



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

"ΜΟΝΑΔΑ SBR ΜΕ ΑΛΟΦΥΤΑ ΓΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ
ΔΙΣΦΑΙΝΟΛΗΣ Α"

ΧΡΙΣΤΟΦΙΛΟΠΟΥΛΟΣ ΣΤΑΥΡΟΣ

Εξεταστική επιτροπή:

Καθ. Ν. Καλογεράκης (Επιβλέπων)

Καθ. Ν. Νικολαΐδης

Λέκτ. Ν. Παρανυχιανάκης

ΧΑΝΙΑ, 2012

Η παρούσα διατριβή υλοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος:



**Microorganism and enzyme Immobilization:
NOvel Techniques and Approaches for Upgraded
Remediation of Underground wastewater and Soil**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Νικόλαο Καλογεράκη για την υποστήριξή του καθ' όλο το διάστημα εκπόνησης της διπλωματικής αυτής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την γενικότερη καθοδήγηση και συνεργασία που είχαμε.

Ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Καθ. Ν. Νικολαΐδη και Λέκτ. Ν. Παρανυχιανάκη οι οποίοι συντέλεσαν για την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας αυτής και την Καθ. Ε. Ψυλλάκη για τις καθοριστικές παρεμβάσεις της και ουσιαστική βοήθεια που προσέφερε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Επ. Καθ. Ν. Ξεκουκουλωτάκη για τις πολύτιμες οδηγίες που προσέφερε όταν αυτό χρειάστηκε και την Δρ. Ε. Μανουσάκη για την πολύτιμη συμπαράσταση και συνεργασία. Την Ε. Συρανίδου για την εξαιρετική συνεργασία, και τις Ε. Γιαντζή, Κ. Τσουρουνάκη και Δρ. Κ. Τυροβολά, για τις καθοριστικές υποδείξεις και βοήθειά τους. Επίσης θα ήθελα να αποστείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ και σε όλους όσους συμφοιτητές και συμφοιτήτριες συνέβαλαν με το δικό τους τρόπο στην προσπάθεια μου αυτή. Τους ευχαριστώ θερμά.

Τέλος οφείλω ένα απέραντο ευχαριστώ στους γονείς μου οι οποίοι με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ενδιαφέρον όσον αφορά στις επιδράσεις των ενδοκρινικών διαταρακτών στους διάφορους οργανισμούς, τα τελευταία χρόνια είναι ολοένα και αυξανόμενο. Ανάμεσα στις ξеноβιοτικές ουσίες που έχει ορίσει η Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (ΕΡΑ), το μονομερές δισφαινόλη Α (ΒΡΑ) έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον αλλά και τις περισσότερες αντικρουόμενες απόψεις λόγω της ευρείας έκθεσης του πληθυσμού και των ενδοκρινικών επιδράσεων της στον άνθρωπο και τα ζώα. Η δισφαινόλη Α είναι μια οργανική ένωση η οποία χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων, συμπεριλαμβανομένου πλαστικών μπουκαλιών και κονσερβοποιημένων τροφίμων.

Οι τεχνολογίες φυτοεξυγίανσης στις οποίες γίνεται χρήση φυτών και των συνεργαζόμενων με αυτά μικροοργανισμών για να διασπών οργανικές ενώσεις σε λιγότερο τοξικά ή μη τοξικά προϊόντα, έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες. Τα αλοφυτικά είδη αποτελούν αντικείμενο εφαρμογής της τεχνολογίας, εφόσον εμφανίζονται στη φύση σε περιβάλλοντα που χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών ιόντων (κυρίως νατρίου και χλωρίου), ενώ θεωρείται ότι η ανθεκτικότητα στην αλατότητα συνδέεται και με ανθεκτικότητα σε άλλους παράγοντες καταπόνησης όπως αυτής από οργανικούς και ανόργανους ρύπους.

Προκειμένου να δοθεί ουσιαστική δυνατότητα στα αλόφυτα να αντεπεξέλθουν στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις, η αποδόμηση στη ριζόσφαιρα αναμένεται να είναι μεγαλύτερη αν πληρούνται οι ιδανικές συνθήκες για ανάπτυξη μικροβιακής δραστηριότητας. Επίσης, η χρήση φυτών σε συνδυασμό με τους σχετιζόμενους με αυτά μικροοργανισμούς συνεισφέρουν σημαντικά στην δυνατότητα φυτοαποκατάστασης. Τα σχετιζόμενα με το φυτό βακτήρια, όπως είναι τα ενδοφυτικά και τα βακτήρια της ριζόσφαιρας, έχει αποδειχθεί ότι επιδρούν θετικά στη βιοαποδόμηση ρυπασμένων εδαφών από τοξικές οργανικές ενώσεις και δύναται να βελτιώσουν τη φυτοαποκατάσταση.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός, η κατασκευή και η λειτουργία δύο πιλοτικών μονάδων, τύπου Rhizodegradation Sequencing Batch Reactor (Rhizo SBR), για τη μελέτη της φυτοαποκατάστασης της δισφαινόλης Α από το αλόφυτο *Tamarix parviflora*. Η πρώτη (Rhizo SBR Α') έχει σκοπό τη μελέτη της δυνατότητας βιοαποδόμησης που λαμβάνει χώρα στο χώρο της ριζόσφαιρας, παρέχοντας τη δυνατότητα για αερισμό του συστήματος μελλοντικά, ενώ η δεύτερη (Rhizo SBR Β') παρέχει τη δυνατότητα βαθύτερου ριζικού συστήματος, προσομοιώνοντας την περίπτωση αποκατάστασης ρυπασμένου νερού σε εξωτερική δεξαμενή αποθήκευσης. Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ΒΡΑ, πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), ενώ τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δείχνουν ότι το προτεινόμενο σύστημα φυτοεξυγίανσης δουλεύει αποτελεσματικά.

ABSTRACT

Bisphenol A is a high volume chemical used in a wide variety of products, including plastic bottles and canned goods. Of all the xenobiotics registered for use by the Environmental Protection Agency of USA (EPA), the monomer bisphenol A has generated great amount of interest and controversy during the past decade, based on widespread human exposure and endocrine effects observed first in animal studies and now in humans.

While much success has been reported using plants alone in phytoremediation of organic contaminants, the use of plants in conjunction with plant-associated bacteria offers important potential for remediation. Plant-associated bacteria, such as endophytic bacteria and rhizospheric bacteria have been shown to contribute to biodegradation of toxic organic compounds in contaminated soil and could have potential for improving phytoremediation.

Halophytes have been selected for this phytoremediation research based on the fact that halophytic vegetation often grows in contaminated soils and various studies suggest that halophytes may be useful for phytoremediation in contaminated salty soils. Moreover, halophyte species are of special interest since these plants are naturally present in environments characterized by an excess of toxic ions and several studies have revealed that these plants can also tolerate other stresses such as chilling, freezing, heat and drought; hence, natural occurring salt tolerance might have much wider implications and can be related to higher resistance to other environmental stressors including inorganic and organic contaminants.

Based on the above, *Tamarix parviflora* (family Tamaricaceae), known by the common name smallflower tamarisk has been investigated for its phytoremediation potential to degrade BPA in contaminated environments. Species of genus *Tamarix* are salt-tolerant plants widespread in the Mediterranean region characterized by wider and deeper root apparatus development and as facultative phreatophytes have great

capacity for extracting contaminated water either from the soil or from the water table.

The main purpose of this phytoremediation study was to design, develop and operate two pilots; both of them are Rhizodegradation Sequencing Batch Reactors with the first one exploring the bioremediation potential that takes place in the bottom region, especially with aeration. The second pilot provides a deeper rooting zone, offering a better simulation of treating wastewater stored in an adjacent pool or storage tank. Another aspect was to investigate the ability of *Tamarix parviflora* to degrade bisphenol A from soil and groundwater. Moreover degradation ability of endophytic bacteria isolated from roots, shoots and leaves is investigated. The analysis of BPA, was performed using high performance liquid chromatography (HPLC). The experimental results show that the proposed phytoremediation system works effectively.

Περιεχόμενα

Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	- 1 -
Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	- 3 -
2.1 Ενδοκρινικοί διαταράκτες.....	- 3 -
2.2 Δισφαινόλη-A, παραγωγή και χρήση της	- 3 -
2.2.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες της BPA	- 4 -
2.2.2 Πηγές και απελευθέρωση της BPA στο περιβάλλον	- 6 -
2.3 Η δισφαινόλη - A στο φυσικό περιβάλλον	- 7 -
2.3.1 Περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις.....	- 7 -
2.3.2 Τύχη στο υδατικό περιβάλλον	- 8 -
2.4 Απομάκρυνση της BPA	- 8 -
2.4.1 Αβιοτική αποδόμηση της BPA	- 8 -
2.4.1.1 Χημικές μέθοδοι.	- 9 -
2.4.1.2 Φωτοαποδόμηση.....	- 9 -
2.4.1.3 Φυσικές μέθοδοι.	- 9 -
2.4.2 Βιοαποδόμηση της BPA στο περιβάλλον	- 10 -
2.4.2.1 Βακτήρια ικανά να αποδομούν την BPA.....	- 10 -
2.5 Φυτοαποκατάσταση	- 12 -
2.5.1 Γενικά στοιχεία και τύποι φυτοαποκατάστασης.....	- 12 -
2.5.2 Μηχανισμοί φυτοαποκατάστασης	- 13 -
2.5.3 Η φυτοαποκατάσταση ως μέθοδος εξυγίανσης από οργανικούς ρύπους- 15	-
2.6 Φυτοαποδόμηση και Ριζοαποδόμηση	- 16 -
2.6.1 Φυτοαποδόμηση.....	- 16 -
2.6.1.1 Το ‘Green Liver Concept’	- 16 -
2.6.1.2 Φάσεις του μεταβολισμού των οργανικών ενώσεων στα φυτά	- 17 -
2.6.2 Ριζοαποδόμηση	- 19 -
2.6.2.1. Η επίδραση της ριζόσφαιρας	- 21 -
2.6.2.2 Εισαγωγή Καταβολικών Γονιδίων σε Μικροοργανισμούς.....	- 22 -
2.6.2.3 Προϊόντα Αποδόμησης	- 23 -
2.7 Φυτοτοξικότητα στους Ρύπους	- 23 -
2.8 Μεταβολισμός της BPA από τα φυτά.....	- 24 -
Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο 3: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ <i>T. PARVIFLORA</i>	- 26 -
3.1 Γενικά στοιχεία	- 26 -

