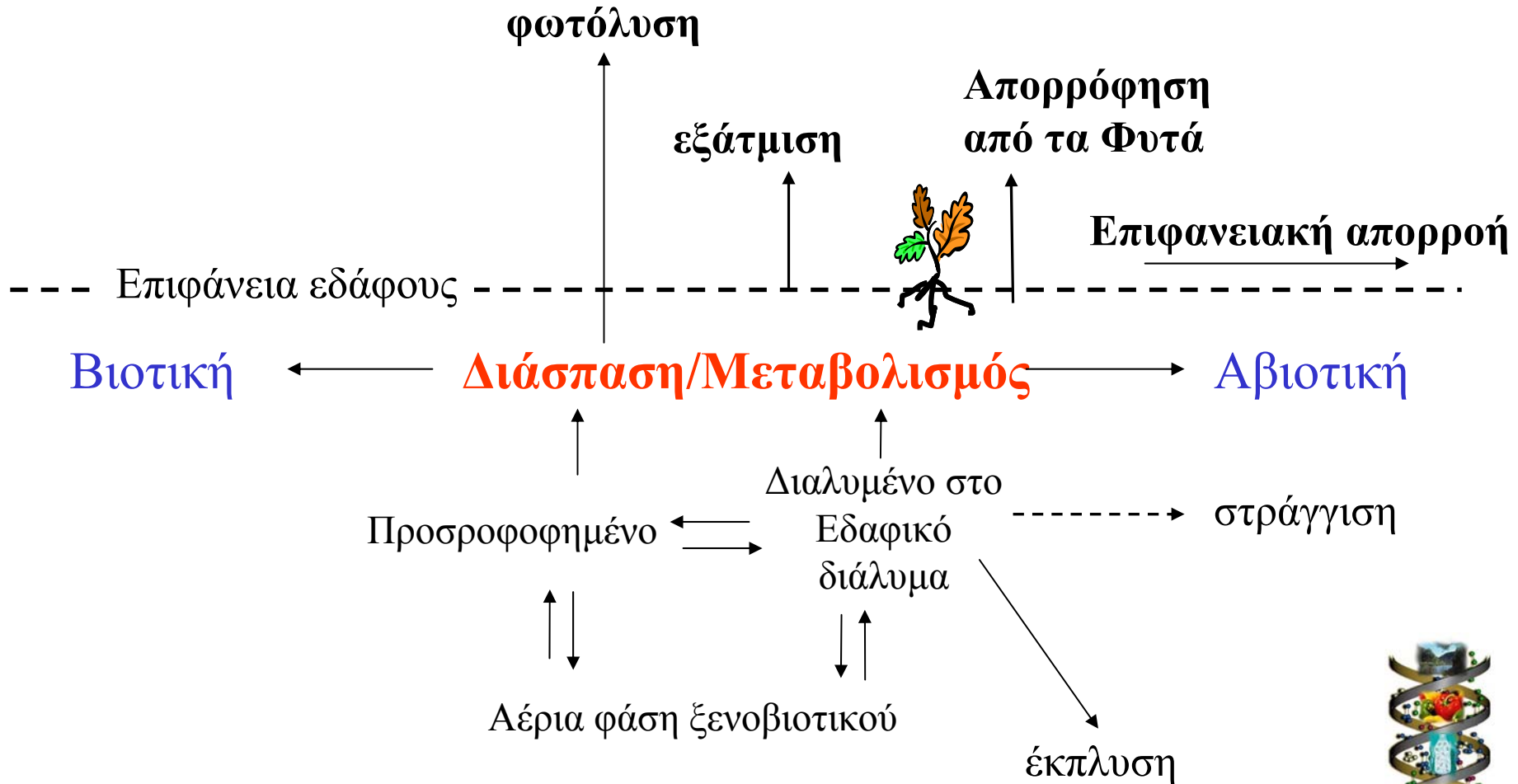


# Αποδόμηση Ξενοβιοτικών Ουσιών στο Περιβάλλον

*Δημήτριος Καρπούζας*



# Περιβαλλοντική Τύχη Γεωργικών Φαρμάκων



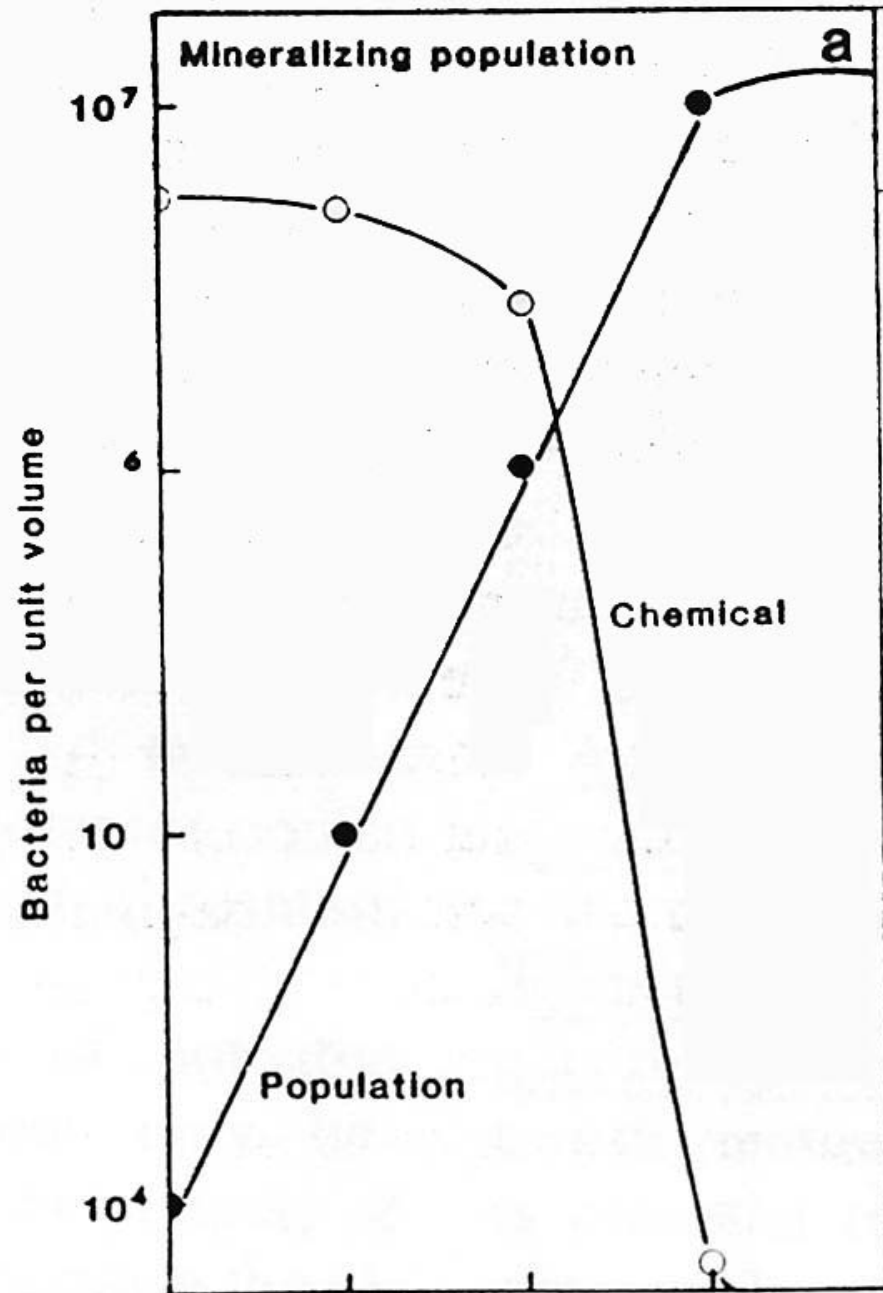
# Μικροβιακή Διάσπαση Γεωργικών Φαρμάκων

- Συμμεταβολισμός
- Ανοργανοποίηση



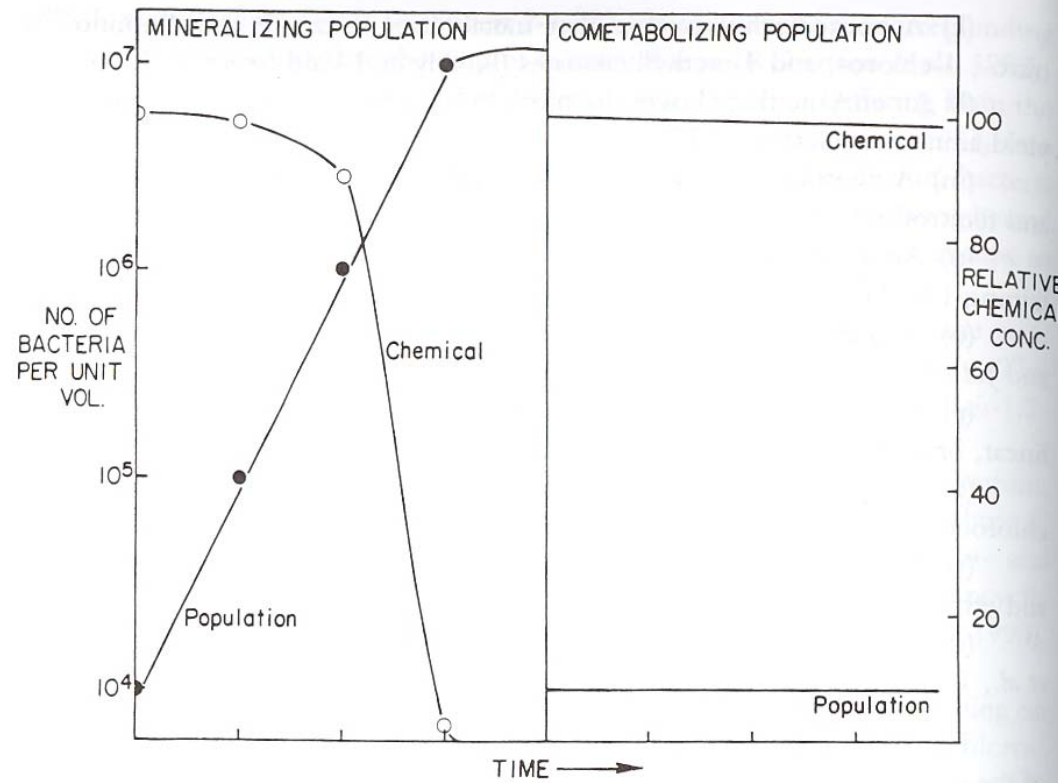
# Ανοργανοποίηση

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



# 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 που βρίσκονται στο περιβάλλον.



# Γιατί πρέπει να γνωρίζουμε το μεταβολικό μονοπάτι των ξενοβιοτικών ουσιών;

- **Αποτελεσματικότητα** – Σε περιπτώσεις όπου ο μεταβολισμός οδηγεί σε ενεργοποίηση, δηλ. προϊόν με αυξημένη βιολογική δράση
- **Λόγους Έγκρισης Χρήσης** – για προϊόντα μεταβολισμού που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης από περιβαλλοντικής άποψης

## (Τι σημαίνει?)

- Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά (bioconcentration potential?)
- Τοξικολογική Αξιολόγηση (Ecotoxicity, Mammalian toxicity, etc)
- Κίνδυνος έκπλυσης και αξιολόγηση του περιβαλλοντικού κινδύνου

# Πως μπορούμε να παρακολουθήσουμε το μεταβολικό μονοπάτι μιας ξενοβιοτικής ουσίας?

- Χρωματογραφική Ανάλυση
- $^{14}\text{C}$  – σημασμένα ξενοβιοτικά μόρια



# Χρωματογραφική Ανάλυση

Εφαρμογή στο έδαφος και μετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα της συγκέντρωσης της μητρικής ουσίας και των προϊόντων μεταβολισμού

- Ανάλυση με αέρια (GC) ή υγρή χρωματογραφία (HPLC)
- Επιβεβαίωση σε σύστημα **GC-MS** ή **LC-MS**





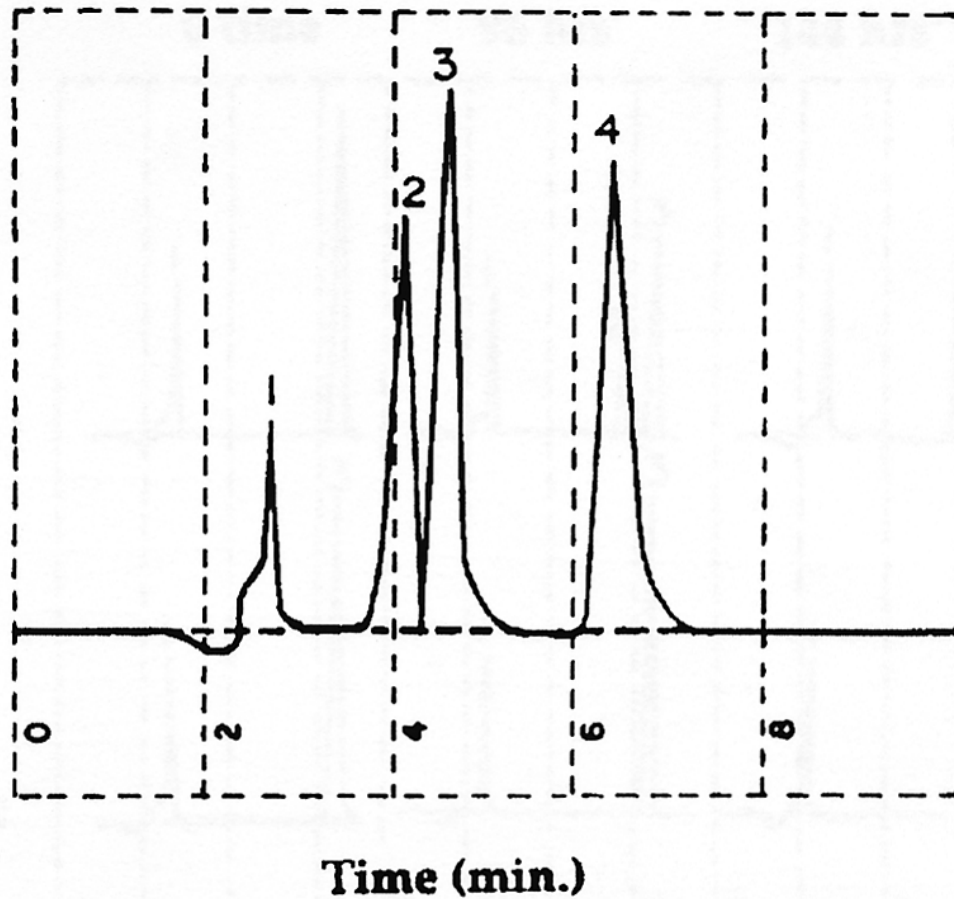
# Χρωματογραφική Ανάλυση

## Πλεονεκτήματα:

- Αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των προϊόντων μεταβολισμού
- Πιθανή αναγνώριση της κινητικής του μεταβολισμού

## Μειονεκτήματα:

- Δεν είναι πάντα δυνατός ο υπολογισμός του τελικού ισοζυγίου μάζας
- Ακριβός εξοπλισμός απαραίτητος
- Σχετικά επίπονες διεργασίες για την εκχύλιση και ανάλυση των ουσιών



Χρωματογράφημα από Υγρό Χρωματογράφο όπου οι κορυφές αντιστοιχούν (2) aldicarb sulfoxide, (3) aldicarb sulfone και (4) aldicarb parent

# Χρήση $^{14}\text{C}$ -σημασμένων ξενοβιοτικών

Εφαρμογή  $^{14}\text{C}$ -επισημασμένων γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος και μέτρηση σε scintillation counter ανά τακτά χρονικά διαστήματα:

- $^{14}\text{CO}_2$  που ελευθερώθηκε
- Ποσότητα  $^{14}\text{C}$  στο έδαφος που εκχυλίζεται με οργανικούς διαλύτες
- Ποσότητα  $^{14}\text{C}$  που είναι μη-αντιστρεπτά δεσμευμένη στο έδαφος (bound residues) - **Υγρή καύση εδάφους ( $\text{K}_2\text{CrO}_7$ )**
- Πιθανή αναγνώριση μεταβολιτών – **Εφαρμογή Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)**

# Χρήση $^{14}\text{C}$ -επισημασμένων ξενοβιοτικών

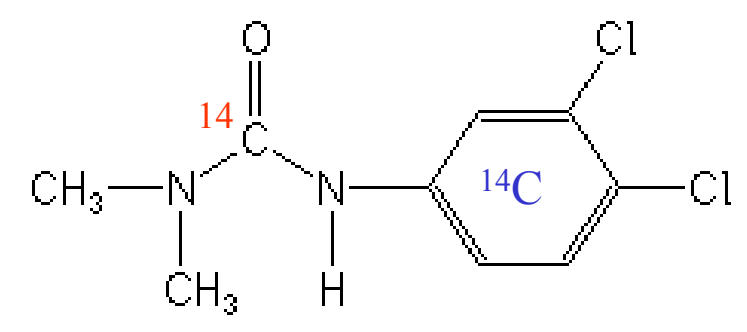
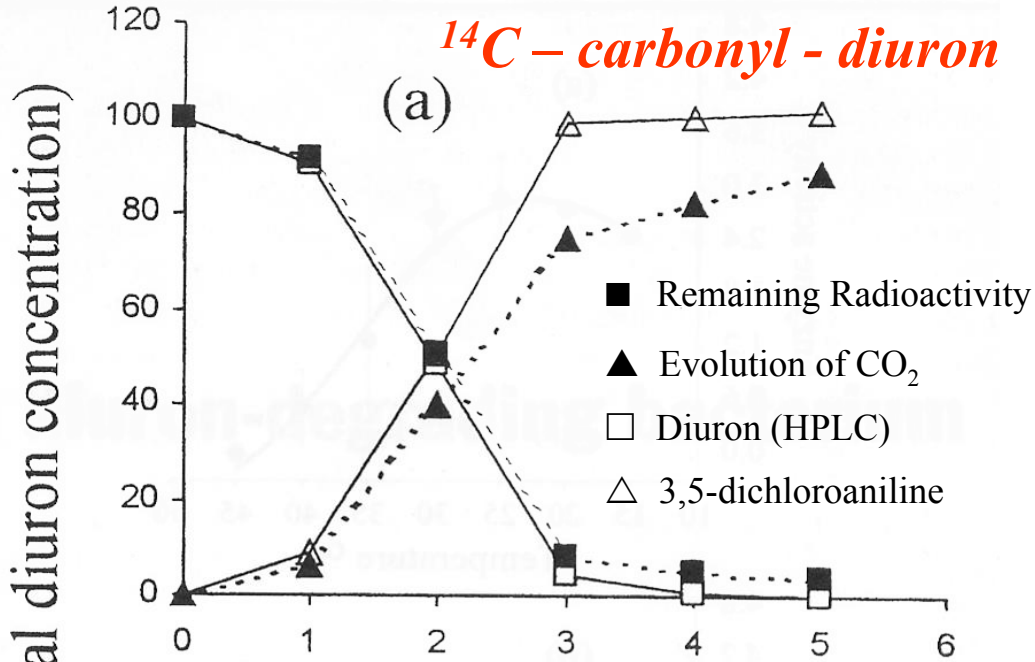
## Πλεονεκτήματα:

