (νερό και διοξείδιο του άνθρακα) έχει μελετηθεί ως μέσο βιολογικής επεξεργασίας μολυσμένων περιοχών. Σήμερα, αποτελεί αντικείμενο πολλών ερευνητικών μελετών και εφαρμογών και είναι η βάση για το αναδυόμενο πεδίο της βιοεξυγίανσης (Alexander, 1999; Vidali, 2001).

Η διαδικασία της βιοεξυγίανσης βασίζεται σε ενζυμικές δραστηριότητες μικροβίων με σκοπό τον μετασχηματισμό και την υποβάθμιση των ρυπογόνων ουσιών. Πραγματοποιείται μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως η βιοσυσσωμάτωση, η βιοαποικοδόμηση, η βιοσυσσώρευση και ο μεταβολισμός των ρυπογόνων μορίων. Η βιοεξυγίανση, ιδίως όταν μπορεί να πραγματοποιηθεί 'in situ', αποτελεί ένα οικονομικό μέσο απομάκρυνσης πολλών χημικών ρύπων που επηρεάζουν δυσμενώς την ανθρώπινη υγεία ή την ποιότητα του περιβάλλοντος. Πρόκειται για μια επιτάχυνση της φυσικής διαδικασίας της βιοαποικοδόμησης και ως εκ τούτου αποτελεί μια πράσινη λύση στην αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών ρύπων, προκαλώντας ελάχιστες έως και καθόλου πρόσθετες οικολογικές επιπτώσεις (Atlas & Philp, 2005; Lovley, 2003; Atlas & Philp, 2005).

⁴ Η βιοαποικοδόμηση είναι ο τρόπος με τον οποίον ανακυκλώνονται τα απόβλητα στη φύση ή διασπάται η οργανική ύλη σε θρεπτικά συστατικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από οργανισμούς. "Αποικοδόμηση" σημαίνει αποσύνθεση και το πρόθεμα "βιο-" σημαίνει ότι η αποσύνθεση πραγματοποιείται από μια τεράστια ποικιλία βακτηρίων, μυκήτων, εντόμων και άλλων οργανισμών που τρώνε νεκρή ύλη και ανακυκλώνουν τις νέες μορφές.

Μικροοργανισμοί όπως μύκητες και βακτήρια μπορούν να αποικοδομήσουν και να διασπασούν ένα ευρύ φάσμα μορίων φυσικής ή συνθετικής προέλευσης. Ο υψηλός ρυθμός ανάπτυξής τους, τα πολύπλοκα ενζυμικά συστήματα που διαθέτουν καθώς και τα διάφορα συστήματα έκκρισης τους, τους καθιστούν ισάξιους αντικαταστάτες, αν όχι και καλύτερους, από άλλους χημικούς και φυσικούς παράγοντες αποκατάστασης (Sardrood et al., 2004). Οι οργανισμοί που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για εφαρμογές βιοεξυγίανσης πρέπει να πληρούν τις ακόλουθες απαιτήσεις: (α) πρέπει να διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα που είναι απαραίτητα για την διαδικασία, (β) πρέπει να είναι σε θέση να αναπτυχθούν, να επιβιώσουν, και να δείξουν τη βιοδραστικότητα τους υπό συνθήκες μόλυνσης, (γ) πρέπει να είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με την ρυπογόνο ουσία που μπορεί να είναι μη διαλυτή σε υδατικά περιβάλλοντα ή προσροφημένη σε στερεές επιφάνειες, (δ) το υπόστρωμα του ρύπου πρέπει να είναι προσβάσιμο από τα εμπλεκόμενα ένζυμα της διαδικασίας βιοεξυγίανσης, (ε) ο ρύπος και το σύστημα των ενζύμων πρέπει να έρχονται σε επαφή είτε κάπου μέσα ή έξω από το κύτταρο, (στ) τέλος, πρέπει να υπάρχουν ή να παρέχονται οι κατάλληλες συνθήκες για την ενίσχυση του πληθυσμού του μικροοργανισμού (Alexander, 1999).

2.1 Η ανάγκη για βιοεξυγίανση

Οι κυριότεροι λόγοι για την βιοεξυγίανση των μολυσμένων υδάτων και του εδάφους αφορούν αρχικά ανησυχίες σχετιζόμενες με τη δημόσια υγεία, ενώ η διατήρηση του περιβάλλοντος έρχεται σε δεύτερη μοίρα. Το καθαρό νερό είναι ουσιαστικής σημασίας για τη γεωργία και τη βιομηχανία, και για τις περισσότερες χώρες το νερό είναι ένας πόρος ζωτικής σημασίας που πρέπει να παραμείνει απαλλαγμένος από ρύπους. Η διατήρηση ασφαλών αποθεμάτων πόσιμου νερού αποτελεί μείζον πρόβλημα υγείας σε όλο τον κόσμο. Το ίδιο ισχύει και για το έδαφος. Ακόμη και οι χώρες με πολύ μεγάλες εκτάσεις γης στην διάθεση τους αντιμετωπίζουν σημαντικά προβλήματα εξαιτίας της μόλυνσης του εδάφους, κάτι που προκαλεί σοβαρό οικονομικό και αναπτυξιακό αντίκτυπο. Η ανάγκη εφαρμογής οικονομικά αποδοτικών τεχνολογιών για την απομάκρυνση των περιβαλλοντικών ρύπων είναι πλέον επιτακτική (Atlas & Philp, 2005).

2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοεξυγίανση

Η ευρύτερη ταξινόμηση των περιβαλλοντικών ρύπων γίνεται σε δύο κατηγορίες: οργανικοί και ανόργανοι. Οι οργανικοί ρύποι που ενδιαφέρουν περισσότερο είναι οι υδρογονάνθρακες στις διάφορες μορφές τους. Οι τρεις κύριες κατηγορίες υδρογονανθράκων (αλειφατικοί, αλεικυκλικοί και αρωματικοί υδρογονάνθρακες) διαφέρουν ως προς τη βιοδιασπασιμότητα τους ανάλογα με το μέγεθος και τη διαλυτότητά τους. Θεωρείται ότι μόνο μόρια υδρογονανθράκων που διαλύονται στην υδατική φάση είναι διαθέσιμα για ενδοκυτταρικό μεταβολισμό. Ο ρυθμός με τον οποίο μια συγκεκριμένη οργανική ένωση διαλύεται στο νερό αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τη βιοαποδομησιμότητα της, καθώς αυτός ρυθμίζει το ρυθμό μεταφοράς της ουσίας στον οργανισμό (Sikkema et al., 1995).

Στόχος των μηχανικών είναι η βελτιστοποίηση των φυσικών και χημικών παραγόντων που είναι σημαντικοί για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Πολλές μολυσμένες περιοχές χαρακτηρίζονται από χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών (π.χ. χαμηλά επίπεδα αζώτου και φωσφόρου), αυξημένες ή χαμηλές θερμοκρασίες και παρουσία ενός ευρέος φάσματος άλλων ρύπων, όπως βαρέα μέταλλα. Όλα αυτά μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία της βιοεξυγίανσης με την αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Οι εφαρμογές βιοεξυγίανσης περιοχών συχνά σχεδιάζονται ώστε να ξεπεράσουν αυτούς τους περιορισμούς. Ιδιαίτερης σημασίας είναι το pH, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, η παροχή οξυγόνου, η υγρασία, η θερμοκρασία, τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων, η βιοδιαθεσιμότητα των ρύπων και το πορώδες του εδάφους. Τα περισσότερα μολυσμένα εδάφη περιέχουν κατάλληλους πληθυσμούς μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση κάποιου ρύπου, παρόλα αυτά μπορούν να παραμείνουν μολυσμένα για δεκαετίες ή και περισσότερο, ως αποτέλεσμα των συνθηκών που επικρατούν και οι οποίες δεν ευνοούν την ταχεία βιοαποικοδόμηση πολύπλοκων μορίων.

Συχνά ο σημαντικότερος παράγοντας που περιορίζει τα ποσοστά βιοδιάσπασης στο περιβάλλον είναι η διαθεσιμότητα του μοριακού οξυγόνου. Τα αρχικά ένζυμα της αερόβιας προσβολής σε υδρογονάνθρακες είναι οι οξυγενάσες, οι οποίες έχουν ανάγκη από οξυγόνο. Η παροχή αέρα ή οξυγόνου σε μολυσμένα εδάφη ή ύδατα μπορεί να είναι δύσκολη για πολλούς λόγους, όπως το πορώδες. Επίσης, η σχετικά χαμηλή

διαλυτότητα του οξυγόνου στο νερό είναι ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας (Atlas & Philp, 2005).

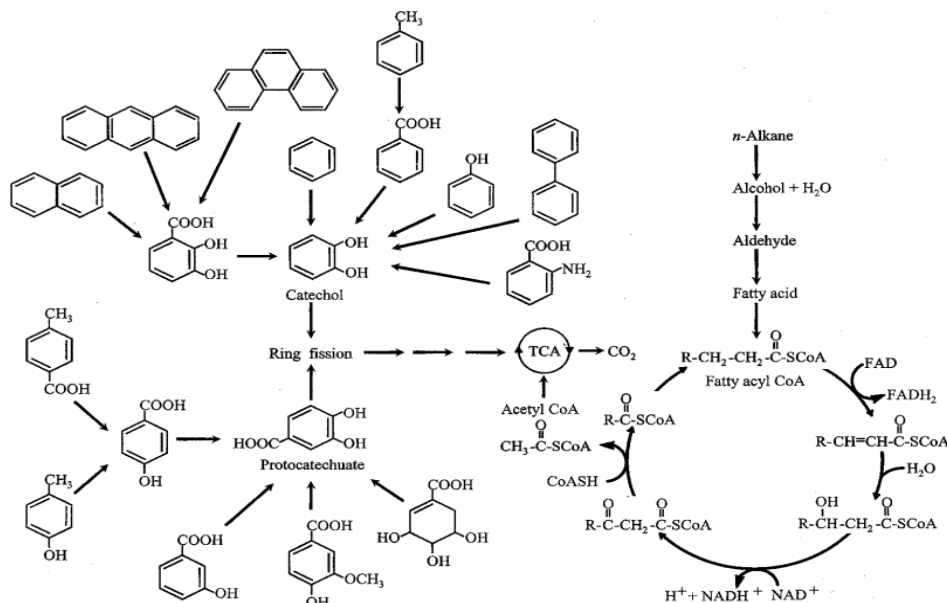
Αν και οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να μεταβολίζουν οργανικές ρυπογόνες ουσίες, το οξυγόνο αποτελεί συχνά αναπόσπαστο μέρος της οξειδωσης πολλών οργανικών ρύπων, συμπεριλαμβανομένων των υδρογονανθράκων. Είναι σημαντικό να ερευνάται πριν από οποιαδήποτε επιχείρηση, εάν ο εκάστοτε ρύπος θα μετασχηματιστεί ταχύτερα κάτω από αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες και αν το κόστος παροχής οξυγόνου αντισταθμίζεται από μια αποδεκτή αύξηση στον ρυθμό μετασχηματισμού του ρύπου (Atlas & Philp, 2005; Margesin & Schinner, 2001).

Είναι επίσης απαραίτητο οι μολυσμένες περιοχές να βρίσκονται στη βέλτιστη θερμοκρασία, καθώς οι υπερβολικά υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες εμποδίζουν μερικές φορές τον μεταβολισμό των μικροβίων. Ένα στοιχείο που πρέπει να ληφθεί υπόψιν για την επίδραση της θερμοκρασίας είναι ότι η διαλυτότητα και η βιοδιαθεσιμότητα μίας ρυπογόνου ένωσης αυξάνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας σε αντίθεση με τη διαλυτότητα του οξυγόνου που μειώνεται, γεγονός που αφήνει λιγότερο διαθέσιμο οξυγόνο για τον μικροβιακό μεταβολισμό (Margesin & Schinner, 2001).

Σε μη μολυσμένες και μη γεωργικές περιοχές, τα ορυκτά θρεπτικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων του αζώτου, του φωσφόρου και του καλίου (N, P, K), σπανίως αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες. Ωστόσο, όταν ένα περιβάλλον μολύνεται με οργανικές ενώσεις, ο λόγος C: N μπορεί να αυξηθεί δραματικά και να γίνει παράγοντας περιορισμού του ρυθμού στην βιοαποκατάσταση (Atagana & Haynes, 2003; Breedveld & Sparrevik, 2000). Αυτές οι θρεπτικές ουσίες μπορούν να παρέχονται στους μικροοργανισμούς προσθέτοντας στην περιοχή (χώμα ή νερό) ένα ανόργανο λίπασμα, για παράδειγμα, φωσφορικό αμμώνιο ή μείγμα άλλων αλάτων όπως ένας συνδυασμός θειικού αμμωνίου και φωσφορικού ασβεστίου. Επιπλέον, οργανικά υλικά όπως οστά ψαριών και κοπριά μπορούν επίσης να αποτελέσουν πηγή θρεπτικών ουσιών. Σε κάθε περίπτωση, είναι σημαντικό να εφαρμοστεί η σωστή ισορροπία και συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών στο μολυσμένο υλικό, καθώς η λανθασμένη αναλογία άνθρακα προς άζωτο μπορεί να οδηγήσει σε μικρή ή και μηδενική αύξηση της μικροβιακής ανάπτυξης (Atagana & Haynes, 2003).

2.3 Η γενετική μηχανική στα χέρια της βιοεξυγίανσης

Λόγω της περιορισμένης δραστηριότητας των αρωματικών υδρογονανθράκων και των αντίστοιχων χλωριωμένων ενώσεων, απαιτούνται πολύπλοκα βιοχημικά μονοπάτια για τη βιοδιάσπαση τους. Αυτά περιλαμβάνουν τη σύνθεση πολλαπλών ενζύμων και την ικανότητά τους να δρουν συναρτησί της σωστής αλληλουχίας για την επίτευξη της μετατροπής του υδρογονάνθρακα σε έναν κεντρικό μεταβολίτη (εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8 Βακτηριακός μεταβολισμός υδρογονανθράκων σε κεντρικούς μεταβολίτες. Ένας μεγάλος αριθμός υδρογονανθράκων μετατρέπεται σε μόλις δύο βασικά ενδιάμεσα προϊόντα, την κατεχόλη (catechol) και το προτοκατεχουικό (protocatechuate) (αριστερό μέρος). Στη συνέχεια πραγματοποιείται η σχάση του δακτυλίου και τα προϊόντα σχάσης μετατρέπονται με τη σειρά τους σε κεντρικούς μεταβολίτες (δεξί μέρος) (TCA= Τρικαρβοξυλικό οξύ (tricarboxylic acid); CoA=συνένζυμο A (coenzyme A)) (Atlas & Philp, 2005).

Η γενετική μηχανική των μικροοργανισμών μπορεί να οδηγήσει σε σταθεροποίηση και αύξηση του επιθυμητού ρυθμού δραστηριότητας, αύξηση του φάσματος δράσης των μικροοργανισμών και ανάπτυξη ασφαλών μικροβιακών συστημάτων (Paknikar et al., 1998). Η πρόοδος της μοριακής βιολογίας και η διαθεσιμότητα τεχνικών για το χειρισμό του DNA, έχουν κάνει εφικτή την κατασκευή ειδικά σχεδιασμένων μικροοργανισμών για την επεξεργασία συγκεκριμένων αποβλήτων. Νέα γονίδια ανακαλύπτονται συνεχώς και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία καινούργιων αποικοδομητικών οδών για νέες συνθετικές ενώσεις,

ενώ είναι επίσης δυνατό να εισαχθούν ικανότητες βιοαποικοδόμησης που δεν υπήρχαν πριν (Atlas & Philp, 2005; Dua et al., 2002).

Οι συμβατικές προσεγγίσεις για την αποκατάσταση περιοχών που παρουσιάζουν μόλυνση από πολλαπλούς ρύπους με την χρήση φυσικοχημικών ή θερμικών μεθόδων μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό άγνωστων τοξικών ενδιάμεσων (Dua et al., 2002). Έτσι, για την αντιρύπανση τέτοιων περιοχών μπορεί να προτιμηθεί η χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών αυτών και των σχεδιαζόμενων (και όχι άγνωστων) μεταβολικών οδών που ακολουθούν (Furukawa, 2003; Pieper & Reineke, 2000). Ωστόσο, οι γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ακόμα ευρέως σε εφαρμογές αποκατάστασης είτε επειδή δεν έχουν φτάσει ακόμα σε στάδιο τελειότητας είτε λόγω περιοριστικών κανόνων (Paknikar et al., 1998).

2.4 Βιοαποικοδόμηση αλειφατικών και αρωματικών αλογονούχων ενώσεων

Όπως αναφέρθηκε και στις προηγούμενες παραγράφους, μεταξύ των διάφορων οργανικών ρύπων, οι υδρογονάνθρακες είναι αυτοί που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στις εφαρμογές της βιοεξυγίανσης, ειδικότερα αυτοί που διαθέτουν αλογόνα στο μόριό τους. Οι αλειφατικές και αρωματικές αλογονούχες ενώσεις παρουσιάζουν σταθερότητα λόγω των δεσμών άνθρακα-αλογόνου που διαθέτουν. Συνεπώς, η διάσπαση των δεσμών αυτών αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην διαδικασία βιοαποικοδόμησης. Η βιοαποικοδόμηση των αλογονούχων αρωματικών ενώσεων πραγματοποιείται με την αφαίρεση των ατόμων αλογόνου είτε πριν είτε μετά την διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου. Ωστόσο, για υψηλά υποκατεστημένες αλογονούχες ενώσεις, όπως το πενταχλωροφαινόλιο και κάποια PCBs, η αφαίρεση τουλάχιστον κάποιον ατόμων αλογόνου είναι απαραίτητη πριν την διάσπαση του δακτυλίου. Το στάδιο της διάσπασης του δακτυλίου είναι πολύ σημαντικό καθώς διάσπαση σε θέση ‘μέτα’ συνήθως οδηγεί στην παραγωγή ακυλαλογονιδίων (acylhalides) ως μεταβολίτες αδιέξοδου, ενώ διάσπαση σε θέση ‘όρθο’ οδηγεί σε ένα παραγωγικό μονοπάτι βιοαποικοδόμησης (Haggbloom & Bossert, 2004).

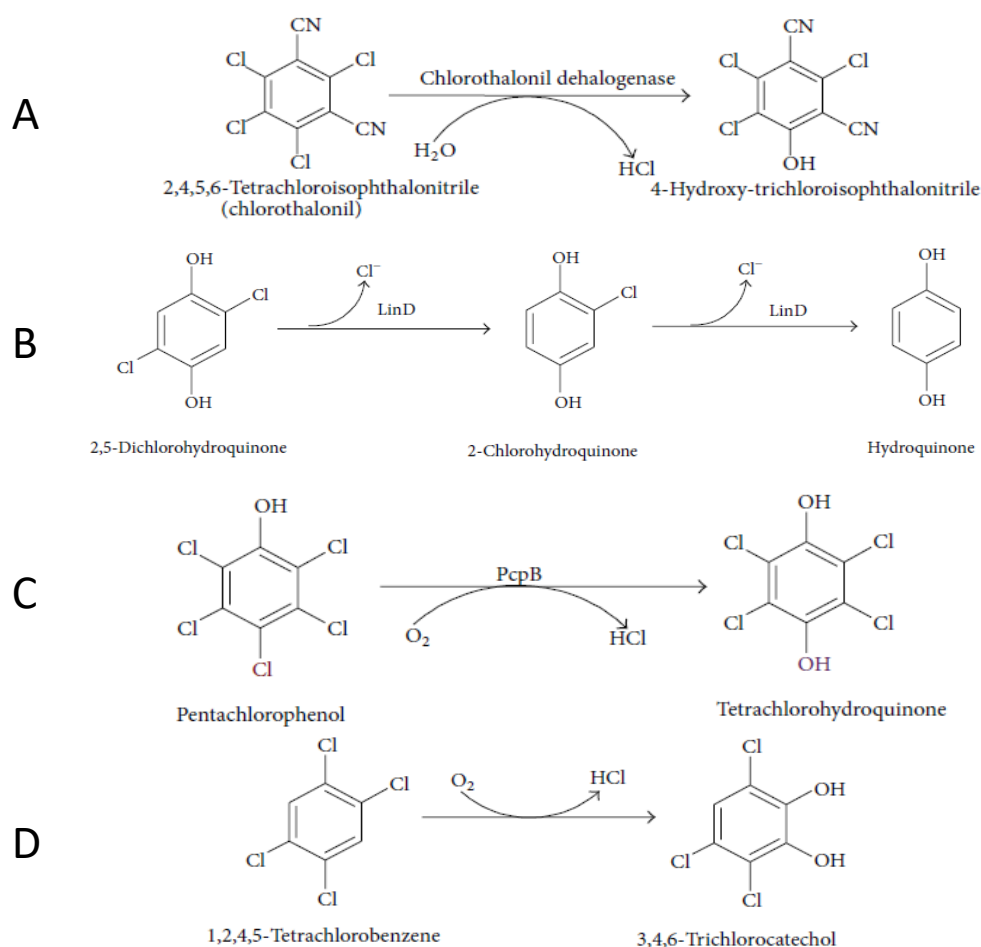
2.4.1 Διάσπαση του δεσμού άνθρακα-αλογόνου

Ο δεσμός άνθρακα-αλογόνου μπορεί να διασπαστεί είτε με αυθόρμητη αφαλογόνωση (spontaneous dehalogenation) μέσω παραγωγής ασταθών ενδιάμεσων και τυχαίων αντιδράσεων, είτε με ενζυμική αφαλογόνωση (enzymatic dehalogenation). Η αυθόρμητη αφαλογόνωση συμβαίνει λόγω της χημικής αποσύνθεσης ασταθών ενδιάμεσων μετά την διάσπαση του δακτυλίου των χλωριωμένων αρωματικών ενώσεων. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί για παράδειγμα στην αποικοδόμηση του γ-εξαχλωροκυκλοεξανίου (gamma-hexachlorocyclohexane) όπου η 1,2-διοξυγενάση της χλωρο-ϋδροκινόνης (chlorohydroquinone-1,2-dioxygenase) καταλύει την διάσπαση της χλωρο-ϋδροκινόνης (chlorohydroquinone) σε ένα ακυλογλωρίδιο που μετατρέπεται σε μαλεϊνικό οξύ (maleylacetate) με απελευθέρωση υδροχλωρίου (Agora & Bae, 2014; Susanne Fetzner & Lingens, 1994).

Όσον αφορά την ενζυμικά καταλύομενη αφαλογόνωση των αλειφατικών και αρωματικών αλογονούχων ενώσεων έχουν αναγνωρισθεί διάφοροι μηχανισμοί. Αυτοί περιλαμβάνουν: (1) υδρολυτική αφαλογόνωση (hydrolytic dehalogenation), καταλύομενη από αλογονοϋδρολάσες (halohydrolyses), (2) αναγωγική αφαλογόνωση (reductive dehalogenation), η οποία καταλύεται από αναγωγικές αφαλογονάσες (reductive dehalogenases), (3) οξειδωτική αφαλογόνωση (oxygenolytic dehalogenation), καταλύομενη από μονο- ή διοξυγενάσες, (4) θειολυτική αφαλογόνωση (thiolytic dehalogenation), καταλύομενη από ένζυμα S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) (glutathione S-transferase (GST) enzymes) (5) ενδομοριακή υποκατάσταση, που καταλύεται από εποξειδάσες αλογονοϋδρίνης (halohydrin epoxidases), (6) δεϋδροαλογόνωση (dehydrohalogenation) καταλύομενη από δεϋδροαλογονάσες (dehydrohalogenases), (7) ενυδάτωση (hydration), και (8) αντιδράσεις μεταφοράς μεθυλίου (Haggbloom & Bossert, 2004; Nikolaiivits et al., 2017)

Από τους διάφορους μηχανισμούς που προαναφέρθηκαν, η υδρολυτική, η αναγωγική και η οξειδωτική αφαλογόνωση αποτελούν τους σημαντικότερους. Η υδρολυτική αφαλογόνωση περιλαμβάνει την αντικατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο του ατόμου χλωρίου με μια υδροξυλομάδα προερχόμενη από ένα μόριο νερού (εικόνα 1.9A). Η αναγωγική αφαλογόνωση περιλαμβάνει την αντικατάσταση του ατόμου χλωρίου με ένα άτομο υδρογόνου (εικόνα 1.9B). Η οξειδωτική αφαλογόνωση περιλαμβάνει την αντικατάσταση ενός ατόμου χλωρίου με μια υδροξυλομάδα της

οποίας το άτομο οξυγόνου προέρχεται από το μοριακό οξυγόνο O₂. Η οξειδωτική αφαλογόνωση χωρίζεται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν το ένζυμο που συμμετέχει είναι μονοξυγενάση ή διοξυγενάση. Η μονοξυγενάση προσθέτει ένα άτομο οξυγόνου στον δακτύλιο για την αφαίρεση ενός ατόμου χλωρίου (εικόνα 1.9Γ) ενώ η διοξυγενάση προσθέτει δύο άτομα οξυγόνου στον δακτύλιο για την αφαίρεση ενός ατόμου χλωρίου (εικόνα 1.9Δ) (Arora & Bae, 2014; Haggblom & Bossert, 2004).



