

Φ. ΡΗΓΑΣ¹, Β. ΑΡΙΤΣΑ¹, R. MARCHANT², Ε. ΑΒΡΑΜΙΑΗ³, Ε. ΚΑΨΑΝΑΚΗ-ΓΚΟΤΣΗ⁴, Ζ. ΓΚΟΝΟΥ-ΖΑΓΚΟΥ⁴,
Σ. ΣΚΛΑΒΟΥΝΟΣ¹, Ι. ΧΑΤΖΗΛΑΚΗΣ¹, Α. ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΟΥ¹
1 ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ, ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
2 ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ULSTER, N. IRELAND, SCHOOL OF BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES
3 ΕΘΙΑΓΕ, ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΛΑΦΟΛΟΓΙΑΣ ΑΘΗΝΑΣ
4 ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

➤ **Περίληψη**

Σε αυτό το έργο, διεξήχθη βασική έρευνα για την απομόνωση από το περιβάλλον και τον χαρακτηρισμό ορισμένων στελεχών μυκήτων που έχουν την ικανότητα να αποδομούν τη λινίνη (μύκητες λευκής σήψης –white rot fungi) με τελικό στόχο τη χρησιμοποίησή τους στην βιοεξυγίανση εδαφών ρυπασμένων με τοξικές ουσίες.

➤ **Εισαγωγή**

Οι **μύκητες λευκής σήψης** έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν αποτελεσματικούς αποδομητές ποικίλων οργανικών ενώσεων. Συγκριτικά με άλλα συστήματα βιοεξυγίανσης, το εξοικονομικό, μη εκλεκτικό σύστημα αποδόμησης της λινίνης, που διαθέτουν οι βασιδιομυκήτες, έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε μια μεγάλη ποικιλία επίμονων τοξικών χημικών ενώσεων. Η βιοαποδομητική τους ικανότητα εξαρτάται από την έκκριση συγκεκριμένων λινινολυτικών ενζύμων, όπως η υπεροξειδάση της λινίνης, η υπεροξειδάση του μαγγανίου και η λακάση.

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν (Φωτ. 1) από την ερευνητική μας ομάδα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους για αποδόμηση της χρωστικής ουσίας Poly R-478, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση ελέγχου της λινινολυτικής ικανότητας.

Η χρωστική Poly R-478 έχει έντονο ροζ/κόκκινο χρώμα. Όταν συντελείται η αποδόμηση της χρωστικής, εμφανίζονται κίτρινες κηλίδες ή ζώνες (Φωτ. 2).

Η απομόνωση της χρωστικής μελετήθηκε και σε υγρές καλλιέργειες μυκήτων, όπου προσδιορίστηκε, τόσο η αποδόμηση, όσο και η ρόφηση της χρωστικής από τους μύκητες.

Οι ενζυμικές δραστηριότητες των μυκήτων υπολογίστηκαν σε υγρές καλλιέργειες και διαπιστώθηκε ο χρόνος έκφρασής τους καθώς και η μέγιστη τιμή.

Η ανοχή στο φυτοφάρμακο μελετήθηκε σε στερεές καλλιέργειες και προσδιορίστηκε ο ρυθμός ανάπτυξης σε τέσσερις συγκεντρώσεις ενός τοξικού βιοκτόνου, την πενταχλωροφαινόλη (PCP) το οποίο αποτελεί έναν από τους ρύπους προτεραιότητας, σύμφωνα με στοιχεία από την ΕΡΑ. Έγινε έλεγχος της ανοχής τους σε μεγάλες συγκεντρώσεις του βιοκτόνου.

Τέλος, πειράματα με χρήση του φυτοφαρμάκου Lindane πραγματοποιήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες. Αναπτύχθηκαν αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό του Lindane και μελετήθηκε η ικανότητα αποδόμησης του από το επιλεγμένο στέλεχος *Pleurotus ostreatus* sp.2, σε δύο θερμοκρασίες.

Φωτογραφία 1. Μύκητες που συλλέχθηκαν σε βουνά της Ελλάδας



➤ **Μέθοδοι και υλικά**

1. Στέλεχη

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν από την ερευνητική μας ομάδα, συλλέχθηκαν από βουνά της χώρας μας και κάποια παραγορήθηκαν από τη συλλογή των μυκήτων του Τομέα Οικολογίας και Ταξινόμησης του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών (Πίνακας 1).