3.2 Επιλογή του υπό εξέταση φυτού.....	28 -
3.3 Ανασκόπηση σε έρευνες που έχει χρησιμοποιηθεί το γένος <i>Tamarix</i> για φυτοαποκατάσταση.....	29 -
Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30 -
4.1 Χρωματογραφία HPLC.....	30 -
4.1.1 Μικροεκχύλιση με ελεύθερη σταγόνα.....	31 -
4.1.2 Υλικά.....	31 -
4.1.3 Πειραματικό μέρος	32 -
4.1.3.1 Μέθοδος FDME.....	32 -
4.1.3.2 Αναλύσεις με HPLC	32 -
4.2 Προσδιορισμός χλωροφύλλης	32 -
4.3 Μελέτη της ικανότητας συγκεκριμένων βακτηρίων απομονωμένα από τις ρίζες, το βλαστό και τα φύλλα του <i>T. parviflora</i> , να αποδομούν την BPA	33 -
4.4 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	34 -
4.4.1 Γενικά στοιχεία	34 -
4.4.2 Περιγραφή μονάδας Rhizo SBR Type A'	36 -
4.4.3 Περιγραφή μονάδας Rhizo SBR Type B'	39 -
4.4.4 Κύκλος λειτουργίας των αντλιών	42 -
Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	43 -
5.1 Χαρακτηρισμός εδάφους	43 -
5.2 Βαθμονόμηση	44 -
5.3 Ρυθμοί απομάκρυνσης της BPA από τις μονάδες.....	46 -
5.4 Ρυθμοί αποδόμησης της BPA από ενδοφυτικά βακτήρια του <i>T. parviflora</i> . -	50 -
5.5 Ρυθμός απωλειών από εξατμισοδιαπνοή	53 -
5.6 Έλεγχος τοξικότητας από την παρουσία της BPA στα φυτά.....	53 -
5.7 Συμπεράσματα – Προτάσεις	54 -
Βιβλιογραφία	57 -

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1. Χημική δομή της δισφαινόλης.	- 5 -
Εικόνα 2. Μεταφορά οξυγόνου, νερού και ενώσεων σε ξυλώδες φυτό.	- 14 -
Εικόνα 3. Ο μεταβολισμός του TCE στο φυτικό κύτταρο σύμφωνα με το g.l.c. ...	- 17 -
Εικόνα 4. Γενικευμένη απεικόνιση των εκκριμάτων της ρίζας και της επίδρασής τους στη ριζοαποδόμηση. Το SOM αναφέρεται στην οργανική ουσία του εδάφους (Soil Organic Matter).....	- 22 -
Εικόνα 5. Εκπρόσωπος της οικογένειας των Ταμαριδοειδών..	- 26 -
Εικόνα 6. Άνθη και φύλλα αλμυρικού.....	- 27 -
Εικόνα 7. Οι περισταλτικές αντλίες ανακύκλωσης τοποθετημένες στη μια πλευρά της μονάδας (SBR B')......	- 35 -
Εικόνα 8. Στάδιο πλήρωσης της μονάδας με χώμα (SBR A')......	- 35 -
Εικόνα 9. Μέρος του συστήματος αερισμού των μονάδων (αριστερά το πιεστικό και δεξιά το δίκτυο δευτερευόντων αγωγών στον πυθμένα).	- 36 -
Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της μονάδας SBR A'.	- 37 -
Εικόνα 11. Συνολική άποψη της μονάδας SBR A' (αριστερά) και λεπτομέρεια του σταθμοδείκτη ελέγχου (δεξιά).	- 38 -
Εικόνα 12. Τα φυτά στην SBR A την ημέρα της φύτευσης 28/3/11 και μετά από 15 μήνες 14/6/12.	- 39 -
Εικόνα 13. Η μονάδα SBR B' βάση του αρχικού σχεδιασμού και στην τελική της μορφή, βάση του τροποποιημένου σχεδιασμού.....	- 40 -
Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της μονάδας SBR B'.	- 41 -
Εικόνα 15. Λεπτομέρεια του συστήματος αποστράγγισης της μονάδας.	- 42 -

Περιεχόμενα Σχημάτων

Σχήμα 1. Παρουσίαση της γραμμικότητας στον FLD στην περίπτωση της μήτρας από χώμα της μονάδας.	- 45 -
Σχήμα 2. Παρουσίαση της γραμμικότητας στον PDA στην περίπτωση της μήτρας από χώμα της μονάδας.	- 46 -
Σχήμα 3. Ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης της BPA στην μονάδα SBR A'.. -	47 -
Σχήμα 4. Απεικόνιση της συγκέντρωσης της BPA στην υγρή φάση μετά από προσθήκη στην επιφάνεια του εδάφους.....	- 48 -
Σχήμα 5. Απεικόνιση της συγκέντρωσης της BPA στην υγρή φάση μετά από προσθήκη στην επιφάνεια του εδάφους.....	- 49 -
Σχήμα 6. Ρυθμός αποδόμησης της BPA από απομονωμένα ενδοφυτικά βακτήρια του <i>T. parviflora</i>	- 51 -

Σχήμα 7. Πορεία ανάπτυξης των κυττάρων των ενδοφυτικών βακτηρίων κατά την καλλιέργειά τους στο L-θρεπτικό, παρουσία δισφαινόλης.....	- 51 -
Σχήμα 8. Χρωματογραφική απεικόνιση της αποδόμησης της δισφαινόλης από βακτήρια <i>Sphingomonas</i> (strain 15b) απομονωμένα από βλαστούς του <i>T. parviflora</i> ..	- 52 -
Σχήμα 9. Ρυθμός αποδόμησης της BPA από απομονωμένα ενδοφυτικά βακτήρια του <i>T. parviflora</i> , στο θρεπτικό M9.	- 52 -
Σχήμα 10. Μέσος μηνιαίος ρυθμός συνολικών απωλειών σε νερό της μονάδας SBR Α'.	- 53 -
Σχήμα 11. Απεικόνιση της ολικής χλωροφύλλης, της χλωροφύλλης a και χλωροφύλλης b, σε φυτά αναφοράς και στα δύο φυτά της μονάδας.....	- 54 -

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1. Φυσικοχημικές ιδιότητες της BPA.....	- 5 -
Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις BPA σε δείγματα υγρών αποβλήτων από διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας.....	- 7 -
Πίνακας 3. Οργανικές ουσίες που διασπώνται από βακτήρια στη περιοχή της ριζόσφαιρας.....	- 21 -
Πίνακας 4. Υπολογισμός τυπικής και σχετικής τυπικής απόκλισης.....	- 45 -

Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δισφαινόλη Α ή BPA αποτελεί ενδοκρινικό διαταράκτη (Krishnan et al., 1993) με ενδοκρινική δράση και ισχυρή τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς σε συγκεντρώσεις από 1.000-10.000μg/L (Alexander et al., 1988, Wang, 2008).

Η BPA είναι μια συνθετική οργανική ένωση που χρησιμοποιείται για την παραγωγή φαινολικών ρητίνων, πολυακρυλικών και πολυεστέρων, κυρίως όμως στην παραγωγή εποξικών ρητινών και πολυκαρβονικών πλαστικών. Οι εποξικές ρητίνες βρίσκουν εφαρμογή ως εσωτερικές επιστρώσεις κονσερβών, σε μεταλλικά καπάκια συσκευασιών, προστατευτικά επιστρώματα και φινιρίσματα, ανταλλακτικά αυτοκινήτων, κόλλες, στην επικάλυψη σωλήνων PVC και στην αεροδιαστημική τεχνολογία. Τα πολυκαρβονικά πλαστικά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ψηφιακών δίσκων, σε φανάρια αυτοκινήτων, οικιακές συσκευές, συσκευασίες τροφίμων, καθώς και πλαστικά μπουκάλια (Staples et al., 1998).

Λόγω της αυξημένης χρήσης προϊόντων που έχουν ως βάση τις εποξικές ρητίνες και τα πολυκαρβονικά πλαστικά και βάση του γεγονότος ότι η BPA μπορεί να διαρρεύσει από αυτά (Brede et al., 2003, Kang et al., 2003), η έκθεση των διαφόρων οργανισμών στην BPA μέσω διαφόρων τρόπων, όπως μέσω της τροφικής αλυσίδας και του περιβάλλοντος, έχει αυξηθεί (Kang et al., 2006). Ειδικά στον άνθρωπο, η έκθεση είναι πιο αυξημένη σε αστικές και βιομηχανικές περιοχές (Loffredo et al., 2010). Λόγω αυτής της ευρείας διάδοσής της, είναι δύσκολο για τους οργανισμούς (μικροοργανισμούς, φυτά, σπονδυλωτά και ασπόνδυλα) να αποφύγουν τις τοξικές και ενδοκρινικές επιδράσεις της BPA (Wang, 2008).

Η BPA έχει χαμηλή πτητικότητα σε υδατικά διαλύματα, ενώ περιβαλλοντικές έρευνες καταδεικνύουν την παρουσία της σε διάφορα υδατικά οικοσυστήματα και υγρά

απόβλητα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 0,001mg/L έως 149mg/L (Loffredo et al., 2010). Σύμφωνα με μελέτες, η BPA ανιχνεύθηκε σε στραγγίσματα χώρων υγειονομικής ταφής επικίνδυνων αποβλήτων σε συγκεντρώσεις 17,2mg/L (Yamamoto et al., 2001) και σε λυματολάσπη σε συγκεντρώσεις κυμαινόμενες από 0,033 mg/kg έως 36,7 mg/kg ξηρού βάρους (Loffredo et al., 2010, Gatidou et al., 2007).