Εικόνα 1.9 (Α) Υδρολυτική αφαλογόνωση της χλωροθαλονίλης με μια αφαλογονάση της χλωροθαλονίλης (Β) Αναγωγική αφαλογόνωση της 2,5-διχλωροϋδροκινόνης με μία αφαλογονάση της 2,5-διχλωροϋδροκινόνης (LinD) (Γ) Αφαλογόνωση της πενταχλωροφαινόλης με πενταχλωροφαινόλη-4-μονοοξυγενάση (PcpB); (Δ) Αφαλογόνωση του 1,2,4,5-τετραχλωροβενζολίου με μια διοξυγενάση του χλωροβενζολίου (Arora & Bae, 2014).

2.4.2 Ένζυμα αφαλογόνωσης

2.4.2.1 Οι αφαλογονάσες των αλογονοαλκανίων

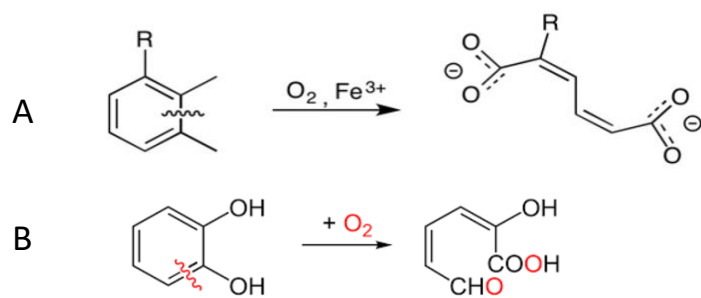
Οι αφαλογονάσες των αλογονοαλκανίων (HDLs) (haloalkane dehalogenases) αποτελούν σημαντικά ένζυμα για την αποικοδόμηση των αλογονούχων αλειφατικών ενώσεων. Ανήκουν στις α/β-υδρολάσες (a/b-hydrolase superfamily) και διασπών τον δεσμό άνθρακα-αλογόνου με υδρόλυση (Li & Shao, 2014). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν αντιδράσεις σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων και παρουσιάζουν ειδίκευση προς τους μονο-,δι- και τρι-υποκατεστημένους αλογονόχους υδρογονάνθρακες μικρής αλυσίδας (C2–C8) (Dravis, Lejeune, Hetro, & Russell, 2000). Βρίσκουν έναν μεγάλο αριθμό εφαρμογών όπως βιομηχανική βιοκατάλυση, βιοεξυγίανση, αποτοξίνωση και βιοανίχνευση (Koudelakova et al., 2011).

2.4.3 Ένζυμα διάσπασης των αρωματικών δακτυλίων

2.4.3.1 Οι διοξυγενάσες της κατεχόλης

Μεταξύ των διάφορων βιοκαταλυτών, οι διοξυγενάσες της κατεχόλης είναι τα βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στη διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου (Pankaj Kumar Arora, Alok Srivastava, 2010). Αποτελούν μεταλλοπρωτεϊνικά ένζυμα που πραγματοποιούν την οξειδωτική διάσπαση των κατεχολών και παρουσιάζουν ειδίκευση σε ποικιλία υποστρωμάτων. Το ενεργό κέντρο των βιοκαταλυτών αυτών ενσωματώνει συνήθως άτομο σιδήρου, ωστόσο υπάρχουν και ένζυμα που περιέχουν μαγγάνιο (Boyd et al., 2001).

Η 1,2-διοξυγενάση της κατεχόλης (1,2-CD) και η 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης (2,3-CD) μπορούν να διακριθούν με βάση τα προϊόντα που δίνουν και τα συμπράγοντά τους. Η 1,2-CD χρησιμοποιεί Fe^{3+} ως συμπράγοντα για να διασπάσει το δεσμό άνθρακα-άνθρακα μεταξύ των φαινολικών υδροξυλομάδων της κατεχόλης, αποδίδοντας ως προϊόν το μουκονικό οξύ (muconic acid) όπως φαίνεται στην εικόνα 1.10A. Αντίθετα, η 2,3-CD χρησιμοποιεί το Fe^{2+} ως συμπράγοντα για να διασπάσει τον δεσμό άνθρακα-άνθρακα που βρίσκεται δίπλα στις φαινολικές υδροξυλομάδες της κατεχόλης, δίνοντας ως προϊόν την 2-υδροξυμονοαλδεΰδη (2-hydroxymuconaldehyde) όπως απεικονίζεται στην εικόνα 1.10B (Gibson & Parales, 2000; Solomon et al., 2000).



Εικόνα 1.10 (A) Η 1,2-CTD χρησιμοποιεί Fe^{3+} ως συμπαράγοντα για την διάσπαση του δεσμού άνθρακα-άνθρακα μεταξύ των φαινολικών υδροξυλομάδων της κατεχόλης, αποδίδοντας έτσι ως προϊόν το *cis,cis*-μουκονικό οξύ. (B) Η 2,3-CTD χρησιμοποιεί Fe^{2+} ως συμπαράγοντα για την διάσπαση του δεσμού άνθρακα-άνθρακα που βρίσκεται δίπλα στις φαινολικές υδροξυλομάδες της κατεχόλης δίνοντας ως προϊόν την 2-υδροξυμυκκοαλδεύδη

Κεφάλαιο 3 Οι βιοτεχνολογικές δυνατότητες των μυκήτων

Οι μύκητες είναι μοναδικοί οργανισμοί λόγω των μορφολογικών, φυσιολογικών και γενετικών χαρακτηριστικών τους. Είναι ετερότροφοι, βρίσκονται σχεδόν παντού στη Γη και μπορούν να αποικίσουν όλα τα υποστρώματα (χώμα, νερό, αέρα), στα οποία και παίζουν πρωταρχικό ρόλο για τη διατήρηση της ισορροπίας των οικοσυστημάτων. Η τεράστια εξελικτική επιτυχία αυτής της ομάδας οργανισμών αποδεικνύεται από τον υψηλό αριθμό ειδών που διαθέτει, την ποικιλία και διαφορετικότητα των περιοχών που αναπτύσσονται, την ικανότητα συμβίωσης (τόσο αμοιβαία όσο και παθολογικά) με άλλους οργανισμούς (κυρίως φυτά και ζώα), και την ικανότητα επιβίωσης κάτω από συνθήκες απαγορευτικές για τους περισσότερους οργανισμούς.

3.1 Βιομηχανικές εφαρμογές μυκητιακών βιοκαταλυτών

Οι μυκητιακοί βιοκαταλύτες βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στην βιομηχανία. Η παγκόσμια αγορά βιοκαταλυτών για βιομηχανικές εφαρμογές ήταν περίπου 4,8 δισεκατομμύρια δολάρια το 2014 και αναμένεται να φτάσει τα 7,1 δισεκατομμύρια δολάρια μέχρι το 2018 και τα 10 δισεκατομμύρια δολάρια μέχρι το 2020 (Nikolaivits et al., 2017). Εκτός από τις ελκυστικές ιδιότητες που διαθέτουν, όπως η αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και υψηλές πιέσεις (Dalmaso et al., 2015), η ικανότητα των μυκήτων που προέρχονται από τη θάλασσα να αναπτυχθούν σε σχετικά απλά και φθηνά υποστρώματα και να παράγουν ένζυμα με διαφορετικά φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους τοποθετεί στην πρώτη γραμμή των σύγχρονων εμπορικών εφαρμογών (Bonugli-Santos et al., 2015).

3.2 Περιβαλλοντικές εφαρμογές μυκητιακών βιοκαταλυτών

Πρακτικά όλες οι φυσικές οργανικές ενώσεις μπορούν να διασπαστούν από ένα ή περισσότερα είδη μυκήτων χάρη στην παραγωγή μιας ποικιλίας ενζύμων όπως αμυλάσες, λιπάσες και πρωτεάσες. Ένας πιο περιορισμένος αριθμός ειδών μπορεί να χρησιμοποιήσει πηκτίνες, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη ως πηγές άνθρακα. Τέλος, ορισμένοι μύκητες είναι οι κύριοι αποικοδομητές φυσικών πολυμερών ιδιαίτερα ανθεκτικών σε μικροβιακές προσβολές, όπως η κερατίνη, η χιτίνη και η λινίνη. Λόγω

της μεγάλης ακρίβειας των ενζύμων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης, οι μύκητες αυτοί μπορούν να προσβάλουν πολλές αρωματικές και αλειφατικές ξενοβιοτικές⁵ ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων διάφορων περιβαλλοντικών ρύπων, όπως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), χρωροφαινολικές ενώσεις, βαφές υφασμάτων, πολυχλωριωμένα διφαινόλια (PCBs) και άλλους έμμοιους οργανικούς ρύπους (POPs) (Πίνακας 1.2) (Bajaj & Singh, 2015; Bonugli-Santos et al., 2015; Pulicherla, 2013; Sardrood et al., 2004).

Πίνακας 1.2 Επισκόπηση των δυνατοτήτων αποικοδόμησης χημικών ενώσεων από μύκητες (Deshmukh et al., 2016).

Χημική ένωση	Μύκητες
1. Έμμοιι οργανικοί ρύποι Πολυχλωριωμένα διφαινόλια	<i>Doratomyces nanus</i> , <i>D. purpureofuscus</i> , <i>D. verrucisporus</i> , <i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>Phoma eupyrena</i> , <i>Thermoascus crustaceus</i> , <i>Aspergillus niger</i>
Πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια	<i>Μύκητες λευκής σήψης</i> , <i>Phanerochaete sordida</i>
2. Συνθετικές βαφές κλωστοϋφαντουργίας	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>T. viride</i> , <i>A. sojae</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Ceriporia metamorphosa</i> , <i>Ganoderma sp.</i>
3. Προϊόντα πετρελαίου Αργό πετρέλαιο	<i>A. niger</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Mucor sp.</i>
Βενζίνη	<i>Exophiala xenobiotica</i>
4. Απορρίμματα από δερματίνη	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus sp. and A. niger</i> <i>Aspergillus jegita</i>
5. Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες Διφαινυλαιθέρας	<i>Μύκητες λευκής σήψης</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Trametes versicolor</i>
Ανθρακένιο	<i>Armillaria sp</i>
Ναφθαλίνη	<i>Μύκητες λευκής σήψης</i> , <i>Pleurotus eryngii</i>
6. Φαρμακευτικά προϊόντα και προϊόντα προσωπικής φροντίδας Καφεΐνη	<i>Chrysosporium keratinophilum</i> , <i>Gliocladium roseum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>A. restrictus</i> , <i>Penicillium and Stemphylium</i>
Φλουοξετίνη, σουλφαμεθοξαζόλη	<i>Bjerkandera sp. R1</i> , <i>Bjerkandera adusta</i> and <i>Phanerochaete chrysosporium</i>
7. Μυκητοκτόνα (Metalaxyl, Folpet)	<i>Gongronella sp. and R. stolonifer</i>
8. Φυτοφάρμακα Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες	<i>P. ostreatus</i>
Οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	<i>Aspergillus terreus</i>
9. Βαρέα μέταλλα	<i>Aspergillus</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Acrimonium</i> , <i>Pythyme</i> <i>Aspergillus flavus</i>

⁵ Ως ξενοβιοτικά χαρακτηρίζονται στο σύνολό τους οι συνθετικές ενώσεις

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι μύκητες είναι εξοπλισμένοι με ένα καλά αναπτυγμένο ενζυμικό σύστημα που τους δίνει την ικανότητα να αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα φυσικών και συνθετικών υποστρωμάτων. Οι μύκητες παράγουν και εκκρίνουν υψηλά ποσοστά διαφορετικών εξωκυτταρικών και εσωκυτταρικών ενζύμων στο περιβάλλον γεγονός που δίνει την ευκαιρία για μεταβολισμό νέων υποστρωμάτων όπως πολλές μη πολικές, μη διαλυτές τοξικές ενώσεις που δεν είναι επιδεκτικές σε ενδοκυτταρικές διεργασίες (Levin et al., 2003; Reddy & Mathew, 2001).

Η μακριά και γεμάτη διακλαδώσεις νηματοειδής δομή των μυκήτων τους δίνει τη δυνατότητα να αναζητούν νέες πηγές ενέργειας και να διεισδύουν στα εσωτερικά στρώματα των υποστρωμάτων τα οποία δεν βρίσκονται σε άμεση επαφή με την υδατική φάση. Άλλο ένα πλεονέκτημα της χρήσης μυκήτων είναι ότι τα ένζυμα που έχουν σημασία στη βιοεξυγίανση παράγονται/διεγείρονται κάτω από συνθήκες ανεπάρκειας θρεπτικών συστατικών (Mansur & Gonza, 2003).

Εκτός από την ικανότητα διείσδυσης σε πληθώρα υποστρωμάτων, οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν υπό δύσκολες περιβαλλοντικές ή και τοξικές συνθήκες (χαμηλό pH και χαμηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά), όπου άλλοι μικροοργανισμοί αναμένεται να έχουν περιορισμένη βιοδραστικότητα (Davies & Westlake, 1979). Οι περισσότεροι μύκητες παρουσιάζουν μικρούς κύκλους ζωής και υψηλότερους ρυθμούς σπορίωσης και επομένως μπορούν να αυξήσουν τους πληθυσμούς τους σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Επιπλέον, μπορούν εύκολα να μεταφερθούν, να τροποποιηθούν γενετικά και να ενισχυθούν. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά και οι δυνατότητες καθιστούν τους οργανισμούς αυτούς στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος για πιθανή χρήση στην αντιμετώπιση των οργανικών ρύπων (Sardrood et al., 2004).

3.3 Θαλάσσια προερχόμενοι μύκητες

Ο ωκεανός μπορεί να θεωρηθεί ως μια μεγάλη δεξαμενή βιοποικιλότητας. Οι μικροβιακές κοινότητες των θαλάσσιων περιβαλλόντων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση των θρεπτικών ουσιών καθώς συμμετέχουν στην αποσύνθεση οργανικών ουσιών και νεκρής ύλης. Οι μύκητες που προέρχονται από τη θάλασσα αποτελούν σημαντική πηγή ενζύμων βιομηχανικού και περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος. Η ικανότητα προσαρμογής των μυκήτων αυτών στις αντίξοες συνθήκες

των ωκεανών τους καθιστά τρομερά ελκυστικούς παράγοντες στον τομέα της βιοτεχνολογίας (Bonugli-Santos et al., 2015).

Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα, την αφθονία και τη κατανομή των μυκήτων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Θαλάσσιοι μύκητες έχουν βρεθεί σε διάφορα υποστρώματα όπως σφουγγάρια, άλγη, ξύλο, μαλάκια, κοράλλια, φυτά και ψάρια. Παράλληλα, περιβαλλοντικά φαινόμενα όπως οι πλημμύρες και οι άνεμοι, μεταφέρουν τους μύκητες σε ακτές, παραλίες και εκβολές ποταμών. Οι μύκητες που προέρχονται από τη θάλασσα συχνά εμφανίζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των χερσαίων ομολόγων τους (Bonugli-Santos et al., 2015). Ωστόσο, η ικανότητά τους να προσαρμόζονται σε υψηλά αλμυρές συνθήκες και σε ακραίες τιμές pH τους παρέχει ένα μεγάλο πλεονέκτημα έναντι των χερσαίων μυκήτων, ενώ έχει επίσης μελετηθεί η ικανότητα τους να ανέχονται υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων όπως ο μόλυβδος και ο χαλκός (Deshmukh et al., 2016).

Η αγορά των θαλάσσιων μυκητιακών ενζύμων σήμερα χωρίζεται σε πέντε τομείς: i) ένζυμα που προορίζονται κυρίως για βιομηχανίες καθαρισμού, κλωστοϋφαντουργίας, δέρματος, βιοκαυσίμων, χαρτοπολτού και χαρτιού, ii) ένζυμα με εφαρμογές στα τρόφιμα και στα ποτά, iii) ένζυμα για ζωοτροφές, iv) ένζυμα που σχετίζονται με περιβαλλοντικές εφαρμογές, (v) και ένζυμα που σχετίζονται με φάρμακα και καλλυντικά (Bonugli-Santos et al., 2015; Cavicchioli, Siddiqui, Andrews, & Sowers, 2002; Pulicherla, 2013; Zhang & Kim, 2012).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4 Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Υλικά

4.1.1 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα διπλωματική εργασία οι βιοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι μικροοργανισμοί (ασκομύκητες), οι οποίοι είναι συμβιώτες ασπόνδυλων (σπόγγοι, μαλακά κοράλλια, ανεμώνες, εχινόδερμα), τα οποία έχουν συλλεχθεί από μεσόφωτα θαλάσσια οικοσυστήματα. Οι μεσόφωτες αυτές περιοχές βρίσκονται στον Ινδικό Ωκεανό, στην Κόκκινη Θάλασσα και στις Ακτές της Ταϊλάνδης. Συνολικά εξετάστηκαν 44 διαφορετικά στελέχη μυκήτων.

4.1.2 Θρεπτικά Μέσα

Για την ανάπτυξη των μυκητιακών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο με εμπορική ονομασία «Marine broth (dehydrated culture media) for microbiology» της εταιρίας Panreac AppliChem (Γερμανία), χωρίς τη χρήση γλυκόζης ή άλλης πηγής άνθρακα. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού σε g/L ήταν η ακόλουθη: βορικό οξύ 0.022, νιτρικό άλας αμμωνίου 0.0016, χλωριούχο ασβέστιο 1.8, χλωριούχο στρόντιο 0.034, εκχύλισμα ζύμης 1, κιτρικό σίδηρο 0,1, χλωριούχο μαγνήσιο 8,8, βακτηριολογική πεπτόνη 5, βρωμιούχο κάλιο 0,08, χλωριούχο κάλιο 0,55, χλωριούχο νάτριο 19,4, φθοριούχο νάτριο 0,0024, ανθρακικό υδρογόνο νάτριο 0,16, φωσφορικό υδρογόνο δινατρίου 0,008, πυριτικό νάτριο 0,004, θειικό νάτριο 3,24.

4.1.3 Οργανικοί Ρύποι

Οι χημικοί ρύποι που μελετήθηκαν ως προς την αποικοδόμησή τους ήταν οι:

- 2,4-διχλωροφαινόλη (2,4-dCP) με μοριακό τύπο $C_{12}H_6Cl_2O$, μοριακού βάρους 163,00 g/mol που προμηθεύτηκε από την εταιρία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α). Η 2,4-dCP που χρησιμοποιήθηκε τόσο στα πειράματα μελέτης της αποικοδόμησης του ρύπου (βλ. ενότητες 4.3.3 και 4.4.2) όσο και στα πειράματα επαγωγής των ενζυμικών ενεργοτήτων (βλ. ενότητα 4.5.1) είχε αρχική συγκέντρωση στο σύστημα αντίδρασης 1 mM (163 ppm). Για τα πειράματα

επαγωγής ενζυμικής ενεργότητας, η 2,4-dCP προερχόταν από stock 50 mM 2,4-dCP. Το stock αυτό παρασκευαζόταν με διάλυση της 2,4-dCP σε υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό. Για τα υπόλοιπα πειράματα παρασκευαζόταν διάλυμα 2,4-dCP σε υπερκάθαρο νερό συγκέντρωσης 1 mM.

- 2,4,5-τριχλωροδιφαινύλιο (PCB No29) με μοριακό τύπο $C_{12}H_7Cl_3$, μοριακού βάρους 257,54 g/mol που προμηθεύτηκε από την εταιρία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.). Λόγω της πολύ χαμηλής διαλυτότητας του ρύπου στο νερό, για τα πειράματα διαλογής των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε διάλυμα κορεσμένο σε PCB 29 που βρισκόταν στους 27 °C, η συγκέντρωση του οποίου μετρήθηκε με αέρια χρωματογραφία (βλ. ενότητα 4.3.1.2).

Ο χειρισμός των ενώσεων αυτών γινόταν με μεγάλη προσοχή λόγω της υψηλής τοξικότητας τους, ενώ εξαιτίας της υψηλής πτητικότητας τους οι περισσότερες εργασίες εκτελούνταν στον απαγωγό.

4.1.4 Συσκευές και όργανα- Αναλώσιμα υλικά

Παρακάτω καταγράφονται οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας:

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- pH-μετρο 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Φωτόμετρο S-22 UV/Vis. Spectrophotometer της BOECO (Γερμανία)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.)

- Φυγόκεντροι J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), Sorvall® RC28S, DuPont (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Zentrifuge Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης Nuova II Stir Plate της Thermolyne και Stirrer Magnetic w Hotplate της Bioline scientific (Ελλάδα)
- Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και Abs 120-4 (KERN & Sohn GmbH)
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices)
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης HPLC SHIMADZU LC-20AD
- Συσκευή αέριας χρωματογραφίας SHIMADZU GC-17A
- Συσκευή φασματομετρίας μάζας ESI-LTQ-Orbitrap Discovery XL της Thermo Scientific (Γερμανία), συνδεδεμένη με συσκευή υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας Accela UHPLC system της Thermo Scientific (Γερμανία)
- Στήλη αφαλάτωσης PD-10
- Στήλη χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής, Bio-Rad (Η.Π.Α.)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

Εκτός των παραπάνω οργάνων, χρησιμοποιήθηκαν και διάφορα εργαστηριακά υλικά όπως, ογκομετρικοί κύλινδροι, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, χωνιά, τρυβλία, eppendorf tubes, falcon tubes, πιπέτες paster και γυάλινα μπουκάλια.

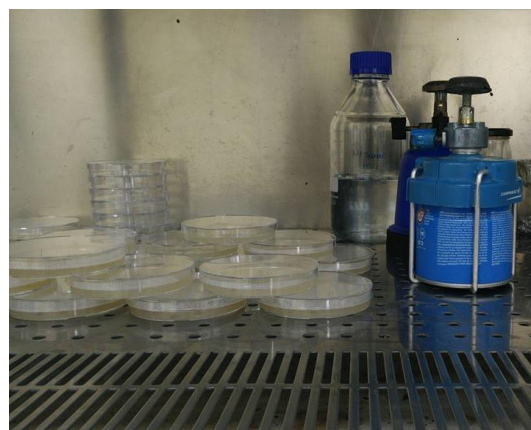
4.2 Καλλιέργειες κυττάρων

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν δύο είδη κυτταρικών καλλιιεργειών, στερεές και υγρές καλλιέργειες. Οι στερεές καλλιέργειες αποσκοπούσαν στη διατήρηση των εξεταζόμενων μικροοργανισμών ενώ οι υγρές καλλιέργειες αποσκοπούσαν στην ανάπτυξη της μυκητιακής βιομάζας για την πραγματοποίηση των διάφορων πειραμάτων.

