

Διάλεξη 5

Βιολογική Απομάκρυνση Οργανικών Ρύπων



Οργανικοί Περιβαλλοντικοί Ρύποι

- Πολυαρωματικοί Υδρογονάνθρακες (PAHs)
- Πολυχλωριωμένα Διφαινύλια (PCBs)
- Πολυχλωριωμένες Διβενζοδιοξίνες
- Νιτροαρωματικά (TNT, Νιτρογλυκερόλη)
- Γεωργικά Φάρμακα και προϊόντα μεταβολισμού
- Χλωροφαινόλες
- Χλωροαλκάνια ή χλωροαλκένια
- Οργανομεταλλικά σύμπλοκα



Μικροβιακός μεταβολισμός οργανικών ξενοβιοτικών ουσιών

Οι μικροοργανισμοί στο περιβάλλον έχουν την ικανότητα να αποδομούν ξενοβιοτικές ουσίες και να χρησιμοποιήσουν την ενέργεια που παράγεται για την αύξηση και ανάπτυξη τους

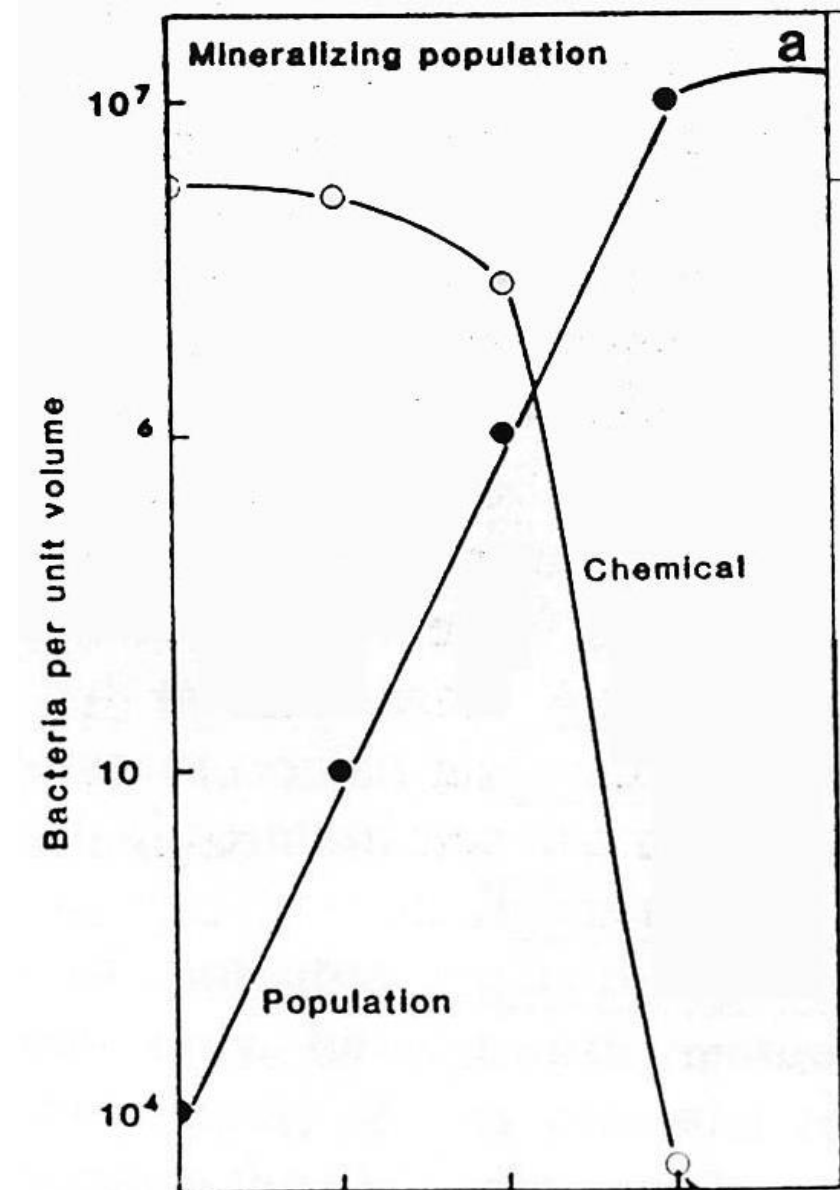
Δύο είναι οι κύριοι τρόποι μεταβολισμού ξενοβιοτικών ουσιών στο περιβάλλον:

1. Συμμεταβολισμός (co-metabolism)
2. Καταβολισμός (catabolism) / Ανοργανοποίηση (mineralization)

