



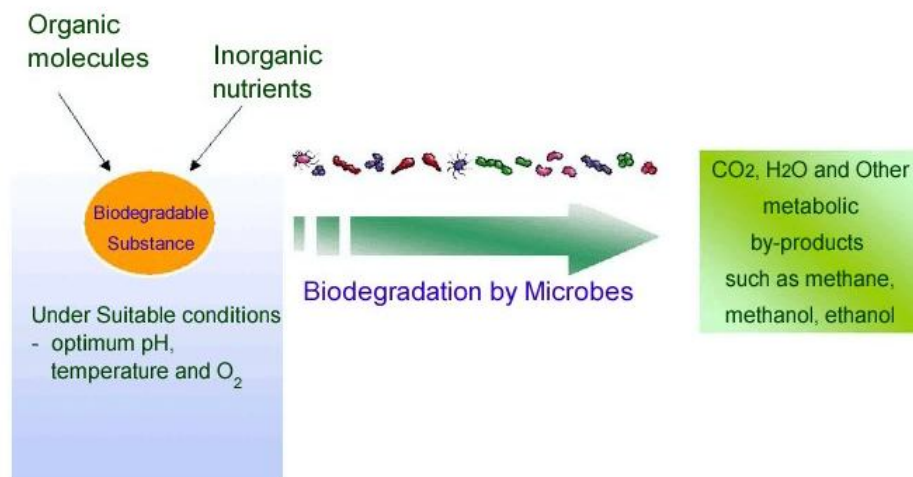
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεση και Ανάπτυξη Βιομηχανικών Διαδικασιών

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

## «Βιοαποικοδόμηση Αλογονωμένων Αλειφατικών Ενώσεων»



Όνοματεπώνυμο Φοιτήτριας: Σοφία Τρανού

Υπεύθυνος Διπλωματικής: Καθ. Δημήτριος Κέκος

Αθήνα, 25/9/2012

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Δημήτριο Κέκο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την συγκεκριμένη εργασία, αλλά και για την διαρκή και προπάντων ευχάριστη συνεργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα κ. Κατερίνα Κόντη, καθώς και στην Δρ. Διομή Μαμμά χωρίς την βοήθεια των οποίων η ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας δεν θα ήταν δυνατή. Ακόμα, σημαντική ήταν η συμπαράστασή τους, τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού της μέρους, όσο και κατά την συγγραφή της.

Ευχαριστώ, επίσης, το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τις χρήσιμες πληροφορίες και την βοήθεια που μου παρείχε κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την συνεχή συμπαράσταση, την αγάπη και την κατανόηση που μου έδειξαν καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT .....	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	7
1. Εισαγωγικά: Αλογονωμένες Οργανικές Ενώσεις .....	7
1.1 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη (CPD) .....	8
1.2 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη (DCP) .....	9
1.3 Διαχείριση αποβλήτων από την παραγωγή επιχλωρυδρίνης .....	11
2. Βιοαποικοδόμηση χλωριωμένων ενώσεων.....	11
2.1 Τρόποι βιοαποικοδόμησης .....	13
2.2 Κατηγορίες αφαλογόνωσης .....	14
2.3 Βιοαποικοδόμηση της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης και 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης .....	19
3. Διεργασίες βιοαποικοδόμησης των 3-CPD και 1,3-DCP.....	22
3.1 Βιοαποικοδόμηση σε εργαστηριακό επίπεδο .....	22
3.2 Βιομηχανικές εφαρμογές βιοαποικοδόμησης.....	25
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	26
1. Μικροοργανισμοί.....	26
2. Θρεπτικά υποστρώματα .....	26
2.1 Nutrient Agar.....	26
2.2 Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για στελέχη με ικανότητες αφαλογόνωσης.....	27
2.3. Μέσο ανάπτυξης για υγρές καλλιέργειες DSMZ 457 Mineral medium (Brunner)...	27
3. Υλικά .....	28
4. Προκαλλιέργεια.....	28
5. Καλλιέργεια.....	29

6. Αναλύσεις.....	29
6.1 Προσδιορισμός κυτταρικής ανάπτυξης .....	29
6.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός ιόντων χλωρίου .....	29
6.3 Εκχύλιση 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη και 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη.....	31
6.4 Μέτρηση των Χλωροπροπανολών με Αέριο Χρωματογράφο (GC).....	32
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	34
1. Επιλογή μικροβιακών στελεχών με ικανότητα αφαλογόνωσης.....	34
2. Επιλογή των ικανότερων μικροοργανισμών για αποχλωρίωση.....	43
2.1 Επιλογή των ικανότερων μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση της 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης .....	43
2.2 Επιλογή των ικανότερων μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης (DCP).....	59
3. Ανθεκτικότητα μικροοργανισμών .....	76
3.1 Ανθεκτικότητα στην 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη (CPD) .....	76
3.2 Ανθεκτικότητα στην 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP) .....	87
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	99

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εξέταση μιας σειράς μικροοργανισμών ως προς την ικανότητα τους να αφαλογονώνουν τις τοξικές ουσίες 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη (3-CPD) και 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη (1,3-DCP). Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα με κατάλληλη χρωστική ουσία προκειμένου να επιλεγθούν μόνο οι μικροοργανισμοί με ικανότητα αφαλογόνωσης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες διαλείποντος έργου. Συγκεκριμένα, εμβολιάστηκαν οι επιλεγθέντες μικροοργανισμοί σε θρεπτικό μέσο με συγκέντρωση τοξικής ουσίας  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , έτσι ώστε να γίνει επιλογή των πιο ικανών για την αποικοδόμηση της κάθε τοξικής ένωσης. Επιλέχθηκαν οι *Pseudomonas putida* DSM 437 και *P. putida* DSM 12448 για την 3-CPD με ποσοστά αποικοδόμησης 72 και 39 % και για την 1,3-DCP οι *P.putida* DSM 437 και το βακτηριακό στέλεχος 966 (πρόκειται για μη ταυτοποιημένο στέλεχος) με ποσοστά αποικοδόμησης 11 και 12 % αντίστοιχα. Τέλος, τα βακτήρια αυτά εμβολιάστηκαν σε κωνικές φιάλες με θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις ( $100, 200, 300, 400, 500 \text{ mg L}^{-1}$ ) τοξικής ένωσης προκειμένου να ελεγχθεί η ανθεκτικότητά τους. Όσον αφορά στην 3-CPD σε συγκεντρώσεις μέχρι  $400 \text{ mg L}^{-1}$  το ποσοστό αποικοδόμησης από το *P.putida* DSM 437 ήταν ιδιαίτερα υψηλό, ενώ η αποικοδόμηση από το *P.putida* DSM 12448 ήταν χαμηλότερη. Αντίστοιχα, για την 1,3-DCP παρατηρήθηκε αποικοδόμηση σε συγκεντρώσεις έως  $300 \text{ mg L}^{-1}$  και για τους δύο μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις τα ποσοστά αποικοδόμησης της 1,3-DCP ήταν μηδενικά.

### Λέξεις κλειδιά:

Βιοαποικοδόμηση, Αλογονωμένες ενώσεις, 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη (CPD), 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη (DCP)

## ABSTRACT

The purpose of this study is to examine a range of microorganisms for their ability to dehalogenate the toxic compounds 3-chloro-1,2-propanediol (3-CPD) and 1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP). Initially, selective medium containing a suitable pigment was used in order the microorganisms which are capable to dehalogenate to be selected. Then, the selected microorganisms were tested in batch cultures at 100 mg L<sup>-1</sup> of each toxic compound, in order the microorganisms exhibited the highest dehalogenation ability, to be selected. Concerning 3-CPD degradation, *Pseudomonas putida* DSM 437 and *P. putida* DSM 12448 degraded 72 and 39 %, respectively of the compound. As far as 1,3-DCP is concerned *P. putida* DSM 437 and strain 966 (not yet identified) degraded 11 and 12 % respectively of the compound. Finally, the effect of increasing concentrations of the toxic compounds (100, 200, 300, 400, 500 mg L<sup>-1</sup>) was investigated in batch cultures. In 3-CPD for the concentrations up to 300 mg L<sup>-1</sup> the degradation degree was high in *P. putida* DSM 437, while at higher concentrations the degradation dramatically decreased. Concerning *P. putida* DSM 12448 the degradation pattern was similar, although the degradation degree was significantly lower. In the case of *P. putida* DSM 437 degradation of 1,3-DCP was achieved up to 300 mg L<sup>-1</sup> approximately. Strain 966 exhibited the same behavior. Higher concentrations of 1,3-DCP (400, 500 mg L<sup>-1</sup>) exceeded the resistance limits of both microorganisms tested.

### Keywords:

Biodegradation, Halogenated compounds, 3-chloro-1,2-propanediol (CPD), 1,3-dichloro-2-propanol (DCP)

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### *1. Εισαγωγικά: Αλογονωμένες Οργανικές Ενώσεις*

Οι αλογονωμένες ενώσεις βρίσκονται παντού στο περιβάλλον. Ένα τμήμα αυτής της κατηγορίας χημικών ενώσεων παράγονται φυσικά από βιοτικές και αβιοτικές διεργασίες στους ωκεανούς και την ατμόσφαιρα. Ωστόσο, η χρήση αλογόνων (χλώριο, βρώμιο, ιώδιο, φθόριο) σε βιομηχανική κλίμακα κατά τα τελευταία 100 χρόνια έχει εισάγει πολλές επιπλέον τεχνητές ενώσεις αλογόνου στο περιβάλλον (Neidleman et al. 1966, Gschwend et al. 1965, Weissermel et al. 1997).

Οι αλογονωμένες οργανικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ως συστατικά φαρμάκων, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα, επιβραδυντικά φλόγας, ενδιάμεσα στην οργανική σύνθεση, διαλύτες, κλπ. Επιπλέον, πολλές αλογονωμένες ενώσεις προκύπτουν ως παραπροϊόντα κατά τη χημική σύνθεση, όπως οι διοξίνες, τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια και η πενταχλωροφαινόλη.

Ωστόσο, οι αλογονωμένες οργανικές ενώσεις δεν είναι μόνο ανθρωπογενούς προέλευσης, αλλά επίσης συνθέτονται στη φύση από διάφορους οργανισμούς. Μέχρι σήμερα, πάνω από 3.500 μεταβολίτες που περιέχουν αλογόνα (ως υποκαταστάτες) έχουν απομονωθεί (Gribble et al. 1998). Μερικοί από αυτούς βρίσκουν εφαρμογή ως αντιβιοτικά, όπως η χλωραμφαινικόλη, η 7-χλωροτετρακυκλίνη και η βανκομυκίνη. Μέχρι πρόσφατα, πολύ λίγα ήταν γνωστά για τα ένζυμα που καταλύουν την ενσωμάτωση ατόμων αλογόνου κατά την βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων (Van Pée et al. 1996).

Τα υπολείμματα των συνθετικών χημικών ουσιών που φθάνουν στο περιβάλλον ως επί το πλείστον εξαρτώνται από τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στη συγκεκριμένη περιοχή. Εξαρτώνται δηλαδή από την ικανότητα των μικροβίων να παράγουν ένζυμα, τα οποία αναγνωρίζουν τις ξενοβιοτικές ενώσεις και καταλύουν αντιδράσεις διάσπασης αυτών. Η απουσία των μικροοργανισμών ή των μικροβιακών συστημάτων που αποικοδομούν τις επικίνδυνες χημικές ουσίες

έχει σαν αποτέλεσμα τη μακροχρόνια παραμονή τους, η οποία αποτελεί έναν ισχυρό κίνδυνο για το οικοσύστημα (Bhatt et al. 2007).

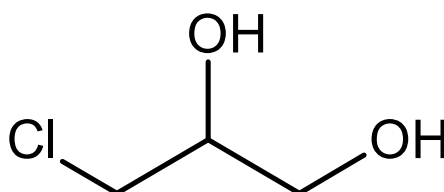
Επειδή πολλές από αυτές τις ενώσεις εμφανίζουν τοξικότητα ή ακόμα και καρκινογόνο δράση και είναι συχνά δύσκολο να αποσυντεθούν, πολλές έρευνες διεξήχθησαν για την επίδραση αυτών στο περιβάλλον. Μελέτες στην αποικοδόμηση των διαφόρων αλογονωμένων αλειφατικών και αρωματικών ενώσεων οδήγησαν στον προσδιορισμό μιας ποικιλίας αφαλογονώσεων, καθώς και των μηχανισμών τους (Fetzner 1998, Janssen et al. 1994, Pries et al. 1994).

Οι αλογονωμένες ενώσεις με τις οποίες θα ασχοληθεί η παρούσα εργασία είναι οι: 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη και 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη.

### 1.1 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη (CPD)

- Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Η 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη (Εικόνα 1) είναι μια ημι-πτητική οργανική ένωση διαλυτή σε μια ποικιλία διαλυτών, συμπεριλαμβανομένου του νερού, της αιθανόλης και του αιθέρα (Windholz et al. 1976).



**Εικόνα 1:** Μοριακός τύπος 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD)

- Χρήση - Παραγωγή

Το CPD χρησιμοποιείται ως κροκκιδωτικό της πολυαμίνης για την παραγωγή πόσιμου νερού. Ο άνθρωπος επίσης μπορεί να εκτεθεί στην ουσία αυτή μέσω ορισμένων τροφίμων, στα οποία έχει γίνει όξινη υδρόλυση των πρωτεϊνών (Robjohns et al. 2003). Μελέτες έχουν δείξει ότι η ένωση αυτή μπορεί να



δημιουργηθεί και στα διάφορα ψωμιά και cakes κατά το ψήσιμο. Διάφορες πρόδρομες ενώσεις, κυριότερη των οποίων είναι η γλυκερόλη των διογκωτικών σιτάλευρων κατά το ψήσιμο αντιδρούν με ιόντα χλωρίου από το μαγειρικό αλάτι σχηματίζοντας CPD (Hamlet et al. 2004). Θα πρέπει ακόμα να σημειωθεί ότι η ένωση αυτή είναι δυνατόν να δημιουργηθεί κατά το μαγείρεμα κατά ανάλογο τρόπο είτε με το ψήσιμο, είτε στο φούρνο μικροκυμάτων, είτε στο τηγάνισμα (Crews et al. 2001).

- Επιπτώσεις

Μετά από χορήγηση 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης για σύντομο χρονικό διάστημα σε αρουραίους παρατηρήθηκε αύξηση του βάρους των νεφρών και του συκωτιού (Kluwe et al. 1983). Ακόμα, η χορήγηση της προκαλεί διούρηση και σε υψηλότερες δόσεις ανεύρυσμα ή ακόμα και θάνατο (Jones et al. 1978). Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους η 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη φαίνεται να προκαλεί καρκινογένεση (όγκους στους όρχεις, στο μαστό και στα νεφρά) (Edwards et al. 1975, Robjohns et al. 2003). Σύμφωνα με τα παραπάνω, διεθνείς οργανισμοί έχουν δεχθεί ότι η 3-MCPD είναι γενετοξική καρκινογόνος ουσία (Robjohns et al. 2003). Σε πύθηκους η χορήγηση οδήγησε σε αιματολογικές ανωμαλίες, όπως αναιμία, λευκοπενία, θρομβοκυτταροπενία (Kirton et al. 1970).

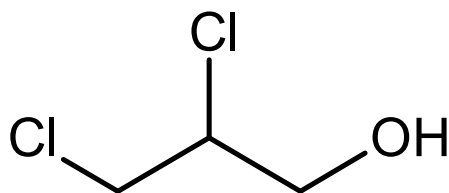
## 1.2 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη (DCP)

- Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Η 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη (1,3-DCP) (Εικόνα 2) είναι μια ημι-πτητική οργανική ένωση που είναι διαλυτή στο νερό και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Σε ουδέτερο pH εμφανίζει χρόνο ημίσειας ζωής 1,4 χρόνια. Ο χρόνος ημίσειας ζωής στην ατμόσφαιρα για την 1,3-DCP βασισμένος στον ρυθμό αντίδρασης με ρίζες υδροξυλίου είναι 8 ημέρες.

- Χρήση - Παραγωγή

Η 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη χρησιμοποιείται σε μεγάλη συγκέντρωση ως ενδιάμεσο στην παραγωγή επιχλωρυδρίνης και την παραγωγή των 1,3-διχλωροπροπένιο και 1,2,3-τριχλωροπροπένιο. Ως εκ τούτου, οι εργαζόμενοι μπορεί να εκτεθούν σε 1,3-DCP κατά την κατασκευή και τη χρήση αυτών των χημικών ενώσεων. Η έκθεση σε 1,3-DCP μπορεί επίσης να προκύψει από την κατανάλωση τροφίμων στα οποία έχει προστεθεί υδροχλωρικό οξύ μέσω υδρολυμένης φυτικής πρωτεΐνης ή πόσιμο νερό που έχει προκύψει από την απομάκρυνση της πολυαμίνης. Σύμφωνα με εκθέσεις της Αμερικανικής Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) δεν έχει βρεθεί 1,3-DCP σε κεντρικές βιομηχανικές εγκαταστάσεις διαχείρισης αποβλήτων (έλαια, μέταλλα, οργανικές ενώσεις και υποκατηγορίες), σε στραγγίσματα χώρων υγειονομικής ταφής ή σε εκπομπές από αποτεφρωτήρες για επικίνδυνα απόβλητα . 1,3-DCP έχει βρεθεί στα λύματα μονάδας χαρτοπολοτού καθώς και στα υγρά λεύκανσης χαρτιού.



**Εικόνα 2:** Μοριακός τύπος 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης (DCP)

- Επιπτώσεις

Η 1,3-DCP είναι "μετρίως τοξική» μέσω της εισπνοής, κατάποσης ή επαφής με το δέρμα. Μετά την από στόματος χορήγηση 1,3-DCP σε αρουραίους προκλήθηκε ηπατική βλάβη, διάβρωση των νεφρών και του βλεννογόνου του γαστρεντερικού σωλήνα, διούρηση, μείωση των λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων, και αύξηση του χρόνου πήξης του αίματος. Θάνατοι σημειώθηκαν σε τιμές μεγαλύτερες του 50 mg/kg σωματικού βάρους. Σε κουνέλια, η 1,3-DCP ήταν ήπια ερεθιστική για το δέρμα, καθώς και ερεθιστική για τα μάτια. Σε χρόνιες μελέτες, προκάλεσε μείωση του βάρους του σώματος, διόγκωση του ήπατος και των νεφρών, μεταβολές στις βιοχημικές παραμέτρους των ούρων και του αίματος και ιστοπαθολογικές

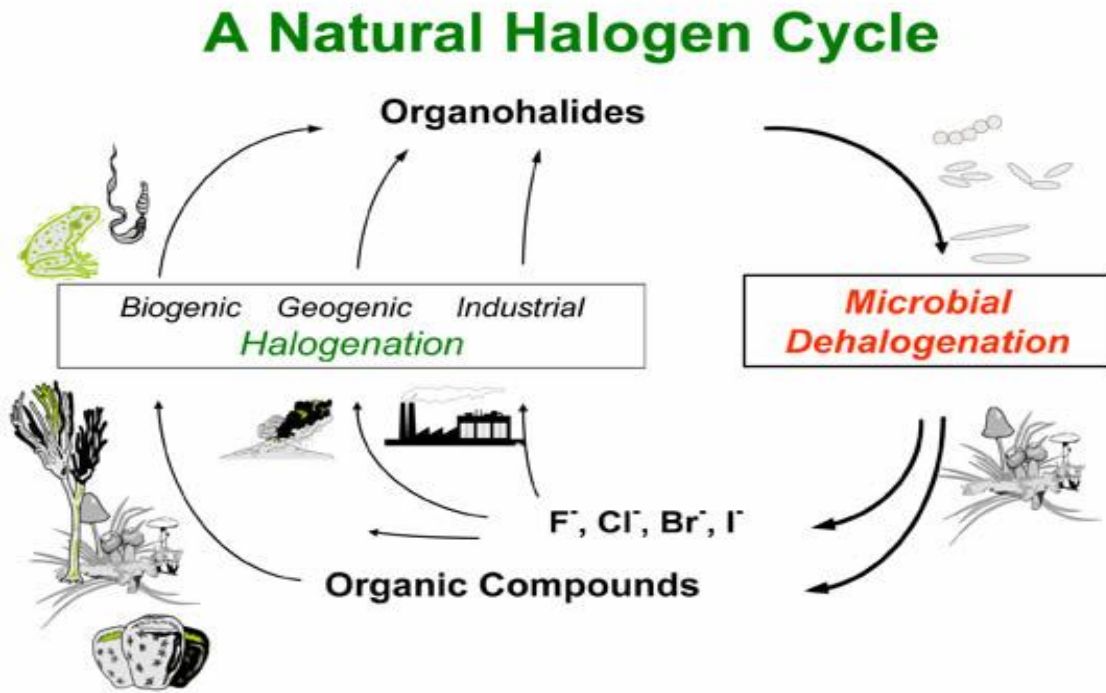
αλλοιώσεις στο στομάχι, τα νεφρά, το συκώτι, και τον ρινικό ιστό των αρουραίων (Integrated Laboratory Systems 2005).

### **1.3 Διαχείριση αποβλήτων από την παραγωγή επιχλωρυδρίνης**

Η διαχείριση των αποβλήτων από την παραγωγή επιχλωρυδρίνης και άλλων αποβλήτων που περιέχουν διπροπανόλες ρυθμίζεται από την Πράξη για την Διατήρηση και Αποκατάσταση των Πόρων (Resource Conservation and Recovery Act, RCRA) των Ηνωμένων Πολιτειών. Μεγάλα χρηματικά ποσά δαπανώνται για την σωστή διαχείριση των αποβλήτων επιχλωρυδρίνης μέσω φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών αποικοδόμησης. Η 1,3-DCP και η 3-CPD μπορούν να βιοδιασπαστούν από εγκλιματισμένους μικροοργανισμούς που ενυπάρχουν στην ενεργό ιλύ μονάδων επεξεργασίας αποβλήτων από την παραγωγή επιχλωρυδρίνης, καθώς και μικροοργανισμούς που απομονώνονται από μολυσμένα εδάφη. Με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων αυτών (που έχουν ήδη αναφερθεί), δεν αναμένεται εξάτμιση από τα εδάφη και την επιφάνεια του νερού (Integrated Laboratory Systems 2005).

## **2. Βιοαποικοδόμηση χλωριωμένων ενώσεων**

Η βιολογική αποικοδόμηση των τοξικών και επικίνδυνων χημικών ενώσεων είναι σύμφωνη με τη διατήρηση των οικοσυστημάτων, η οποία περιλαμβάνει την κυκλοφορία, τον μετασχηματισμό, την αφομοίωση της ενέργειας και της ύλης (Cookson et al. 1995). Οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν σύνθετες οργανικές ενώσεις, μέσω του μεταβολισμού τους, σε CO<sub>2</sub> ή άλλες απλές οργανικές ενώσεις (Εικόνα 3). Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που εμφανίζουν ικανότητα αποικοδόμησης οφείλεται στην οξείδωση οργανικών ενώσεων. Μέρος των ενδιάμεσων προϊόντων του μεταβολισμού μετατρέπεται σε κυτταρική μάζα (αφομοίωση) (Janssen et al. 1989).



**Εικόνα 3:** Σχεδιάγραμμα κύκλου ζωής των αλογονοϋδρινών (Häggblom et al. 2006)

Η αποικοδόμηση των ενώσεων φυσικής προέλευσης είναι συνήθως πιο εύκολο να επιτευχθεί και οι οργανισμοί που τις αποικοδομούν μπορούν εύκολα να απομονωθούν από το φυσικό τους περιβάλλον. Ωστόσο, ενώσεις που έχουν μια διαφορετική δομή σε σχέση με τις φυσικά απαντώμενες ενώσεις είναι πιο δύσκολο να βιοαποικοδομηθούν (Hutzinger et al. 1981).

Εντούτοις, μία ομάδα μικροοργανισμών αποδείχτηκε ότι χρησιμοποιεί ξενοβιοτικά, όπως χλωριωμένα αλκάνια, χλωριωμένες αλογονοϋδρίνες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, και χλωροβενζόλια για την επιβίωσή της (Bhatt et al. 2007).

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται χλωριωμένες ενώσεις που έχουν εξεταστεί ως προς την βιοαποικοδόμησή τους και έχει βρεθεί ότι αποικοδομούνται ικανοποιητικά από τους αντίστοιχους μικροοργανισμούς.

**Πίνακας 1:** Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε αλογονούχες ενώσεις ως μόνη πηγή άνθρακα

Αλογονωμένη ένωση	Μικροοργανισμός	Αναφορά
dichloromethane	<i>Hyphomicrobium</i> GJ21	Αδημοσίευτο
1,2-dichloroethane	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> GJ10, <i>Ancylobacter aquaticus</i> AD20	Janssen et al. 1985, Van den Wijngaard et al. 1992
2-chloroethyl-vinylether	<i>Ancylobacter aquaticus</i> AD27	Van den Wijngaard et al. 1992
2-chloroethanol	<i>Pseudomonas</i> GJ1	Van der Ploeg et al. 1996
1,6-dichlorohexane	<i>Rhodococcus</i> GJ70	Janssen et al. 1987
epichlorohydrin	<i>Agrobacterium radiobacter</i> AD1	Van den Wijngaard et al. 1989
1-chloro-2,3-propanediol	<i>Arthrobacter</i> AD2	Van den Wijngaard et al. 1989
1,3-dichloropropene	<i>Pseudomonas pavonaceae</i> 170	Poelarends et al. 2000a
1,2-dibromoethane	<i>Mycobacterium</i> GP1	Poelarends et al. 2000b
chlorobenzene	<i>Pseudomonas</i> GJ31	Mars et al. 1997
1,2-dichlorobenzene	<i>Pseudomonas</i> GJ60	Oldenhuis et al. 1989

## 2.1 Τρόποι βιοαποικοδόμησης

Η βιοαποικοδόμηση χλωριωμένων ενώσεων ακολουθεί δύο οδούς: «Αερόβια αποικοδόμηση» και «Αναερόβια αποικοδόμηση». Ωστόσο, ανεξάρτητα από την ακολουθούμενη οδό, ο βαθμός αποικοδόμησης εξαρτάται από τη δομή της ένωσης, τον αριθμό των υποκαταστατών χλωρίου και την θέση του χλωρίου στα μόρια. Ανάλογα με τη δομή, οι χλωριωμένες ενώσεις μπορούν είτε να οξειδώνονται είτε να ανάγονται. Η αποικοδόμηση των χλωριωμένων ενώσεων είναι δυνατή λόγω του ηλεκτραρνητικού τους χαρακτήρα (McCarty et al. 1987).

### 2.1.1 Αερόβια αποικοδόμηση

Κατά τη διάρκεια της αερόβιας αποικοδόμησης των χλωριωμένων ενώσεων από μικροοργανισμούς, το μοριακό οξυγόνο χρησιμεύει ως δέκτης ηλεκτρονίων. Αρκετές τέτοιες ενώσεις έχουν δειχθεί ότι αποικοδομούνται αερόβια. Ένας αριθμός μελετών απέδειξαν ότι μικροοργανισμοί αποικοδομούν το 1,2-διχλωροαιθένιο (DCE) υπό αερόβιες συνθήκες (Bradley et al. 1998, Hopkins et al. 1995, Bielefeldt et al. 1995, Bradley et al. 1998). Αρκετά από τα χλωροβενζόλια (που περιέχουν μία, δύο, τρεις, ή τέσσερις υποκαταστάτες χλωρίου) μπορεί να βιομετασχηματίζονται μόνο υπό αερόβιες συνθήκες, ενώ απουσία μοριακού οξυγόνου είναι ασταθή (Van der Meer et al. 1987).

### 2.1.2 Αναερόβια αποικοδόμηση

Στην αναερόβια αποικοδόμηση ο δέκτης ηλεκτρονίων είναι διαφορετικός από το μοριακό οξυγόνο. Θα μπορούσε να είναι  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{H}^+$ , S, φουμαρικό, οξείδιο της τριμεθυλαμίνης, μια οργανική ένωση ή  $\text{CO}_2$  (Cookson et al. 1995). Οι περισσότερες από τις χλωριωμένες αρωματικές ενώσεις και διάφορα παρασιτοκτόνα είναι γνωστό ότι αποικοδομούνται καλύτερα υπό αναερόβιες συνθήκες (Ramanand et al. 1993).

## 2.2 Κατηγορίες αφαλογόνωσης

Οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς προκειμένου να μετασχηματίσουν και να αποικοδομήσουν αλογονωμένες οργανικές ενώσεις. Παράγουν μια σειρά από ένζυμα (Πίνακας 2) που προκαλούν αφαλογόνωση και αποικοδόμηση, τόσο σε αλειφατικές, όσο και σε αρωματικές ενώσεις. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από αυτά τα ένζυμα μπορεί να είναι οι εξής (Bhatt et al. 2007):

**Πίνακας 2:** Αντιδράσεις και ένζυμα που παίρνουν μέρος στην διαδικασία της αφαλογόνωσης

Αντίδραση	Ένζυμα
Οξειδωτική αφαλογόνωση	Μονο – ή Διοξυγονάσες
Αφυδραλογόνωση	Αφυδρογονάσες
Αφαλογόνωση υποκατάστασης	Αφαλογονάσες
Αφαλογόνωση με μεταφορά μεθυλίου	Μεθυλτρανσφεράσες
Αναγωγική αφαλογόνωση	Αφυδρογονάσες

### 2.2.1 Οξειδωτική αφαλογόνωση

Οι οξειδωτικές αντιδράσεις αφαλογόνωσης είναι σημαντικές στην βιοαποικοδόμηση, τόσο των αλογονωμένων αλειφατικών, όσο και των αλογονωμένων αρωματικών ενώσεων. Η συμμεταβολική οξείδωση αλογονωμένων αλκενίων, μικρής αλυσίδας αλκανίων και μερικών αλογονωμένων αρωματικών καταλύεται από μια ομάδα ενζύμων (μονο- και διοξυγονάσες), όπως είναι η μονοοξυγονάση μεθανίου, αμμωνίας, φαινόλης, 2,4-διχλωροφαινόλης τολουολίου, 2,3-διοξυγενάση τολουολίου, μονο-οξυγονάση προπανίου, αλκένιου και διοξυγονάση ισοπροπυλοβενζενίου. Ο χλωριωμένος υδρογονάνθρακας ανταγωνίζεται με το υπόστρωμα ανάπτυξης για το ενεργό κέντρο της οξυγονάσης παρουσία οξυγόνου. Μικροοργανισμοί που έχει αναφερθεί ότι ακολουθούν αυτή τη μεταβολική οδό είναι: *Pseudomonas putida* G786, *Pseudomonas* sp. CBS3 and *Pseudomonas* sp. 2CBS, *Pseudomonas aeruginosa* strain 142, *Burkholderia* sp. strain PS12, *Alcaligenes* sp. strain BR30, *Pseudomonas* sp. strain LB400, *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723, *Mycobacterium fortuitum* CG-2 και *Mycobacterium chlorophenolicum* (παλαιότερα ως *Rhodococcus chlorophenolicus*) (Fetzner et al. 1998).

### 2.2.2 Αφυδραλογόνωση

Οι αφυδρογονάσεις απομακρύνουν ένα μόριο υδροχλωρικού οξέως από το οργανικό υπόστρωμα με αποτέλεσμα τον σχηματισμό διπλού δεσμού. Αφυδραλογόνωση εμφανίζεται, επίσης, στην αφαλογόνωση των χλωροκατεχολών, οι οποίες είναι κεντρικά ενδιάμεσα του αερόβιου μεταβολισμού πολλών αλογονοαρωματικών ενώσεων. Ένα μικροοργανισμός που πραγματοποιεί αφυδραλογόνωση είναι ο *Sphingomonas raucimobilis* UT26 (Fetzner et al. 1998, Nagata et al. 1993).

### 2.2.3 Αφαλογόνωση υποκατάστασης

- Υδρολυτική αφαλογόνωση

Ο μεγαλύτερος αριθμός αφαλογονασών που υπάρχει ανήκει στην κατηγορία των υδρολυτικών αφαλογονασών. Έχουν αναφερθεί υδρολυτικές αφαλογονώσεις ετεροκυκλικών, αρωματικών και αλειφατικών ενώσεων. Με βάση την βιβλιογραφία μικροοργανισμοί που ακολουθούν τον μηχανισμό αυτό είναι: *Pseudomonas* sp. strain ADP, *Rhizobium* sp. strain PATR, *Rhodococcus corallines* strain, *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* sp. CBS3, *Xanthobacter autotrophicus* strain GJ10, *Ancylobacter aquaticus* strains, *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064, *S. raucimobilis* UT26, *Moraxella* sp. strain B, *Pseudomonas* sp. strain YL (Hardman et al. 1991, Leisinger et al. 1991, Leisinger et al. 1993, Janssen et al. 1994, Slater et al. 1995, Slater et al. 1997, Fetzner et al. 1998).

- Θειολυτική αφαλογόνωση

Η θειολυτική αφαλογόνωση πραγματοποιείται από βακτήρια που χρησιμοποιούν το διχλωρομεθάνιο (DCM) ως πηγή άνθρακα. Η θειολυτική διαδικασία καταλύεται από επαγόμενες από γλουταθειόνη S-τρανσφεράσες. Έχει αναφερθεί ότι οι μικροοργανισμοί *Hyphomicrobium* sp. strain DM2, *Methylophilus* sp. Strain DM11,



*Methylobacterium sp.* strain DM4 ακολουθούν θειολυτική αφαλογόνωση (Fetzner et al. 1998, Löffler et al. 1991, Galli et al. 1989, Kohler-Staub et al. 1986).

- Αφαλογόνωση μέσω ενδομοριακής υποκατάστασης

Οι αλοαλκοολικές αφαλογονάσες ειδικεύονται στην κατάλυση αφαλογονώσεων γειτνιαζόντων υποκαταστατών αλογόνου σε αλοαλκοόλες και αλοκετόνες. Έτσι, παράγονται τα αντίστοιχα εποξειδία μέσω μιας ενδομοριακής νουκλεοφιλικής υποκατάστασης. Οι μικροοργανισμοί που αναφέρονται στην βιβλιογραφία είναι: *Pseudomonas sp.* strain OS-K-29, *Pseudomonas sp.* strain AD1, *Arthrobacter sp.* strain AD2, και *Coryneform* strain AD3 *Corynebacterium* strain N1074 (Fetzner et al. 1998).

Σύμφωνα με τους Assis et al. 1998, το *Arthrobacter erithii* H10A διαθέτει δύο ένζυμα ικανά να καταλύουν την αφαλογόνωση των γειτονικών υποκαταστατών που έχουν ορισθεί ως αφαλογονάσες DEHA και DehC. Η αφαλογονάση DEHA έδειξε μεγαλύτερη δραστηριότητα απέναντι στην 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη (1,3-DCP), ενώ η DehC αφαλογονάση έδειξε μεγαλύτερη δραστηριότητα στην 3-χλωρο-1,2-προπανδιόλη (3-CPD) και σε βρωμιωμένες αλκοόλες. Η αφαλογονάση DEHA αποτελείται από δύο μη ταυτόσημες υπομονάδες (σχετική μοριακή μάζα 31,5 και 34 kDa), οι οποίες συνδέονται πιθανώς με άλλες πρωτεΐνες για να σχηματίσουν μια μεγάλη καταλυτικής δραστηρική πρωτεΐνη των 200 kDa.

#### 2.2.4 Αφαλογόνωση με μεταφορά μεθυλίου

Τα χλωρομεθάνια και διχλωρομεθάνια (DCM) χρησιμοποιούνται σαν υποστρώματα των αυστηρώς αναερόβιων βακτηρίων. Μια αφαλογονάση χλωρομεθανίου, η οποία επάγεται παρουσία χλωρομεθανίου, μεταφέρει την ομάδα μεθυλίου του υποστρώματος στο τετραϋδροφυλλικό, παράγοντας μεθυλοτετραϋδροφυλλικό και χλώριο. Παραδείγματα μικροοργανισμών αυτής της κατηγορίας είναι: *Acetobacterium dehalogenans* (παλαιότερα strain MC), *Dehalobacterium formicoaceticum* (Fetzner et al. 1998, Knackmuss et al. 1981, MeBmer et al. 1993, MeBmer et al. 1996).

### 2.2.5 Αναγωγική αφαλογόνωση

Η έναρξη της αναγωγικής αφαλογόνωσης αποτελεί κρίσιμο βήμα για το μεταβολισμό των πολυχλωριωμένων ενώσεων. Πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες και αποτελεί το πρώτο βήμα για την αναερόβια βιοαποικοδόμηση ενώσεων όπως: χλωροανιλίνες, χλωροφαινόλες καθώς και μερικών ζιζανιοκτόνων. Ωστόσο, κάποιες αλογονωμένες ετεροκυκλικές ενώσεις είναι ανθεκτικές στην αναγωγική αφαλογόνωση. Στη διαδικασία αυτή απομακρύνεται ο αλογονοϋποκαταστάτης ως ιόν αλογόνου από ένα μόριο της ουσίας και προστίθενται ηλεκτρόνια σε αυτό από κάποιο δότη.

- Συμμεταβολική αναγωγική αφαλογόνωση

Πολλά μεθανογόνα, ακετογόνα, σουλφο- και σιδηροαναγωγικά βακτήρια εκτελούν συμμεταβολικές αφαλογονώσεις χωρίς να επωφελούνται από αυτό. Κυρίως αλογονωμένα αλκάνια αποτελούν υπόστρωμα για τέτοιες δραστηριότητες. Οι μικροοργανισμοί που έχουν αναφερθεί είναι: *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas* sp. strain KC, *Shewanella putrefaciens* 200, *S. putrefaciens* strain MR-1, *Pseudomonas putida* G786, *Methanosarcina* sp., *Acetobacterium woodii* και *Dehalospirillum multivorans*.

- Αναγωγική αφαλογόνωση που σχετίζεται με τον μεταβολισμό του άνθρακα

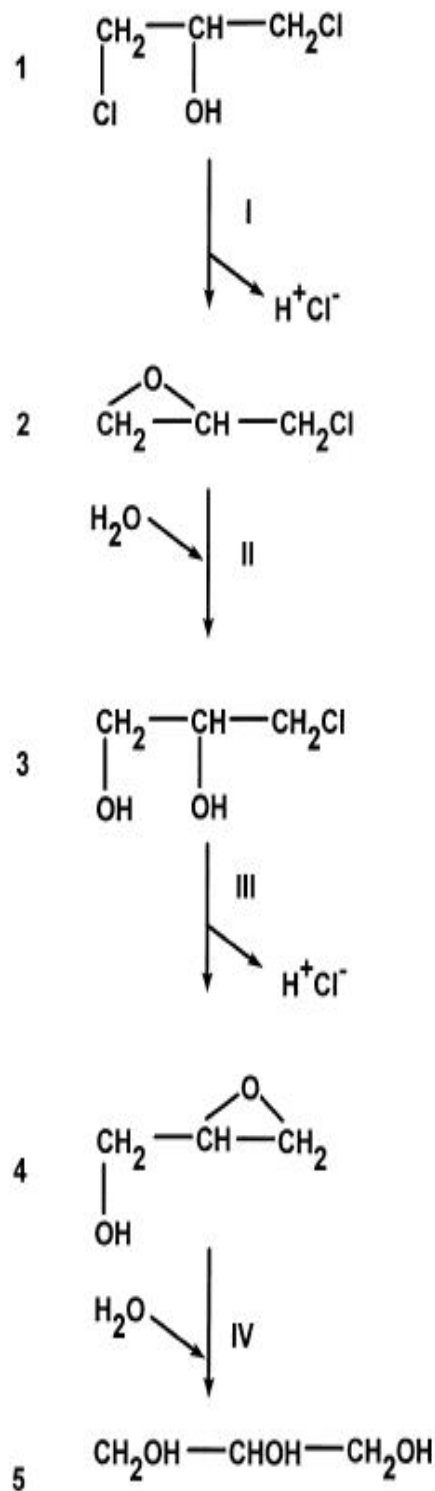
Η αναγωγική αφαλογόνωση δεν περιορίζεται σε αυστηρώς αναερόβια βακτήρια. Η απομάκρυνση του υποκαταστάτη αλογόνου-ων ακολουθείται από αφομοίωση των αντίστοιχων καρβοξυλικών οξέων. Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται οι μικροοργανισμοί: *Rhodospirillum rubrum*, *R. photometricum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *S. chlorophenolica* ATCC39723, *S. paucimobilis* UT26, *Azotobacter chroococcum* MSB-1, *Corynebacterium sepedonicum* KZ-4, *Pseudomonas* sp. B13, *P. aeruginosa* RHO1, *Ralstonia eutropha* JMP134.