4.2.1 Στερεές καλλιέργειες

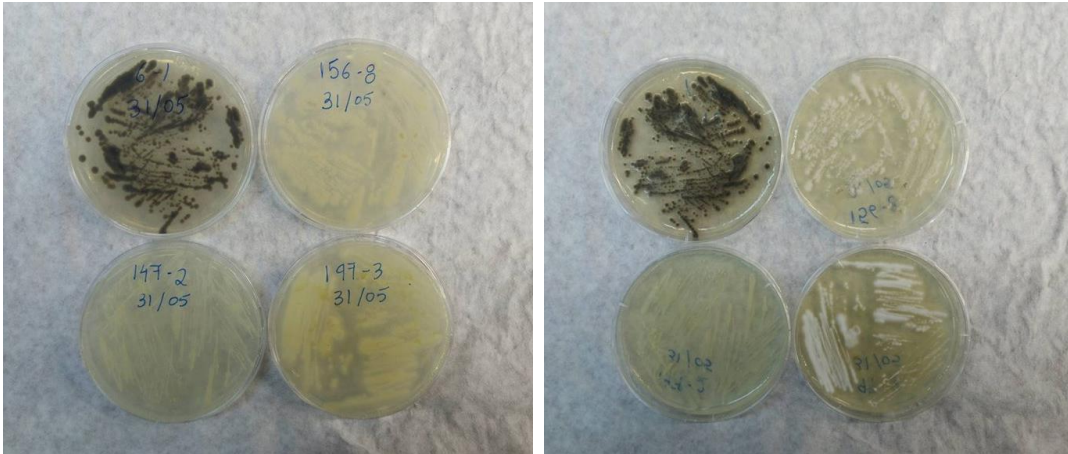
Για την επιτυχή ανάπτυξη στερεών καλλιεργειών ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- I. Διαλυτοποίηση του θρεπτικού υλικού με απιονισμένο νερό σε κωνική φιάλη με συνεχή μαγνητική ανάδευση ώστε το τελικό διάλυμα να αποτελείται από 4% w/v marine broth και 1,5% w/v άγαρ. Το pH του προκύπτον διαλύματος ρυθμίζεται σε 7,6 με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH).
- II. Αποστείρωση του διαλύματος σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά και υπό πίεση 0,1 MPa, ύστερα από σφράγισμα της ογκομετρικής φιάλης με τη χρήση αλουμινόχαρτου.
- III. Έκχυση του θρεπτικού μέσου σε τρυβλία petri (περίπου 25 mL θρεπτικού ανά τρυβλίο) κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε ειδικά διαμορφωμένο απαγωγό (laminar flow cabinet), όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1. Αφού στερεοποιηθεί το περιεχόμενο κάθε τρυβλίου, πραγματοποιείται ο εμβολιασμός με τους μικροοργανισμούς υπό ασηπτικές συνθήκες και πάλι. Ο εμβολιασμός των μυκητιακών καλλιεργειών διεξήχθη χρησιμοποιώντας μικύλιο προερχόμενο από απόθεμα γλυκερίνης.
- IV. Τοποθέτηση τρυβλίων σε επωαστήρα στους 27°C για 5 ημέρες.
- V. Αφαίρεση τρυβλίων στο πέρας του χρόνου επώασης προς σφράγιση με parafilm για διατήρηση στο ψυγείο στους 4°C. Στην εικόνα 2.2 παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένες στερεές καλλιέργειες στο πέρας του χρόνου επώασης.



Εικόνα 2.1 Τρυβλία Petri (αριστερά) έτοιμα για εμβολιασμό κάτω από ασηπτικές συνθήκες στον απαγωγό.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Εικόνα 2.2 Εμβολιασμένα τρυβλία petri τεσσάρων διαφορετικών μικροοργανισμών ύστερα από 5 μέρες ανάπτυξης σε επωαστήρα στους 27°C. Στα αριστερά φαίνεται η πίσω όψη ενώ στα δεξιά η μπροστινή όψη των τρυβλίων.

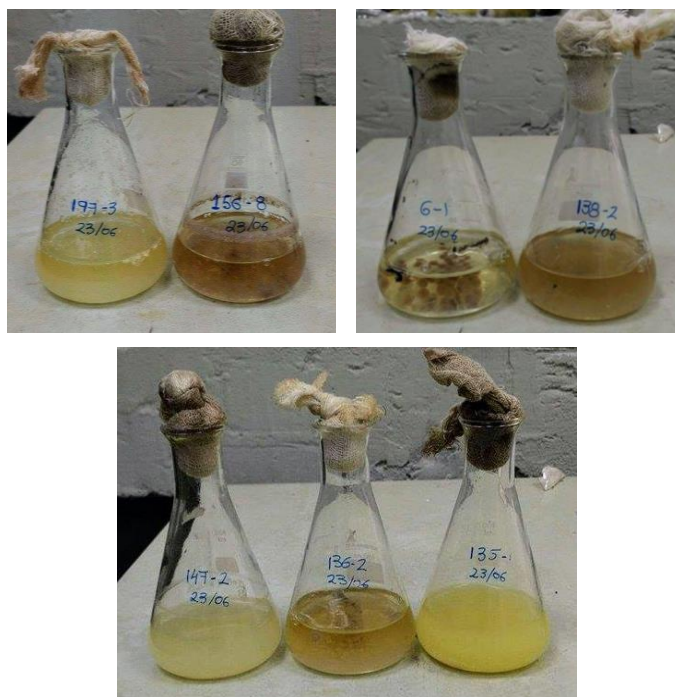
4.2.2 Υγρές καλλιέργειες

Η μέθοδος που ακολουθείται είναι παρόμοια με αυτήν που περιγράφηκε παραπάνω για τις στερεές καλλιέργειες. Το θρεπτικό μέσο που παρασκευάζεται αποτελείται μόνο από 4% w/v Marine broth διαλυμένο σε απιονισμένο νερό (pH 7,6). Το προκύπτον διάλυμα σφραγίζεται με βαμβάκι και αλουμινοχαρτο (εικόνα 2.3) και αποστειρώνεται. Στην συνέχεια, αφού έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γίνεται ο εμβολιασμός από στερεές καλλιέργειες απευθείας στον όγκο του θρεπτικού μέσου, κάτω από



Εικόνα 2.3 Κοινικές φιάλες με θρεπτικό υλικό μέσα σε καλάθι αποστείρωσης που προορίζονται για υγρές καλλιέργειες.

ασηπτικές συνθήκες. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί για τις υγρές καλλιέργειες στον επωαστήρα είναι πάντα οι ίδιες, δηλαδή θερμοκρασία 27°C και ανάδευση 120 rpm, και δεν θα αναφέρονται στην υπόλοιπη εργασία. Ο χρόνος ανάπτυξης των μικροοργανισμών εξαρτάται από το εκάστοτε πείραμα. Στην εικόνα 2.4 παρουσιάζονται οι υγρές καλλιέργειες για 7 διαφορετικά στελέχη.



Εικόνα 2.4 Υγρές καλλιέργειες 7 μικροοργανισμών. ύστερα από 3 μέρες επόασης.

4.3 Διαλογή μικροοργανισμών για τη δυνατότητα αποικοδόμησης των ρύπων

Στόχος της διαλογής (screening) αποτέλεσε η ανάδειξη των αποτελεσματικότερων μικροοργανισμών ως προς την αποικοδόμηση του PCB 29 και της 2,4-dCP. Ανάλογα με την φύση του κάθε ρύπου πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις χρησιμοποιώντας είτε Αέρια Χρωματογραφία (GC) είτε Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία (HPLC).

Ο γενικός όρος ‘χρωματογραφία’ αναφέρεται σε ένα πλήθος μεθόδων ανάλυσης και τεχνικών διαχωρισμού, που βασίζονται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινητής φάσης, που μπορεί να είναι υγρή ή αέρια και μίας στατικής φάσης που μπορεί να είναι στερεή ή υγρή (Παππά Α., 2004).

4.3.1 Ανάλυση του PCB 29

Ο διαχωρισμός στην αέρια χρωματογραφία συμβαίνει στην αέρια φάση, συνεπώς τα στερεά και υγρά δείγματα πρέπει πρώτα να αεριοποιηθούν. Οι ενώσεις που αναλύονται με GC πρέπει να είναι θερμικά σταθερές και με ικανοποιητική πτητικότητα. Συνήθως χρησιμοποιούνται υγρές στατικές φάσεις ενώ η κινητή φάση

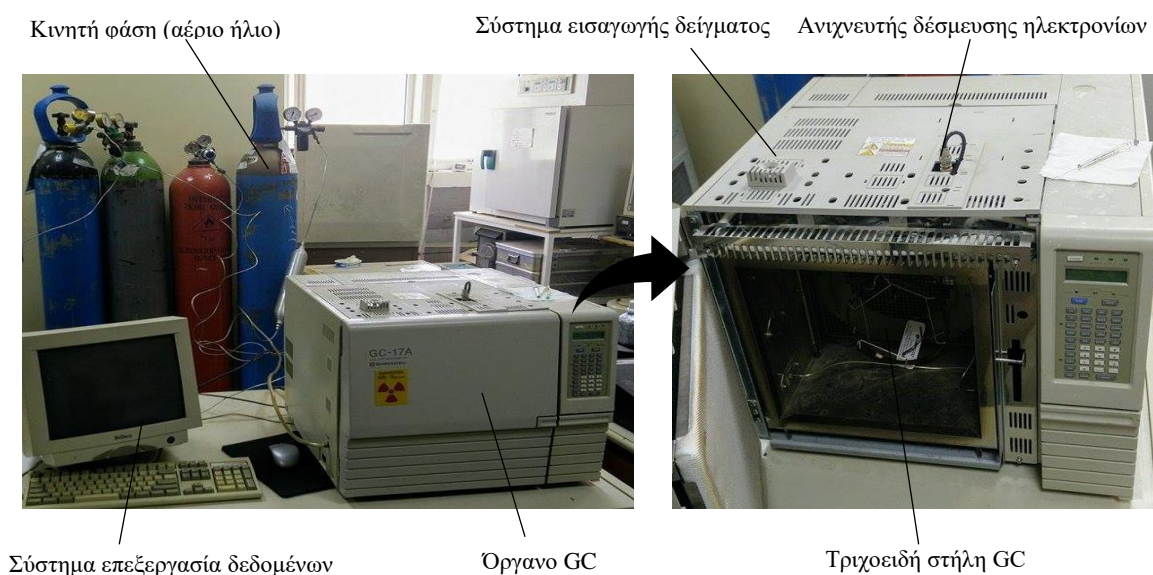
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

είναι ένα αδρανές αέριο (ήλιο, άζωτο, υδρογόνο). Σε αντίθεση με την υγρή χρωματογραφία, η κινητή φάση δεν αλληλοεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Ο μόνος ρόλος της κινητής φάσης είναι η διακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης.

Τα βασικά τμήματα ενός συστήματος GC είναι:

- σύστημα παροχής κινητής φάσεως (φέρων αέριο)
- σύστημα εισαγωγής δείγματος
- στήλη
- ανιχνευτής και
- σύστημα επεξεργασίας δεδομένων

Στην εικόνα 2.5 παρουσιάζεται το σύστημα αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε με επισημασμένα τα διάφορα τμήματα του.



Εικόνα 2.5 Οργανολογία συστήματος αέριας χρωματογραφίας (GC)

4.3.1.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα από τις αντιδράσεις διαλογής του PCB 29 εκχυλίστηκαν με ίσο όγκο οξικού αιθυλεστέρα πριν από την ανάλυση τους στην συσκευή αέριας χρωματογραφίας.

4.3.1.2 Πρόγραμμα ανάλυσης δειγμάτων

Το PCB 29 αναλύθηκε με τη χρήση συσκευής SHIMADZU GC-17A που ενσωματώνει τριχοειδή στήλη GC των 30 m Equity®-5. Η κινητή φάση ήταν αέριο ήλιο με ρυθμό ροής $1,8 \text{ mL min}^{-1}$. Δείγματα $1 \mu\text{L}$ εγχύθηκαν με ή/και χωρίς διαχωρισμό ροής (split/splitless mode) και η θυρίδα έγχυσης διατηρήθηκε στους 280°C . Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- i. 90°C για 3 λεπτά,
- ii. αύξηση στους 220°C με ρυθμό $30^\circ\text{C min}^{-1}$ και διατήρηση σε αυτή τη θερμοκρασία για 1 λεπτό,
- iii. αύξηση στους 280°C με ρυθμό $25^\circ\text{C min}^{-1}$ και διατήρηση σε αυτή τη θερμοκρασία για 2 λεπτά.

Η ανίχνευση διεξήχθη με ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων ECD-17 με δραστηριότητα 10 mCi , διατηρούμενο στους 300°C . Ο χρόνος ανασχεσης του PCB 29 ήταν περίπου $10,35$ λεπτά, ενώ η αρχική συγκέντρωση του υπολογίστηκε ίση με $0,97 \mu\text{M}$ ($0,25 \text{ ppm}$).

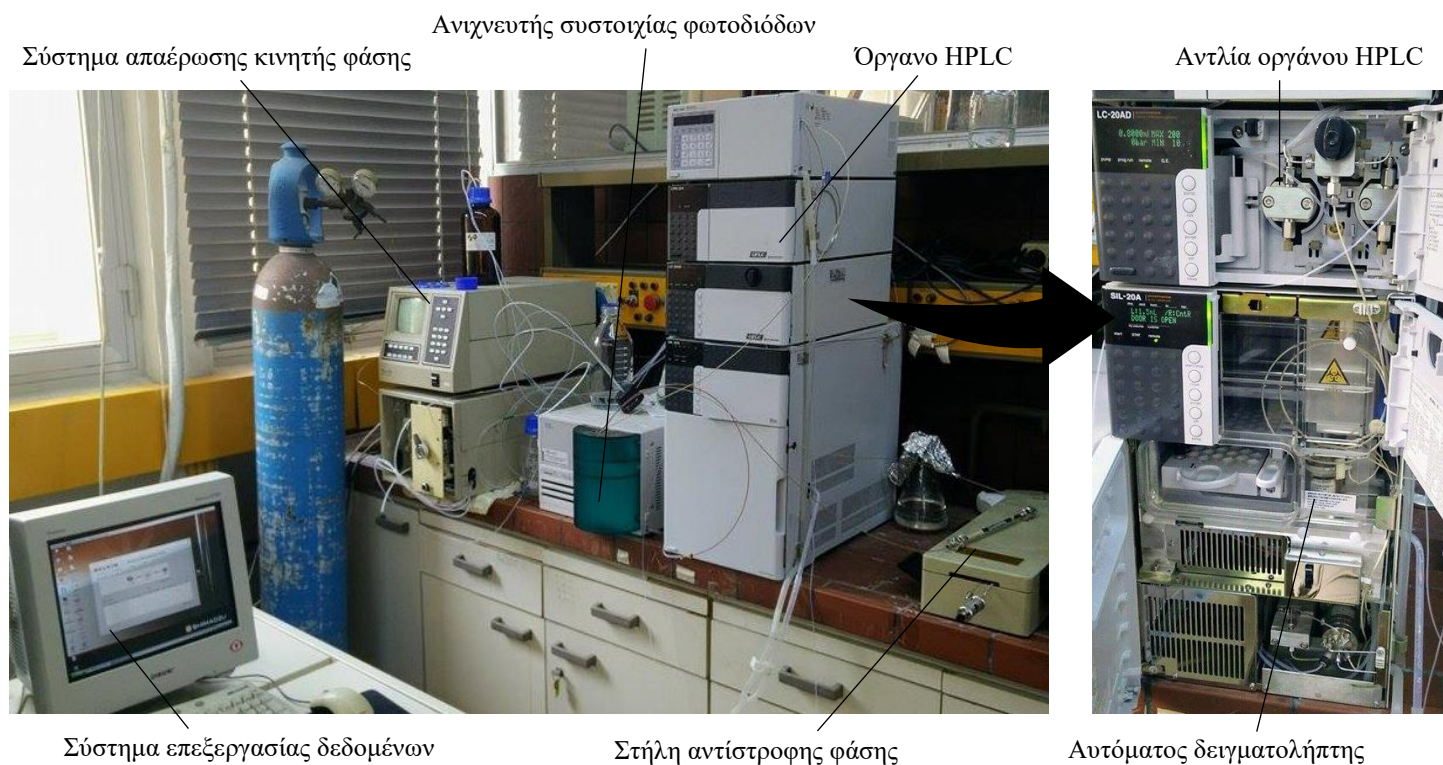
4.3.2 Ανάλυση της 2,4-dCP

Η θεωρητική ανάπτυξη της HPLC στηρίχθηκε στις βασικές αρχές της υγρής χρωματογραφίας, ενώ η ανάπτυξη της οργανολογίας της στην αέρια χρωματογραφία (GC) (Παππά Α., 2004). Τα βασικά τμήματα ενός συστήματος HPLC είναι:

- σύστημα παροχής κινητής φάσεως
- σύστημα εισαγωγής δείγματος,
- στήλη
- ανιχνευτής και
- καταγραφέας

Στην εικόνα 2.6 παρουσιάζεται το σύστημα υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε με επισημασμένα τα διάφορα τμήματα του.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Εικόνα 2.6 Οργανολογία συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Όταν η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση έχουμε ισοκρατική έκλουση (isocratic elution), ενώ όταν μεταβάλλεται βαθμιαία έχουμε σταδιακή έκλουση (gradient elution). Η κινητή φάση στην HPLC συμμετέχει ενεργά στο διαχωρισμό. Η επιτυχία ενός υγρού χρωματογραφικού διαχωρισμού εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δείγματος, σταθερής φάσης και διαλύτη έκλουσης. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη έκλουσης γίνεται με βάση τη δύναμη (solvent strength) και την εκλεκτικότητα (selectivity) του διαλύτη. Η δύναμη του διαλύτη θα πρέπει να έχει τέτοια τιμή ώστε τα συστατικά του δείγματος να εκλύονται σε χρόνο διάφορο του νεκρού χρόνου της στήλης (Παππά, 2004).

4.3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα πριν την ανάλυση τους εκχυλίστηκαν με ίσο όγκο χλωροφορμίου. Προκειμένου να αποφευχθεί η φόρτωση χλωροφορμίου στη στήλη της HPLC, ο όγκος της οργανικής φάσης εξατμίστηκε και στη συνέχεια επαναδιαλύθηκε σε ίδιο όγκο της κινητής φάσης HPLC πριν αναλυθεί.

4.3.2.2 Πρόγραμμα ανάλυσης δειγμάτων

Η 2,4-dCP αναλύθηκε μέσω συσκευής HPLC SHIMADZU LC-20AD εξοπλισμένης με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20A. Η στατική φάση ήταν μία στήλη NUCLEOSIL® 100-5 αντίστροφης φάσης C-18 και η κινητή φάση ήταν 40% (v/v) ακετονιτρίλιο σε νερό με ροή 0.8 mL min^{-1} . Η ανίχνευση της 2,4-dCP πραγματοποιήθηκε με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (photodiode array) Varian ProStar στα 285 nm και ο χρόνος ανάλυσης ήταν περίπου 11 λεπτά.

4.3.3 Μέθοδος διαλογής μικροοργανισμών

Παρακάτω παρουσιάζονται τα βήματα που έγιναν για την διαδικασία της διαλογής:

I. Παραγωγή βιομάζας

Τα διάφορα μυκητιακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες (βλ. ενότητα 4.2.2) για 5 ημέρες σε φιάλες Erlenmeyer (250 mL) με όγκο εργασίας 50 mL. Μετά το τέλος της ζύμωσης η βιομάζα διηθήθηκε και εκπλύθηκε με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση εναπομείναντος θρεπτικού υλικού, ενώ μετρήθηκε και το βάρος της (για κάθε έναν από τους 44 μικροοργανισμούς).

II. Βιοκαταλυτικές αντιδράσεις

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή των κυττάρων σε ηρεμία (resting cells). Αναλυτικότερα, έγινε προσθήκη μυκητιακής βιομάζας σε υδατικό διάλυμα με τον προς εξέταση ρύπο σε συγκέντρωση 10% (w/v) νωπής βιομάζας. Η βιομετατροπή διεξήχθη σε φιάλες Erlenmeyer των 50 mL που περιείχαν 10-15 mL από το υδατικό διάλυμα του ρύπου (ανάλογα με την ποσότητα της προστιθέμενης βιομάζας). Πραγματοποιήθηκαν επίσης δύο αντιδράσεις ελέγχου. Η πρώτη περιείχε μόνο τον ρύπο χωρίς τον βιοκαταλύτη (κύτταρα) και η άλλη περιείχε μόνο τον βιοκαταλύτη σε απιονισμένο νερό. Και οι δύο αντιδράσεις ελέγχου σχεδιάστηκαν προκειμένου να γίνει εκτίμηση οποιουδήποτε είδους αποικοδόμησης του ρύπου ή αντίστοιχα των μυκητιακών κυττάρων που θα επηρέαζαν την επακόλουθη χρωματογραφική ανάλυση.

III. Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία από κάθε βιοκαταλυτική αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε χρόνους 3, 6 και 10 ημερών. Πιο συγκεκριμένα, για τις πρώτες δύο δειγματοληψίες (3^η και 6^η ημέρας) ελήφθησαν 0.5 mL του μέσου αντίδρασης (χωρίς κύτταρα) ενώ για την 10^η

ημέρα, ελήφθη ολόκληρος ο όγκος της αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων.

4.4 Μελέτη του μηχανισμού αποικοδόμησης της 2,4-dCP

Στο κομμάτι αυτό έγινε προσπάθεια διαλεύκανσης του μηχανισμού με τον οποίο οι μύκητες βιομετατρέπουν τον ρύπο με βάση τους μεταβολίτες που παράγουν. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με συνδυασμένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS).

4.4.1 Ταυτοποίηση των μεταβολιτών από την αποικοδόμηση της 2,4-dCP

Για την ταυτοποίηση των διαχωρισθέντων ουσιών ο υγρός χρωματογράφος μπορεί να συνδεθεί με φασματόμετρο μάζας (MS) σε μια ενιαία διάταξη δημιουργώντας την συνδυασμένη τεχνική LC-MS. Το MS έχει τη θέση ενός εκλεκτικού ανιχνευτή, που ανιχνεύει συνεχώς την έξοδο της χρωματογραφικής στήλης. Βασίζεται στην παραγωγή ιόντων κατά τον ιονισμό του μορίου και τον διαχωρισμό τους βάσει του λόγου m/z , όπου m η μάζα του ιόντος και z το φορτίο του ιόντος (Παππά Α., 2004).

4.4.1.1 Σύστημα LC-MS και εφαρμοζόμενο πρόγραμμα ανάλυσης δειγμάτων

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα φασματόμετρο μάζας ESI-LTQ-Orbitrap Discovery XL της Thermo Scientific (Γερμανία) συνδεδεμένο με ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας Accela UHPLC της Thermo Scientific (Γερμανία). Ο αναλυτής Orbitrap είναι από τους πιο πρόσφατους, τελευταίας τεχνολογίας αναλυτής μαζών και λειτουργεί παγιδεύοντας ιόντα σε κυκλική κίνηση. Αποτελείται από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο με σχήμα ατράκτου και ένα εξωτερικό κυλινδρικό ηλεκτρόδιο, ομοαξονικό με το κεντρικό ηλεκτρόδιο. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης Fortis UPLC C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m) της Fortis Technologies Ltd. Η κινητή φάση αποτελούταν από 0,1% (v/v) μυρμηκικό οξύ / νερό (διαλύτης Α) και ακετονιτρίλιο (διαλύτης Β). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μέθοδος σταδιακής έκλυσης 30 λεπτών με ροή 0,4 mL min⁻¹ ως εξής:

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- i. 0 έως 24 λεπτά: 95% A: 5% B,
- ii. 24 έως 28 λεπτά: 5% A: 95% B,
- iii. 28 έως 30 λεπτά: 95% A: 5% B.

Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40°C. Ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL. Η ανάλυση των δειγμάτων διεξήχθη με μέθοδο φασματομετρίας μάζας με ηλεκτροψεκασμό θετικών (ESI+) και αρνητικών (ESI-) ιόντων. Οι συνθήκες για τους δύο τρόπους ιονισμού καθορίστηκαν ως εξής:

- i. Για τον (ESI+), η θερμοκρασία στην τριχοειδή είσοδο δείγματος και η τάση μεταξύ των ηλεκτροδίων ρυθμίστηκαν στους 320°C και 40 V, αντίστοιχα. Η ροή αερίου εκνέφωσης ρυθμίστηκε σε 40 arb και η ροή του βοηθητικού αερίου στα 8 arb. Η τάση ψεκασμού ρυθμίστηκε σε 3,6 kV και η τάση φακού του σωλήνα (tube lens) στα 120 V.
- ii. Για τον (ESI-) η θερμοκρασία στην τριχοειδή είσοδο δείγματος και η τάση μεταξύ των ηλεκτροδίων ρυθμίστηκαν στους 320°C και -20 V αντίστοιχα. Η ροή αερίου εκνέφωσης ρυθμίστηκε σε 40 arb και η ροή του βοηθητικού αερίου στα 8 arb. Η τάση ψεκασμού ρυθμίστηκε στα 2,7 kV και η τάση του φακού του σωλήνα (tube lens) στα -80 V.

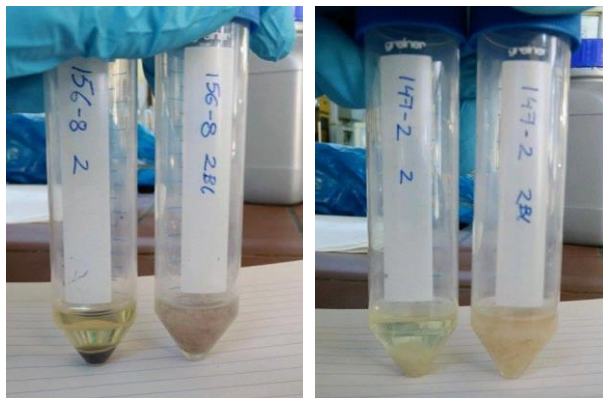
Μετά την ανίχνευση του ιοντικού ρεύματος εφαρμόστηκε μετασχηματισμός Fourier (FT) για τη μετατροπή του σήματος σε φάσμα m/z (FTMS). Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε για μια περιοχή μάζας 100-1000 Da.