Η παρουσία της BPA στα συστήματα αυτά είναι συνεπώς μεγάλης περιβαλλοντικής σημασίας, ενώ ο έλεγχος και η απομάκρυνσή της είναι αναγκαία για τη μείωση του φαινομένου της ρύπανσης του φυσικού νερού και του εδάφους.

Οι πρακτικές αποκατάστασης του νερού και του εδάφους ρυπασμένου με BPA βασίζονται κατά βάση σε φυσικο-χημικές και μικροβιολογικές διεργασίες (Mohapatra et al., 2010). Εντούτοις, η αναπτυσσόμενη τεχνολογία της φυτοαποκατάστασης, η οποία αρχικά εφαρμόστηκε για την απορρύπανση εδαφών ρυπασμένων από βαρέα μέταλλα, έχει επεκταθεί και σε οργανικούς ρύπους, για χάριν της αειφόρου ανάπτυξης (Katayama et al., 2010).

Η φυτοαποκατάσταση βασίζεται στην ικανότητα συγκεκριμένων φυτών να αποδομούν, μεταβολίζουν, σταθεροποιούν και απομακρύνουν οργανικές ενώσεις από διάφορα μέσα (Gerhardt et al., 2009). Περιοριστικό παράγοντα φυτοαποκατάστασης αποτελεί η ανάγκη προσδιορισμού φυτών τα οποία να είναι ικανά να απομακρύνουν το ρύπο αποτελεσματικά και γρήγορα, καθώς και να μπορούν να ανταπεξέλθουν σε μεγάλες δόσεις του ρύπου αυτού. Υπάρχουν μικρός αριθμός διαθέσιμων πληροφοριών στην παγκόσμια βιβλιογραφία σχετικά με τη φυτοαποκατάσταση της BPA στο νερό και στο έδαφος (Loffredo et al., 2010).

Η διατριβή αυτή επικεντρώθηκε στη κατασκευή και λειτουργία μονάδας φυτοαποκατάστασης για την απομάκρυνση της BPA από το έδαφος και το υπόγειο νερό. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε το φυτό *Tamarix parviflora* για το οποίο μελετήθηκε σε αρχικό στάδιο η συμβολή του στην απομάκρυνση της υπό εξέταση ένωσης, ειδικά μέσω απομονωμένων ενδοφυτικών του βακτηρίων.

Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο 2

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

2.1 Ενδοκρινικοί διαταράκτες

Ορισμένες χημικές ενώσεις μπορούν να παρεμβάλλονται στο ενδοκρινικό σύστημα για την παραγωγή μιας ανεπιθύμητης αντίδρασης ή διαταραχής, η οποία ενδέχεται να επηρεάσει διαδοχικά την υγεία, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή, μιας ευρείας ποικιλίας οργανισμών. Αυτές οι ουσίες είναι υπεύθυνες για ορμονικές διαταραχές και ονομάζονται ενδοκρινικοί χημικοί διαταράκτες (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs), (Lynch, 1990).

Ενδοκρινικός διαταράκτης όπως ορίστηκε στην ευρωπαϊκή ημερίδα σχετικά με την επίδραση των ενδοκρινικών διαταρακτών (European Commission, 1996), είναι 'μια εξωγενής υπόσταση η οποία προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία ενός άθικτου οργανισμού ή στους απογόνους του ως επακόλουθο αλλαγών στην ενδοκρινική λειτουργία' (Lynch, 1990).

Σύμφωνα με τη Διεύθυνση Περιβαλλοντικής Προστασίας των Η.Π.Α. (EPA, 1997) ενδοκρινικός διαταράκτης είναι ένας εξωγενής παράγοντας που παρεμβαίνει με τη σύνθεση, απέκκριση, μεταφορά, πρόσδεση, κίνηση ή εξάλειψη των φυσικών ορμονών στο σώμα και είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση της αναπαραγωγής, ανάπτυξης ή /και συμπεριφοράς.

2.2 Δισφαινόλη-A, παραγωγή και χρήση της

Η δισφαινόλη Α (2,2-(4,4-διϋδροξυδιφαινύλο)προπάνιο ή 4,4'-ισοπροπυλιδενοδιφαινόλη) ανήκει στην κατηγορία των ενδοκρινικών διαταρακτών και είναι μια οργανική ένωση η οποία σχεδιάστηκε αρχικά το 1936 ως τεχνητή

ορμόνη, αλλά σήμερα είναι διαδεδομένη σε υλικά συσκευασίας και στην βιομηχανία πολυκαρβονικών πλαστικών και εποξικών ρητινών. Η σύνθεση και η παραγωγή της BPA στις Ηνωμένες Πολιτείες φτάνει τους 771.000 τόνους, ενώ η παγκόσμια παραγωγή το 2009 ξεπέρασε τους 2,2 εκ. τόνους (Reuters, 2010). Περίπου 100 τόνοι BPA απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα κάθε έτος κατά τη διάρκεια της παραγωγής (Maffini et al., 2006) ενώ σχεδόν το 30% της παγκόσμιας παραγωγής εμφανίζεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Birkett and Lester, 2003).

Το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγόμενης δισφαινόλης χρησιμοποιείται στη βιομηχανία πλαστικών για την παραγωγή πολυανθρακικών (65%) και εποξικών ρητινών (28%) και το υπόλοιπο (7%) σε άλλα προϊόντα, όπως ακόρεστα πολυεστερικά - ρητίνες στυρένιου, επιβραδυντικών φλόγας, προϊόντα PVC κ.α. (Cousins et al., 2002). Αυτού του είδους τα παραγόμενα πλαστικά χρησιμοποιούνται στη συσκευασία τροφίμων και ποτών, σε κονσέρβες, καπάκια μπουκαλιών, συσκευασίες γάλακτος, παιδικών τροφών, για την εσωτερική κάλυψη μεταλλικών δοχείων, σε καπάκια μπουκαλιών και για την κατασκευή οδοντικών ρητινών και αγωγούς ύδρευσης (Maffini et al., 2006, Subramanya, 2007). Επίσης, η ένωση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προσθετικό σε θερμικό χαρτί, και ως αντιοξειδωτικό των πλαστικών (Jiang et al., 2005).

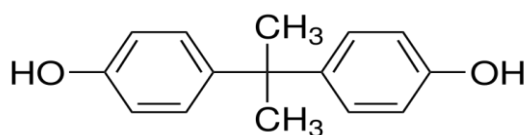
Εδώ και αρκετά χρόνια οι ειδικοί έχουν ανακαλύψει ότι η ουσία δρα σε επιγενετικό επίπεδο – παρεμβαίνει δηλαδή στην έκφραση των γονιδίων - όχι όμως και στην αλληλουχία του γενετικού κώδικα. Έρευνες έχουν δείξει ότι η BPA όταν χρησιμοποιείται για κάλυψη του εσωτερικού μεταλλικών δοχείων που περιέχουν τρόφιμα, καταφέρνει να εισχωρήσει μέσα στο προϊόν και κατά συνέπεια να αποκτήσει οιστρογόνα δραστηριότητα. Τα δοχεία αυτά περιέχουν τη μεγαλύτερη ποσότητα BPA καθώς έχει βρεθεί ποσότητα της τάξης των 80μg/Kg μέσα σε κονσερβοποιημένες τροφές (Jiang et al., 2005).

2.2.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες της BPA

Η BPA όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί μια αρωματική ένωση τεχνητά παρασκευασμένη, και με ποικίλες χρήσεις ως χημικό δομικό στοιχείο στη βιομηχανία

για την παραγωγή προϊόντων,. Τα προϊόντα αυτά χαρακτηρίζονται από χαμηλό βάρος, ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και αντοχή στο φυσικό περιβάλλον, καθιστώντας την ιδιαίτερα χρήσιμο βιομηχανικό προϊόν.

Αποτελείται από δύο φαινολικούς δακτυλίους ενωμένους με γέφυρα μεθυλίου και με μεθυλικές ομάδες συνδεδεμένες με τη γέφυρα (Εικ.1). Σε συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας περιβάλλοντος εμφανίζεται ως λευκό στερεό σε μορφή κρυστάλλων, νιφάδων ή σκόνης. Ως ένωση με σταθερά Henry της τάξης του $4,03 \cdot 10^{-6}$, χαρακτηρίζεται από χαμηλή πτητικότητα (μικρότερη του νερού), ενώ είναι μέτρια υδατοδιαλυτή. Έχει μεγαλύτερη διαλυτότητα σε αλκαλικό pH, ενώ θεωρείται υδρόφοβη ένωση με σταθερά pKa μεταξύ 9,59 και 11,30 (Cousins et al., 2002). Η χαμηλή τιμή του συντελεστή κατανομής οκτανόλης νερού K_{ow} υποδηλώνει τη λιποφιλικότητά της και την τάση της να προσδένεται σε στερεές φάσεις στα υδατικά οικοσυστήματα (Αθανασιάδου, 2008).



Εικόνα 1. Χημική δομή της δισφαινόλης.

Πίνακας 1. Φυσικοχημικές ιδιότητες της BPA (Sax and Lewis, 1996).