- Αναγωγική αφαλογόνωση ως αναπνευστική διαδικασία

Αρκετά βακτηριακά στελέχη έχουν απομονωθεί και συνδέουν την αναγωγική αφαλογόνωση με την παραγωγή ενέργειας. Μεγάλο μέρος της αναγωγικής αφαλογόνωσης στο περιβάλλον θεωρείται ότι καταλύεται από αναερόβια βακτήρια που αναπτύσσονται σε αλογονωμένες αλειφατικές ή αλογονωμένες αρωματικές ενώσεις ως δέκτες ηλεκτρονίων. Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι οι μικροοργανισμοί *Desulfomonile tiedjei*, *Proteobacteria*, *Desulfitobacterium*, *Desulfitobacterium dehalogenans*, *Desulfitobacterium chlororespirans*, *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195, *Dehalobacter restrictus*, *D. multivorans* ακολουθούν αναγωγική αφαλογόνωση ως αναπνευστική διαδικασία (Fetzner et al. 1998).

### 2.3 Βιοαποικοδόμηση της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης και 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης

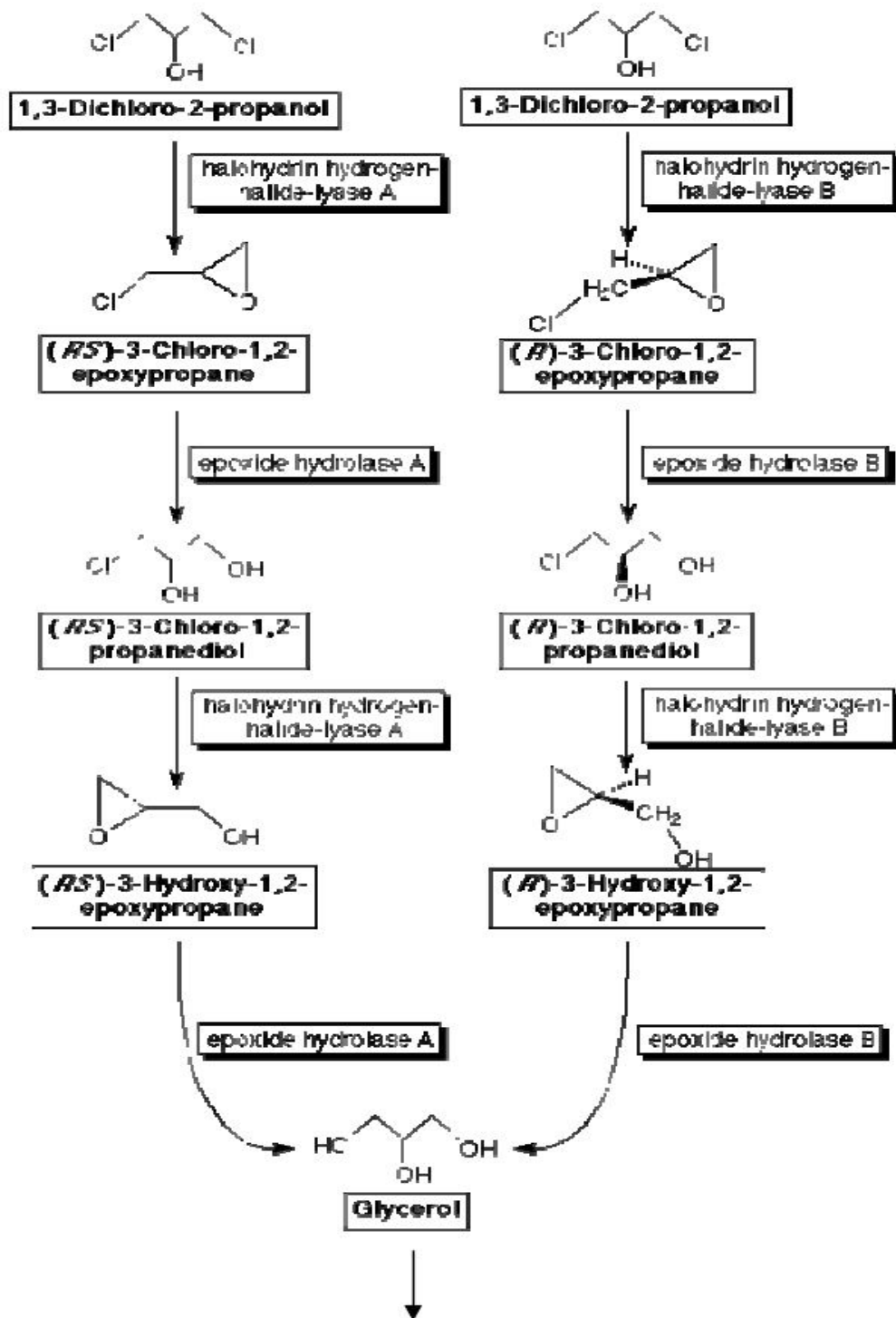
Οι μηχανισμοί αποικοδόμησης της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης και της 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης από τα βακτήρια *Pseudomonas sp.* strain OS – K – 29, *Arthobacter sp.* strain AD2 και *Corynebacterium sp.* strain N-1074 φαίνονται στις εικόνες 4 και 5. Πρόκειται για αφαλογόνωση με υποκατάσταση που πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά. Το μονοχλωροπαράγωγο είναι ενδιάμεσο προϊόν του καταβολισμού του διχλωροπαραγωγού. Συγκεκριμένα, στο πρώτο βήμα του μονοπατιού της αποικοδόμησης 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης, μία χλωροαλκοολο-αφαλογονάση αποσπά ένα μόριο υδροχλωρίου από το διχλωροπαράγωγο σχηματίζοντας το αντίστοιχο εποξείδιο, την επιχλωροϋδρίνη. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται υδρόλυση του εποξεικού δακτυλίου από την κατάλληλη εποξυ-υδρολάση με αποτέλεσμα το σχηματισμό του μονοχλωροπαραγωγού. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται αντίστοιχα με τα κατάλληλα ένζυμα για άλλη μια φορά για την δεύτερη αποχλωρίωση καταλήγοντας στο σχηματισμό γλυκερόλης (Kasai et al. 1990, van den Wijngaard et al. 1989, Kanehisa Laboratory 2012).



**Εικόνα 4:** Μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης από το *Pseudomonas* sp. AD1 (van den Wijngaard et al. 1989). Σύμβολα (1) 1,3 - Διχλωρο-2-προπανόλη, (2) επιχλωροϋδρίνη, (3) 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη, (4) γλυκιδόλη, (5) γλυκερόλη, (I,III) λυάσες αλογονοϋδρίνης υδρογονοαλογόνου (αφαλογονάσες αλογονοαλκοόλης), (II, IV) εποξειδικές υδρολάσες

*Arthrobacter* sp. strain AD2  
*Corynebacterium* sp. strain N-1074

*Corynebacterium* sp. strain N-1074



**Εικόνα 5:** Μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης από τα βακτήρια *Arthrobacter* sp. strain AD2 και *Corynebacterium* sp. strain N-1074 (Kanehisa Laboratory 2012)

### 3. Διεργασίες βιοαποικοδόμησης των 3-CPD και 1,3-DCP

Η βιοαποικοδόμηση περιλαμβάνει τη χρήση βιομορίων, υπό τη μορφή ολόκληρων κυττάρων ή απομονωμένων ενζύμων. Τέτοια συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την βιοκατάλυση συνθετικών αντιδράσεων, βιοαποικοδόμηση ρύπων ή εμπλουτισμό των αποβλήτων προκειμένου να μετατρέπουν βιομηχανικά υπολείμματα σε χρήσιμα χημικά προϊόντα. Σε κάθε περίπτωση απαιτούνται κατάλληλοι βιοκαταλύτες και κατάλληλα συστήματα βιοαντιδραστήρων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Ο σκοπός αυτών των βιομετατροπών είναι η μείωση των λυμάτων, η δημιουργία λιγότερο τοξικών προϊόντων, καθώς και η μετατροπή τους σε προϊόντα με οικονομική αξία.

Για την ανάπτυξη του κατάλληλου βιοκαταλύτη απαιτείται, αρχικά ο προσδιορισμός της απαιτούμενης δράσης του ενζύμου. Θα πρέπει να προσδιοριστούν οι απαιτούμενες χημικές αντιδράσεις για την παραγωγή των επιθυμητών προϊόντων, και στη συνέχεια, να βρεθούν οι μικροοργανισμοί που παράγουν τα αντίστοιχα ένζυμα (Burton 2001).

#### 3.1 Βιοαποικοδόμηση σε εργαστηριακό επίπεδο

Η αποικοδόμηση χαμηλών συγκεντρώσεων 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης (1,3-DCP) και παραπλήσιων αλογονοϋδρινών από βακτηριακά κύτταρα του εδάφους έχει ερευνηθεί. Εξετάστηκαν τρία βακτηριακά στελέχη (A1, A2, A4) που απομονώθηκαν από το ίδιο δείγμα εδάφους. Το στέλεχος A1 (πιθανώς ένα στέλεχος *Agrobacterium*) μπορεί να αφαλογονώσει την 1,3-DCP με την υψηλότερη ειδική δραστικότητα ( $0,33 \text{ U mg πρωτεΐνης}^{-1}$ ) και έχει την υψηλότερη συγγένεια για την 1,3-DCP ( $K_m, 0,1 \text{ mM}$ ). Η παρουσία ενός βακτηρίου που δεν έχει ικανότητα αφαλογόνωσης, στέλεχος G1 (πιθανόν πρόκειται για το *Pseudomonas mesophilus*), δεν αυξάνει την αφαλογόνωση σε χαμηλές συγκεντρώσεις 1,3-DCP. Ωστόσο, η σύμπραξη των στελεχών A1 και G1 έδειξε μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με την καλλιέργεια ενός στελέχους σε συγκεντρώσεις 1,3-DCP πάνω από  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  (Fauzi et al. 1996).

Σε μια μελέτη συγκρίθηκαν δύο κοινές μέθοδοι εμπλουτισμού, διαλείποντος και συνεχούς έργου. Στα δυο συστήματα η 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη (1,3-DCP) είναι η μοναδική πηγή άνθρακα. Και στις δύο μεθόδους έχει πραγματοποιηθεί εμπλουτισμός ενός μίγματος μικροοργανισμών ικανών να αποικοδομούν την 1,3-DCP. Οι ρυθμοί βιοαποικοδόμησης του 1,3-DCP στη διαδικασία διαλείποντος έργου ήταν υψηλότεροι σε σύγκριση με μια διαδικασία διαλείποντος έργου που δεν είχε πραγματοποιηθεί εμπλουτισμός. Τρία βακτηριακά στελέχη της ομάδας *Rhizobiaceae* απομονώθηκαν από την καλλιέργεια και αποδείχτηκε ότι ο ρυθμός αποικοδόμησης του 1,3-DCP ήταν χαμηλότερος όταν χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη μεμονωμένα ( $45 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), σε σύγκριση με  $74 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  χρησιμοποιήθηκαν και τα τρία ταυτόχρονα. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηρίων. Όπως αποδείχτηκε η βιοαποικοδόμηση με διαλείποντος έργου διεργασίες με ποικιλία βακτηρίων είναι ταχύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη συνεχούς έργου (Bastos et al. 2002).

Η βιοαποικοδόμηση του 1,3-DCP, από το βακτηριακό στέλεχος *P. putida* DSM 437, μελετήθηκε με τρεις διαφορετικές διαδικασίες. Ένα πλήθος συνδυασμών, σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης και του 1,3-DCP εξετάστηκαν σε μια διεργασία διαλείποντος έργου. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε εγκλιματισμένη βιομάζα σε ένα σύστημα διαλείποντος έργου και τέλος, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα από δύο συνεχείς βιοαντιδραστήρες, όπου στον πρώτο γινόταν εγκλιματισμός των κυττάρων στην 1,3-DCP και στον δεύτερο αποικοδόμηση σε μεγάλες συγκεντρώσεις της ένωσης. Μεγαλύτεροι ρυθμοί αποικοδόμησης παρατηρήθηκαν στο σύστημα με τους δύο βιοαντιδραστήρες, και αμέσως μικρότερη, όταν χρησιμοποιήθηκε εγκλιματισμένη βιομάζα. Επομένως, κρίσιμη παράμετρο αποτελεί η συγκέντρωση των κυττάρων (Kalogeris et al. 2007).

Η αποικοδόμηση της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη (1,3-DCP) και της 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης (3-CPD) καθώς και τα μίγματά τους σε συγκεντρώσεις μέχρι  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  από τον μικροοργανισμό *P. putida* DSM 437 ερευνήθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα διαλείποντος έργου με ολόκληρα κύτταρα με ικανοποιητικές

αποδόσεις. Το 3-CPD αποικοδομήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με την 1,3-DCP (Mamma et al. 2006).

Σύμφωνα με αναφορές το *Arthobacter sp.* strain PY1 που έχει την ικανότητα να αποικοδομεί την 1,3-διχλωρο-2-προπανδιόλη απομονώθηκε από δείγμα εδάφους ενός εργοστασίου χημικών. Το στέλεχος PY1 αποικοδόμησε  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (7,75 mM) της 1,3-DCP πλήρως σε 7 ημέρες και η ικανότητα του βελτιώθηκε με τον εγκλιματισμό του ( $4000 \text{ mg L}^{-1}$  την εβδομάδα). Η προσθήκη θρεπτικών, όπως η πεπτόνη, η γλυκόζη και η γλυκερόλη έδειξε ελάχιστη ή καμία επίδραση στην διαδικασία της αποικοδόμησης. Η ικανότητα για αφαλογόνωση του στελέχους μειωνόταν με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας 1,3-DCP (Yonetani et al 2004).

Έχει αναφερθεί ότι η *Saccharomyces cerevisiae* (ζύμη αρτοποιίας) έχει την ικανότητα να αφαλογονώνει την 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη (3-MCPD). Τα πειράματα βιοαποικοδόμησης πραγματοποιήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες, στους  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  με παρακαλούθηση της κινητικής. Η βιοδιάσπαση εκτελούνταν σε διαφορετικές τιμές pH (6.2, 7.0, και 8.2), με την παρουσία και απουσία γλυκόζης, χρησιμοποιώντας ρακεμικό 3-MCPD σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ( $7,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  και  $27 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Βέλτιστη μετατροπή (68 %) της ρακεμικής (R, S)- 3-MCPD σε συγκέντρωση  $27 \text{ mmol L}^{-1}$  επιτεύχθηκε μετά από 48 h, σε pH 8.2 και σε παρουσία γλυκόζης. Σε συγκέντρωση  $7.3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , παρατηρήθηκε αποικοδόμηση 73 % μετά από 72 h, σε pH 8.2 και απουσία γλυκόζης. Υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, η μετατροπή του καθαρού (S)-3-MCPD (85 %) ήταν υψηλότερη από εκείνη του (K)-εναντιομερούς (60 %) (Bel-Rhlid et al. 2004).

Σύμφωνα με τους Assis et al (1998), η σύνθεση (R) επιχλωρυδρίνης από 1,3-DCP απομονώνοντας την αντίστοιχη αφαλογονάση από το βακτήριο *Arthrobacter erithrii* H10a έχει πολύ καλή απόδοση (>95%) και αντιδρά ταχύτερα από αυτή του *Corynebacterium sp.* N-1074.



### 3.2 Βιομηχανικές εφαρμογές βιοαποικοδόμησης

Σύμφωνα με τον Swanson (1999), δύο Ιαπωνικές εταιρίες (Daiso Co. LTD και Nitto Chemical Industry Co) ασχολήθηκαν με την ανάπτυξη ενζύμων (λυάσες υδρογονοαλογόνωσης) ως βιοκαταλύτες από τις αρχές του 1990.

Η Daiso Co. LTD χρησιμοποιώντας ολόκληρα κύτταρα – καταλύτες ξεκινά από ρακεμικά μίγματα 2,3–DCP και 3–CPD για την παραγωγή επιχλωρυδρίνης και γλυκικόλης αντίστοιχα. Ο μικροοργανισμός βιοαποικοδομεί το ένα εναντιομερές και ανακτά το άλλο που έχει απομείνει στο υδατικό μέρος της διεργασίας, το οποίο χρησιμοποιεί ως πρόδρομη ένωση για την παραγωγή του επιθυμητού εναντιομερούς εποξειδίου με κατεργασία με βάση. Η μικροβιακή διαδικασία χρησιμοποιεί τα στελέχη *Pseudomonas sp.* και *Alcaligenes sp.* προκειμένου να παράγει και τα τέσσερα ισομερή των δυο αλογονοϋδρινών.

Η Nitto Chemical Industry Co. έχει αναπτύξει διαφορετική στρατηγική για την παραγωγή οπτικής ενεργού επιχλωρυδρίνης. Ξεκινά από ρακεμικό 1,3–DCP και καταλήγει με δύο ενζυμικά βήματα σε (R) 3–CPD παρέχοντας (S) επιχλωρυδρίνη με κατεργασία με βάση. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι μπορεί να εκμεταλλευτεί και τις δύο ρακεμικές μορφές του αρχικού υλικού σε αντίθεση με την πατέντα της Daiso που δεν εκμεταλλεύεται τη μία ρακεμική μορφή. Χρησιμοποιεί την λυάση αλογονοϋδρίνης-υδρογονοαλογόνου και τη σχετική εποξειδάση από το βακτήριο *Corynebacterium sp.* N-1074, η οποία έχει κλωνοποιηθεί στο *E.coli* ex vivo. Ακόμη διαθέτει νεότερη πατέντα για την παραγωγή και των δύο εναντιομερών της επιχλωρυδρίνης.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Μικροοργανισμοί

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος είναι το *Pseudomonas putida* DSM 437 και το *Pseudomonas putida* DSM 12448 που παρέχει η γερμανική εταιρεία DSMZ (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulture GmbH) στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τομέα IV Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών, ΕΜΠ, καθώς και 72 άλλα μικροβιακά στελέχη που ανήκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τομέα Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

Οι μικροοργανισμοί συντηρήθηκαν σε γλυκερόλη 30 % w/w στους -80 °C για χρονικό διάστημα 6 έως 12 μηνών.

### 2. Θρεπτικά υποστρώματα

#### 2.1 Nutrient Agar

Οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar (επώαση στους 25 °C), έτσι ώστε να αποθηκευτούν και στη συνέχεια να γίνει ο εμβολιασμός των καλλιεργειών. Το θρεπτικό περιέχει τα εξής:

**Πίνακας 3:** Σύσταση nutrient agar

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Πεπτόνη	5.0
Beef extract / Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	3.0
Αγαρ	15.0
NaCl	5.0

Το pH του θρεπτικού υποστρώματος ρυθμίζεται στο 6.8.

## 2.2 Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για στελέχη με ικανότητες αφαλογόνωσης

Προκειμένου να ελεγχθεί αν τα βακτηριακά στελέχη έχουν δυνατότητα αφαλογόνωσης χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει τα εξής συστατικά (Smejkal 2001):

**Πίνακας 4:** Σύσταση εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος

Συστατικό	Ποσότητα ανά λίτρο
Eosin B	8.0 mg
Methylene blue	1.3 mg
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	0.3 g
Bacto agar	15.0 g
3 – χλωρο – 1,2 – προπανοδιόλη	200 mg

Το υπόστρωμα ρυθμίζεται σε pH 7. Τα τρυβλία μετά των εμβολιασμό επώαστηκαν στους 25 °C και μετά την πάροδο 4 ημερών τα στελέχη με την επιθυμητή ιδιότητα εμφάνισαν μπλε αποικίες, ενώ στα υπόλοιπα δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή.

## 2.3. Μέσο ανάπτυξης για υγρές καλλιέργειες DSMZ 457 Mineral medium (Brunner)

Το θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των βακτηρίων είναι το DSMZ 457 Mineral medium που περιέχει:

**Πίνακας 5:** Medium 457 (www.dsmz.de)

Συστατικό	Ποσότητα ανά λίτρο
$Na_2HPO_4$	2.44 g
$KH_2PO_4$	1.52 g
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.05 g
SL – 4	10 ml
Απιονισμένο νερό	990 ml

**Πίνακας 6:** Υδατικό διάλυμα ιχνοστοιχείων SL-4 (www.dsmz.de)

Συστατικό	Ποσότητα ανά λίτρο
<i>EDTA</i>	0.5 g
<i>FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</i>	0.2 g
<i>SL – 6</i>	100 ml
Απιονισμένο νερό	900 ml

**Πίνακας 7:** Υδατικό διάλυμα ιχνοστοιχείων SL-6 (www.dsmz.de)

Συστατικό	Ποσότητα ανά λίτρο
<i>ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</i>	0.1 g
<i>MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O</i>	0.03 g
<i>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></i>	0.3 g
<i>CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O</i>	0.2 g
<i>CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O</i>	0.01 g
<i>NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O</i>	0.02 g
<i>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O</i>	0.03 g
Απιονισμένο νερό	1000 ml

Το pH του μέσου ρυθμίστηκε στο 6.9.

### 3. Υλικά

Η γλυκόζη, η 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη, η 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη, καθώς και τα άλατα του μέσου ανάπτυξης παρήχθησαν από την εταιρία Sigma.

### 4. Προκαλλιέργεια

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης πλην της πηγής άνθρακα παρουσιάζεται στους πίνακες 5 - 7. Ως πηγή άνθρακα για την προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη σε συγκέντρωση  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Το pH του μέσου ρυθμίστηκε στο 6.9. Μετά την αποστείρωση του θρεπτικού μέσου ( $109 \text{ }^\circ\text{C}$ , 40 min) ακολούθησε εμβολιασμός αυτού από τις αποθηκευμένες γλυκερόλες (200  $\mu\text{L}$ ) και επώαση σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (200 rpm) για 24 ώρες στους  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 5. Καλλιέργεια

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης πλην της πηγής άνθρακα παρουσιάζεται στους πίνακες 5 - 7. Το pH του μέσου ρυθμίστηκε στο 6.9. Μετά την αποστείρωση του θρεπτικού μέσου (121 °C, 20 min) ακολούθησε εμβολιασμός αυτού με 10 % (v/v) από τις αντίστοιχες προκαλλιέργειες. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (200 rpm) στους 30 °C. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη ή 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη.

- Στο στάδιο επιλογής στελεχών (screening) η συγκέντρωση των 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη και 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη ήταν 100 mg·L<sup>-1</sup>.
- Για την μελέτη της ανθεκτικότητας οι 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη και 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300, 400 και 500 mg·L<sup>-1</sup>.
- Δειγματοληψία πραγματοποιούνταν ανά 24 ώρες. Στα δείγματα προσδιορίζονταν η κυτταρική ανάπτυξη, η απελευθέρωση ιόντων χλωρίου και οι εναπομείνουσες 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη και 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη (μετά από εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα).

## 6. Αναλύσεις

### 6.1 Προσδιορισμός κυτταρικής ανάπτυξης

Μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 600 nm με χρήση φασματοφωτομέτρου UV – Vis, S – 22 της εταιρείας BOECO (Γερμανία).

### 6.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός ιόντων χλωρίου

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός ιόντων χλωρίου πραγματοποιείται σύμφωνα με τους Fauzzi et al (1996) και Florence and Farrar (1971).

Σε πλάκα microplate τοποθετούνται 200  $\mu\text{L}$  δείγματος, 20  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου A, 20  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου B. Τα αντιδραστήρια A και B περιέχουν:

**Πίνακας 8:** Σύσταση αντιδραστηρίου A

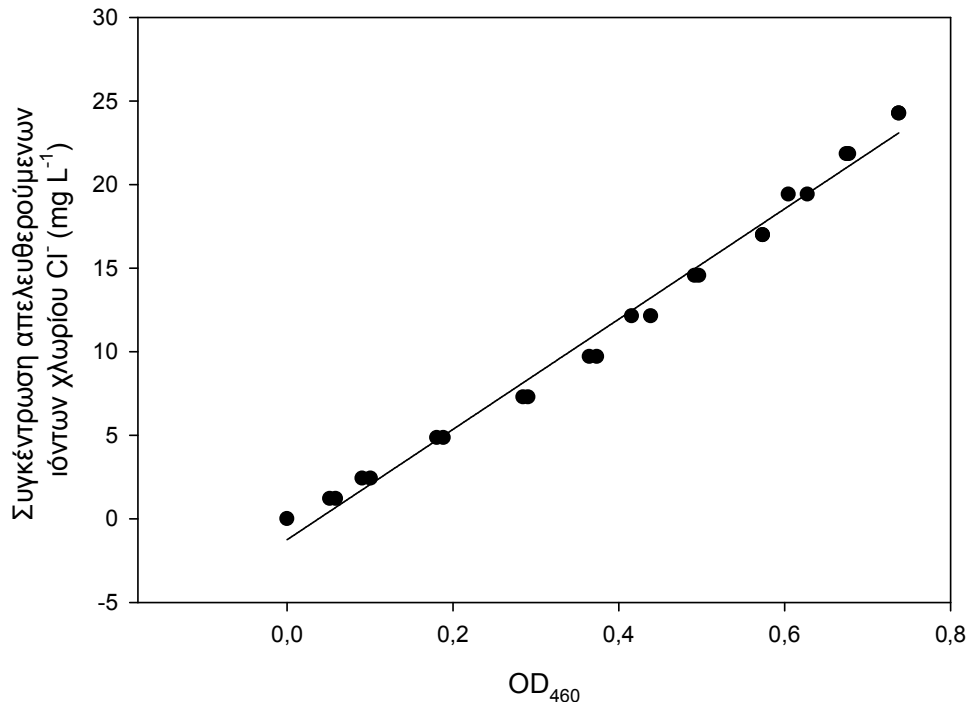
Συστατικό	Ποσότητα ανά 100 mL
Ferric nitrate	15.1 g
Υπερχλωρικό όξύ 70 % ( $\text{HClO}_4$ )	45 mL

**Πίνακας 9:** Σύσταση αντιδραστηρίου B

Συστατικό	Ποσότητα ανά 100 mL
Mercury thiocyanate ( $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ )	4.7515 mg
Αιθανόλη 100 %	100 mL

Μετά από ανάδευση πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 460 nm μέσα σε διάστημα μικρότερο από 1 h.

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της φωτομέτρησης και τον προσδιορισμό χλωριόντων κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με χρήση διαλυμάτων χλωριούχου νατρίου γνωστής συγκέντρωσης που φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα:



**Διάγραμμα 1:** Πρότυπη καμπύλη ιόντων χλωρίου

Η εξίσωση συγκέντρωσης ιόντων χλωρίου σε συνάρτηση με την οπτική πυκνότητα είναι:

$$\text{Συγκέντρωση ιόντων χλωρίου (mg L}^{-1}\text{)} = - 1,2453 + 32,9957 \cdot \text{OD}_{460}, R^2 = 0,989$$

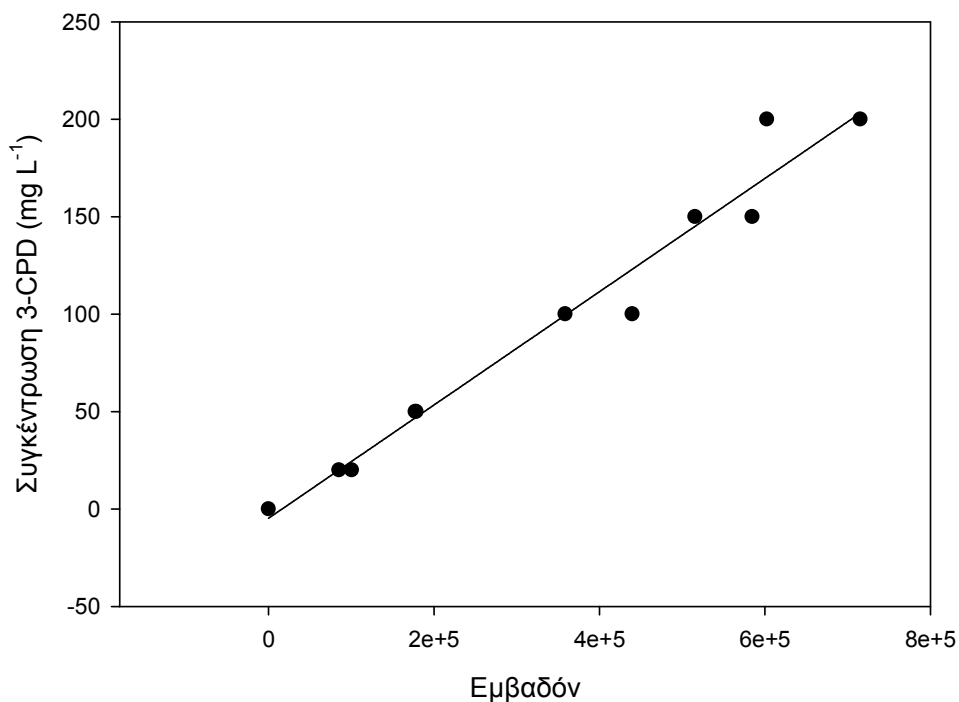
### 6.3 Εκχύλιση 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη και 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη

Η εκχύλιση των 3-CPD και 1,3-DCP πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Mueller et al. (1992). Σε 100 μL του υπό εξέταση δείγματος προστίθενται 400 μL οξικού αιθυλεστέρα. Στη συνέχεια, αναδεύονται για 20 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (800 rpm), ακολουθεί φυγοκέντρηση και απομάκρυνση της οργανικής φάσης. Στην υδατική φάση προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας και επαναλαμβάνεται η διαδικασία εκχύλισης δύο φορές.

## 6.4 Μέτρηση των Χλωροπροπανολών με Αέριο Χρωματογράφο (GC)

Οι 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη και 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη προσδιορίστηκαν με χρήση αέριου χρωματογράφου (Shimadzu gas chromatograph GC-17A) εξοπλισμένου με ανιχνευτή αρπαγής ηλεκτρονίων (electron capture detector, ECD-17, Shimadzu). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η EquityTM<sup>-1</sup> (Supelco) διαστάσεων 60 m x 0.25 mm x 0.25 μm. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο με ροή 1 ml min<sup>-1</sup>. Το κλάσμα διαίρεσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:25. Οι θερμοκρασίες του εισαγωγέα δείγματος και ανιχνευτή ήταν 280 και 300 °C, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν 90 °C για 2 min και στη συνέχεια αυξήθηκε με ρυθμό 5 °C min<sup>-1</sup> έως τους 150 °C, όπου παρέμεινε σταθερή για 1 min. Ακολούθησε αύξηση με ρυθμό 25 °C min<sup>-1</sup> έως τους 240 °C, όπου παρέμεινε σταθερή για 1 min.

Οι χρόνοι κατακράτησης των 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη και 1,3-διχλωρο-2-προπανόλη ήταν 9,9 και 9,2 min αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων έγινε με τη χρήση των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς (Διάγραμμα 2 - 3).

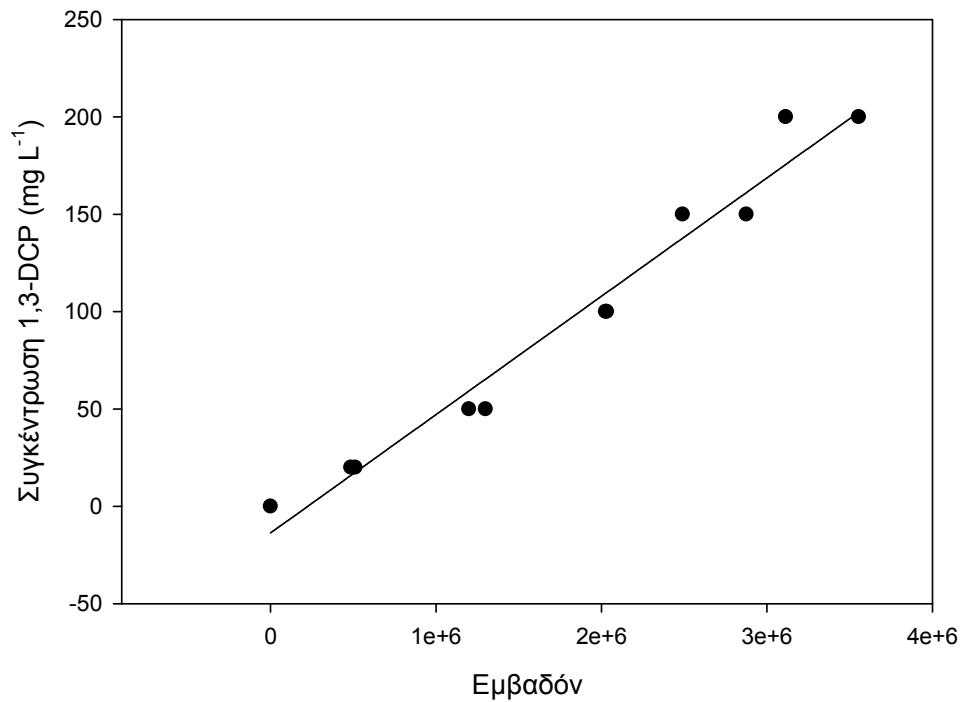


**Διάγραμμα 2:** Πρότυπη καμπύλη της 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης



Η εξίσωση συγκέντρωσης της 3-χλωρο-1,2-προπανδιόλης σε συνάρτηση με το εμβαδόν που προκύπτει από τον αέριο χρωματογράφο είναι:

$$\text{Συγκέντρωση 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης (mg L}^{-1}\text{)} = -4,7148 + 0,0003, R^2 = 0,9670$$



**Διάγραμμα 3:** Πρότυπη καμπύλη της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης

Η εξίσωση συγκέντρωσης της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης σε συνάρτηση με το εμβαδόν που προκύπτει από τον αέριο χρωματογράφο είναι:

$$\text{Συγκέντρωση 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης (mg L}^{-1}\text{)} = -13,6536 + 0,000060774, R^2 = 0,9697$$

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Επιλογή μικροβιακών στελεχών με ικανότητα αφαλογόνωσης

Αρχικά, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο εξετάστηκαν 74 μικροβιακά στελέχη προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητά τους για αφαλογόνωση. Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται τα στελέχη που εξετάστηκαν, όπου με (+) συμβολίζονται αυτά με θετικό αποτέλεσμα αφαλογόνωσης και με (-) τα υπόλοιπα.

**Πίνακας 10:** Έλεγχος ικανότητας αφαλογόνωσης σε μικροβιακά στελέχη

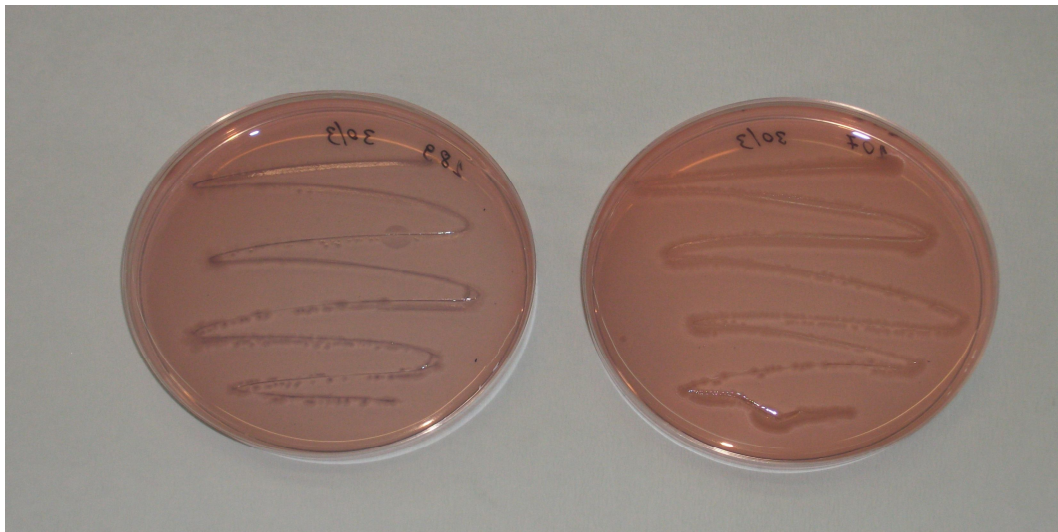
Μικροοργανισμός	Ικανότητα αφαλογόνωσης	Μικροοργανισμός	Ικανότητα αφαλογόνωσης
MT1	+	241	-
MT3	+	262	-
MT4	-	815	+
MT5	+	966	+
MT7	+	967	-
MT8	+	968	+
MT9	-	969	+
MT11	-	1181	+
MT12	-	1810	+
MT13	-	1812	+
MT17	-	1813	+
BK1	-	1814	-
BK3	-	1816	-
BK11	-	1817	-
2C1	+	1819	-
2C4	-	2410	-
2C5	-	4476	-
025	-	8830	-
<i>P. putida</i> DSM 437	+	9610	-
<i>P. putida</i> DSM 50222	-	BK2	-
<i>P. putida</i> DSM 12448	+	BK4	-
A	+	BK5	-
203	-	BK8	-
212	-	BK9	-
214	-	BK10	-
215	-	104	-
216	-	105	-
217	-	106	-
242	-	107	-
243	-	108	+
244	-	181	-
245	-	182	+
247	-	183	+
249	-	184	-

**Συνέχεια Πίνακα 10:** Έλεγχος ικανότητας αφαλογόνωσης σε μικροβιακά στελέχη

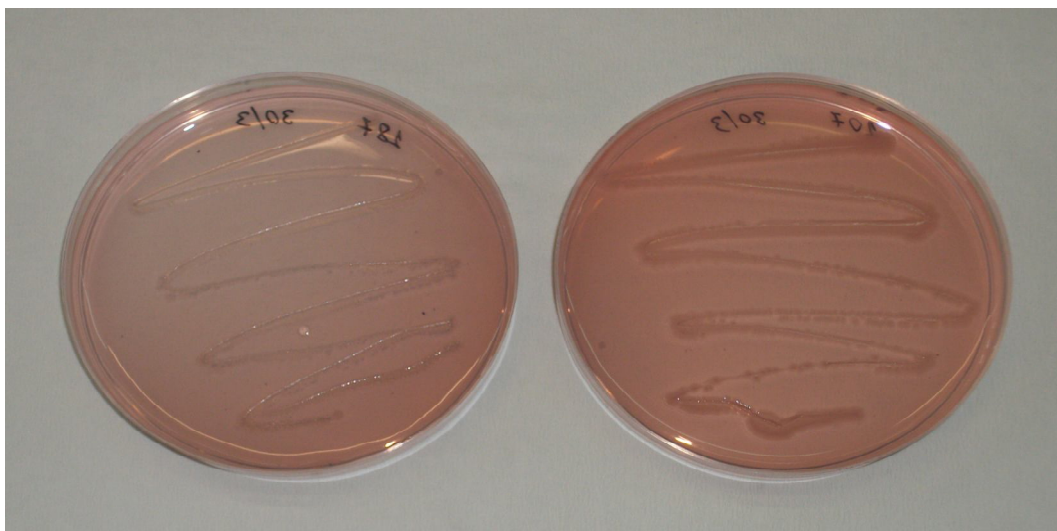
Μικροοργανισμός	Ικανότητα αφαλογόνωσης	Μικροοργανισμός	Ικανότητα αφαλογόνωσης
185	+	187	+
186	+	189	+

Επομένως, 24 στελέχη είχαν την επιθυμητή ιδιότητα, καθώς οι αποικίες τους εμφάνιζαν αποχρώσεις του μπλε.