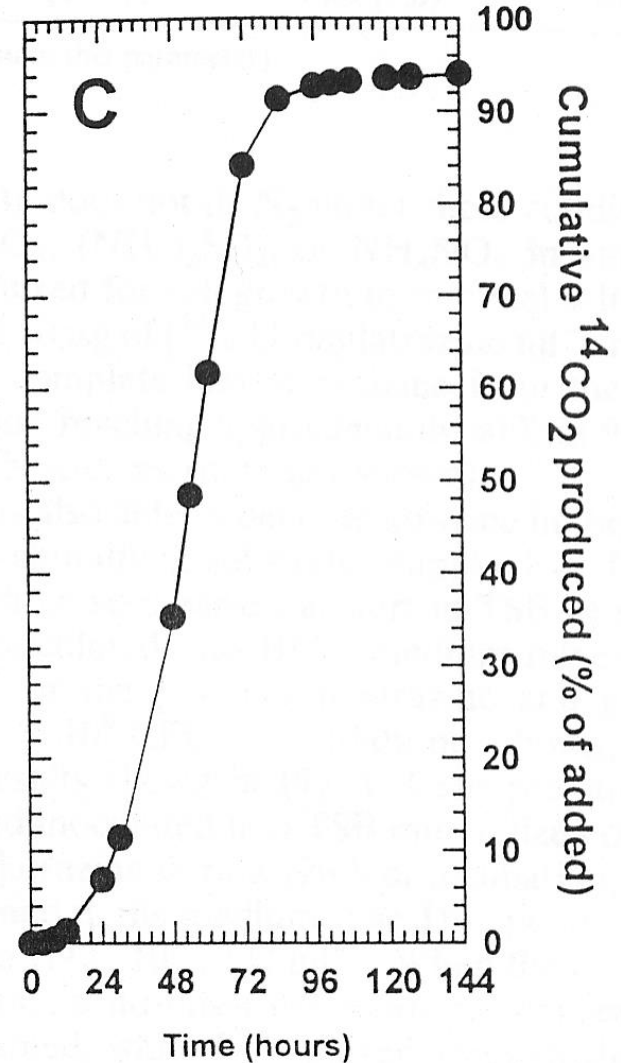
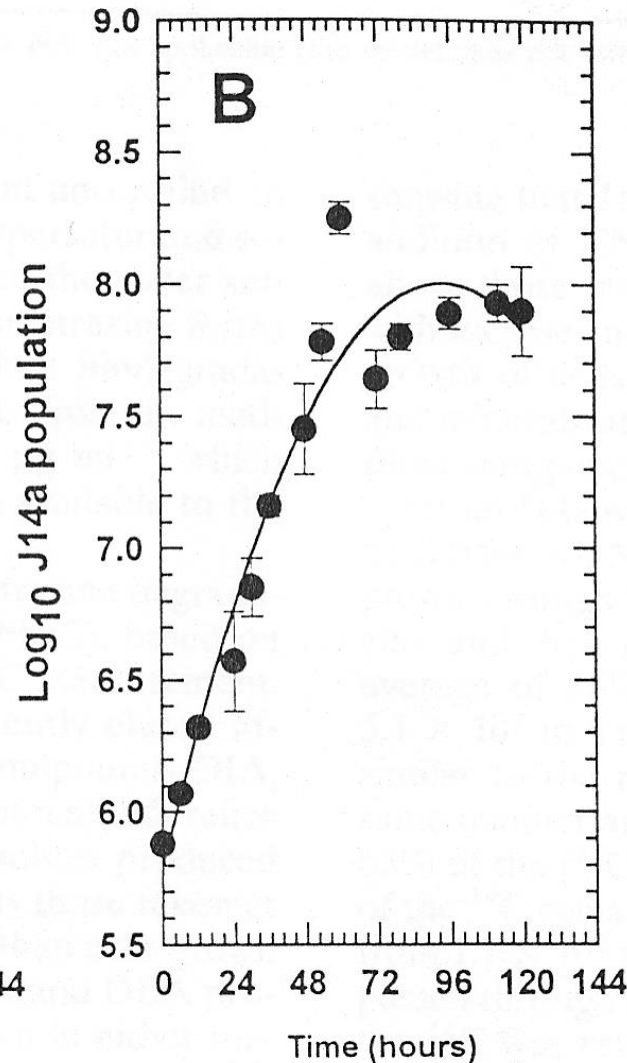
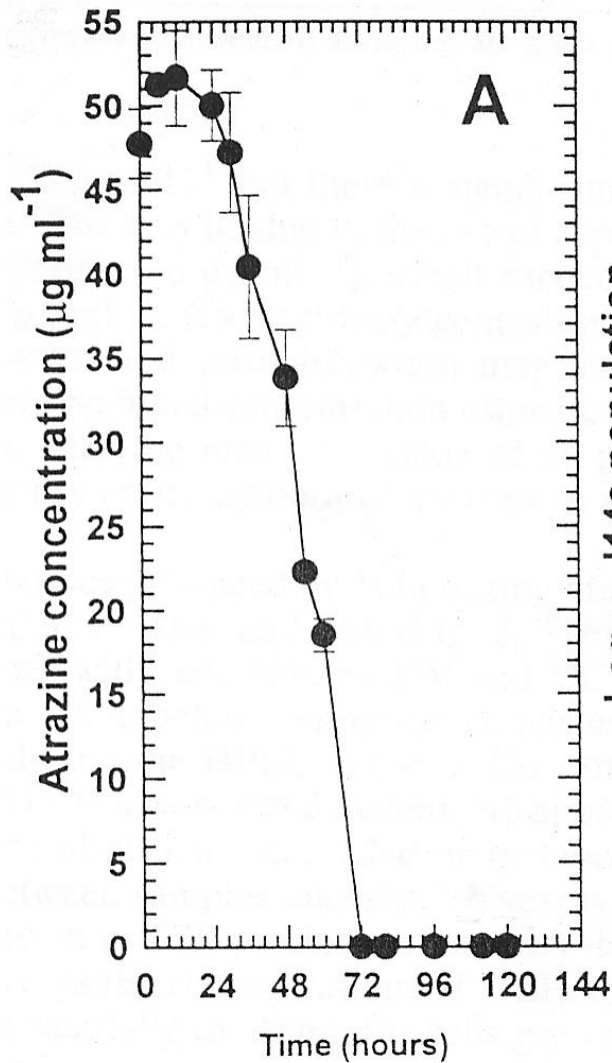


Καταβολισμός ή Ανοργανοποίηση

Το φαινόμενο κατά το οποίο οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν ξενοβιοτικές ουσίες και να χρησιμοποιούν την ενέργεια που παράγεται για την αύξηση και ανάπτυξη τους