4.4.2 Βιοκαταλυτικές αντιδράσεις αποικοδόμησης της 2,4-dCP

Τα πειραματικά στάδια της μελέτης αυτής περιλαμβάνουν την αρχική παραγωγή βιομάζας, όπως αυτή περιγράφηκε στην ενότητα 4.3.3, με την διαφορά πως οι ανάπτυξη των μυκητιακών καλλιεργειών έγινε σε φιάλες Erlenmeyer (500 mL) με όγκο εργασίας 200 mL. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη μυκητιακής βιομάζας σε υδατικό διάλυμα με τον προς εξέταση ρύπο σε συγκέντρωση 10% (w/v) νωπής βιομάζας. Η βιομετατροπή διεξήχθη σε falcon tubes όγκου 50 mL που περιείχαν 5 mL από το υδατικό διάλυμα του ρύπου. Πραγματοποιήθηκαν επίσης δύο αντιδράσεις ελέγχου. Η πρώτη περιείχε μόνο τον ρύπο χωρίς τον βιοκαταλύτη (κύτταρα) και η άλλη περιείχε μόνο τον βιοκαταλύτη σε απιονισμένο νερό. Η δειγματοληψία από κάθε βιοκαταλυτική

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε χρόνους 2, 5 και 9 ημερών (εικόνα 2.7). Δεν πραγματοποιήθηκε κάποια εκχύλιση πριν την ανάλυση του εξωκυτταρικού υγρού με LC-MS (βλ. ενότητα 4.4.1).



Εικόνα 2.7 Δείγματα από την δειγματοληψία της πέμπτης ημέρας για τα πειράματα του 2,4-dCP. Για κάθε ζεύγος που απεικονίζεται, αριστερά είναι η αντίδραση και δεξιά το τυφλό.

4.5 Μέθοδοι επαγωγής και μέτρησης ενζυμικών ενεργοτήτων

Στη συνέχεια της προσπάθειας διαλεύκανσης του μηχανισμού με τον οποίο οι μύκητες βιομετατρέπουν την 2,4-dCP, έγιναν δοκιμές προσδιορισμού συγκεκριμένων ενζυμικών ενεργοτήτων, οι οποίες μπορεί να εμπλέκονται στην αποτοξικοποίηση. Για τον σκοπό αυτό έγινε προσθήκη διάφορων επαγωγέων ώστε να διεγείρουν την παραγωγή των επιθυμητών ενζύμων. Τα ένζυμα που εξετάστηκαν ήταν οι διοξυγενάσες της κατεχόλης (1,2-CD και 2,3-CD) και οι αφαλογονάσες των αλογονοαλκανίων.

4.5.1 Επαγωγή ενζυμικών ενεργοτήτων 1,2-CD, 2,3-CD και αφαλογονασών με 2,4-dCP

Η προσθήκη της 2,4-dCP πραγματοποιήθηκε 3 μέρες μετά τον εμβολιασμό των υγρών καλλιεργειών με τους μικροοργανισμούς και οι συνθήκες ανάπτυξης παραμένουν ίδιες. Οι δειγματοληψίες έγιναν στις 15, 23, 39, 45, 63 και 69 ώρες. Στην εικόνα 2.8 απεικονίζονται τα δείγματα των 45 ωρών. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο Eppendorf πάγκου με σκοπό την απομάκρυνση στερεών που ελήφθησαν κατά την δειγματοληψία (κύτταρα, θρεπτικό). Τέλος, 0,5 mL από κάθε δείγμα οδηγήθηκε σε βρασμό για 10 min. Τα βρασμένα αυτά δείγματα χρησίμευσαν

ως δείγματα ελέγχου στις αναλύσεις που ακολούθησαν. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας σε πάγο $T = 4^{\circ}\text{C}$.



Εικόνα 2.8 Δείγματα από την δειγματοληψία των 45 ωρών σε Eppendorf tubes.

4.5.2 Επαγωγή ενζυμικής ενεργότητας 2,3-CD με βενζοϊκό οξύ

Σε αυτή τη μέθοδο ο επαγωγέας προστέθηκε στις υγρές καλλιέργειες ταυτόχρονα με τα μυκητιακά κύτταρα. Ως επαγωγέας χρησιμοποιήθηκε το βενζοϊκό οξύ. Οι συνθήκες εξέλιξης του πειράματος ήταν οι ίδιες με αυτές της προηγούμενης παραγράφου (27°C και 120 rpm). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις 20, 23, 26, 29 και 32 ώρες μετά την έναρξη του πειράματος.

4.5.3 Επαγωγή ενζυμικής ενεργότητας αφαλογονασών με 2-χλωροβουτάνιο και με 2-χλωροπροπάνιο

Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μεθοδολογίες για την επαγωγή της ενεργότητας των αφαλογονασών, μία με επαγωγέα το 2-χλωροβουτάνιο και μια με επαγωγέα το 2-χλωροπροπάνιο. Οι δύο αυτοί επαγωγείς προστέθηκαν στις υγρές καλλιέργειες ταυτόχρονα με τα μυκητιακά κύτταρα

4.5.4 Μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων

Η μέτρηση των ενζυμικών ενεργοτήτων πραγματοποιήθηκε σε πλάκα υπεριώδους ακτινοβολίας με την χρήση οργάνου microplate reader Spectra Max 250. Παρακάτω παρουσιάζονται τα πειράματα δοκιμής ενεργότητας (assays) που πραγματοποιήθηκαν για κάθε ένζυμο.

4.5.4.1 Διοξυγενάσεις

Το μίγμα της αντίδρασης για τις 1,2-CD και 2,3-CD αποτελούταν από 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος tris base $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ συγκέντρωσης 50 mM και pH 7 με 3% w/v γλωριούχο μαγνήσιο ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 25 μL υποστρώματος κατεχόλης συγκέντρωσης 10 mM και 25 μL ενζύμου. Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθήθηκε μετρώντας το προϊόν cis, cis-μουκονικό οξύ (cis,cis muconic acid) στα 260 nm (για την μέτρηση της ενεργότητας της 1,2-CD) και μετρώντας το προϊόν 2-υδροξυμουκονική ημι-αλδεΐδη (2-hydroxymuconic semialdehyde) στα 375 nm (για την μέτρηση της ενεργότητας της 2,3-CD) για 30 λεπτά. 1 unit ενεργότητας 1,2-CD και 2,3-CD ορίζεται ως η ποσότητα ενζύμου που παράγει 1 μmol προϊόντος ανά λεπτό στους 35°C. Κατά τους υπολογισμούς των συγκεντρώσεων C από τις απορροφήσεις A εφαρμόστηκε ο νόμος του Beer-Lambert ($A = \epsilon \cdot b \cdot C$) όπου το μήκος της κυψελίδας ήταν ίσο με $b = 0.6 \text{ cm}$ και η μοριακή απορροφητικότητα $\epsilon = 1680 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ και $36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ για το cis, cis-μουκονικό οξύ και 2-υδροξυμουκονική ημι-αλδεΐδη αντίστοιχα.

4.5.4.2 Αφαλογονάσεις

Αρχικά παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα A με pH 8,2 σύστασης 1 mM HEPES, 20 mM sodium sulphate, 1 mM EDTA και 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phenol red. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούταν από 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος A, 25 μL 2,4-dCP συγκέντρωσης 5 mM και 25 μL ενζύμου. Η πρόοδος της αντίδρασης (30 λεπτά) παρακολουθήθηκε μετρώντας την αλλαγή του χρώματος (από ροζ σε κίτρινο) με μείωση της απορρόφησης στα 540 nm, που οφείλεται στη μείωση του pH.

4.6 Μέθοδοι προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Παράλληλα με τον προσδιορισμό των ενζυμικών ενεργοτήτων έγινε και προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε η μέθοδος Bradford που παρουσιάζεται παρακάτω:

Για τις ανάγκες των πειραμάτων παρασκευάστηκε 1 L διαλύματος Bradford ως εξής:

- I. 0,1 g Coomassive Brilliant Blue G250 διαλύονται σε 50 mL αιθανόλης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II. Προσθήκη 100 mL H_3PO_4 και συμπλήρωση του διαλύματος με απιονισμένο νερό μέχρι τα 1000 mL.

III. Φιλτράρισμα του διαλύματος και αποθήκευση του σε σκοτεινό μέρος.

Για τις μετρήσεις απορρόφησης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

I. Προσθήκη 1,25 mL διαλύματος Bradford και 25 λ δείγματος.

II. Ανάδευση του διαλύματος σε Vortex και τοποθέτηση του σε σκοτεινό μέρος για 10 λεπτά

III. Στο πέρας των 10 λεπτών, μέτρηση απορρόφησης του δείγματος στα 595nm.

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την χρήση καμπύλης αναφοράς που έγινε με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης ορού βοδιού, BSA (bovine serum albumin).

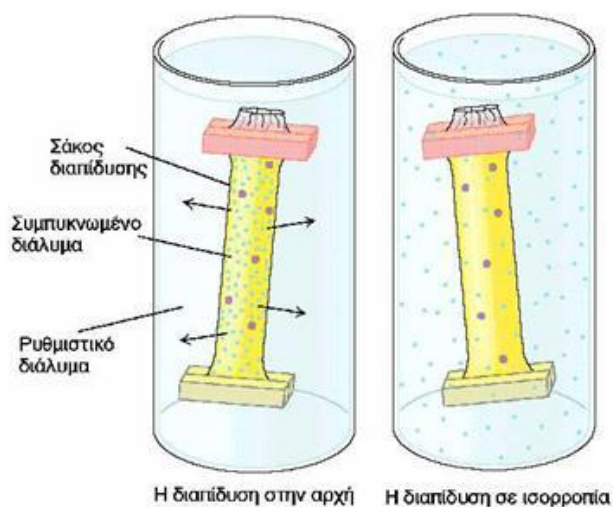
4.7 Μέθοδοι εξισορρόπησης πρωτεϊνών σε ρυθμιστικά διαλύματα

4.7.1 Εξισορρόπηση με διαπίδυση (dialysis)

Διαπίδυση ονομάζεται το φυσικό φαινόμενο που πραγματοποιείται όταν δύο μίγματα διαχωρίζονται μεταξύ τους από μία ημιπερατή πορώδη μεμβράνη. Τα συστατικά του μίγματος που είναι πολύ ογκώδη και δε μπορούν να περάσουν από τους πόρους της μεμβράνης παραμένουν από τη μία πλευρά αυτής, τη στιγμή που τα μικρότερα συστατικά των μιγμάτων διαχέονται διαμέσου της μεμβράνης από την περιοχή υψηλής συγκέντρωσης στην περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης (εικόνα 2.9).

Σκοπός της μεθόδου είναι η εξισορρόπηση του υγρού καλλιέργειας στο ρυθμιστικό διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί στο σύστημα χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής (βλ. ενότητα 4.8.4). Το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται εντός προθερμασμένης μεμβράνης κυτταρίνης (Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Da, Sigma-Aldrich) που είχε παραμείνει για 30 min εντός απιονισμένου νερού θερμοκρασίας 100°C. Στη συνέχεια η ασφαλισμένη μεμβράνη τοποθετείται εντός δοχείου που περιέχει περίπου 3 L ρυθμιστικού διαλύματος (απαιτείται όγκος ρυθμιστικού διαλύματος τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερος από αυτόν του υγρού προς εξισορρόπηση). Η διαδικασία της διαπίδυσης ολοκληρώνεται ύστερα από παραμονή του παραπάνω συστήματος σε σταθερή θερμοκρασία $T = 4^\circ C$, υπό ελάχιστη

ανάδευση του ρυθμιστικού διαλύματος, για 20 h. Στην εικόνα 14 απεικονίζεται σχηματικά η διαδικασία της διαπίδυσης.



Εικόνα 2.9 Απεικόνιση της διαδικασίας της διαπίδυσης σε εργαστηριακή κλίμακα. Τα συστατικά του μίγματος που είναι πολύ ογκώδη και δε μπορούν να περάσουν από τους πόρους της μεμβράνης παραμένουν από τη μία πλευρά αυτής, τη στιγμή που τα μικρότερα συστατικά των μιγμάτων διαχέονται διαμέσου της μεμβράνης από την περιοχή υψηλής συγκέντρωσης στην περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης.

4.7.2 Εξισορρόπηση με στήλη αφαλάτωσης

Για την αφαλάτωση του εξωκυτταρικού υγρού χρησιμοποιήθηκε η στήλη αφαλάτωσης PD-10 που περιέχει μεμβράνη Sephadex G-25, η οποία επιτρέπει τον γρήγορο διαχωρισμό ουσιών υψηλού μοριακού βάρους από ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους (όπως άλατα). Τα μόρια που είναι μεγαλύτερα από τους μεγαλύτερους πόρους της μεμβράνης της στήλης εξέρχονται πρώτα από την στήλη ενώ μόρια μικρότερα από τους μεγαλύτερους πόρους της μεμβράνης διεισδύουν στους πόρους σε διαφορετικό βάθος. Παρακάτω αναγράφονται τα βήματα της διαδικασίας αφαλάτωσης που εφαρμόστηκε:

- i. Γέμισμα της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα για την εξισορρόπηση της. Συνολικά χρησιμοποιούνται περίπου 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος.
- ii. Λαμβάνονται 2,5 mL δείγματος και τοποθετούνται στη στήλη αφαλάτωσης.
- iii. Έκλουση με 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος και παραλαβή του διερχόμενου κλάσματος.

4.8 Παραγωγή και απομόνωση της 1,2-CD

4.8.1 Παραγωγή της 1,2-CD σε μεγάλη κλίμακα

Αρχικά πραγματοποιούνται δύο προκαλλιέργειες, δηλαδή δύο κωνικές φιάλες με 50 mL θρεπτικό υλικό η κάθε μια στις οποίες γίνεται εμβολιασμός από τρυβλίο με ένα από τα μυκητιακά στελέχη. Μετά από 3 ημέρες επώασης πραγματοποιείται έκχυση των προκαλλιιεργειών αυτών σε δύο κωνικές φιάλες που περιέχουν 450 mL θρεπτικού υλικού. Οι καλλιέργειες αυτές τοποθετούνται σε επωαστήρα για 3 ημέρες. Στο πέρας των τριών ημερών γίνεται προσθήκη 10 mL 2,4-dCP συγκέντρωσης 50 mM σε κάθε κωνική για επαγωγή του ενζύμου και επανατοποθέτηση στον επωαστήρα. Μετά από άλλες 3 ημέρες οι καλλιέργειες αφαιρούνται οριστικά και οδηγούνται σε διήθηση, με σκοπό τον διαχωρισμό της στερεάς (βιομάζα) από την υγρή φάση (εξωκυτταρικό υγρό). Τόσο η βιομάζα όσο και το εξωκυτταρικό υγρό αποθηκεύονται στην κατάψυξη στους -20 °C προκειμένου να γίνει σε επόμενο στάδιο μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της 1,2-CD.

4.8.2 Κλασμάτωση της καλλιέργειας

4.8.2.1 Προετοιμασία εξωκυτταρικού πρωτεϊνικού μίγματος

Το εξωκυτταρικό υγρό ή 'crude' υποβάλλεται σε φυγοκέντριση για 25 min με ταχύτητα 10000 rpm με σκοπό την απομάκρυνση των περισσότερων στερεών. Ακολουθεί φιλτράρισμα του 'crude' χρησιμοποιώντας φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0,8 nm και 0,45 nm. Τέλος, το φιλτραρισμένο διάλυμα τοποθετείται σε συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.) για συμπύκνωση όπου λαμβάνεται τελική ποσότητα 40 mL διαλύματος (από περίπου 900 mL αρχικού όγκου). Η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της 1,2-CD πραγματοποιείται όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 4.5.4.1.

4.8.2.2 Προετοιμασία εσωκυτταρικού πρωτεϊνικού μίγματος

4.8.2.2.1 Προετοιμασία διαλύματος για την συσκευή υπέρηχων

Αρχικά γίνεται προετοιμασία του δείγματος για την συσκευή υπέρηχων. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιείται παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος με σύσταση 1,2 M σορβιτόλη, 20 mM φωσφορικού καλίου και 0,5 mM χλωριούχου μαγνησίου. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 200 μ L (10 U/ μ L) εμπορικού σκευάσματος Lyticase της εταιρίας Sigma (Η.Π.Α.) σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Το σκευάσμα αυτό θα βοηθήσει στην λύση των μηκυτιακών κυττάρων. Το μίγμα αυτό προστίθεται σε 3 g νωπής βιομάζας και το σύστημα αφήνεται για 1 ώρα στους 30°C υπό ήπια ανάδευση (90 rpm).

4.8.2.2.2 Λύση των μυκητιακών κυττάρων με συσκευή υπερήχων

Το διάλυμα που περιέχει τα κύτταρα οδηγείται στην συσκευή υπερήχων. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Vibra-Cell Processor VC 505 της εταιρίας Sonics (Η.Π.Α.). Το όργανο ρυθμίζεται ώστε κάθε 16 δευτερόλεπτα να λειτουργεί για 8 δευτερόλεπτα. Το διάλυμα με τα κύτταρα διατηρούνται σε θερμοκρασία 4°C καθ' όλη την διάρκεια. Το υγρό με τα διαρρηγμένα πλέον κύτταρα αραιώνεται (δύο φορές) με ρυθμιστικό διάλυμα σύστασης ίδιας με αυτήν που περιεγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Στην συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 15 min με ταχύτητα 15000 rpm με σκοπό τον διαχωρισμό των κυτταρικών θραυσμάτων από το εσωκυτταρικό πρωτεϊνικό μίγμα.

4.8.3 Απομόνωση της 1,2-CD με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής

Η χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής είναι η αναστρέψιμη προσρόφιση φορτισμένων μορίων σε ακινητοποιημένες ομάδες ιόντων που βρίσκονται σε υπόστρωμα αντίθετου φορτίου (ρητίνη). Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται μέσω της προσρόφησης και απελευθέρωσης των δειγμάτων από την ρητίνη. Η ανταλλαγή ιόντων αρχίζει με την εξισορρόπηση της ρητίνης με βάση το pH και την ιοντική ισχύ. Μόλις επιτευχθεί ισορροπία και προστεθεί το δείγμα, τα μόρια του δείγματος προσροφώνται πάνω στην ρητίνη. Τα συστατικά που δεν δεσμεύτηκαν στην ρητίνη εκλύονται από

την στήλη. Τέλος, η παραλαβή των προσροφημένων συστατικών πραγματοποιείται αυξάνοντας την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης.

Η CM-cellulose (carboxymethylcellulose) και η DEAE-cellulose (diethylaminoethyl-cellulose) αποτελούν δύο ρητίνες ασθενής ιοντοεναλλαγής ενώ η Q-Sepharose Fast Flow και η SP-Sepharose Fast Flow ανήκουν στην κατηγορία των ρητινών ισχυρής ιοντοεναλλαγής.

Για κάθε πρωτεΐνη όταν το ισοηλεκτρικό σημείο της ισούται με το pH του συστήματος, τότε ο συνολικός αριθμός των αρνητικών φορτίων ισούται με τον αριθμό των θετικών φορτίων και συνεπώς δεν έχει καθαρό φορτίο. Όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στο ισοηλεκτρικό της σημείο τότε αυτή δεν θα προσδεθεί στην ρητίνη. Σε χαμηλότερες τιμές pH η πρωτεΐνη θα είναι θετικά φορτισμένη και θα προσροφάται σε ρητίνες εναλλαγής κατιόντων, ενώ σε υψηλότερες τιμές pH θα είναι αρνητικά φορτισμένη και θα προσροφάται σε ρητίνες εναλλαγής ανιόντων

4.8.3.1 Επιλογή του κατάλληλου pH ρυθμιστικού διαλύματος για την στήλη

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικών τιμών pH ώστε να γίνει επιλογή του καταλληλότερου που θα χρησιμοποιηθεί στην στήλη. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που εξετάστηκαν ήταν τα: i) Piperazine pH 6 συγκέντρωσης, ii) Bis-Tris pH 7 συγκέντρωσης και iii) Tris pH 8, και είχαν όλα συγκέντρωση 20 mM. Τα διαλύματα αυτά ρυθμίστηκαν με διάλυμα υδροχλωρίου. Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια ρητίνη ισχυρής εναλλαγής ανιόντων Q sepharose fast flow της εταιρίας Pharmacia Biotech. (H.P.A.), που χρησιμοποιείται εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες για παρασκευαστικούς διαχωρισμούς πρωτεϊνών τόσο σε ερευνητικές όσο και σε βιομηχανικές εφαρμογές. Η ρητίνη αυτή αποθηκεύονταν σε διάλυμα 20% αιθανόλης για διατήρηση. Για την επιλογή του καταλληλότερου pH για την στήλη ακολουθήθηκαν οι παρακάτω διεργασίες :

- i. Τοποθέτηση του δείγματος που έχει δεχτεί αφαλάτωση στη στήλη με την ρητίνη Q-Sepharose για δέσμευση των πρωτεϊνών.
- ii. Έκπλυση της στήλης με 8 mL ρυθμιστικού διαλύματος.
- iii. Έκπλυση της στήλης με 4 mL ρυθμιστικό διάλυμα με 500 mM χλωριούχο νάτριο.

Τα διερχόμενα κλάσματα των σταδίων i, ii και iii συλλέγονται σε ξεχωριστά falcon tubes και αποθηκεύονται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας σε πάγο $T = 4^{\circ}\text{C}$. Ακολουθεί μέτρηση της ενεργότητας της 1,2-CD για κάθε κλάσμα.

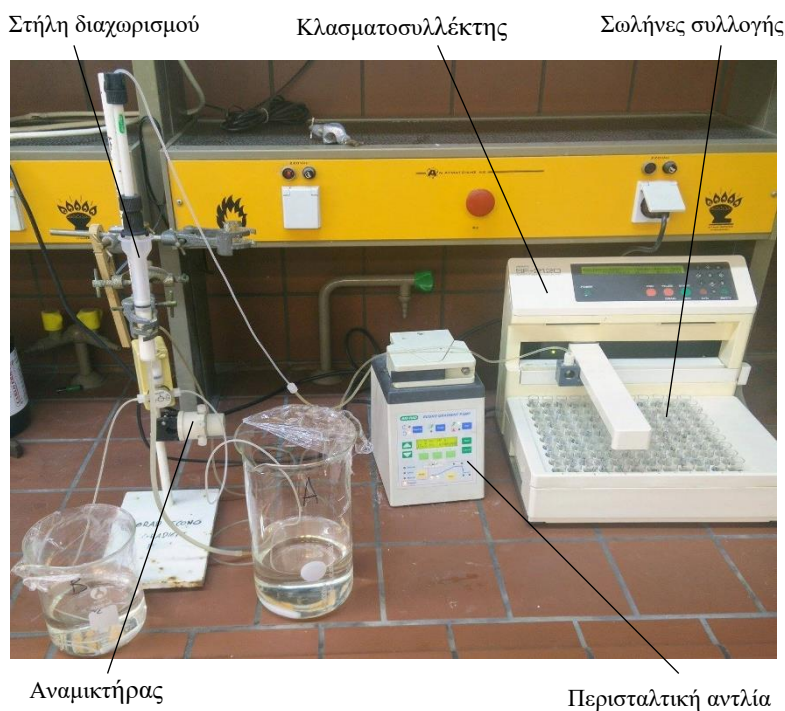
4.8.3.2 Προετοιμασία του συστήματος χρωματογραφίας

Αφού γίνει η επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί (βλ. ενότητα 4.8.3.1) και εξισορρόπηση του εξωκυτταρικού υγρού με διαπίδυση (βλ. ενότητα 4.7.1), παρασκευάζονται τρία διαλύματα με αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα, τα δύο με χλωριούχο νάτριο καθορισμένης συγκέντρωσης (διαλύματα Β και Γ) και ένα χωρίς (διάλυμα Α). Το χλωριούχο νάτριο είχε συγκέντρωση 500 mM στο διάλυμα Β και 1 M στο διάλυμα Γ.

Τα βασικά τμήματα του συστήματος χρωματογραφίας διαχωρισμού είναι:

- η στήλη διαχωρισμού
- η περισταλτική αντλία
- ο αναμικτήρας και
- ο κλασματοσυλλέκτης

Στην εικόνα 2.10 παρουσιάζεται η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 2.10 Οργανολογία συστήματος χρωματογραφίας

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ρυθμίζεται από το όργανο της αντλίας. Στην συγκεκριμένη περίπτωση το πρόγραμμα είχε ως εξής:

- i. ισοκρατική έκλουση 100% Α για 30 λεπτά
- ii. σταδιακή έκλουση από 100% Α έως 100% Β για 70 λεπτά
- iii. ισοκρατική έκλουση 100% Β για 15 λεπτά
- iv. ισοκρατική έκλουση 100% Γ για 15 λεπτά
- v. ισοκρατική έκλουση 100% Α για 20 λεπτά

Η ροή έκλουσης ήταν σταθερή καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας και ίση με 2 mL/min. Ο κλασματοσυλλέκτης ρυθμίστηκε έτσι ώστε να συλλέγει κλάσματα των 4 mL.