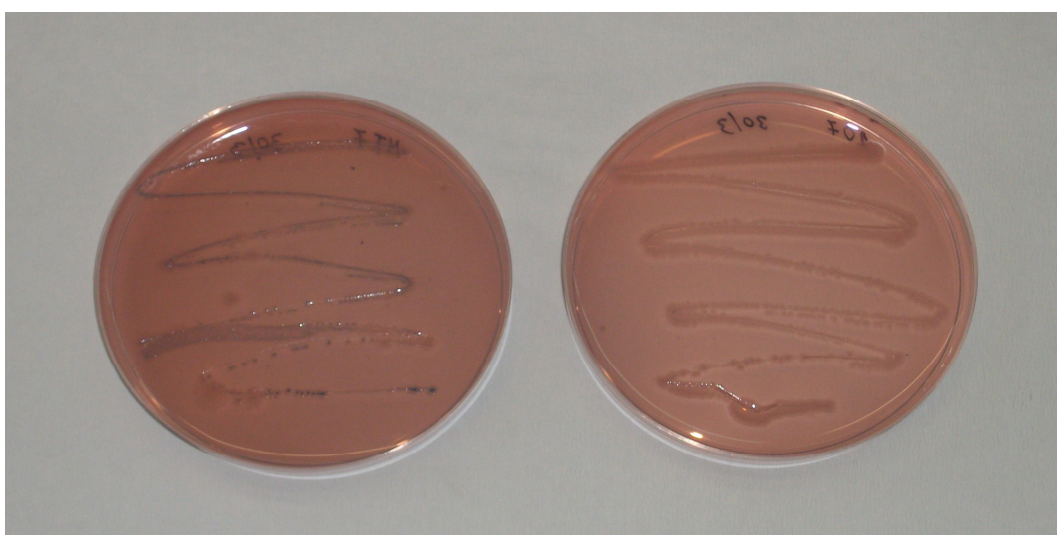
Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 6 - 28) απεικονίζονται τα μικροβιακά στελέχη με ικανότητα αφαλογόνωσης στα αριστερά και για λόγους σύγκρισης ένα στέλεχος που δεν έχει αυτή την ιδιότητα στα δεξιά:



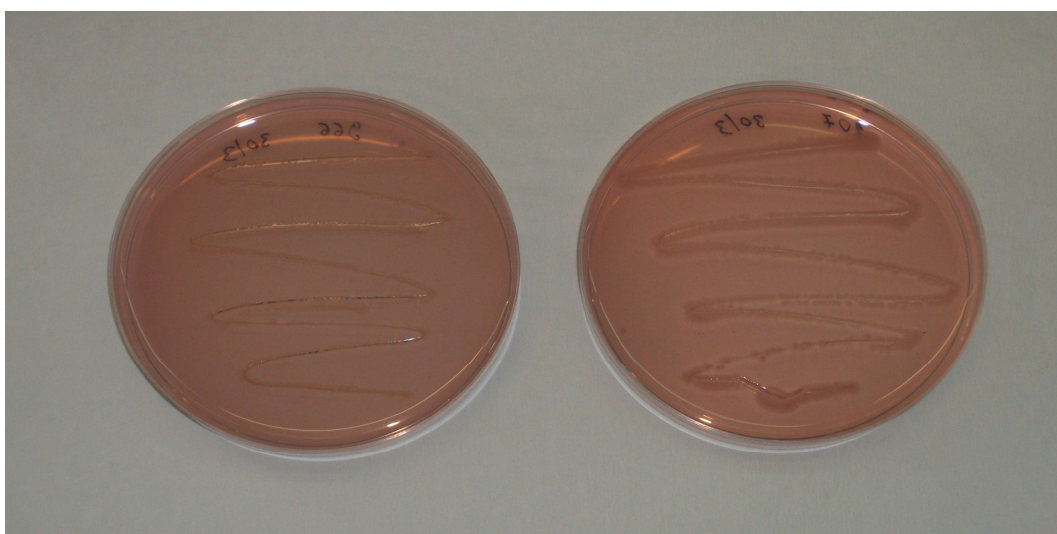
**Εικόνα 6:** Στέλεχος 189 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



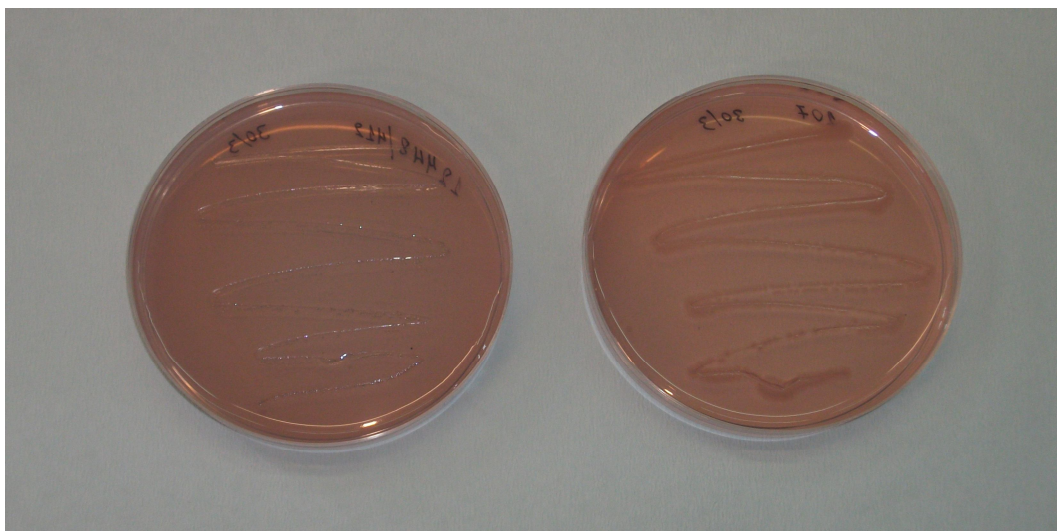
**Εικόνα 7:** Στέλεχος 187 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



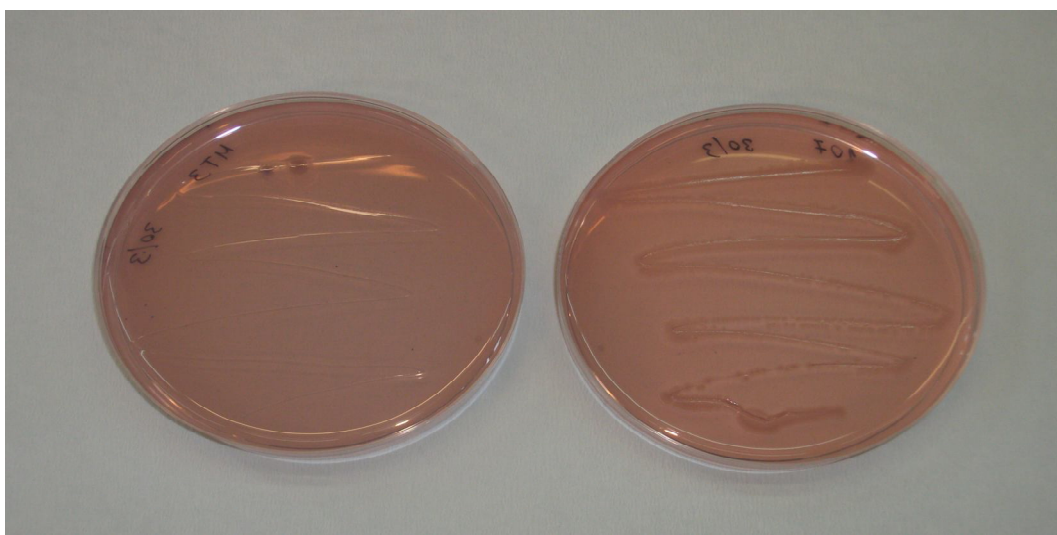
**Εικόνα 8:** Στέλεχος MT7 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



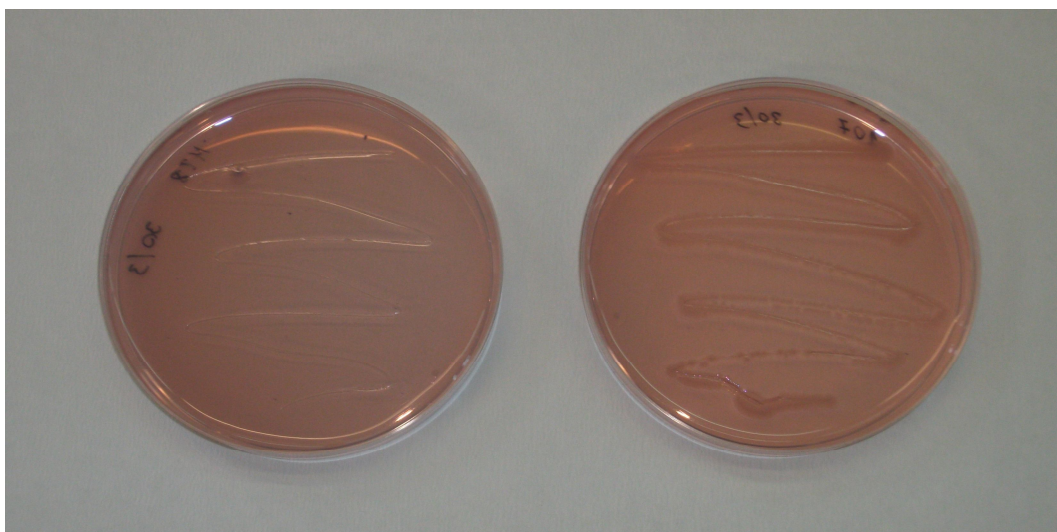
**Εικόνα 9:** Στέλεχος 966 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



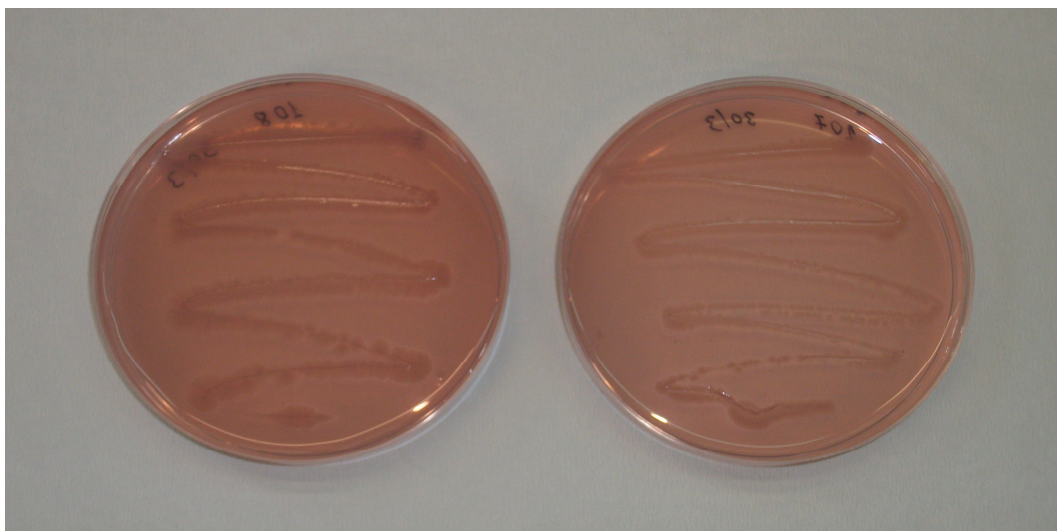
**Εικόνα 10:** Στέλεχος 12448 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



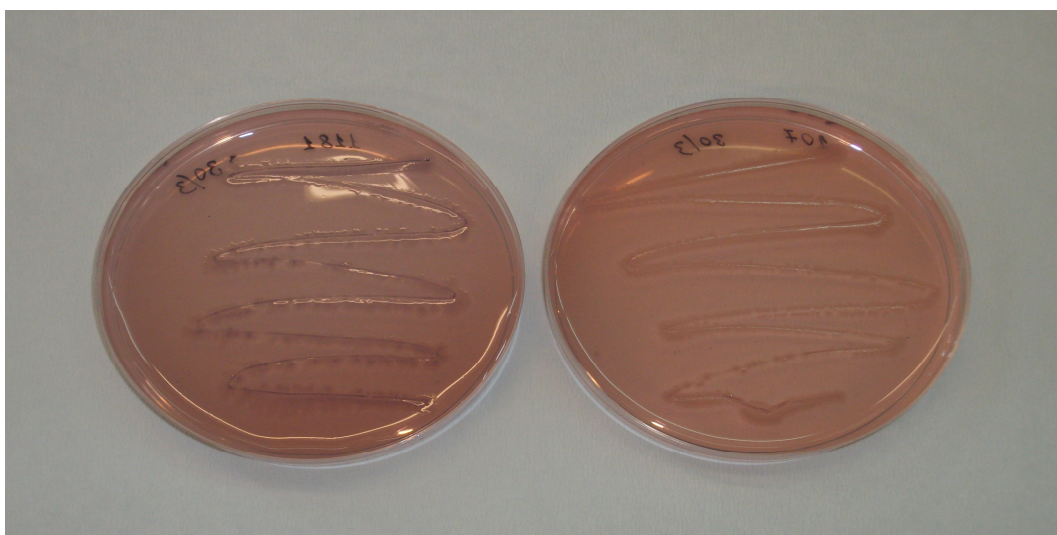
**Εικόνα 11:** Στέλεχος MT3 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



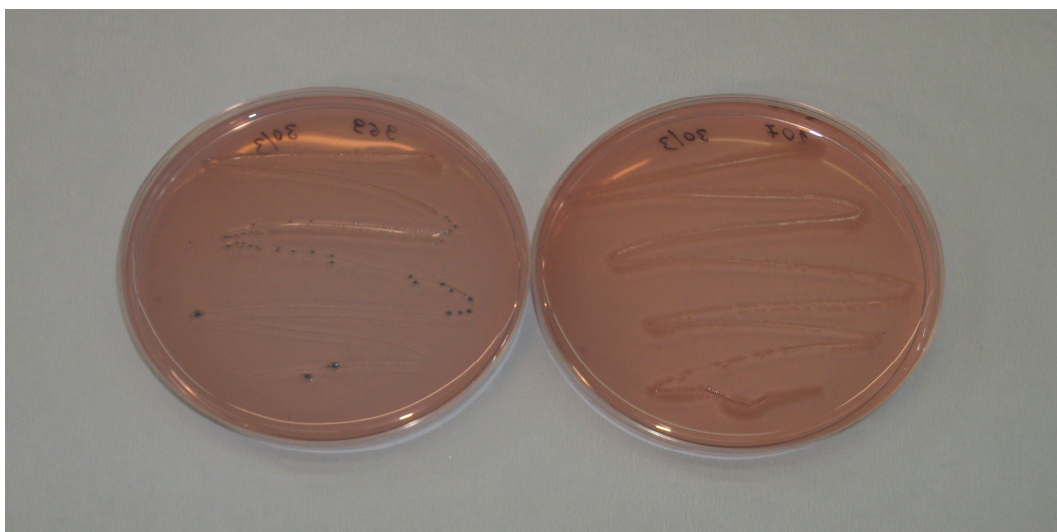
**Εικόνα 12:** Στέλεχος MT8 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



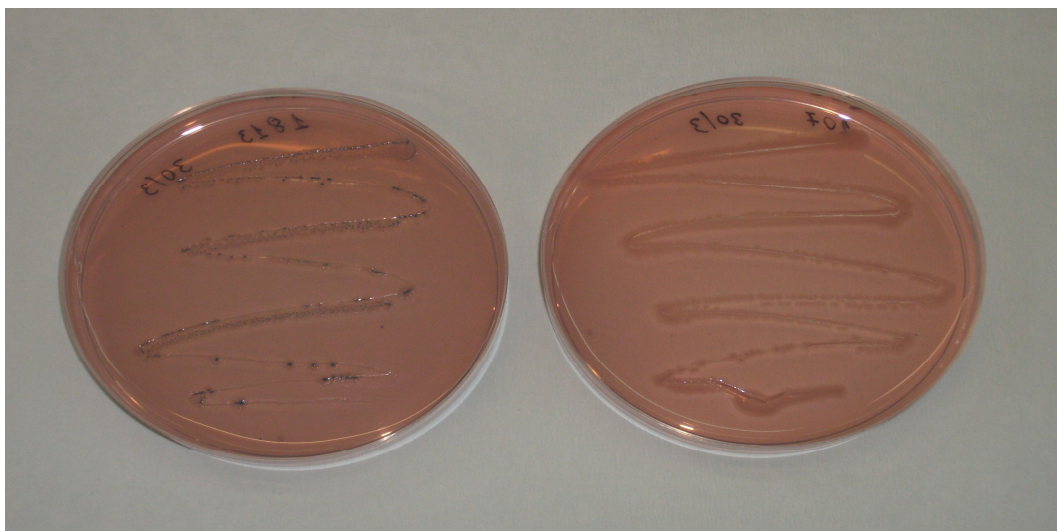
**Εικόνα 13:** Στέλεχος 108 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



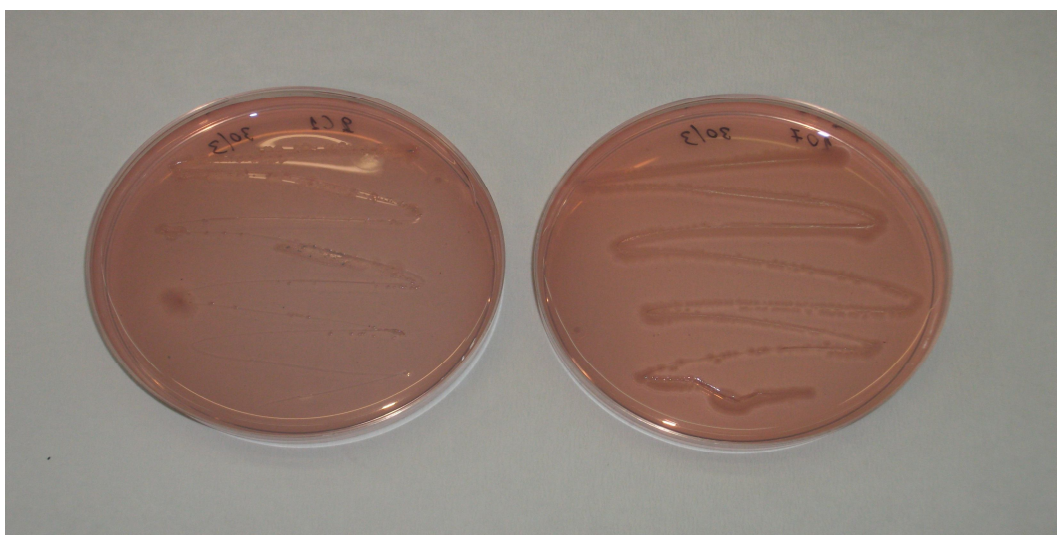
**Εικόνα 14:** Στέλεχος 1181 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



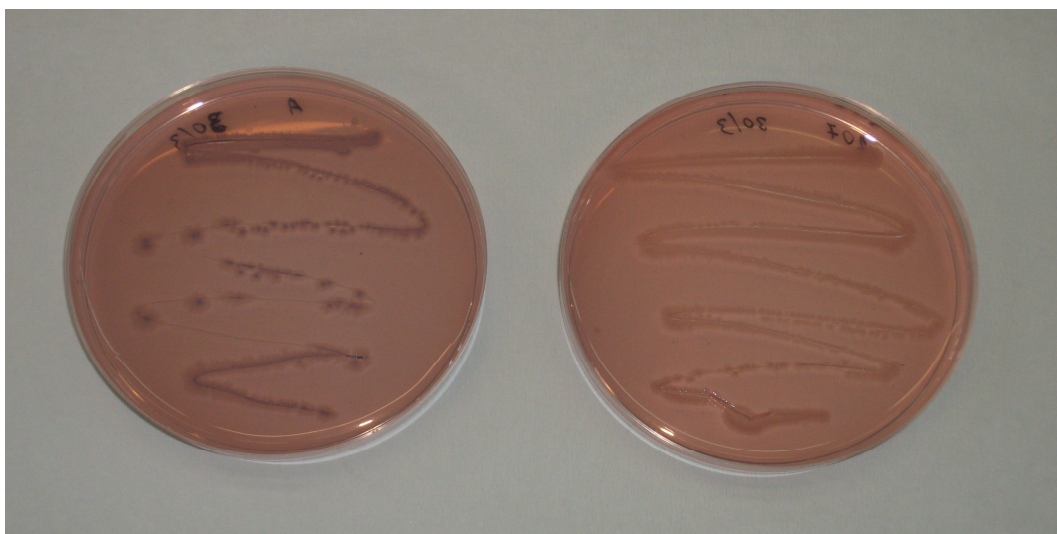
**Εικόνα 15:** Στέλεχος 969 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



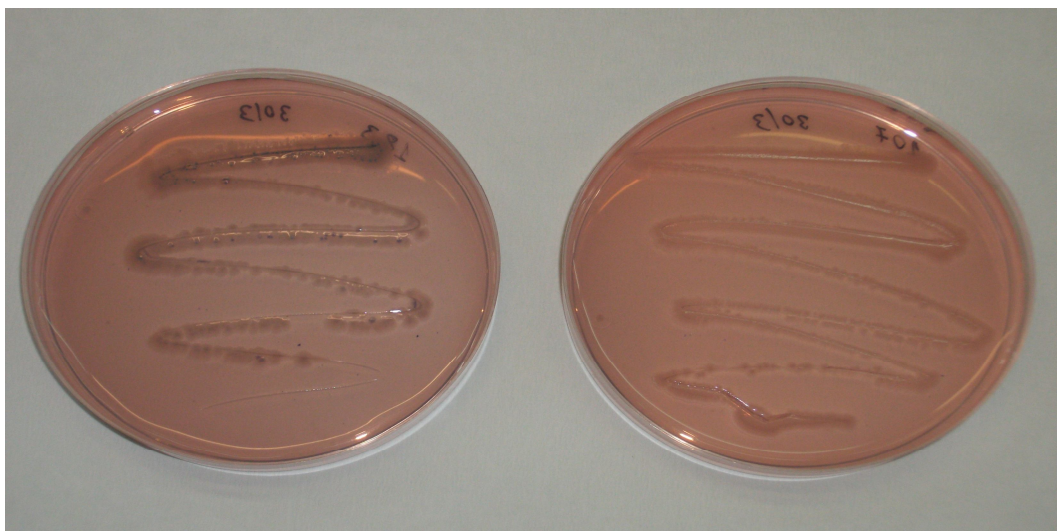
**Εικόνα 16:** Στέλεχος 1813 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



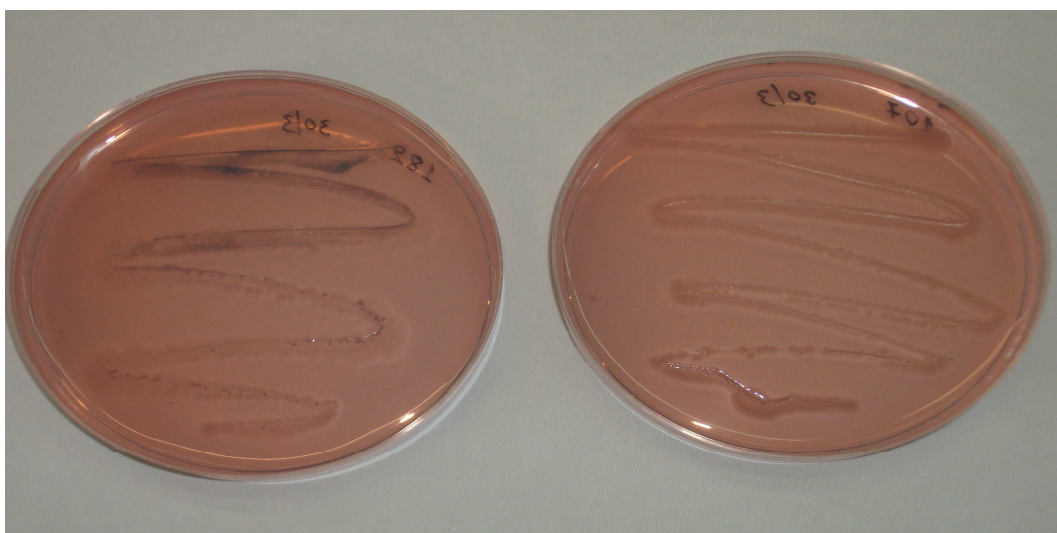
**Εικόνα 17:** Στέλεχος 2C1 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



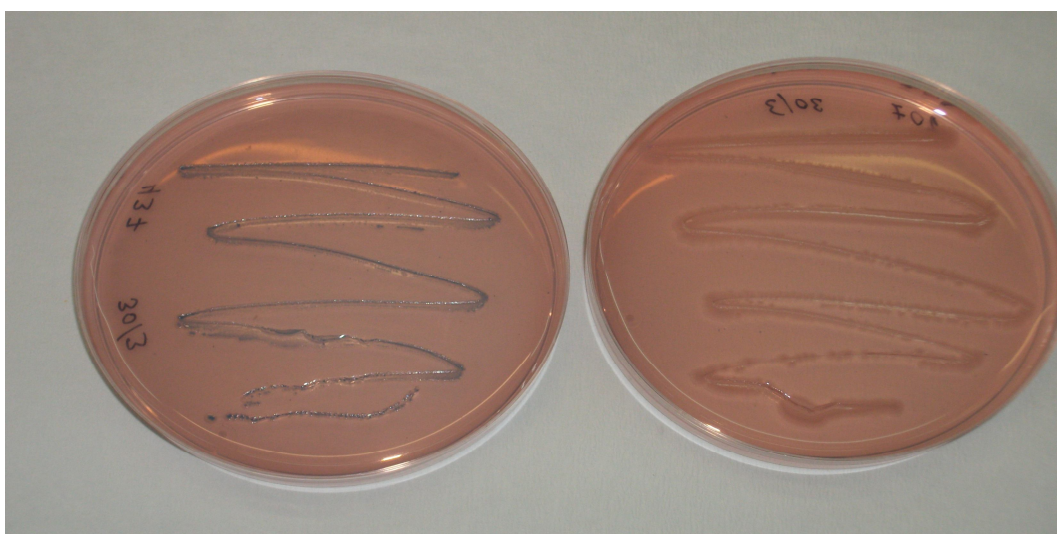
**Εικόνα 18:** Στέλεχος Α με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



**Εικόνα 19:** Στέλεχος 183 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107

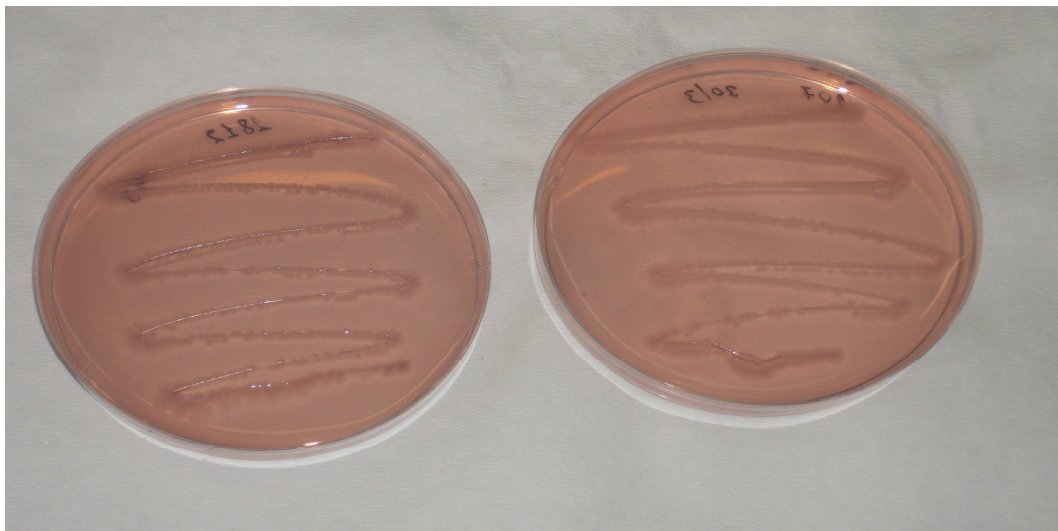


**Εικόνα 20:** Στέλεχος 182 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107

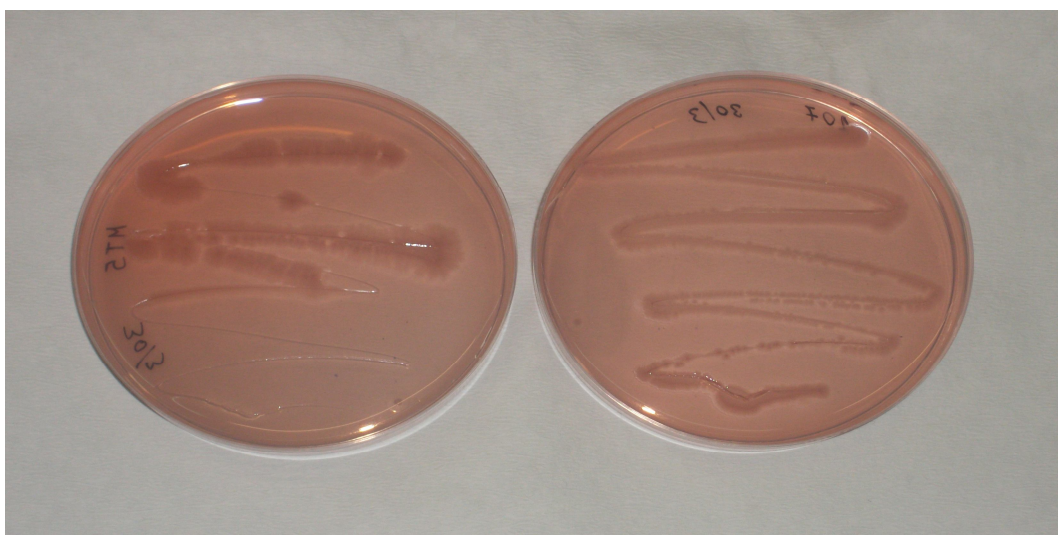


**Εικόνα 21:** Στέλεχος 437 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107

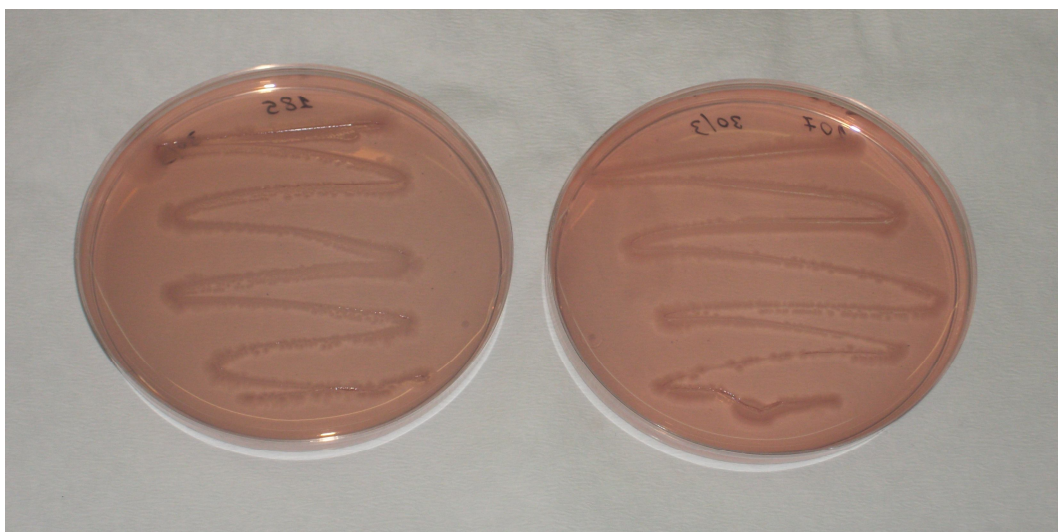




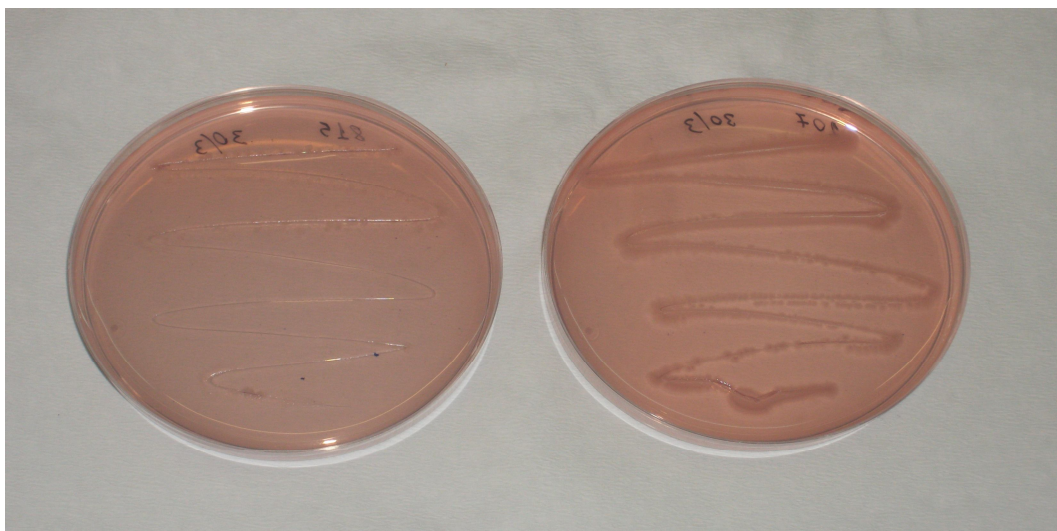
**Εικόνα 22:** Στέλεχος 1812 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



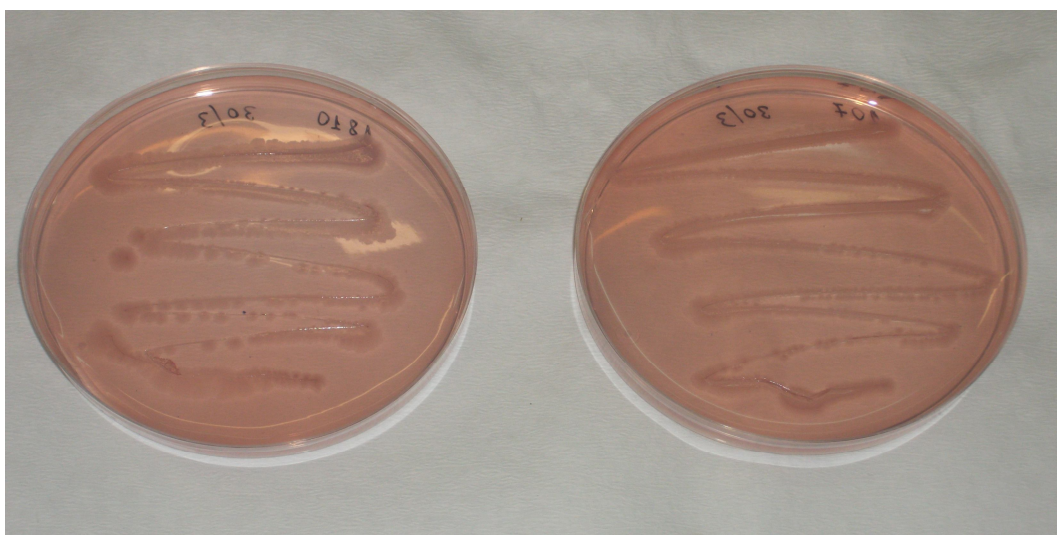
**Εικόνα 23:** Στέλεχος MT5 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



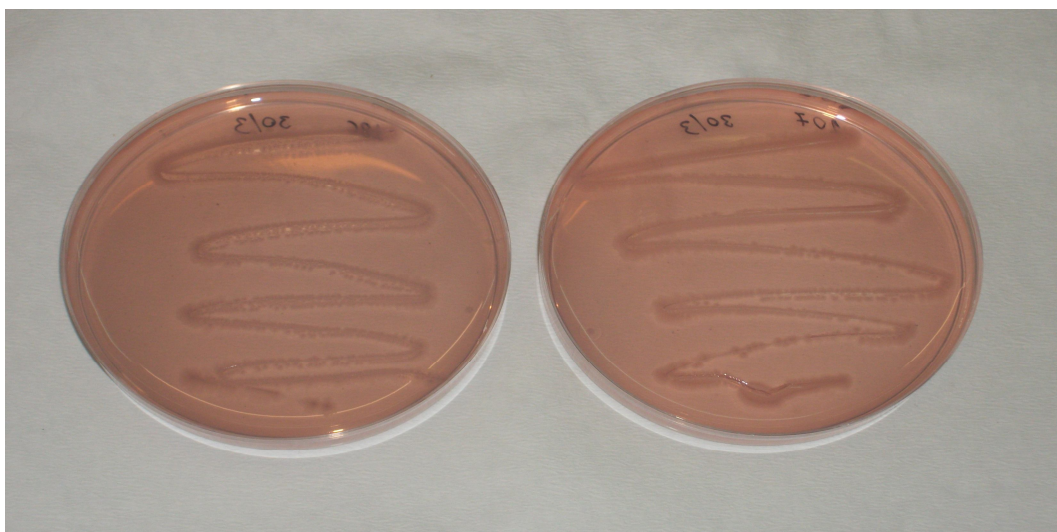
**Εικόνα 24:** Στέλεχος 185 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



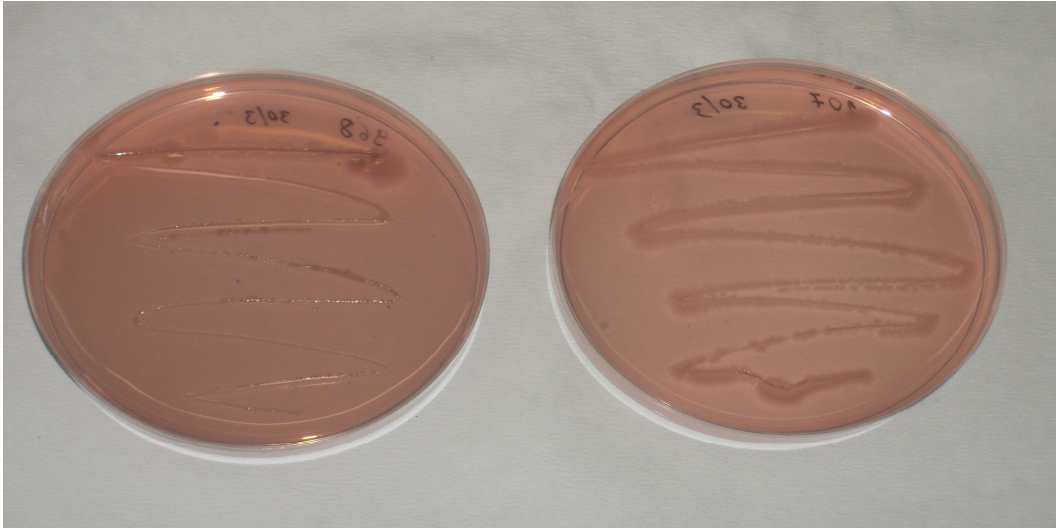
**Εικόνα 25:** Στέλεχος 815 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



**Εικόνα 26:** Στέλεχος 1810 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



**Εικόνα 27:** Στέλεχος 186 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107



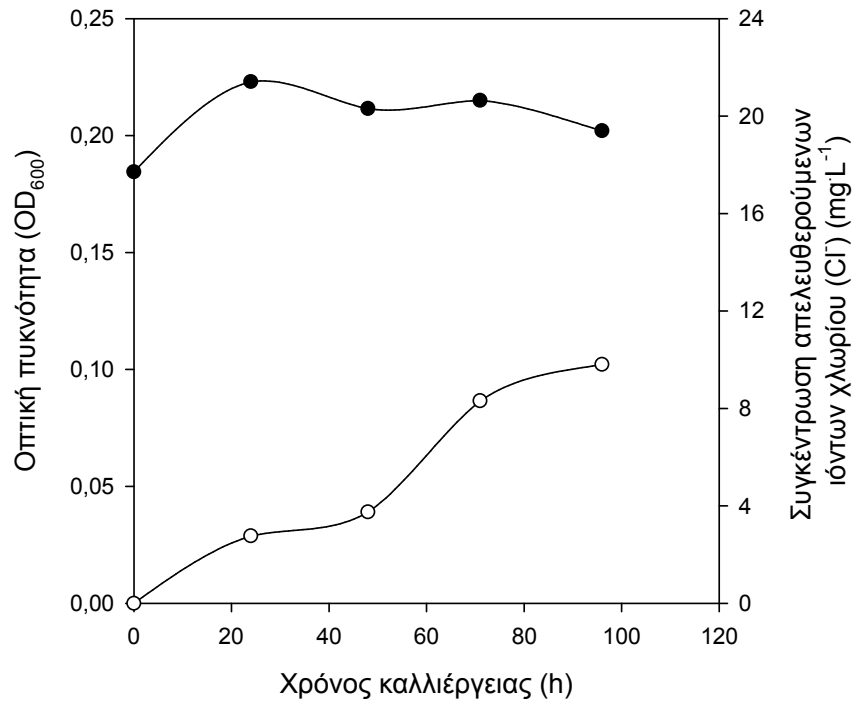
**Εικόνα 28:** Στέλεχος 968 με ικανότητα αφαλογόνωσης – Στέλεχος 107

## **2. Επιλογή των ικανότερων μικροοργανισμών για αποχλωρίωση**

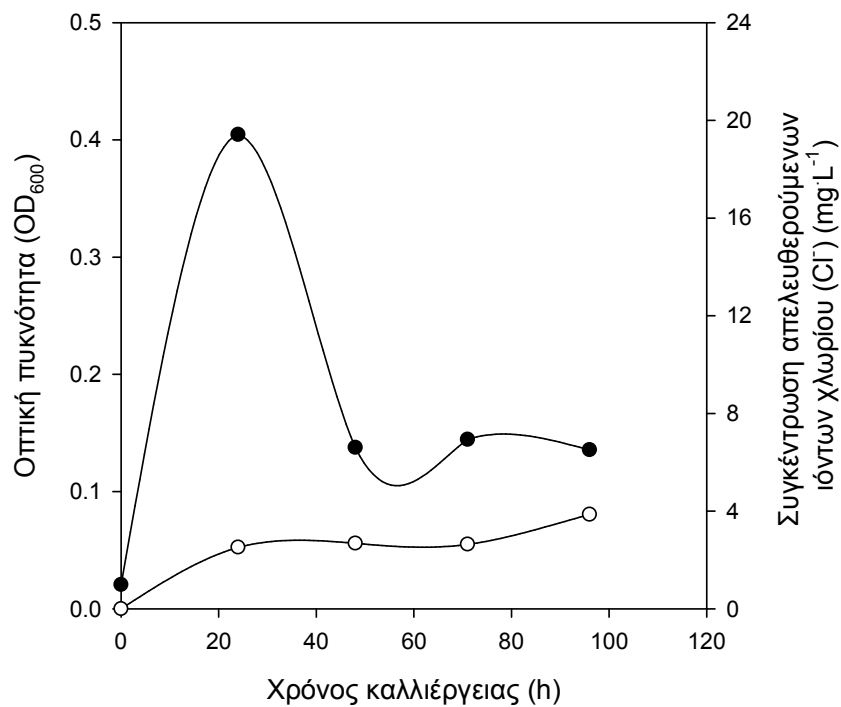
Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τα 24 θετικά ως προς την ικανότητα αποικοδόμησης μικροβιακά στελέχη σε συγκέντρωση  $100 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$  3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) ή 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP). Κάθε 24 h μετρούνταν η οπτική πυκνότητα στα 600nm και η απελευθέρωση χλωριόντων, όπως αναπτύχθηκε στο παραπάνω κεφάλαιο.