2. Θρεπτικά μέσα και συνθήκες ανάπτυξης

Στερεές καλλιέργειες: PDA (Potato Dextrose Agar), CM (Complete medium), MA (Malt Extract Agar).

Μέσο αποχρωματισμού: BM (Basal Medium) με την προσθήκη 0.01% (w/w) Poly R-478.

Μέσο για την παραγωγή των λινινολυτικών ενζύμων: θρεπτικό μέσο K1K.

Μέσο δοκιμής ανοχής στη PCP: μέσο PDA με την προσθήκη 5, 10, 15 και 20 ppm.

Μέσο αποδόμησης φυτοφαρμάκων: μέσο BM με προσθήκη Lindane (3ppm).

Η θερμοκρασία επίστασης των μυκήτων διατηρήθηκε σταθερή στους 25°C σε σκοτεινό θάλαμο.

3. Ρυθμοί ανάπτυξης στα θρεπτικά μέσα και αποχρωματισμός της χρωστικής

Οι μετρήσεις της ακτίνας των μυκουλίων λαμβάνονταν κάθε δύο ημέρες, έως ότου να καλυφθεί πλήρως το τρυβλίο. Ο τελικός ρυθμός ανάπτυξης λαμβάνεται από το μέσο όρο των δειγμάτων σε mm / d. Σημειώθηκε η ημέρα εμφάνισης του αποχρωματισμού και ο τύπος αποχρωματισμού που ακολούθησε κάθε μύκητας. Στον υγρό αποχρωματισμό υπολογίστηκε η ικανότητα της αποδόμησης και ρόφησης της Poly R-478.

4. Δοκιμή ανοχής

Υπολογίστηκε ο ρυθμός ανάπτυξης σε διάφορες συγκεντρώσεις PCP.

5. Ενζυμικές δραστηριότητες

Η δραστηριότητα της λακάσης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο των Szklarz et al. (1989), της υπεροξειδάσης της λινίνης (LiP) με τη μέθοδο των Tien και Kirk (1988) και με τη μέθοδο Paszczynski et al. (1988) υπολογίστηκε η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης του μαγγανίου (MnP).

6. Ικανότητα αποδόμησης του φυτοφαρμάκου Lindane

Η αποδόμηση του Lindane υπολογίστηκε σε υγρές καλλιέργειες υπό ανάδραση και σε δύο θερμοκρασίες (18 και 28°C). Αναπτύχθηκε η κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης και η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο (Shimadzu GC-17A) εξοπλισμένο με ανιχνευτή ECD (Electron Capture Detector).

Πίνακας 1. Μύκητες που συλλέχθηκαν σε βουνά της Ελλάδας

Στέλεχος	Προέλευση	Υπόστρωμα
<i>Polyporus sp.1</i>	Αττική	Κλαδιά σε αποσύνθεση
<i>Polyporus sp.2</i>	Αττική	Πευκοβελόνες
<i>Polyporus brumalis</i>	Αττική	Κλαδιά σε αποσύνθεση
<i>Polyporus ciliatus</i>	Αττική	Πευκοβελόνες
<i>Pleurotus dryinus</i>	Αρκαδία	Σε ξύλα / <i>Quercus</i> sp.
<i>Pholiota squarrosa</i>	Ευρωτανία	Σε ξύλα / <i>Abies cephalonica</i>
<i>Polyporus meridionalis</i>	Αττική	Σε κλαδιά / <i>maquis</i> βλάστηση
<i>Pholiota aurivella</i>	Αττική	Απομεινάρια <i>Abies cephalonica</i>
<i>Omphalotus olearius</i>	Μεσσηνία	Ρίζες ή κορμούς του <i>Fagus moesiaca</i>
<i>Armillaria galica</i>	Μαγνησία	Κορμός του <i>Olea europea</i>
<i>Armillaria mellea</i>	Αρκαδία	Ρίζες του <i>Prunus avium</i>
<i>Pleurotus ostreatus sp.1</i>	Αττική	Κορμός του <i>Abies cephalonica</i>
<i>Pleurotus ostreatus sp.2</i>	Κορινθία	Οργανικό υλικό σε αποσύνθεση