4.8.3.3 Ανάλυση των εκλουόμενων δειγμάτων

Για τα διάφορα δείγματα που συλλέχθηκαν από την στήλη έγινε μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι πρωτεϊνικού φορτίου. Στη συνέχεια, έγινε συλλογή των δειγμάτων στις περιοχές που έδειξαν απορρόφηση στα 280 nm. Τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν ως προς την ενζυμική ενεργότητα της 1,2-CD.

4.8.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε πήκτη SDS-PAGE είναι μία κλασική μέθοδος για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση την κινητικότητά τους εντός πήκτης πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Στη συγκεκριμένη μέθοδο εφαρμόζεται η χρήση των εξής αποδιατακτικών παραγόντων, οι οποίοι γραμμικοποιούν τις πρωτεΐνες και τους προσδίδουν αρνητικό φορτίο: Το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) που αποτελεί ένα ανιονικό απορρυπαντικό και προαιρετικά η β-μερκαπτοαιθανόλη που αποτελεί αναγωγικό παράγοντα και ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που σταθεροποιούν τη τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, ύστερα από θέρμανση. Η γραμμικοποιημένη, αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη κινείται εντός της πήκτης με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού, προς τον θετικό πόλο. Τα

μικρότερα σε μέγεθος μόρια πρωτεΐνης κινούνται ταχύτερα. Παράλληλα χρησιμοποιείται πρότυπο δείγμα που περιέχει πρωτεϊνικά μόρια γνωστού βάρους.

4.8.4.1 Προετοιμασία της πηκτής SDS-PAGE

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο διαφορετικά φιλμ γέλης. Το φιλμ επιστοίβασης και το φιλμ διαχωρισμού. Κάθε φιλμ παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη σύσταση που υποδεικνύεται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1 Σύσταση των δύο φιλμ της πηκτής πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE.

Πηκτή διαχωρισμού		Πηκτή επιστοίβασης	
Συστατικό	Όγκος (μL)	Συστατικό	Όγκος (μL)
ddH ₂ O	1750	ddH ₂ O	1500
Ρυθμιστικό διάλυμα 0,75 M Tris, 0.2% w/v SDS, pH 8,8	4700	Ρυθμιστικό διάλυμα 0,25 M Tris, 0.2% w/v SDS, pH 6,8	1900
40% bis-acrylamide	2900	40% bis-acrylamide	380
TEMED	15	TEMED	10
10% w/v APS	90	10% w/v APS	30

Το διάλυμα του φιλμ διαχωρισμού τοποθετήθηκε πρώτο εντός της πλάκας της συσκευής SDS-PAGE Mini-Protean 3 (Biorad), η οποία είχε τοποθετηθεί σε κάθετη θέση. Μετά την πήξη αυτού τοποθετήθηκε από πάνω το διάλυμα του επόμενου φιλμ, στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η «φόρτωση» του πρωτεϊνικού δείγματος. Σημειώνεται πως το ύψος της πηκτής διαχωρισμού είναι περίπου τριπλάσιο από αυτό της πηκτής επιστοίβασης. Μετά τη στερεοποίηση και των δύο πηκτών πραγματοποιήθηκε συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης (εικόνα 2.11) και προσθήκη εντός αυτής περίπου 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος 30,3 g/L Tris, 144 g/L γλυκίνη, 1% w/v SDS, pH 8,3.

4.8.4.2 Χρώση της πηκτής SDS-PAGE και εμφάνιση της θέσης των πρωτεϊνικών μορίων

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών απομακρύνθηκε το πήκτωμα ακρυλαμιδίου από τη συσκευή και εμβαπτίστηκε σε υδατικό διάλυμα χρώσης 40% v/v μεθανόλη, 10% v/v CH₃COOH, 0.4% w/v Coomassie Brilliant Blue G-250 για χρονικό διάστημα 20 min, υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθησε αποχρωματισμός του πηκτώματος με διαδοχικές πλύσεις με υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) 40% v/v μεθανόλη, 10% v/v CH₃COOH. Τελικώς η πηκτή αποχρωματίζεται, ενώ το μπλε χρώμα διατηρούν μόνο τα πρωτεϊνικά μόρια.



Εικόνα 2.11 Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

Κεφάλαιο 5 Διαλογή μικροοργανισμών

5.1 Μελέτη του δυναμικού βιοαποικοδόμησης της 2,4-dCP από τα μυκητιακά στελέχη

Όλα τα μυκητιακά στελέχη (44) υποβλήθηκαν σε διαλογή (screening) για το δυναμικό τους στην αποικοδόμηση της 2,4-dCP υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν στην ενότητα 4.3 του κεφαλαίου 4. Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζεται η ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης της 2,4-dCP για τα διάφορα χρονικά διαστήματα (3^η, 6^η και 10^η ημέρα) για κάθε στέλεχος. Γενικά, η κατανάλωση της 2,4-dCP φαίνεται να βελτιώνεται μεταξύ 3^{ης} και 6^{ης} ημέρας. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, η κατανάλωση της 2,4-dCP που εκτιμήθηκε την 6^η ημέρα αποδείχθηκε λανθασμένη, αφού η κατανάλωση της βρέθηκε χαμηλότερη στο τελευταίο δείγμα όπου ολόκληρο το σύστημα αντίδρασης εκχυλίστηκε, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων.

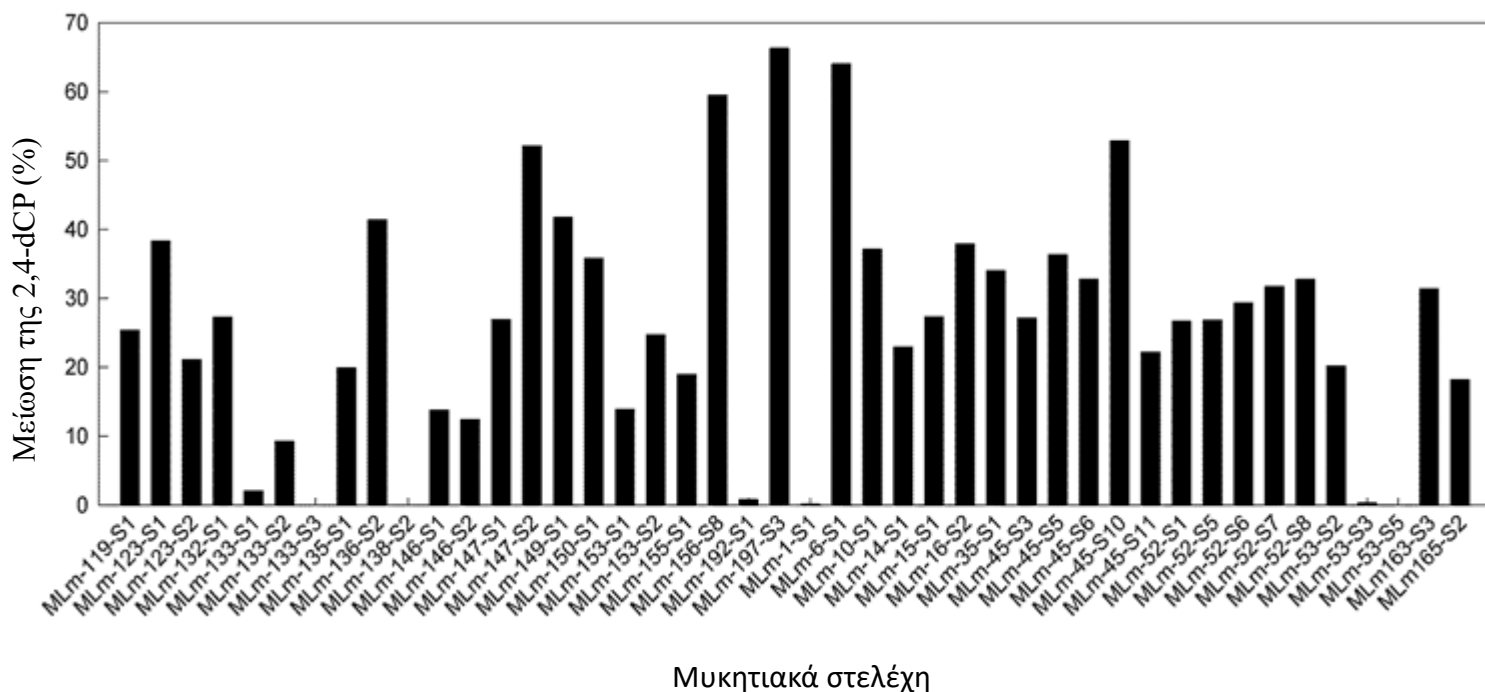
Πίνακας 2.2 Διαλογή των μυκητιακών στελεχών για την βιομετατροπή της 2,4-dCP ύστερα από 3, 6 και 10 μέρες βιοκαταλυτικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την ποσοστιαία μείωση στη συγκέντρωση της 2,4-dCP.

Στέλεχος	3 ^η μέρα	6 ^η μέρα	10 ^η μέρα
MLm-119-S1	39.1	54.6	25.4
MLm-123-S1	55.0	63.3	38.3
MLm-123-S2	38.6	49.9	21.1
MLm-132-S1	46.9	56.5	27.3
MLm-133-S1	43.4	54.9	2.0
MLm-133-S2	39.4	49.9	9.3
MLm-133-S3	27.5	39.1	0.0
MLm-135-S1	41.3	53.7	19.9
MLm-136-S2	30.0	37.9	41.4
MLm-138-S2	32.6	42.3	0.0
MLm-146-S1	39.5	50.7	13.8
MLm-146-S2	32.7	43.5	12.4
MLm-147-S1	35.8	45.4	26.9
MLm-147-S2	18.7	30.6	52.1
MLm-149-S1	30.8	53.3	41.8
MLm-150-S1	28.5	36.0	35.8
MLm-153-S1	27.4	44.3	13.9
MLm-153-S2	26.8	37.2	24.7
MLm-155-S1	30.6	37.1	19.0
MLm-156-S8	31.0	47.5	59.5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

MLm-192-S1	28.4	49.3	0.8
MLm-197-S3	7.3	23.9	66.3
MLm-1-S1	16.6	34.1	0.1
MLm-6-S1	4.7	18.4	64.0
MLm-10-S1	32.5	40.3	37.1
MLm-14-S1	32.7	44.1	22.9
MLm-15-S1	21.9	26.6	27.3
MLm-16-S2	36.9	53.0	37.9
MLm-35-S1	28.9	38.2	34.0
MLm-45-S3	31.8	51.4	27.1
MLm-45-S5	41.9	40.0	36.3
MLm-45-S6	19.3	35.5	32.8
MLm-45-S10	41.4	44.1	52.9
MLm-45-S11	22.0	36.3	22.2
MLm-52-S1	26.8	36.2	26.7
MLm-52-S5	35.2	38.9	26.8
MLm-52-S6	24.7	42.1	29.3
MLm-52-S7	26.4	30.2	31.7
MLm-52-S8	23.5	30.9	32.8
MLm-53-S2	25.5	34.3	20.2
MLm-53-S3	22.9	30.4	0.3
MLm-53-S5	20.9	27.4	0.0
MLm163-S3	24.1	29.2	31.4
MLm165-S2	29.3	37.4	18.2

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2.2, υπάρχουν μόνο λίγα στελέχη που μπορούν να μετατρέψουν πάνω από το 50% της 2,4-dCP εντός 10 ημερών. Στελέχη που παρουσιάζουν υψηλό δυναμικό για την βιομετατροπή της 2,4-dCP είναι τα: MLm147-S2, MLm156-S8, MLm197-S3, MLm6-S1 και MLm45-S10. Μεταξύ αυτών, το στέλεχος MLm197-S3 είναι αυτό που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης της 2,4-dCP (66,3%).



Διάγραμμα 2.2 Ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης της 2,4-dCP κατά την 10^η ημέρα της βιοκαταλυτικής αντίδρασης

5.2 Μελέτη του δυναμικού βιοαποικοδόμησης του PCB από τα μυκητιακά στελέχη

Όλα τα μυκητιακά στελέχη υποβλήθηκαν σε διαλογή για το δυναμικό τους στην αποικοδόμηση του PCB 29 υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν στην ενότητα 4.3. Στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζεται η ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης του PCB 29 για τα διάφορα χρονικά διαστήματα (3^η, 6^η και 10^η ημέρα) για κάθε στέλεχος. Όπως διαπιστώθηκε και στην περίπτωση της 2,4-dCP, σε ορισμένα δείγματα η αποικοδόμηση φαίνεται υψηλότερη στις πρώτες ημέρες αντίδρασης. Τα πιο ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα βρέθηκαν στο τελευταίο δείγμα όταν όλο το σύστημα αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων, συλλέχθηκε και εκχυλίστηκε.

Πίνακας 2.3 Διαλογή των μυκητιακών στελεχών για την βιομετατροπή του PCB 29 ύστερα από 3, 6 και 10 μέρες βιοκαταλυτικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν την ποσοστιαία μείωση στη συγκέντρωση του PCB 29.

Στέλεχος	3 ^η μέρα	6 ^η μέρα	10 ^η μέρα
MLm-119-S1	96.01	95.64	60.38
MLm-123-S1	96.02	77.11	85.80
MLm-123-S2	89.74	88.54	87.12

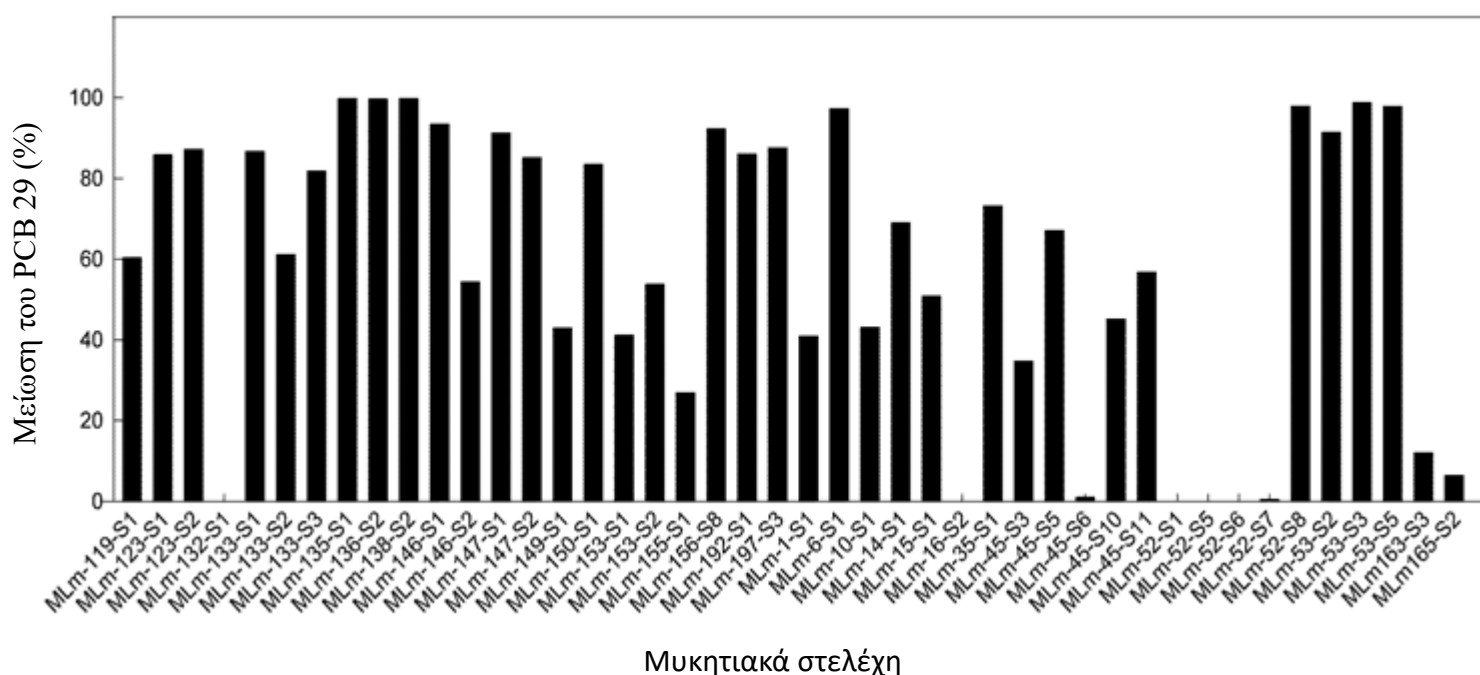
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

MLm-132-S1	69.51	31.95	0.00
MLm-133-S1	69.95	73.56	86.66
MLm-133-S2	6.52	64.43	61.09
MLm-133-S3	79.47	80.01	81.82
MLm-135-S1	71.78	83.47	99.79
MLm-136-S2	85.25	97.12	99.67
MLm-138-S2	91.60	95.44	99.76
MLm-146-S1	5.14	96.39	93.40
MLm-146-S2	12.95	49.21	55.47
MLm-147-S1	92.63	92.59	91.27
MLm-147-S2	88.75	89.56	85.10
MLm-149-S1	95.64	96.42	42.89
MLm-150-S1	44.57	50.15	83.55
MLm-153-S1	60.24	65.47	39.73
MLm-153-S2	51.84	55.19	60.52
MLm-155-S1	92.32	90.85	26.84
MLm-156-S8	76.90	80.69	92.27
MLm-192-S1	85.95	85.93	85.96
MLm-197-S3	95.34	99.53	87.62
MLm-1-S1	97.67	97.32	40.87
MLm-6-S1	0.03	91.52	97.24
MLm-10-S1	20.71	28.54	43.05
MLm-14-S1	13.41	20.19	68.99
MLm-15-S1	7.18	15.27	50.82
MLm-16-S2	0.13	0.87	0.00
MLm-35-S1	100.00	100.00	73.13
MLm-45-S3	0.14	21.56	34.74
MLm-45-S5	29.18	36.84	67.09
MLm-45-S6	54.00	60.21	0.99
MLm-45-S10	4.92	22.14	45.12
MLm-45-S11	27.84	33.68	56.71
MLm-52-S1	0.06	0.87	0.00
MLm-52-S5	0.00	1.20	0.00
MLm-52-S6	0.10	0.50	0.00
MLm-52-S7	0.00	0.12	0.45
MLm-52-S8	90.10	91.06	97.86
MLm-53-S2	95.02	94.87	91.37
MLm-53-S3	95.54	96.24	98.76
MLm-53-S5	96.66	96.44	97.82
MLm163-S3	27.01	26.54	12.01
MLm165-S2	92.65	98.87	6.40

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2.2, πολλά στελέχη μπόρεσαν να βιομετατρέψουν αυτόν τον έμμονο οργανικό ρύπο σε ποσοστά άνω του 80%, ενώ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

αρκετά στελέχη αποδείχθηκαν ικανά να το χρησιμοποιήσουν σχεδόν εξ ολοκλήρου (> 98%). Στελέχη που παρουσιάζουν υψηλό δυναμικό για την βιομετατροπή του PCB 29 είναι τα: MLm135-S1, MLm136-S2, MLm138-S2, MLm53-S3. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα στελέχη MLm147-S2, MLm156-S8, MLm197-S3 και MLm6-S1 που παρουσίασαν υψηλό δυναμικό αποικοδόμησης της 2,4-dCP, εμφανίζονται ιδιαίτερα ικανά και στην αποικοδόμηση του PCB 29 (85%, 92%, 88% και 97% μείωση του PCB 29 αντίστοιχα).



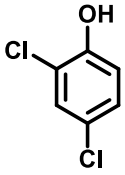
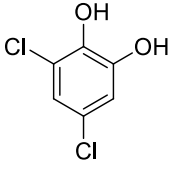
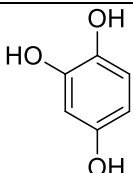
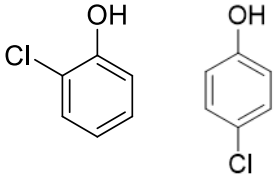
Διάγραμμα 2.2 Ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης του PCB 29 κατά την 10^η ημέρα της βιοκαταλυτικής αντίδρασης

Κεφάλαιο 6 Μελέτη μηχανισμού βιοαποικοδόμηση του 2,4-dCP

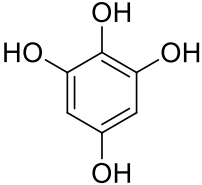
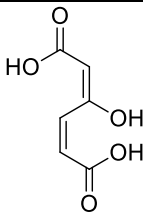
6.1 Τα προϊόντα του μεταβολισμού της 2,4-dCP

Οι βιοκαταλυτικές αντιδράσεις των πιο αποδοτικών μικροοργανισμών ως προς την αποικοδόμηση της 2,4-dCP, μελετήθηκαν με φασματομετρία μάζας με σκοπό την διαλεύκανση του τρόπου με τον οποίο οι μύκητες βιομετατρέπουν τον ρύπο αυτό.. Στον πίνακα 2.3 απεικονίζονται τα διάφορα προϊόντα που ανιχνεύτηκαν από την LC-MS, ενώ παράλληλα σημειώνεται σε ποια ή ποιες βιοκαταλύτες αντιδράσεις ανιχνεύτηκαν.

Πίνακας 2.4 Τα προϊόντα του μεταβολισμού της 2,4-dCP από τα μνητικά στελέχη. Η παρουσία κάποιας ένωσης στα προϊόντα της βιοκαταλυτικής αντίδρασης κάθε στελέχους σημειώνεται με το σύμβολο '+', ενώ η απουσία της ένωσης σημειώνεται με το σύμβολο '-'.

Ένωση	Μυκητιακό στέλεχος			
	MLm147-S2	MLm156-S8	MLm197-S3	MLm6-S1
 2,4-dCP	+	+	+	+
 3,5-διχλωροκατεχόλη	+	+	-	+
 υδροξυ-υδροκινόλη C ₆ H ₃ (OH) ₃	+	+	+	+
 2 ή 4-χλωροφαινόλη	+	-	-	-

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

 <p>τετραϋδροξυβενζόλιο C₆H₂(OH)₄</p>	-	+	+	+
 <p>μαλεϊνικό οξύ C₆H₆O₅</p>	-	-	+	-

Όπως ήταν αναμενόμενο από τα αποτελέσματα της διαλογής των μικροοργανισμών, που έδειξαν μερική ποσοστιαία μείωση της 2,4-dCP, η αρχική ένωση ανιχνεύεται σε όλες της βιοκαταλυτικές αντιδράσεις. Παράλληλα όλα τα μυκητιακά στελέχη που μελετήθηκαν μετέτρεψαν την 2,4-dCP σε υδροξυ-υδροκινόλη (C₆H₃(OH)₃). Άλλα προϊόντα της βιομετατροπής ήταν η 3,5-διχλωροκατεχόλη, η χλωροφαινόλη και το τετραϋδροξυβενζόλιο. Τέλος, το στέλεχος MLm-197-S3 φάνηκε να είναι το μόνο ικανό να διανοίξει τον αρωματικό δακτύλιο της υδροξυ-υδροκινόλης και να την μετατρέψει σε μαλεϊνικό οξύ (C₆H₆O₅).