- Ακριβής Υπολογισμός του Ισοζυγίου Μάζας
- Χαμηλότερο κόστος εξοπλισμού

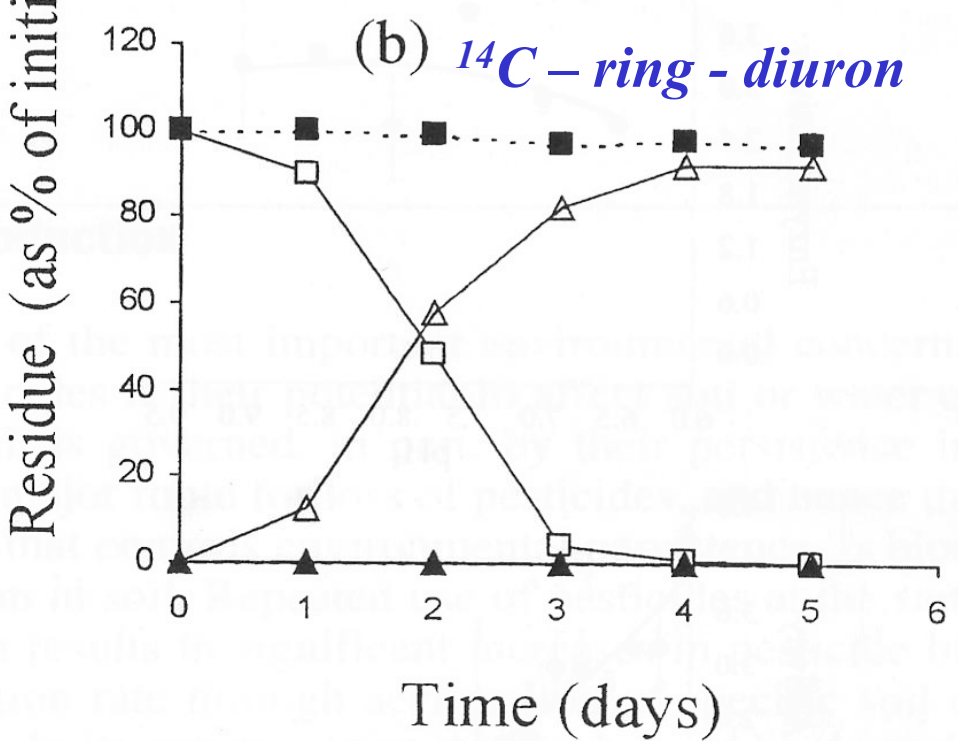
## Μειονεκτήματα:

- Απαραίτητη η χρήση εξοπλισμού εργαστηρίων
- Δεν είναι πάντα δυνατή



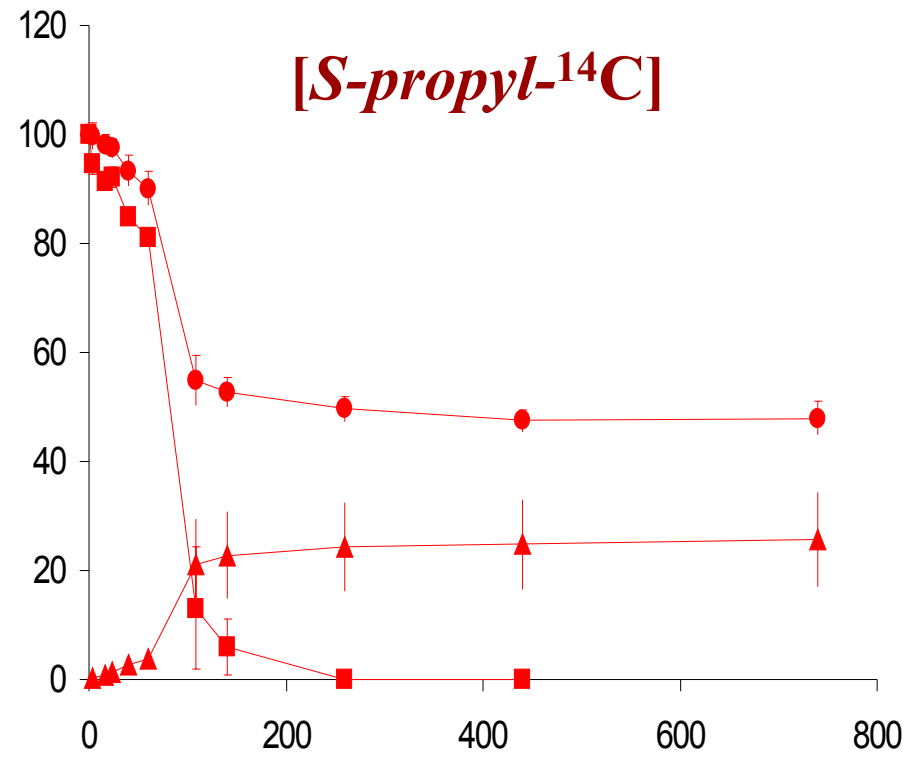
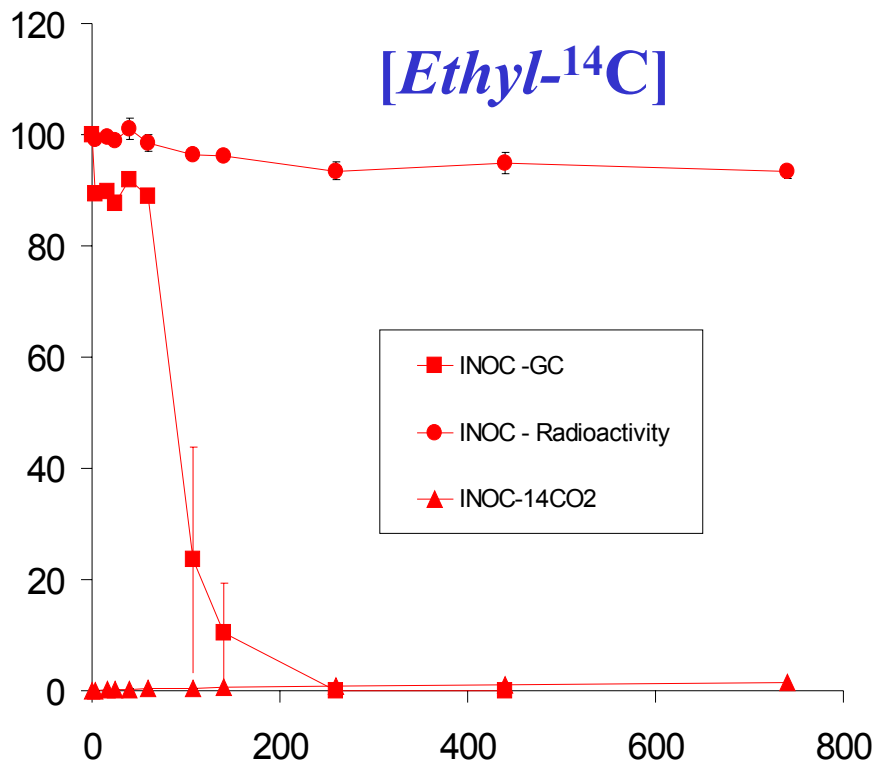
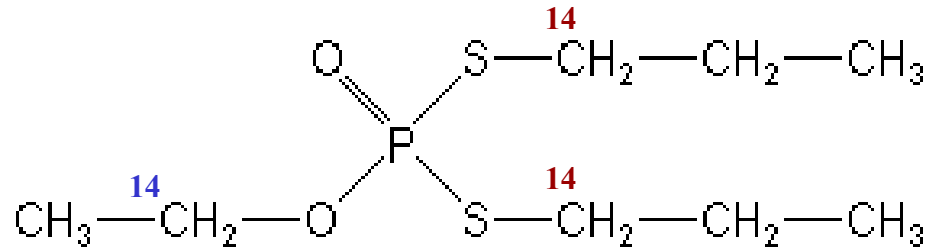


Διάσπαση <sup>14</sup>C-labelled diuron από βακτήρια εδάφους



Η χρήση <sup>14</sup>C-radio-labelled diuron σε δύο διαφορετικά σημεία του μορίου (**carbonyl** και **ring labelled**) για εξακρίβωση του μεταβολικού μονοπατιού του

# Διάσπαση [*ethyl-<sup>14</sup>C*] ή [*S-propyl-<sup>14</sup>C*] ethoprophos στο έδαφος



Time (hours)

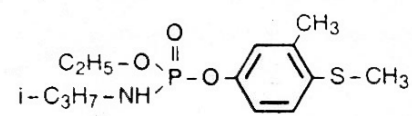
# Ισοζύγιο μάζας – <sup>14</sup>C-labelled Linuron

Soils	Mineralisation (% <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> of added <sup>14</sup> C)	Water extraction (% of added <sup>14</sup> C)	Methanol extraction (% of added <sup>14</sup> C)	Residual <sup>a</sup> (% of added <sup>14</sup> C)	Sum (% of added <sup>14</sup> C)
S 1	9.6	7.4	56.6	13.8	87.4
S 2	14.9	2.5	42.2	23.4	83.0
S 3	4.8	3.6	56.5	22.4	87.3
S 4	1.7	3.7	62.5	22.6	90.6
S 5	1.9	3.9	59.2	29.7	94.6
S 6	1.0	2.7	59.9	27.1	90.8
S 7	0.6	3.2	62.9	24.1	90.8
S 8	13.5	2.7	45.4	23.2	84.8
S 9	1.9	4.0	59.8	26.2	92.0
S 10	2.3	4.4	62.7	19.9	89.3
S 11	7.2	2.7	54.1	25.2	89.1

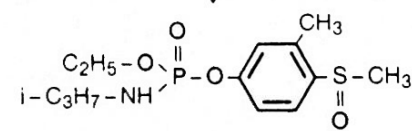
**TLC ανάλυση** από εκχυλίσματα μεθανόλης από το έδαφος δεν έδειξαν συσσώρευση από πιθανά προϊόντα μεταβολισμού που να είναι επισημασμένοι με <sup>14</sup>C

<sup>a</sup> measured by oxidation of sub-samples with capture of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produced.

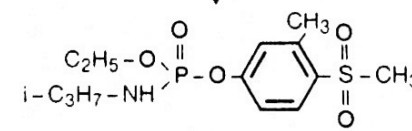
temp, °C	day	extr <sup>b</sup>	1	2	3	5	6	7	TTR <sup>c</sup>	nonextr	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub>	recovery
<b>Canada (I)</b>												
22	15	74.5	14.6	45.0	6.2	3.9	4.8	0.0	65.8	18.5	1.3	94.3
	50	53.5	2.9	24.3	6.3	3.7	14.9	1.4	33.5	36.2	8.3	97.7
	90	45.3	2.2	27.7	4.3	2.7	16.7	2.7	34.2	34.8	17.0	97.1
16	15	79.9	33.5	41.2	2.1	2.1	1.0	0.0	76.8	14.8	0.6	95.3
	50	70.1	10.0	37.8	7.2	4.8	10.3	0.0	55.0	21.5	3.4	95.0
	90	54.3	5.3	25.4	4.5	3.4	14.4	1.3	35.2	31.6	10.4	96.3
<b>Sweden (II)</b>												
22	15	85.7	7.8	65.3	9.0	1.3	2.3	0.0	82.1	6.3	1.7	93.7
	50	70.8	1.5	35.6	19.0	1.1	11.9	1.7	56.1	12.2	8.1	91.1
	90	55.7	0.8	21.0	14.1	0.9	14.8	3.9	35.9	18.5	16.2	90.4
16	15	87.8	18.0	65.7	3.6	0.5	0.0	0.0	87.3	3.7	0.6	92.1
	50	81.5	8.6	53.9	11.7	2.1	5.2	0.0	74.2	8.1	3.1	92.7
	90	77.7	4.9	49.8	14.3	2.0	6.0	0.7	69.0	9.1	4.8	91.6



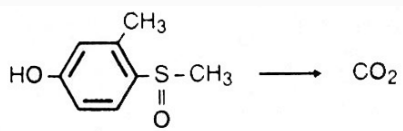
1



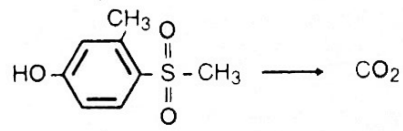
2



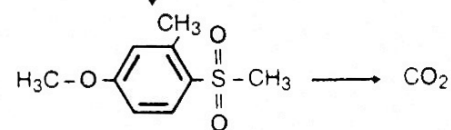
3



5



6



TLC επιβεβαίωση μεταβολιτών

Ακριβές Ισοζύγιο Μάζας



# Μικροβιακός Μεταβολισμός Επιλεγμένων Ομάδων Γεωργικών Φαρμάκων

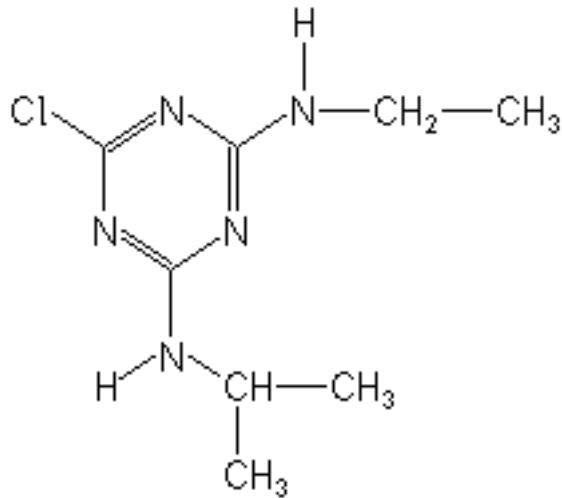


# Ζιζανιοκτόνα Τριαζίνες

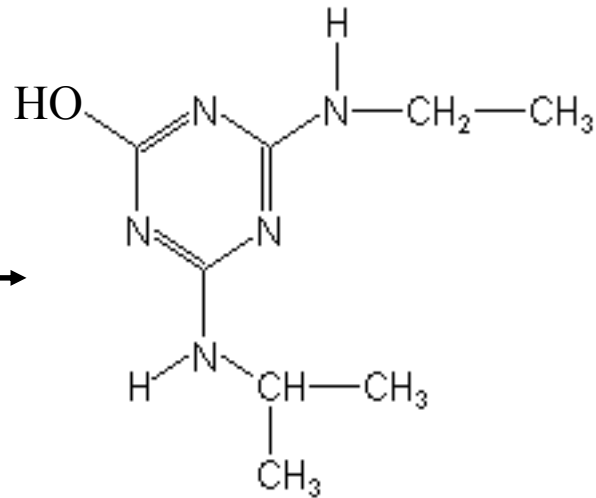
- Χημική Διάσπαση
- Μικροβιακή Διάσπαση



# Τριαζίνες – Αβιοτικός μεταβολισμός



atrazine



hydroxy-atrazine

Υπό όξινες συνθήκες ( $\text{pH} < 5$ ) το atrazine και τα περισσότερα τριαζινικά ζιζανιοκτόνα διασπώνται μέσω χημικής υδρόλυσης προς hydroxy-triazine

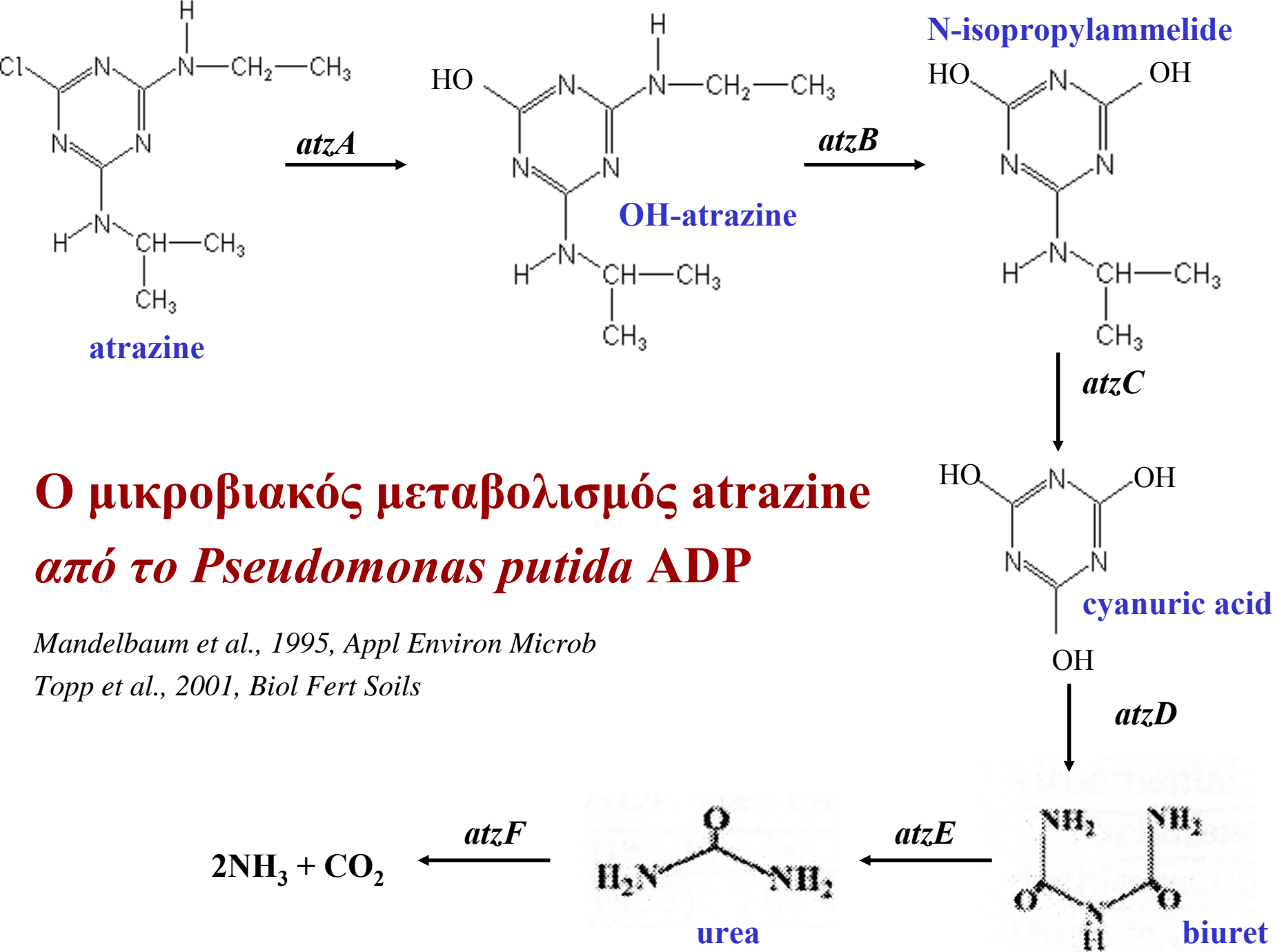
# Τριαζίνες – Μικροβιακός Μεταβολισμός

Διάφορα μεταβολικά μονοπάτια των τριαζινών έχουν παρατηρηθεί σε εδάφη από :

- Βακτήρια σε αμιγής καλλιέργειες (*Pseudomonas putida* ADP)
- Κοινοπραξίες μικροοργανισμών

Και στις δύο περιπτώσεις μπορούμε να παρατηρήσουμε πλήρη ανοργανοποίηση των τριαζινών