Παράδειγμα καταβολισμού – ανοργανοποίησης atrazine

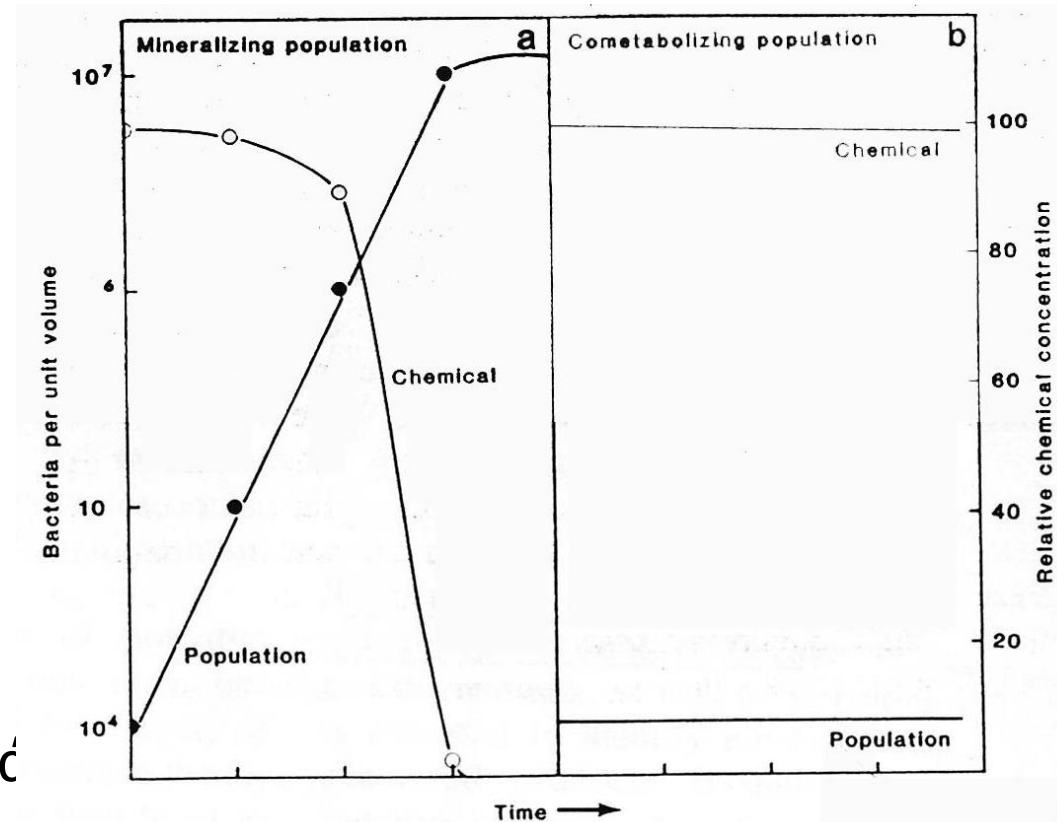


Αρχές Καταβολισμού/Ανοργανοποίησης

- Ταχύτατος ρυθμός αποδόμησης των ξενοβιοτικών ουσιών
- Η ενέργεια που παράγεται κατά την διάρκεια του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών χρησιμοποιείται άμεσα από τους μικροοργανισμούς για την αύξηση και ανάπτυξη τους
- Οι μικροοργανισμοί συνεχίζουν να μεταβολίζουν τις ξενοβιοτικές ουσίες ως βασικό υπόστρωμα ακόμη και παρουσία εύκολα διαθέσιμων εναλλακτικών πηγών C ή N.
- Ο καταβολισμός οδηγεί στην παραγωγή απλούστερων μορίων που μπορούν να μεταβολισθούν παραπέρα από τους μικροοργανισμούς προς $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
- Οι μικροοργανισμοί κατέχουν εξειδικευμένα ενζυμικά συστήματα για την αποδόμηση των συγκεκριμένων ξενοβιοτικών ουσιών

Συμμεταβολισμός

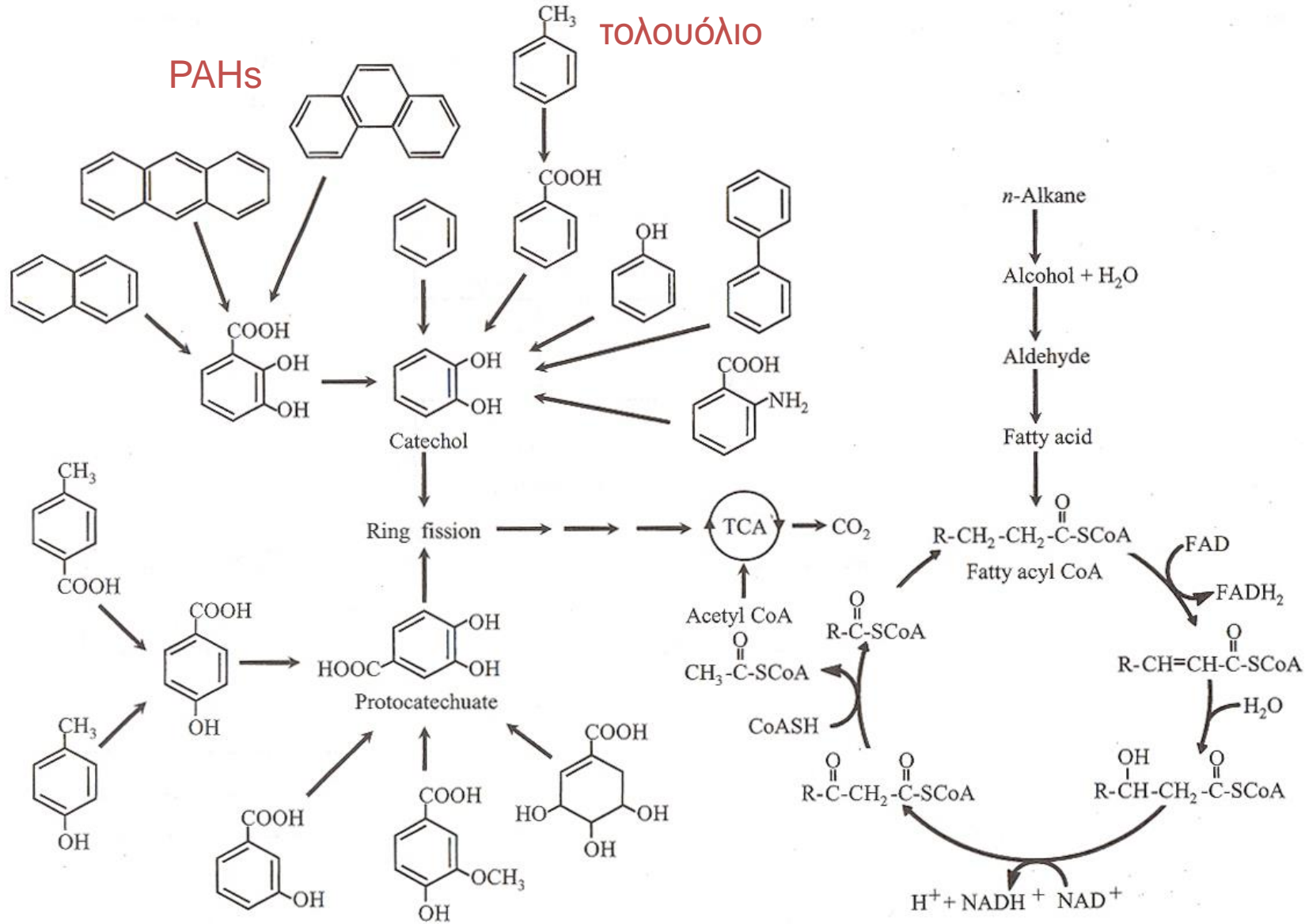
Το φαινόμενο κατά το οποίο μικροοργανισμοί έχουν ενζυμικά συστήματα ευρέως φάσματος τα οποία χρησιμοποιούνται για τον μεταβολισμό διαφόρων φυσικών υποστρωμάτων αλλά ταυτόχρονα μπορούν να μεταβολίζουν και ξενοβιοτικές ουσίες στο περιβάλλον.



Συμμεταβολισμός

- Βραδύς μεταβολισμός με σταθερό ρυθμό αποδόμησης
- Οι μικροοργανισμοί δεν αποκομίζουν ενεργειακό όφελος από την αποδόμηση των ξενοβιοτικών ουσιών για την ανάπτυξη τους
- Παρουσία εναλλακτικών πηγών C ή N αναστέλλεται ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών ουσιών
- Ο συμμεταβολισμός οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού που δεν μπορούν να μεταβολισθούν παραπέρα από τους μικροοργανισμούς
- Οι μικροοργανισμοί κατέχουν ενζυμικά συστήματα ευρέως φάσματος