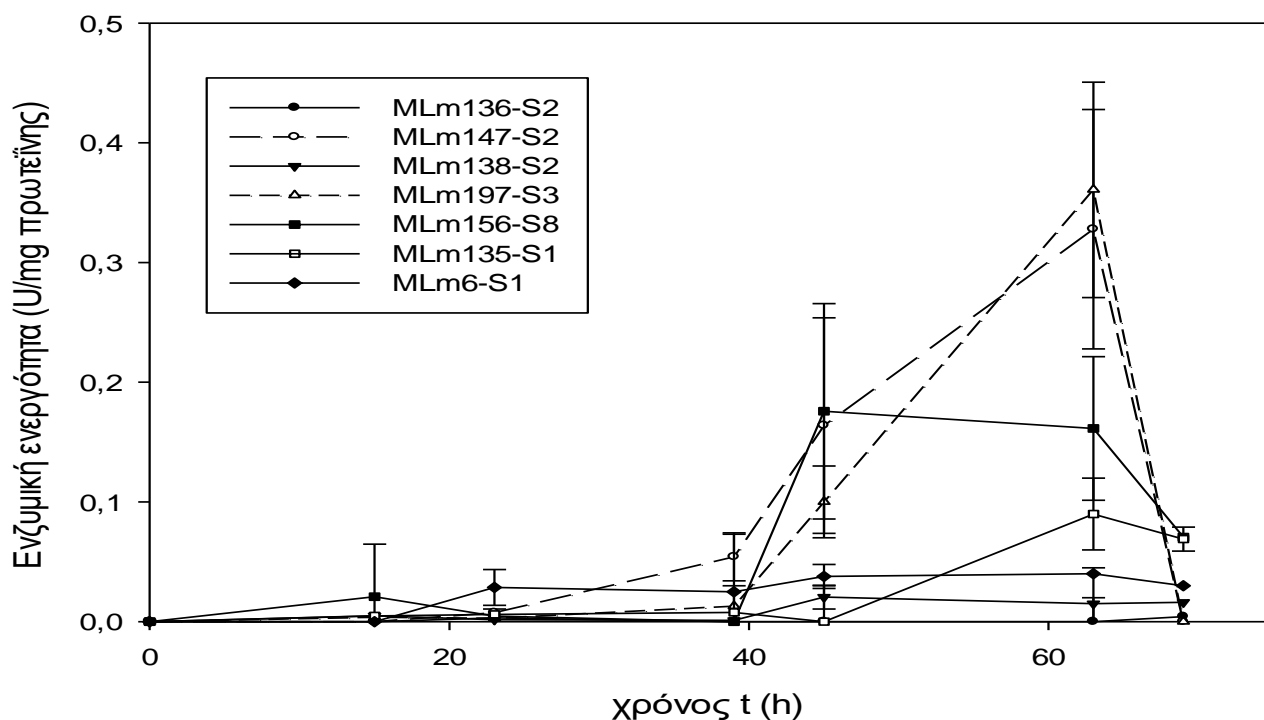
Κεφάλαιο 7 Προσδιορισμός ενζυμικών ενεργοτήτων και πρωτεϊνικού περιεχομένου στο εξωκυτταρικό υγρό

Για τα μυκητιακά στελέχη που έδειξαν το καλύτερο δυναμικό στην αποικοδόμηση της 2,4-dCP και/ή του PCB 29 έγινε μέτρηση των ενζυμικών ενεργοτήτων διάφορων ενζύμων που πιθανόν συμμετέχουν στην μεταβολική οδό των παραπάνω ρύπων. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν τα ένζυμα 1,2-CD, 2,3-CD και αφαλογονάση των αλογοαλκανίων.

7.1 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας 2,3-CD

7.1.1 Επαγωγή με 2,4-dCP

Αρχικά έγινε προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της 2,3-CD στο εξωκυτταρικό υγρό με επαγωγέα την 2,4-dCP, όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.5.1 του κεφαλαίου 4 'Υλικά και Μέθοδοι'. Σε αυτή την μέθοδο ορίστηκε αρχικός χρόνος επώασης των μικροοργανισμών ίσος με 3 ημέρες.

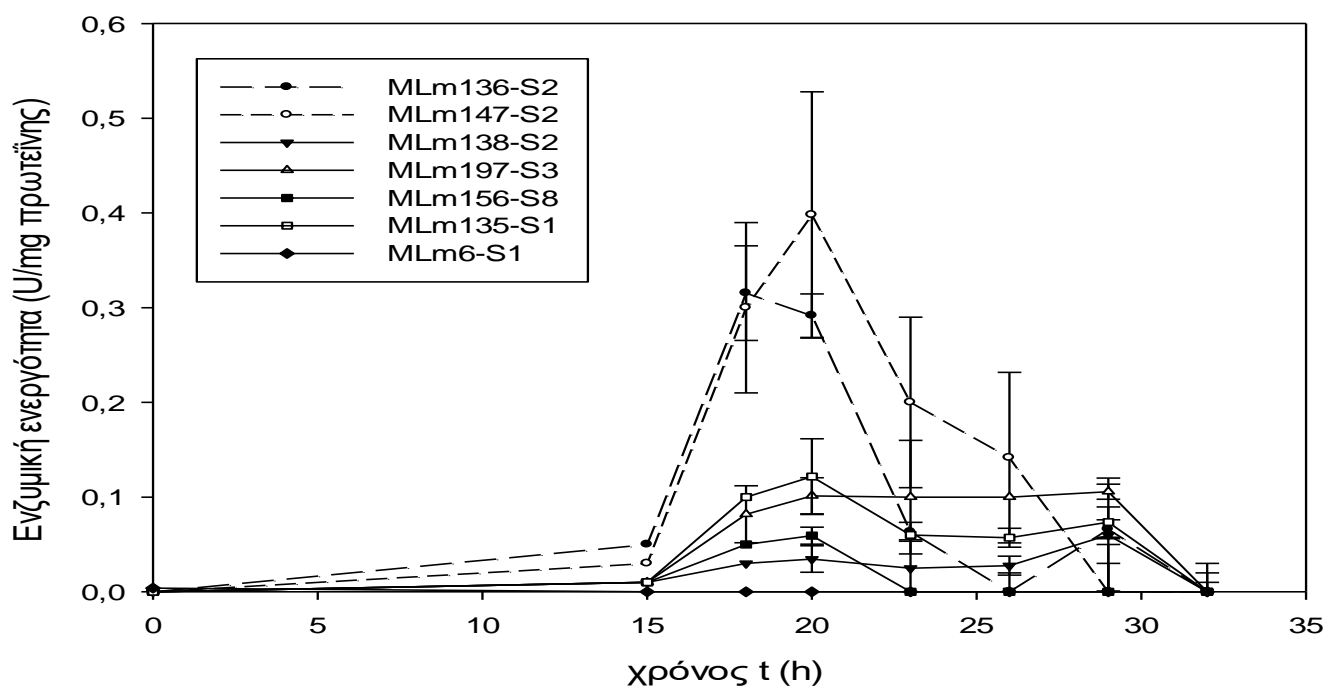


Διάγραμμα 2.3 Ενζυμική ενεργότητα 2,3-CD συναρτήσει του χρόνου με επαγωγέα την 2,4-dCP

Η πορεία της ενεργότητας του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας κάθε στελέχους ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης σε συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας αναπαρίσταται στο διάγραμμα 2.3. Το διάγραμμα αυτό δείχνει την εμφάνιση ενεργότητας λίγο πριν τις 40 ώρες για κάποια στελέχη (MLm197-S3, MLm147-S2 και MLm156-S8), η οποία μειώνεται μετά τις 60 ώρες. Η μέγιστη τιμή ενεργότητας ανέρχεται στα 0,36 Units/mg πρωτεΐνης για το στέλεχος MLm197-S3, ενώ ακολουθεί το MLm147-S2 με 0,33 Units/mg πρωτεΐνης.

7.1.2 Επαγωγή με βενζοϊκό οξύ

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η ενζυμική ενεργότητα της 2,3-CD στο εξωκυτταρικό υγρό με επαγωγέα το βενζοϊκό οξύ, όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.5.2 του κεφαλαίου 4 ‘Υλικά και Μέθοδοι’. Στο διάγραμμα 2.4 παρουσιάζεται η πορεία της ενεργότητας του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας κάθε στελέχους ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης σε συναρτήσει με τον χρόνο καλλιέργειας.



Διάγραμμα 2.4 Ενζυμική ενεργότητα 2,3-CD συναρτήσει του χρόνου με επαγωγέα το βενζοϊκό οξύ.

Από το διάγραμμα 6 φαίνεται η εμφάνιση ενεργότητας για κάποια στελέχη, η οποία μειώνεται μετά τις 20 ώρες. Την μέγιστη ενεργότητα εμφανίζει το στέλεχος MLm147-S2 και είναι ίση με 0,39 Units/mg πρωτεΐνης. Πρέπει να σημειωθεί πως όπως και στην περίπτωση της 2,4-dCP έτσι και στην περίπτωση του βενζοϊκού οξέος οι τιμές των ενεργοτήτων είναι πολύ μικρές και παρόμοιες μεταξύ τους .

7.2 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας αφαλογονασών

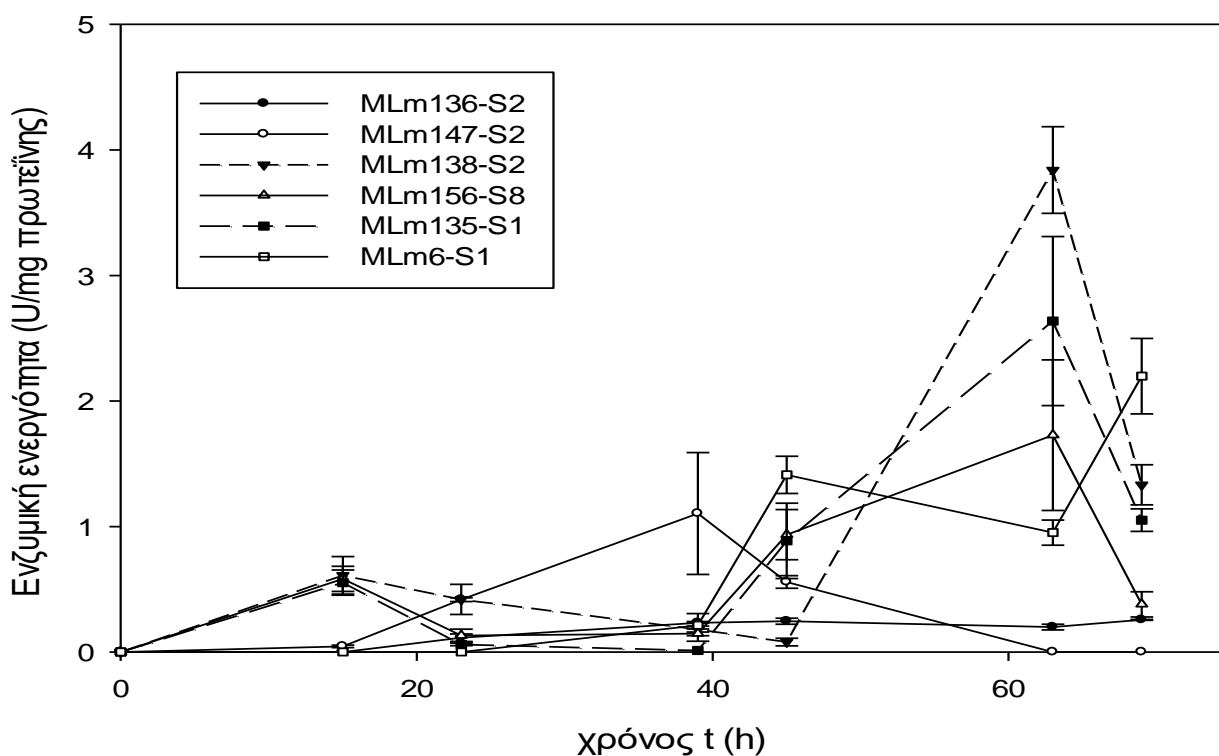
Σε επόμενο στάδιο επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της αφαλογονάσης των αλογοσαλκανίων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικοί επαγωγείς, η 2,4-dCP, το 2-χλωροβουτάνιο και το 2-χλωροπροπάνιο. Οι μεθοδολογίες και τα assays που εφαρμόστηκαν για τον προσδιορισμό της ενεργότητας αναλύονται στις ενότητες 4.5.1 και 4.5.3 του κεφαλαίου 4. Ανεξάρτητα από τον επαγωγέα που χρησιμοποιήθηκε, δεν ανιχνεύθηκε σε καμία περίπτωση ενεργότητα αφαλογονασών για τα στελέχη.

7.3 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας 1,2-CD με επαγωγέα την 2,4-dCP

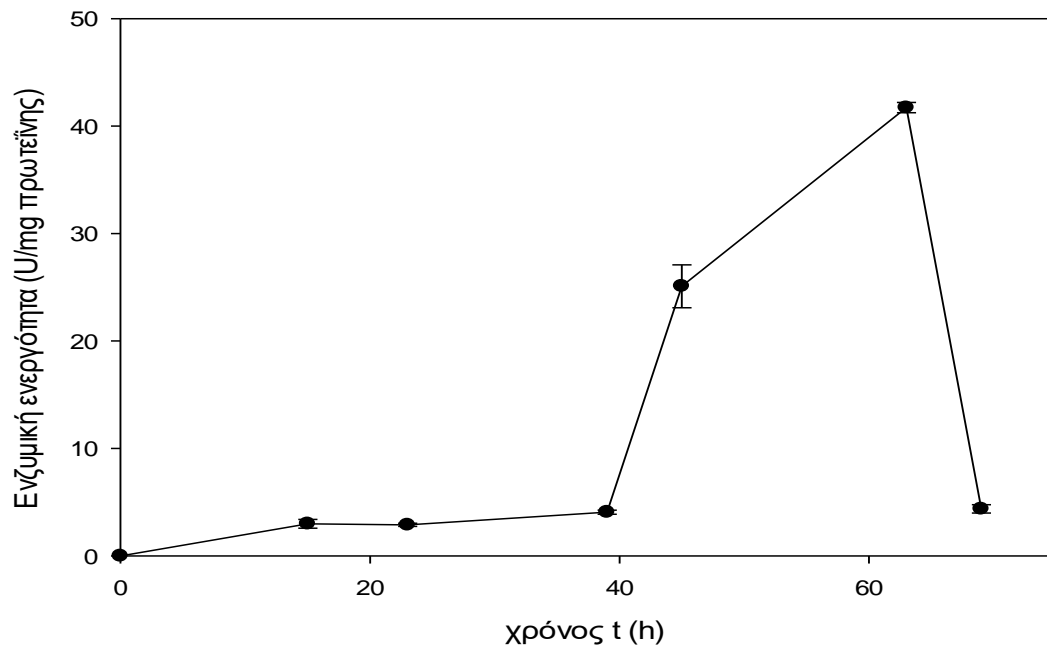
Τέλος, προσδιορίστηκε η ενζυμική ενεργότητα της 1,2-CD στο εξωκυτταρικό υγρό με επαγωγέα την 2,4-dCP και με αρχικό χρόνο επώασης των καλλιέργειών τις 3 μέρες, όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.5.1 του κεφαλαίου 4. Επιπλέον, παράλληλα με τον προσδιορισμό της ενεργότητας του εξωκυτταρικού υγρού, προσδιορίστηκε και το συνολικό πρωτεϊνικό φορτίο με την μέθοδο Bradford, όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.6 του κεφαλαίου 4.

Τα δύο διαγράμματα που ακολουθούν δείχνουν την πορεία της ενεργότητας του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας κάθε στελέχους ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης σε συνάρτηση με τον χρόνο καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, στο διάγραμμα 2.5 απεικονίζεται η ενεργότητα για τους μικροοργανισμούς MLm135-S1, MLm136-S2, MLm138-S2, MLm147-S2, MLm156-S8 και MLm6-S1 ενώ στο διάγραμμα 2.6 εμφανίζεται η πορεία ενεργότητας του μικροοργανισμού MLm197-S3.

Με βάση τα δύο αυτά διαγράμματα προκύπτει πως το εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας του στελέχους MLm197-S3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη παραγωγή ενεργότητας ανά μάζα πρωτεΐνης κατά την διάρκεια της επώασης (διάγραμμα 2.6), επισκιάζοντας τις ανοδικές πορείες ενεργότητας ορισμένων άλλων στελεχών, όπως τα MLm138-S2, MLm135-S1, 6, και 156 (διάγραμμα 2.5). Η μέγιστη τιμή ενεργότητας που εμφανίζει το στέλεχος MLm197-S3 είναι τα 41,7 Units/mg πρωτεΐνης, ενώ η αμέσως υψηλότερη τιμή (3,8 Units/mg πρωτεΐνης) παρουσιάζεται στο στέλεχος MLm138-S2 (~10 φορές μικρότερη) για τις 63 ώρες. Είναι εμφανές ότι τα 41,7 Units/mg πρωτεΐνης που εμφανίζει το στέλεχος MLm197-S3 για την 1,2-CD (βλέπε ενότητα 7.1) αποτελούν ιδιαίτερα υψηλή τιμή σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μέγιστες τιμές ενεργότητας για την 2,3-CD ($< 0,4$ Units/mg πρωτεΐνης).



Διάγραμμα 2.5 Ενζυμική ενεργότητα 1,2-CD συναρτήσει του χρόνου



Διάγραμμα 2.6 Ενζυμική ενεργότητα 1,2-CD συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος MIm197-S3

Κεφάλαιο 8 Απομόνωση της 1,2-CD

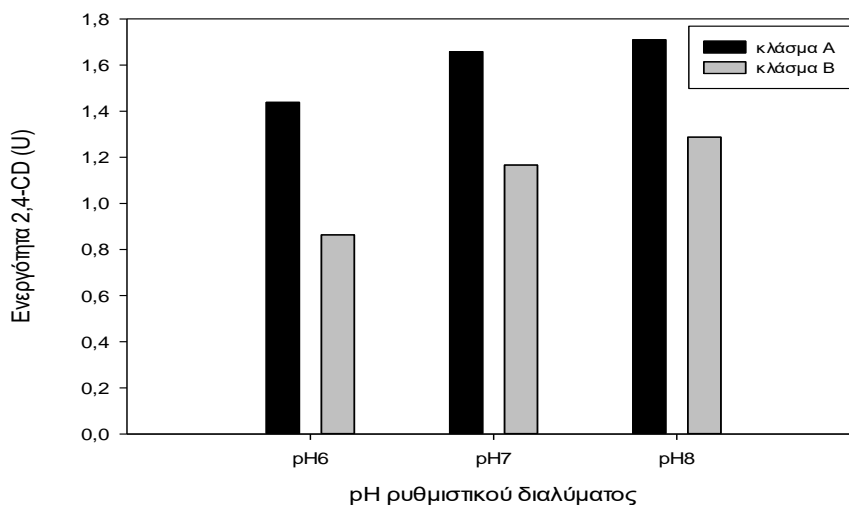
Από τα διάφορα στελέχη που μελετήθηκαν, το στέλεχος MLm197-S3 παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές ενζυμικής ενεργότητας και επιλέχθηκε για την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα της 1,2 CD. Ο τρόπος και οι συνθήκες καλλιέργειας αναφέρονται στην ενότητα 4.8.1 του κεφαλαίου 4. Προκειμένου να γίνει η απομόνωση της 1,2-CD εξετάστηκαν αρχικά το εξωκυτταρικό υγρό και το εσωκυτταρικό υγρό (βιομάζα), ώστε να εντοπιστεί ποιο από τα δύο εμφανίζει την μεγαλύτερη ενεργότητα σε 1,2-CD.

8.1 Εντοπισμός ενζυμικής ενεργότητας 1,2-CD στο εξωκυτταρικό και στο εσωκυτταρικό υγρό

Η μεθοδολογία που ακολουθείται περιγράφεται στο κεφάλαιο 4, στην παράγραφο 4.8.2 για το εξωκυτταρικό υγρό και στην παράγραφο 4.8.3 για το εσωκυτταρικό υγρό. Από τις αναλύσεις προέκυψε πως η ενζυμική ενεργότητα της 1,2-CD στο εσωκυτταρικό υγρό αποτελεί το 1/5 (19%) της συνολικής ενεργότητας που βρέθηκε στο στέλεχος. Έτσι, για την απομόνωση του ενζύμου επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί το εξωκυτταρικό υγρό από τις καλλιέργειες του στελέχους MLm197-S3.

8.2 Επιλογή του pH ρυθμιστικού διαλύματος για την στήλη χρωματογραφίας

Για την απομόνωση της 1,2-CD πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία εναλλαγής ιόντων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικού pH ώστε να γίνει επιλογή του καταλληλότερου που θα χρησιμοποιηθεί στην στήλη χρωματογραφίας. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που εξετάστηκαν ήταν τα Piperazine pH 6, Bis-Tris pH 7 και Tris pH 8. Στο παρακάτω διάγραμμα 2.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις ενεργότητας της 1,2-CD για το κλάσμα που προέκυψε μετά την αρχική αφαλάτωση (κλάσμα A) του εξωκυτταρικού υγρού και για το κλάσμα που προέκυψε μετά την τελική έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου 500 mM (κλάσμα B) (βλέπε ενότητα 4.8.4.1 του κεφαλαίου 4).



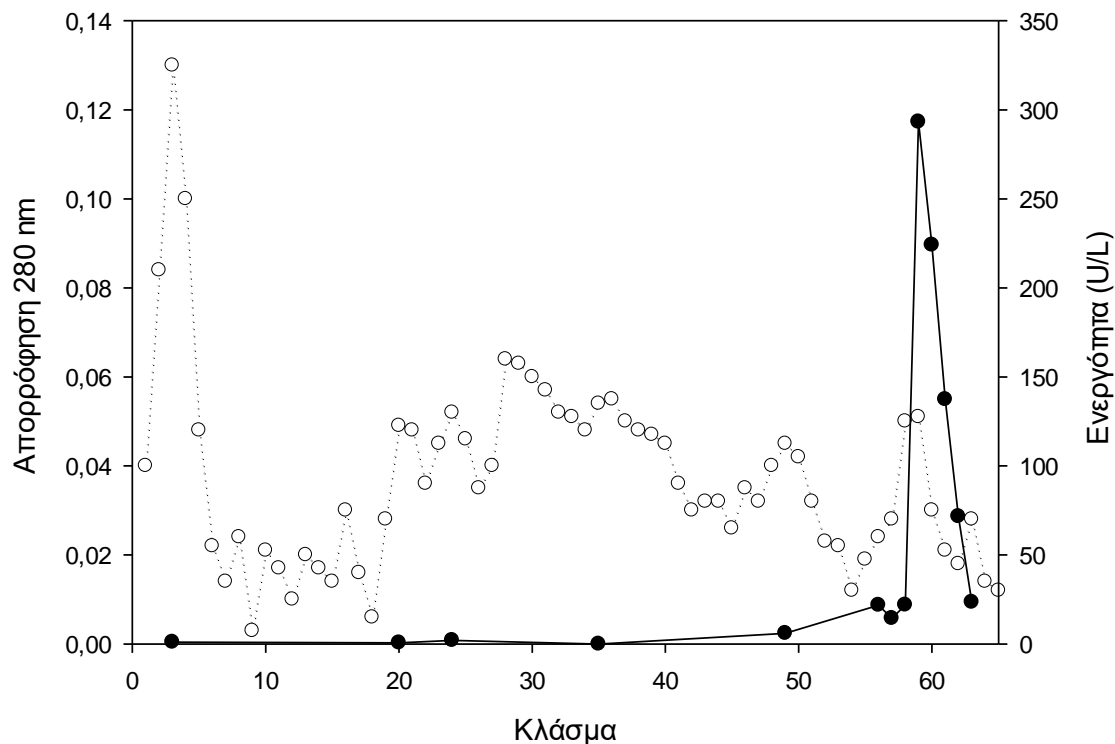
Διάγραμμα 2.7 Ενζυμική ενεργότητα 1,2-CD συναρτήσει του χρόνου για το κλάσμα που προέκυψε μετά την αρχική αφαλάτωση (κλάσμα A) και για το κλάσμα που προέκυψε μετά την τελική έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου 500 mM (κλάσμα B)

Και για τα τρία ρυθμιστικά διαλύματα που εξετάστηκαν μετρήθηκε ενζυμική ενεργότητα σε παρόμοια επίπεδα. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται πως το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της πρωτεΐνης είναι μικρότερο από 6. Όσο μεγαλύτερη η διαφορά μεταξύ pI και pH ρυθμιστικού διαλύματος τόσο ισχυρότερη θα είναι η πρόσδεση της πρωτεΐνης στην ρητίνη και συνεπώς τόσο πιο δύσκολη η μετέπειτα απομάκρυνση της από την ρητίνη. Επιλέχθηκε συνεπώς να χρησιμοποιηθεί στην στήλη το ρυθμιστικό διάλυμα Piperazine pH 6. Ωστόσο, το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα προκαλούσε ροζ χρωματισμό κατά τις δοκιμές ενεργότητας εξαιτίας του Piperazine, αλλοιώνοντας ενδεχομένως τα αποτελέσματα. Για αυτόν τον λόγο έγινε η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος Bis-Tris pH 6.

8.3 Υπολογισμός πρωτεϊνικού φορτίου και ενζυμικής ενεργότητας 1,2-CD

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την στήλη χρωματογραφίας αναφέρεται στην ενότητα 4.8.4.2. Για τα διάφορα δείγματα που συλλέχθηκαν από την στήλη σε σωλήνες έγινε μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι πρωτεϊνικού φορτίου. Τα κλάσματα που έδειξαν απορρόφηση στα 280 nm εξετάστηκαν ως προς την ενζυμική ενεργότητα της 1,2-CD.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (διάγραμμα 2.8) παρουσιάζονται οι απορροφήσεις στα 280 nm και οι ενζυμικές ενεργότητες της 1,2-CD για τα διάφορα κλάσματα.