Παράμετρος	Τιμή
Εμφάνιση	λευκό στερεό σε μορφή κρυστάλλων, νιφάδων ή σκόνης
Μοριακός τύπος	$C_{15}H_{16}O_2$
Μοριακό Βάρος	228,29g/mol
CAS number	80-05 ⁻⁷
EINECS-No:	201-245-8
Σχετική πυκνότητα	1,195kg/m ³ at 25°C
Σημείο τήξης	150-157°C
Σημείο βρασμού	220 °C (493 K) / 4 mmHg
Διαλυτότητα στο νερό	120 - 301 mg/l at 25°C
Τάση ατμών	$<3,96 \cdot 10^{-7}$ mm Hg
Log K_{ow}	3,4 (pH=7)
K_{oc}	314 - 1524L/kg
Σημείο ανάφλεξης	207°C

2.2.2 Πηγές και απελευθέρωση της BPA στο περιβάλλον

Η BPA εισέρχεται στο περιβάλλον μέσω διαφόρων οδών. Μπορεί να απελευθερωθεί μέσω βιομηχανικών διεργασιών ειδικότερα μέσω θέρμανσης, χειρισμού, μεταφοράς ή ατυχήματος. Κατά την επεξεργασία της στη βιομηχανία, η θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα να απελευθερώνεται μέρος της στην ατμόσφαιρα. (Subramanya, 2007). Καθώς χαρακτηρίζεται μέτρια υδατοδιαλυτή, εισέρχεται στο περιβάλλον από τα απόβλητα των βιομηχανιών όπου παράγεται. Τα διασταλλάγματα χωματερών, παρουσιάζουν μέσες συγκεντρώσεις της τάξης των 269μg/L, γεγονός που τα κατατάσσει ως σημαντικό μέσο απελευθέρωσης της ένωσης στο περιβάλλον (Yamamoto et al., 2001) Το νερό που χρησιμοποιείται για πλύση αποτελεί εξίσου πηγή ρύπανσης. Παρά την επεξεργασία του, δεν επιτυγχάνεται ολοκληρωτική απομάκρυνσή της, ενώ λόγω της χαμηλής τιμής του συντελεστή κατανομής αέρα – νερού της τάξης του 10^{-9} , η εξάτμιση κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα. Έρευνες δείχνουν ότι μέσω των συσκευασιών των τροφίμων όπου χρησιμοποιείται, μπορεί να περάσει στο προϊόν με αποτέλεσμα αυτό να αποκτήσει οιστρογενή δράση (Αθανασιάδου, 2008).

Με εκτιμώμενη ετήσια παραγωγή 700.000tn στην ΕΕ και 2.500.000tn παγκοσμίως την περίοδο 1996-1999, η BPA είναι ποσοτικά σχεδόν συγκρίσιμη με το σύνολο των φθαλατών μαζί (Oehlmann et al., 2008). Οι τιμές $K_{OW} = 3,40$ και διαλυτότητας 301mg/L μπορεί να καταδεικνύουν μια μέση προσρόφηση σε ιζήματα και συσσώρευσή της σε οργανισμούς. Ωστόσο, μετρήσεις βιοσυσσώρευσης σε ψάρια δείχνουν ότι δεν υπάρχει σημαντική βιοσυσσώρευση σε σπονδυλωτά, αν και ελαφρώς υψηλότερη αναφέρεται σε ασπόνδυλα του γλυκού νερού. Αν και αποδομείται σχετικά εύκολα υπό αερόβιες συνθήκες, συνηθίζεται να ανιχνεύεται σε υδατικά οικοσυστήματα, λόγω της συνεχούς απελευθέρωσης της στο περιβάλλον (Oehlmann et al., 2008).

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις BPA σε δείγματα υγρών αποβλήτων από διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας (Furhacker et al., 1999).

Σημεία Δειγματοληψίας	Μέση συγκέντρωση (μg/L)	Ελάχιστη τιμή (μg/L)	Μέγιστη τιμή (μg/L)
Βιομηχανία ξύλου / μετάλλου	17	2,6	35
Χημική βιομηχανία	18	2,5	50
Νοσοκομεία	μη ανιχνεύσιμο	μη ανιχνεύσιμο	1
Παραγωγή χαρτιού	41	28	72
Εταιρίες καθαρισμού ρούχων	5,2	1,0	8,9
Βιομηχανία τροφίμων	2,1	μη ανιχνεύσιμο	3,8
Περιοχές νοικοκυριών I	2,2	μη ανιχνεύσιμο	2,6
Περιοχές νοικοκυριών II	2,5	μη ανιχνεύσιμο	5,8
Εισροή Μονάδας Επεξεργ. Λυμάτων	21,0	10	37
Εκροή Μονάδας Επεξεργ. Λυμάτων	1,5	μη ανιχνεύσιμο	2,5

2.3 Η δισφαινόλη - Α στο φυσικό περιβάλλον

2.3.1 Περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις

Τα επίπεδα της BPA σε υδατικά δείγματα και δείγματα ιζημάτων έχουν προσδιοριστεί σε διάφορες μελέτες, από τις οποίες συμπεραίνεται ότι ποικίλουν βάσει της πηγής του δείγματος και τη χρονική στιγμή λήψης αυτού.

Από διάφορα σημεία δειγματοληψιών, οι υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης βρέθηκαν σε στραγγίσματα ΧΥΤΑ και αναερόβια ιζήματα. Από έρευνες που έχουν γίνει με βάση της συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν σε διαφορετικής προέλευσης υγρά δείγματα, συμπεραίνονται τα ακόλουθα: (1) οι συγκεντρώσεις σε δείγματα ρεμάτων και ποταμών είναι συνήθως μικρότερες των 21μg/L, (2) οι συγκεντρώσεις σε στραγγίσματα ΧΥΤΑ είναι συνήθως μικρότερες των 17,2 mg/L, και (3)

συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τα 17,2 mg/L συνήθως δεν απαντώνται στο περιβάλλον (Crain et al., 2007)

2.3.2 Τύχη στο υδατικό περιβάλλον

Η BPA αποδομείται εύκολα σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και επιφανειακά νερά και φωτοοξειδώνεται σαν αέρια BPA ή εναποτίθεται σαν σωματίδια από την ατμόσφαιρα. Βακτήρια ικανά να βιοαποδομούν την BPA βρίσκονται σε νερά ποταμών και μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Σε εκροές βιολογικών καθαρισμών έχει παρατηρηθεί απομάκρυνση πάνω από 90% και σε ποταμούς οι χρόνοι ημίσειας ζωής ήταν μικρότεροι των 5 ημερών. Η αποδόμηση της BPA επηρεάζεται επίσης από τη θερμοκρασία. Σε νερά ποταμών ο χρόνος ημίσειας ζωής ήταν 4 και 7 ημέρες σε θερμοκρασίες 30 και 20°C αντίστοιχα, ενώ στους 4°C μόνο το 20% της BPA αποδομήθηκε σε διάστημα 20 ημερών. Επίσης σημαντικό ρόλο παίζουν οι αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες. Τα αναερόβια βακτήρια έχουν περιορισμένη με ανύπαρκτη ικανότητα βιοαποδομητικότητας και σαν αποτέλεσμα η BPA παρουσιάζεται επίμονη επί μακρόν διάστημα κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Τέλος τα άλγη παρουσιάζουν επίσης ικανότητα απομάκρυνσης της BPA, ενώ η απομάκρυνση ευνοείται κάτω από συνθήκες φωτός έως και 63% (Γιαντζή, 2007).

2.4 Απομάκρυνση της BPA

Γενικότερα η απομάκρυνση της BPA λαμβάνει χώρα μέσω αβιοτικών και βιοτικών διεργασιών όπως συνοψίζονται στη συνέχεια:

2.4.1 Αβιοτική αποδόμηση της BPA

Διάφορες αβιοτικές διεργασίες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία της BPA σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (ΜΕΛ). Στο περιβάλλον συμβαίνει και χημική αποδόμηση της BPA μέσω φωτοαποδόμησης (Subramanya, 2007).

2.4.1.1 Χημικές μέθοδοι.

Χημικές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς για την αποδόμηση της BPA από βοθρολύματα. Μελέτη αναφέρει απομάκρυνση της ένωσης κατά 85% με εφαρμογή ουδετεροποίησης του pH. Μέθοδοι όπως η οζονοποίηση και η χλωρίωση έχουν επίσης εφαρμοστεί για την απομάκρυνση της BPA από πόσιμο νερό. Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία δειγμάτων με συγκεντρώσεις 500 – 300.000ng/L με οζονοποίηση (1,4mg/L O₃), και χλωρίωση με υποχλωριώδες νάτριο (0,5mg/L) και διοξείδιο του χλωρίου (0,4-0,6mg/L). Οζονοποίηση ακολουθούμενη από χλωρίωση απομάκρυνε την BPA κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Οζονοποίηση σε συνδυασμό με επεξεργασία με υποχλωριώδες νάτριο κατέληξε στο ίδιο αποτέλεσμα, ωστόσο με αύξηση στην ενδοκρινική δραστηριότητα (Lenz et al., 2004).

2.4.1.2 Φωτοαποδόμηση.

Η φωτοαποδόμηση είναι η κύρια μη-βιολογική διεργασία για τη διάσπαση της BPA στο περιβάλλον και συμβαίνει είτε με φωτόλυση, είτε με φωτοοξειδωση. Η φωτοαποδόμηση της BPA συμβαίνει αργά σε καθαρό νερό, αλλά μπορεί να επιταχυνθεί με την παρουσία διαλυμένης οργανικής ουσίας (DOM), συμπεριλαμβανομένων των χουμικών και φουλβικών οξέων, ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species ή ROS) και ιόντων συμπεριλαμβανομένων ιόντων σιδήρου και νατρίου. Διαλυμένες οργανικές ουσίες συναντώνται ευρέως στο επιφανειακό νερό και μπορούν να απορροφήσουν ακτινοβολία και να αυξήσουν το μετασχηματισμό της BPA. Στην ατμόσφαιρα ο χρόνος ημίσειας ζωής της BPA από φωτοαποδόμηση κυμαίνεται από 0,74 σε 7,4 ώρες (Wang, 2008).

2.4.1.3 Φυσικές μέθοδοι.