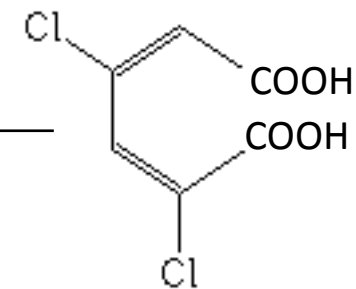
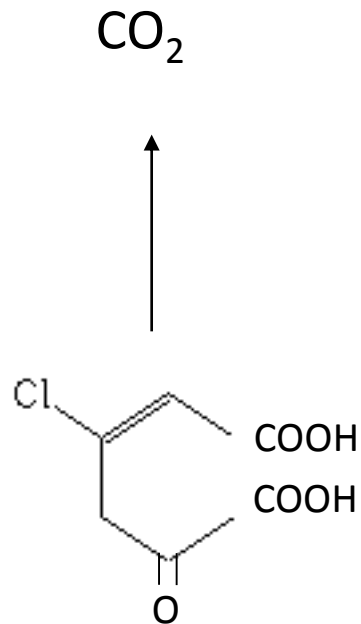
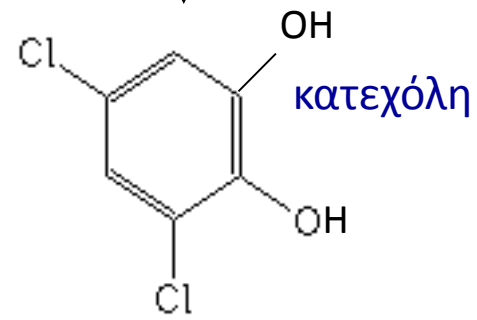
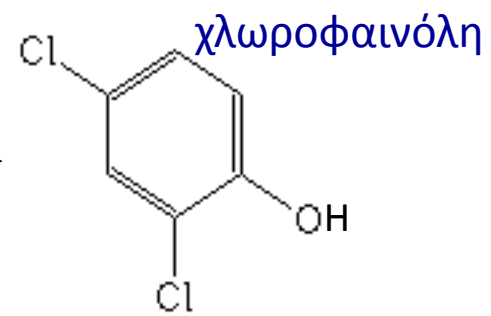
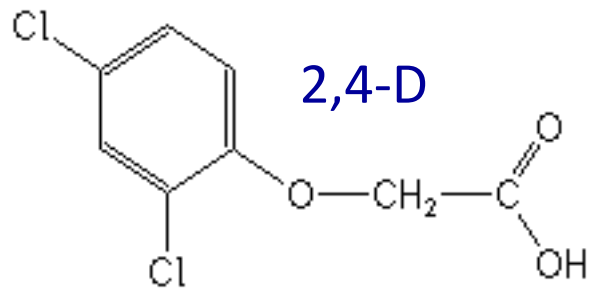
Η μικροβιακή διάσπαση οργανικών ρύπων οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων που ενσωματώνονται στον μεταβολισμό των αποδομητικών μικροοργανισμών προς παραγωγή ενέργειας

Μεταβολισμός Αρωματικών Ενώσεων

Γενικότερα οι αρωματικές ενώσεις είναι σταθερές στο περιβάλλον και ιδιαίτερα **οι πολυχλωριωμένες ενώσεις που όσο περισσότερα άτομα Cl έχουν τόσο περισσότερο σταθερές είναι**

Συνήθως **πολυχλωριωμένες αρωματικές ενώσεις** μεταβολίζονται υπό αναγωγικές συνθήκες με σταδιακή **απομάκρυνση των ατόμων Cl** και στην συνέχεια ο αρωματικός δακτύλιος συνήθως παραμένει σταθερός ή υπό αερόβιες συνθήκες σταδιακά διασπάται προς **κατεχόλη**