### **2.1 Επιλογή των ικανότερων μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση της 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης**

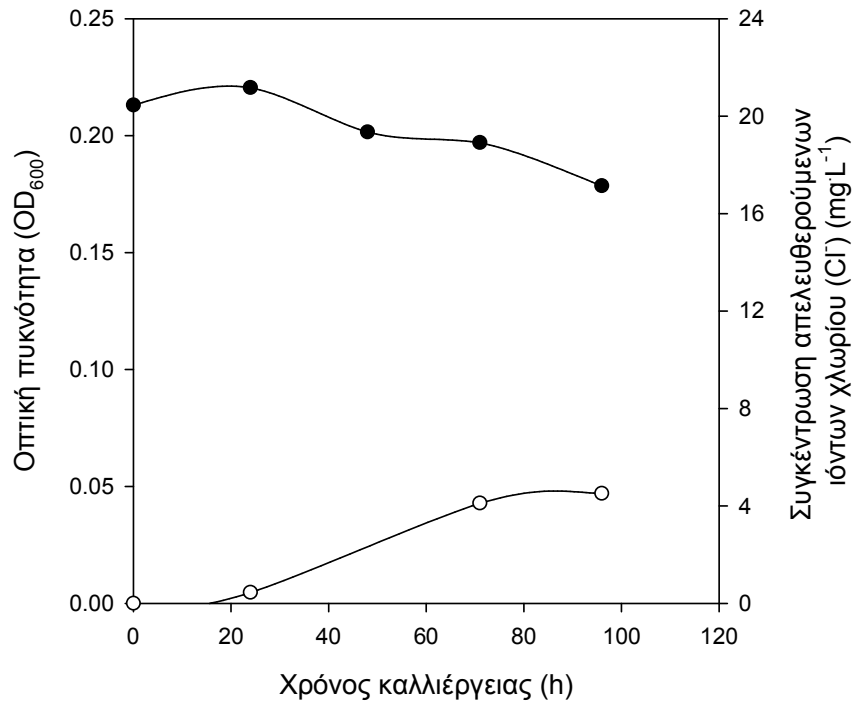
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επιλογής των αποδοτικότερων μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση της 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD):



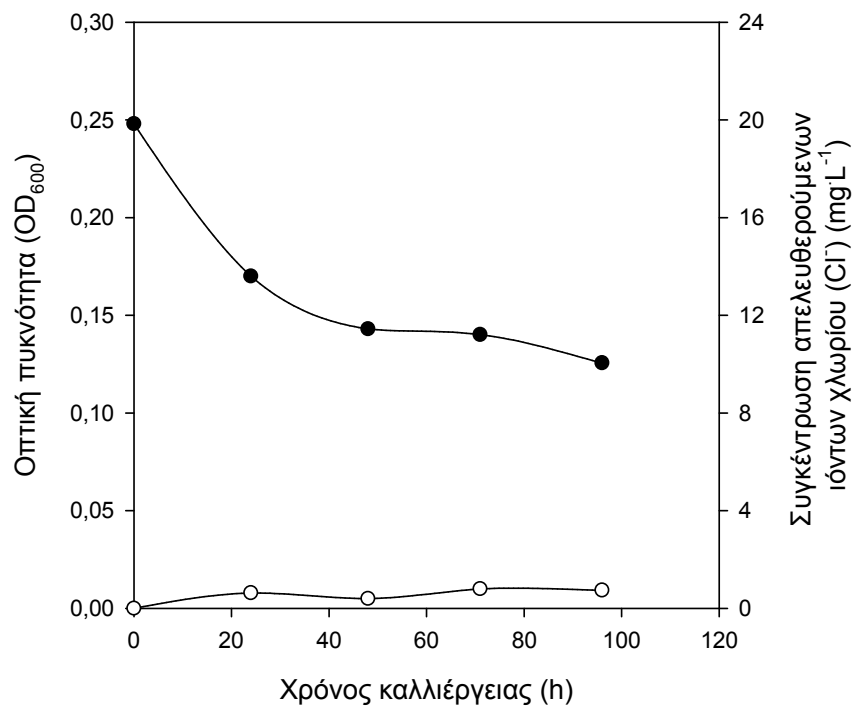
**Διάγραμμα 4:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 108. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



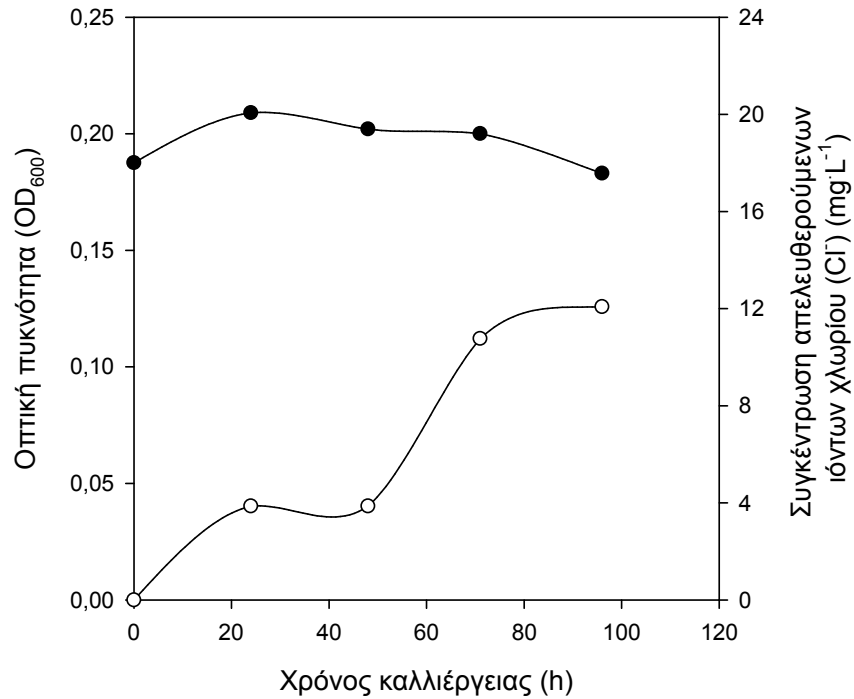
**Διάγραμμα 5:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο MT7. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



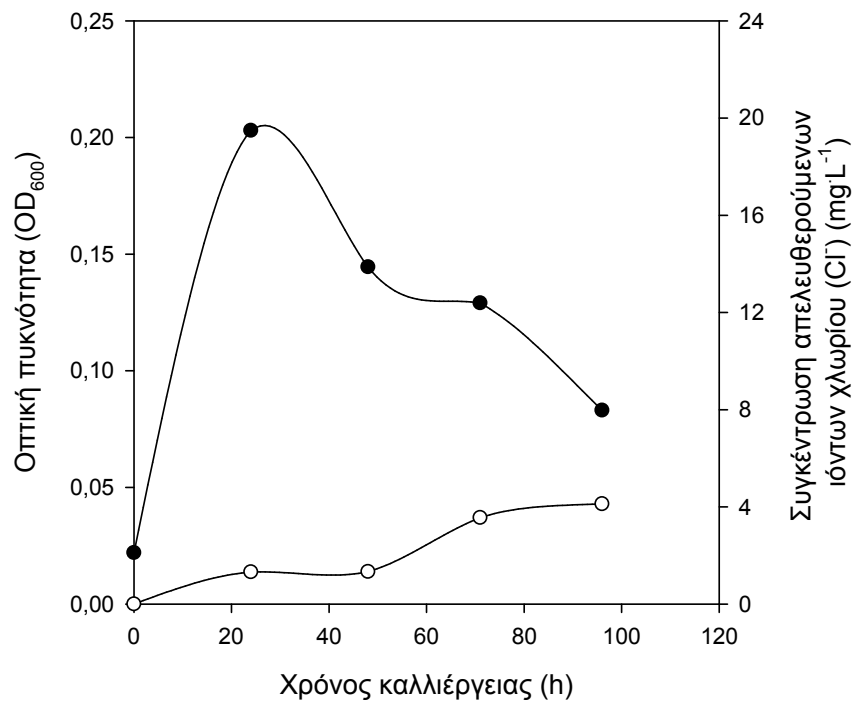
**Διάγραμμα 6:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο MT8. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



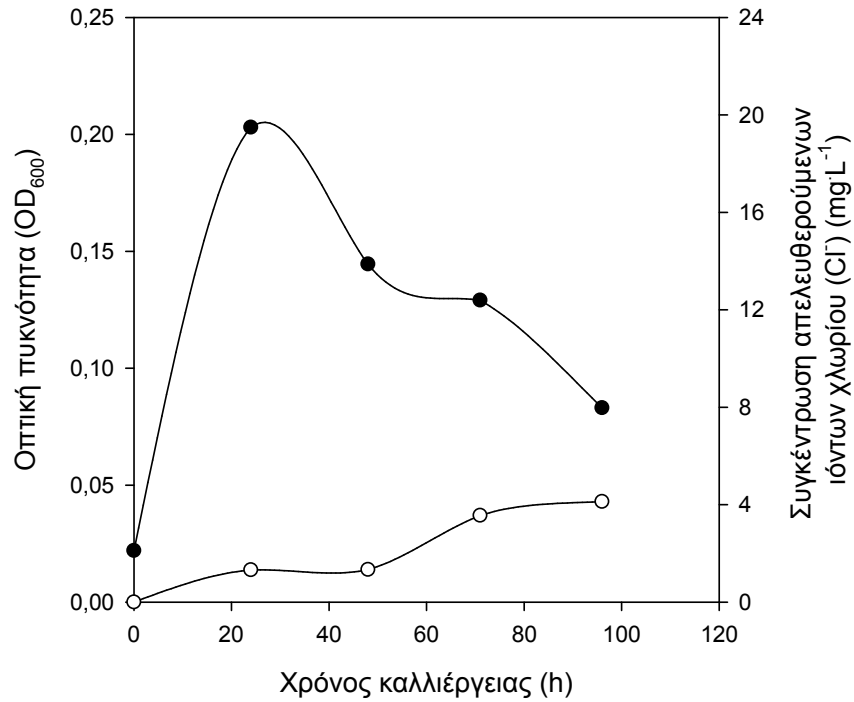
**Διάγραμμα 7:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο MT3. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



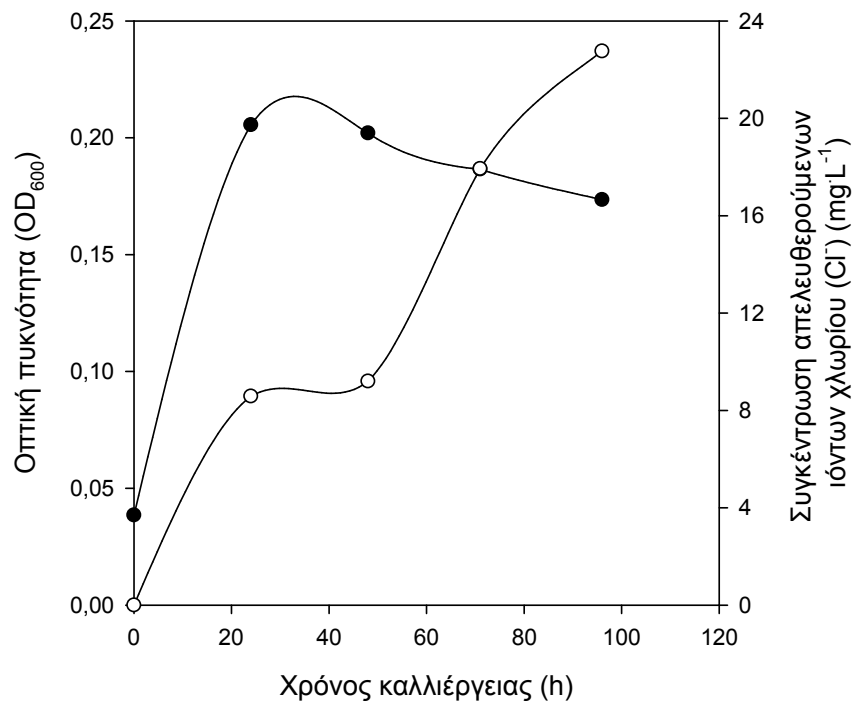
**Διάγραμμα 8:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 187. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



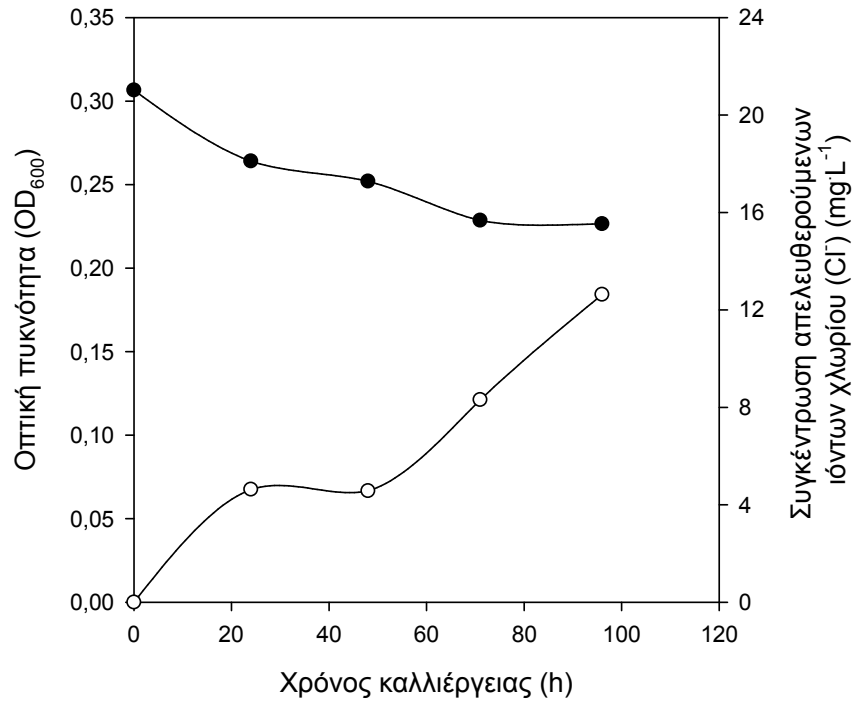
**Διάγραμμα 9:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 966. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



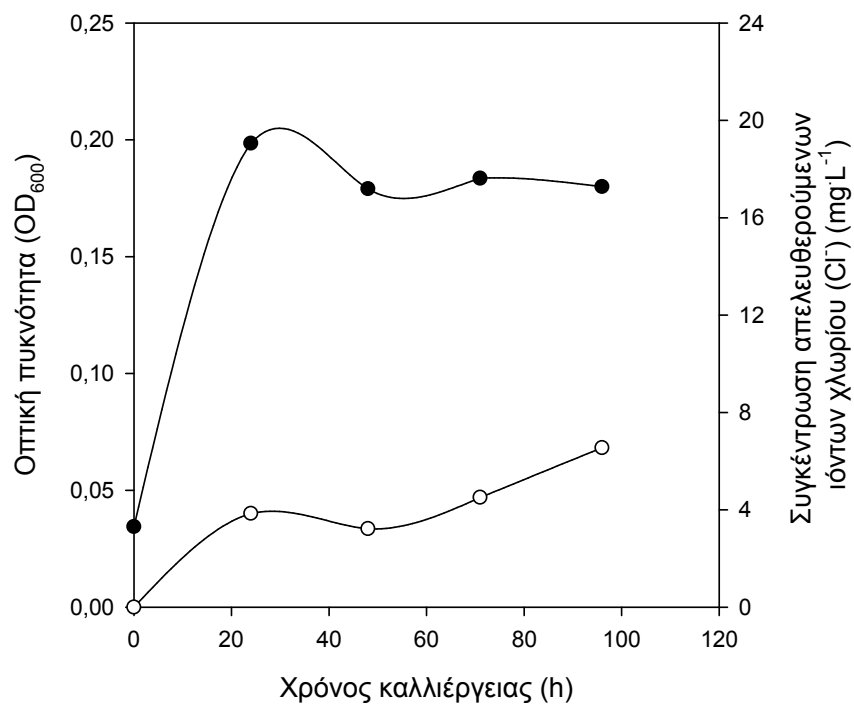
**Διάγραμμα 10:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 12448. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 11:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 437. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου

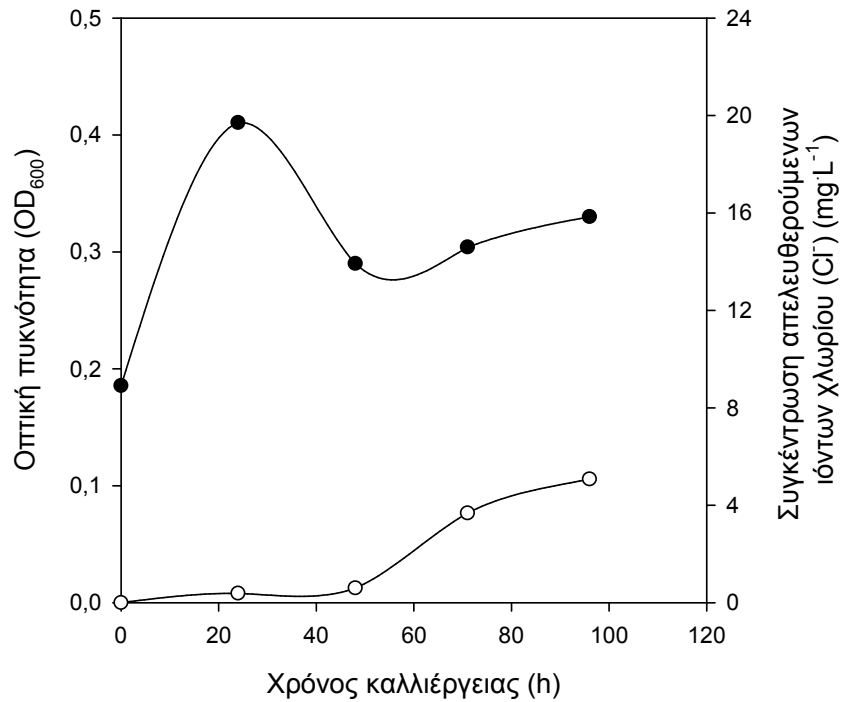


**Διάγραμμα 12:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 183. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου

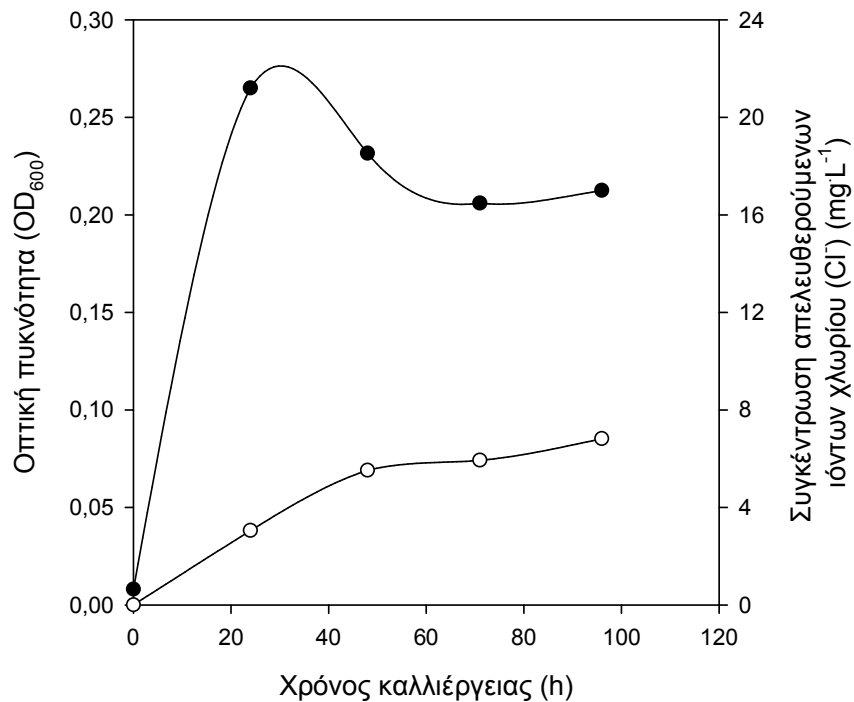


**Διάγραμμα 13:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 186. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου

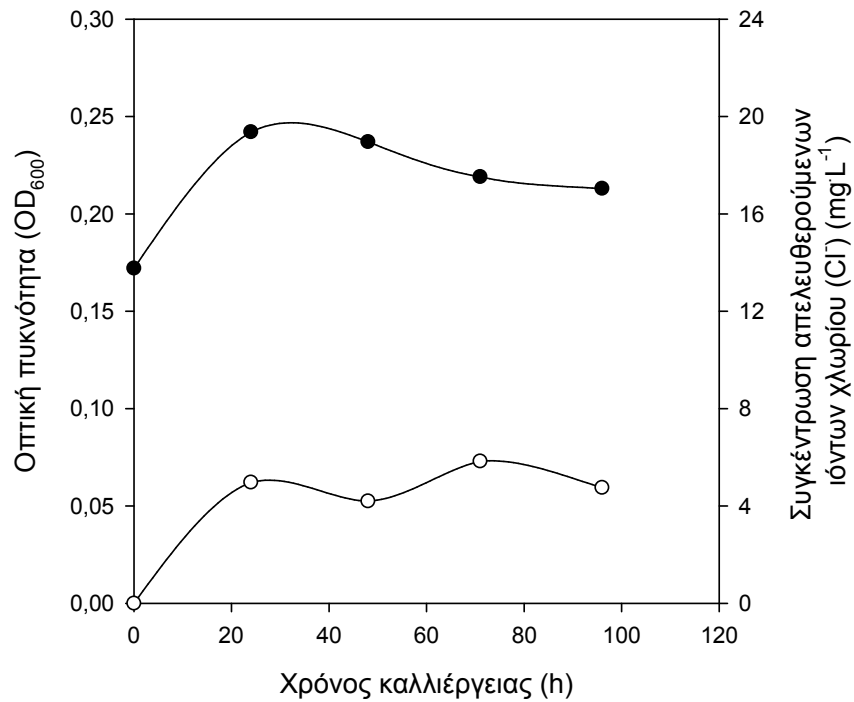




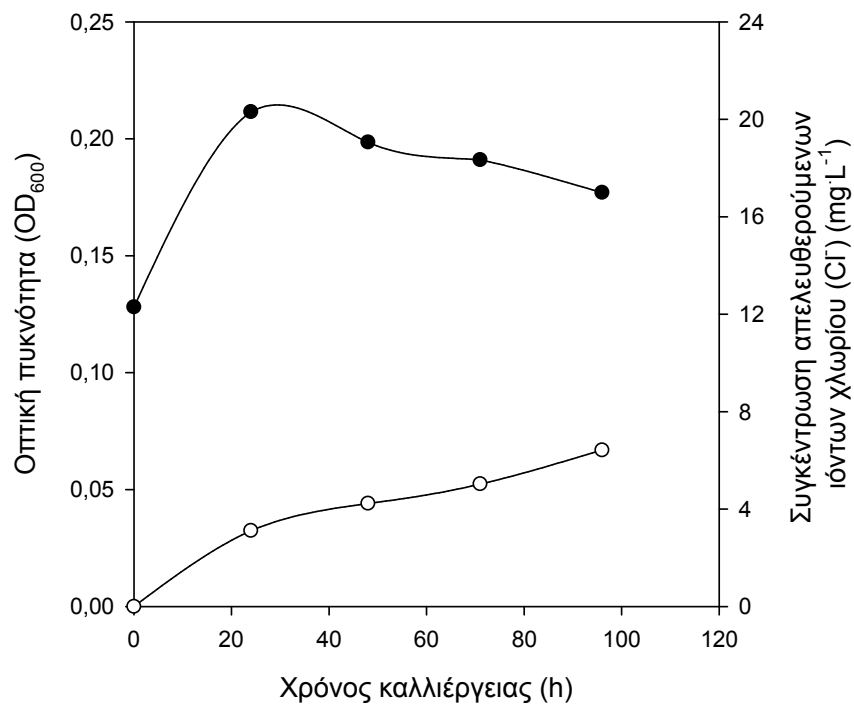
**Διάγραμμα 14:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο Α. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



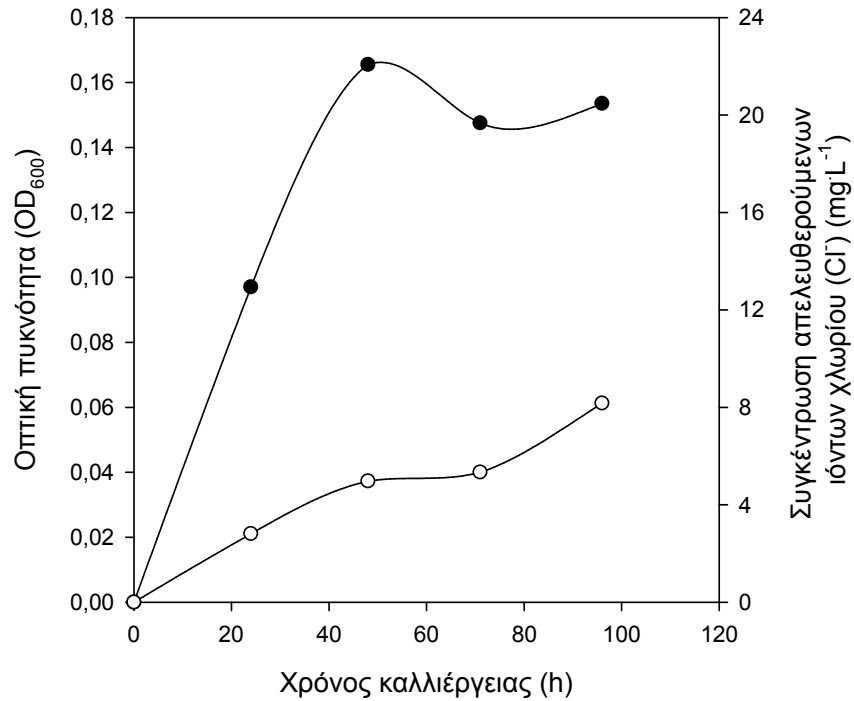
**Διάγραμμα 15:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 185. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



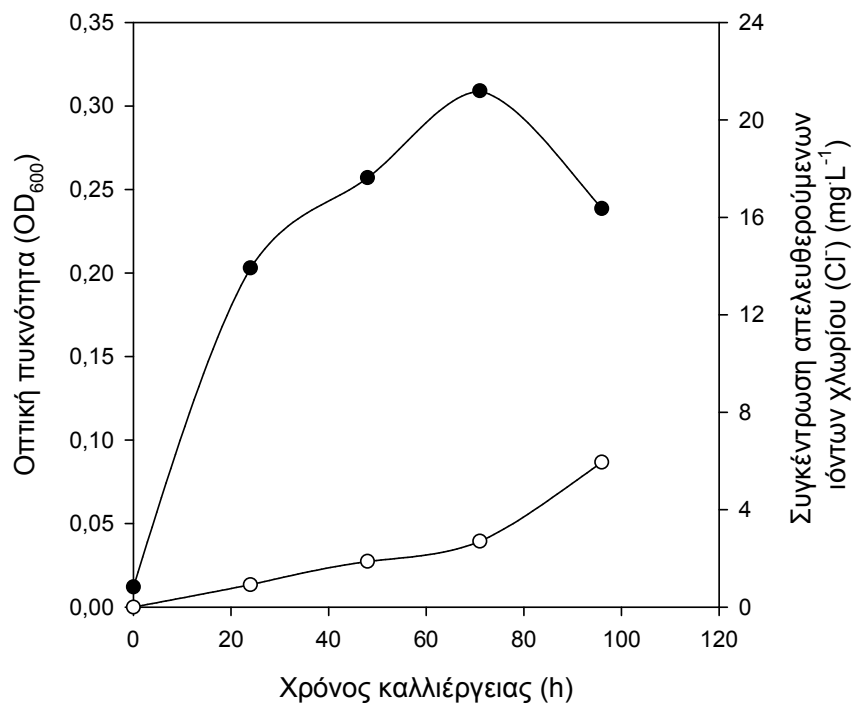
**Διάγραμμα 16:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 182. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



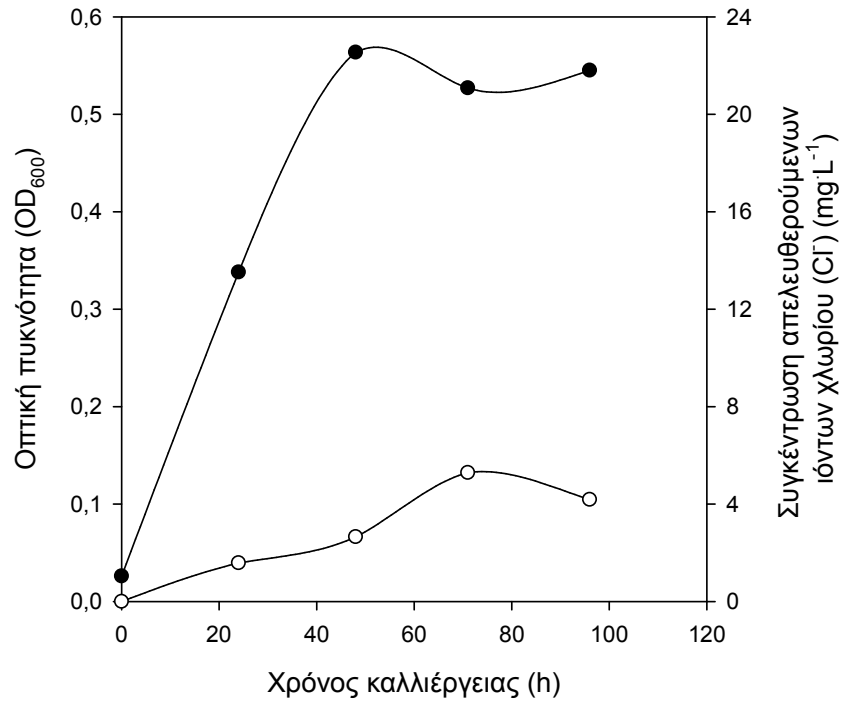
**Διάγραμμα 17:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο MT5. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



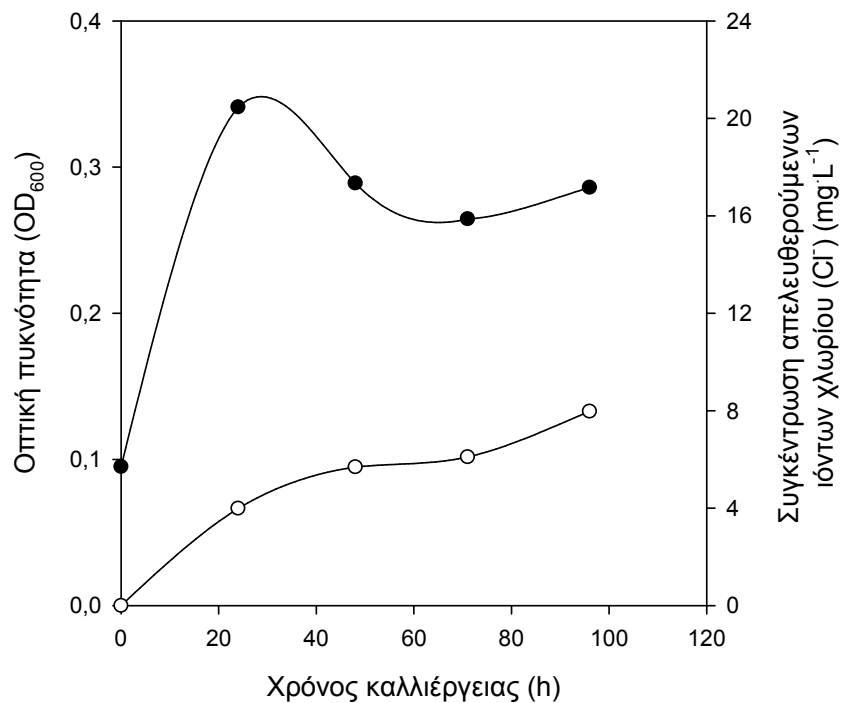
**Διάγραμμα 18:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 2C1. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



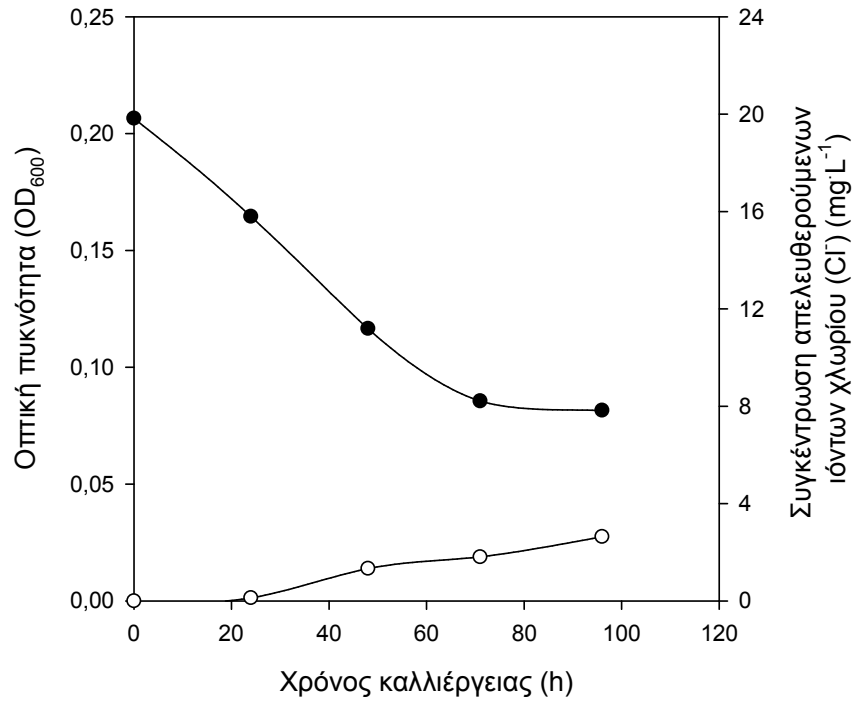
**Διάγραμμα 19:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 1813. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