Απομάκρυνση σε ποσοστό πάνω από 85% παρατηρήθηκε με τη μέθοδο της διήθησης σε συνδυασμό με τη χρήση ρητινών XAD. Ακόμη, χρήση διαφορετικών νανόφιλτρων είχε σαν αποτέλεσμα απομάκρυνση από 70 έως 100%. Άλλες τεχνολογίες όπως βιοαντιδραστήρες μεμβράνης και αντίστροφη ώσμωση σχετίζονταν με απομάκρυνση 98%. Τέλος, η επεξεργασία με βιοαντιδραστήρες μεμβράνης σε συνδυασμό με χρήση ενεργού άνθρακα σε μορφή κόκκων, κατέληξε σε 99% απομάκρυνση (Subramanya, 2007).

2.4.2 Βιοαποδόμηση της BPA στο περιβάλλον

Η BPA δύναται να αποδομηθεί από μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες και πλαγκτόν), φυτά, ασπόνδυλα και σπονδυλωτά (ψάρια, αμφίβια και θηλαστικά). Η βιοαποδόμηση είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα για την απομάκρυνση ή τη μείωση τοξικότητας της BPA στο περιβάλλον ή σε οργανισμούς (Kang et al., 2006).

2.4.2.1 Βακτήρια ικανά να αποδομούν την BPA

Αρκετά βακτήρια ικανά να αποδομούν την BPA έχουν απομονωθεί από το χώμα, νερά ποταμών, από θαλασσινό νερό (Wang, 2008) και μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (Spivack et al., 1993).

Οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων χρησιμοποιούν βακτήρια για την απομάκρυνση της BPA. Επίσης βακτήρια που έχουν βρεθεί σε ποτάμια και τα οποία αποδομούν την εν λόγω ένωση προκάλεσαν ημίσεια ζωή, λόγω αποδόμησης, της τάξης των 5 ημερών (Kang and Kondo, 2004). Ωστόσο αν και υπάρχουν πολλά βακτήρια αποδομητές στα ποτάμια, αυτά τα οποία έχουν υψηλή βιοαποδομητική ικανότητα είναι περιορισμένα (Kang and Kondo, 2002).

Στο έδαφος, ο κύριος υπεύθυνος παράγοντας αποδόμησης είναι μικροοργανισμοί, κατά κύριο λόγο βακτήρια (Fent et al., 2003). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι ένα στέλεχος (*Pseudomonas monteilii*) που απομονώθηκε από το έδαφος είχε καλή ανοχή και δυνατότητα βιοαποδόμησης για υψηλότερες συγκεντρώσεις BPA (500.000 -1.000.000 μg/kg) σε σχέση με αυτά που ήταν ισχυρά τοξικά στους υδρόβιους οργανισμούς (1.000-10.000 μg/L) (Masuda et al., 2007).

Το βασικό μεταβολικό μονοπάτι της BPA από βακτήρια, έχει ως κύριους μεταβολίτες την 4-υδροξυακετοφαινόνη (4-hydroxyacetophenone ή 4-HAP) και το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (4-hydroxybenzoic acid), ενώ το δευτερεύων μονοπάτι παράγει επίσης δύο κύριους μεταβολίτες, την 2,2-δις(4-υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλη (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)-1-propanol) και την 2,3-δις(4-υδροξυφαινυλ)-1,2-προπανοδιόλη (2,3-

bis(4-hydroxyphenyl)-1,2-propanediol) (Lobos et al., 1992; Spivack et al., 1994). Αντίστοιχα μεταβολικά μονοπάτια έχουν εξαχθεί και σε άλλες μελέτες (Wang, 2007).

I. Επιφανειακά ύδατα και μονάδες επεξεργασίας λυμάτων

Η βιοαποδόμηση της BPA έχει αποτελέσει το επίκεντρο διαφόρων μελετών ως εναλλακτική των χημικών και φυσικών μεθόδων επεξεργασίας. Η BPA είναι γνωστό ότι βιοαποδομείται ταχέως σε επιφανειακά ύδατα με μέσο χρόνο ημίσειας ζωής μικρότερο των 5 ημερών (Kang and Kondo, 2002).

Διάφορα στελέχη αερόβιων βακτηριών που αποδομούν την BPA απομονώθηκαν από νερά ποταμών και μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (ΜΕΛ). Δύο στελέχη βακτηριών τα *Pseudomonas* sp. και *Pseudomonas putid* τα οποία διασπούσαν την BPA περισσότερο από 90% απομονώθηκαν από νερά ποταμών. Κάτω από αερόβιες συνθήκες, η αποδόμηση της BPA ήταν μεγαλύτερη από 90% στο τέλος της 7^{ης} ημέρας, σε σύγκριση με αποδόμηση με ποσοστό μικρότερο από 10% μετά από 10 ημέρες κάτω από αναερόβιες συνθήκες (Kang and Kondo, 2002).

Μελέτη σχετικά με τη BPA που απελευθερώνεται από τη βιομηχανία, διεξήχθη στην περιοχή Houston Ship Channel, ένα από τα πιο πολυσύχναστα λιμάνια των ΗΠΑ. Αποδόμηση στα περισσότερα από τα 12 δείγματα παρατηρήθηκε έπειτα από 2 ημέρες, με τη συγκέντρωση της BPA να φτάνει κάτω από τα όρια ανίχνευσης την 4^η ημέρα. Η μείωση αυτή αποδόθηκε σε βιοαποδόμηση, καθώς δεν υπήρχε έκθεση σε ακτινοβολία UV ή αλλαγή στο pH των δειγμάτων (Dorn et al., 1987).

II. Έδαφος

Καθώς η BPA έχει υψηλό συντελεστή κατανομής οκτανόλης – νερού, έχει την τάση να προσροφάται σε στερεές επιφάνειες, στη βλάστηση, στο έδαφος και τα αεροζόλ. Η BPA σε στερεά ιζήματα αναφέρεται ότι έχει χρόνο ημίσειας ζωής λιγότερο από 3 ημέρες. Οι μεταβολίτες της BPA βρέθηκε ότι επίσης αποδομούνταν επιτυχώς στο έδαφος. Το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης αποδόθηκε στην αερόβια βιοαποδόμηση,

ενώ ένα μέρος της μείωσης αποδόθηκε σε ενσωμάτωση στην οργανική ουσία του εδάφους (Mondel, 2001). Για την επίδραση της ακτινοβολίας UV στην BPA δεν υπήρχαν δεδομένα.

2.5 Φυτοαποκατάσταση

2.5.1 Γενικά στοιχεία και τύποι φυτοαποκατάστασης

Τα φυτά αποτελούν οργανισμούς οι οποίοι επηρεάζουν το περιβάλλον τους όχι μόνο μέσω της πρόσληψης ουσιών, αλλά και από την έκκριση πολλών άλλων που παράγονται στον πρωτοβάθμιο και δευτεροβάθμιο μεταβολισμό (Martin 1977, Anderson et al., 1994). Αυτή η φυσικοχημική αλληλεπίδραση των φυτών με το περιβάλλον μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών. Οι ρύποι μπορεί να λαμβάνονται και να μεταβολίζονται από τα φυτά, να ακινητοποιούνται στις ρίζες, ή να αποδομούνται από μικροοργανισμούς που ζουν σε περιοχές γύρω από τη ρίζα των φυτών. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν τα φυτά για την αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών κατηγοριοποιούνται με τον όρο «φυτοαποκατάσταση» ή «φυτοεξυγίανση» (*Phytoremediation*). Ο ευρύτερος όρος «φυτοτεχνολογία» (*Phytotechnology*) χρησιμοποιείται επίσης, ωστόσο περιλαμβάνει και άλλες μεθόδους, όπως η κατασκευή υγροτόπων ή χρήση φυτών εδαφοκάλυψης για μείωση της διάβρωσης (Pilon, 2005).

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία της φυτοαποκατάστασης μπορούν να διακριθούν, σύμφωνα με την υπηρεσία προστασίας του περιβάλλοντος των Η.Π.Α (U.S. E.P.A., 2001, Μανουσάκη, 2008), στις εξής κατηγορίες:

1. Φυτοδιάσπαση ή φυτοαποδόμηση (*Phytodegradation*): πρόσληψη του ρυπαντή από το φυτό και διάσπαση/αποδόμησή του στους ιστούς του.
2. Ριζοδιάσπαση ή ριζοαποδόμηση (*Rhizodegradation* ή *Enhanced rhizosphere biodegradation*): διάσπαση οργανικών ρυπαντών στο έδαφος, μέσω μικροβιακών πληθυσμών που αναπτύσσονται στην περιοχή του ριζικού συστήματος (ριζόσφαιρα).

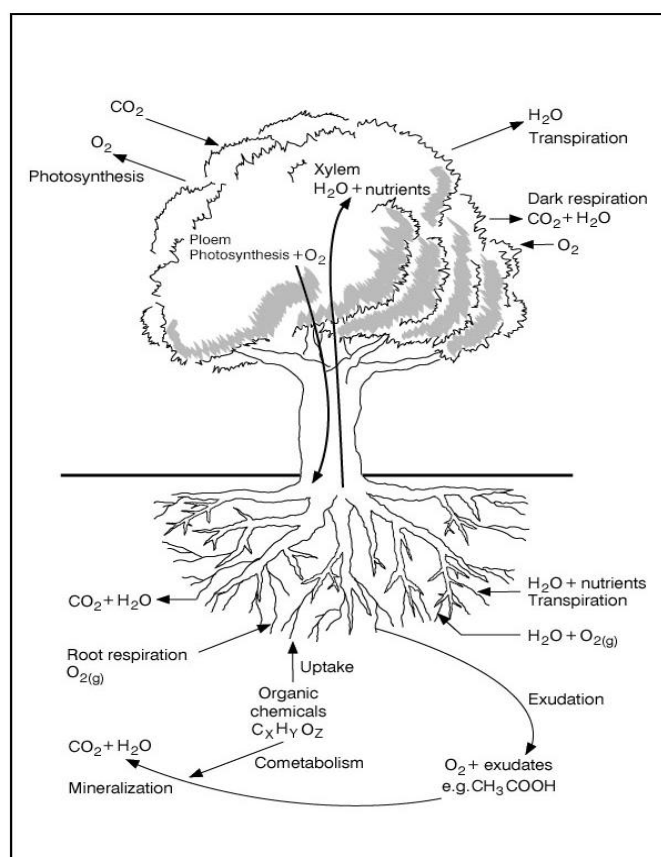
3. Φυτοεξάτμιση (*Phytovolatilization*): πρόσληψη μετάλλων και οργανικών ενώσεων από τα φυτά, μετατροπή τους σε πτητικές μορφές και απελευθέρωσή τους στην ατμόσφαιρα.
4. Φυτοεξαγωγή ή φυτοσυσσώρευση (*Phytoextraction* ή *Phytoaccumulation*): πρόσληψη μετάλλων και μεταφορά τους στα υπέργεια τμήματα του φυτού.
5. Φυτοσταθεροποίηση (*Phytostabilization*): ακινητοποίηση του ρύπου στο έδαφος.
6. Ριζοδιήθηση (*Rhizofiltration*): προσρόφηση του ρύπου στις ρίζες για συγκράτηση και/ή απομάκρυνση
7. Υδραυλικός έλεγχος (*Hydraulic control*): έλεγχος και απομάκρυνση των υπόγειων υδάτων μέσω της πρόσληψής τους από τα φυτά