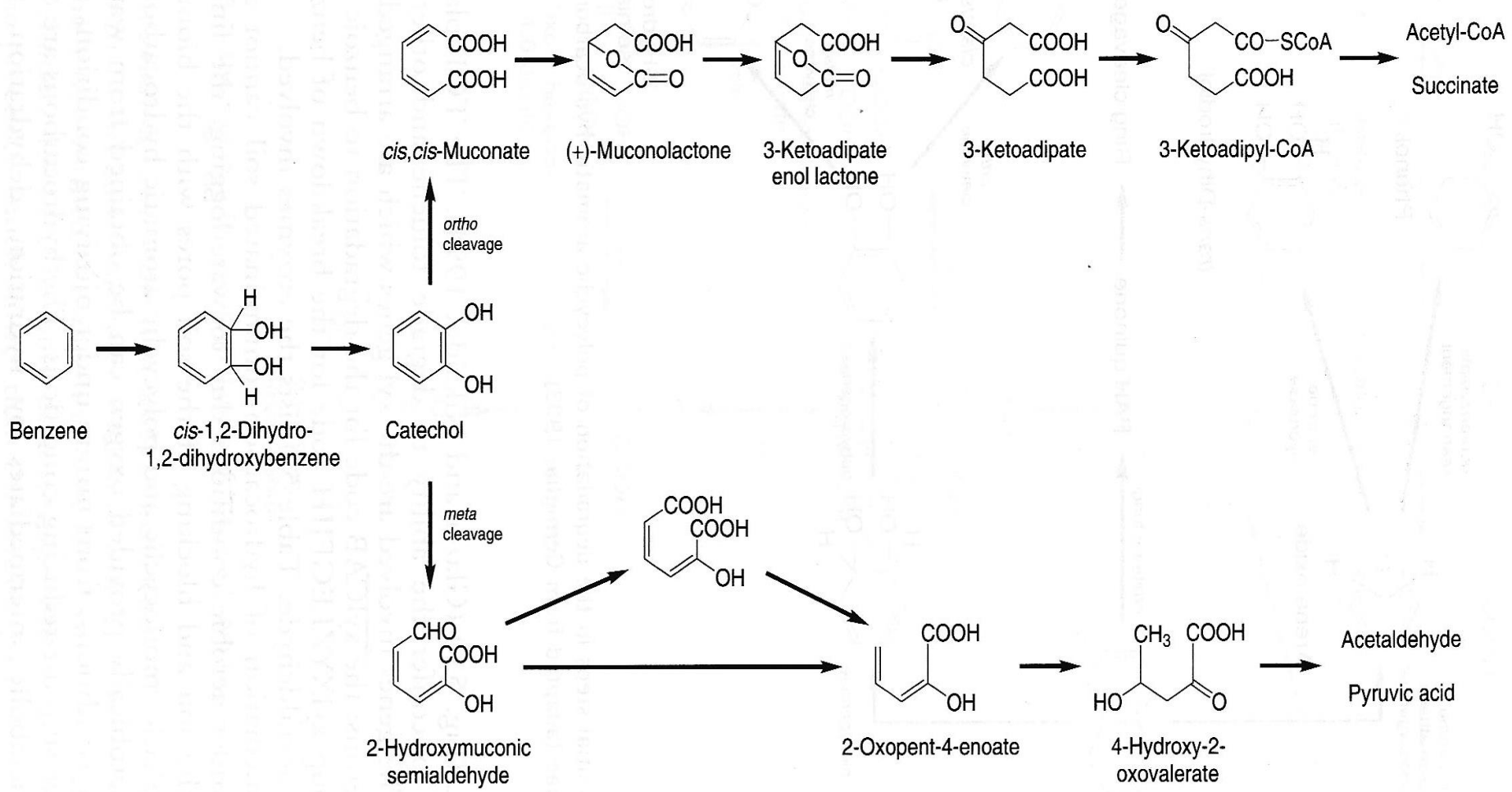


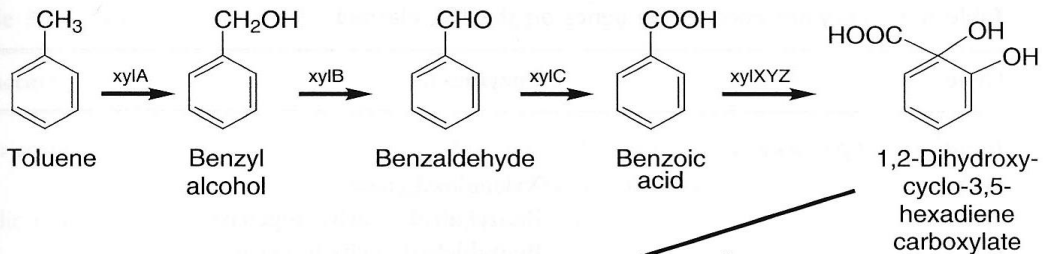
Μεταβολισμός μονοκυκλικών υδρογοναθράκων

Μονοκυκλικοί υδρογονάνθρακες όπως βενζόλιο, τολουόλιο αποδομούνται από τους μικροοργανισμούς με ενσωμάτωση δύο $-OH$ στο δακτύλιο (κατεχόλη) και στην συνέχεια ορθο- ή μετά διάσπαση του δακτυλίου

Τα τελικά προϊόντα της διάσπασης εισέρχονται στον κύκλο του Krebs και συνεπώς βοηθούν στην παραγωγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς

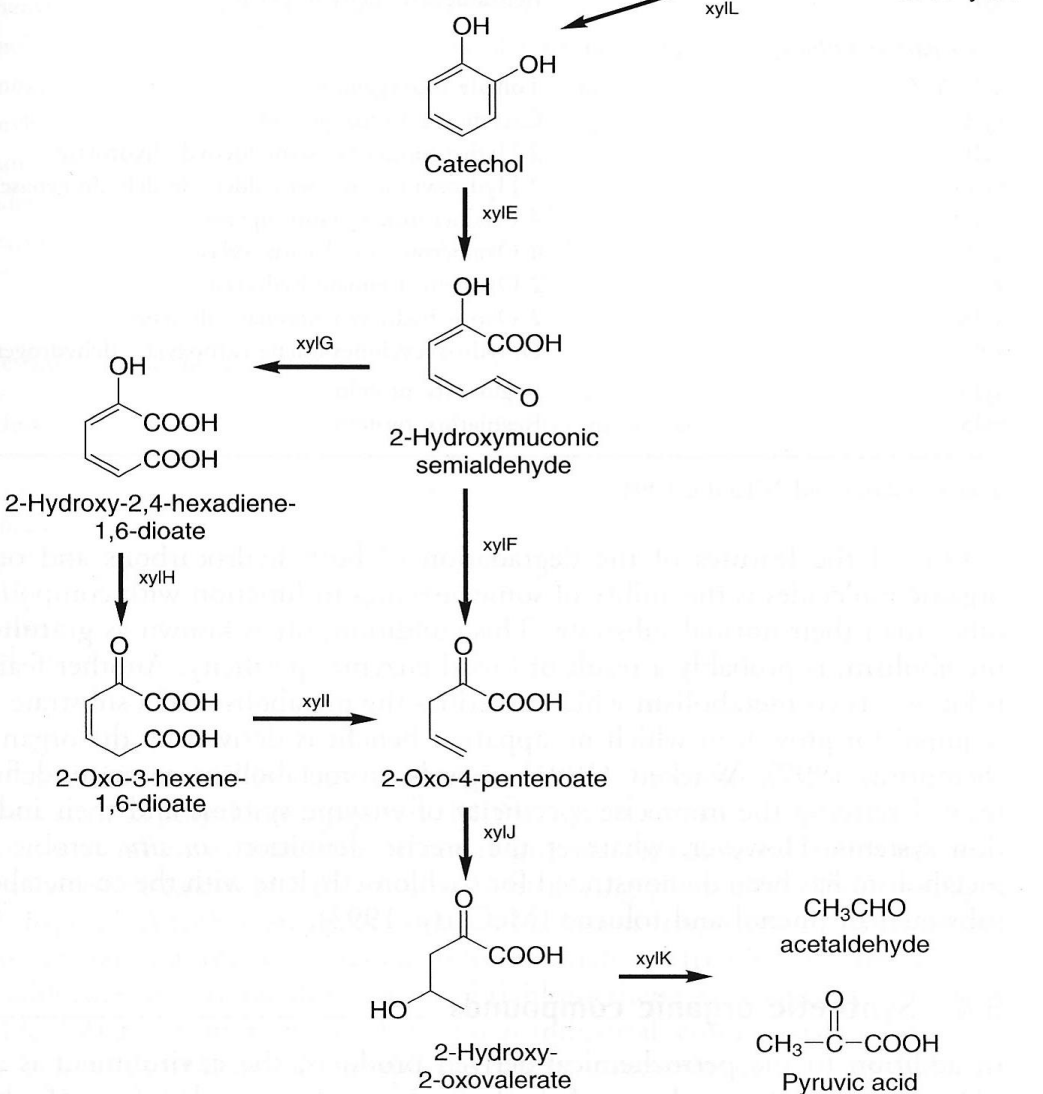






Μεταβολισμός Τολουολίου

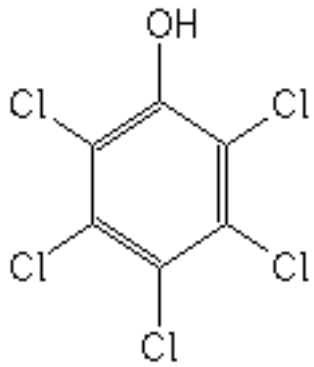
Το βακτήριο *Pseudomonas putida* TOL περιέχει σε ένα και μόνο πλασμίδιο όλα τα γονίδια που ελέγχουν την αλυσίδα των αντιδράσεων για την πλήρη ανοργανοποίηση του τολουολίου.