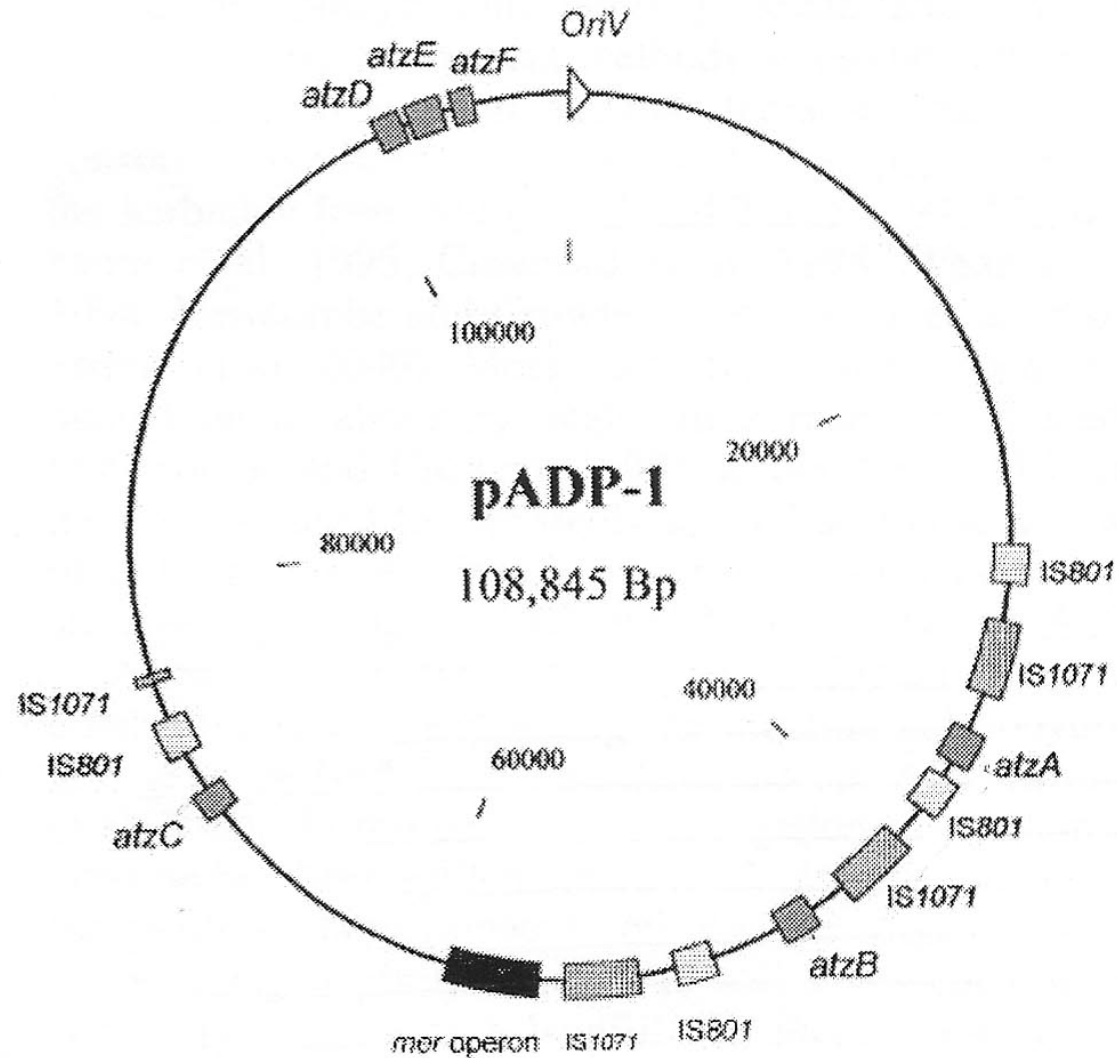


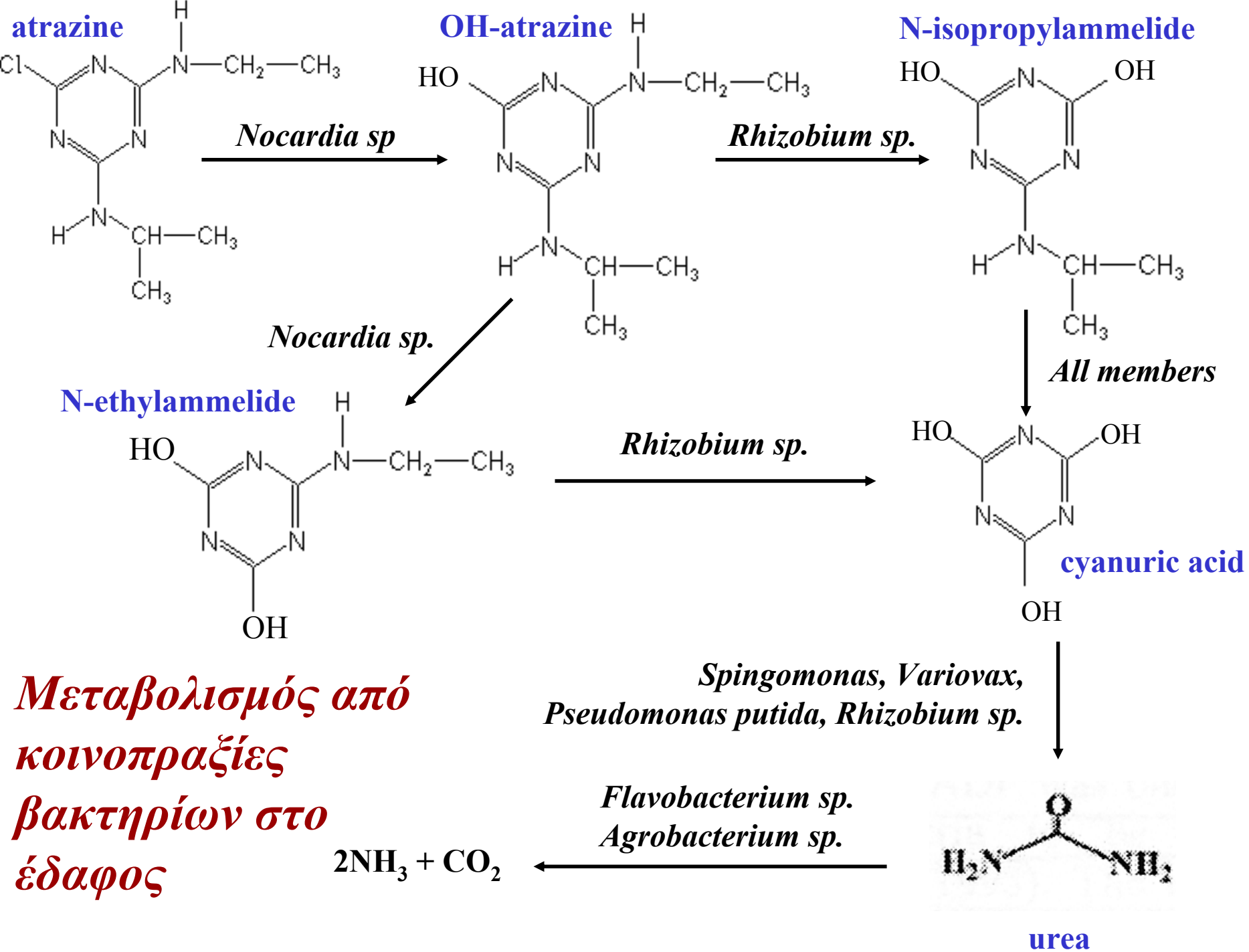
## Ο μικροβιακός μεταβολισμός atrazine από το *Pseudomonas putida* ADP

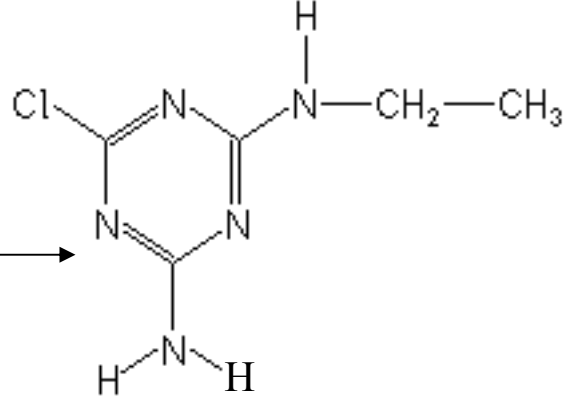
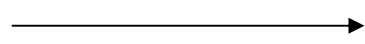
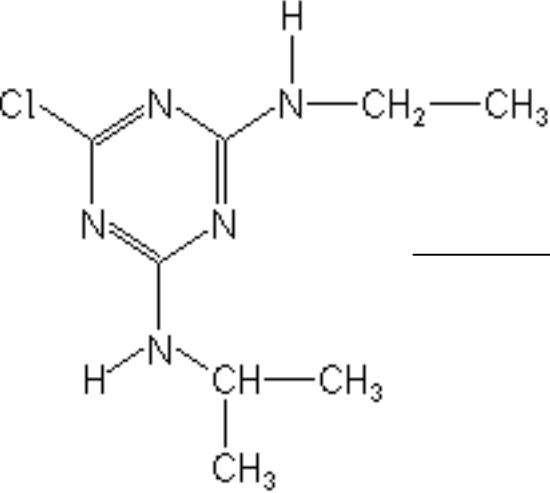
Mandelbaum et al., 1995, Appl Environ Microb

Topp et al., 2001, Biol Fert Soils

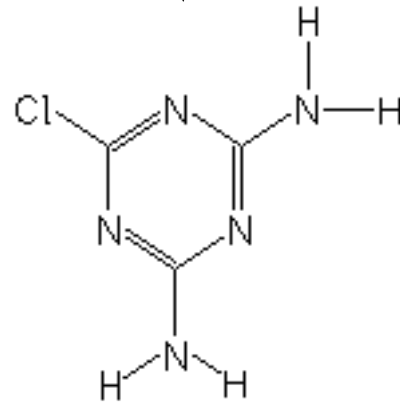
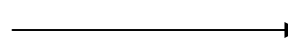
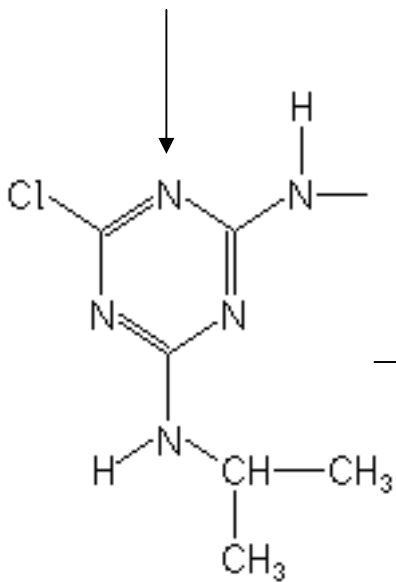
Το βακτήριο *Pseudomonas putida* ADP κατέχει το πλασμίδιο pADP-1 συνολικού μεγέθους 109 kb στο οποίο περιέχονται τα γονίδια *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, *atzF* που κωδικοποιούν τα διάφορα στάδια για την ανοργανοποίηση του atrazine







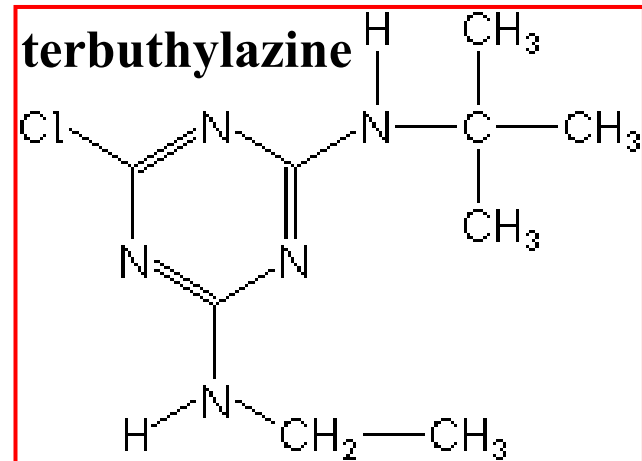
**Deisopropylatrazine (DIA)**



**Desethylisopropylatrazine (DEIA)**

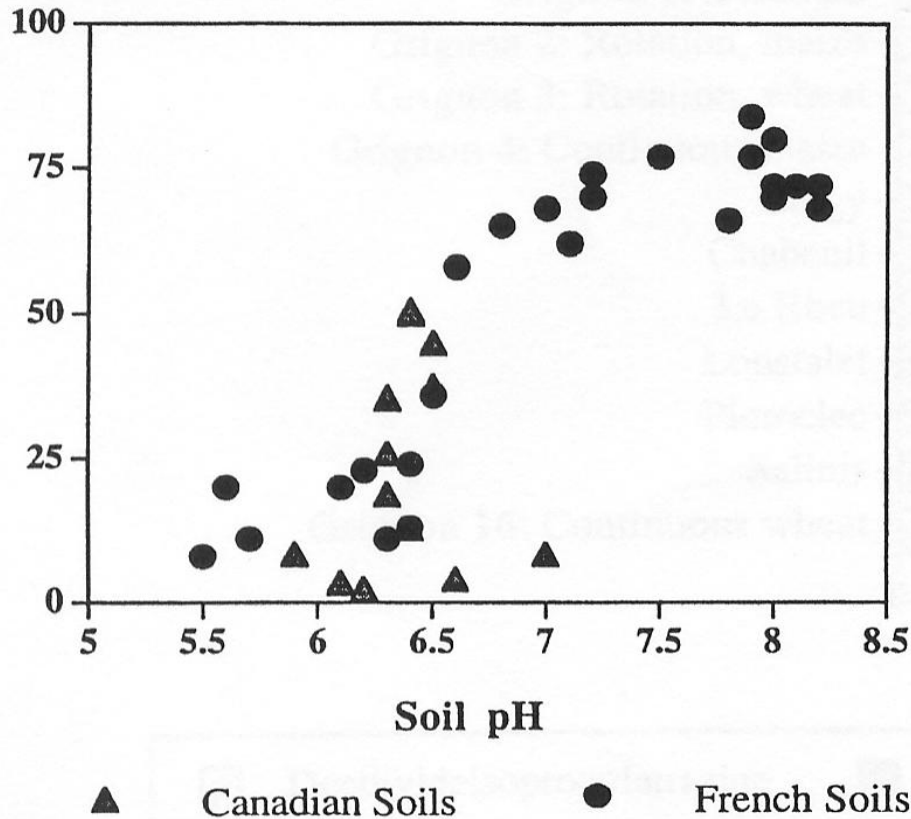
**Desethylatrazine (DEA)**

Το σύννηθες μονοπάτι μεταβολισμού των τριαζινών στο έδαφος ειδικότερα όταν οι τριαζίνες συμμετολίζονται από μη-εξειδικευμένους μικροοργανισμούς





Mineralized Atrazine  
(% initial  $^{14}\text{C}$ )



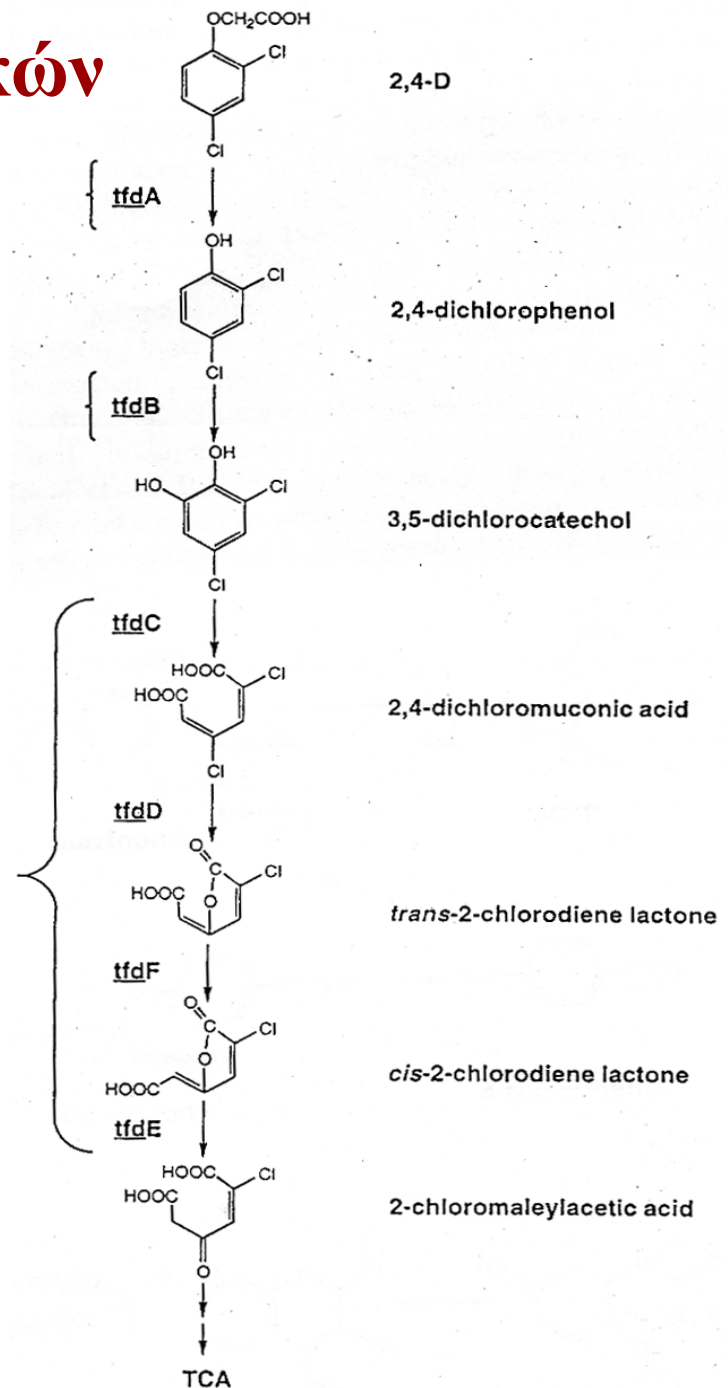
**Η επίδραση του pH στην διάσπαση των τριαζινών στο έδαφος:**

- **Υψηλό pH ευνοεί τα βακτήρια** που ανοργανοποιούν ταχύτατα
- **Χαμηλό pH δεν ευνοεί τα βακτήρια αλλά τους μύκητες στο έδαφος** που συνήθως είναι μη-εξειδικευμένοι αποδομητές

# Μεταβολισμός Φαινοξυαλκανοϊκών Οξέων στο έδαφος

Το βακτήριο *Ralstonia eutrophus* κατέχει το πλασμίδιο pJ4 στο οποίο περιέχονται όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα για την ανοργανοποίηση του ζιζανιοκτόνου 2,4-D

Τα γονίδια ***tfdC***, ***tfdD***, ***tfdF***, ***tfdE*** περιέχονται στο ίδιο οπερόνιο του πλασμιδίου ενώ τα γονίδια ***tfdA***, ***tfdB*** περιέχονται σε διαφορετικά οπερόνια του ίδιου πλασμιδίου