Πίνακας 2. Ρυθμοί ανάπτυξης και έλεγχος αποχρωματισμού

Στέλεχος	Μέσος Ρυθμός Ανάπτυξης (mm/d)		Τύπος / Ημέρα εμφάνισης αποχρωματισμού
	PDA	BM	
<i>Pleurotus dryinus</i>	0,89 ± 0,09	0,95 ± 0,04	Κίτρινη ζώνη / 6
<i>Pholiota squarrosa</i>	1,15 ± 0,04	1,32 ± 0,17	Κίτρινη ζώνη / 8
<i>Polyporus meridionalis</i>	3,43 ± 0,09	2,44 ± 0,18	Διασκορπισμένες κηλίδες / 11
<i>Polyporus sp.1</i>	2,29 ± 0,07	2,51 ± 0,05	-
<i>Polyporus sp.2</i>	2,13 ± 0,08	1,99 ± 0,08	Κίτρινη ζώνη / 5
<i>Polyporus brumalis</i>	4,52 ± 0,11	3,43 ± 0,83	Κίτρινη ζώνη / 7
<i>Polyporus ciliatus</i>	3,33 ± 0,078	1,99 ± 0,05	Διασκορπισμένες κηλίδες / 7
<i>Pholiota aurivella</i>	1,63 ± 0,34	2,12 ± 0,76	Κίτρινη ζώνη / 5
<i>Omphalotus olearius</i>	3,49 ± 0,45	-	-
<i>Armillaria gallica</i>	0,92 ± 0,41	1,18 ± 0,13	Διασκορπισμένες κηλίδες / 13
<i>Armillaria mellea</i>	0,91 ± 0,34	-	-
<i>Pleurotus ostreatus sp.1</i>	6,21 ± 0,28	2,07 ± 0,00	Κίτρινη ζώνη / 6
<i>Pleurotus ostreatus sp.2</i>	6,28 ± 0,03	3,25 ± 0,55	Κίτρινη ζώνη / 6

Φωτογραφία 2. Αποχρωματισμός της χρωστικής (από φούζα σε κίτρινο)



➤ **Αποτελέσματα**

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 2, συμπεραίνουμε ότι ο μύκητας *Pleurotus ostreatus* sp.2 έχει το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης, 6,28 mm / ημέρα στο μέσο PDA. Το μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης τον παρουσιάζει ο μύκητας *Pleurotus dryinus*, 0,89 mm / ημέρα. Ο πρώτος μύκητας που αποχρωματίζει τη χρωστική Poly R-478 ήταν ο *Pholiota aurivella* σε 5 ημέρες, ενώ οι *Pleurotus ostreatus* sp.1 και sp.2, *Pleurotus dryinus*, αποχρωματίζουν σε 6 ημέρες.

Ο μύκητας *Pholiota aurivella* επιτυγχάνει 34% απομόκρυνση της χρωστικής ουσίας στις 17 ημέρες, ενώ τη μικρότερη απομόκρυνση παρουσιάζει ο μύκητας *Pol. brumalis* σε ποσοστό 21% (Πίνακας 3).

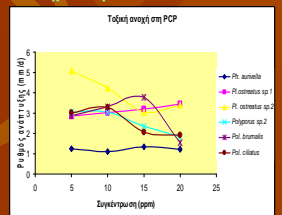
Η συγκέντρωση της πενταχλωροφαινόλης δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στους ρυθμούς ανάπτυξης των μυκήτων *Pholiota aurivella* και *Pleurotus ostreatus* sp.1. Αντιθέτως, η παρουσία της PCP, επηρεάζει την ανάπτυξη των άλλων μυκήτων. Η δραστηριότητα της λακάσης του μύκητα *Pleurotus ostreatus* sp.2 παρουσιάζει σταδιακή αύξηση με μέγιστο την 16η ημέρα με τιμή 34,46 U/L. Η δραστηριότητα MnP του μύκητα *Pleurotus ostreatus* sp.2 παρουσιάζει και αυτή σχεδόν σταδιακή αύξηση, με μέγιστο την 12η ημέρα με τιμή 46,30 U/L.