Το τολουόλιο μετατρέπεται σε κατεχόλη και στην συνέχεια διασπάται ο δακτύλιος σταδιακά προς ακεταλδεύδη και πυρουβικό οξύ

Μεταβολισμός Χλωροφαινολών

Η πενταχλωροφαινόλη είναι από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα ενώσεων που καταβολίζονται μικροβιακά με ελευθέρωση CO₂



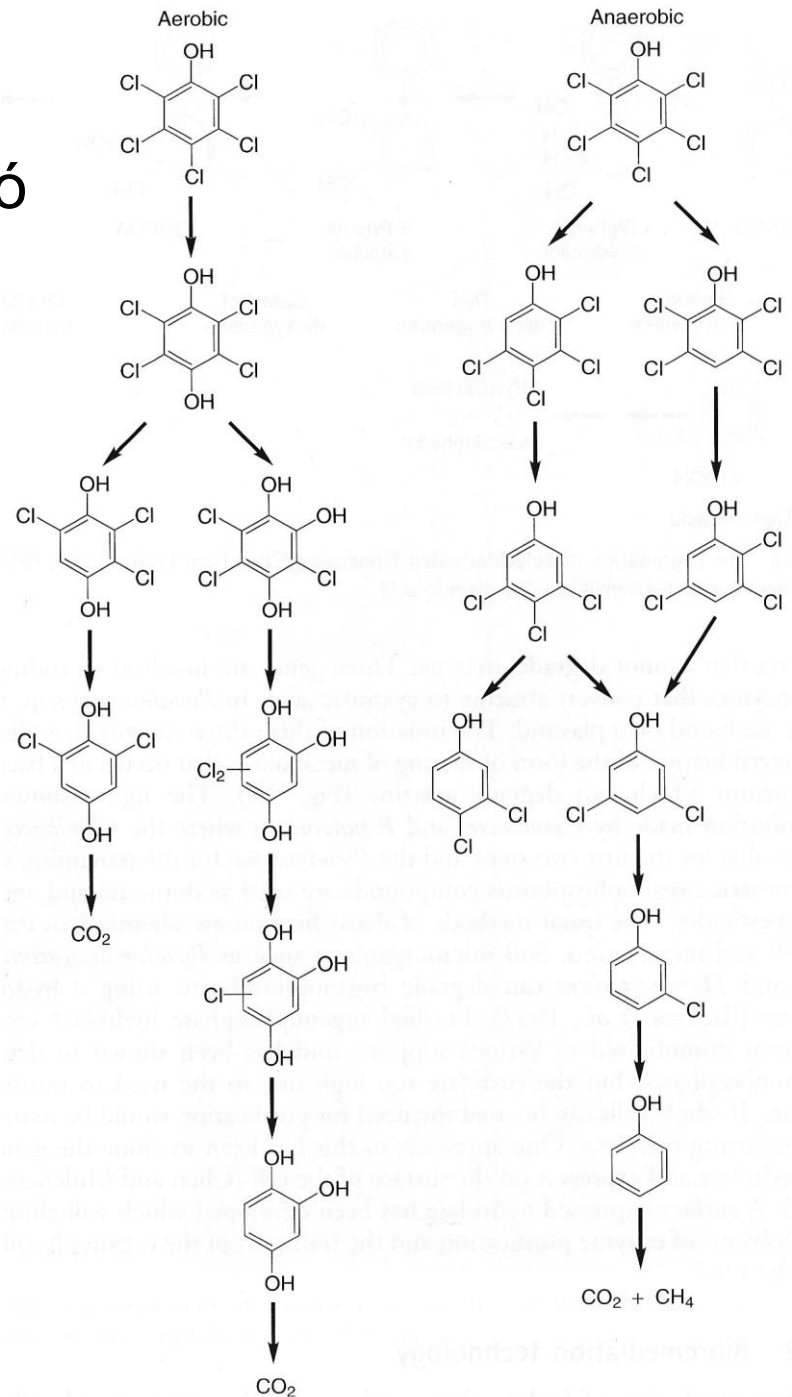
Σε εδάφη και υδροφορά συστήματα που περιείχαν σημαντικές συγκεντρώσεις πενταχλωροφαινόλης η εφαρμογή βακτηρίων (*Rhodococcus chlorophenolicus*, *Sphingomonas chlorophenolica*, *Mycobacterium chlorophenolicum*) και μυκήτων (*Phanerochaete chrysosporium*) οδήγησε σε σχεδόν πλήρη καταβολισμό της ουσίας προς CO₂



Η πενταχλωροφαινόλη (PCP)
αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό
ρύπτο που λόγω του μεγάλου
αριθμού Cl είναι σχετικά ανθεκτικό
στην βιοαποδόμηση

Αερόβιες Συνθήκες: με σταδιακή
απομάκρυνση των
υποκαταστατών Cl και
αντικατάσταση τους με OH

Αναερόβιες Συνθήκες: με
διαδοχικές αποχλωριώσεις του
δακτυλίου και τελική παραγωγή
 CO_2 και CH_4



Μεταβολισμός PCBs

Η χρήση των PCBs έχει απαγορευθεί τα τελευταία 20 χρόνια αλλά η ανθεκτικότητα του στην μικροβιακή αποδόμηση έχει οδηγήσει στην ανίχνευση τους ακόμη και τώρα στο περιβάλλον.

Τα PCBs μεταβολίζονται από τους μικροοργανισμούς κυρίως υπό αεροβικές συνθήκες και ο τρόπος μεταβολισμού τους είναι ίδιος με αυτό των PAHs δηλαδή με οξειδωση προς κατεχόλη και στην συνέχεια διάσπαση των δύο φαινυλικών δακτυλίων προς πυρροβικό οξύ και ακεταλδεύδη.



Βιολογική Απομάκρυνση Πετρελαιοειδών



Βιολογική Απομάκρυνση Πετρελαίου

Οι κυριότερες κατηγορίες υδρογονανθράκων που περιέχονται στο πετρέλαιο:

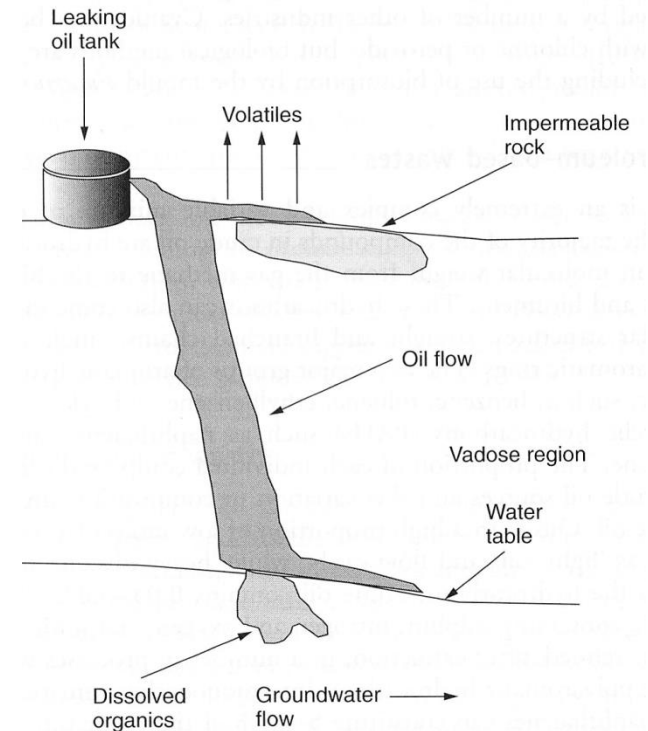
- Μονοκυκλικοί: βενζόλιο, τολουόλιο, αιθυλβενζόλιο, ξυλένιο (BTEX)
- Πολυκυκλικοί: φαιναθρίνη, ναφθαλένιο, ανθρακένιο (PAHs)