# Εντομοκτόνα

## Μεταβολισμός Καρβαμιδικών

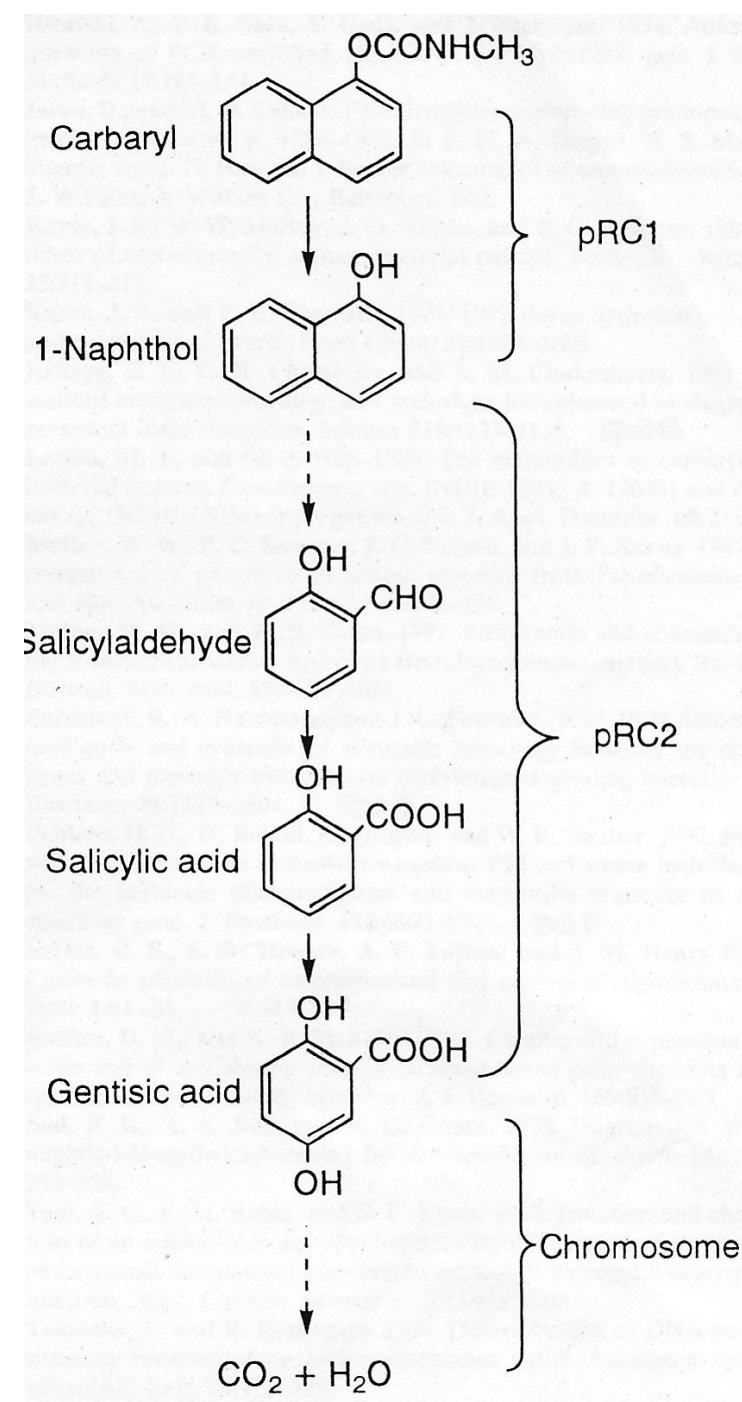
- **Υδρόλυση:** Διάσπαση του καρβονυλικού δεσμού που οδηγεί σε απώλεια της εντομοκτόνου δράσης
- **Οξείδωση:** Υδροξυλίωση των αρωματικών δακτυλίων που οδηγεί συνήθως σε προϊόντα χωρίς εντομοκτόνο δράση



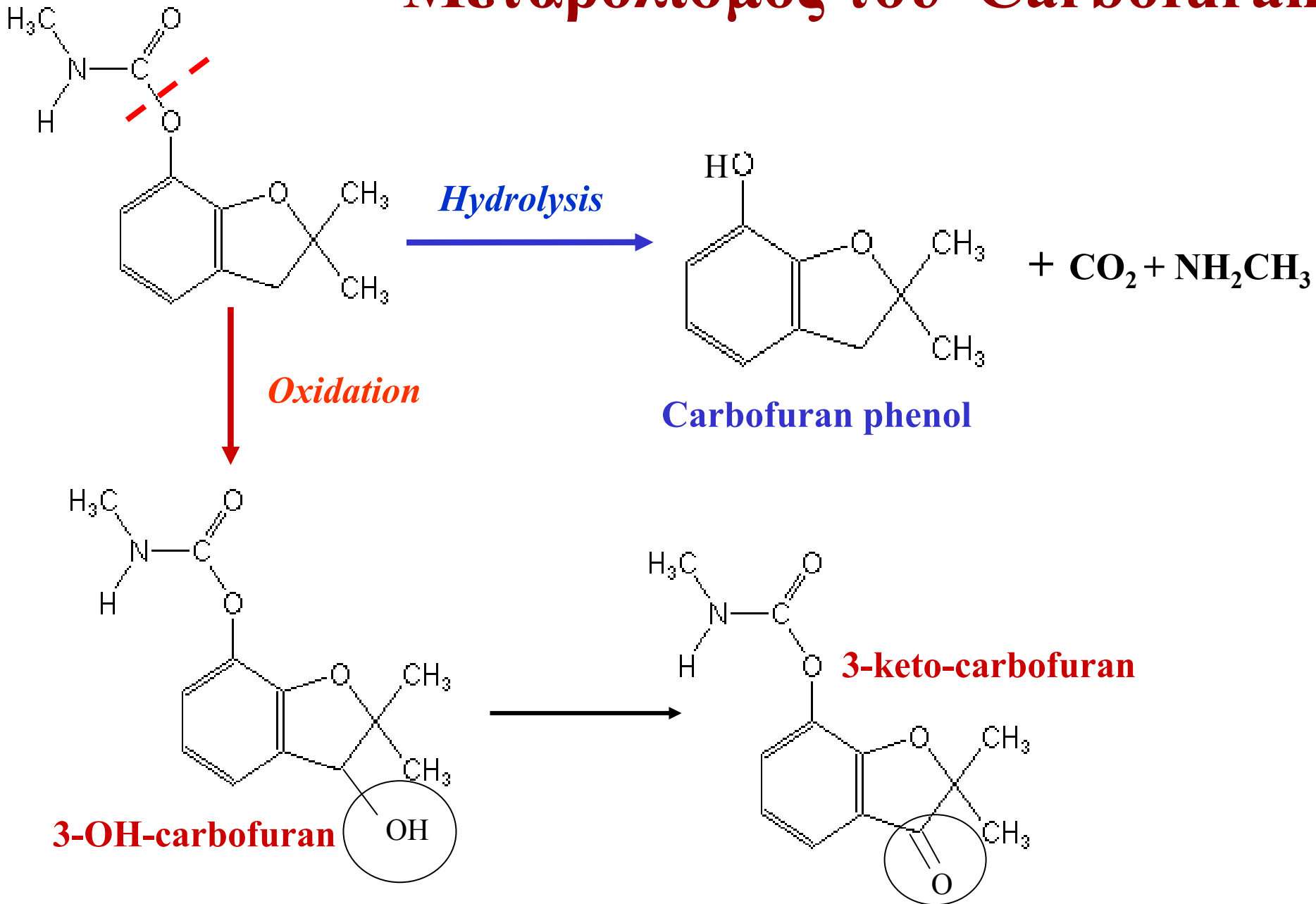
# Μεταβολισμός Carbaryl από Βακτήρια Εδάφους

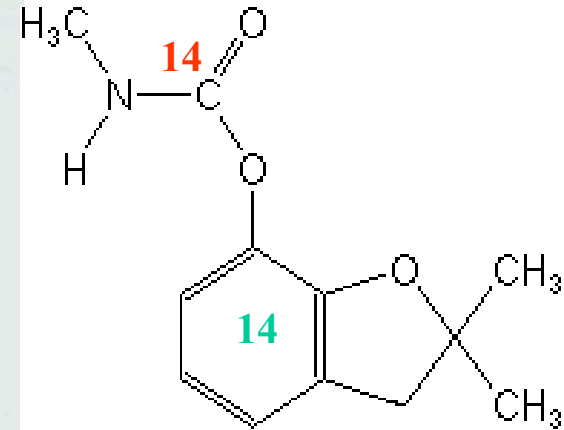
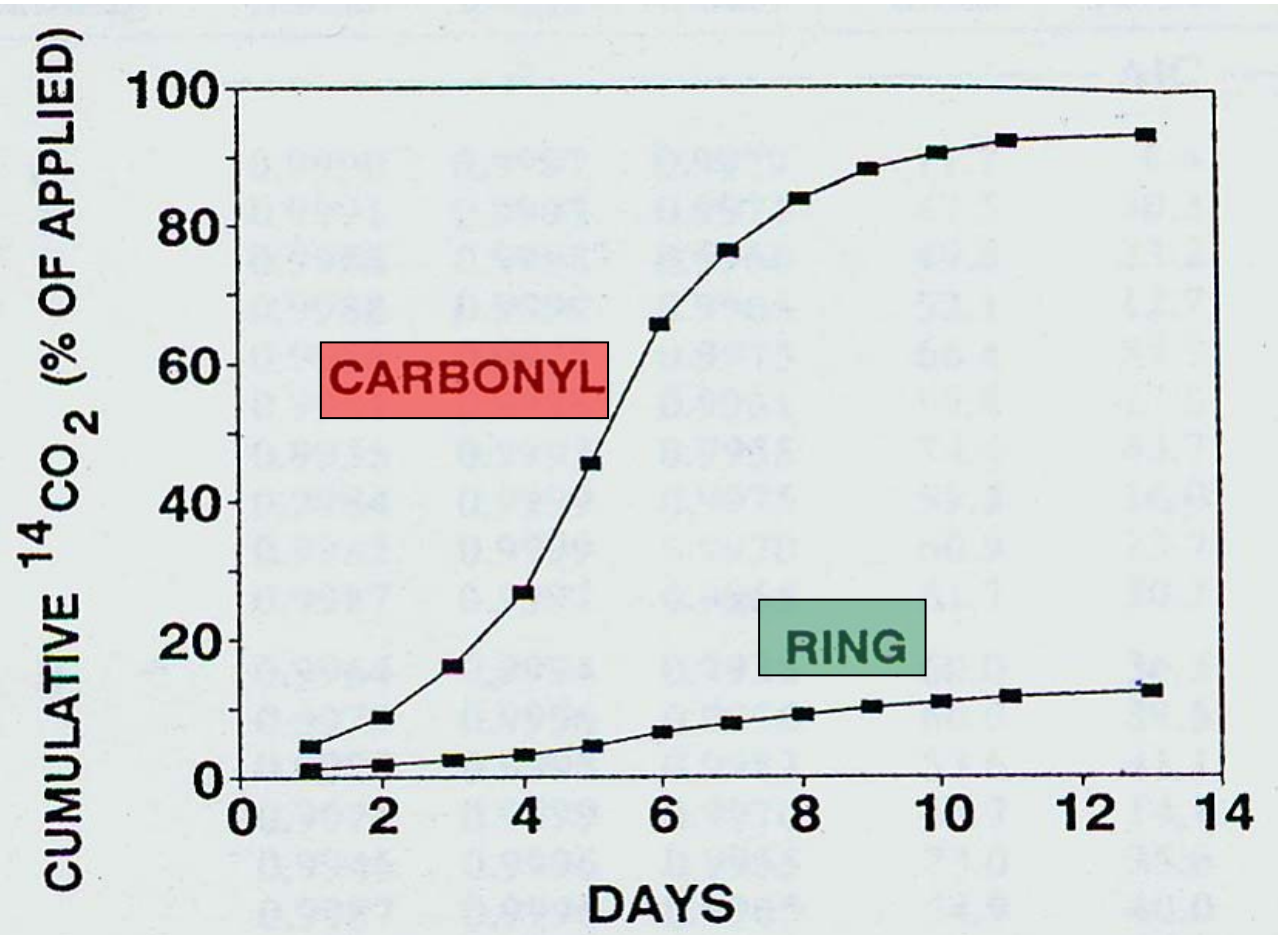
Βακτήρια του γένους *Arthrobacter* απομονώθηκαν από εδάφη όπου είχε παρατηρηθεί ταχύτατη διάσπαση του carbaryl

Το *Arthrobacter* κατείχε δύο μεγάλα πλασμίδια pRC1 και pRC2 που περιέχουν δύο γονίδια που κωδικοποιούν όλα τα βήματα για την πλήρη διάσπαση του carbaryl



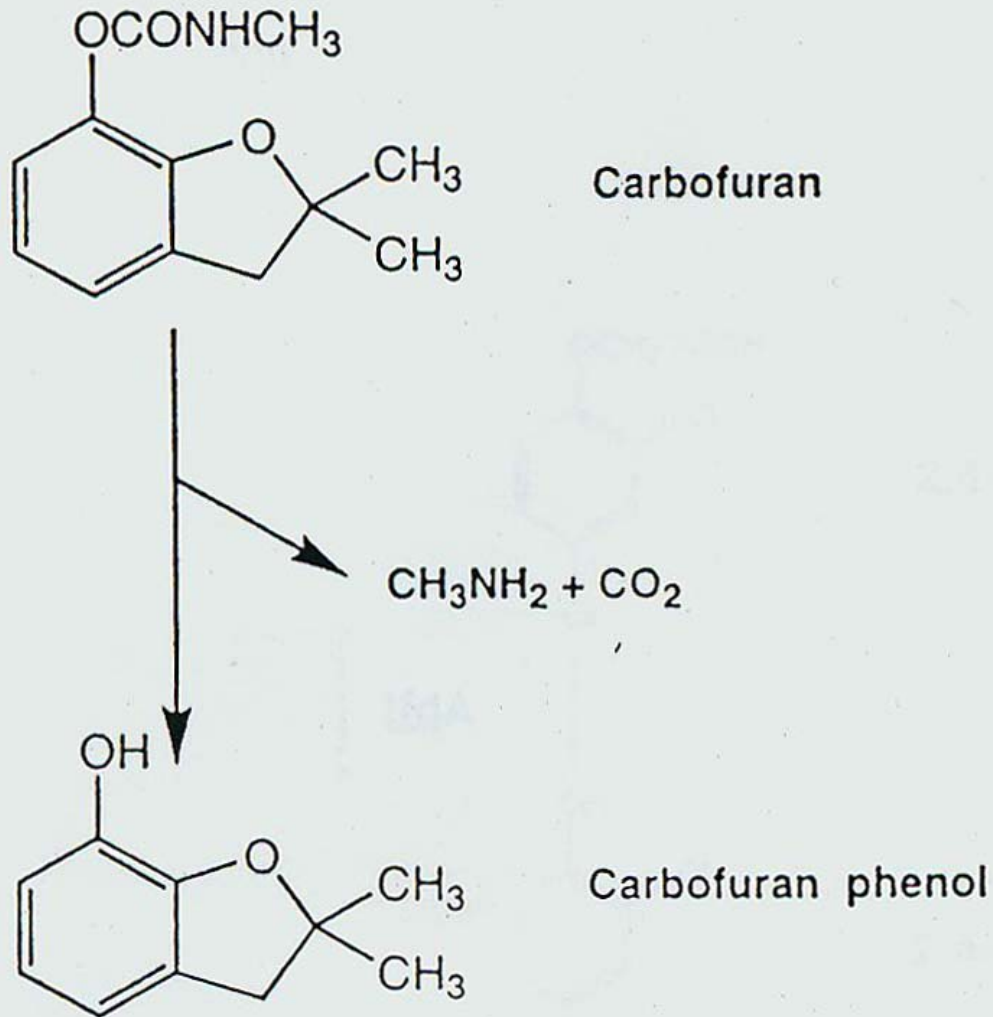
# Μεταβολισμός του Carbofuran





Χρήση <sup>14</sup>C-επισημασμένου carbofuran στο **καρβονύλιο** ή **στον δακτύλιο** μας δίνει την δυνατότητα να αποκωδικοποιήσουμε το μεταβολικό μονοπάτι

# Μικροβιακός Μεταβολισμός Carbofuran – Υδρόλυση Καρβονυλικού Δεσμού



Μερικά βακτήρια εδάφους έχουν απομονωθεί που μπορούν να διασπάσουν ταχύτατα το carbofuran διαμέσου διάσπασης του καρβονυλικού δεσμού.

Τα βακτήρια αυτά κατέχουν το γονίδιο *mcd* σε πλασμίδια

# Μικροβιακός μεταβολισμός Λοιπών Καρβαμιδικών

## ➤ Aldicarb

- **Υδρόλυση:**

Οδηγεί σε ταχύτατη απώλεια της βιοκτόνου δράσης

Χημική ή βιολογική διεργασία που λαμβάνει χώρα σε αλκαλικά εδάφη

- **Οξείδωση:**

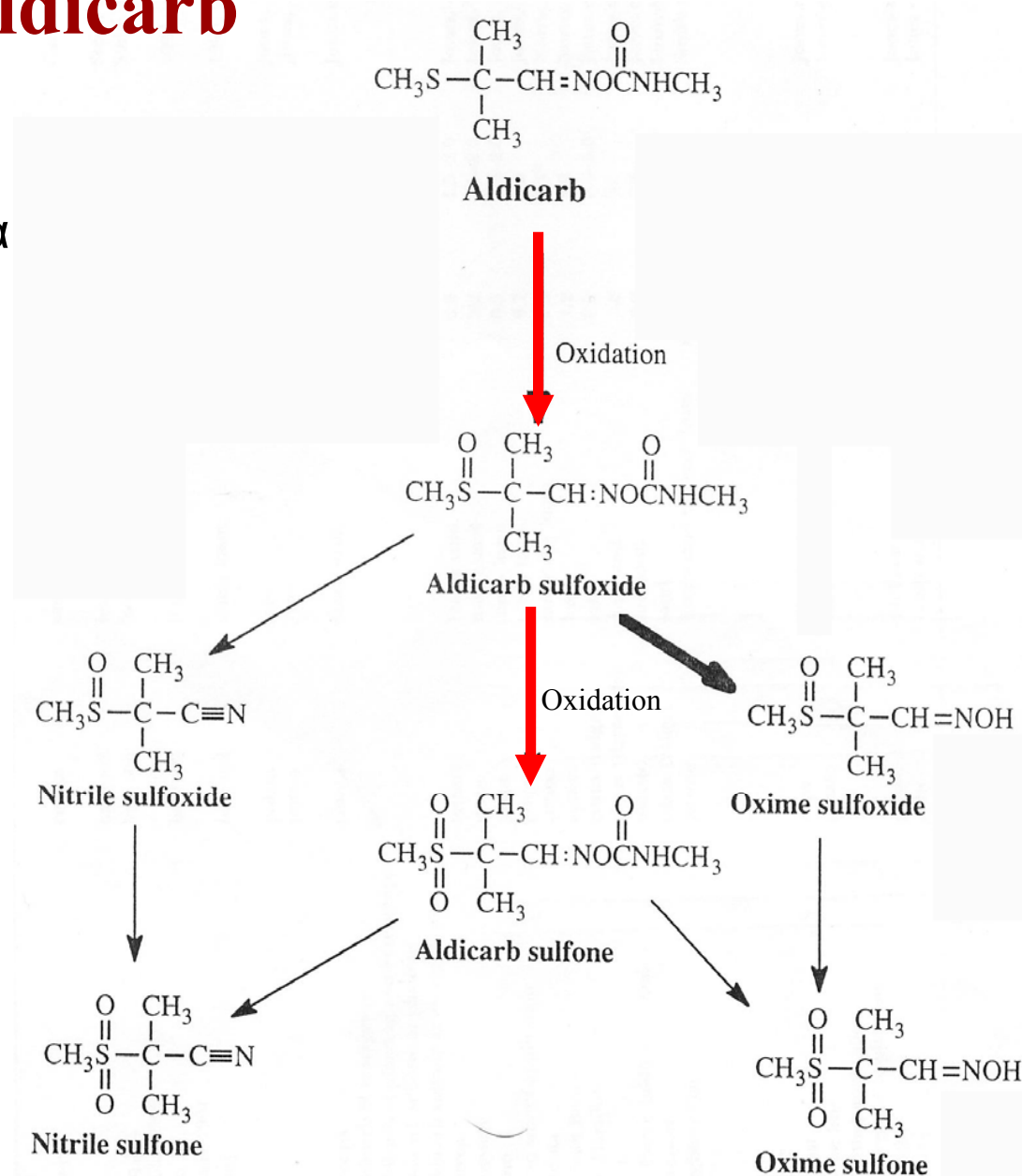
Οδηγεί σε διατήρηση ή επιτάχυνση της βιολογικής δράσης