Διάγραμμα 2.8 Απορροφήσεις κλασμάτων στα 280 nm και ενζυμική ενεργότητα 1,2-CD για τις μέγιστες απορροφήσεις

Τα αποτελέσματα για την ενζυμική ενεργότητα της 1,2-CD φανερώνουν πως η πρωτεΐνη έχει εκλουστεί από την ρητίνη περίπου στα 236 mL διαλύματος (σωλήνας 59), ήτοι στα 118 λεπτά του προγράμματος (βλ. ενότητα 4.8.4.2). Αυτό σημαίνει πως η 1,2-CD που έχει προσδεθεί στην ρητίνη, απομακρύνεται από αυτήν κατά την ροή 100% ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου συγκέντρωσης 1 M. Τα δείγματα που βρίσκονται πριν από τον σωλήνα 59 και δείχνουν απορρόφηση στα 280 nm (όπως οι σωλήνες 3, 24 ή 49) περιέχουν άλλες πρωτεΐνες που διαχωρίζονται από την 1,2-CD. Τα δείγματα που βρίσκονται στους σωλήνες 56 έως 63 (δηλαδή στην περιοχή κοντά στον σωλήνα 59), συλλέχθηκαν, και οι μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας σε αυτά έδειξαν ποσοστιαία ανάκτηση πρωτεΐνης 70,7%.

8.4 Προσδιορισμός της καθαρότητας και του μοριακού βάρους της 1,2-CD με ανάλυση SDS-PAGE

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του απομονωμένου ενζύμου πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου SDS-PAGE, χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνικών μορίων γνωστού μοριακού βάρους (βλ. παράγραφο 4.8.5 του κεφαλαίου 4). Στην εικόνα 2.12 απεικονίζεται το πήκτωμα ακρυλαμιδίου μετά την ηλεκτροφόρηση. Η χρωματισμένη «ζώνη» που αντιστοιχεί στο ένζυμο εντοπίζεται λίγο πιο πάνω από τα 70 kDa και κάτω τα 90 kDa. Πιο αναλυτικά, η χρωματισμένη ζώνη υπολογίστηκε ότι βρίσκεται περίπου στα 73 kDa. Η μοναδική ζώνη στην στήλη του δείγματος αποδεικνύει την καθαρότητα της απομονωμένης πρωτεΐνης.



Εικόνα 2.12 Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Στο πήκτωμα φαίνεται στα δεξιά η δέσμη των πρωτεϊνικών μορίων του πρότυπου διαλύματος (*marker*) και στα αριστερά η ζώνη που αντιστοιχεί στην 1,2-CD

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κεφάλαιο 9 Συμπεράσματα

9.1 Διαλογή μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση των 2,4-dCP και PCB 29

Η διαλογή αποτέλεσε μια διαδικασία ανάδειξης των αποτελεσματικότερων μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση των 2,4-dCP και PCB 29. Η μέθοδος διαλογής που αναφέρεται στις περισσότερες ερευνητικές εργασίες περιλαμβάνει τον αρχικό εμβολιασμό καλλιεργείων με το επιθυμητό μικροβιακό στέλεχος, και ύστερα από καθορισμένο χρόνο επώασης αυτών, προσθήκη της προς αποικοδόμηση ένωσης. (Birolli et al., 2015; Fahr, Wetzstein, Grey, & Dietmar, 1999; Levin et al., 2003; Vroumsia et al., 2005). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν αυτή των κυττάρων σε ηρεμία (resting cells) όπου τα κύτταρα αφού αναπτυχθούν απομακρύνονται από το θρεπτικό και προστίθενται σε υδατικό διάλυμα του προς εξέταση ρύπου. Η λογική της μεθόδου αυτής είναι να υποβάλει τα μυκητιακά κύτταρα σε συνθήκες 'στρες', γεγονός που έχει συνδεθεί στην βιβλιογραφία με αποτελεσματικότερη δράση των τελευταίων. Πράγματι, τα ένζυμα που έχουν σημασία στη βιοεξυγίανση παράγονται κάτω από συνθήκες ανεπάρκειας θρεπτικών συστατικών (Davies & Westlake, 1979; Korcan, Cigerci, & Konuk, 2013; Mansur & Gonza, 2003; Sardrood et al., 2004). Από την παρούσα διπλωματική εργασία δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα για το ποια από τις δύο μεθόδους διαλογής είναι αποτελεσματικότερη, καθώς κάτι τέτοιο θα απαιτούσε τον σχεδιασμό και τη σύγκριση πειραμάτων διαλογής και με τις δύο μεθόδους.

Κατά την διαλογή των μικροοργανισμών παρατηρήθηκε κάτι παράδοξο στα περισσότερα αποτελέσματα. Ενώ υπήρξε μείωση στη συγκέντρωση της 2,4-dCP μεταξύ 3^{ης} και 6^{ης} ημέρας δειγματοληψίας, τα αποτελέσματα τις 10^{ης} ημέρας έδειξαν μικρότερη συνολική μείωση από την 6^η ημέρα και πολλές φορές και από την 3^η. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για το PCB 29 ωστόσο σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με την 2,4-dCP. Η διαφορά στις τιμές μεταξύ των δειγμάτων της 6^{ης} και 10^{ης} ημέρας μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η 2,4-dCP καθώς και το PCB 29 προσροφώνται εν μέρει από την κυτταρική βιομάζα λόγω της λιποφιλικότητάς τους και επομένως η συγκέντρωση στον όγκο αντίδρασης μειώνεται περαιτέρω. Το φαινόμενο αυτό είναι αναμενόμενο με βάση την βιβλιογραφία, καθώς οι ρύποι αυτοί τείνουν σε υδάτινα περιβάλλοντα να δεσμεύονται έντονα σε στερεά σωματίδια και συνεπώς να ανιχνεύονται μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις στη διαλυμένη φάση (O'Sullivan &

Megson, 2013; UNEP, 2010; Zeddel & Majcherczyk, 2015). Μάλιστα, την ιδιότητα τους αυτή εκμεταλλεύονται ορισμένες τεχνικές αντιρρύπανσης, που βασίζονται στην βιοπροσρόφηση (biosorption) των ρύπων με ακινητοποιημένα μυκητιακά κύτταρα (Wu, 2007). Συνεπώς, μόνο κατά την 10^η ημέρα δειγματοληψίας υπολογίζεται η ρεαλιστική τιμή συγκέντρωσης του ρύπου, όπου ελήφθη ολόκληρος ο όγκος της αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων, ο οποίος και εκχυλίστηκε πριν από την ανάλυσή του. Έτσι, εκχυλίστηκαν και τα μόρια του PCB 29 και της 2,4-dCP που είχαν δεσμευτεί στην κυτταρική βιομάζα. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα των Vroumsia et al. (2005) οι οποίοι σε ένα παρόμοιο πείραμα μυκητιακής βιομετατροπής της 2,4-dCP από τους μικροοργανισμούς *Chrysosporium ramosum* και *Mucor genevensis*, εκχύλισαν στο πέρας των 5 ημερών την στερεή βιομάζα με μεθανόλη και βρήκαν ότι δεν είχε πραγματοποιηθεί προσρόφηση των μορίων στα κύτταρα.

Είναι εμφανές ότι η βιομετατροπή του PCB 29 από τα μυκητιακά στελέχη είναι πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με την βιοαμικοδόμηση της 2,4-dCP. Πράγματι, ενώ μόλις λίγα στελέχη κατάφεραν να μετατρέψουν πάνω από το 50% της 2,4-dCP εντός 10 ημερών, πολλά στελέχη μπόρεσαν να βιομετατρέψουν το PCB 29 σε ποσοστά άνω του 80%, ενώ αρκετά στελέχη αποδείχθηκαν ικανά να το χρησιμοποιήσουν σχεδόν εξ ολοκλήρου (>98%). Αυτό ίσως φαίνεται κάπως παράδοξο, καθώς το PCB 29 είναι πιο πολύπλοκο μόριο από τη 2,4-dCP. Όμως πρέπει να σημειωθεί ότι η αρχική συγκέντρωση της 2,4-dCP ήταν 1 mM (163ppm), η οποία είναι υψηλή σε σύγκριση με αυτήν του PCB 29 (0,97 μM) που χρησιμοποιήθηκε λόγω της πολύ χαμηλής διαλυτότητας του τελευταίου. Επομένως, η σχετικά υψηλή συγκέντρωση της 2,4-dCP μπορεί να έχει επηρεάσει σε κάποιο βαθμό τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν και την αποτελεσματικότητα της βιοαμικοδόμησης, λόγω της τοξικότητας της. Σε μια μελέτη οι ερευνητές έδειξαν πως η αύξηση της συγκέντρωσης της 2,4-dCP παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μυκητιακών κυττάρων του γένους *Gloeophyllum*. (Fahr, Wetzstein, Grey, & Y, 1999a). Μείωση της ανάπτυξης των μυκητιακών στελεχών *Trichoderma sp. Gc1* και *P. miczynskii Gc5* παρατηρήθηκε επίσης κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του διχλωροδιφαινυλοδιχλωροαιθανίου (DDD), ενός μεταβολίτη του DDT (που ανήκει στην οικογένεια των POPs) (Nere et al., 2011). Τέλος, οι Olaniran et al. (2017) παρατήρησαν πως με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της 2,4-dCP, μειωνόταν η ικανότητα διάσπασης της από τα μελετούμενα στελέχη του *Pseudomonas*.

Γίνεται λοιπόν εμφανές ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των ρύπων αυτών επηρεάζει σε κάποιον βαθμό την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και συνεπώς την διαδικασία βιοαποικοδόμησης.

Βιοαποικοδόμηση της 2,4-dCP μικρότερη του 50% παρατηρήθηκε και από τους Vroumsia et al. (2005) οι οποίοι είχαν διεξάγει τις μυκητιακές βιοκαταλυτικές αντιδράσεις με 2,4-dCP συγκέντρωσης 0,62 mM. Λίγα μόνο στελέχη ήταν αυτά που κατάφεραν μετατροπή μεγαλύτερη από 50% (*C. pannorum* (61%), *Mucedinaceae*, *M. genevensis*, (65%) *Zygomycetes* και *Phoma glomerata*, (58%) *Sphaeropsidale*). Αντίθετα, οι Olaniran et al. (2017) πέτυχαν μετατροπή 98,4% της 2,4-dCP αρχικής συγκέντρωσης 0,25 mM από τρία βακτηριακά στελέχη (*Pseudomonas putida DLL-E4*, *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas fluorescens*). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ικανοποιητική αποικοδόμησή των PCBs από βακτηριακά και μυκητιακά στελέχη, ειδικότερα όταν αφορά δι- και τριχλωροδифαινύλια (Abramowicz, 1995; Kub, Eichleron, Homolka, Nerud, & Sa, 2001; Zeddel & Majcherczyk, 2015). Δεν μπορούν να συγκριθούν άμεσα με τα δικά μας γτ η μέθοδος αποδόμησης ήταν διαφορετική.

9.2 Μεταβολικά προϊόντα της αποικοδόμησης της 2,4-dCP.

Τα διάφορα μεταβολικά προϊόντα που ανιχνεύτηκαν από την αποικοδόμηση της 2,4-dCP περιλαμβάνουν την υδροξυ-υδροκινόλη, την 3,5-διχλωροκατεχόλη, τη χλωροφαινόλη, το τετραϋδροξυβενζόλιο και το μαλεϊνικό οξύ. Όλα τα προϊόντα είναι πιο υδρόφιλα ή/και λιγότερο τοξικά από την αρχική ένωση. Η 3,5-διχλωροκατεχόλη αποτελεί ένα μεταβολικό προϊόν της διάσπασης της 2,4-dCP που έχει ανιχνευτεί αρκετές φορές στο παρελθόν και από άλλους ερευνητές (Fahr, Wetzstein, Grey, & Y, 1999a; Koh, McCullar, & Focht, 1997; Perkins, Gordon, Caceres, & Lurquin, 1990; Vroumsia et al., 2005). Επίσης, οι Valli και Gold (1991) εντόπισαν το τετραϋδροξυβενζόλιο ως ενδιάμεσο προϊόν της μετατροπής της 2,4-dCP σε μηλικό οξύ (malonic acid) από τον μύκητα *Phanerochaete chrysosporium*, ενώ οι Fahr et al. (1999) στην προσπάθειά τους να χαρακτηρίσουν τους μεταβολίτες της διάσπασης της 2,4-dCP από τον *G. Striatum* (μύκητας καστανόχρωμης σήψης) εντόπισαν τον μεταβολίτη 4-χλωροκατεχόλη, ο οποίος δεν ανιχνεύτηκε από τις δικές μας αναλύσεις.

9.3 Μηχανισμός διάσπασης της 2,4-dCP

Προχωρώντας ένα βήμα παραπέρα επιδιώκεται η εκτίμηση του μηχανισμού αποικοδόμησης της 2,4-dCP. Από τα διάφορα μυκητιακά στελέχη, το στέλεχος MLm-197-S3 ήταν το μόνο που βρέθηκε να ανοίγει τον δακτύλιο της υδροξυ-υδροκινόλης και να μετασχηματίζει την τελευταία σε μαλειϊνικό οξύ. Παράλληλα, κατά τις δοκιμασίες ενζυμικής ενεργότητας της 1,2-CD, το στέλεχος MLm-197-S3 έδειξε την υψηλότερη δραστηριότητα, πολύ πιο υψηλή (~10 φορές) από την αμέσως μεγαλύτερη. Όπως είναι γνωστό από την βιβλιογραφία, η 1,2-CD συμμετέχει στην διάσπαση του δεσμού άνθρακα-άνθρακα μεταξύ των φαινολικών υδροξυλομάδων της κατεχόλης, αποδίδοντας ως προϊόν το μουκονικό οξύ (muconic acid) (Boyd et al., 2001; Gibson & Parales, 2000; Pankaj Kumar Arora, Alok Srivastava, 2010; Solomon et al., 2000). Μόνο τυχαίο δεν μπορεί να είναι λοιπόν το γεγονός ανίχνευσης ενός προϊόντος ανοικτού δακτυλίου στο ίδιο στέλεχος για το οποίο βρέθηκε ιδιαίτερα υψηλή ενεργότητα ενός ενζύμου διάσπασης δακτυλίου.

Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τον μηχανισμό αποικοδόμησης των χλωροφαινολικών ενώσεων και διάσπασης του αρωματικού δακτυλίου από αερόβια βακτήρια και μύκητες (M. M. Haggblom & Valo, 1995; Neilson, Allard, Hynning, & Remberger, n.d.; Rochkind-Dubinsky, Sayler, & Blackburn, 1987; Tiedje, Boyd, & Fathpure, 1987). Η αερόβια βιοδιάσπαση των χλωροφαινολών ξεκινάει από την δράση οξυγενασών (μόνο- ή δι-) που τοποθετούν υδροξυλομάδες στον αρωματικό δακτύλιο. Οι διχλωροφαινόλες συγκεκριμένα μετατρέπονται πρώτα στις αντίστοιχες κατεχόλες με υδροξυλίωση του αρωματικού δακτυλίου σε θέση 'όρθο'. Κάτι τέτοιο φαίνεται να έχει συμβεί και εδώ με την 3,5-διχλωροκατεχόλη να ανιχνεύεται ως προϊόν σε τρεις από τις τέσσερις βιοκαταλυτικές αντιδράσεις. Στη συνέχεια, με βάση την βιβλιογραφία, ακολουθεί η διάσπαση του δακτυλίου και η αφαλογόνωση της ένωσης, ενώ οι προκύπτουσες αλειφατικές ενώσεις υπόκεινται σε αποικοδόμηση μέσω των καταβολικών οδών των μικροοργανισμών (Max M. Haggblom & Bossert, 2004; Perkins et al., 1990). Παρόλα αυτά, η αφαλογόνωση μπορεί να πραγματοποιηθεί και πριν την διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου (Arora & Bae, 2014a; Haggblom, D., & Max, 2003). Στην παρούσα έρευνα, η παρουσία των υδροξυ-υδροκινόλη και τετραϋδροξυβενζόλιο (μεταβολίτες κλειστού δακτυλίου) αλλά και του μαλειϊνικού οξέος (ο μοναδικός μεταβολίτης ανοικτού δακτυλίου που βρέθηκε), προϊόντα στα

οποία απουσιάζει το χλώριο, οδηγεί στο συμπέρασμα πως η αφαλογόνωση προηγήθηκε της σχάσης του δακτυλίου. Τέλος, κάποιες φορές μπορεί να πραγματοποιηθεί ατελής αερόβια μετατροπή οδηγώντας στην δημιουργία ‘αδιέξοδων’ ενώσεων (Max M. Haggblom & Bossert, 2004). Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί στην βιοαποικοδόμηση των 2,4-dCP (Valli & Gold, 1991), 2,4,5-τριχλωροφαινόλης (Joshi & Gold, 1993), και της πενταχλωροφαινόλης (Mileski, Bumpus, Jurek, & Aust, 1988) από το μύκητα λευκής σήψης *Phaenerochaete chrysosporium*.

9.4 Ενζυμικές ενεργότητες

9.4.1 Ενζυμική ενεργότητα αφαλογονασών

Στις χλωριωμένες ενώσεις η αντικατάσταση στον δακτύλιο μορίων χλωρίου από υδροξυλομάδες έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή υδροχλωρίου και συνεπώς την μείωση του pH (Arora & Bae, 2014b; Max M. Haggblom & Bossert, 2004). Το assay που χρησιμοποιήθηκε ωστόσο με σκοπό τον εντοπισμό της ενζυμικής ενεργότητας των αφαλογονασών έδειξε μηδενική μεταβολή του pH και άρα μηδενική ενεργότητα. Όμως, με βάση τους μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από την διάσπαση της 2,4-dCP είναι αυτονόητο ότι έχει επέλθει αφαλογόνωση του αρωματικού δακτυλίου και συνεπώς απελευθέρωση μορίων υδροχλωρίου. Πιθανό είναι το assay που χρησιμοποιήθηκε να μην ήταν αρκετά ευαίσθητο για τον εντοπισμό της ενεργότητας της αφαλογονάσης που αναμενόταν να υπάρχει ή η ενζυμική ενεργότητα αυτή να βρίσκεται στο εσωκυτταρικό υγρό το οποίο δεν αναλύθηκε.

9.4.2 Ενζυμική ενεργότητα 2,3-CD

Ο έλεγχος για τον εντοπισμό της 2,3-CD έδειξε πολύ μικρή ενζυμική ενεργότητα της τελευταίας, ιδιαίτερα σε σύγκριση με την ενζυμική ενεργότητα της 1,2-CD. Αυτό μπορεί να σημαίνει πως το συγκεκριμένο μυκητιακό στέλεχος ειδικεύεται στην παραγωγή της 1,2-CD. Στην έρευνα των Olaniran et al. (2017), κατά την αποικοδόμηση της 2,4-dCP αρχικής συγκέντρωσης 0,25 mM από βακτηριακά στελέχη (*P. putida* και *P. reactans*), παρατηρήθηκε υψηλή παραγωγή της 2,3-CD έναντι της 1,2-CD με αποτέλεσμα να ακολουθηθεί ένα ‘μετα’ μεταβολικό μονοπάτι διάσπασης του αρωματικού δακτυλίου. Κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται είτε στην διαφορετική

φύση των μικροοργανισμών, είτε εξαιτίας των διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων των ρύπων. Πράγματι, οι Hupert-kocurek et al. (2013) παρατήρησαν ότι το στέλεχος *Planococcus* sp. σε χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις φαινόλης παρουσίαζε δραστηριότητα και σε 1,2-CD και σε 2,3-CD, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις της φαινόλης μειωνόταν η ενεργότητα της 1,2-CD και αυξανόταν αυτή της 2,3-CD.

9.5 Απομόνωση 1,2-CD

Στις περισσότερες ερευνητικές εργασίες η 1,2-CD ή άλλα παρόμοια ένζυμα, όπως η 1,2 διοξυγενάση της υδροξυ-υδροκινόλης, έχουν απομονωθεί από το εσωκυτταρικό υγρό (Caglio et al., 2009; Kiyohara, 1999; Li, 2007; Murakami, Wang, Naito, Shinke, & Aoki, 1998; Nadaf & Ghosh, 2011; Wang, You, & Wang, 2006). Αντίθετα στην παρούσα εργασία η 1,2-CD που απομονώθηκε ήταν εξωκυτταρικό ένζυμο. Αυτό έγινε διότι η 1,2-CD έδειξε μεγαλύτερη τιμή ενζυμικής ενεργότητας στο εξωκυτταρικό από ότι στο εσωκυτταρικό υγρό (5 φορές υψηλότερη).

Έρευνες απομόνωσης της 1,2-CD από διάφορους μικροοργανισμούς που έχουν γίνει, χρησιμοποιούν πολλαπλά στάδια για τον καθαρισμό του ενζύμου (Aoki, Konohana, Shinke, & Nishira, 2014; Gražina & Lilija, 2009; Kiyohara, 1999; Matsumura, Ooi, Murakami, Takenaka, & Aoki, 2004; Murakami et al., 1998; San-chin & Yaw-kuen, 2007; Wang et al., 2006). Αντίθετα, στη συγκεκριμένη εργασία ο καθαρισμός του ενζύμου πραγματοποιήθηκε μόλις σε ένα στάδιο, καθιστώντας την όλη διαδικασία απομόνωσης εύκολη και γρήγορη. Επίσης, το γεγονός ότι η απομόνωση πραγματοποιήθηκε σε ένα μόνο βήμα αυξάνει την ποσοστιαία ανάκτηση της ενζυμικής ενεργότητας μετά από τις διαδικασίες καθαρισμού της (70,7%). Στην μελέτη των Nadaf & Ghosh (2011) (καθαρισμός σε ένα βήμα) η ανάκτηση υπολογίστηκε ίση με 45%, ενώ σε διαδικασίες ανάκτησης πολλών βημάτων, το ποσοστό ανάκτησης μειώνεται δραστικά και μπορεί να φτάσει έως πολύ χαμηλές τιμές, όπως 8,4% (Matsumura et al., 2004) ή 2,7% (Murakami et al., 1998). Σε μια απομόνωση ενός σταδίου της 1,2-CD από ένα γενετικά τροποποιημένο *E. coli* (Caglio et al., 2009), χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας με ρητίνη Q-Sepharose (την ίδια που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία), που εξισορροπήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8,0. Σε μια άλλη έρευνα από τους Nadaf & Ghosh (2011), η απομόνωση της 1,2-CD από το βακτήριο *Rhodococcus* sp. πραγματοποιήθηκε σε ένα στάδιο με την

χρήση ρητίνης DEAE-cellulose (diethylaminoethyl-cellulose) (διαωθλαμινοαιθυλοκυτταρίνης) με ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,0.

9.6 Προσδιορισμός του μοριακού βάρους του ενζύμου

Το μοριακό βάρος που προσδιορίστηκε με την μέθοδο SDS-PAGE αντιστοιχεί περίπου στα 73 kDa. Πολλές μελέτες χαρακτηρισμού της 1,2-CD διαφορετικής προέλευσης έχουν πραγματοποιηθεί, με τα αποτελέσματα για το μοριακό βάρος του ενζύμου να βρίσκονται για τις περισσότερες μεταξύ των 30 και 50 kDa. Οι San-chin και Yaw-kuen (2007) απομόνωσαν μια 1,2-CD από τον μύκητα *Candida albicans* TL3 και την χαρακτήρισαν ως ομοδιμερές, με κάθε υπομονάδα να έχει μοριακό βάρος 32 kDa. Σε παρόμοια ευρήματα κατέληξαν οι Murakami et al. (1998) για την 1,2-CD από το βακτήριο *Arthrobacter* sp. BA-5-17, δηλαδή ένα ομοδιμερές με μοριακό βάρος υπομονάδας τα 33 kDa. Στην βιβλιογραφία έχουν χαρακτηριστεί και άλλα διμερή μόρια 1,2-CD με μοριακά βάρη όπως 96 kDa (Gražina & Lilija, 2009) και 106 kDa (Patal, Hon, Felix, & Lillard, 1976). Σε αντίθεση με τις παραπάνω έρευνες, οι Matsumura et al. (2004) χαρακτήρισαν μια 1,2-CD από το βακτήριο *Rhodococcus* sp. AN-22 ως μονομερές ένζυμο μοριακού βάρους 32 kDa, ενώ οι Guzik et al. (2013) απομόνωσαν ένα μονομερές μόριο 1,2-CD από τον μικροοργανισμό *Stenotrophomonas maltophilia*, μοριακού βάρους 34,5 kDa.