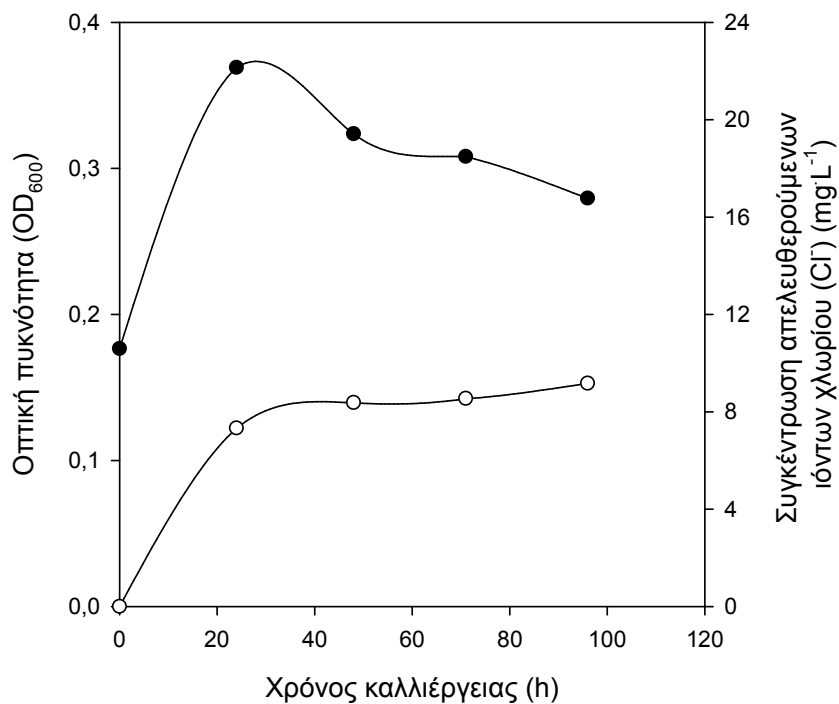
**Διάγραμμα 20:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 815. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



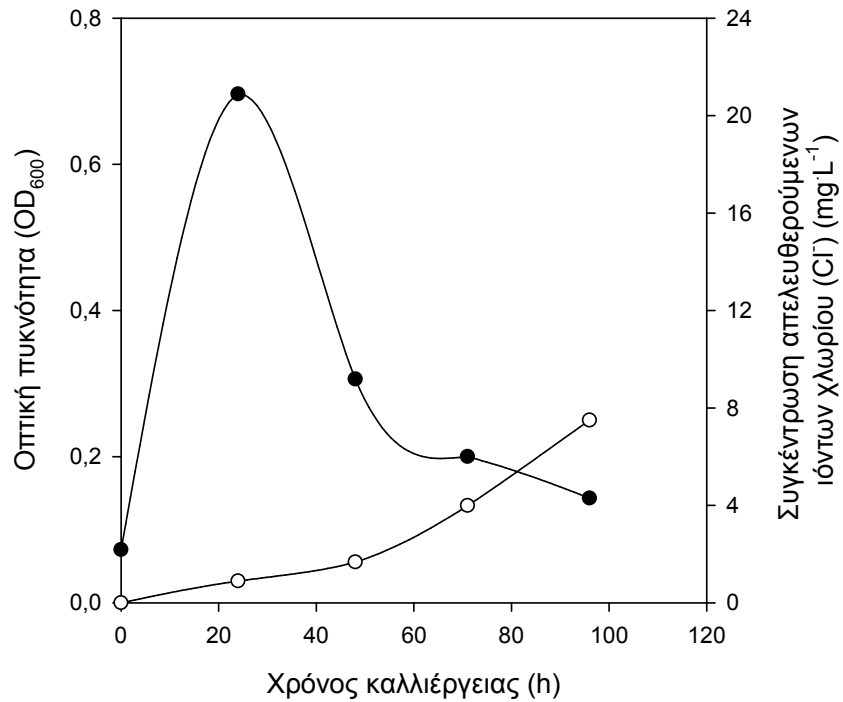
**Διάγραμμα 21:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 189. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



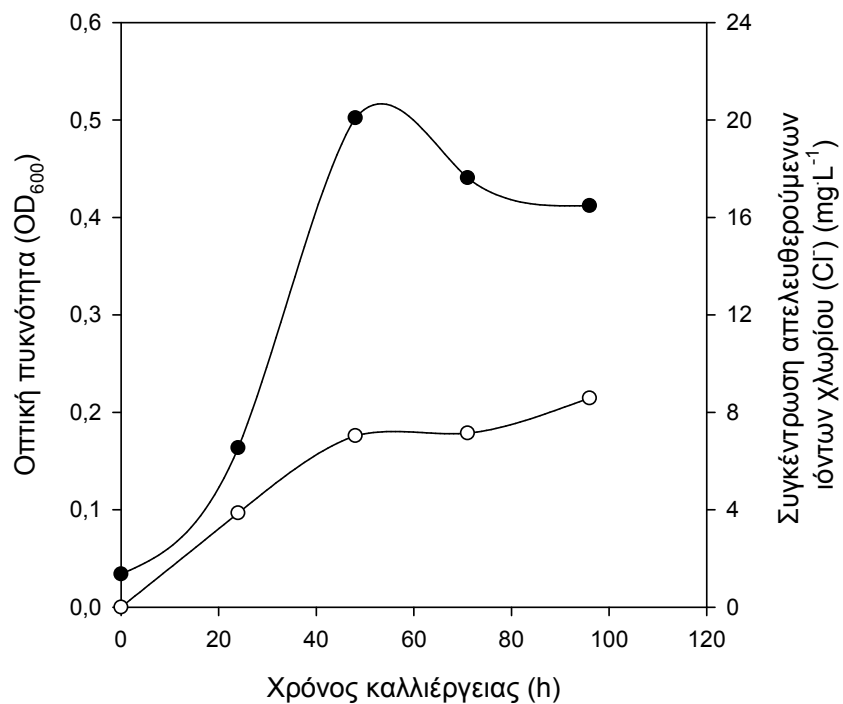
**Διάγραμμα 22:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο MT1. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



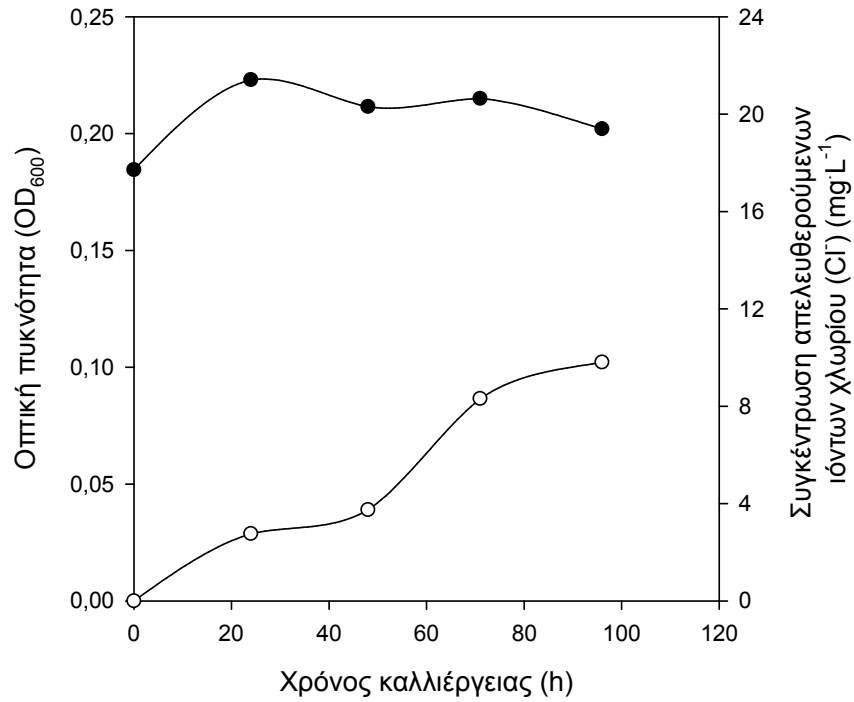
**Διάγραμμα 23:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 1812. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



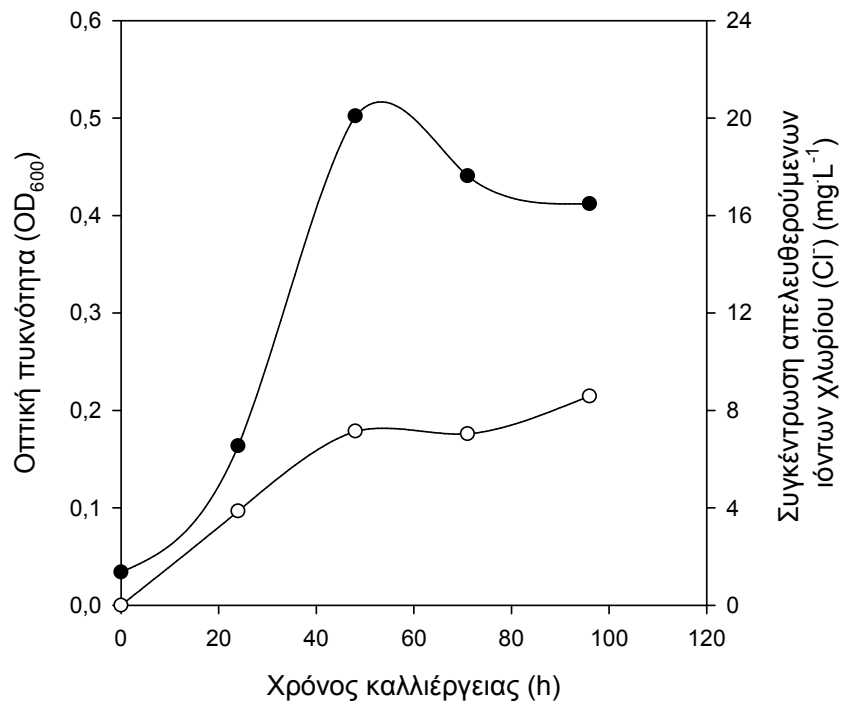
**Διάγραμμα 24:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 1810. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 25:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 968. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 26:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 1181. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 27:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 969. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου

Στα παραπάνω διαγράμματα παρατηρούμε ότι η ανάπτυξη των μικροοργανισμών (προσδιορίζεται από την οπτική πυκνότητα στα 600nm) αρχικά αυξάνεται και στη συνέχεια μειώνεται. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο ότι κάποια κύτταρα έχουν προσαρμοστεί στην παρουσία της 3-CPD και μπορούν να την αποικοδομήσουν, ενώ κάποια άλλα όχι και παρατηρείται λύση των κυττάρων, η οποία προκαλεί μείωση του συνολικού πληθυσμού. Ωστόσο, σε κάποια παρατηρείται συνεχής μείωση της ανάπτυξης με ταυτόχρονη αύξηση των απελευθερούμενων ιόντων χλωρίου. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην χρήση του ανθρακικού σκελετού για παραγωγή μεταβολιτών που έως τώρα δεν είναι γνωστοί.

Αντίστοιχα, η συγκέντρωση των απελευθερούμενων ιόντων χλωρίου εμφανίζεται να έχει ανοδική ή σταθερή τάση. Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα αφαλογόνωσης σπάνε τους δεσμούς χλωρίου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ιόντων χλωρίου. Έτσι, ανάλογα με την κυτταρική συγκέντρωση και την ικανότητα των μικροοργανισμών για αφαλογόνωση απελευθερώνονται και τα αντίστοιχα ιόντα χλωρίου.

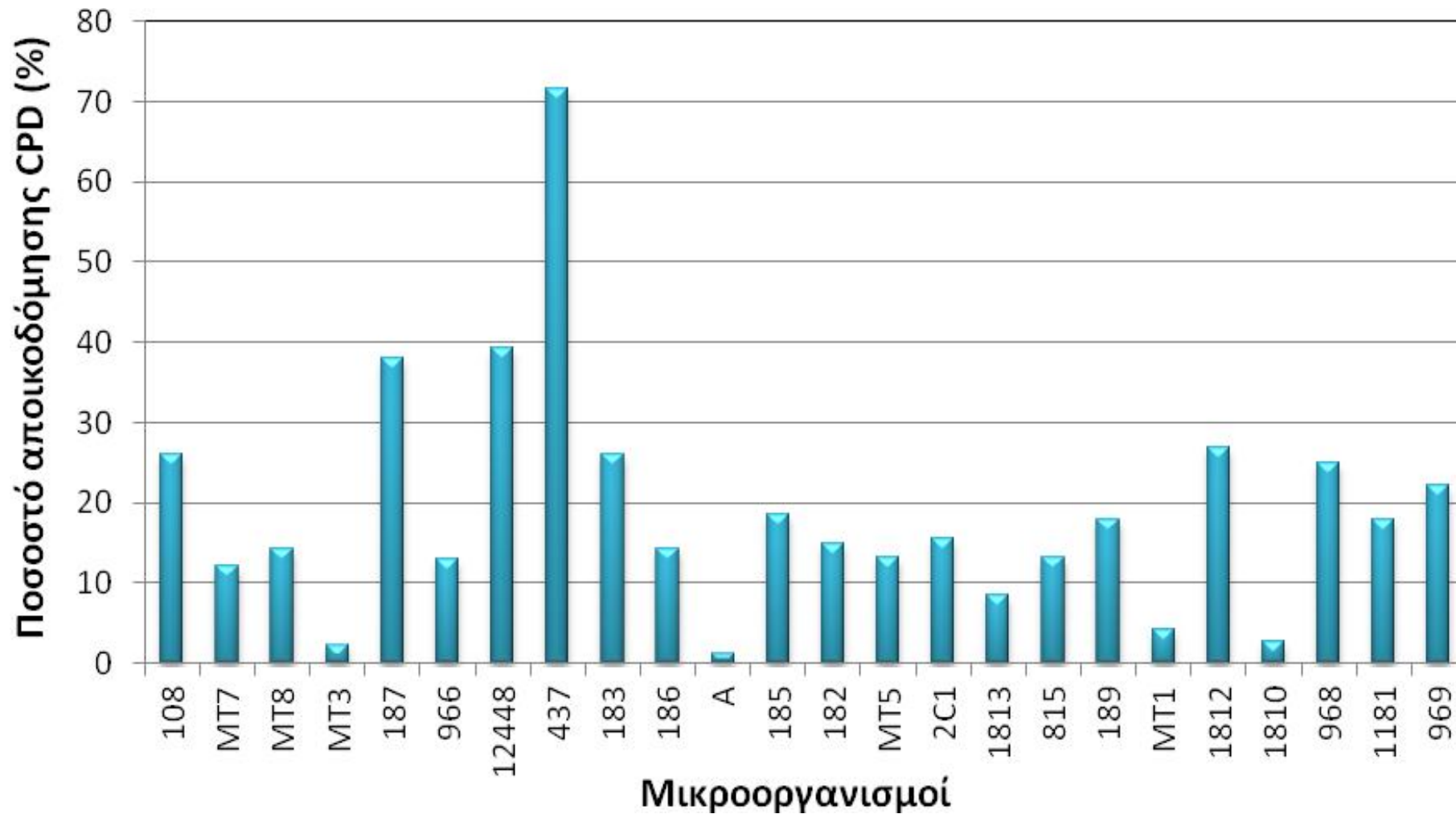
Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτουν ο πίνακας 11 και το διάγραμμα 28 που δείχνουν συνοπτικά την μέγιστη συγκέντρωση  $Cl^-$  και το ποσοστό αποικοδόμησης των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 11 και το Διάγραμμα 28, οι μικροοργανισμοί με τα υψηλότερα ποσοστά αποικοδόμησης 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) και συγκέντρωσης απελευθερούμενων  $Cl^-$ , αντίστοιχα, είναι η *P. putida* DSM 437 με αποικοδόμηση 72 % και συγκέντρωση απελευθερούμενων  $Cl^-$  23 mg L<sup>-1</sup> και *P. putida* DSM 12448 με 39 % και 12 mg L<sup>-1</sup> αντίστοιχα.



**Πίνακας 11:** Συγκεντρωτικός πίνακας αποικοδόμησης 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) ανά μικροοργανισμό

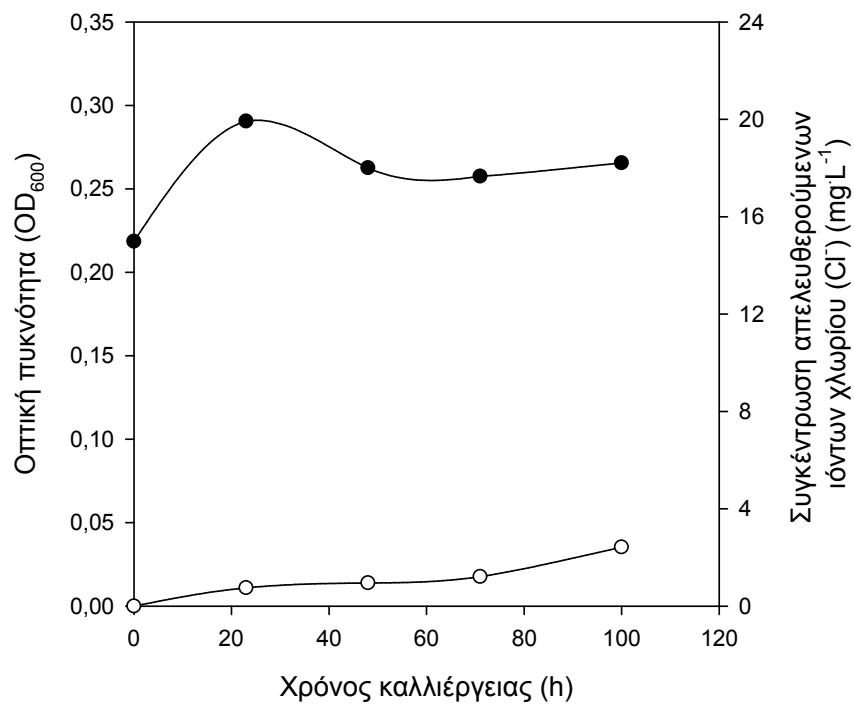
Στέλεχος	Μέγιστη συγκέντρωση Cl <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Αποικοδόμηση 3-CPD (%)
108	8.31	26.11
MT7	3.86	12.14
MT8	4.51	14.16
MT3	0.74	2.31
187	12.08	37.95
966	4.12	12.96
12448	12.47	39.21
437	22.76	71.52
183	8.31	26.11
186	4.51	14.16
A	0.38	1.20
185	5.93	18.64
182	4.75	14.93
MT5	4.23	13.29
2C1	4.97	15.61
1813	2.70	8.48
815	4.18	13.15
189	5.69	17.87
MT1	1.33	4.19
1812	8.26	26.83
1810	0.89	2.79
968	7.94	24.95
1181	5.67	17.82
969	7.03	22.11



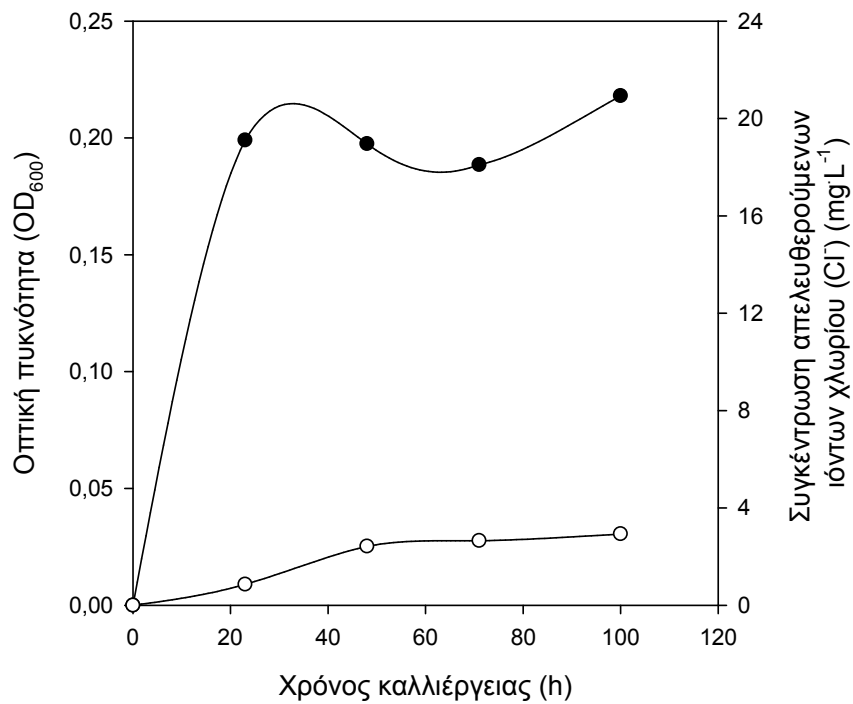
**Διάγραμμα 28:** Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποικοδόμησης 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) ανά μικροοργανισμό

## 2.2 Επιλογή των ικανότερων μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης (DCP)

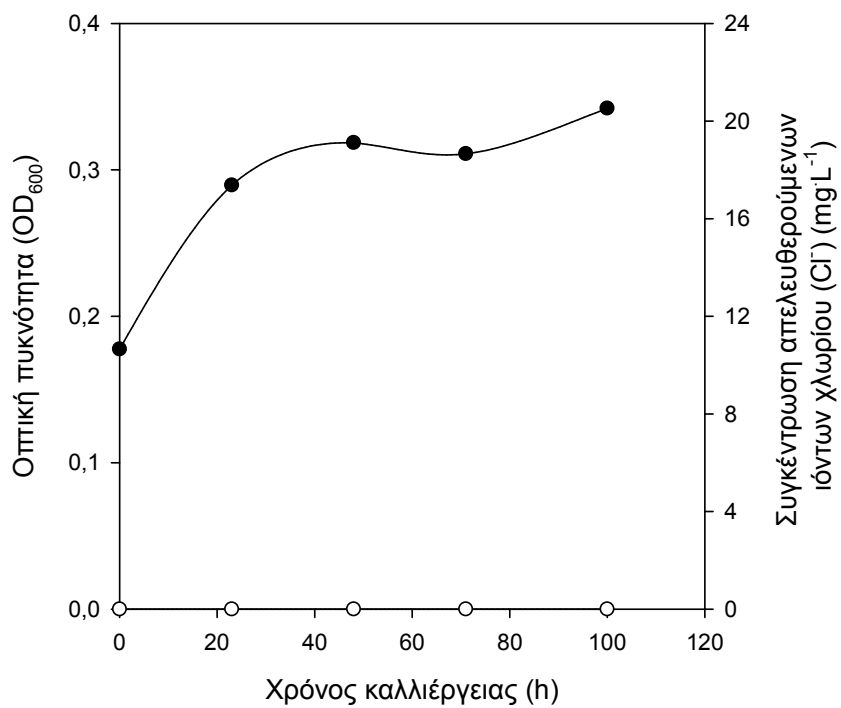
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επιλογής των αποδοτικότερων μικροοργανισμών για την αποικοδόμηση της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης (DCP):



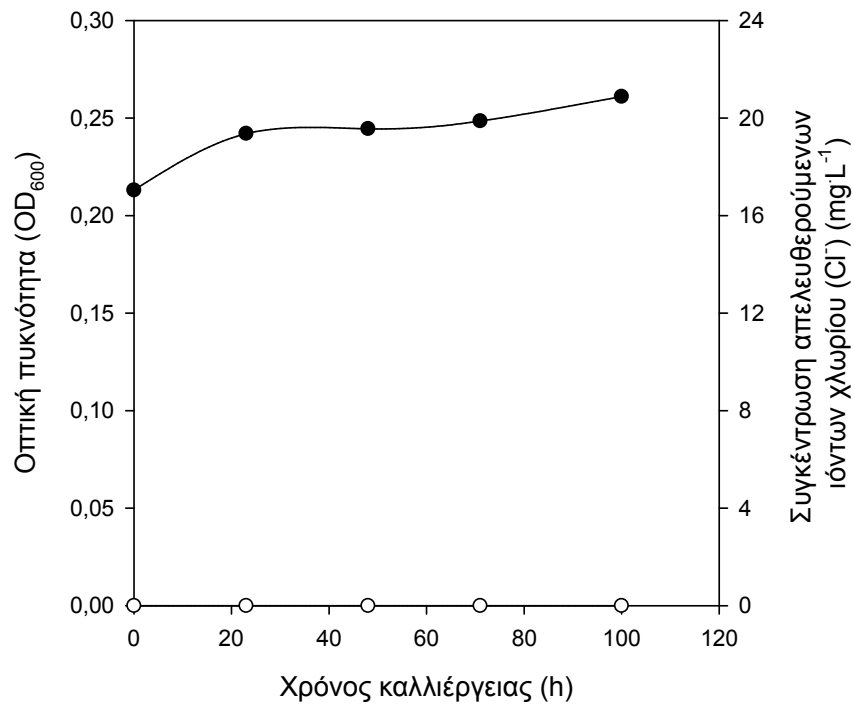
**Διάγραμμα 29:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 108. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



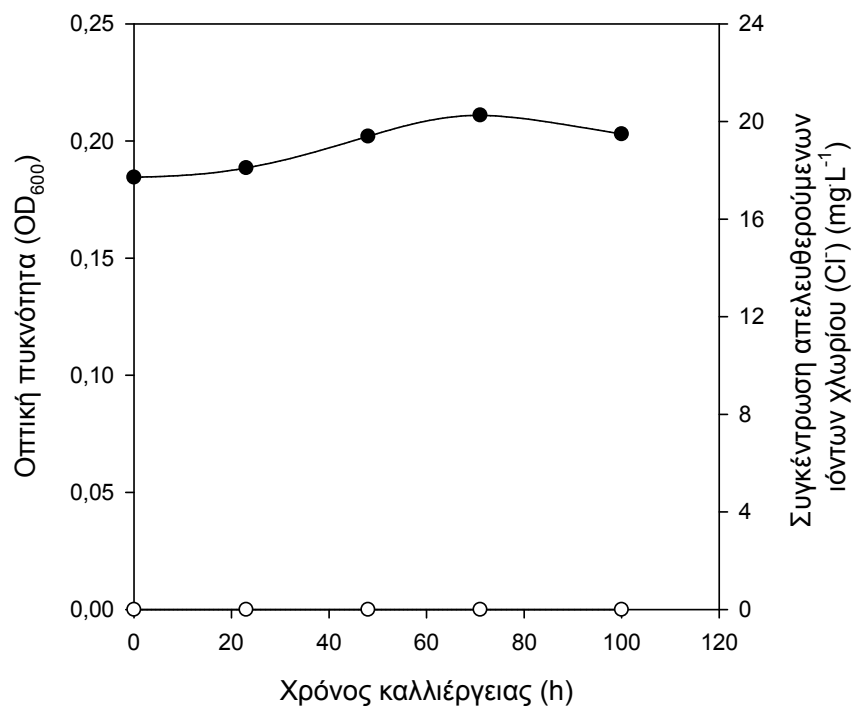
**Διάγραμμα 30:** Αποικοδόμηση  $100 (mg L^{-1})$  1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο MT7. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα ( $OD_{600}$ ), (○) ιόντα χλωρίου



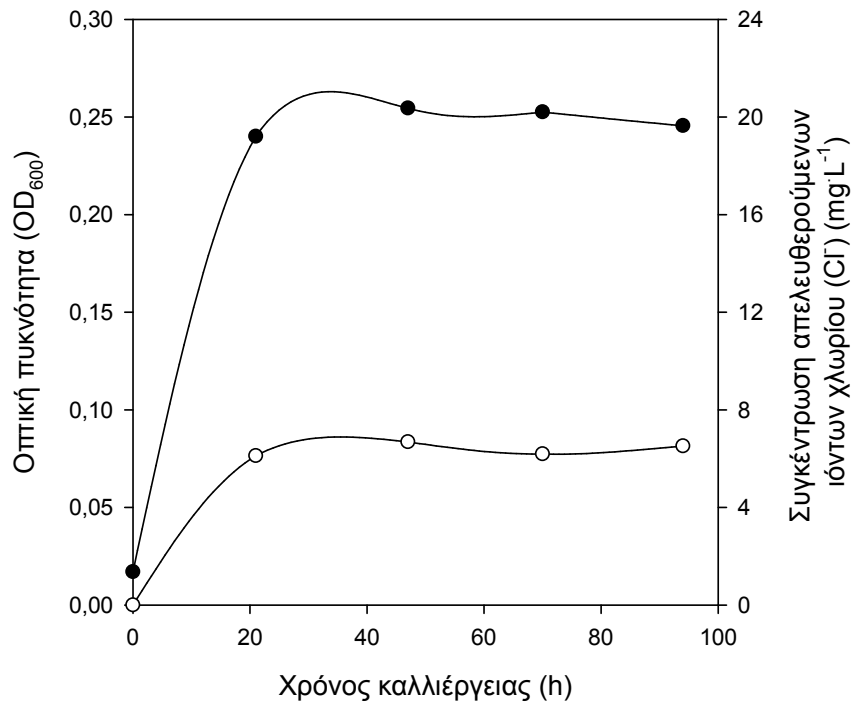
**Διάγραμμα 31:** Αποικοδόμηση  $100 (mg L^{-1})$  1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο MT8. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα ( $OD_{600}$ ), (○) ιόντα χλωρίου



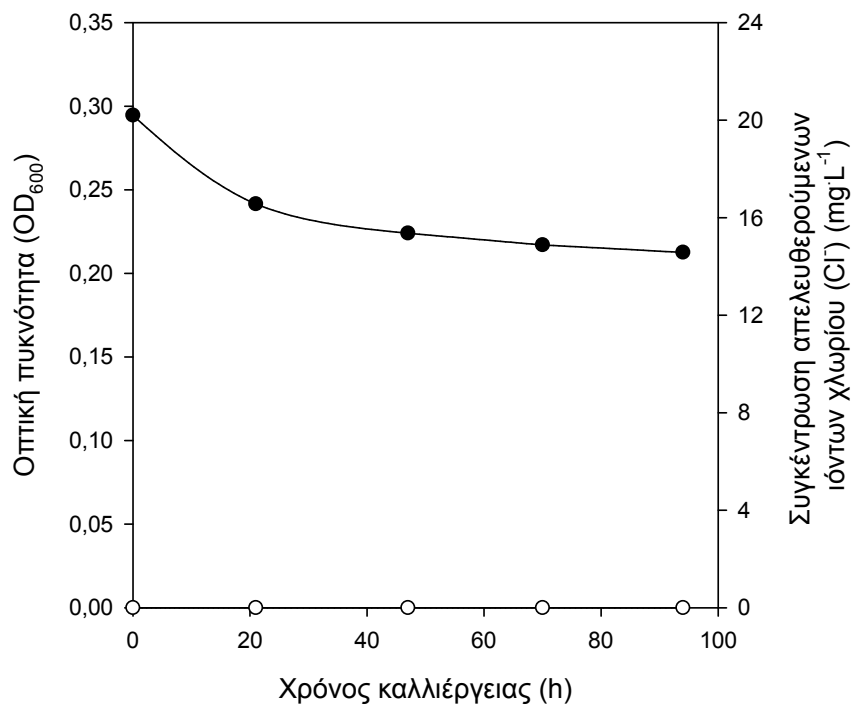
**Διάγραμμα 32:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο MT3. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



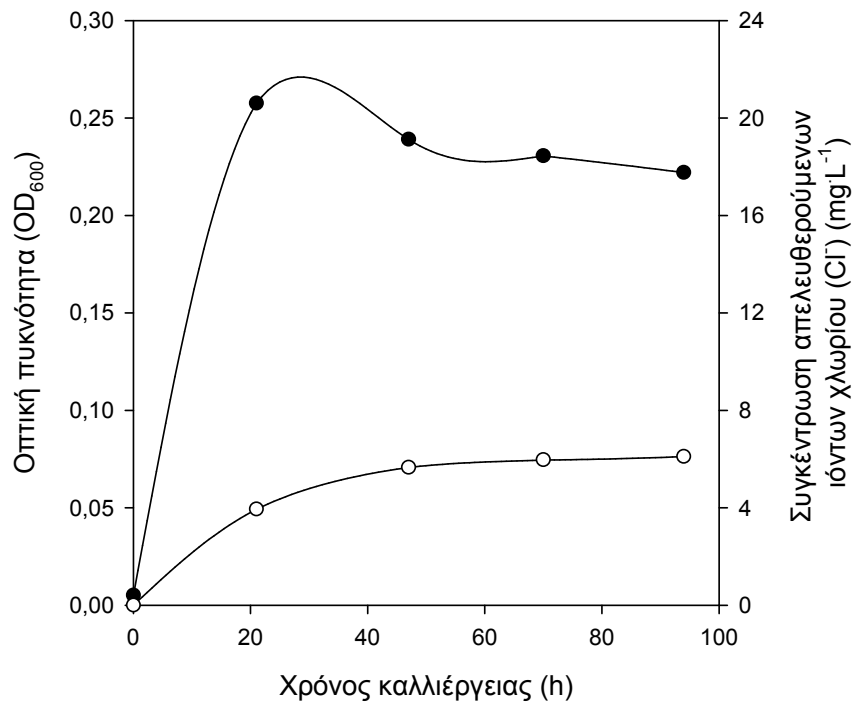
**Διάγραμμα 33:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 187. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



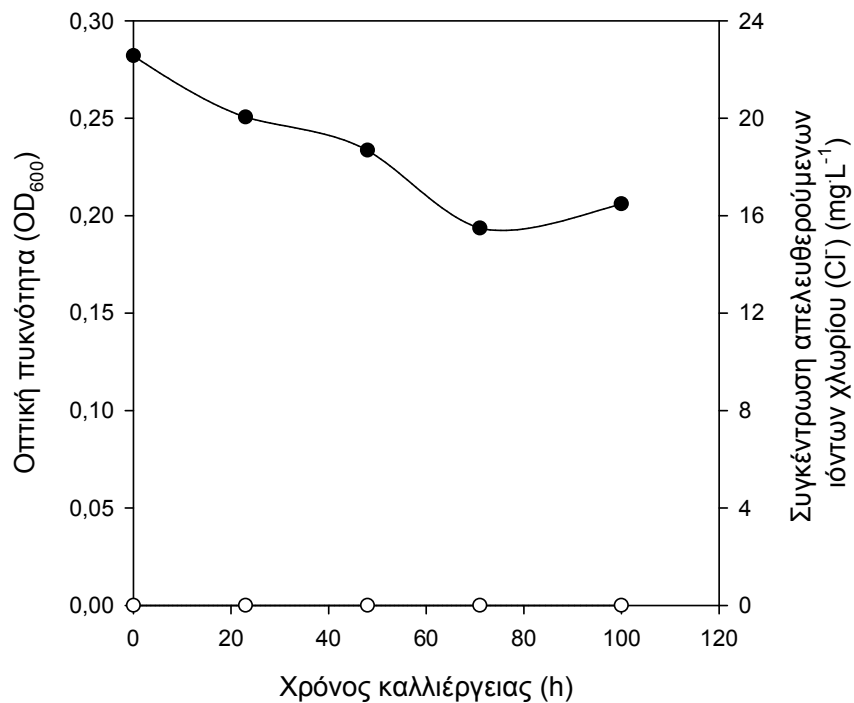
**Διάγραμμα 34:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 966. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



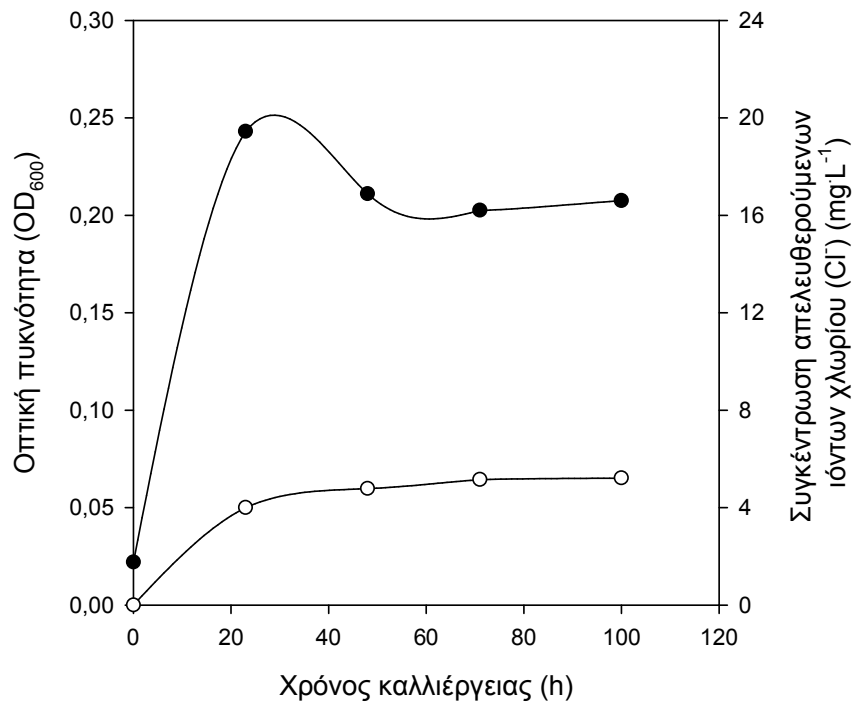
**Διάγραμμα 35:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 12448. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



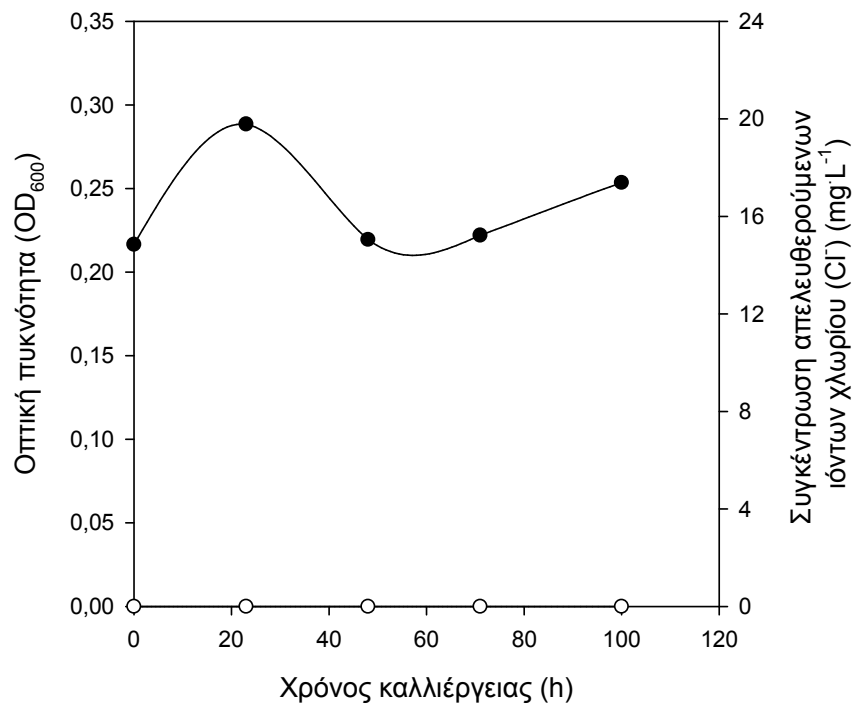
**Διάγραμμα 36:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 437. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 37:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 183. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου

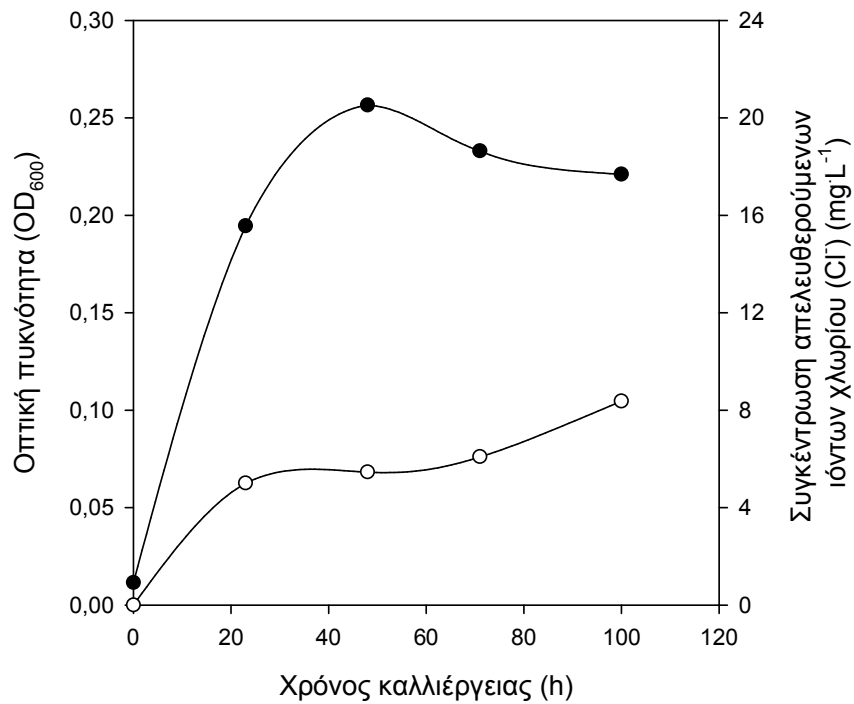


**Διάγραμμα 38:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 186. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου