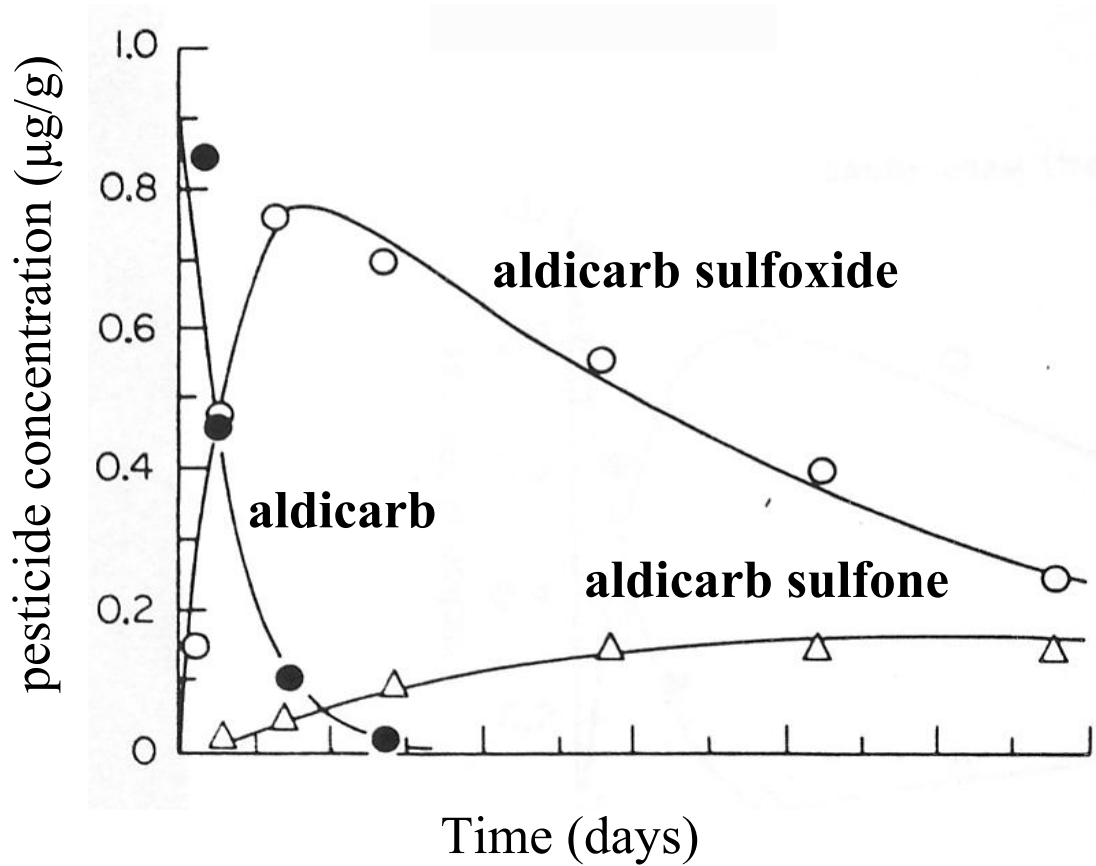
# Μεταβολισμός του Aldicarb

➤ **Οξείδωση:** Σταδιακή μετατροπή προς σουλφοξειδία και σουλφόνες που έχουν εντομοκτόνο δράση

➤ **Υδρόλυση:** Σχηματισμός οξιμών και νιτριλίων που δεν έχουν εντομοκτόνο δράση



# Κινητική του μεταβολισμού του aldicarb



*Smelt et al., 1983, Pesticide Science*



# Μεταβολισμός Οργανοφωσφορικών στο έδαφος

- Υδρόλυση:

Οδηγεί σε απώλεια της βιολογικής δράσης

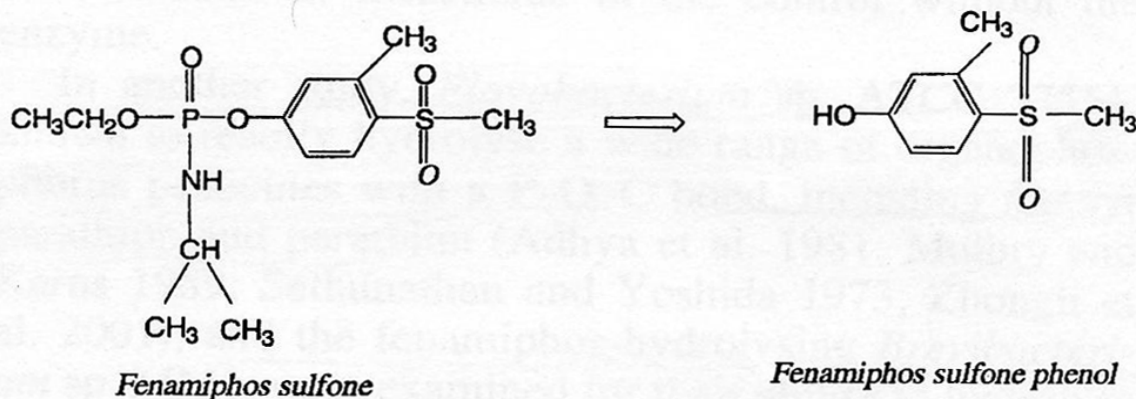
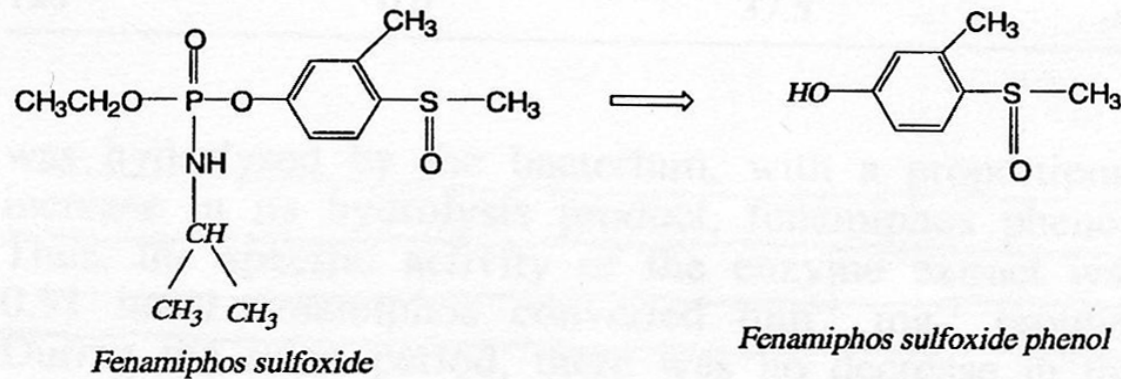
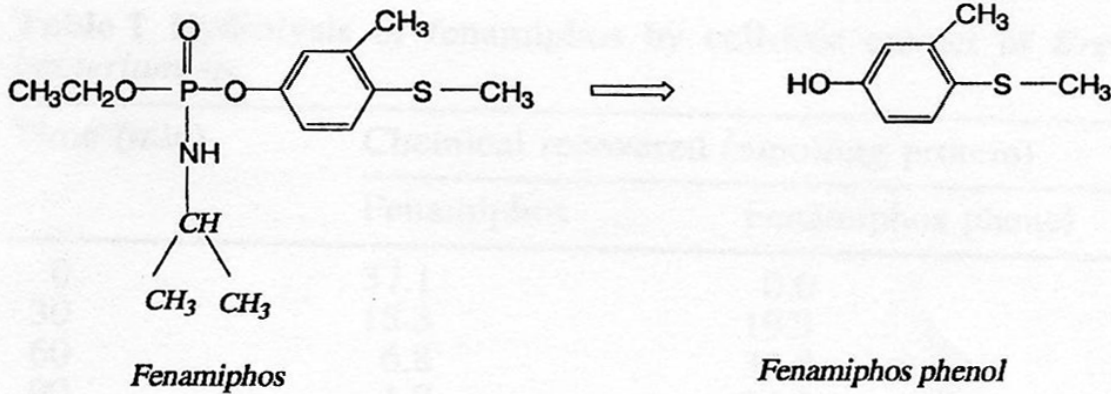
**Χημική ή βιολογική διεργασία** που ευνοείται σε αλκαλικά  
pH

- Οξείδωση

Οδηγεί σε διατήρηση ή αύξηση της βιολογικής δράσης

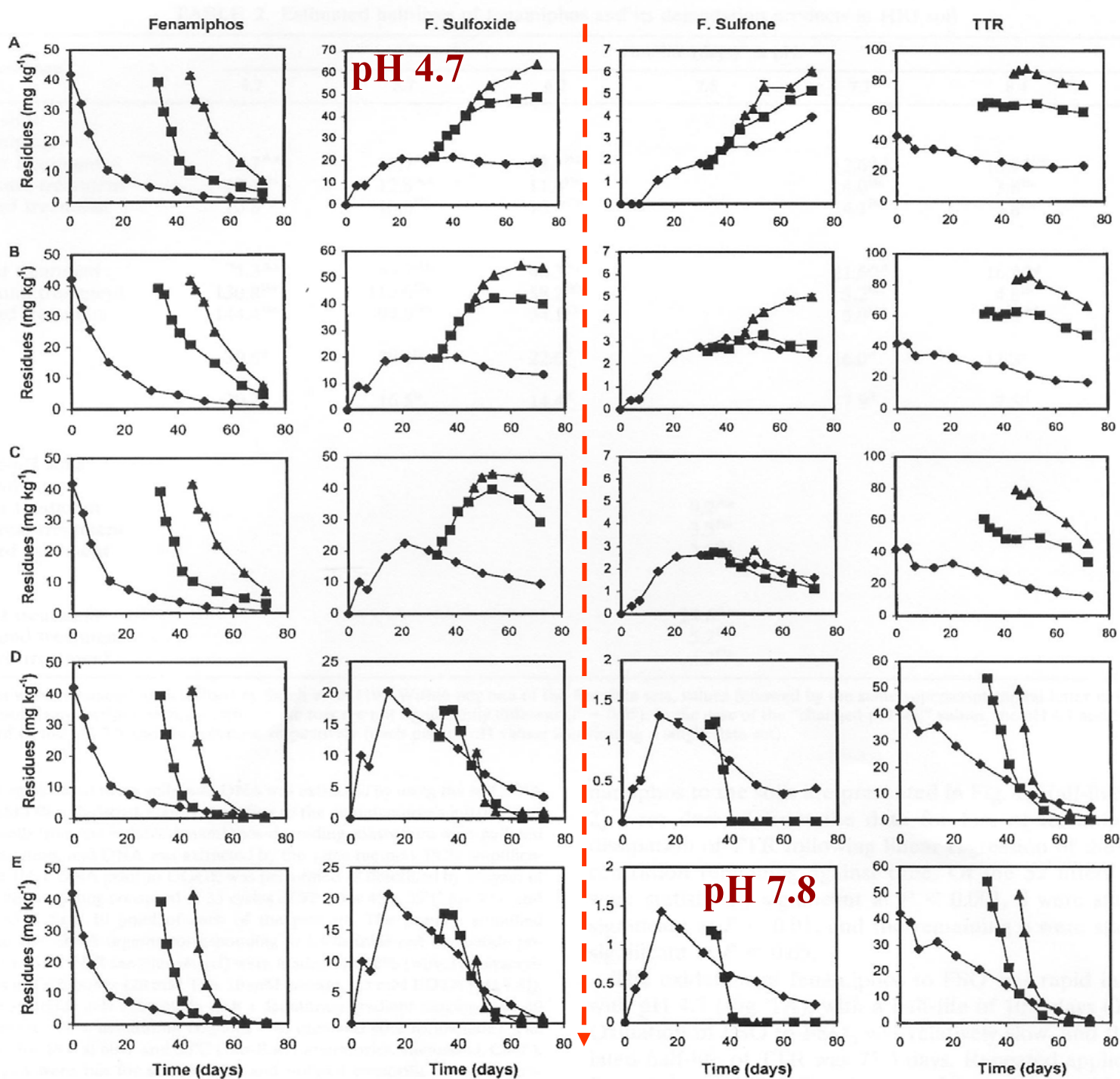


# Μεταβολισμός του Fenamiphos στο έδαφος



- **Οξείδωση:**  
Σχηματισμός σουλφοξειδίου και σουλφόνης που έχουν εντομοκτόνο δράση

- **Υδρόλυση:**  
Σχηματισμός φαινολών που δεν έχουν εντομοκτόνο δράση



Επιτάχυνση  
της  
μικροβιακής  
διάσπασης του  
fenamiphos  
και των  
προϊόντων  
οξείδωσής του  
με αύξηση του  
pH από 4.7 σε  
7.8

*Singh et al, 2003  
Appl Environ Microb*

# Μικροβιακός μεταβολισμός λοιπών ξενοβιοτικών μορίων

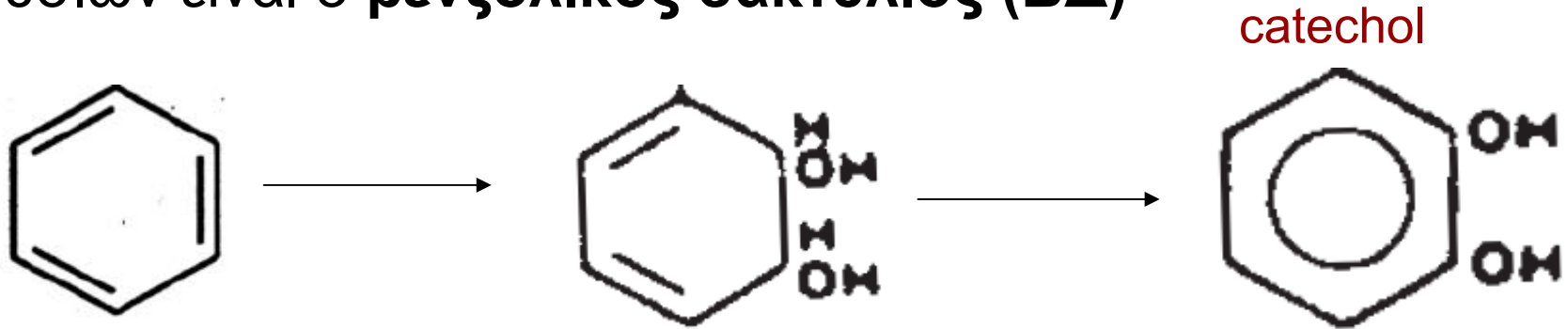


# Ποια είναι αυτά τα ξενοβιοτικά μόρια?

1. Τολουόλιο – Ξυλένιο
2. Πολυχλωριωμένα Διφαινύλια (PCBs)
3. Πολυαρωματικοί Υδρογονοάνθρακες (PAHs) –  
Ναφθαλένιο, Φαιναθρίνη, Ανθρακένιο
4. Οργανοφωσφορικά
5. Οργανοχλωριωμένα
6. Glyphosate

# Γενικές Αρχές μεταβολισμού αρωματικών ξеноβιοτικών μορίων I

Ο πιο συνήθης δακτύλιος στην χημική δομή ξеноβιοτικών ουσιών είναι ο **βενζολικός δακτύλιος (ΒΔ)**

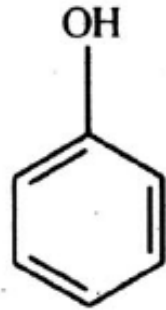


Το πρώτο βήμα στην διάσπαση του ΒΔ είναι η προσθήκη δύο ατόμων Ο για την μετατροπή του σε **διυδροδιόλη (dihydrodiol)** και πραγματοποιείται από ένζυμα που ονομάζονται **διοξυγενάσες (dioxygenases)** με τελικό προϊόν συνήθως **κατεχόλες (catechol)**

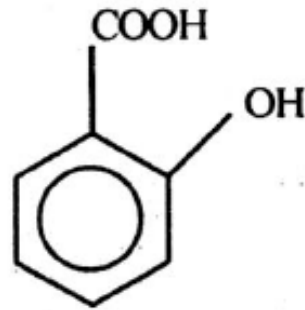


# Γενικές Αρχές μεταβολισμού αρωματικών ξενοβιοτικών μορίων II

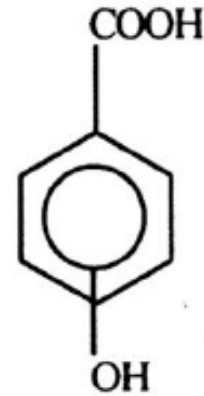
Ξενοβιοτικά μόρια που περιέχουν ήδη ένα OH στον βενζολικό δακτύλιο όπως



PHENOL



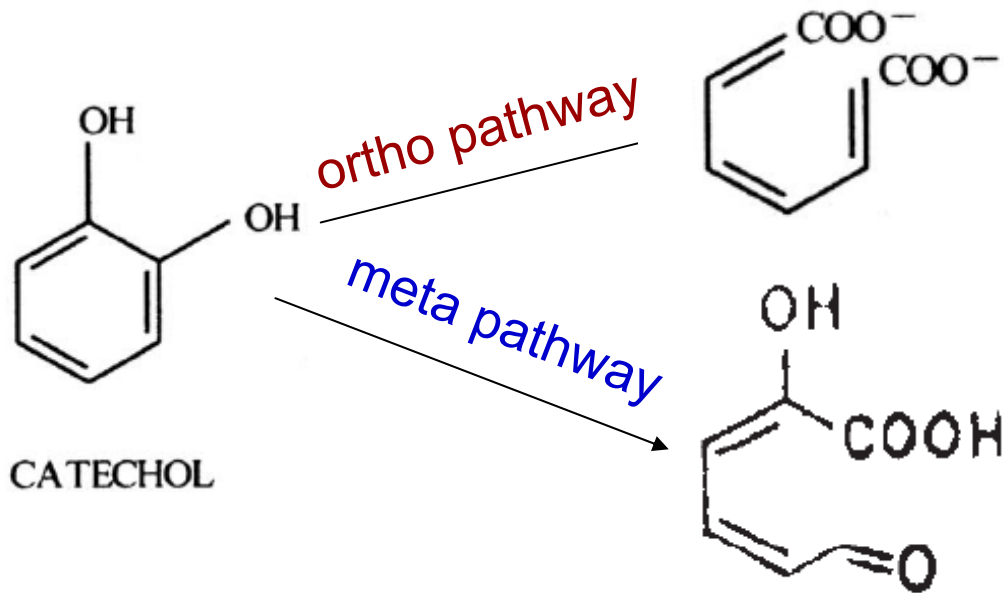
SALICYLATE



HYDROXYBENZOATE

Απαιτούν την προσθήκη ενός ακόμη OH με ένζυμα που ονομάζονται **μονοξυγενάσες (monooxygenases)** ώστε να σχηματιστούν κατεχόλες

# Γενικές Αρχές μεταβολισμού αρωματικών ξενοβιοτικών μορίων III



Δύο μονοπάτια μεταβολισμού υπάρχουν για τις κατεχόλες

1. Ortho pathway
2. Meta pathway

# Γενικές Αρχές μεταβολισμού αρωματικών ξενοβιοτικών μορίων IV

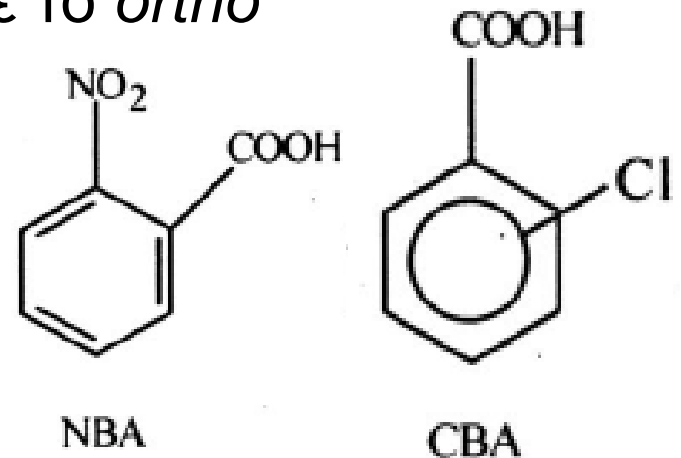
Το **ortho** μονοπάτι πραγματοποιείται κυρίως σε ξενοβιοτικά μόρια με μεθυλιομένους βενζολικούς δακτυλίους όπως