Τέλος, η απόδοση απομόκρυνσης από το μύκητα *Pleurotus ostreatus* sp.2, ήταν μεγαλύτερη στη χαμηλή θερμοκρασία και έφτασε στην τιμή 64,5%. Η απόδοση στην υψηλή θερμοκρασία κυμάνθηκε στην τιμή 56,8.

Πίνακας 3. Αποχρωματισμός της χρωστικής Poly R-478 από επιλεγμένα στελέχη.

Στέλεχος	Απόδοση Βιοαποδόμησης	Απόδοση Βιορρόφησης	Βιόμαζα (g)
<i>Polyporus sp.2</i>	24,57 ± 0,59	5,33 ± 1,19	0,144 ± 0,032
<i>Pol. brumalis</i>	14,86 ± 1,26	6,15 ± 0,85	0,101 ± 0,020
<i>Pol. ciliatus</i>	18,74 ± 0,46	5,85 ± 1,85	0,128 ± 0,020
<i>Pl. ostreatus sp.1</i>	20,62 ± 2,03	5,04 ± 1,14	0,064 ± 0,002
<i>Ph. aurivella</i>	30,14 ± 2,55	3,85 ± 0,19	0,064 ± 0,006

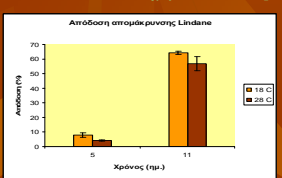
Σχήμα 1. Η τοξική ανοχή επιλεγμένων στελεχών στην PCP.



Πίνακας 4. Ενεργότητα της λακάσης και υπεροξειδάσης του μαγγανίου.

Στέλεχος	Μέγιστη ενεργότητα	
	Λακάση	Υπεροξειδάση του Μαγγανίου
<i>Polyporus sp.2</i>	21,54 ± 5,41	27,83 ± 2,26
<i>Pol. brumalis</i>	21,17 ± 6,26	43,03 ± 5,45
<i>Pol. ciliatus</i>	32,00 ± 4,07	38,35 ± 5,31
<i>Pl. ostreatus sp.1</i>	16,49 ± 2,34	40,46 ± 12,4
<i>Pl. ostreatus sp.2</i>	34,46 ± 6,28	46,29 ± 3,53

Σχήμα 2. Απόδοση απομόκρυνσης του Lindane από το στέλεχος *Pl. ostreatus* sp.2.



➤ **Συμπεράσματα**

Από την εξέταση των 13 βασιδιομυκήτων, προέκυψε ότι ο μύκητας *Pleurotus ostreatus* sp.2 παρουσιάζει ικανοποιητική βιοαποδόμηση του φυτοφαρμάκου lindane, γεγονός που καθιστά το μύκητα κατάλληλο για εφαρμογές βιοεξυγίανσης. Ο μύκητας θα χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε στερεές καλλιέργειες με λινινολυτικαρινούχα υλικά στο εργαστήριο και κατόπιν σε μολυσμένα εδάφη.

➤ **Δημοσιεύσεις σε περιοδικά και συνέδρια**

- F. Rigas, R. Marchant, V. Dritsa, E. Kapsanaki-Gotsi, Z. Gonou-Zagou, E. Avramides, 2003. " Screening of wood rotting fungi potentially useful for the degradation of organic pollutants" *Water, Air, and Soil Pollution: Focus* 3: 201-210.
- Dritsa, V., Rigas, F., Marchant, R., Kapsanaki-Gotsi, E., Gonou-Zagou, Z., 2003. "Screening of certain wood rotting fungi for their ability to degrade toxic compounds" *Second European Bioremediation Conference, Chania, Crete, Greece, June 30 – July 4, 2003.*
- Rigas, F., Dritsa, V., Chatzidakis, J. and Marchant, R., 2003 "Detoxification characteristics of selected *Polyporus* species for bioremediation applications", *8th Conference on Environmental Science and Technology, Lemnos, Greece, 2003.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ερευνητική ομάδα επιθυμεί να εκφράσει τις ευχαριστίες της προς την Επιτροπή Ερευνών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου για τη μερική χρηματοδότηση αυτής της έρευνας στα πλαίσια του προγράμματος «ΘΑΛΗΣ».