2.5.2 Μηχανισμοί φυτοαποκατάστασης

Η φυτοαποκατάσταση εκμεταλλεύεται φυσικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στα φυτά (Εικ. 2) και οι οποίες περιλαμβάνουν απορρόφηση νερού και χημικών ενώσεων, μεταβολισμό εντός του φυτού, απελευθέρωση ανόργανων και οργανικών ενώσεων (εκκρίματα) στο έδαφος και φυσικές και βιολογικές επιδράσεις των ριζών του φυτού. Τα φυτά χρειάζονται 13 ανόργανα θρεπτικά συστατικά (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cl, Zn, Mn, Cu, B και Mo) για την ανάπτυξή τους τα οποία προσλαμβάνονται από το ριζικό σύστημα. Εκτός από τα παραπάνω απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, είναι δυνατόν να προσληφθούν από τα φυτά και άλλα μη απαραίτητα ανόργανα συστατικά όπως ορισμένοι κοινοί ανόργανοι (Pb, Cd, As, κ.λπ.) ή οργανικοί ρύποι. Για να προσληφθεί ένα χημικό συστατικό από το φυτό χρειάζεται να είναι διαλυμένο είτε στο νερό του εδάφους είτε στο υπόγειο νερό. Το νερό απορροφάται από το εδαφικό διάλυμα στον εξωτερικό ιστό των ριζών και έτσι οι περιεχόμενοι στο νερό ρυπαντές μπορεί να μετακινηθούν στα διαφορετικά μέρη του φυτού όπου μπορεί να ροφηθούν, δεσμευθούν ή μεταβολισθούν (Πανταζίδου κ.α., 2006).

Ένα από τα χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την πρόσληψη οργανικών συστατικών σε ένα φυτό είναι ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού, $\log K_{ow}$. Τα χημικά συστατικά που έχουν τη δυνατότητα να εισέρχονται στο φυτό έχουν τιμές $\log K_{ow}$

μεταξύ 1 και 3,5. Τα υδρόφοβα χημικά που παρουσιάζουν τιμές $\log K_{ow}$ μεγαλύτερες από 3,5 είναι γενικά μη επαρκώς διαλυτά στο νερό ή δεσμεύονται τόσο ισχυρά στην επιφάνεια των ριζών που δε μπορεί εύκολα να μεταφερθούν εντός του φυτού. Από την άλλη πλευρά, τα χημικά τα οποία είναι ισχυρά πολωμένα και εύκολα διαλυτά στο νερό ($\log K_{ow} < 1$) δεν απορροφώνται επαρκώς από τις ρίζες ούτε μεταφέρονται ενεργά μέσω των μεμβρανών του φυτού λόγω της υψηλής τους πολικότητας. Τα περισσότερα χημικά του βενζολίου, τολουολίου, αιθυλοβενζολίου και ξυλολίου (BTEX), οι χλωριωμένοι διαλύτες και τα αλειφατικά χημικά βραχείας αλύσου παρουσιάζουν εύρος τιμών του συντελεστή $\log K_{ow}$ που τους επιτρέπει να είναι δεκτικά σε φυτοαποκατάσταση (Πανταζίδου κ.α., 2006).



Εικόνα 2. Μεταφορά οξυγόνου, νερού και ενώσεων σε ξυλώδες φυτό (Πανταζίδου κ.α., 2006)

2.5.3 Η φυτοαποκατάσταση ως μέθοδος εξυγίανσης από οργανικούς ρύπους

Σε αντίθεση με την περίπτωση των μετάλλων, οι οργανικοί ρύποι μπορούν να αποδομηθούν αποτελεσματικά με τη συνεργιστική δράση του φυτού με τους σχετιζόμενους με αυτό μικροοργανισμούς, μέσω της διαδικασίας της ριζο- και της φυτοαποδόμησης. Ορισμένες οργανικές ενώσεις μπορούν να μεταφέρονται διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών των φυτών. Από αυτές, εκείνες οι οποίες είναι χαμηλού μοριακού βάρους μπορούν συχνά να λαμβάνονται από το έδαφος και να απελευθερώνονται μέσω των φύλλων μέσω της διαπνοής. Ορισμένες από τις μη πτητικές ενώσεις μπορούν να διασπαστούν ή να καταστούν μη τοξικές μέσω ενζυματικής τροποποίησης και απομόνωσης στα φυτά (phytodegradation, phytoextraction). Άλλες ενώσεις παραμένουν σταθερές στα φυτά και μπορούν να αφαιρεθούν μαζί με τη βιομάζα, για τη δέσμευση ή την αποτέφρωσή τους.

Διάφορα πειράματα έχουν διεξαχθεί τα οποία αφορούν στην επίδραση των ρύπων στην ανάπτυξη των φυτών. Αυτά τα πειράματα επιτρέπουν τη διερεύνηση μεθόδων για την αντιμετώπιση της καταπόνησης που δημιουργείται από τη ρύπανση, χωρίς την επίδραση παραγόντων που θα προκαλούσαν διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων, όπως οι καιρικές συνθήκες και η παρουσία ή όχι θρεπτικών. Έχει βρεθεί ότι κάποια φυτά μπορούν να έχουν ριζικό σύστημα συνολικού μήκους περισσότερο από 16 εκ. χλμ/στρ, κάτι το οποίο σημαίνει ότι αποτελούν σημαντικό δυναμικό για φυτοαποκατάσταση στο φυσικό περιβάλλον. Πρόβλημα αποτελεί το γεγονός όμως ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις ρύπων, εν μέρει λόγω της οξειδωτικής καταπόνησης, τείνουν να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των φυτών αλλά και των ριζών τους (Gerhardt et al., 2009). Η καταπόνηση αυτή περιορίζει το ρυθμό φυτοαποκατάστασης *in situ* (Huang et al., 2004, Huang et al., 2005, Ferro et al., 1999). Επίσης τα ρυπασμένα εδάφη τείνουν να είναι φτωχά σε θρεπτικά στοιχεία και να έχουν μειωμένη μικροβιακή ποικιλότητα, κάτι το οποίο συμβάλει με τη σειρά του στη μικρότερη ανάπτυξη βιομάζας, καθώς και στη μείωση του ρυθμού αποκατάστασης (Gerhardt et al., 2009, Chaudhry et al., 2005, Ferro et al., 1999, White et al., 2006).

Στα πειράματα φυτοαποκατάστασης τεχνητά ρυπασμένου εδάφους σε θερμοκήπιο, η προσοχή εστιάζεται συνήθως στην ικανότητα κάποιου συγκεκριμένου φυτού να επιζήσει και να αναπτυχθεί παρουσία κάποιας συγκεκριμένης χημικής ουσίας, ή και ακόμα να την αποδομήσει. Στην πραγματικότητα όμως τα εδάφη σε ρυπασμένες περιοχές συνήθως περιέχουν ένα μείγμα από χημικές ενώσεις και συχνά περιλαμβάνουν τόσο ανόργανα όσο και οργανικά στοιχεία. Επίσης σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στο πειραματικό πεδίο, στη φύση οι χημικές ενώσεις δεν είναι άμεσα βιοδιαθέσιμες. Τέτοια παραδείγματα υπάρχουν, όπως η περίπτωση όπου τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από εφαρμογή της φυτοαποκατάστασης σε περιοχή παλαιού εργοστασίου παρασκευής κωκ, ήταν διαφορετικά από αυτά που εξήχθησαν μετά από παρατήρηση εδάφους εμπλουτισμένου τεχνητά με μίγμα PAH και πίσσας (Smith et al., 2006).