- Μεθυλκατεχόλη
- Μεθυλβενζόλιο
- Χλωρομέθυλοβενζόλιο

# Γενικές Αρχές μεταβολισμού αρωματικών ξеноβιοτικών μορίων V

Το *meta* μονοπάτι πραγματοποιείται κυρίως σε ξеноβιοτικά μόρια με χλωριωμένους βενζολικούς δακτυλίους όπως το χλωροβενζολικό οξύ (CBA) καθώς και στις νιτροφαινόλες, νιτροβενζοϊκά (NBA)

Εξαίρεση αποτελούν τα Πολυχλωριωμένα Διφαινύλια (PCBs) που διασπώνται προς CBA σύμφωνα με το *ortho* μονοπάτι και στην συνέχεια ακολουθείται το *meta* μονοπάτι



# Γενικές Αρχές μεταβολισμού αρωματικών ξеноβιοτικών μορίων VI

Τα οργανοχλωριωμένα όπως DDT, HCH διασπώνται με σταδιακές αποχλωριώσεις που οδηγούν στον σχηματισμό χλωροβενζοϊκού οξέος (CBA) που διασπάται στην συνέχεια διαμέσω του *meta* μονοπτατιού

# Γενικές Αρχές μεταβολισμού αρωματικών ξενοβιοτικών μορίων VII

- **Αυξημένος αριθμός CI υποκαταστατών σε δακτύλιο**  
περιορίζει την ελεύθερη ενέργεια για τους μικροοργανισμούς  
και αυξάνει την ανθεκτικότητα σε μικροβιακή διάσπαση
- **Αεροβική διάσπαση αρωματικών δακτυλίων** είναι  
περισσότερο επιθυμητή (ταχύτερη και αποτελεσματικότερη  
διεργασία) από την αναεροβική διάσπαση που δεν ευνοείται  
ούτε θερμοδυναμικά

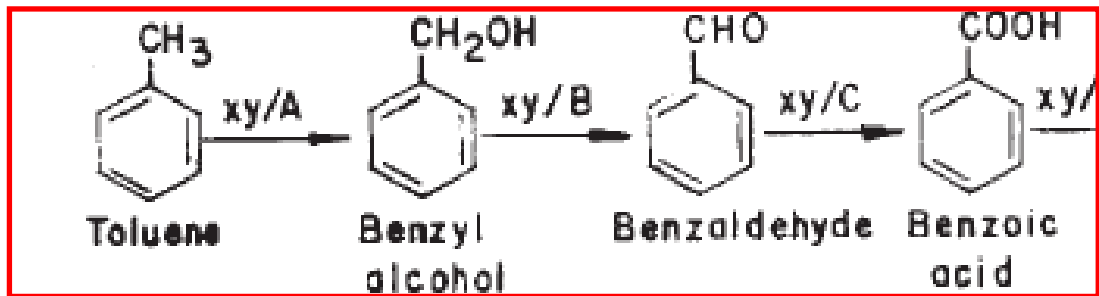
# Γενικές Αρχές μεταβολισμού αρωματικών ξενοβιοτικών μορίων - Ένζυμα

- **Περιφερειακό μονοπάτι (Peripheral pathway):** Συμμετέχουν ένζυμα με εξειδίκευση προς τα ξενοβιοτικά μόρια που αναγνωρίζουν και τα μετατρέπουν σε ουσίες που διασπώνται μικροβιακά με ευκολία, Σημαντικά ένζυμα για την μικροβιακή διάσπαση ξενοβιοτικών μορίων (*Dioxygenases, Monooxygenases, Dehalogenases, Dehydrogenases*)
- **Μονοπάτι διάσπαση δακτυλίου (Ring cleavage pathway)**  
Συμμετέχουν ένζυμα που είναι συνήθως κοινά στον μεταβολισμό πολλών διαφορετικών ξενοβιοτικών μορίων και δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη εξειδίκευση

# Μεταβολισμός Τολουολίου - Ξυλένιο

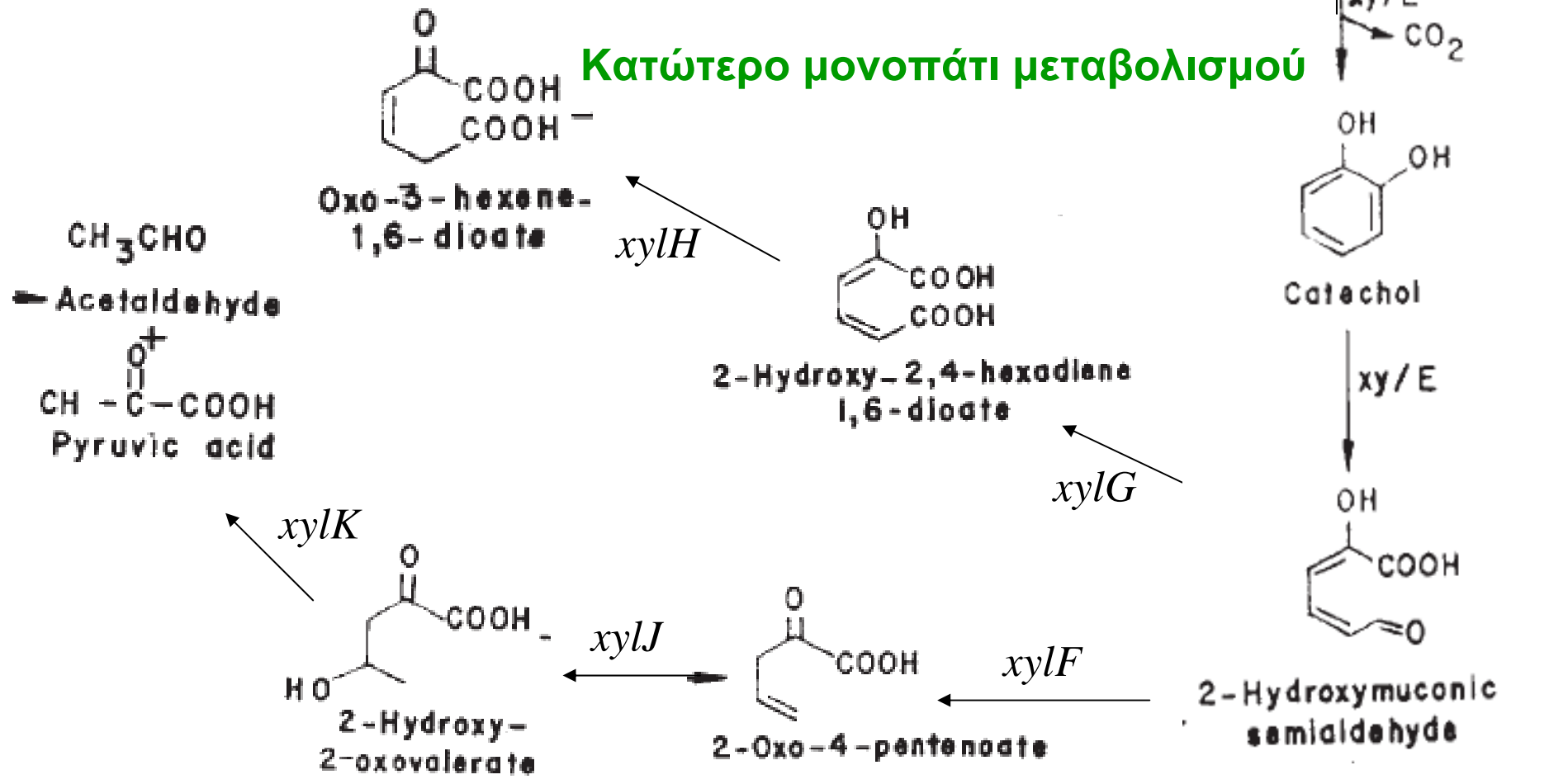
Το πιο γνωστό μεταβολικό μονοπάτι έχει παρατηρηθεί στο πλασμίδιο TOL ενός *Pseudomonas* sp. που περιέχει όλα τα γονίδια για την πλήρη διάσπαση του τολουολίου





**Ανώτερο μονοπάτι μεταβολισμού**

**Κατώτερο μονοπάτι μεταβολισμού**

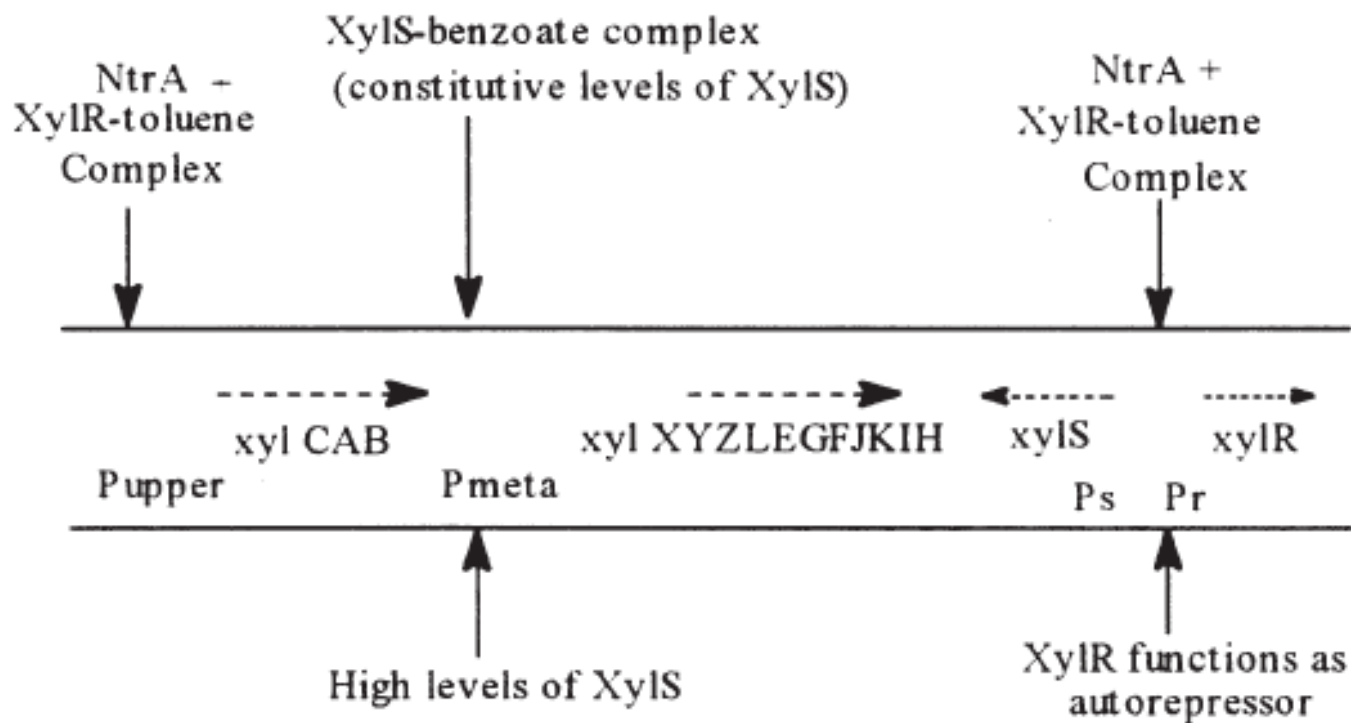


# Γονίδια και ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του τολουολίου

Gene	Enzyme or function
“Upper –pathway” operon	Enzymes involved in the conversion of toluene and xylenes to benzoate and toluates
<i>XyIA</i>	Xylene oxygenase
<i>XyIB</i>	Benzyl alcohol dehydrogenase
<i>XyIC</i>	Benzaldehyde dehydrogenase
“Lower (meta) – pathway” operon	Enzymes involved in the degradation of benzoate and toluates to acetaldehyde and pyruvate
<i>xyIX, Y, Z</i>	Toluate di-oxygenase
<i>XyIE</i>	Catechol 2,3-dioxygenase
<i>XyIF</i>	2-Hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase
<i>XyIG</i>	2-Hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase
<i>XyIH</i>	4-oxalocrotonate tautomerase
<i>XyII</i>	4-oxalocrotonate decarboxylase
<i>XyIJ</i>	2-Oxopent-4-enoate hydratase
<i>XyIK</i>	2-Oxo-4-hydroxypentenoate aldolase
<i>XyIL</i>	Dihydroxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase
	Proteins involved in controlling the transcription of the upper- and lower–pathway genes
<i>XyIR</i>	Regulatory protein
<i>XyIS</i>	Regulatory protein

Τα γονίδια *xyl* είναι οργανωμένα σε δύο οπερόνια

- οπερόνιο του όρθο-μονοπατιού (*xyl/CAB*)
- οπερόνιο του μέτα-μονοπατιού (*xyl/XYZLEGFJKIH*)



***XylR*:** Προαγωγέας του όρθο – μονοπατιού + τολουόλιο

***XylS*:** Προαγωγέας του μέτα – μονοπατιού + βενζοϊκό οξύ

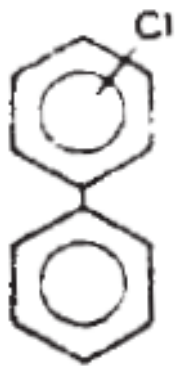
# Μικροβιακός Μεταβολισμός Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων

Ο μεταβολισμός των PCBs ξεκινά με την δράση

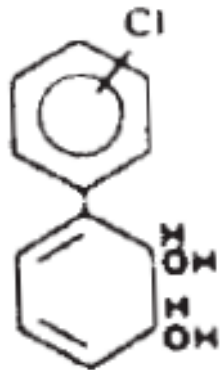
διοξυγενασών που προσθέτουν δύο OH στον ένα

φαινυλικό δακτύλιο και ξεκινούν ουσιαστικά τις διαδικασίες

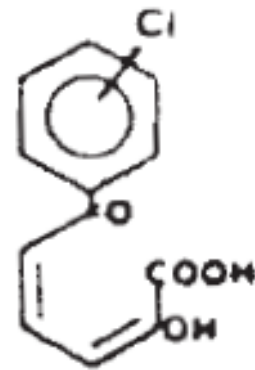
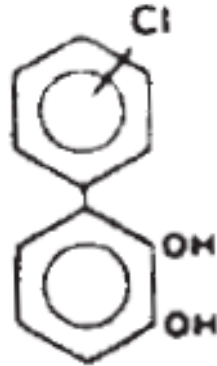
διάσπασης του δακτυλίου προς σαλυκιλικό οξύ



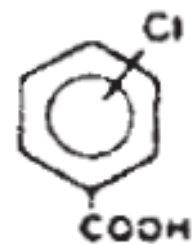
I **Biphenyl  
Dioxygenase**



II **Dihydrodiol  
Dehydrogenase**

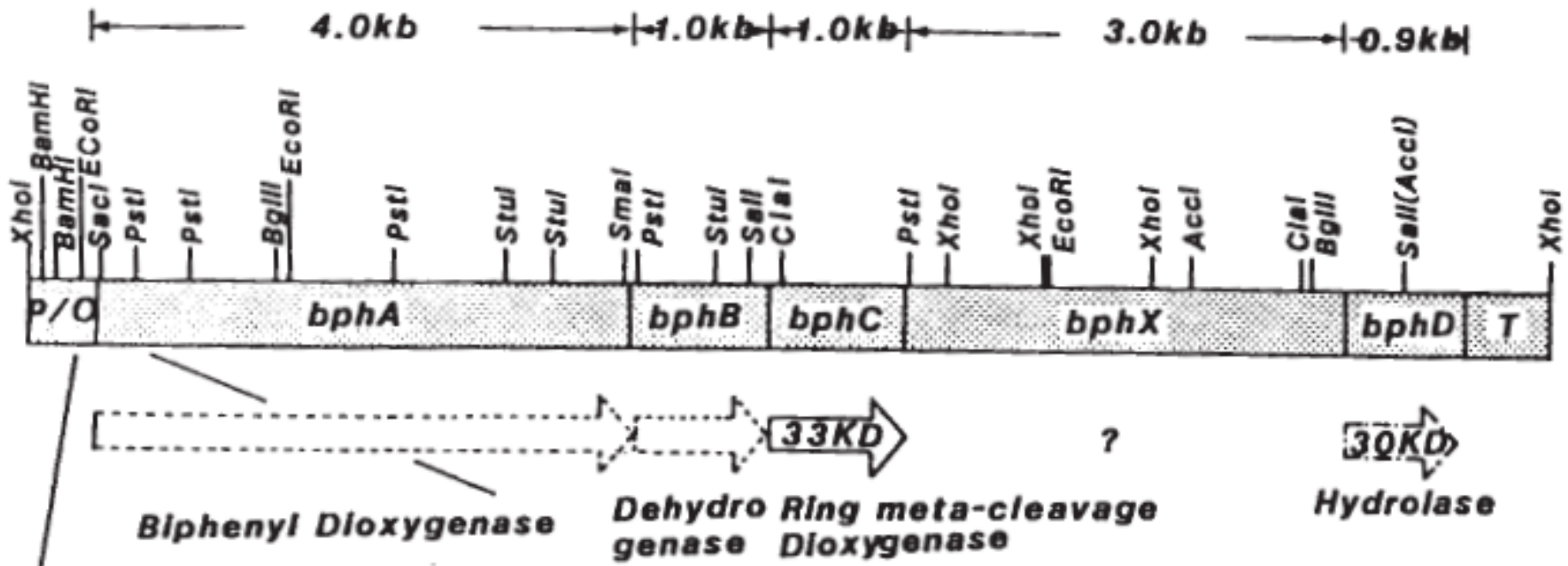


IV



V

*meta ring cleavage*



## Το σπερόνιο που περιέχει όλα τα γονίδια για την διάσπαση των PCBs

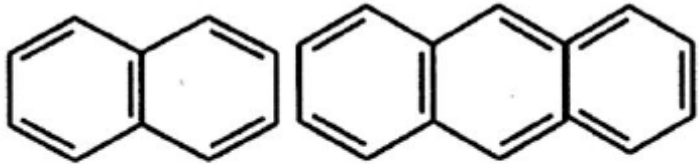
Ο ρόλος του γονιδίου **bhpX** δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως και δεν παίζει ρόλο στην διάσπαση των PCBs και δεν περιέχεται στο σπερόνιο **bhp** που απομονώθηκε από άλλα βακτήρια που κατά τα άλλα περιείχαν ομόλογα γονίδια

# Βακτήρια που διασπούν PCBs

Τα γονίδια απομονώθηκαν κυρίως από το χρωμόσωμα διαφόρων στελεχών *Pseudomonas* KF707, LB400, K715 και περιέχονταν σε ένα οπερόνιο με τα γονίδια **bhpA,B,C,X** και **D** και ο προαγωγέας του οπερονίου να βρίσκεται 104 bp πριν το γονίδιο **bhpA** (Το bhpX δεν υπήρχε στα στελέχη LB400, K715)

Το ίδιο οπερόνιο απομονώθηκε και από *Rhodococcus* sp. (θετικά κατά gram) και βρισκόταν σε ένα 100 kbp πλασμίδιο