Προέλευση Πετρελαίου στο Περιβάλλον

Η παρουσία του πετρελαίου στο περιβάλλον οφείλεται:

- Σε διαρροές δεξαμενών ή αγωγών μεταφοράς πετρελαίου στο έδαφος
- Σε ατυχήματα που συμβαίνουν σε δεξαμενόπλοια μεταφοράς πετρελαίου



Βιολογική Απορρύπανση Πετρελαίου

Σημαντικός αριθμός ιδιαίτερα καταστροφικών για το περιβάλλον ατυχημάτων με δεξαμενόπλοια έχουν καταγραφεί τα τελευταία 20 χρόνια με πιο σημαντικά τα ναυάγια Torey Canyon, Exxon Valdez (1989), Braer (1993)

Ο περιορισμός και η απομάκρυνση του πετρελαίου που ελευθερώνονται από τα δεξαμενόπλοια στο περιβάλλον ακολουθεί μια σειρά μηχανικών, θερμικών και χημικών διεργασιών απορρύπανσης με **τελικό στάδιο την εφαρμογή της βιολογικής απορρύπανσης**



Περίπτωση Exxon Valdez

Το δεξαμενόπλοιο Exxon Valdez ναυάγησε κοντά σε ακτές της Αλάσκας με αποτέλεσμα την ελευθέρωση περίπου 1,200,000 βαρελιών ακατέργαστου πετρελαίου εντός 5 h στην θάλασσα δημιουργώντας πετρελαιοκηλίδα έκτασης 6 km² που με την βοήθεια του αέρα εξαπλώθηκε στις ακτές δημιουργώντας σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα





Τα αρχικά μέτρα περιορισμού εξάπλωσης της πετρελαιοκηλίδας στην θάλασσα και καθαρισμός των ακτών και της θάλασσας με μηχανικά μέσα απομάκρυνε σημαντικές ποσότητες του πετρελαίου

Παρόλα αυτά σημαντικές ποσότητες βαρέων υπολειμμάτων του πετρελαίου διαχύθηκαν σε βαθύτερα εδαφικά στρώματα με κίνδυνο την ρύπανση των υπογείων υδροφόρων συστημάτων. Επίσης υπήρχε σοβαρός κίνδυνος για την υγεία των πουλιών που διαβιούσαν στις ακτές της Αλάσκας.



Exon Valdez – Εφαρμογή Βιολογικής Απορρύπανσης

Η βιολογική απορρύπανση χρησιμοποιήθηκε ως το τελικό μέτρο αφού ο κύριος όγκος του ακατέργαστου πετρελαίου είχε απομακρυνθεί με μηχανικά μέσα

Η βιολογική απορρύπανση περιλάμβανε την προσθήκη στις ακτές της Αλάσκας λιπασμάτων κατάλληλης μορφής και σύστασης ώστε να διαθέσει στους μικροοργανισμούς τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για την ταχύτατη αποδόμηση του πετρελαίου.



Exon Valdez – Εφαρμογή Βιολογικής Απορρύπανσης

Τα λιπάσματα εφαρμόσθηκαν στις ακτές είτε με την μορφή κοκκωδών σκευασμάτων βραδείας απελευθέρωσης που τοποθετήθηκαν σε δίκτυα ώστε να μην παρασύρονται από τα κύματα είτε με την μορφή λιπασμάτων που περιέχουν οργανικές μορφές N, P

Τελικά 2 μήνες μετά το ατύχημα ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που αποδομούσαν το πετρέλαιο αυξήθηκε κατά 10,000 φορές





Τμήμα παραλίας χωρίς
βιολογική απορρύπανση

Τμήμα παραλίας με
βιολογική απορρύπανση

Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην Βιολογική Απορρύπανση



Μικροοργανισμοί στην Βιο. Απορρύπανση

- Μύκητες
- Βακτήρια

Η επιλογή του είδους των μικροοργανισμών που θα χρησιμοποιηθούν εξαρτάται από πολλές παραμέτρους όπως είναι το είδος του ρύπου που πρέπει να απομακρυνθεί και η παρουσία ή όχι και άλλων ρύπων



Μύκητες Λευκής Σήψης στην Βιολογική Απορρύπανση

Χρησιμοποιούνται για την απορρύπανση εδαφών με υψηλές συγκεντρώσεις διαφόρων υπολειμματικών οργανικών ρύπων όπως PCBs, PAHs, Χλωροφαινόλες κ.α.

Οι μύκητες λευκής σήψης ή λιγνολυτικοί ονομάζονται white rot fungi (WRF) διότι το υπόστρωμα ανάπτυξης τους είναι το ξύλο στο οποίο προκαλούν χαρακτηριστική λευκή σήψη

Οι WRF έχουν ως βασικό υπόστρωμα ανάπτυξης τις κυτταρίνη και ημικυτταρίνη και ως δευτερογενές υπόστρωμα την λιγνίνη

Χαρακτηριστικά Μυκήτων Λ. Σήψης

Χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες ικανότητες που τους καθιστούν **ιδανικούς** για χρήση σε στρατηγικές βιολογικής απορρύπανσης

- 1) Εξωκυτταρικά ένζυμα:** ο ρύπος δεν χρειάζεται να εισέλθει στον μικροοργανισμό και επίσης υπάρχει δυνατότητα αποδόμησης και ρύπων που βρίσκονται προσροφημένοι και δη προστατευμένοι στα εδαφικά κολλοειδή
- 2) Χαμηλής Εξειδίκευσης ένζυμα:** τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα μεταβολισμού της λιγνίνης, ενός πολύπλοκου πολυμερούς. Η ικανότητα τους αυτή να καταδεικνύει το ευρύ φάσμα δράσης των ενζύμων αυτών των μυκήτων.