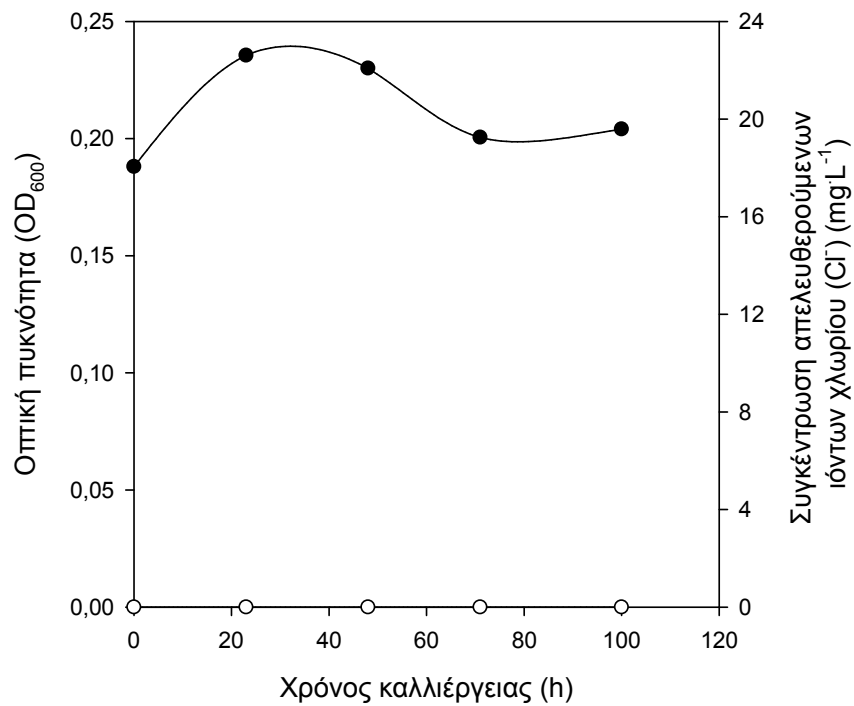


**Διάγραμμα 39:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο A. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου

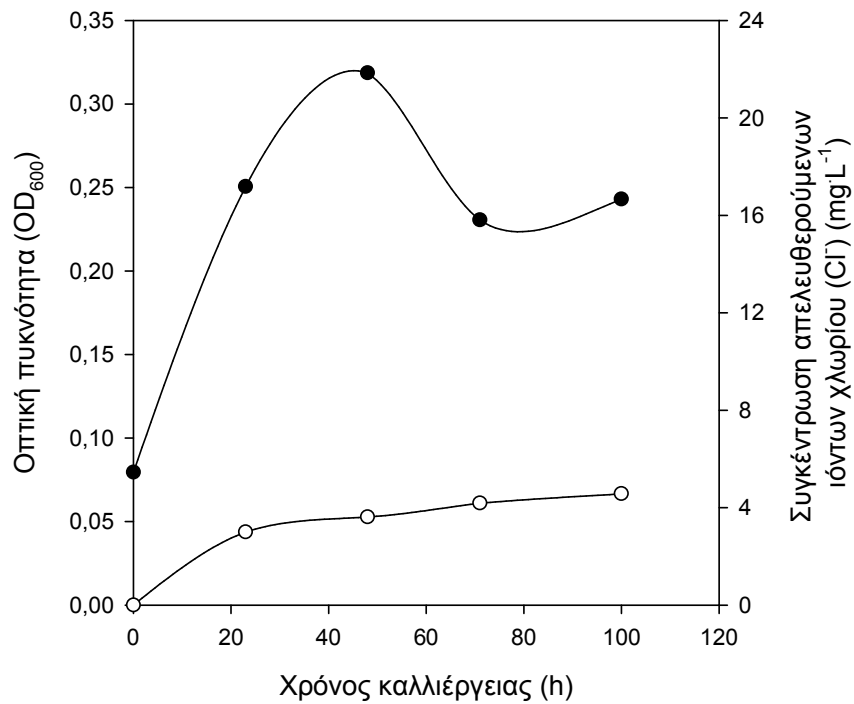




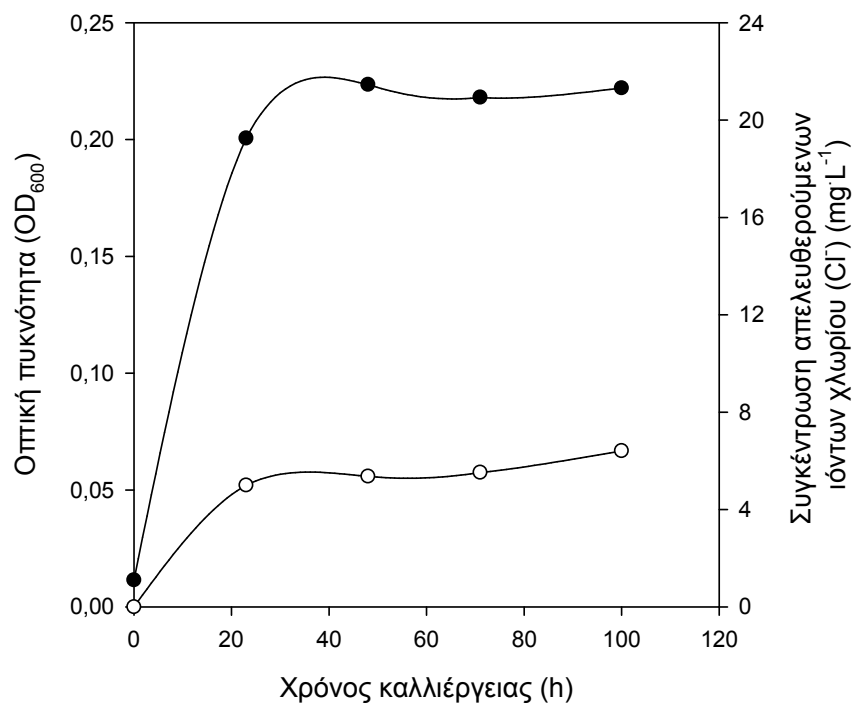
**Διάγραμμα 40:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 185. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



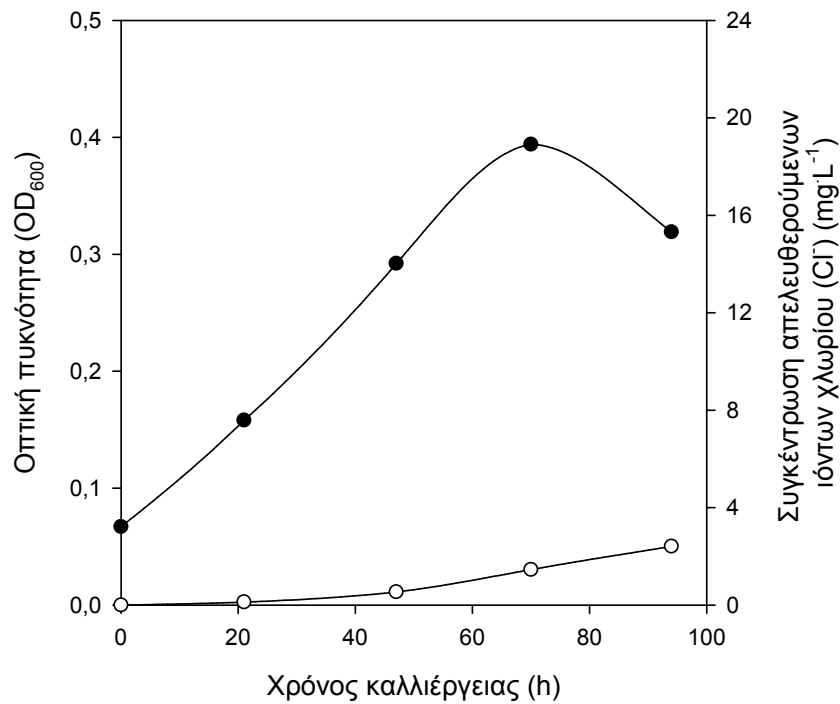
**Διάγραμμα 41:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 182. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



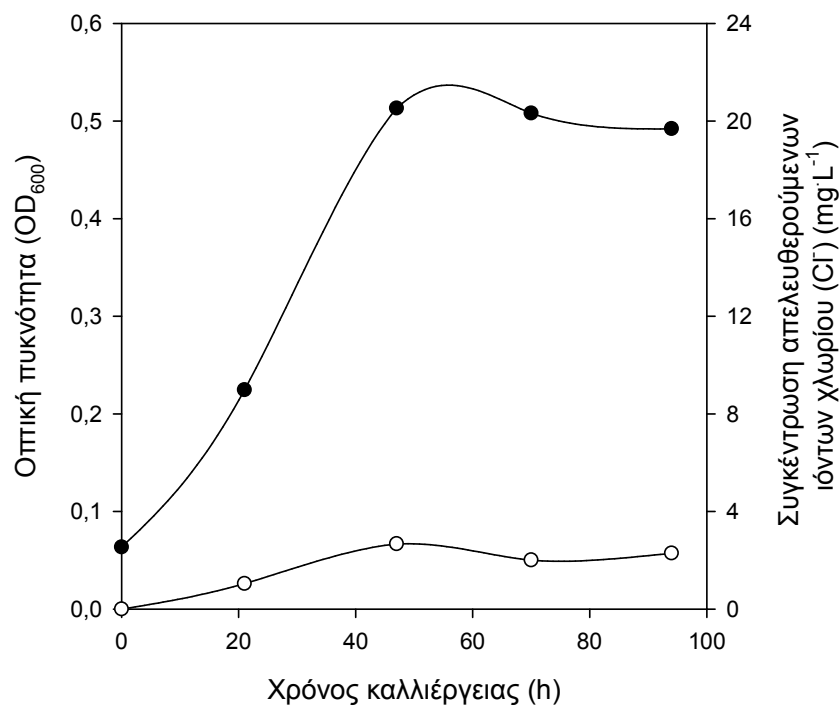
**Διάγραμμα 42:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο MT5. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



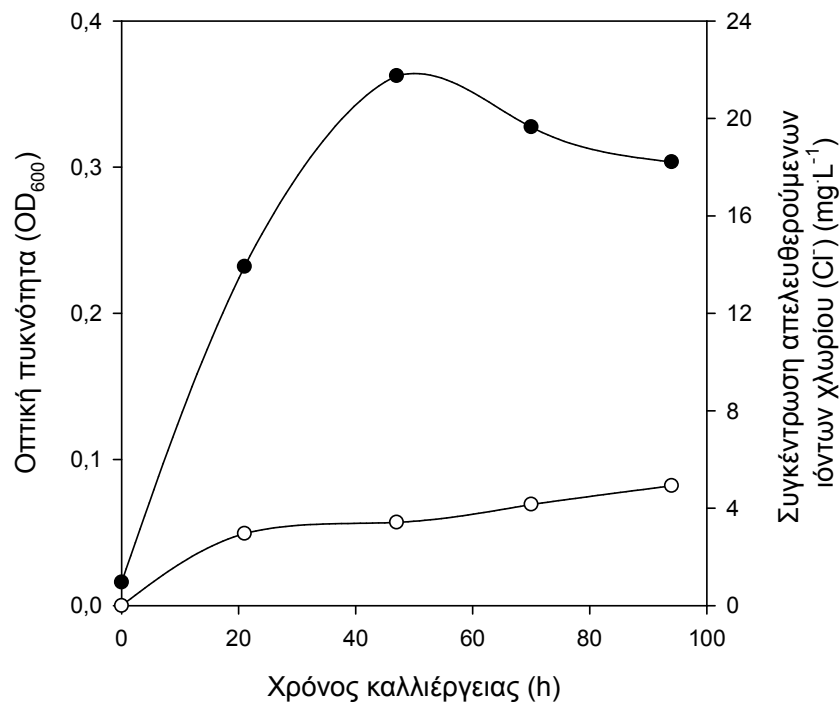
**Διάγραμμα 43:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 2C1. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



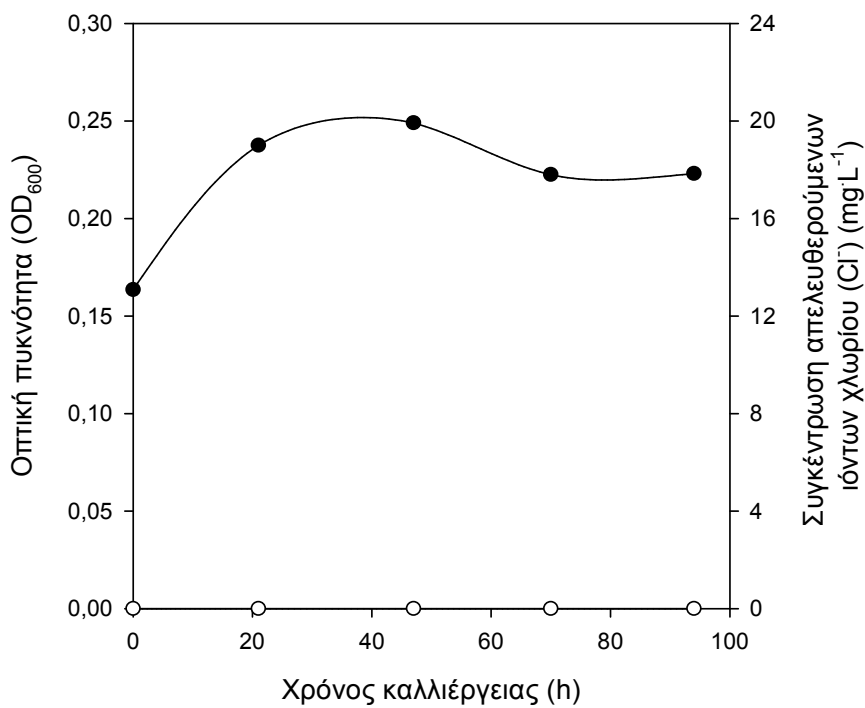
**Διάγραμμα 44:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 1813. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



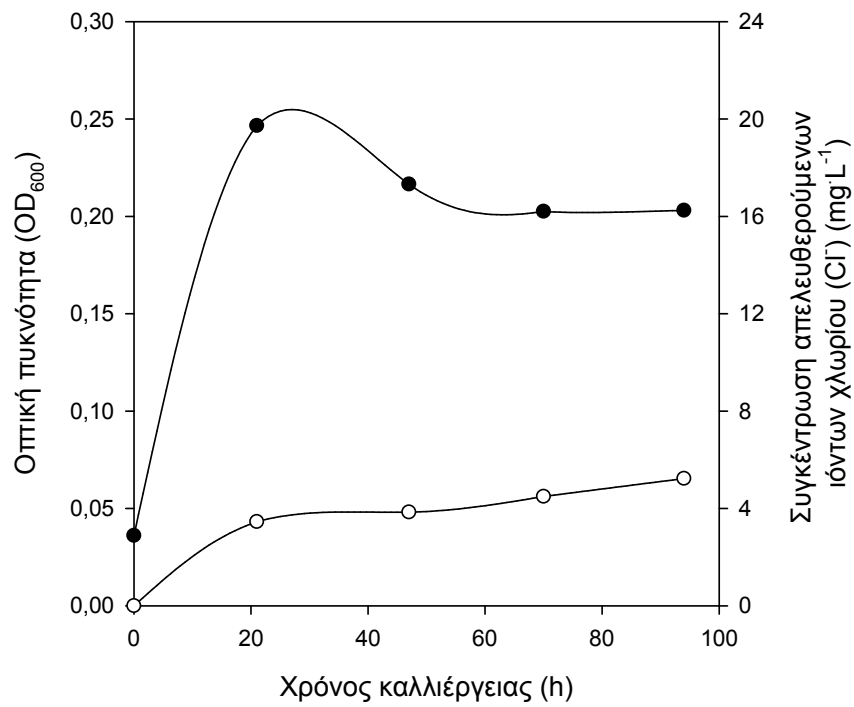
**Διάγραμμα 45:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 815. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



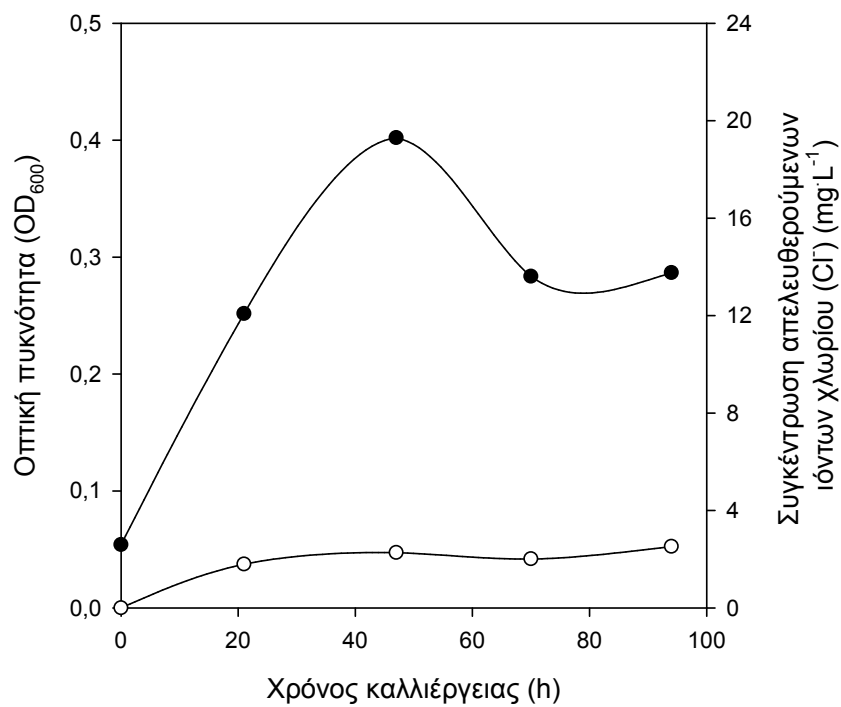
**Διάγραμμα 46:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 189. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



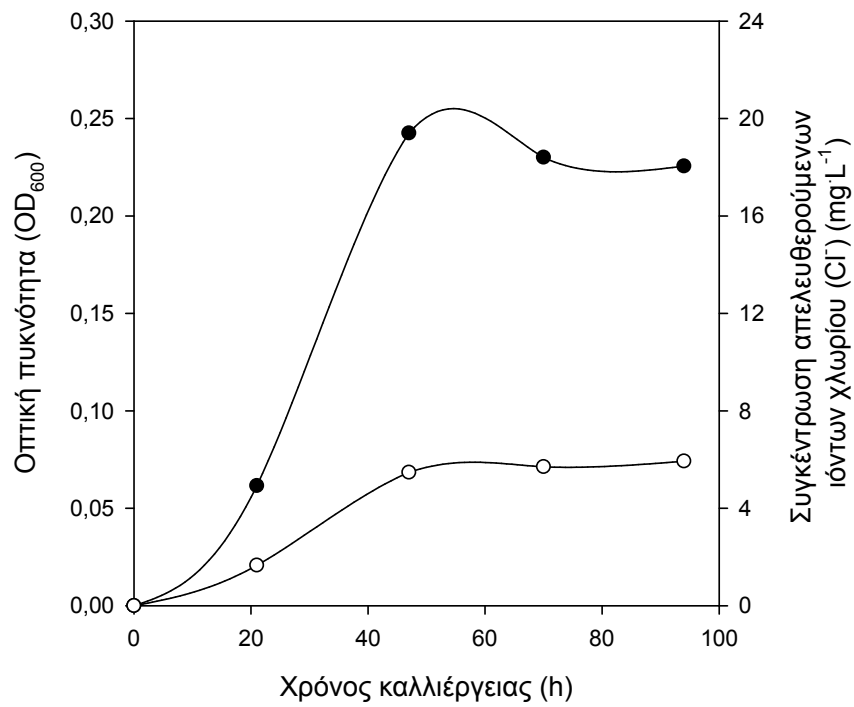
**Διάγραμμα 47:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο MT1. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



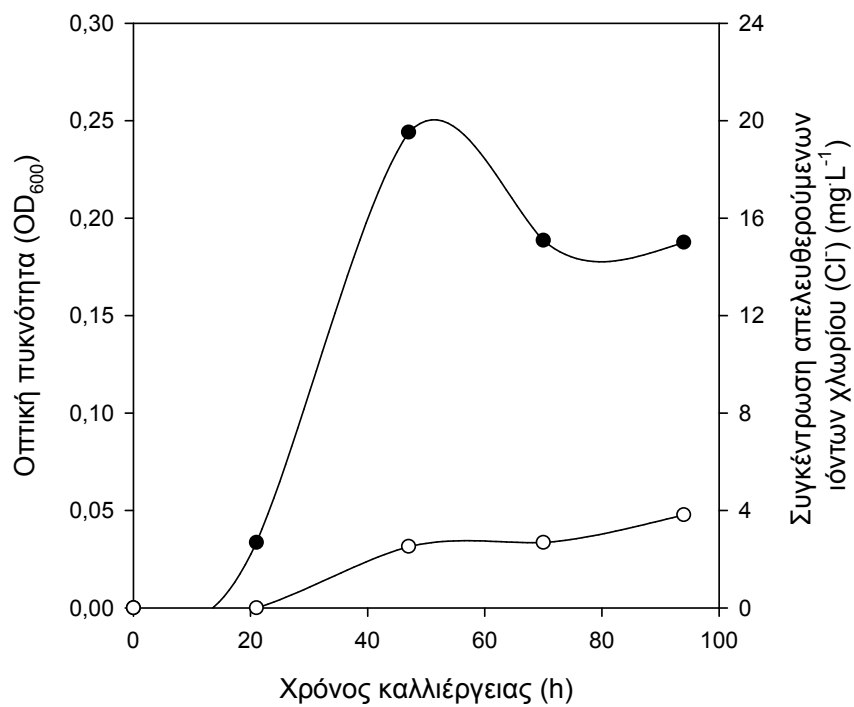
**Διάγραμμα 48:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 1812. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



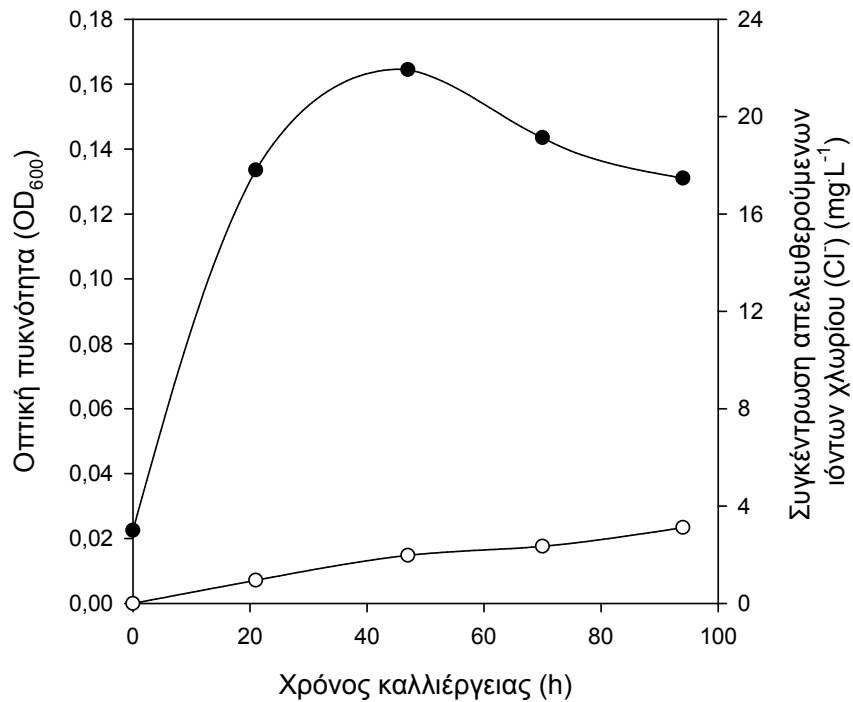
**Διάγραμμα 49:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 1810. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 50:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 968. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 51:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 1181. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 52:** Αποικοδόμηση 100 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 969. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) ιόντα χλωρίου

Όπως παρατηρήθηκε και στην 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη (CPD), η οπτική πυκνότητα στα 600nm που δείχνει την κυτταρική ανάπτυξη, στις περισσότερες περιπτώσεις, και στην 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP) αρχικά αυξάνεται και στη συνέχεια μειώνεται. Στις υπόλοιπες, ο ρυθμός μειώνεται συνεχώς καθώς τα κύτταρα μπορεί να χρησιμοποιούν την αποχλωρίωση για παραγωγή μη γνωστών μεταβολιτών και όχι για την ανάπτυξή τους.

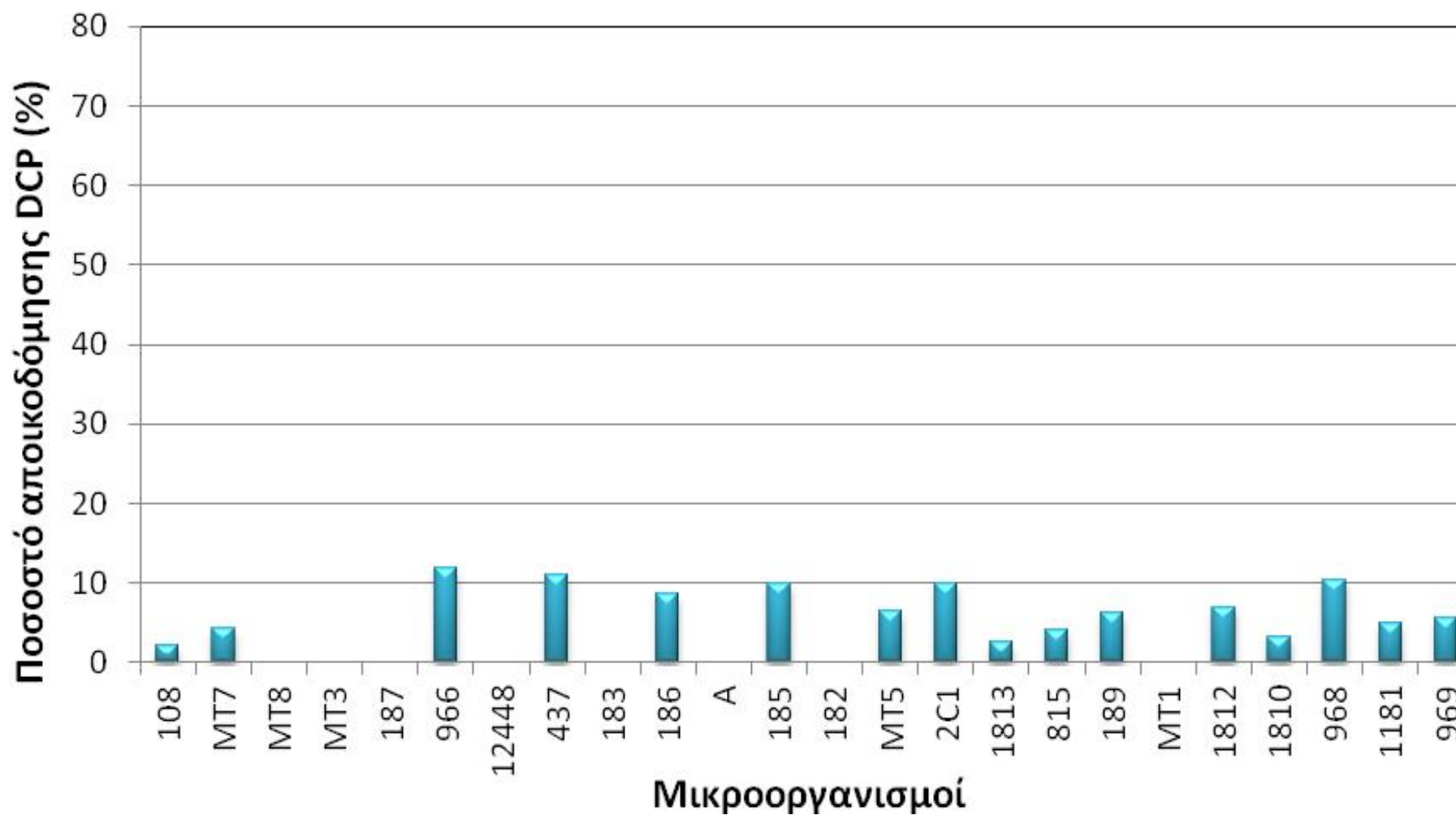
Αντίστοιχα, η συγκέντρωση των απελευθερούμενων ιόντων χλωρίου εμφανίζεται να έχει ανοδική ή σταθερή τάση. Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα αφαλογόνωσης σπάνε τους δεσμούς χλωρίου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ιόντων χλωρίου. Έτσι, ανάλογα με την ανάπτυξη και την ικανότητά τους για αφαλογόνωση απελευθερώνονται και τα αντίστοιχα ιόντα χλωρίου.

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτουν ο πίνακας 12 και το διάγραμμα 53 που δείχνουν συνοπτικά την μέγιστη συγκέντρωση  $\text{Cl}^-$  και το ποσοστό αποικοδόμησης των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν.

**Πίνακας 12:** Συγκεντρωτικός πίνακας αποικοδόμησης  $100 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$  1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) ανά μικροοργανισμό

Στέλεχος	Μέγιστη συγκέντρωση $\text{Cl}^-$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Αποικοδόμηση 1,3-DCP (%)
108	1.21	2.20
MT7	2.42	4.40
MT8	0.00	0.00
MT3	0.00	0.00
187	0.00	0.00
966	6.51	11.85
12448	0.00	0.00
437	6.10	11.10
183	0.00	0.00
186	4.78	8.70
A	0.00	0.00
185	5.46	9.92
182	0.00	0.00
MT5	3.62	6.58
2C1	5.52	10.04
1813	1.46	2.65
815	2.28	4.15
189	3.42	6.22
MT1	0.00	0.00
1812	3.85	7
1810	1.79	3.26
968	5.70	10.37
1181	2.68	4.88
969	3.11	5.66



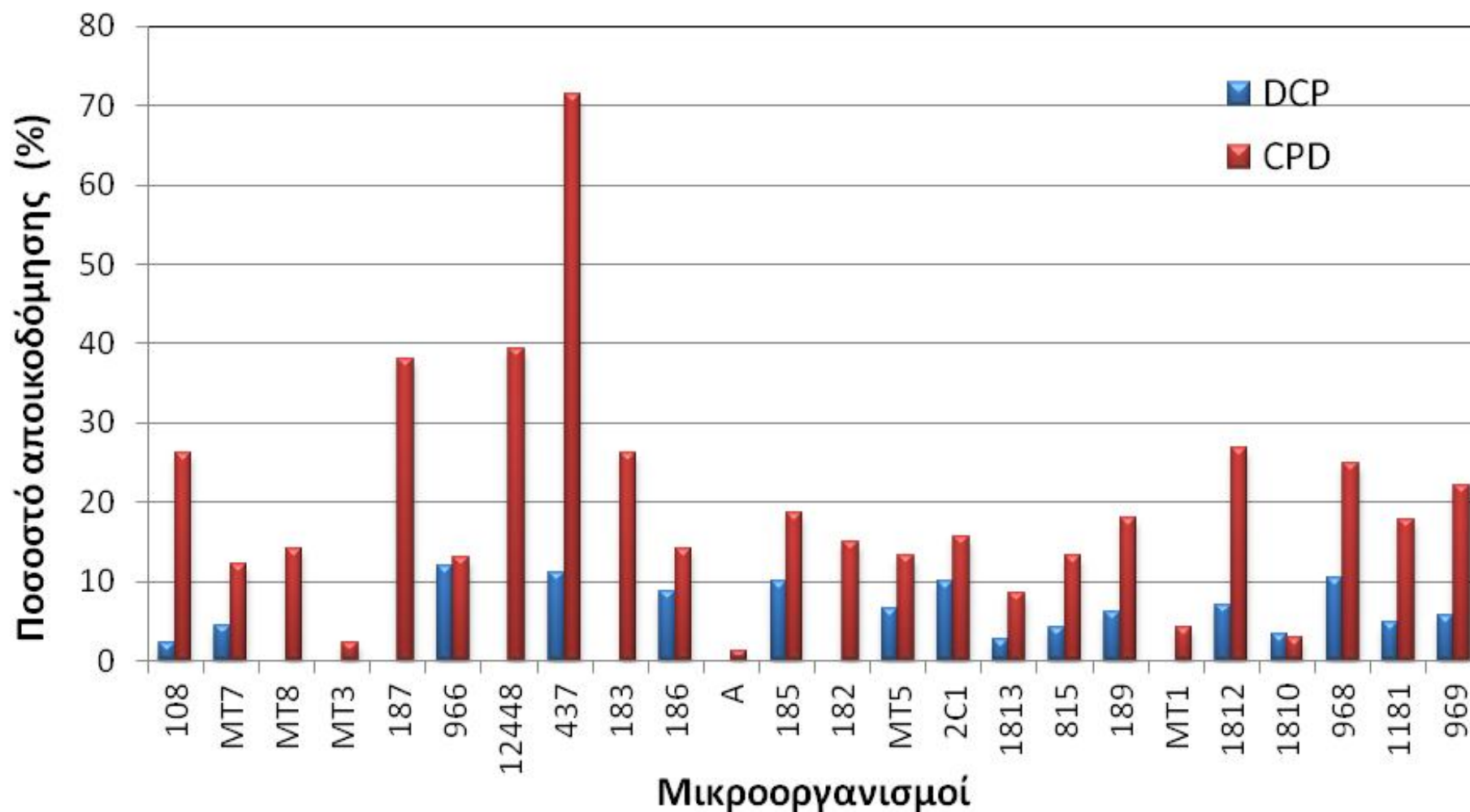


**Διάγραμμα 53:** Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποικοδόμησης  $100 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$  1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) ανά μικροοργανισμό

Συνοψίζοντας τα παραπάνω (Πίνακας 12 και Διάγραμμα 53) οι μικροοργανισμοί με τα υψηλότερα ποσοστά αποικοδόμησης 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) και συγκέντρωσης  $\text{Cl}^-$  είναι η *P. putida* DSM 437 με αποικοδόμηση 11 % και συγκέντρωση απελευθερούμενων  $\text{Cl}^-$   $6 \text{ mg L}^{-1}$  και το βακτήριο 966 με 12 % και  $6.5 \text{ mg L}^{-1}$  αντίστοιχα.

Μελετώντας τα ποσοστά αποικοδόμησης για την κάθε τοξική ουσία, παρατηρείται ότι η 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) αποικοδομείται σε μεγαλύτερο βαθμό έναντι της 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP). Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη ενός χλωρίου στο 3-CPD σε σύγκριση με το 1,3-DCP που το καθιστά λιγότερο σταθερό και επομένως είναι πιο εύκολη η βιοαποικοδόμησή του.

Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 54) υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των μικροοργανισμών όσον αφορά τις τοξικές ουσίες που εξετάστηκαν. Παρατηρείται ότι δεν αποικοδομούν οι ίδιοι μικροοργανισμοί και στον ίδιο βαθμό τις δυο τοξικές ουσίες. Υπάρχει μια κατηγορία μικροοργανισμών που αποικοδομεί μόνο την 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη (CPD) και καθόλου την 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP), όπως είναι τα στελέχη MT3, 187, A, MT1. Ακόμα, υπάρχουν και αυτοί που αποικοδομούν την CPD σε μεγάλο βαθμό και την DCP σε πολύ μικρότερο. Ωστόσο, μερικά βακτηριακά στελέχη με μικρό ποσοστό αποικοδόμησης είναι ικανά να αποικοδομήσουν και τις δυο τοξικές ουσίες στον ίδιο βαθμό.



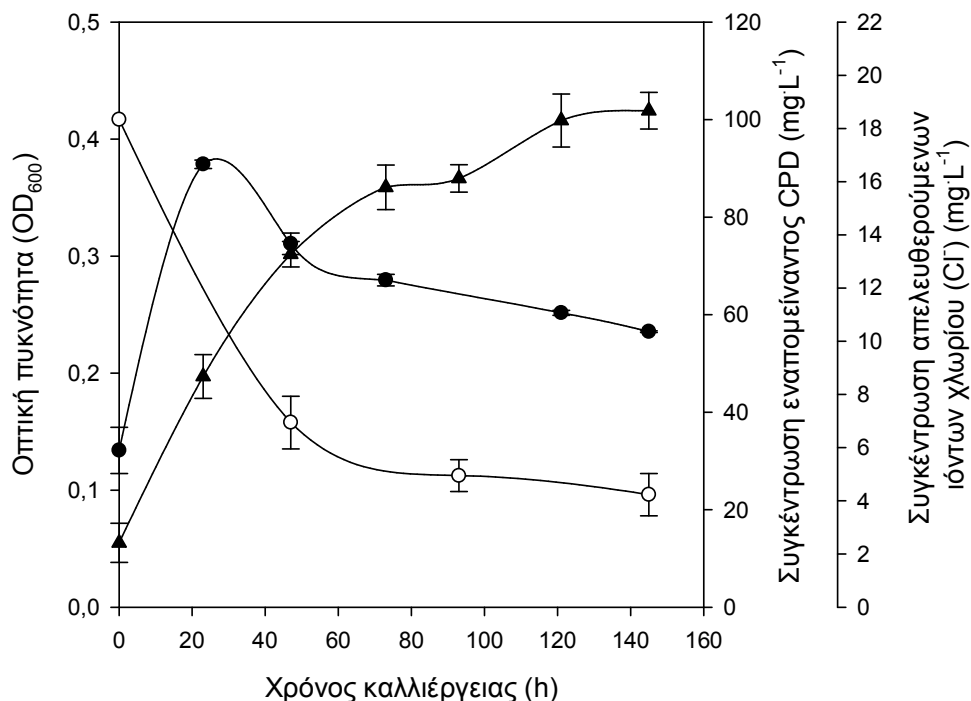
**Διάγραμμα 54:** Συγκεντρικό διάγραμμα αποικοδόμησης της 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) και 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) ανά μικροοργανισμό στα 100 (mg·L<sup>-1</sup>)

### 3. Ανθεκτικότητα μικροοργανισμών

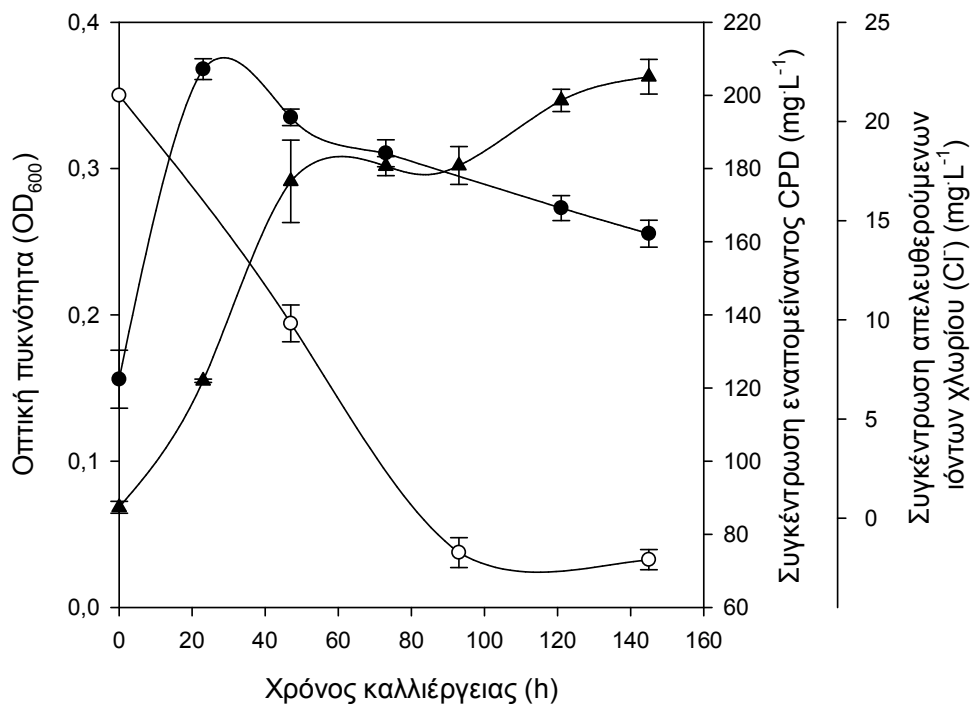
Τέλος, εξετάστηκε η ανθεκτικότητα των δυο αποδοτικότερων ως προς την αποικοδόμηση της κάθε ένωσης μικροοργανισμών (με βάση τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες με διαφορετικές συγκεντρώσεις της εκάστοτε ένωσης (100, 200, 300, 400 και 500 ppm). Στα δείγματα που λαμβάνονταν, μετρήθηκαν η οπτική πυκνότητα στα 600 nm, η απελευθέρωση χλωριόντων και η εναπομείνασα CPD ή DCP, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο.