# Μεταβολισμός Ναφθαλενίου - PAHs



NAPHTHALENE    ANTHRACENE

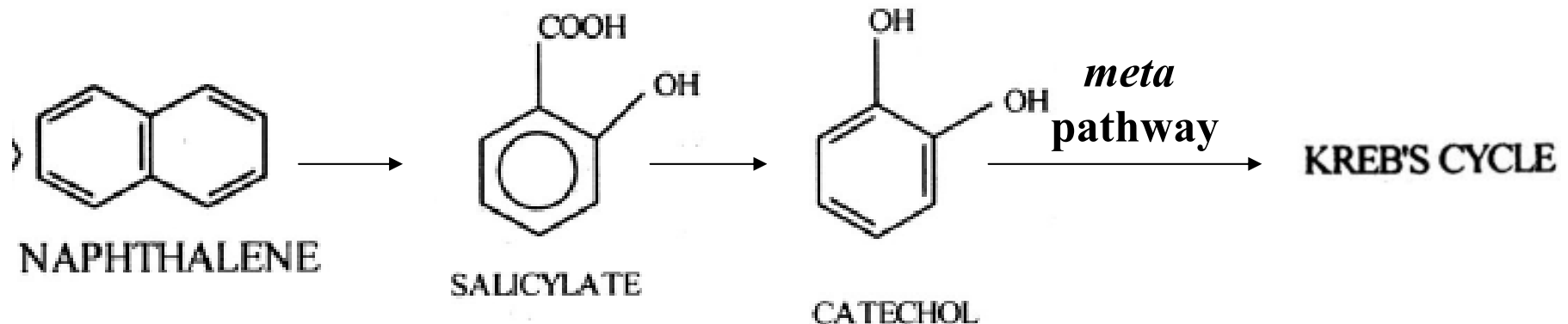
Το πλήρες μεταβολικό μονοπάτι ανιχνεύθηκε και καταγράφηκε πλήρως από ένα στέλεχος *Pseudomonas putida* (G7) που περιείχε σε ένα πλασμίδιο (NAH7) τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα για τα πρώτα 11 βήματα στην διάσπαση του ναφθαλενίου



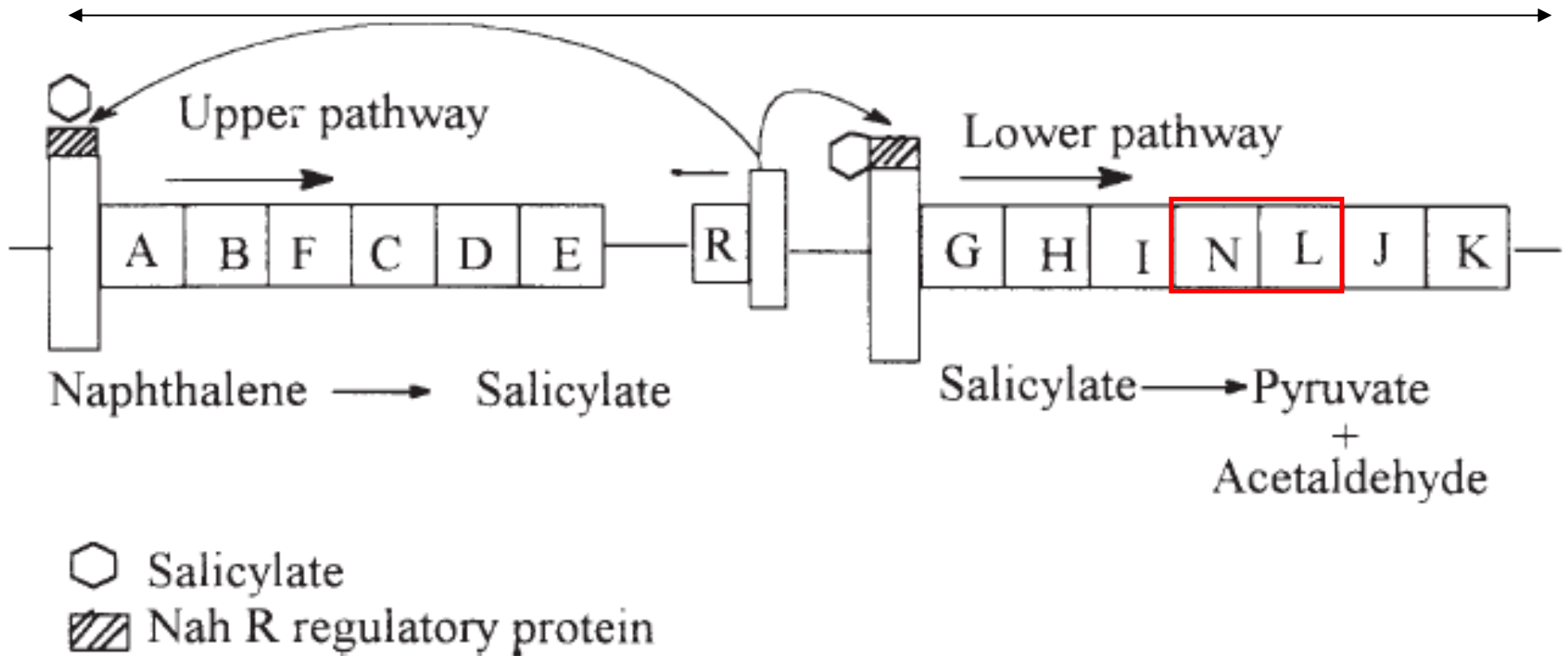
# Μεταβολισμός Ναφθαλενίου - PAHs

Τα γονίδια διατάσσονται σε δύο οπερόνια:

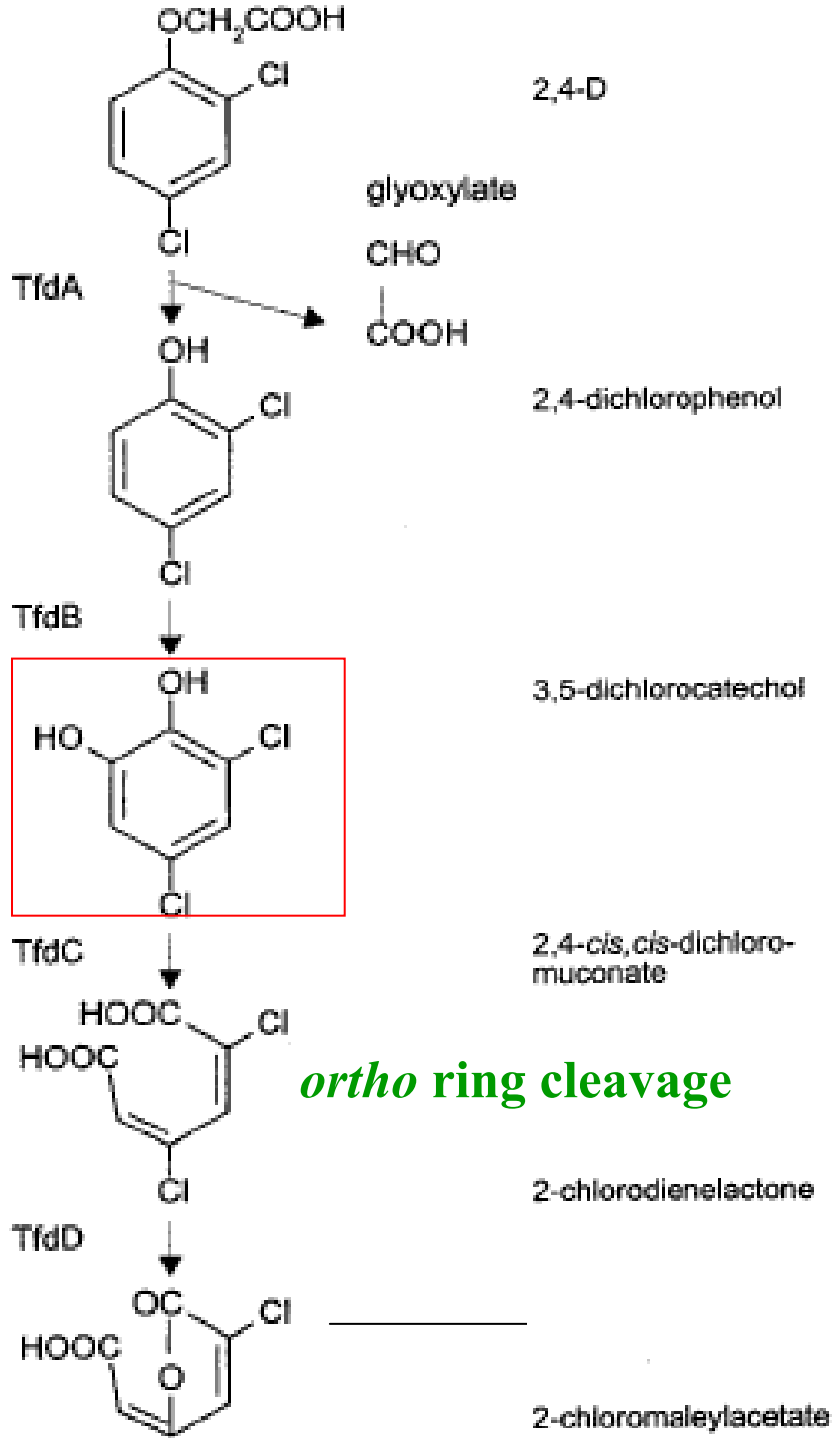
- Πρώτο οπερόνιο με τα γονίδια ***nahABCDEF*** τα οποία ελέγχουν την μετατροπή του ναφθαλενίου σε σαλυκιλικό οξύ
- Δεύτερο οπερόνιο με τα γονίδια ***nahGHIJK*** τα οποία ελέγχουν την μετατροπή του σαλυκιλικού οξέος σε κατεχόλη



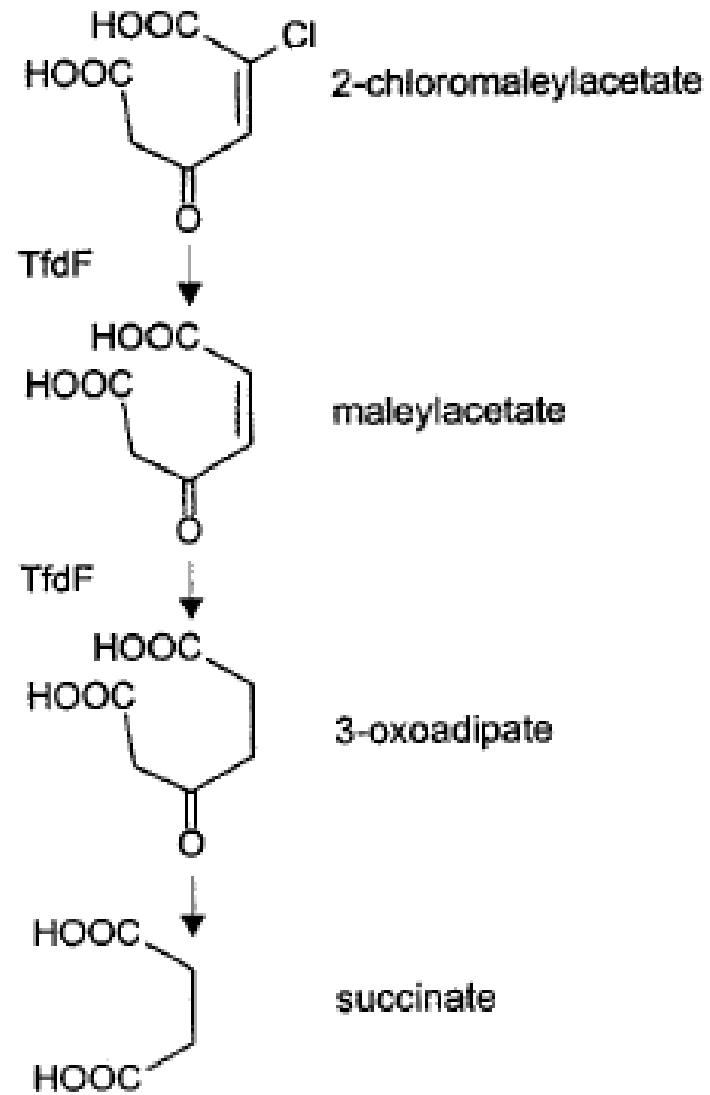
30 kBp



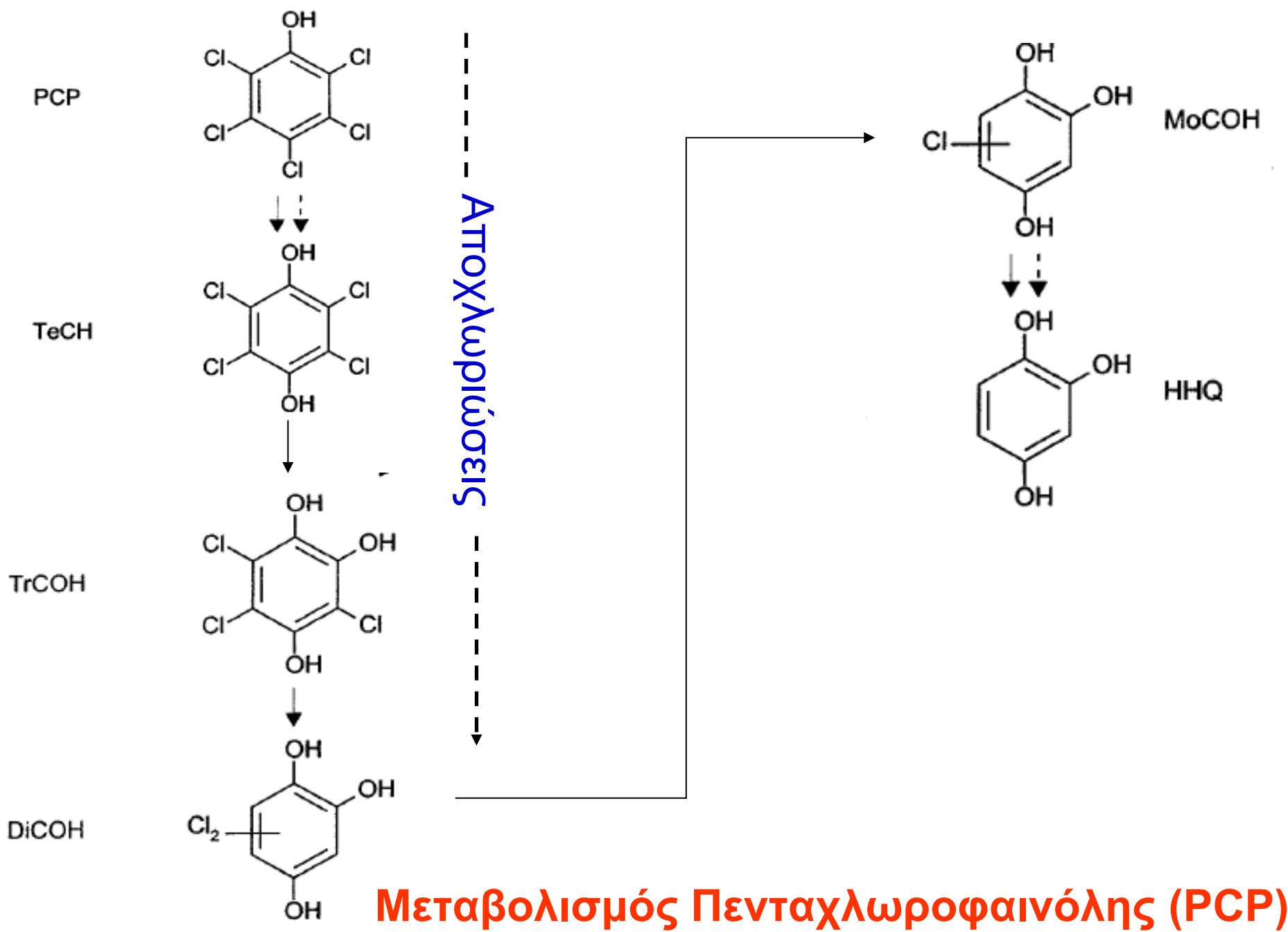
Η οργάνωση των οπερονίων *nah* και *sal* που ελέγχουν τον μεταβολισμό του ναφθαλενίου



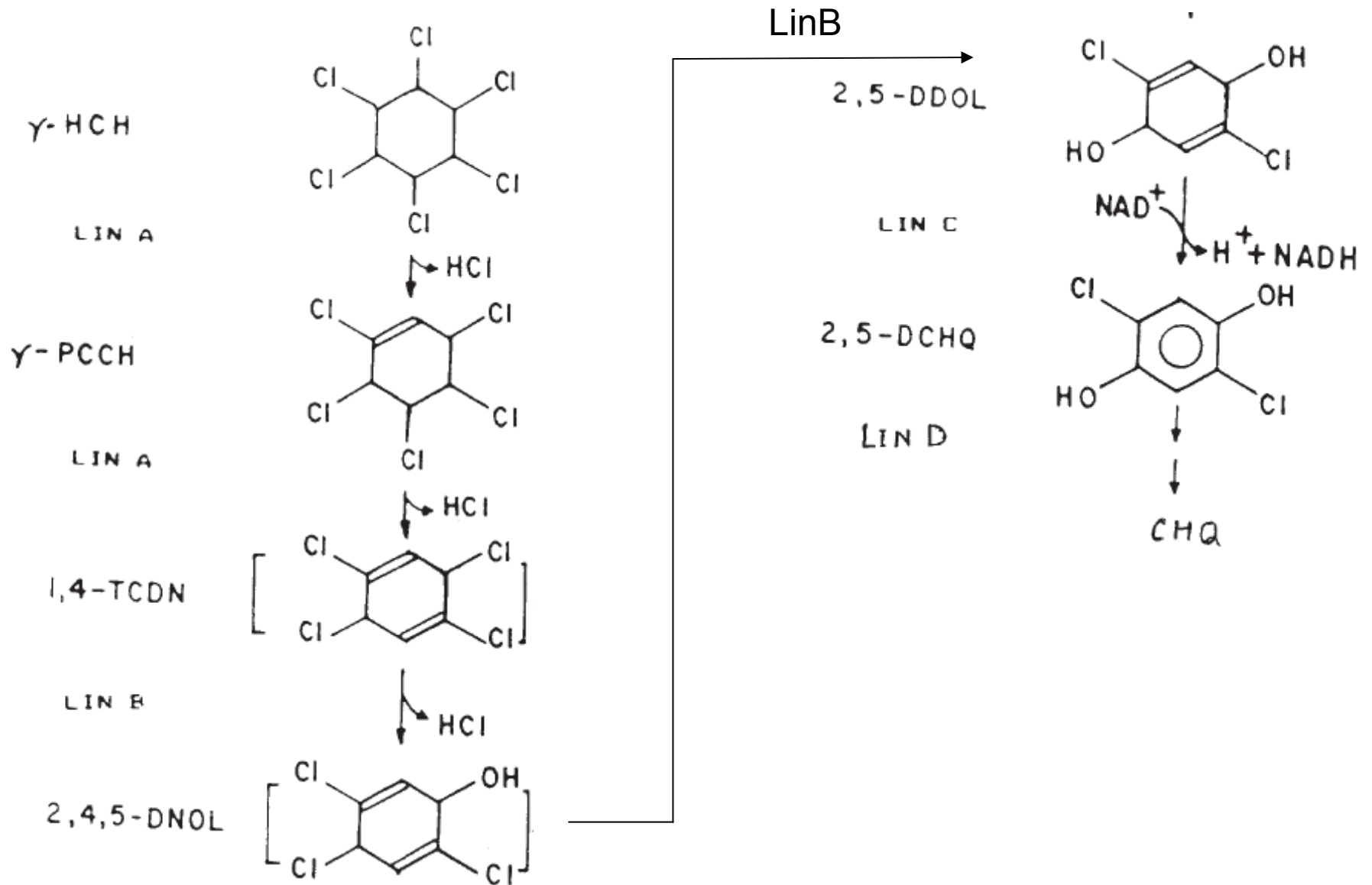
*tfdE*



**Μεταβολισμός 2,4- D**



# Μεταβολισμός Οργανοχλωριωμένα - ΗΧΗ



# Μεταβολισμός Οργανοχλωριωμένα - ΗCΗ

Το μεταβολικό μονοπάτι και τα γονίδια που κωδικοποιούν τα απαραίτητα ένζυμα απομονώθηκαν από το χρωμόσωμα του βακτηρίου *Pseudomonas putida* UT26