Ένζυμα ΜΛΣ - Υπεροξειδάσες

Οι ΜΛΣ παράγουν τρεις κατηγορίες ενζύμων (υπεροξειδάσες) που οξειδώνουν την λιγνίνη παρουσία H_2O_2 (εκτός από λακκάσες)

- **Λιγνινο-υπεροξειδάσες (LiP):** Οξειδώνουν μη φαινολικά τμήματα της λιγνίνης αφαιρώντας ένα ηλεκτρόνιο και σχηματίζοντας κατιονικές ρίζες που διασπώνται χημικά
- **Μαγγάνιο-υπεροξειδάσες (MnP):** Οξειδώνουν Mn^{+2} σε Mn^{+3} το οποίο οξειδώνει φαινολικά τμήματα της λιγνίνης προς φαινοξικές ρίζες με αποτέλεσμα την διάσπαση των ουσιών
- **Λακκάσες (Lac):** Είναι Cu-οξειδάσες που χρησιμοποιούν μοριακό O_2 για την οξείδωση κυρίως φαινολικών ενώσεων προς φαινοξικές ρίζες

Γονίδια *lip* και *mnp*

Τα *lip* γονίδια *GLG1, 2, 3, 4, 5* και *6* που κωδικοποιούν την παραγωγή των LiP έχουν απομονωθεί από διάφορους μύκητες και κωδικοποιούν την παραγωγή πρωτεϊνών με 344 αμινοξέα

Επίσης τα γονίδια *mnp* που ελέγχουν την παραγωγή των MnPs έχουν απομονωθεί από το χρωμόσωμα διαφόρων μυκήτων αλλά τα *lip* γονίδια έχουν μελετηθεί περισσότερο



Προβλήματα εφαρμογής μυκήτων λευκής σήψης στην βιολογική απορρύπανση

1. Περιορισμένη γνώση της φυσιολογίας και λειτουργίας των λιγνολυτικών ενζυμικών συστημάτων των μυκήτων
2. Υψηλό κόστος μαζικής παραγωγής εμβολίου
3. Προβληματικός ο σχεδιασμός σε επίπεδο αγρού
4. Αργή δράση και χαμηλή ικανότητα ανταγωνισμού με την ενδογενή μικροβιακή κοινότητα



Εφαρμογή των Μυκήτων Λευκής Σήψης στην Βιολογική Απορρύπανση

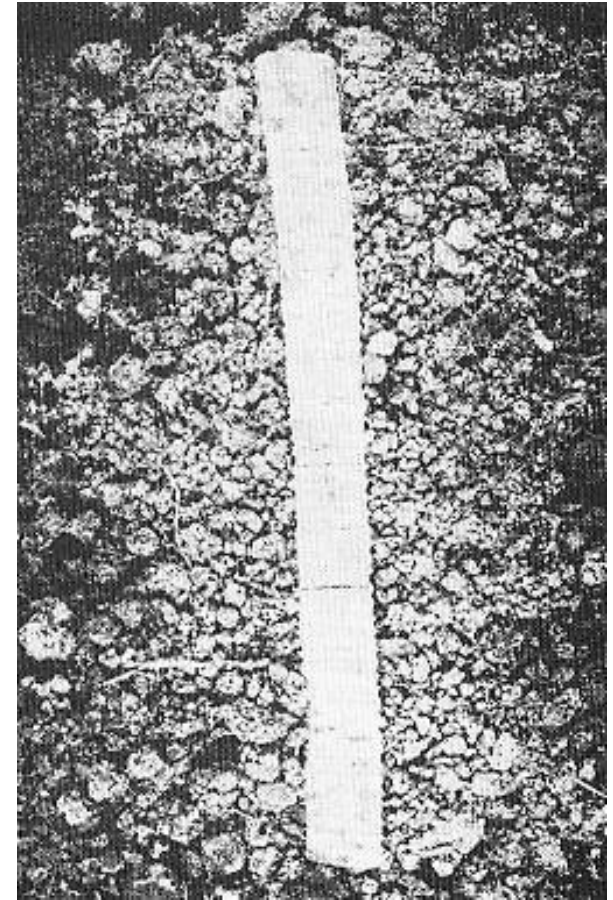
Ο μύκητας που έχει δοκιμαστεί περισσότερο και έχει δείξει και την υψηλότερη αποτελεσματικότητα στην βιολογική απορρύπανση είναι ο *Phanerochaete chrysosporium*

Άλλοι μύκητες που έχουν βρει εφαρμογή και έχουν δοκιμαστεί στην βιολογική απορρύπανση είναι οι *Phanerochaete sorbida*, *Coriolus versicolor*, *Pleurotus sp.*



Εφαρμογή των Μυκήτων Λευκής Σήψης στην Βιολογική Απορρύπανση

Οι μύκητες καλλιεργούνται επί τριμμάτων
ξύλου ή άχυρου και με την μορφή αυτή
εφαρμόζονται στο ρυπασμένο έδαφος



Τρίμματα άχυρου εξασφαλίζουν στον μύκητα το υπόστρωμα για
ανάπτυξη και παραγωγή των οξειδωτικών ενζύμων για την
αποδόμηση των οργανικών ρύπων

Παράδειγμα *ex situ* εφαρμογής μυκήτων λευκής σήψης

Ατύχημα σε εργοστάσιο επεξεργασίας ξύλου προκάλεσε
ρύπανση παρακείμενων εδαφών με υψηλές συγκεντρώσεις PCP

Το έδαφος απομακρύνθηκε, τοποθετήθηκε σε μικροτεμάχια και
εμβολιάστηκε με τους μύκητες *P. chrysosporium* & *P. sorbida*

Εντός 56 ημερών από τον εμβολιασμό του εδάφους ο μύκητας
P. sorbida αποδόμησε 89% της αρχικής ποσότητας PCP και ο
P. chrysosporium 67%

Ο μύκητας *P. sorbida* είχε την ικανότητα να διασπά και
σημαντικό αριθμό PAHs όπως φαιναθρίνη (90%) και
ανθρακένιο (80%)

Βακτήρια στην Βιολογική Απορρύπανση

Σημαντικός αριθμός βακτηρίων έχουν απομονωθεί από ρυπασμένα εδάφη που έχουν την ικανότητα να αποδομούν γεωργικά φάρμακα, πετρέλαια, PCP, PCBs.

Η χρήση βακτηρίων στην βιολογική απορρύπανση αποτελεί σημαντική μέθοδο ιδιαίτερα μέσω ενεργοποίησης της ενδογενούς μικροχλωρίδας με την δημιουργία βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης

Η προσθήκη βακτηρίων στο έδαφος για την βιολογική απορρύπανση εδαφών έχει δοκιμασθεί σε πλήθος περιπτώσεων με αντικρουόμενα αποτελέσματα

Προβλήματα εφαρμογής βακτηρίων στην βιολογική απορρύπανση

- 1) Κατά κανόνα τα εξωγενή βακτήρια (βιολογικός εμπλουτισμός) δεν έχουν την ικανότητα να ανταγωνιστούν την ενδογενή μικροβιακή κοινότητα
- 2) Τα καταβολικά ένζυμα των βακτηρίων είναι συνήθως εξειδικευμένα για το μεταβολισμό περιορισμένου αριθμού οργανικών ρύπων και συνεπώς η χρήση τους περιορίζεται μόνο σε περιπτώσεις που το έδαφος περιέχει ένα μόνο σημαντικό ρύπο