2.6 Φυτοαποδόμηση και Ριζοαποδόμηση

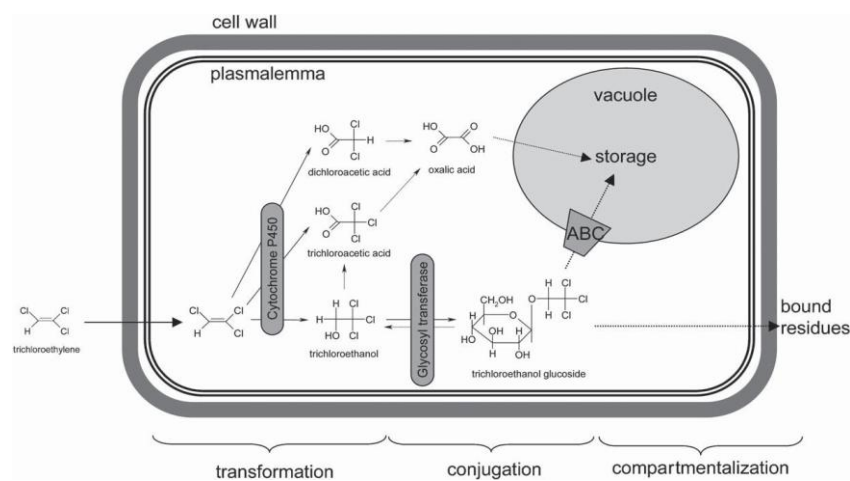
Οι τεχνικές της φυτοαποδόμησης και ριζοαποδόμησης, θεωρούνται οι επικρατέστερες για την φυτοαποκατάσταση από οργανικούς ρύπους. Τα φυτά προκειμένου να προστατευτούν από φαινόμενα φυτοτοξικότητας, είναι εφοδιασμένα με ένα πολύπλοκο και ευπροσάρμοστο σύστημα ενζύμων. Κατά την φυτοαποδόμηση γίνεται διάσπαση των ρύπων από τα ένζυμα του φυτού, ενώ κατά τη ριζοαποδόμηση γίνεται ενζυματική διάσπαση στις ρίζες του. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν εξαχθεί και δημοσιευτεί αρκετά χρήσιμα συμπεράσματα, αλλά τα περισσότερα φαίνεται να παραμένουν μακριά ακόμα από το να εφαρμοστούν στην πράξη. Η πρόκληση αφορά στην ερμηνεία και χρήση αυτής της βασικής γνώσης για επίλυση υπαρκτών προβλημάτων ρύπανσης.

2.6.1 Φυτοαποδόμηση

2.6.1.1 To 'Green Liver Concept'

Ο όρος «**green liver**» ήταν επινόηση του Sandermann (Rea, 1999) για να περιγράψει τη μεταβολική δράση των *ξενοβιοτικών* ουσιών από τα φυτά. Ο Sandermann

σύγκρινε το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών στα φυτά με εκείνη στο ήπαρ των θηλαστικών, η οποία μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: τον μετασχηματισμό (transformation, Φάση I), τη σύζευξη (conjugation, Φάση II), και την απέκκριση (excretion, Φάση III). Στα φυτά, ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών ουσιών λειτουργεί επίσης σε τρεις φάσεις, εκτός από το ότι δεν υπάρχει σύστημα απέκκρισης ανάλογο των θηλαστικών. Έτσι, στα φυτά η φάση III είναι το βήμα όπου οι τροποποιημένες ξενοβιοτικές ουσίες κατακρατώνται από τα κύτταρα, δηλαδή οι χημικές ενώσεις “αποθηκεύονται” στο *χυμοτόπιο* ή τα κυτταρικά τοιχώματα. Η ενζυματική διαδικασία που εμπλέκεται σε αυτές τις τρεις φάσεις παρουσιάζεται στη συνέχεια (Εικ.3).



Εικόνα 3. Ο μεταβολισμός του TCE στο φυτικό κύτταρο σύμφωνα με το g.l.c. (Reichenauer et al., 2008).

2.6.1.2 Φάσεις του μεταβολισμού των οργανικών ενώσεων στα φυτά

Φάση I

Στην πρώτη φάση ή φάση μετασχηματισμού, οι ξενοβιοτικές ουσίες τροποποιούνται χημικά με οξείδωση (oxidation), απόσπαση (reduction) και υδρόλυση (hydrolysis), ώστε να γίνουν περισσότερο πολικές και επομένως πιο υδατοδιαλυτές, οδηγώντας σε υψηλότερη βιοχημική δραστηριότητα. Η φάση αυτή αφορά αντιδράσεις οξυγέनेσης του κυτοχρώματος της οικογένειας ενζύμων P450 (CYP). Αυτά τα ένζυμα, με ένα ευρύ φάσμα πιθανών υποστρωμάτων και με υψηλό αριθμό πιθανών αντιδράσεων, μπορούν να βρεθούν σε όλες τις κλάσεις των οργανισμών (Bernhardt, 2006).

Συνιστούν μια πολύ μεγάλη οικογένεια ενζύμων στα ανώτερα φυτά, τα οποία μετατρέπουν τα αδρανή υδρόφοβα μόρια σε πιο αντιδραστικά και πιο υδατοδιαλυτά είδη. Μια άλλη μεγάλη ομάδα ενζύμων της Φάσης I είναι οι καρβοξυλεστεράσες (CXE) που υδρολύουν τους καρβοξυλεστέρες, οι οποίοι είναι υδρόφοβες ουσίες. Τα παραγόμενα καρβοξυλικά οξέα είναι πιο αντιδραστικά από την πρόδρομη ουσία και ως εκ τούτου μπορούν να συζευχθούν με άλλα μόρια κατά τη Φάση II (Reichenauer et al., 2008).

Φάση II

Με τη σύζευξη με ενδογενή μόρια (σάκχαρα ή πεπτίδια), οι τροποποιημένες ξενοβιοτικές ουσίες γίνονται λιγότερο τοξικές για τα φυτά (κάτι το οποίο δε συνεπάγεται απαραίτητα ότι είναι λιγότερο τοξικές και για τον άνθρωπο) και ταυτόχρονα είναι έτοιμες για διαμερισματοποίηση (compartmentalization) (Φάση III). Οι γλυκοσυλτρανσφεράσες αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων (Vogt and Jones, 2000) τα οποία μεταφέρουν νουκλεοτίδιο-διφωσφορικό - ενεργά σάκχαρα σε χαμηλού μοριακού βάρους υποστρώματα, που παίζουν σημαντικό ρόλο στο δευτερογενή μεταβολισμό ο οποίος σχετίζεται με την άμυνα των φυτών και την ανοχή στην καταπόνηση (Bowles et al., 2006). Το ενεργό σάκχαρο είναι κυρίως η διφωσφορική ουριδινο-γλυκόζη (UDP-γλυκόζη), ωστόσο χρησιμοποιούνται επίσης η UDP-γαλακτόζη και η UDP-ραμνόζη. Η γλυκοζυλίωση των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών είναι συχνά σημαντική για τη σταθερότητα τους, καθώς η σύζευξη με τη γλυκόζη, που είναι επακόλουθο του εγκλωβισμού στο χυμοτόπιο, εμποδίζει την αποδόμιση σε τοξικές ουσίες (π.χ. γλυκοσινολάτες και κυανιογόνοι γλυκοσίδες προλαμβάνουν τη δημιουργία τοξικών κυανιούχων ενώσεων, αλδεϋδών ή ισοθειοκυανάτων) (Kahn et al., 1997). Όσον αφορά τη γλυκοζυλίωση των ξενοβιοτικών ουσιών, θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρά τον μεγάλο αριθμό των εμπλεκόμενων ενζύμων, η *γονιδιακή έκφραση* της γλυκοσυλτρανσφεράσης μπορεί να ποικίλλει έντονα ανάλογα με το είδος του φυτού (ή ακόμα και τον οικότυπο) και εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης (Sicker et al., 2000).

Οι γλουταθειόνη-S-τρανσφεράσες (GSTs) αποτελούν μια άλλη οικογένεια ενζύμων με περισσότερα από 25 διαφορετικά διμερή. Τα μέλη αυτής της οικογένειας διαφέρουν πολύ στην επιλεκτικότητα του υποστρώματος (Edwards et al., 2000). Παρόμοια με τις γλυκοσυλτρανσφεράσες, η έκφραση των GSTs εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από εξωτερικούς παράγοντες (π.χ. περιβαλλοντικές συνθήκες, προσβολή από παθογόνα, έκθεση σε χημικές ενώσεις) και εσωτερικούς (π.χ. το στάδιο ανάπτυξης) (Marrs, 1996).

Φάση III

Τέλος, στη φάση III ή φάση διαμερισματοποίησης, οι τροποποιημένες ξενοβιοτικές ουσίες μεταφέρονται στα διάφορα τμήματα του κυττάρου (χυμοτόπιο και κυτταρικό τοίχωμα). Η μεταφορά στο χυμοτόπιο γίνεται από τους λεγόμενους ABC μεταφορείς (ATP Binding Cassette Transporters), οι οποίοι έχουν κεντρικό ρόλο στις διαδικασίες αποτοξίνωσης σε πολλά είδη, από τα αρχαία μέχρι και τον άνθρωπο (Rea, 1999).

2.6.2 Ριζοαποδόμηση

Η ριζοαποδόμηση αποτελεί είδος της υποβοηθούμενης από μικροοργανισμούς φυτοαποκατάστασης, και ορίζεται ως η αποδόμηση των ρύπων στη ριζόσφαιρα. Θεωρείται ως ένα από τα αποτελεσματικότερα μέσα με τα οποία τα φυτά μπορούν να επηρεάσουν στην αποδόμηση οργανικών ρύπων, ιδιαίτερα στην περίπτωση που υπάρχουν μεγάλες ανθεκτικές ενώσεις. Σε αυτή την περίπτωση, πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις σχετιζόμενες με τις ρίζες, τα εκκρίματά τους, το έδαφος στη ριζόσφαιρα και τους μικροοργανισμούς σε αυτή, συμβάλουν στην αποδόμηση των οργανικών ουσιών σε μη τοξικές, ή λιγότερο τοξικές ενώσεις. Το έδαφος στη ριζόσφαιρα έχει 10-100 φορές περισσότερους μικροοργανισμούς κατά βάρος, από ότι το γυμνό έδαφος (Lynch, 1990). Σε έδαφος που περιέχει μεγάλες ποσότητες ριζών, ο μικροβιακός πληθυσμός μπορεί να φτάσει σε αριθμό περίπου τα 10^{12} κύτταρα/g εδάφους (Whipps, 1990). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να προσφέρουν διάφορες παροχές στο φυτό, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης ενώσεων οι οποίες προστατεύουν το φυτό από την καταπόνηση λόγω μείωσης του επιπέδου των

ορμονών, της προστασίας από παθογόνους για το φυτό μικροοργανισμούς, καθώς και της αποδόμησης των ρύπων προτού αυτοί θα μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά το φυτό (Gerhardt et al., 2009).