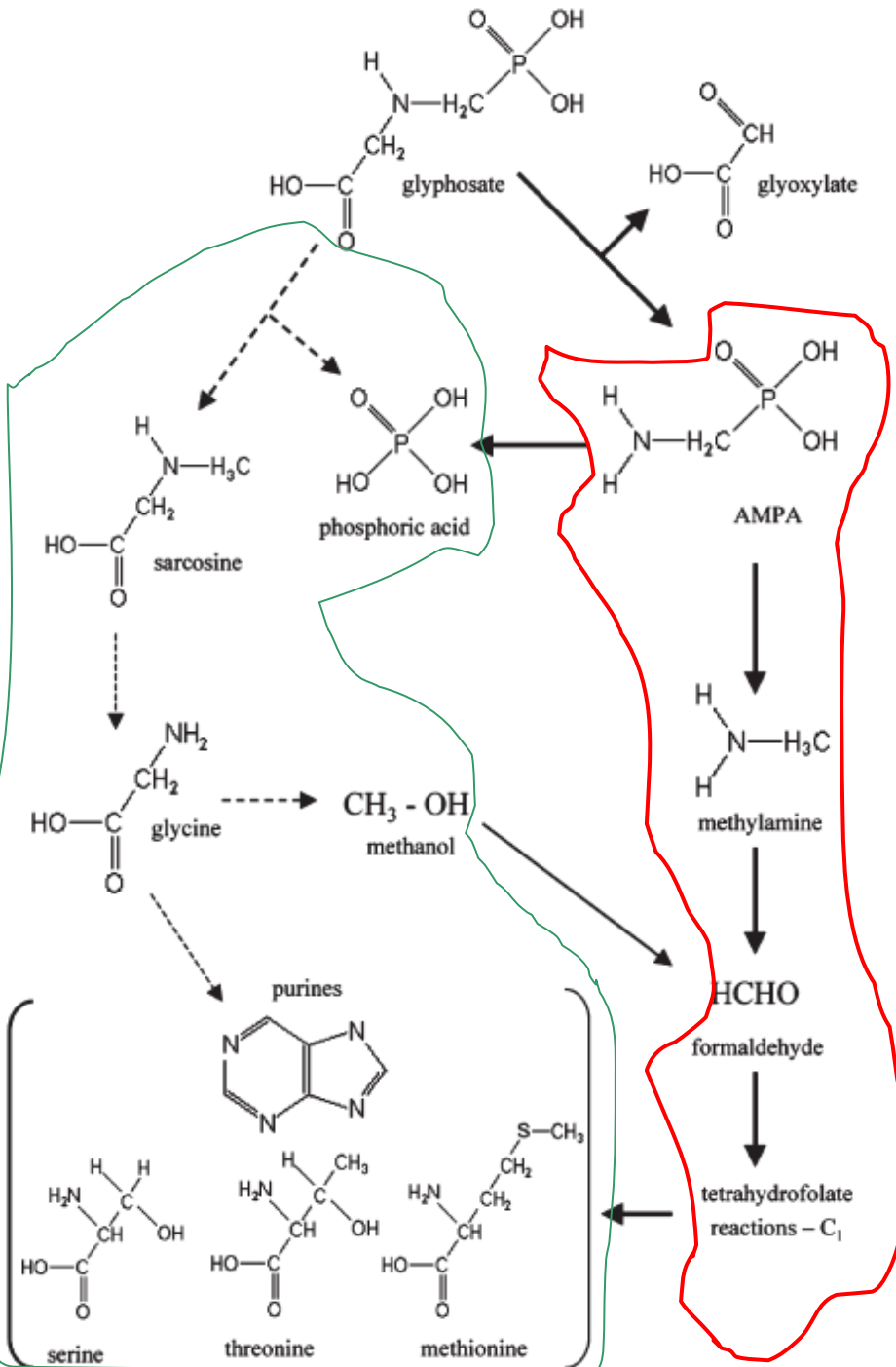
- LinA (dehalogenase, 465 bp)
- LinB (dehalogenase, 885 bp)
- LinC (dehydrogenase)
- LinD (dehalogenase)

# Ο μεταβολισμός του glyphosate πραγματοποιείται

από βακτήρια με δύο διαφορετικά μονοπάτια

➤ **AMPA pathway**

➤ **Sarcosine pathway**



# AMPA pathway

Πρώτο βήμα η διάσπαση του C-N δεσμού και στην συνέχεια διάσπαση του C-P δεσμού (C-P λύση) και παραγωγή μεθυλαμίνης, φορμαλδεύδης και τελικά CO<sub>2</sub>

- *Flavobacterium*
- *Pseudomonas LBr*
- *Arthrobacter artrocyanius*
- *Pseudomonas pesudomallei*
- *Geobacillus caldoxylosilyticus*



# Sacrosine pathway I

Πρώτο βήμα η διάσπαση του ανθεκτικού C-P δεσμού με την δράση του ενζύμου C-P λυάση που οδηγεί στην ελευθέρωση φωσφορικών και σακροζίνης

Η σακροζίνη μετατρέπεται σε γλυκίνη που χρησιμοποιείται στο σχηματισμό πρωτεϊνών ή σε C<sub>1</sub> μόρια που συμμετέχουν στον σχηματισμό πουρινών (αδενίνη, γουανίνη)

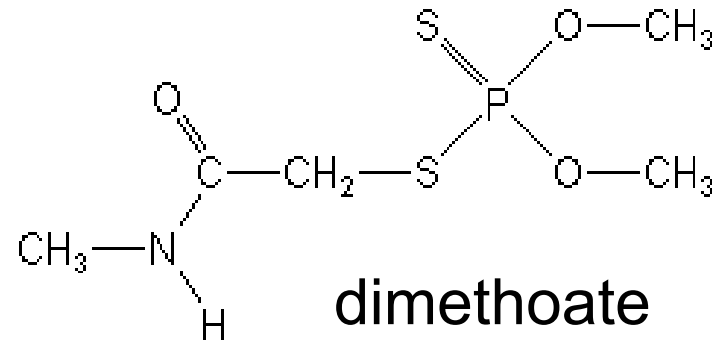
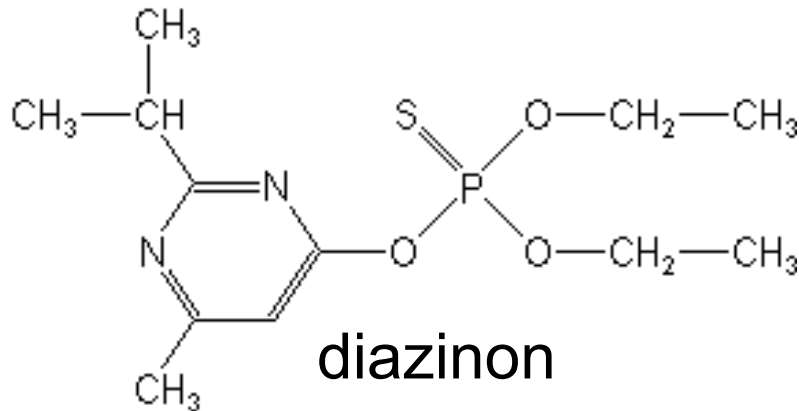
# Sacrosine pathway II

Τα περισσότερα βακτήρια που διασπούν το glyphosate ακολουθώντας το μονοπάτι sacrosine χρησιμοποιούν το glyphosate ως πηγή P και όχι ως πηγή C ή N

- *Pseudomonas*
- *Agrobacterium radiobacter*
- *Arthrobacter* GLP-1
- *Rhizobium meliloti*

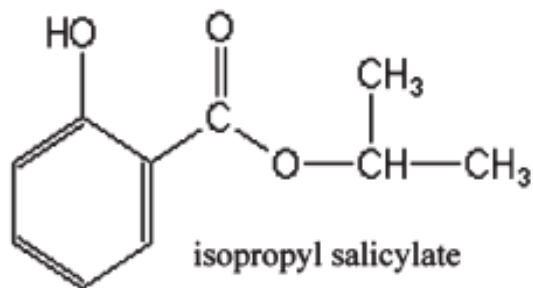
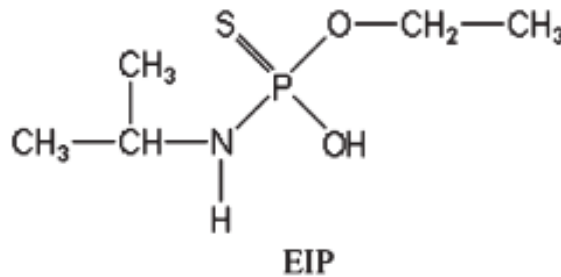
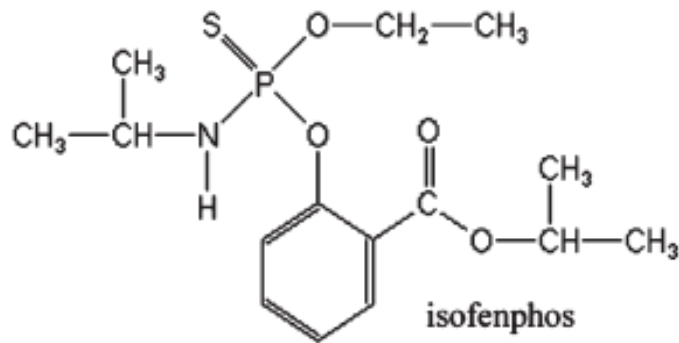
# Μικροβιακός Μεταβολισμός Οργανοφωσφορικών Εντομοκτόνων

Τεράστιος αριθμός βακτηρίων έχουν απομονωθεί από το έδαφος τα οποία αποδομούν/υδρολύουν οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα όπως parathion, diazinon, chlorpyrifos που περιέχουν **P-O** (φωσφοεστερικούς δεσμούς) ή dimethoate, ethoprophos όπως **P-S** (φωσφοθειεστερικούς δεσμούς)

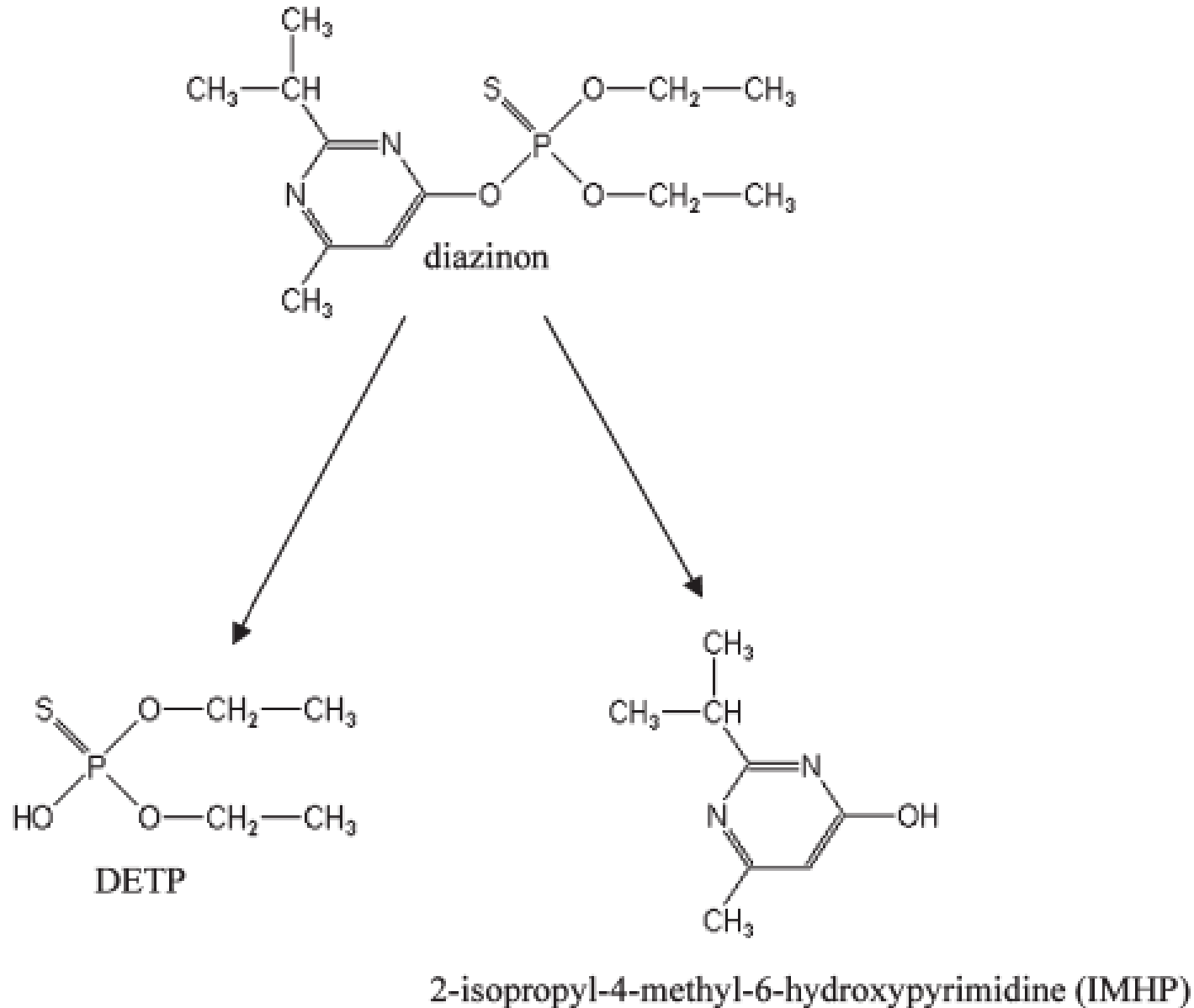


Το πρώτο στάδιο στον μεταβολισμό των οργανοφωσφορικών

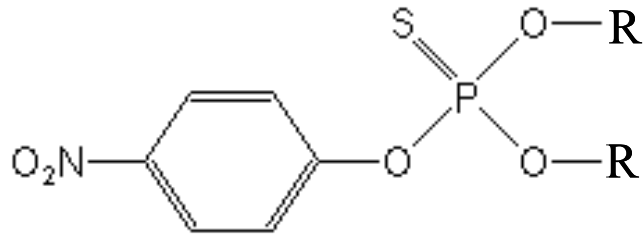
ή δεσμού P-O ή



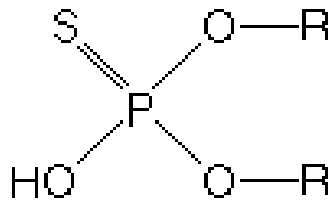
# Υδρόλυση Φωσφοεστερικών δεσμών



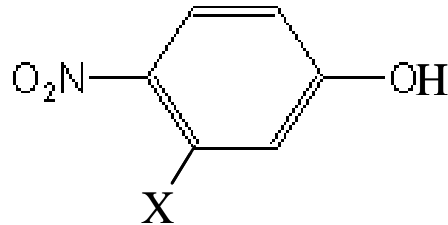
# Υδρόλυση Φωσφοεστερικών δεσμών



Φωσφοτριεστεράση (ΟΡΗ)



+



*π-νιτροφαινόλη*

*Διαλκυλο-θειοφωσφορικό*

# Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα

Διάφορα υδρολυτικά ένζυμα έχουν απομονωθεί από μικροοργανισμούς που διασπούν οργανοφωσφορικά

- OPH (γονίδιο oph)
- OPDA (γονίδιο opdA)
- OPAA (γονίδιο opaA)
- MPD (γονίδιο mpd)

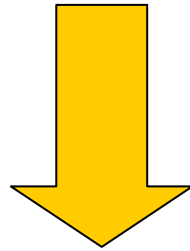
# Γονίδια *Oph*

Απομονώθηκε αρχικά από το πλασμίδιο 43 kb του βακτηρίου *Flavobacterium* sp. (Φιλιππίνες) και σχεδόν ταυτόχρονα από το πλασμίδιο 66 kb του βακτηρίου *Pseudomonas diminuta* (ΗΠΑ)

Τα γονίδια *oph* που απομονώθηκαν από τα δύο βακτήρια παρουσίαζαν 100% ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων ενώ τα δύο πλασμίδια εκτός μιας περιοχής περίπου 5 kb δεν παρουσίαζαν καμία ομολογία



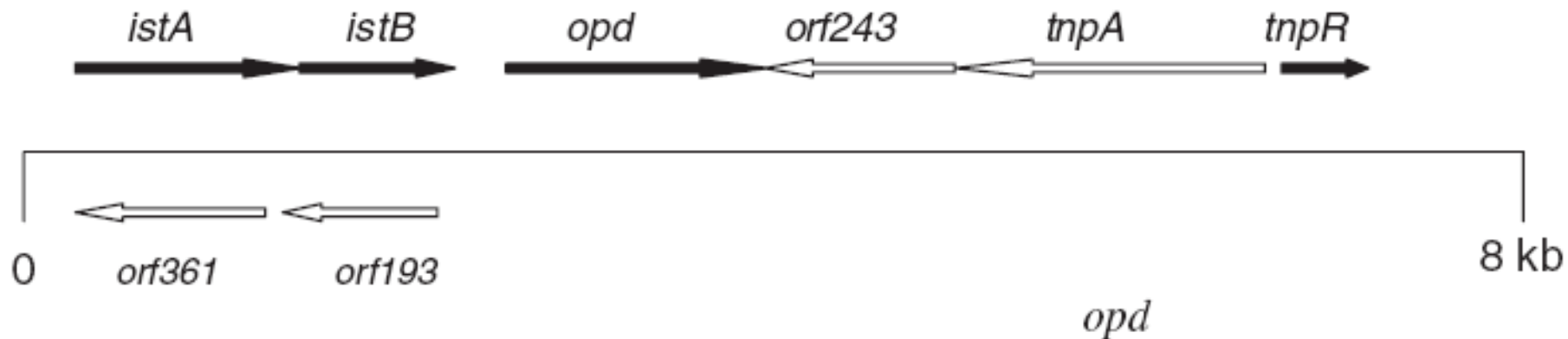
Βακτήρια που απομονώθηκαν από γεωγραφικά διαφορετικές περιοχές, περιέχονται σε μη-συγγενικά πλασμίδια και ανήκουν σε τελείως διαφορετικά φυλογενετικά είδη περιέχουν ακριβώς το ίδιο γονίδιο για την αποδόμηση των οργανοφωσφορικών



Πιθανότατα τα βακτήρια αυτά απέκτησαν το *opd* γονίδιο διαμέσου HGT ως τμήμα ενός μεταθετού στοιχείου (transposons)

Αλληλούχιση της συντηρημένης περιοχής των πλασμιδίων έδειξε την ύπαρξη 6 ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs)

- **Orf243:** διάσπαση p-nitrophenol
- **istA, istB:** μεταθετά στοιχεία
- **tnpA, tnpR:** μεταθετά στοιχεία



Η ύπαρξη πριν ή μετά την αλληλουχία των γονιδίων που κωδικεύουν υδρολυτικά ένζυμα για τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, μεταθετών στοιχείων έχει παρατηρηθεί και με τα γονίδια *opdA*, *mpd*