#### 3.1 Ανθεκτικότητα στην 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη (CPD)

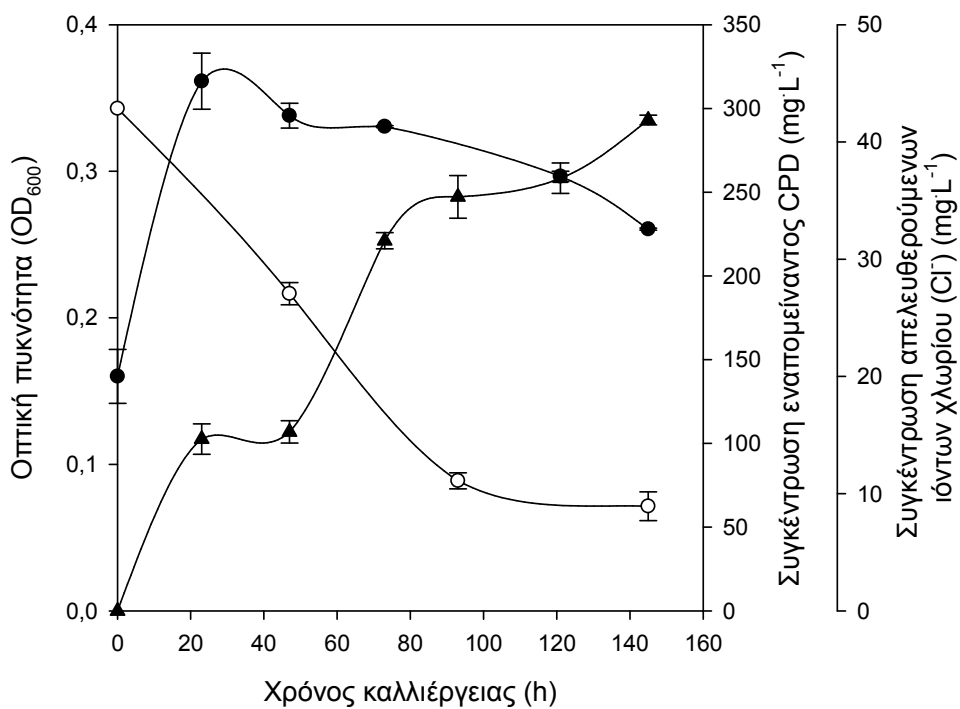
Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) για το βακτήριο *Pseudomonas putida* DSM 437 :



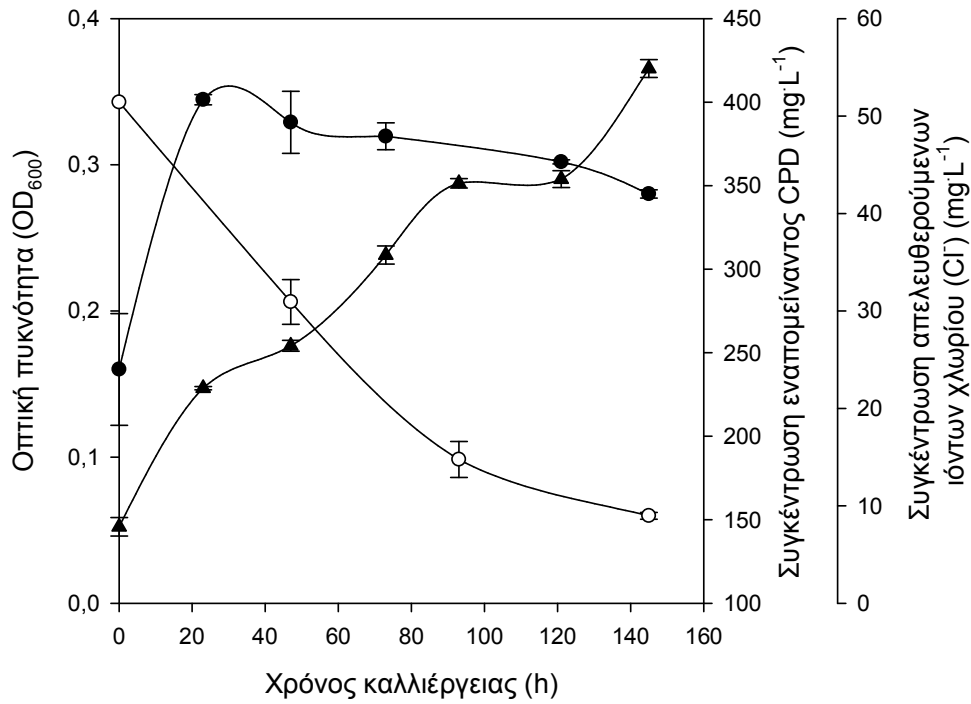
**Διάγραμμα 55:** Αποικοδόμηση  $100\ (mg\ L^{-1})$  3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο *P. putida* DSM 437. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα ( $OD_{600}$ ), (○) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη και (▲) ιόντα χλωρίου



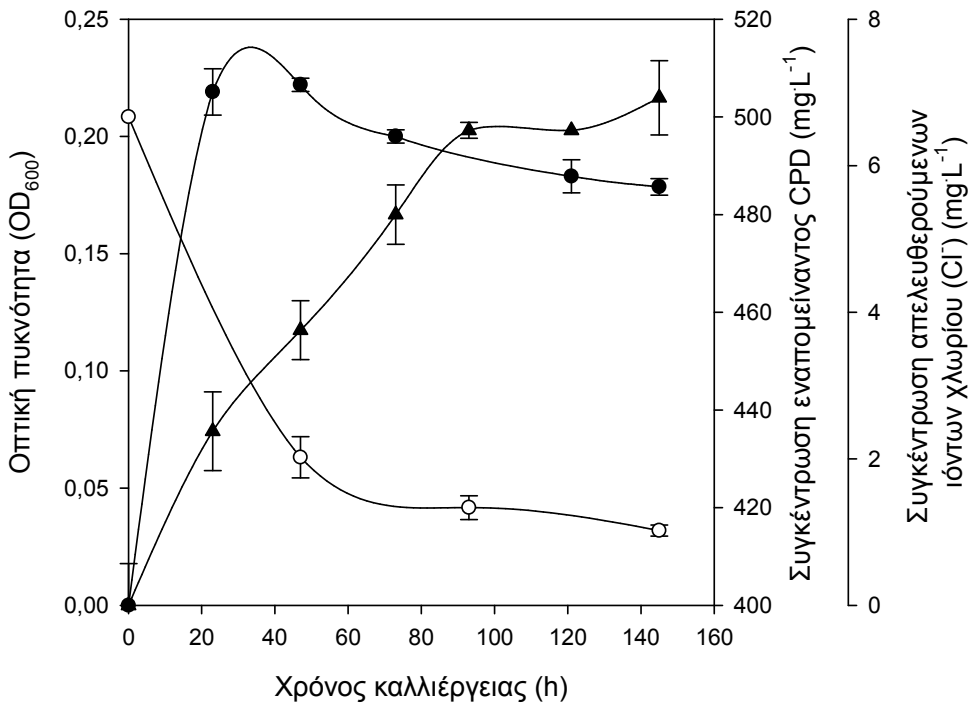
**Διάγραμμα 56:** Αποικοδόμηση 200 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο *P. putida* DSM 437. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα ( $\text{OD}_{600}$ ), (○) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη και (▲) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 57:** Αποικοδόμηση 300 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο *P. putida* DSM 437. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα ( $\text{OD}_{600}$ ), (○) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη και (▲) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 58:** Αποικοδόμηση 400 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο *P. putida* DSM 437. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη και (▲) ιόντα χλωρίου



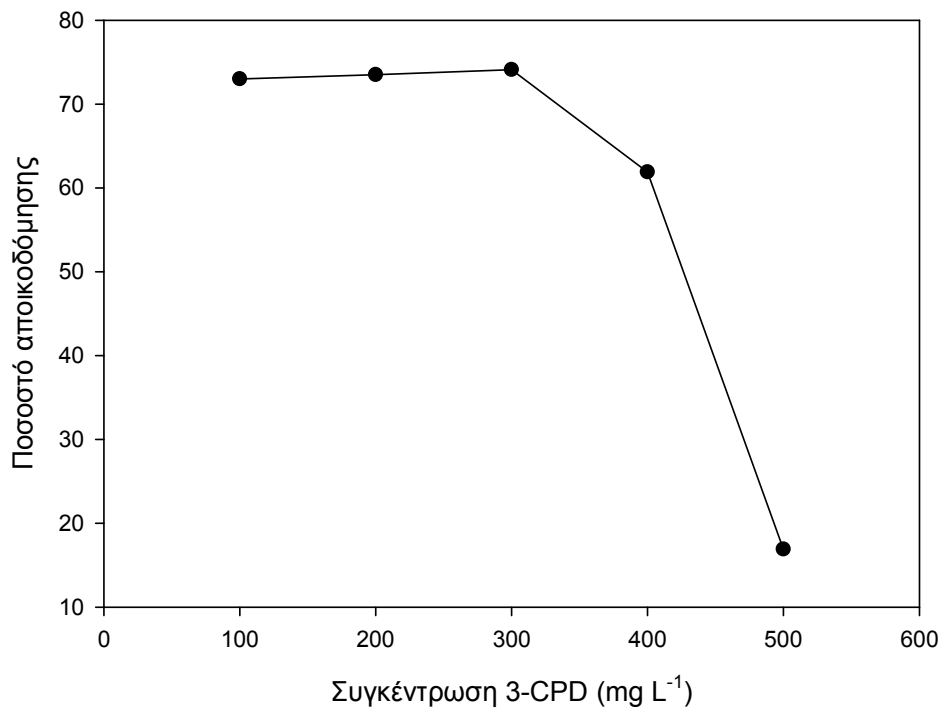
**Διάγραμμα 59:** Αποικοδόμηση 500 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο *P. putida* DSM 437. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη και (▲) ιόντα χλωρίου

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι η οπτική πυκνότητα που δείχνει την κυτταρική ανάπτυξη του βακτηρίου *P. putida* DSM 437 σε όλες τις υπό εξέταση συγκεντρώσεις αρχικά αυξάνεται μέχρι τις 40 h περίπου και στη συνέχεια μειώνεται.

Ακόμα, παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της εναπομείνουσας 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης (3-CPD) συνεχώς μειώνεται και αντίστοιχα η απελευθέρωση ιόντων χλωρίου συνεχώς αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει διότι το βακτήριο *P. putida* DSM 437 που χρησιμοποιήθηκε έχει την ικανότητα να σπάει του δεσμούς χλωρίου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ιόντων χλωρίου και κατ' επέκταση την δημιουργία μη τοξικών ενώσεων.

Ωστόσο, το βακτήριο *P. putida* DSM 437 δεν έχει την ικανότητα να αποικοδομεί την 3-CPD στον ίδιο βαθμό σε όλες τις συγκεντρώσεις. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 60 για συγκεντρώσεις από 100 μέχρι 300 mg L<sup>-1</sup> ο βαθμός αποικοδόμησης είναι περίπου 70 %, ενώ στη συνέχεια παρατηρείται σταδιακή μείωση που φτάνει το 16 % στα 500 mg L<sup>-1</sup>.

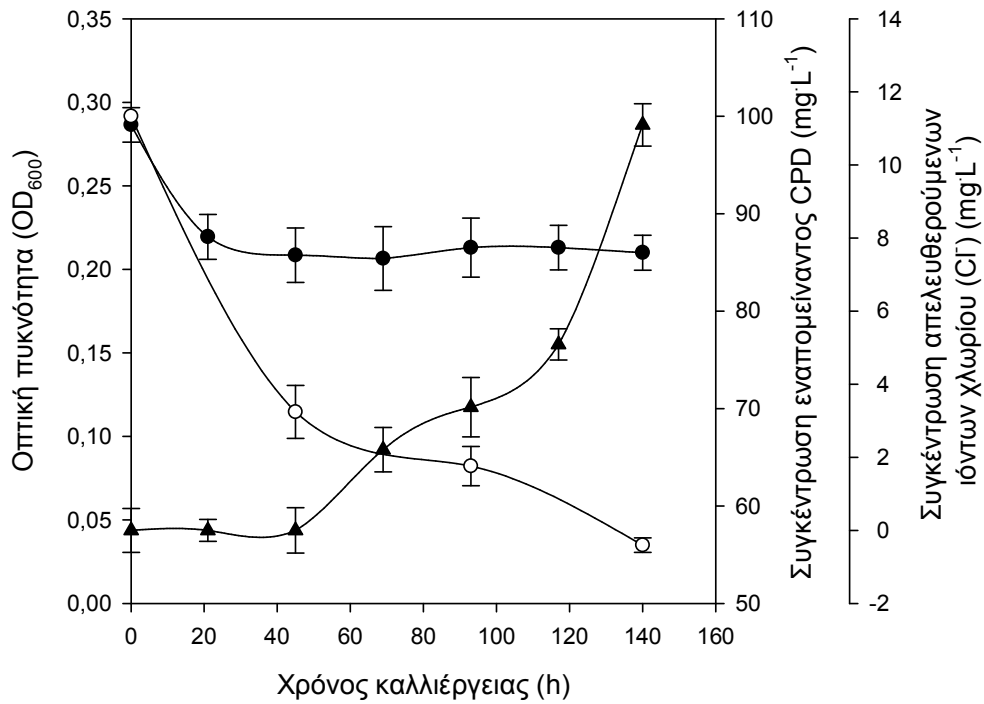
Επομένως, προκύπτει ότι το βακτήριο *P. putida* DSM 437 στις συγκεντρώσεις μέχρι 400 mg L<sup>-1</sup> παρουσιάζει μεγάλα ποσοστά αποικοδόμησης, δηλαδή η ανθεκτικότητά του στις συγκεντρώσεις αυτές είναι ιδιαίτερα υψηλή.



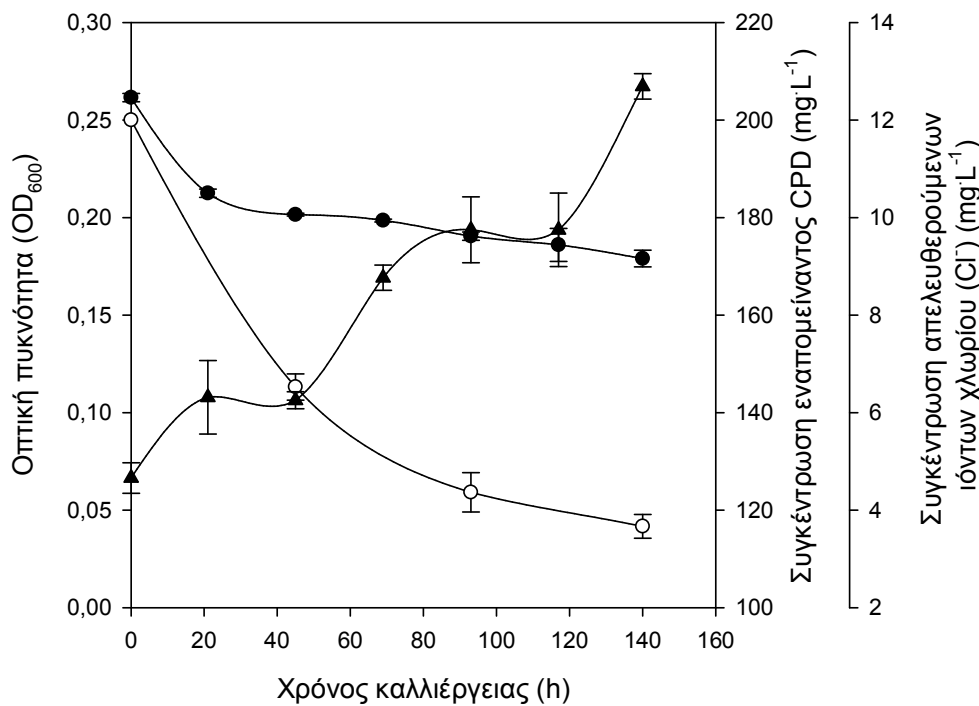
**Διάγραμμα 60:** Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποικοδόμησης της 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) στις συγκεντρώσεις 100 – 500 mg L<sup>-1</sup> από το βακτήριο *P. putida* DSM 437



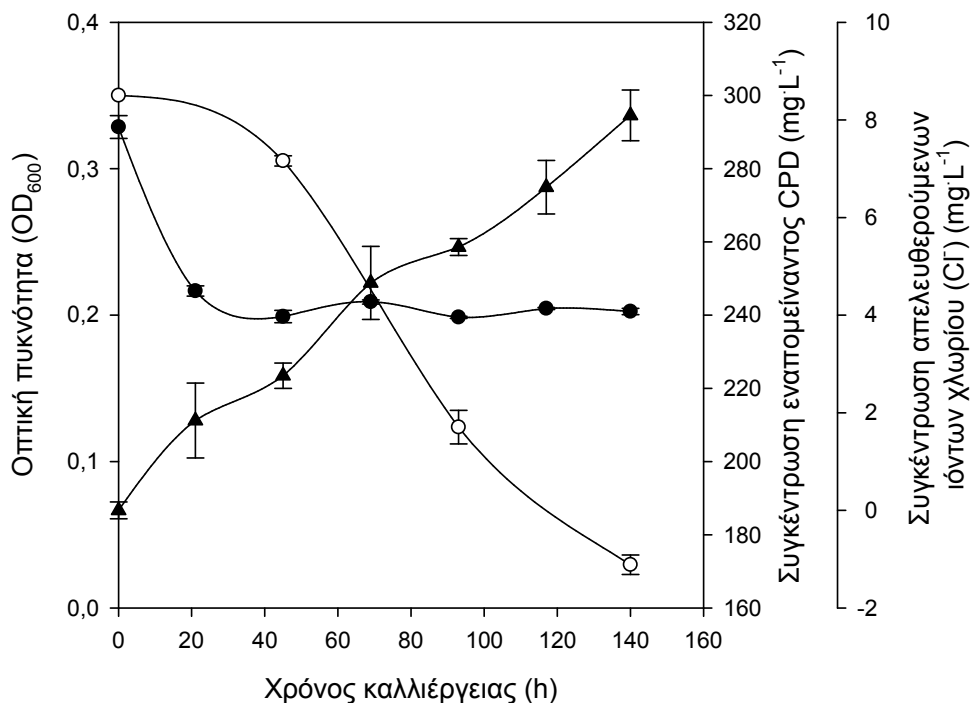
Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) για το βακτήριο *P. putida* DSM 12448 :



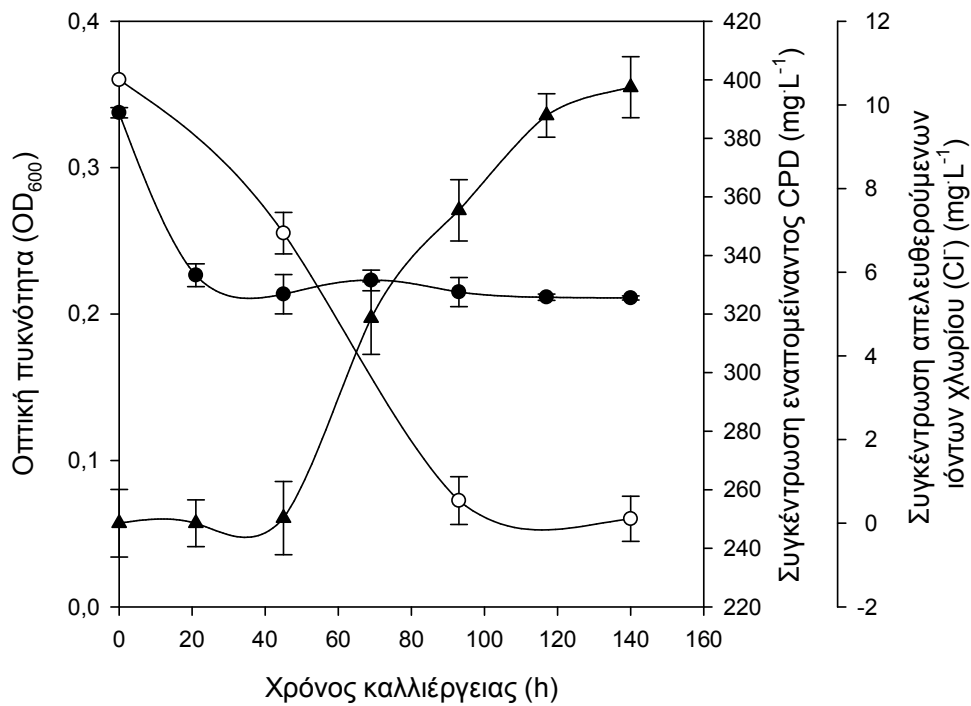
**Διάγραμμα 61:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 12448. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη και (▲) ιόντα χλωρίου



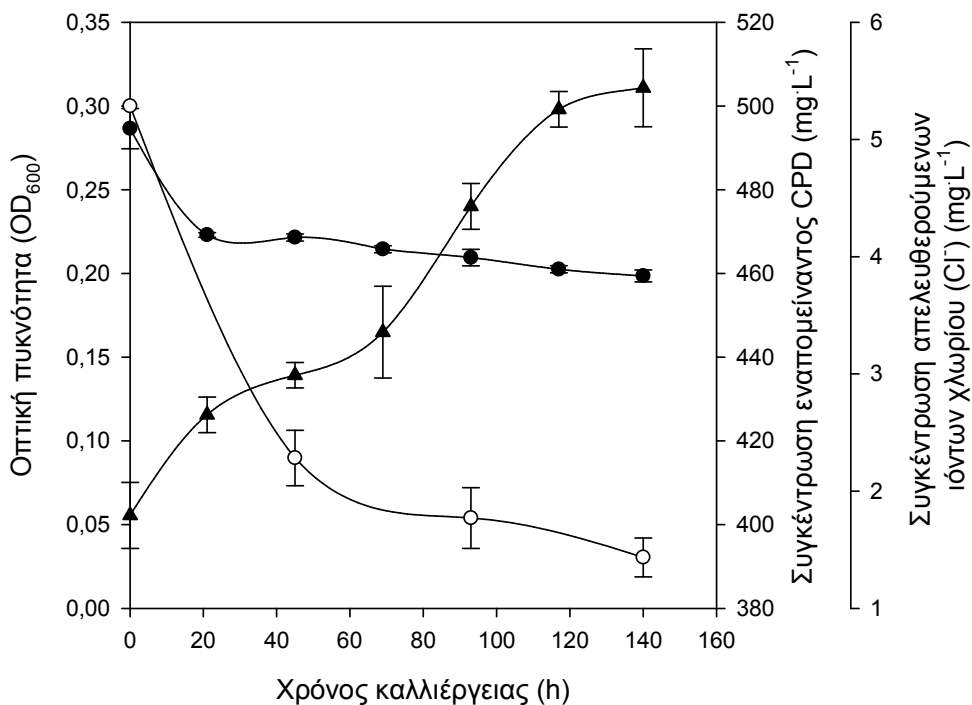
**Διάγραμμα 62:** Αποικοδόμηση 200 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 12448. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα ( $\text{OD}_{600}$ ), (○) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη και (▲) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 63:** Αποικοδόμηση 300 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 12448. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα ( $\text{OD}_{600}$ ), (○) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη και (▲) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 64:** Αποικοδόμηση 400 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 12448. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη και (▲) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 65:** Αποικοδόμηση 500 (mg·L<sup>-1</sup>) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) από το βακτήριο 12448. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλη και (▲) ιόντα χλωρίου

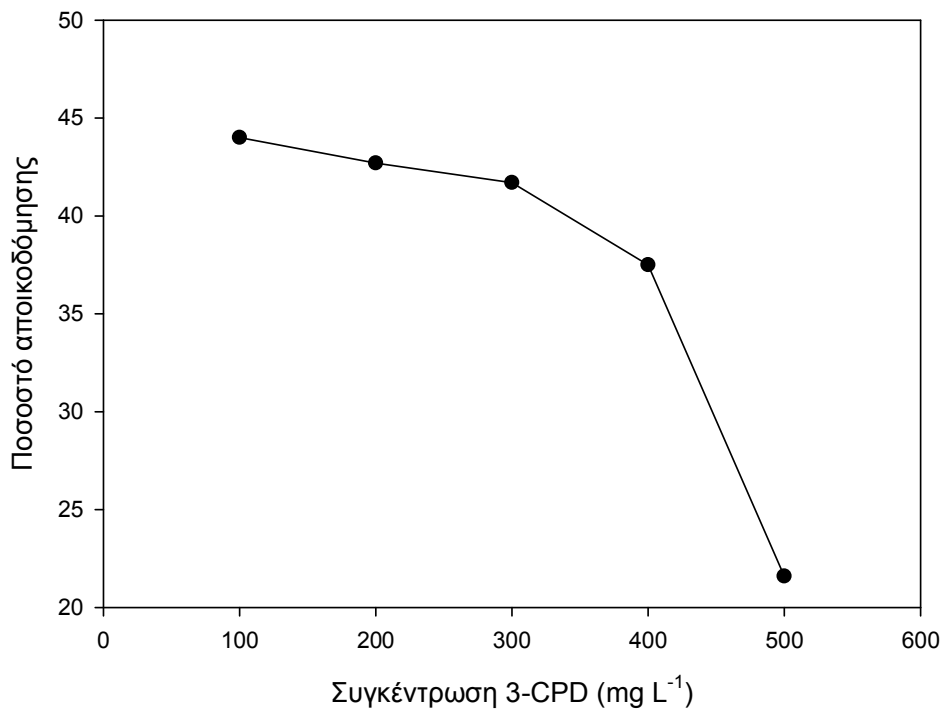
Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι η οπτική πυκνότητα που δείχνει την κυτταρική ανάπτυξη του βακτηρίου *P. putida* DSM 12448 σε όλες τις υπό εξέταση συγκεντρώσεις μειώνεται αισθητά μέχρι τις 20 h και στη συνέχεια μειώνεται με μικρότερο ρυθμό.

Ακόμα, παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της εναπομείνουσας 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης (3-CPD) συνεχώς μειώνεται και αντίστοιχα η απελευθέρωση ιόντων χλωρίου συνεχώς αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει διότι το βακτήριο *P. putida* DSM 12448 που χρησιμοποιήθηκε έχει την ικανότητα να σπάει του δεσμούς χλωρίου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ιόντων χλωρίου και την δημιουργία μη τοξικών ενώσεων.

Όμως, συγκρίνοντας την ανάπτυξη με την βιοαποικοδόμηση για το *P. putida* DSM 12448 παρατηρείται ότι το βακτήριο αυτό παρόλο που δεν αναπτύσσεται παρουσία 3-CPD την αποικοδομεί. Δεν παρατηρείται, δηλαδή, αφομοίωση της 3-CPD σε βιομάζα και ενδεχομένως ο ανθρακικός σκελετός που προκύπτει από την αποχλωρίωση του μορίου χρησιμοποιείται για την παραγωγή μεταβολιτών που έως τώρα δεν είναι γνωστοί.

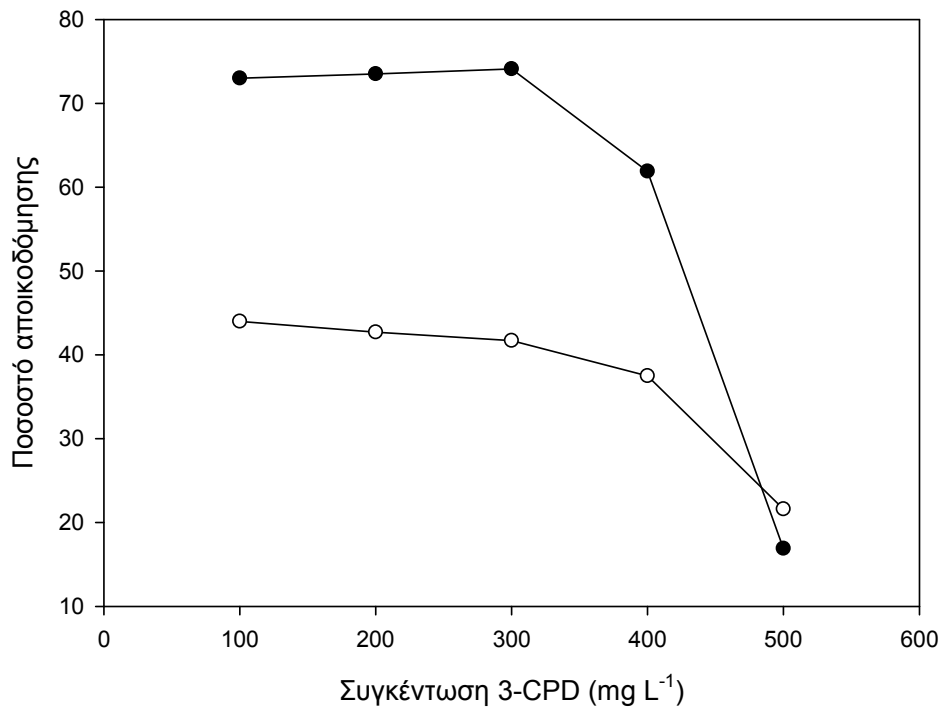
Ωστόσο, το βακτήριο *P. putida* DSM 12448 δεν έχει την ικανότητα να αποικοδομεί την 3-CPD στον ίδιο βαθμό σε όλες τις συγκεντρώσεις. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 66 για συγκεντρώσεις από 100 μέχρι 300 mg L<sup>-1</sup> ο βαθμός αποικοδόμησης είναι περίπου 40 %, ενώ στη συνέχεια παρατηρείται σταδιακή μείωση που φτάνει το 21 % στα 500 mg L<sup>-1</sup>.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το βακτήριο *P. putida* DSM 12448 εμφανίζει καλές τιμές βιοαποικοδόμησης μέχρι τα 300 mg L<sup>-1</sup> και αντίστοιχα καλή ανθεκτικότητα σε αυτές τις συγκεντρώσεις.



**Διάγραμμα 66:** Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποικοδόμησης της 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) στις συγκεντρώσεις 100 – 500 mg L<sup>-1</sup> από το βακτήριο *P. putida* DSM 12448

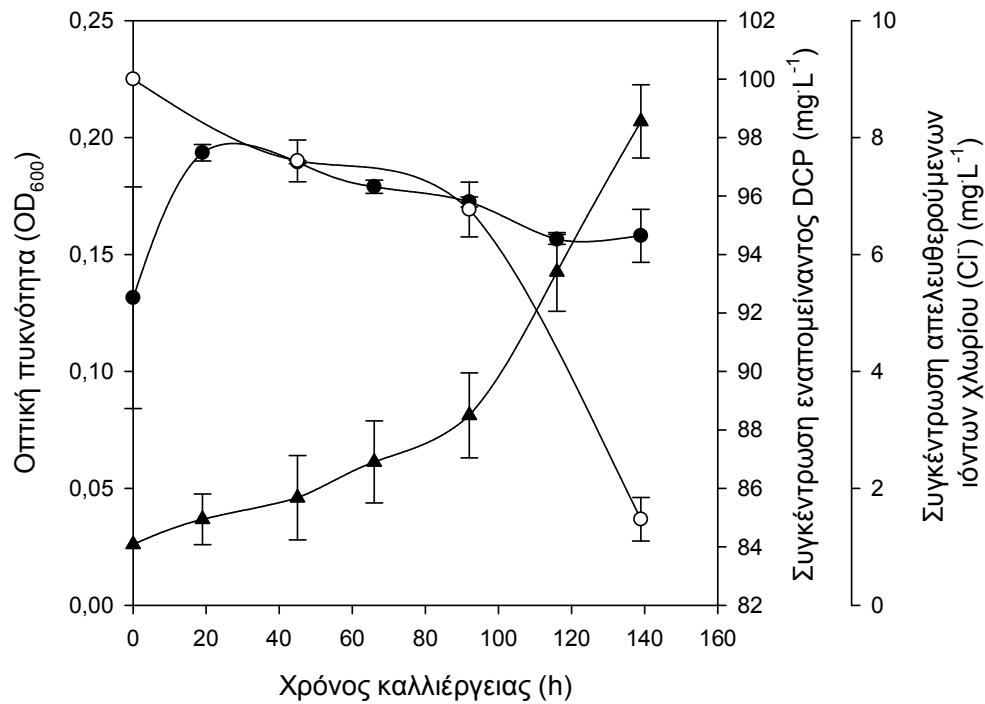
Στο Διάγραμμα 67 απεικονίζονται τα ποσοστά αποικοδόμησης της 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης από τα βακτήρια *P. putida* DSM 437 και 12448 στις συγκεντρώσεις από 100 έως 500 mg L<sup>-1</sup>. Παρατηρείται ότι το *P. putida* DSM 437 εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά αποικοδόμησης σε σύγκριση με το *P. putida* DSM 12448 για τις συγκεντρώσεις μέχρι 300 mg L<sup>-1</sup>. Ωστόσο, τα 500 mg L<sup>-1</sup> CPD φαίνεται να υπερβαίνουν την ανθεκτικότητά και των δύο μελετηθέντων και τα αντίστοιχα ποσοστά αποικοδόμησης είναι μηδενικά.



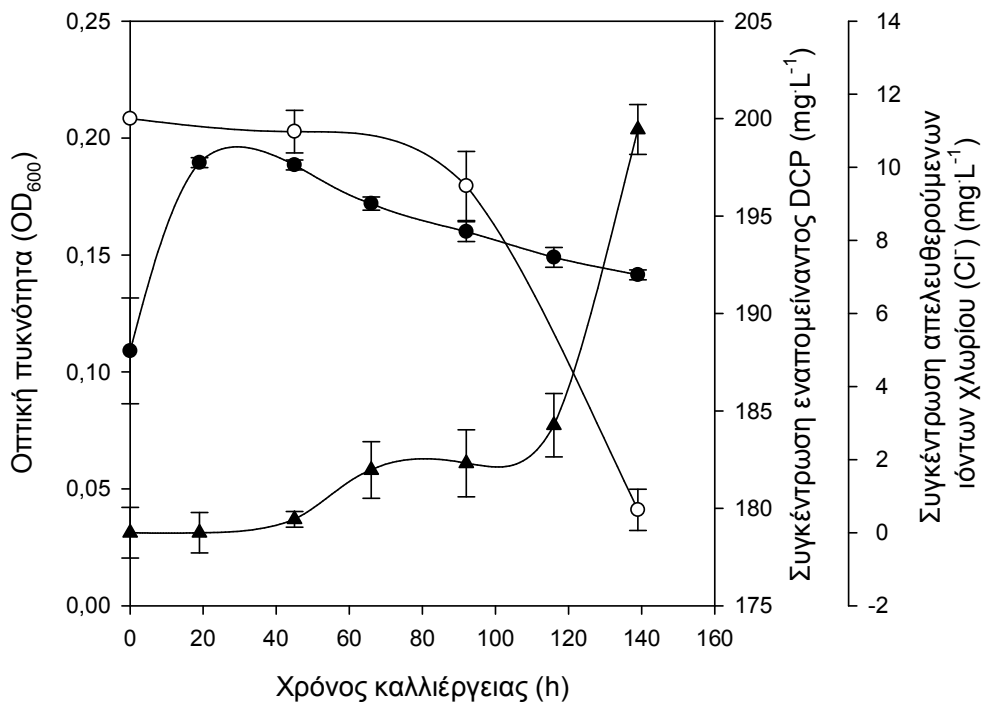
**Διάγραμμα 67:** Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποικοδόμησης της 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) στις συγκεντρώσεις 100 – 500 mg L<sup>-1</sup> από το βακτήριο *P. putida* DSM 437 και 12448 Σύμβολα: (●) βακτήριο *P. putida* DSM 437 , (○) βακτήριο *P. putida* DSM 12448

### 3.2 Ανθεκτικότητα στην 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP)

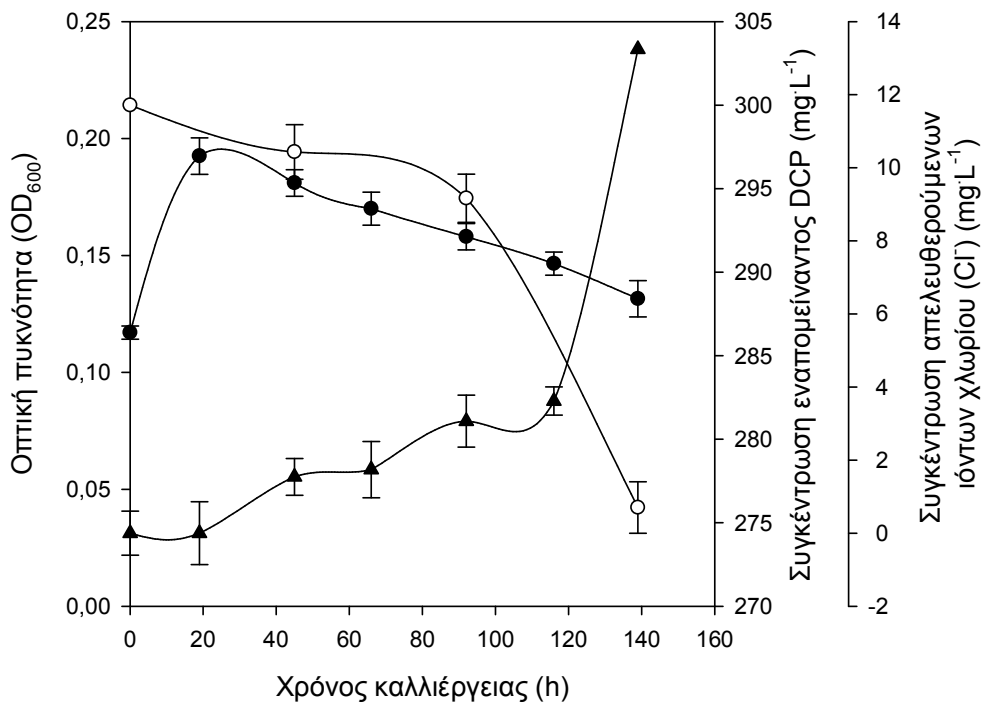
Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) για το βακτήριο *P. putida* DSM 437 :



**Διάγραμμα 68:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο *P. putida* DSM 437. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP) και (▲) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 69:** Αποικοδόμηση 200 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο *P. putida* DSM 437. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP) και (▲) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 70:** Αποικοδόμηση 300 (mg·L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο *P. putida* DSM 437. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP) και (▲) ιόντα χλωρίου



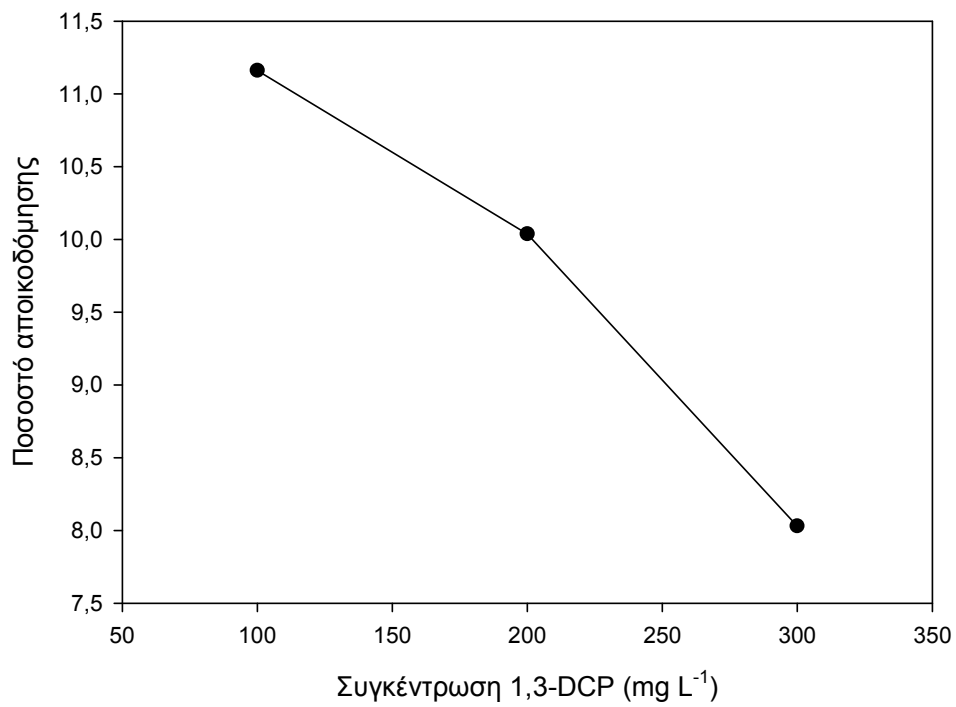
Τα διαγράμματα των συγκεντρώσεων 400 και 500 mg L<sup>-1</sup> 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) για το βακτήριο *P. putida* DSM 437 δεν παραθέτονται, διότι τα ποσοστά αποικοδόμησης ήταν μηδενικά.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι η οπτική πυκνότητα που δείχνει την κυτταρική ανάπτυξη του βακτηρίου *P. putida* DSM 437 σε όλες τις υπό εξέταση συγκεντρώσεις αρχικά αυξάνεται μέχρι τις 20 h περίπου και στη συνέχεια μειώνεται.