Κεφάλαιο 10 Προτάσεις για το μέλλον

Για την μελέτη της αποικοδόμησης των ρύπων πρέπει να γίνουν προσπάθειες βελτίωσης στα εξής σημεία:

- Ανίχνευση των μεταβολιτών που προκύπτουν από την διάσπαση του PCB 29 με την χρήση GC-MS και εύρεση του πιθανού μηχανισμού βιοδιάσπασης του.
- Εύρεση τρόπων βελτιστοποίησης της αποικοδομησης της 2,4-dCP. Εφαρμογή μεθόδου αρχικού εμβολιασμού καλλιιεργειών με το επιθυμητό μικροβιακό στέλεχος και ύστερα από καθορισμένο χρόνο επώασης αυτών προσθήκη της προς αποικοδόμηση ένωσης, ή ανάπτυξη καλλιιεργειών με χρήση μη τοξικών ουσιών για την επαγωγή ενζυμικών ενεργοτήτων και ύστερα εφαρμογή μεθόδου κυττάρων σε ηρεμία.
- Δοκιμή μεθόδων μεγαλύτερης ευαισθησίας για την ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας των αφαλογονασών.

Για το καθαρό ένζυμο της 1,2-CD θα πρέπει να πραγματοποιηθούν οι εξής εργασίες:

- Βιοχημικός χαρακτηρισμός (κινητικοί παράμετροι, βέλτιστη θερμοκρασία δράσης, βέλτιστο pH δράσης, ισοηλεκτρικό σημείο, ανάλυση θερμοσταθερότητας, εξειδικευμένη δράση σε διάφορα υποστρώματα, παρεμπόδιση δράσης)
- Αμινοξική αλληλούχηση της πρωτεΐνης και βάση αυτής δημιουργία συνθετικού γονιδίου για ετερόλογη έκφραση σε ξενιστή με σκοπό την διευκόλυνση παραγωγής και καθαρισμού της.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abramowicz, D. A. (1995). Aerobic and Anaerobic PCB Biodegradation in the Environment Village of. *Environmental Laboratory, GE Corporate Research and Development, Schenectady, New York*, (22), 97–99.
- Ahlborg, U. G., & Spencer, H. C. (1980). *Chlorinated phenols: occurrence, toxicity, metabolism, and environmental impact.*, *Crit Rev Toxicol.* 1980 Jul;7(1):1-35.
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation* (Second edi). Boston: Academic Press.
- Aoki, K., Konohana, T., Shinke, R., & Nishira, H. (2014). Purification and Characterization of Catechol Rhodococcus erythropolis AN-13, 1369(August 2017). <https://doi.org/10.1080/00021369.1984.10866453>
- Arora, P. K., & Bae, H. (2014a). Role of Dehalogenases in Aerobic Bacterial Degradation of Chlorinated Aromatic Compounds, 2014.
- Arora, P. K., & Bae, H. (2014b). Role of Dehalogenases in Aerobic Bacterial Degradation of Chlorinated Aromatic Compounds. *Journal of Chemistry*, 2014.
- Arrebola, J. P., González-Jiménez, A., Fornieles-González, C., Artacho-Cordón, F., Olea, N., Escobar-Jiménez, F., & Fernández-Soto, M. L. (2015). Relationship between serum concentrations of persistent organic pollutants and markers of insulin resistance in a cohort of women with a history of gestational diabetes mellitus. *Environmental Research*, 136, 435–440. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.11.007>
- Atagana, I. H., & Haynes, R. J. (2003). Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote- contaminated soil. *PubMed*, (March 2014). <https://doi.org/10.1023/A>
- Atlas, R. M. I., & Philp, J. (2005). *Bioremediation, Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup*. WASHINGTON, D.C. <https://doi.org/10.1128/9781555817596>
- Bajaj, S., & Singh, D. K. (2015). Biodegradation of persistent organic pollutants in soil, water and pristine sites by cold-adapted microorganisms: Mini review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 100, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.02.023>
- Birolli, W. G., Yamamoto, K. Y., Oliveira, J. R. De, Nitschke, M., Selegim, M. H. R., & Porto, A. L. M. (2015). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Biotransformation of dieldrin by the marine fungus *Penicillium miczynskii* CBMAI 930. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.06.002>
- Boada, L. D., Zumbado, M., Henríquez-Hernández, L. A., Almeida-González, M., Álvarez-León, E. E., Serra-Majem, L., & Luzardo, O. P. (2012). Complex organochlorine pesticide mixtures as determinant factor for breast cancer risk: a population-based case–control study in the Canary Islands (Spain). *Environmental Health*, 11(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-28>
- Bonugli-Santos, R. C., Vasconcelos, M. R. dos S., Passarini, M. R. Z., Vieira, G. A. L., Lopes, V. C. P., Mainardi, P. H., ... Sette, L. D. (2015). Marine-derived fungi: Diversity of enzymes and biotechnological applications. *Frontiers in*

- Microbiology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00269>
- Boyd, D. R., Sharma, N. D., & Allen, C. C. R. (2001). Aromatic dioxygenases : molecular biocatalysis and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, (12), 564–573.
- Breedveld, G., & Sparrevik, M. (2000). Nutrient-Limited Biodegradation of PAH in Various Soil Strata at a Creosote Contaminated Site. *Bioromedation*, 11, 391–399. <https://doi.org/10.1023/A:1011695023196>
- Bukowska, B., & Hutnik, K. (2006). 2,4-D and MCPA and their derivatives: Effect on the activity of membrane erythrocytes acetylcholinesterase (in vitro). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85(3), 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.11.009>
- Bukowska, B., & Kowalska, S. (2004). Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters*, 152(1), 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.03.025>
- Caglio, R., Valetti, F., Caposio, P., Gribaudo, G., Pessione, E., & Giunta, C. (2009). Fine-Tuning of Catalytic Properties of Catechol 1, 2- Dioxygenase by Active Site Tailoring, 1015–1024. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800836>
- Carpenter, D. O. (2006). Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Routes of Exposure and Effects on Human Health. *REVIEWS ON ENVIRONMENTAL HEALTH*, 21(1), 1–24.
- Cavicchioli, R., Siddiqui, K. S., Andrews, D., & Sowers, K. R. (2002). Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 253–261. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00317-8)
- Chen, M. L., Wang, L., Chi, Y. K., Mao, C. C., Lung, S. C. C., & Mao, I. F. (2012). Polybrominated Diphenyl Ethers in Foodstuffs from Taiwan: Level and Human Dietary Exposure Assessment. *Science of the Total Environment*, 431, 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.046>
- Chen, Y., Wang, X., Li, Y., Toms, L. M. L., Gallen, M., Hearn, L., ... Mueller, J. F. (2015). Persistent organic pollutants in matched breast milk and infant faeces samples. *Chemosphere*, 118(1), 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.076>
- Croes, K., Colles, A., Koppen, G., Govarts, E., Bruckers, L., Van de Mierop, E., ... Baeyens, W. (2012). Persistent organic pollutants (POPs) in human milk: A biomonitoring study in rural areas of Flanders (Belgium). *Chemosphere*, 89(8), 988–994. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.06.058>
- Czaplicka, M. (2004). Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment. *Science of the Total Environment*, 322(1–3), 21–39.
- Dalmaso, G., Ferreira, D., & Vermelho, A. (2015). Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Marine Drugs*. <https://doi.org/doi:10.3390/md13041925>.
- Davies, J. S., & Westlake, D. W. S. (1979). Crude oil utilization by fungi. *Department of Microbiology, University of Alberta, Canada*.

- Deribe, E., Rosseland, B. O., Borgström, R., Salbu, B., Gebremariam, Z., Dadebo, E., ... Eklo, O. M. (2014). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in fish from Lake Awassa in the Ethiopian rift valley: Human health risks. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93(2), 238–244. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1314-6>
- Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., & Purohit, H. J. (2016). Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 56(3), 247–264. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>
- Dorothy, M. (2010). Fooling with Nature: Silent Spring Revisited. *Frontline*. Retrieved from <http://www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/shows/nature/disrupt/sspring.html>
- Dravis, B. C., Lejeune, K. E., Hetro, A. D., & Russell, A. J. (2000). Enzymatic Dehalogenation of Gas Phase Substrates with Haloalkane Dehalogenase. *Biotechnol Bioeng*. 5;69(3):235-41.
- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., & Johri, A. (2002). Biotechnology and bioremediation: Successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2–3), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1024-6>
- Fahr, K., Wetzstein, H., Grey, R., & Dietmar, Y. S. (1999). Degradation of 2, 4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi, 175, 127–132.
- Fahr, K., Wetzstein, H., Grey, R., & Y, D. S. (1999a). Degradation of 2, 4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 175, 127–132.
- Fahr, K., Wetzstein, H., Grey, R., & Y, D. S. (1999b). Degradation of 2, 4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi, 175, 127–132.
- Fetzner, S., & Lingens, F. (1994). Bacterial Dehalogenases: Biochemistry, Genetics, and Biotechnological Applications. *Microbiological Reviews*, 641–685.
- Furukawa, K. (2003). Super bugs' for bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 185–187. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00088-X)
- Gascon, M., Morales, E., Sunyer, J., & Vrijheid, M. (2013). Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: A systematic review. *Environment International*, 52, 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.11.005>
- Gibson, D. T., & Parales, R. E. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology, 236–243.
- Gražina, G., & Liliija, K. (2009). Catechol 1,2-dioxygenase from α -naphthol degrading thermophilic *Geobacillus* sp. strain: purification and properties. *Central European Journal of Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.2478/s11535-008-0049-y>
- Grindler, N. M., Allsworth, J. E., Macones, G. A., Kannan, K., Roehl, K. A., & Cooper, A. R. (2015). Persistent organic pollutants and early menopause in U.S. women. *PLoS ONE*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116057>
- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Sitnik, M., & Wojcieszynska, D. (2013). High

- activity catechol 1 , 2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in cis , cis -muconic acid production. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9910-8>
- Häggbloom, B., D., I., & Max, M. (2003). *Microbial Processes and Environmental Applications*. (B. Häggbloom, I. D., & M. Max, Eds.).
- Häggbloom, M. M., & Bossert, I. D. (2004). *DEHALOGENATION Microbial Processes and Environmental Applications*.
- Häggbloom, M. M., & Valo, R. . (1995). Bioremediation of chlorophenol wastes. In *Microbiological Transformation of Toxic Organic Chemicals*, 389–434.
- Hernandez, A. R., Boada, L. D., Mendoza, Z., Ruiz-Suarez, N., Valerin, P. F., & Camacho, M. (2017). Consumption of organic meat does not diminish the carcinogenic potential associated with the intake of persistent organic pollutants (POPs). *Environmental Science and Pollution Research*, 24(5), 4261–4273. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4477-8>
- Hupert-kocurek, K., Guzik, U., & N, D. W. (2013). Factors affecting activity of catechol 2 , 3-dioxygenase from 2-chlorophenol-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2, 31(January), 141–147. <https://doi.org/10.3109/10242422.2013.796456>
- Hupert-kocurek, U. G. K. (2013). High activity catechol 1 , 2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in cis , cis -muconic acid production. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9910-8>
- Igbinosa, E. O., Odjadjare, E. E., Chigor, V. N., Igbinosa, I. H., Emoghene, A. O., Ekhaize, F. O., ... Idemudia, O. G. (2013). Toxicological profile of chlorophenols and their derivatives in the environment: the public health perspective. *Sci World J*, 2013.
- Iszatt, N., Stigum, H., Verner, M.-A., White, R. A., Govarts, E., Murinova, L. P., ... OBELIX. (2015). Prenatal and Postnatal Exposure to Persistent Organic Pollutants and Infant Growth: A Pooled Analysis of Seven European Birth Cohorts. *Environ Health Perspect*, 123(7), 730–736. <https://doi.org/10.1289/ehp.1308005>
- Jaacks, L. M., & Staimez, L. R. (2015). Association of persistent organic pollutants and non-persistent pesticides with diabetes and diabetes-related health outcomes in Asia: A systematic review. *Environment International*, 76, 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.12.001>
- Joshi, D., & Gold, M. (1993). Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidio- mycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, (59:1779–1785).
- Khan, S., & Cao, Q. (2012). Human health risk due to consumption of vegetables contaminated with carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Soils and Sediments*, 12(2), 178–184. <https://doi.org/10.1007/s11368-011-0427-3>
- Khenifi, A., Zohra, B., Kahina, B., Houari, H., & Zoubir, D. (2009). Removal of 2 , 4-DCP from wastewater by CTAB / bentonite using one-step and two-step methods : A comparative study, 146, 345–354.

- <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.06.028>
- Kimbrough, R. D. (2015). Critical Reviews in Toxicology Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Human Health : An Update Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Human Health : An Update *, 8444(November).
<https://doi.org/10.3109/10408449509021611>
- Kiyohara, H. (1999). Cloning and Sequence Analysis of Hydroxyquinol 1 , 2-Dioxygenase DTP0602 and Characterization of Its Product, 87(3), 267–272.
- Koh, S., McCullar, M., & Focht, D. (1997). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol through a distal meta-fission pathway. *Appl Environ Microbiol*, (63(5):2054–2057).
- Korcan, S. E., Cigerci, I. H., & Konuk, M. (2013). White-Rot Fungi in Bioremediation. *Biology Department, Faculty of Science and Literature, Afyon Kocatepe University*, 371–390. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-33811-3>
- Koudelakova, T., Chovancova, E., Brezovsky, J., Monincova, M., Fortova, A., Jarkovsky, J., & Damborsky, J. (2011). Substrate specificity of haloalkane dehalogenases, 354, 345–354. <https://doi.org/10.1042/BJ20101405>
- Kub, A., Eichlerov, I., Homolka, L., Nerud, F., & Sa, V. (2001). PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil, 43.
- Lammel, G., Dvorská, A., Klánová, J., Kohoutek, J., Kukučka, P., Prokeš, R., & Sehili, A. M. (2015). Long-range atmospheric transport of polycyclic aromatic hydrocarbons is worldwide problem-results from measurements at remote sites and modelling. *Acta Chimica Slovenica*, 62(3), 729–735.
<https://doi.org/10.17344/acsi.2015.1387>
- Levin, L., Viale, A., & Forchiassin, A. (2003). Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00091-4)
- Li, A., & Shao, Z. (2014). Biochemical Characterization of a Haloalkane Dehalogenase DadB from *Alcanivorax dieselolei* B-5, 9(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089144>
- Lim, J., Park, S. H., Jee, S. H., & Park, H. (2015). Body concentrations of persistent organic pollutants and prostate cancer: a meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22, 11275–84.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4315-z>
- Lovley, D. R. (2003). Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation, 1(October), 2003. <https://doi.org/10.1038/nrmicro731>
- Mansur, M., & Gonza, A. E. (2003). The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities, 95(6), 1013–1020.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). *Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments*. <https://doi.org/10.1007/s002530100701>
- Matsumura, E., Ooi, S., Murakami, S., Takenaka, S., & Aoki, K. (2004). Constitutive Synthesis , Purification , and Characterization of Catechol 1 , 2-Dioxygenase

- from the Aniline-Assimilating Bacterium *Rhodococcus* sp . AN-22, 98(2), 71–76.
- Michałowicz, J., & Duda, W. (2007). Phenols - Sources and toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(3), 347–362.
- Mileski, G. J., Bumpus, J. ., Jurek, M. A., & Aust, S. D. (1988). Biodegradation of PCP by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, (54, 2885– 2889).
- Mitro, S. D., Birnbaum, L. S., Needham, B. L., & Zota, A. R. (2016). Cross-sectional associations between exposure to persistent organic pollutants and Leukocyte telomere length among U.S. adults in NHANES, 2001–2002. *Environmental Health Perspectives*, 124(5), 651–658. <https://doi.org/10.1289/ehp.1510187>
- Moridani, M. Y., Siraki, A., Chevaldina, T., Scobie, H., & O'Brien, P. J. (2004). Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 147(3), 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.02.001>
- Muir, D. C. G., & Howard, P. H. (2006). Are there other persistent organic pollutants? A challenge for environmental chemists. *Environmental Science and Technology*, 40(23), 7157–7166. <https://doi.org/10.1021/es061677a>
- Mullis, K. B. (2006). 25 Greatest Science Books of All Time. *Discover*. Retrieved from <http://discovermagazine.com/2006/dec/25-greatest-science-books>
- Murakami, S., Wang, L., Naito, A., Shinke, R., & Aoki, K. (1998). Purification and characterization of four catechol 1,2-dioxygenase isozymes from the benzamide-assimilating bacterium, 153, 163–171. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(98\)80036-0](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(98)80036-0)
- Murray, H. E., & Wong, D. (1999). *Toxicological Profile for Chlorophenols*. October. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2013/286524>
- Nadaf, N. H., & Ghosh, J. S. (2011). Purification and characterization of catechol 1 , 2-dioxygenase from, 3(5), 608–613.
- Neilson, A. H., Allard, A. S., Hynning, P. Å., & Remberger, M. (n.d.). Toxicological & Environmental Chemistry Distribution , fate and persistence of organochlorine compounds formed during production of bleached pulp, (May 2015), 37–41. <https://doi.org/10.1080/02772249109357638>
- Nere, S., Marcia, O., Ana, N., Mouad, M., Helena, M., Seleghim, R., & Dura, L. (2011). Isolation of Brazilian marine fungi capable of growing on DDD pesticide, 43–50. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9374-8>
- Nikolaivits, E., Dimarogona, M., Fokialakis, N., & Topakas, E. (2017). Marine-derived biocatalysts: Importance, accessing, and application in aromatic pollutant bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00265>
- O'Sullivan, G., & Megson, D. (2013). *Brief Overview: Discovery, Regulation, Properties, and Fate of POPs*. *Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59424-2.00001-3>

- Olaniran, A. O., Singh, L., Kumar, A., Mokoena, P., & Pillay, B. (2017). Aerobic Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid and Other Chlorophenols by *Pseudomonas* Strains Indigenous to Contaminated Soil in South Africa : Growth Kinetics and Degradation Pathway 1, 53(2), 209–216.
<https://doi.org/10.1134/S0003683817020120>
- Paknikar, K., Puranik, P., Agate, A., & Naik, S. (1998). Metal biosorbents from waste fungal biomass: a new bioremedial material for control of heavy metal pollution. In L. R. Irvine & S. K. Sikdar (Eds.), *Bioremediation Technologies: Principles and Practice* (p. pp 557–576). Technomic, Lancaste: CRC Pres, Taylor & Francis Group.
- Pankaj Kumar Arora, Alok Srivastava, V. P. S. (2010). Application of Monooxygenases in Dehalogenation, Desulphurization, Denitrification and Hydroxylation of Aromatic Compounds. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, (January). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000112>
- Patal, R. N., Hon, C. T., Felix, A., & Lillard, M. . (1976). Catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: purification and properties. *J. Bacteriol.*, (127, 536–544).
- Perelló, G., Díaz-Ferrero, J., Llobet, J. M., Castell, V., Vicente, E., Nadal, M., & Domingo, J. L. (2015). Human exposure to PCDD/Fs and PCBs through consumption of fish and seafood in Catalonia (Spain): Temporal trend. *Food and Chemical Toxicology*, 81, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.010>
- Perkins, E., Gordon, M., Caceres, O., & Lurquin, P. (1990). Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J Bacteriol*, (172(5):2351–2359).
- Pieper, D. H., & Reineke, W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3), 262–270. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095816690000094X>
- Pulicherla, K. K. (2013). Marine biocatalysts and their stability: molecular approach. *Marine Enzymes for Biocatalysis*, 71–87.
<https://doi.org/10.1533/9781908818355.1.71>
- Reaves, D. K., Ginsburg, E., Bang, J. J., & Fleming, J. M. (2015). Persistent organic pollutants and obesity: Are they potential mechanisms for breast cancer promotion? *Endocrine-Related Cancer*, 22(2), R69–R86.
<https://doi.org/10.1530/ERC-14-0411>
- Reddy, C. A., & Mathew, Z. (2001). Bioremediation potential of white rot fungi. *Cambridge University Press*.
- Rochkind-Dubinsky, M. L., Sayler, G. S., & Blackburn, J. W. (1987). *Microbiological Decomposition of Chlorinated Aromatic Compounds*. New York.
- Ruiz-Fernández, A. C., Ontiveros-Cuadras, J. F., Sericano, J. L., Sanchez-Cabeza, J. A., Liong Wee Kwong, L., Dunbar, R. B., ... Páez-Osuna, F. (2014). Long-range atmospheric transport of persistent organic pollutants to remote lacustrine environments. *Science of the Total Environment*, 493, 505–520.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.002>

- Ruzzin, J. (2012). Public health concern behind the exposure to persistent organic pollutants and the risk of metabolic diseases. *BMC Public Health*, 12(1), 298. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-298>
- Safe, S., & Hutzinger, O. (2017). CRC Critical Reviews in Toxicology Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polybrominated Biphenyls (PBBs): Biochemistry , Toxicology , and Mechanism of Action, 6446(July). <https://doi.org/10.3109/10408448409023762>
- San-chin, T., & Yaw-kuen, L. (2007). Puri W cation and characterization of a catechol 1 , 2-dioxygenase from a phenol degrading Candida albicans TL3, 199–206. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0187-4>
- Sardrood, B. P., Goltapeh, E. M., & Varma, A. (2004). Fungi as Bioremediators (Volume 32, Vol. 32, p. 1367). Springer India. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.06.001>
- Schweigert, N., Zehnder, A. J. B., & Eggen, R. I. L. (2001). Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiology*, 3(2), 81–91. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00176.x>
- Sikkema, J. A. N., Jan, A. M., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *American Society for Microbiology*, 59(2), 201–222.
- Solomon, E. I., Brunold, T. C., Davis, M. I., Kemsley, J. N., Lee, S., Lehnert, N., ... Zhou, J. (2000). Geometric and Electronic Structure / Function Correlations in Non-Heme Iron Enzymes.
- Tiedje, J. M., Boyd, S. A., & Fathepure, B. Z. (1987). Anaerobic degradation of chlorinated aromatic hydrocarbons. *Developments in Industrial Microbiology*.
- UNEP. (2010). Ridding the World of POPs: A Guide to 1. UNEP. Ridding the World of POPs: A Guide to the Stockholm Convention. 20 (2010).the Stockholm Convention, 20. Retrieved from <http://www.pops.int/>
- UNEP. (2012). Stockholm Convention, At a glance, (2nd October 2012). Retrieved from <http://www.pops.int/>
- UNEP. (2017). Stockholm Convention Clearing House, The Convention, The POPs. Retrieved January 1, 2017, from <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx>
- Vafeiadi, M., Georgiou, V., Chalkiadaki, G., Rantakokko, P., Kiviranta, H., Karachaliou, M., ... Chatzi, L. (2015). Association of prenatal exposure to persistent organic pollutants with obesity and cardiometabolic traits in early childhood: The rhea mother–child cohort (Crete, Greece). *Environmental Health Perspectives*, 123(10), 1015–1021. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409062>
- Valli, K., & Gold, M. H. (1991). Degradation of 2,4-Dichlorophenol by the Lignin-Degrading Fungus Phanerochaete chrysosporium. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Vol. 173, 345–352.
- Van, A., Rochman, C. M., Flores, E. M., Hill, K. L., Vargas, E., Vargas, S. a., & Hoh, E. (2011). Persistent organic pollutants in plastic marine debris found on beaches in San Diego, California. *Chemosphere*, 43 pp.

- <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.039>
- Vested, A., Giwercman, A., Bonde, J., & Toft, G. (2014). Persistent organic pollutants and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, *16*(1), 71.
<https://doi.org/10.4103/1008-682X.122345>
- Vidali, M. (2001). Bioremediation . An overview, *73*(7), 1163–1172.
- Vroumsia, T., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., & Benoit-Guyod, J.-L. (2005). Fungal bioconversion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP). *Elsevier*, *60*, 1471–1480.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.102>
- Wang, C., You, S., & Wang, S. (2006). Purification and characterization of a novel catechol 1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a carbon source, *41*, 1594–1601. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.008>
- WHO. (2008). PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS (POPs) Children βε™ s Health and the Environment.
- WHO. (2017). Persistent organic pollutants (POPs) About POPs. Retrieved January 1, 2017, from http://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/pops/en/
- Wu, J. (2007). Biosorption of 2, 4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions, *98*, 253–259.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.018>
- Zeddel, A., & Majcherczyk, A. (2015). Toxicological & Environmental Chemistry Degradation of polychlorinated biphenyls by white - rot fungi *pleurotus ostreatus* and *trametes versicolor* in a solid state system. *Toxicological & Environmental Chemistry*, *40:1-4*(February 2015), 255–266.
<https://doi.org/10.1080/02772249309357947>
- Zhang, C., & Kim, S. (2012). *Application of Marine Microbial Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries. Marine Medicinal Foods* (1st ed., Vol. 65). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00028-7>
- Zhao, X., Kim, S. K., Zhu, W., Kannan, N., & Li, D. (2015). Long-range atmospheric transport and the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in Changbai Mountain. *Chemosphere*, *119*, 289–294.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.005>
- Zhao, Z., Xie, Z., Möller, A., Sturm, R., Tang, J., Zhang, G., & Ebinghaus, R. (2012). Distribution and long-range transport of polyfluoroalkyl substances in the Arctic, Atlantic Ocean and Antarctic coast. *Environmental Pollution*, *170*, 71–77.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.06.004>