Ακόμα, παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της εναπομείνουσας 1,3-χλωρο-2-προπανόλης (1,3-DCP) συνεχώς μειώνεται και αντίστοιχα η απελευθέρωση ιόντων χλωρίου συνεχώς αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει διότι το βακτήριο *P. putida* DSM 437 που χρησιμοποιήθηκε έχει την ικανότητα να σπάει του δεσμούς χλωρίου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ιόντων χλωρίου και κατ' επέκταση την δημιουργία μη τοξικών ενώσεων.

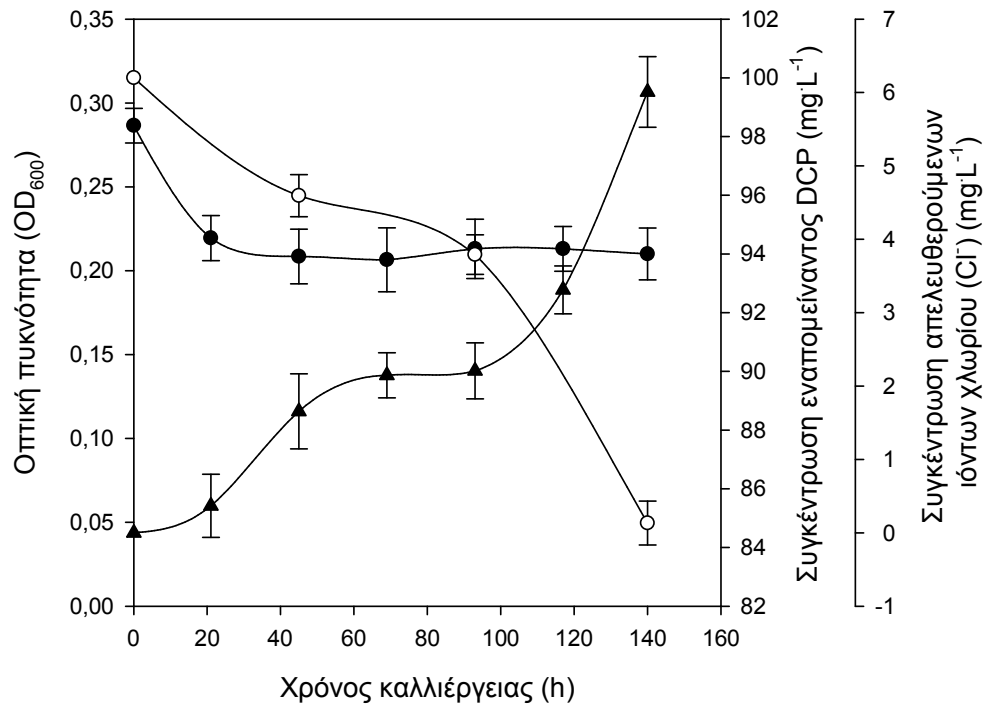
Ωστόσο, το βακτήριο *P. putida* DSM 437 δεν έχει την ικανότητα να αποικοδομεί την 1,3-DCP στον ίδιο βαθμό σε όλες τις συγκεντρώσεις. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 71 για συγκέντρωση 100 mg L<sup>-1</sup> η βιοαποικοδόμηση είναι της τάξης του 11 % και μειώνεται συνεχώς. Στα 400 mg L<sup>-1</sup> το ποσοστό έχει μηδενιστεί πλήρως.

Επομένως, προκύπτει ότι το βακτήριο *P. putida* DSM 437 στις συγκεντρώσεις μέχρι 300 mg L<sup>-1</sup> 1,3-DCP παρουσιάζει κάποιο μικρό ποσοστό αποικοδόμησης και έχει μια μικρή ανθεκτικότητα στις συγκεντρώσεις αυτές.

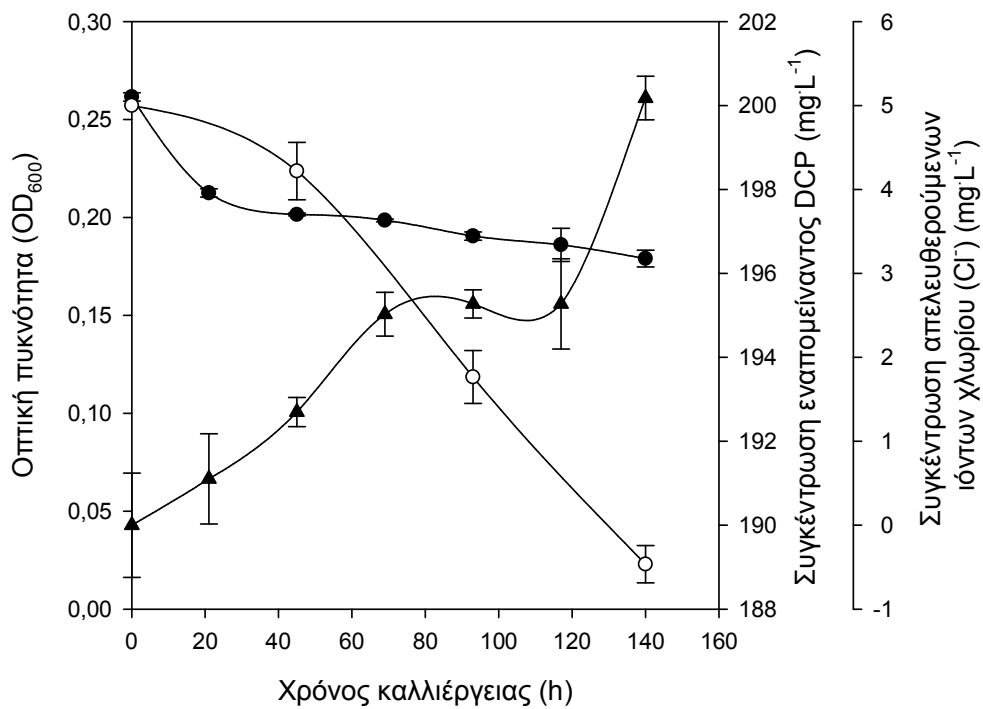


**Διάγραμμα 71:** Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποικοδόμησης της 1,3-διχλωρο-2 - προπανόλης (DCP) στις συγκεντρώσεις 100 – 300 mg L<sup>-1</sup> από το βακτήριο *P. putida* DSM 437

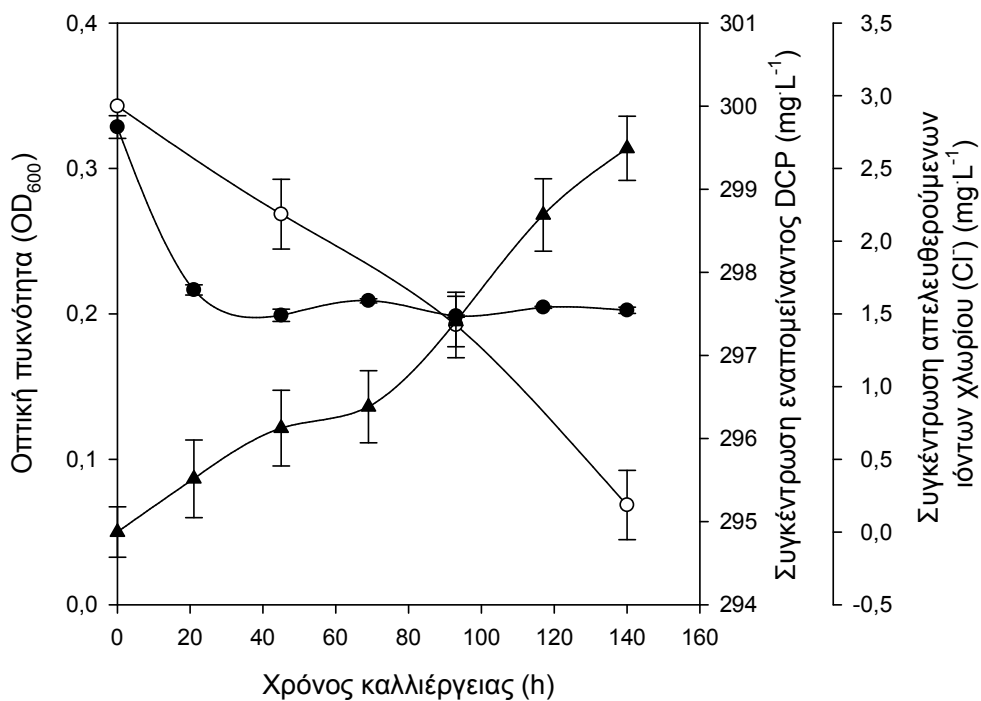
Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) για το στέλεχος 966 :



**Διάγραμμα 72:** Αποικοδόμηση 100 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 966. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP) και (▲) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 73.** Αποικοδόμηση 200 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 966. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP) και (▲) ιόντα χλωρίου



**Διάγραμμα 74:** Αποικοδόμηση 300 (mg L<sup>-1</sup>) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) από το βακτήριο 966. Σύμβολα: (●) οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), (○) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP) και (▲) ιόντα χλωρίου

Τα διαγράμματα των συγκεντρώσεων 400 και 500 mg L<sup>-1</sup> 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) για το βακτήριο 966 δεν παρατίθενται, διότι τα ποσοστά αποικοδόμησης ήταν μηδενικά.

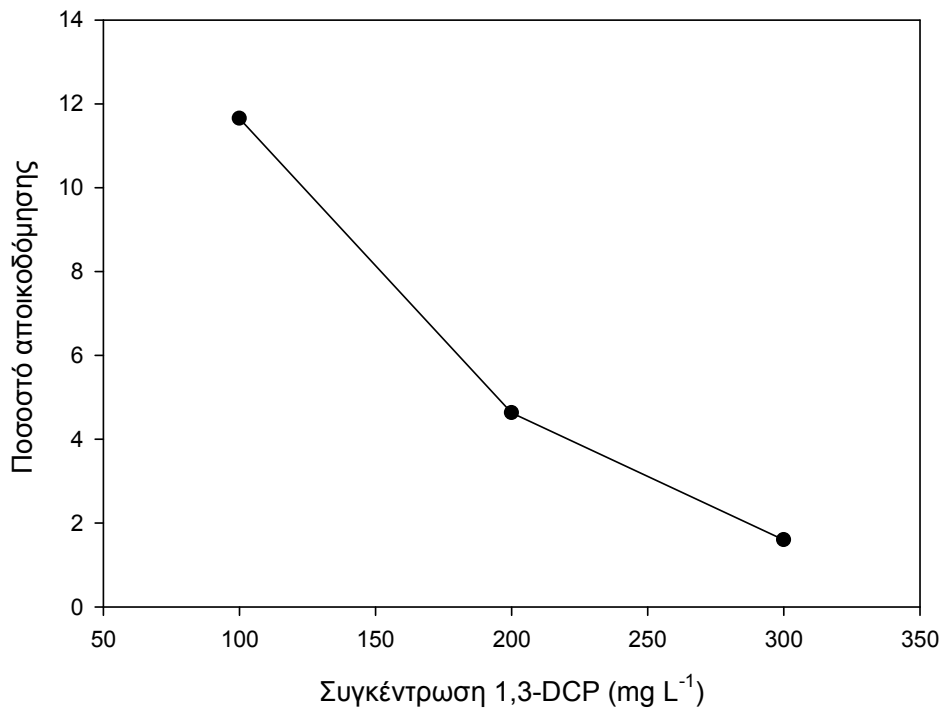
Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι η οπτική πυκνότητα που δείχνει την κυτταρική ανάπτυξη του βακτηρίου 966 σε όλες τις υπό εξέταση συγκεντρώσεις μειώνεται αισθητά μέχρι τις 20 h και στη συνέχεια μειώνεται με μικρότερο ρυθμό.

Ακόμα, παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της εναπομείνουσας 1,3-χλωρο-2-προπανόλης (1,3-DCP) συνεχώς μειώνεται και αντίστοιχα η απελευθέρωση ιόντων χλωρίου συνεχώς αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει διότι το βακτήριο 966 που χρησιμοποιήθηκε έχει την ικανότητα να σπάει του δεσμούς χλωρίου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ιόντων χλωρίου και κατεπέκταση την δημιουργία μη τοξικών ενώσεων.

Όμως, συγκρίνοντας την ανάπτυξη με την βιοαποικοδόμηση για το βακτήριο 966 παρατηρείται ότι το βακτήριο αυτό παρόλο που δεν αναπτύσσεται καταναλώνοντας 1,3-DCP την αποικοδομεί σε κάποιο βαθμό. Δεν παρατηρείται, δηλαδή, αφομοίωση της 1,3-DCP σε βιομάζα και ενδεχομένως ο ανθρακικός σκελετός που προκύπτει από την αποχλωρίωση του μορίου χρησιμοποιείται για την παραγωγή μεταβολιτών που έως τώρα δεν είναι γνωστοί.

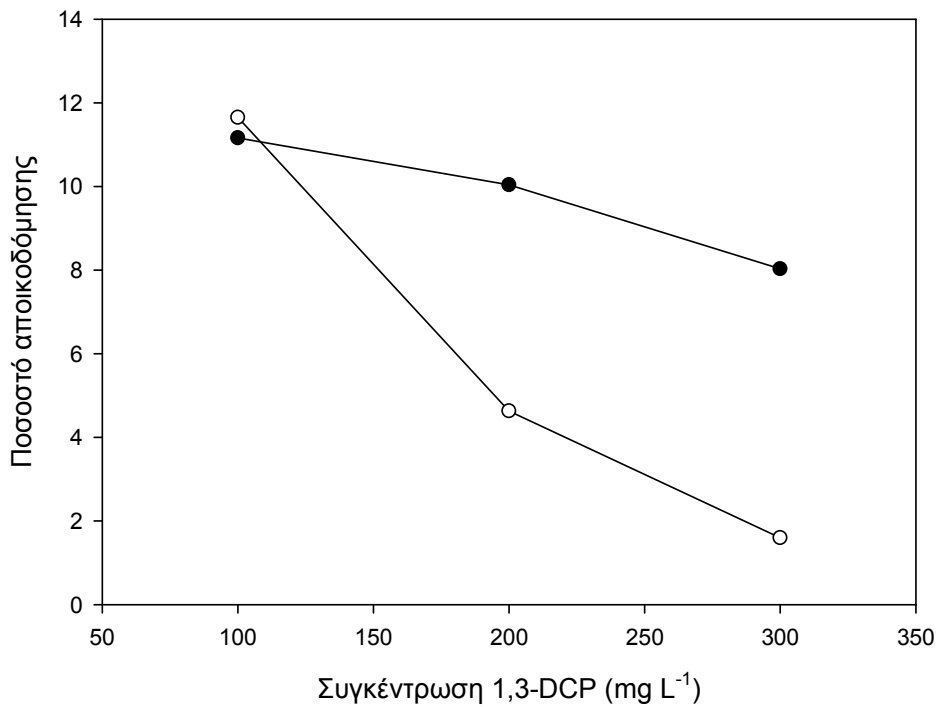
Ωστόσο, το βακτήριο 966 δεν έχει την ικανότητα να αποικοδομεί την 1,3-DCP στον ίδιο βαθμό σε όλες τις συγκεντρώσεις. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 75 για συγκέντρωση 100 mg L<sup>-1</sup> η βιοαποικοδόμηση είναι της τάξης του 11 % και μειώνεται συνεχώς. Στα 400 mg L<sup>-1</sup> το ποσοστό έχει μηδενιστεί πλήρως.

Επομένως, προκύπτει ότι το βακτήριο 966 στις συγκεντρώσεις μέχρι 200 mg L<sup>-1</sup> 1,3-DCP παρουσιάζει κάποιο μικρό ποσοστό αποικοδόμησης και έχει μια σχετικά μικρή ανθεκτικότητα στις συγκεντρώσεις αυτές.



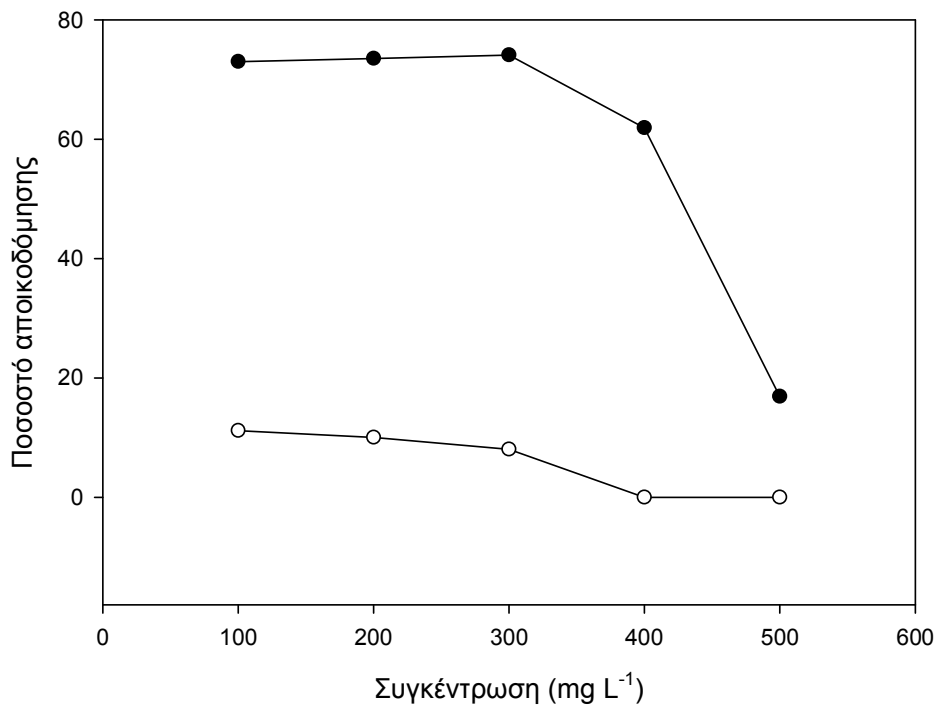
**Διάγραμμα 75:** Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποικοδόμησης της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης (DCP) στις συγκεντρώσεις 100 – 300 mg L<sup>-1</sup> από το βακτήριο 966

Στο διάγραμμα 76 απεικονίζονται τα ποσοστά αποικοδόμησης της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης (DCP) από τα βακτήρια *P. putida* DSM 437 και 966 στις συγκεντρώσεις από 100 έως 300 mg L<sup>-1</sup>. Παρατηρείται ότι τα δυο βακτηριακά στελέχη αποικοδομούν σχεδόν το ίδιο σε συγκέντρωση 100 mg L<sup>-1</sup>. Ωστόσο, στις επόμενες συγκεντρώσεις το βακτήριο 437 μειώνεται σταδιακά μέχρι τα 300 mg L<sup>-1</sup>, ενώ το 966 μειώνεται σημαντικά και πλησιάζει μηδενικές τιμές στα 300 mg L<sup>-1</sup>. Όμως οι συγκεντρώσεις 400 και 500 mg L<sup>-1</sup> έχουν υπερβεί την ανθεκτικότητά των συγκεκριμένων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται βιοαποικοδόμηση.



**Διάγραμμα 76:** Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποικοδόμησης της 1,3-διχλωρο-2-προπανόλης (DCP) στις συγκεντρώσεις 100 – 300 mg L<sup>-1</sup> από το βακτήριο *P. putida* DSM 437 και 966 Σύμβολα: (●) βακτήριο *P. putida* DSM 437 , (○) βακτήριο 966

Στο διάγραμμα 77 φαίνεται το ποσοστό αποικοδόμησης του βακτηρίου *P. putida* DSM 437 ως προς τις δυο τοξικές ουσίες που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία (3-CPD, 1,3-DCP). Παρατηρείται ότι η συμπεριφορά του ίδιου βακτηρίου είναι διαφορετική και εξαρτάται από το είδος της τοξικής ουσίας που αποικοδομεί. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, η 3-CPD είναι πιο εύκολο να αποικοδομηθεί καθώς περιέχει μόνο ένα άτομο χλωρίου, ενώ η 1,3-DCP είναι πιο δύσκολο καθώς περιέχει δυο άτομα χλωρίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η σταθερότερη ένωση 1,3-DCP να αποικοδομείται δυσκολότερα σε σύγκριση με την 3-CPD. Σε συγκεντρώσεις μέχρι 300 mg L<sup>-1</sup> η διαφορά μεταξύ των δυο ενώσεων ως προς την αποικοδόμηση είναι στο 60 %. Ενώ σε πιο μεγάλες συγκεντρώσεις η διαφορά στο ποσοστό τείνει να εξισωθεί και να πάρει μηδενικές τιμές. Αυτό συμβαίνει διότι ο μικροοργανισμός σε μεγάλες συγκεντρώσεις τοξικών ενώσεων χάνει την ανθεκτικότητά του.



**Διάγραμμα 77:** Συγκεντρωτικό διάγραμμα αποικοδόμησης της 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD) και της 1,3-διχλώρο-2-προπανόλης (DCP) στις συγκεντρώσεις 100 – 500 mg L<sup>-1</sup> από το βακτήριο *P. putida* DSM 437 Σύμβολα: (●) 3-χλώρο-1,2-προπανοδιόλης (CPD), (○) 1,3-διχλώρο-2-προπανόλη (DCP)



## ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι αλογονωμένες οργανικές ενώσεις βρίσκονται παντού στο περιβάλλον και προέρχονται, είτε από τον άνθρωπο, είτε από την ίδια την φύση. Ωστόσο, όπως αναφέρεται και στην βιβλιογραφία, πολλές από αυτές τις ενώσεις (π.χ 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη, 1,3-διχλωρο-προπανόλη) είναι τοξικές και καρκινογόνες με αποτέλεσμα να κρίνεται απαραίτητη η αποικοδόμησή τους.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα για αφαλογόνωση 2 βακτηριακά στελέχη της εταιρείας DSMZ και 72 βακτηριακά στελέχη από το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών εκ των οποίων τα 24 βρέθηκαν θετικά. Όταν τα θετικά βακτηριακά στελέχη εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις  $100 \text{ mg L}^{-1}$  της 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης και της 1,3-διχλωρο-προπανόλης προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Τα ποσοστά αποικοδόμησης της 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλης και της 1,3-διχλωρο-προπανόλης διαφέρουν ανά βακτηριακό στέλεχος.
- Η 3-CPD αποικοδομείται πιο εύκολα και με υψηλότερες αποδόσεις σε σχέση με την 1,3-DCP.

Τα δυο πιο ικανά στελέχη (*P. putida* DSM 437 και *P. putida* DSM 12448 για την 3-χλωρο-1,2-προπανοδιόλη και *P. putida* DSM 437 και βακτηριακό στέλεχος 966 για την 1,3-διχλωρο-προπανόλη) της κάθε τοξικής ένωσης σε συγκεντρώσεις  $100 - 500 \text{ mg L}^{-1}$  έδειξαν ότι:

- Η ανθεκτικότητα των βακτηριακών στελεχών για την 3-CPD φτάνει μέχρι τα  $400 \text{ mg L}^{-1}$  και για την 1,3-DCP τα  $300 \text{ mg L}^{-1}$ .
- Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πέρα της ανθεκτικότητας τα ποσοστά αποικοδόμησης τείνουν σε μηδενικές τιμές.

Συμπερασματικά, το *P. putida* DSM 437 θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω και να χρησιμοποιηθεί για την αποικοδόμηση των δύο

χλωροπροπανολών που μελετήθηκαν, καθώς και αποβλήτων που τις περιέχουν σε βιομηχανική κλίμακα. Μία κρίσιμη παράμετρος για την αποικοδόμηση των χλωροπροπανολών φαίνεται να είναι η κυτταρική συγκέντρωση. Άρα, θα μπορούσε να μελετηθεί ο εγκλιματισμός των κυττάρων της *P. putida* DSM 437 και να παραχθεί μία κρίσιμη μάζα κυττάρων, η οποία θα είναι ικανή να αποικοδομήσει σε μεγαλύτερο βαθμό τις δύο ενώσεις.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Assis, H. M. S., Sallis, P. J., Bull, A. T., Hardman, D. J. (1998) «Biochemical characterization of a haloalcohol dehalogenase from *Arthrobacter erithii* H10a», *Enzyme and Microbial Technology*, 22:568–574.
- Bastos F., Bessa J., Pacheco C. C., De Marco Paolo, Castro Paula M.L., Silva M. and Jorge R. F. (2002) «Enrichment of microbial cultures able to degrade 1,3-dichloro-2-propanol: A comparison between batch and continuous methods», *Biodegradation* 13: 211–220.
- Bel-Rhlid R., Talmon J. P., Fay L. B. and Juillerat M. A. (2004) «Biodegradation of 3-Chloro-1,2-propanediol with *Saccharomyces cerevisiae*», *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6165-6169.
- Bhatt, P. et al. (2007) «Biodegradation of chlorinated compounds - A review», *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37(2): 165-198.
- Bielefeldt, A.R., Stensel, H.D., and Strand, S.E. (1995) «Cometabolic degradation of TCE and DCE without intermediate toxicity», *J. Environ. Eng.*, 791–79.
- Bradley, P.M., Landmeyer, J.E., and Dinicola, R.S. (1998) «Anaerobic oxidation of (1,2 14C) dichloroethene», *Appl. Environ. Technol.* 64, 1560–1562.
- Burton S. G. (2001) «Development of bioreactors for application of biocatalysts in biotransformations and bioremediation», *Pure Appl. Chem.*, Vol. 73 (1), 77–83.
- Cookson, J.T., Jr. In (1995) «Bioremediation Engineering: Design and Application», New York: McGraw-Hill.
- Crews C., Brereton P. and Davies A. (2001) «Food Additives and Contaminants», Vol. 18, No. 4, 271± 280.
- Edwards, E.M., Jones, A.R. & Waites, G.M.H., (1975) «The entry of alpha-chlorohydrin into body fluids of male rats and its effect upon incorporation of glycerol into lipids», *J. Reprod. Fertil.*, 43, 225–232.
- Fauzi, A. M., Hardman, David J. B., Alan T. (1996) «Biodehalogenation of low concentrations of 1,3-dichloropropanol by mono- and mixed cultures of bacteria», *Appl Microbiol Biotechnol* 46, 660-666.
- Florence, T. M. and Y. J. Farrar (1971) «Spectrophotometric determination of chloride at the parts-per-billion level by the mercury(II) thiocyanate method» *Analytica Chimica Acta* 54(2): 373-377.

- Fetzner, S., (1998) «Bacterial dehalogenation», *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 633–657.
- Gribble, G.W., (1998) «Naturally occurring organohalogen compounds», *Acc. Chem. Res.* 31, 141–152.
- Gschwend PM, MacFarlane JK, Newman KA (1965) «Volatile halogenated organic compounds released to seawater from temperate marine macroalgae», *Science*, 227, 1033-1035.
- Häggbloom M. M., Fennell D. E., Ahn Y-B., Ravit B., Kerkhof L. (2006) Anaerobic dehalogenation of halogenated organic compounds: Novel strategies for bioremediation of contaminated sediments. In: Twardowska I, Allen HE, Häggbloom MM (eds) *Viable Methods of Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*, Springer, 505-521.
- Hamlet C. G., Sadd P. A. and Gray David A., *J. Agric Food Chem.* (2004), 52, 2067-2072.
- Hardman, D.J. (1991) «Biotransformation of halogenated compounds», *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11, 1–40.
- Hopkins, G.D., and McCarty, P.L. (1995) «Field evaluation of in-situ aerobic cometabolism of trichloroethylene and 3-dichloroethylene isomers using phenol and toluene as the primary substrates», *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1628–1637.
- Hutzinger, O., and Veerlamp, W. In (1981) «Microbial Degradation of Xenobiotic and Recalcitrant Compounds», Leisinger, T., Cook, A., Hutter, R., and Nuesch, J., eds., London: Academic Press 3–45.
- Integrated Laboratory Systems, Inc. Research Triangle Park, North Carolina (2005) «1,3-Dichloro-2-propanol: Review of Toxicological Literature».
- Janssen DB, Scheper A, Dijkhuizen L, & Witholt B. (1985) «Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10», *Appl Environ Microbiol.*, 49, 673-677.
- Janssen DB, Jager D, Witholt B. (1987) «Degradation of n-haloalkanes and alpha, omega-dihaloalkanes by wild-type and mutants of *Acinetobacter* sp. strain GJ70», *Appl Environ Microbiol.*, 53, 561-6. Note: the organism described here was later classified as a *Rhodococcus* (Poelarends et al. 2000a).
- Janssen, D.B., Oldenhius, R., and Van den Wijngaard, A.J. (1989) «Degradation of xenobiotic compounds by microorganisms», *VDI Berichte* 735, 25–39.

- Janssen, D.B., Pries F., and van der Ploeg, J.R. (1994) «Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes», *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 163–191.
- Jones, A.R., (1978) «The antifertility actions of alpha-chlorohydrin in the male», *Life Sci.*, 23, 1625–1646.
- Kalogeris E., Antzoulatos O., Mamma D., Hatzinikolaou D. G., Christakopoulos P., and Kekos D. (2007) «Application of Different Processes for the Biodegradation of 1,3-dichloro-2-propanol by the Bacterium *Pseudomonas putida* DSM437», *Chem. Biochem. Eng. Q.* 21 (3), 297–305.
- Kanehisa Laboratory, Kyoto University Bioinformatics Center (2012) «Glycerolipid metabolism-Reference pathway». Retrieved September 12, 2012 from: <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00561.html>.
- Kasai N, Tsujimura K, Unoura K, Suzuki T (1990) «Degradation of 2,3-dichloro-1-propanol by a *Pseudomonas* sp.», *Agric Biol Chem.*, 54, 3185-3190.
- Kirton, K.T., Erickson, R.J., Ray, J.A. & Porbes, A.D., (1970) «Male antifertility compounds: Efficacy of N-5897 in primates (*Macaca mulatta*)», *J. Reprod. Fertil.*, 21, 275–278.
- Kluwe, W.M., Gupta, B.N. & Lamb, J.C., IV, (1983) «The comparative effects of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) and its metabolites, 3-chloro-1,2-propaneoxide (epichlorohydrin), 3-chloro-1,2-propanediol (alpha-chlorohydrin), and oxalic acid, on the urogenital system of male rats», *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 70, 67–86.
- Knackmuss, H.J. (1981) «Degradation of halogenated & sulfonated hydrocarbons», *FEMS Symp.* 12, 189–212.
- Leisinger, T., and Bader, R. Microbial (1993) «Dehalogenation of synthetic organohalogen compounds: Hydrolytic dehalogenases», *Chimia* 47, 116–121.
- Mamma Diomi, Papadopoulou Eleni, Petroutsos Dimitris, Christakopoulos Paul, and Kekos Dimitris (2006) «Removal of 1,3-Dichloro-2-Propanol and 3-Chloro-1,2-Propanediol by the Whole Cell System of *Pseudomonas putida* DSM 437», *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 41:303–313.
- Mars AE, Kasberg T, Kaschabek SR, van Agteren MH, Janssen DB, Reineke W. (1997) «Microbial degradation of chloroaromatics: use of the meta-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene», *J Bacteriol* 179, 4530-7.

- McCarty, P.L. (1987) «Bioengineering issues related to in-situ remediation of contaminated soils and groundwater. In: Environmental Biotechnology», Omenn, G.S. eds., New York: Plenum Press, 143–162.
- MeBmer, M., Wohlfarth, G. and Dickert, G. (1993) «Methyl chloride metabolism of the strictly anaerobic, methyl chloride-utilizing homoacetogen strain MC», Arch. Microbiol. 160, 383–387.
- MeBmer, M., Reinhardt, S., Wohlfarth, G., and Diekert, G. (1996) «Studies on methyl chloride dehalogenase and o-demethylase in cell extracts of the Homoacetogen strain MC based on a newly developed coupled enzyme assay», Arch. Microbiol. 165, 18–25.
- Mueller, T. W., Fischer, S. A., Tappi J. 75 (1992) «Determination of organic chloride impurities in polyaminoamide-epichlorohydrin resins by gas chromatography», 159-162.
- Nagata, Y., Hatta, T., Imai, R., Kimbara, K., Fukuda, M., Iano, K., and Takagi, M. (1993) «Purification & characterization of  $\gamma$  HCH dehydrochlorinase (Lin A) from *Pseudomonas paucimobilis*», Biosci. Biotechnol. Biochem. 57, 1582–1583.
- Neidleman SL, Giegert J, (1966) «Halometabolites and their sources. In BiohalogenCon: principles, basic roles and applications», Chichester: Ellis Horwood Ltd., 13-45.
- Oldenhuis R, Kuijk L, Lammers A, Janssen DB, & Witholt B. (1989) «Degradation of chlorinated and non-chlorinated aromatic solvents in soil suspensions by pure bacterial cultures», Appl Microbiol Biotechnol 30: 211-217.
- Poelarends GJ, Kulakov LA, Larkin MJ, van Hylckama Vlieg JET, Janssen DB. (2000a) «Roles of horizontal gene transfer and gene integration in evolution of 1,3 dichloropropene- and 1,2 dibromoethane-degradative pathways», J Bacteriol 182, 2191-9.
- Poelarends GJ, Zandstra M, Bosma T, Kulakov A, Larkin MJ, Marchesi JR, Weightman AJ, Janssen, DB. (2000b) «Haloalkane-utilizing *Rhodococcus* strains isolated from geographically distinct locations possess a highly conserved gene cluster encoding haloalkane catabolism», J Bacteriol 182: 2725-31.
- Pries F, van der Ploeg JR, Dolfing J, Janssen DB (1994) «Degradation of halogenated aliphatic compounds: the role of adaptation. EMS halogenated aliphatic compounds: the role of adaptation», EMS Microbiol Rev, 15, 279-295.
- Ramanand, K., Balba, M.T., and Duffy, J. (1993) «Reductive dehalogenation of chlorinated benzenes and toluenes under methanogenic conditions», Environ. Microbiol. 59, 3266–3272.

- Robjohns St., Marshall R., Fellows M. and Kowalczyk G., (2003) «In vivo genotoxicity studies with 3-monochloropropan-1,2-diol», *Mutagenesis* Vol. 18 (5), 401-404.
- Slater, J.H., Bull, A.T., and Hardman, D.J. (1995) «Microbial dehalogenation», *Biodegradation* 6, 181–189.
- Slater, J.H., Bull, A.T., and Hardman, D.J. (1997) «Microbial dehalogenation of halogenated alkanolic acids alcohols and alkanes», *Adv. Microb Physiol.* 38, 133–176.
- Smejkal, C. W., Vallaey, T., Burton, S. K., Lappin-Scott, H. M. (2001) «A rapid method to screen degradation ability in chlorophenoxyalkanoic acid herbicide-degrading bacteria», *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 32(4), 273-277.
- Swanson P. E. (1999) «Dehalogenases applied to industrial-scale biocatalysis», *Current Opinion in Biotechnology*, 10:365-369.
- Van den Wijngaard, AJ, Janssen, DB & Witholt, B. (1989) «Degradation of epichlorohydrin and halohydrins by bacterial cultures isolated from freshwater sediment», *Journal of General Microbiology* 135: 2199-2208.
- Van den Wijngaard, AJ., Van der Kamp, KWHJ., Van der Ploeg, JR, Pries, F, Kazemier, B & Janssen, DB. (1992) «Degradation of 1,2-dichloroethane by *Ancylobacter aquaticus* and other facultative methylotrophs», *Appl Environ Microb* 58: 976-983.
- Van der Ploeg JR, Kingma J, De Vries EJ, Van der Ven JG, Janssen DB. (1996) «Adaptation of *Pseudomonas* sp. GJ1 to 2-bromoethanol caused by overexpression of an NAD-dependent aldehyde dehydrogenase with low affinity for halogenated aldehydes», *Arch Microbiol* 165, 258-64.
- Van der Meer, J.R., Roelofsen, W., Schraa, G., and Zehnder, A.J.B. (1987) «Degradation of low concentrations of dichlorobenzenes and 1,2,4-trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. strain P51 in non-sterile soil columns», *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 333–341.
- Van Pée, K.-H., (1996) «Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria», *Ann. Rev. Microbiol.* 50, 375–399.
- Weissermel K, Arpe HJ (1997) «Industrial Organic Chemistry», edn 3. New York: VCH Publishers, Inc.
- Windholz, M., ed., (1976) «The Merck Index—An Encyclopedia of Chemicals and Drugs», 9th Ed., Rahway, New Jersey, Merck & Co.

Yonetani R., Ikatsu H., Miyake-Nakayama Ch., Fujiwara E., Maehara Y., Miyoshi Sh., Matsuoka H. and Shinoda S. (2004) «Isolation and Characterization of 1,3-Dichloro-2-Propanol- Degrading Bacterium», *Journal of Health Science*, 50(6), 605 – 612.