Η επιτυχία της εφαρμογής της ριζοαποδόμησης έγκειται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητα των αποδομητών των ρύπων ή των μικροοργανισμών που προωθούν την ανάπτυξη του φυτού, να αποικίσουν αποτελεσματικά στη ρίζα. Για την επιτυχημένη αποίκηση των μικροοργανισμών αυτών στη ρίζα, απαιτούνται πολυάριθμα χαρακτηριστικά, που έχουν να κάνουν με μεγάλο αριθμό γονιδίων. Αυτά περιλαμβάνουν την παραγωγή *θειαμίνης* και βιοτίνης, τη σύνθεση του Ο-αντιγόνου λιποπολυσακχαρίτη, τη σύνθεση αμινοξέων και άλλα. Βασικός παράγοντας της αποτελεσματικής αποίκησης στη ρίζα είναι ο *χημειοτακτισμός* προς συγκεκριμένες ενώσεις των εκκριμάτων της ρίζας (Gerhardt et al., 2009).

Μια σημαντική ομάδα ενώσεων που συμβάλουν στον αποικισμό στις ρίζες, είναι οι πολύπλοκες αρωματικές ενώσεις, όπως τα *φλαβονοειδή* και οι *κουμαρίνες*. Υπάρχουν όμως μόνο πολύ μικρές ποσότητες αυτών των ουσιών στο έδαφος, επειδή καταναλώνονται από την εδαφική μικροχλωρίδα, η οποία τα αποδομεί και κατόπιν χρησιμοποιεί τον άνθρακα και το άζωτο. Αυτές οι αρωματικές ενώσεις των φυτών είναι όμοιες δομικά με τους περισσότερους οργανικούς ρύπους, όπως τα PCBs, τους PAHs, και τα PHC, παρέχοντας έτσι ένα μέσο για την εκμετάλλευση των φυσικών διεργασιών στην ριζόσφαιρα για την αποδόμηση των ρύπων (Gerhardt et al., 2009).

Ένας λόγος για τον οποίο η ριζοαποδόμηση συμβαίνει με φυσικό τρόπο, είναι επειδή τα φλαβονοειδή και άλλες ενώσεις που απελευθερώνονται από τις ρίζες, μπορούν να τονώσουν την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των βακτηρίων αποδόμησης των PCBs και των PAH. Επιπλέον, η ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και ο θάνατός τους προωθούν τον αερισμό του εδάφους, ο οποίος μπορεί να ενισχύει την οξειδωτική αποδόμηση των ανθεκτικών οργανικών ενώσεων. Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα είδη φυτών φαίνεται να αυξάνουν τον αριθμό των μικροοργανισμών αποδόμησης σε μεγάλο όγκο εδάφους που εκτείνεται πέρα από τη ριζόσφαιρα (Gerhardt et al., 2009). Αν και η ριζοαποδόμηση συμβαίνει με φυσικό τρόπο, μπορεί να βελτιστοποιηθεί με

ειδική επέμβαση στη ριζόσφαιρα. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με χρήση κατάλληλου συνδυασμού φυτού και μικροοργανισμού. Αυτοί μπορεί να είναι είτε συνδυασμός φυτών και ριζοβακτηρίων ενισχυτικών της ανάπτυξης των φυτών (PGPR), είτε συνδυασμός φυτών και μικροοργανισμών αποδόμησης των ρύπων. Για παράδειγμα, ένα είδος φυτού σε συνδυασμό με μικροοργανισμούς αποδόμησης του ναφθαλένιου, προστατεύει το σπόρο του φυτού από τις τοξικές επιδράσεις του ναφθαλένιου, και οι αναπτυσσόμενες ρίζες προωθούν τα βακτήρια αποδόμησης του ναφθαλένιου μέσα στο έδαφος, που θα ήταν πάρα πολύ βαθιά να μπορούσαν να εισχωρήσουν απουσία των ριζών (Huang et al., 2004).

2.6.2.1. Η επίδραση της ριζόσφαιρας

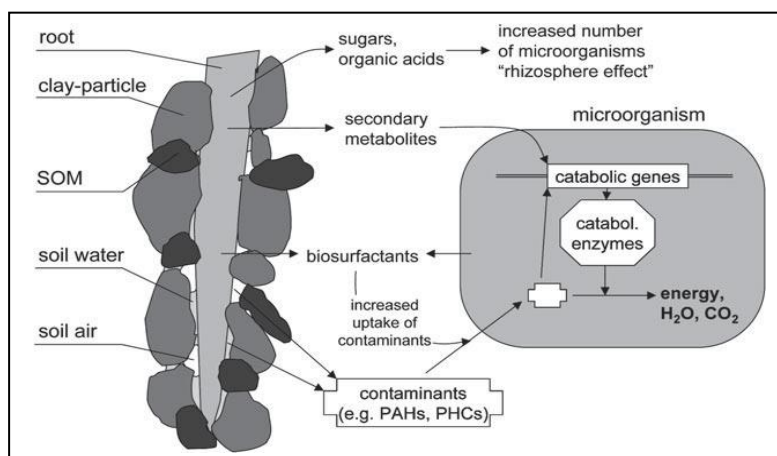
Στη ριζόσφαιρα (δηλαδή σε απόσταση περίπου 1mm από τη ρίζα) μπορεί να υπάρχει μεγάλος αριθμός και ποικιλία μικροοργανισμών (βακτήρια και μύκητες). Αυτό το φαινόμενο στη ριζόσφαιρα προκαλείται από τις φυσικές επιδράσεις της ρίζας στο έδαφος (π.χ. ανταλλαγή αερίων, υγρασία του εδάφους) καθώς και τις χημικές (εκκρίματα) (Reichenauer et al., 2008). Αυτός ο ευνοϊκός για τους μικροοργανισμούς οικότοπος από το ριζικό σύστημα του φυτών μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη αποδόμηση των ρύπων από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Αυτού του τύπου η αποδόμηση εφαρμόζεται σε ένα ευρύ φάσμα ρύπων, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των οποίων, λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, απορροφώνται από τα φυτά μόνο σε πολύ μικρές ποσότητες.

Πίνακας 3. Οργανικές ουσίες που διασπώνται από βακτήρια στη περιοχή της ριζόσφαιρας (Ζαμπετάκης, 2005).

Βακτήριο (γένος)	Υπόστρωμα
<i>Achromobacter</i>	Υδρογονάνθρακες, (BTXE)
<i>Acinetobacter</i>	Υδρογονάνθρακες
<i>Alcaligenes</i>	Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες
<i>Azotobacter</i>	Υδρογονάνθρακες
<i>Nitrosomonas</i>	Αρωματικοί υδρογονάνθρακες
<i>Nocardia</i>	Αρωματικοί υδρογονάνθρακες
<i>Pseudomonas</i>	Υδρογονάνθρακες
<i>Xanthobacter</i>	Αλιφατικές ενώσεις

2.6.2.2 Εισαγωγή Καταβολικών Γονιδίων σε Μικροοργανισμούς

Τα εκκρίματα της ρίζας μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων καταβολισμού των μικροοργανισμών του εδάφους και κατά συνέπεια να οδηγήσουν σε αλλαγές του πληθυσμού συγκεκριμένων ομάδων αυτών (Stralis-Pavese et al., 2004). Εκτός από τα σάκχαρα, τα αμινοξέα, και τα οργανικά οξέα, τα φυτά παράγουν σημαντικά ποσά δευτερογενών μεταβολιτών. Υπάρχουν τρεις μεγάλες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών: τα ισοπρενοειδή, τα αλκαλοειδή, και τα φλαβονοειδή. Ο χαρακτηρισμός ως δευτερογενή δεν σημαίνει δευτερευούσης σημασίας για το φυτό, αλλά γίνεται λόγω της βιοσύνθεσής τους, καθώς παράγονται από πρωτογενείς μεταβολίτες. Αυτά τα δευτερογενή προϊόντα έχουν μια σειρά από σημαντικές λειτουργίες στο φυτό όπως την προστασία από αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης (Pirker et al., 2008). Η δομή πολλών δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών μοιάζει με αυτή των ρύπων, και επομένως μπορούν να επηρεάσουν στην εκδήλωση καταβολικών γονιδίων σε μικροοργανισμούς που επίσης μπορούν να αποδομήσουν τις ξενοβιοτικές ουσίες ανάλογα (Εικ.4).



Εικόνα 4. Γενικευμένη απεικόνιση των εκκριμάτων της ρίζας και της επίδρασής τους στη ριζοαποδόμηση. Το SOM αναφέρεται στην οργανική ουσία του εδάφους (Soil Organic Matter) (Reichenauer et al., 2008).

Κάτι άλλο που παρατηρήθηκε είναι ότι ορισμένες αρωματικές ενώσεις (π.χ. φαινόλες) σε εκκρίματα ριζών ή νεκρές ρίζες, μπορούν να προκαλέσουν παραγωγή του ένζυμου

της διοξυγενάσης σε μικροοργανισμούς που αποδομούν πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB) και άλλες χλωριωμένες οργανικές ενώσεις (Reichenauer et al., 2008).

2.6.2.3 Προϊόντα Αποδόμησης

Προϊόντα αποδόμησης καθώς και ενδιάμεσα προϊόντα που παράγονται από τη μικροβιακή αποδόμηση στη ριζόσφαιρα έχουν μελετηθεί ελάχιστα. Ωστόσο, μια καλύτερη κατανόηση των μεταβολιτών που δημιουργούνται είναι αναγκαία τόσο για την καλύτερη κατανόηση των διαδικασιών που εμπλέκονται στην διάχυση των ρύπων στην ριζόσφαιρα, όσο και για την εκτίμηση των δυνητικών κινδύνων που συνδέονται με τη ριζοαποδόμηση, όπως είναι η συσσώρευση των προϊόντων αποδόμησης στην τροφική αλυσίδα (Reichenauer et al., 2008).

2.7 Φυτοτοξικότητα στους Ρύπους

Τα φυτά που αναπτύσσονται σε μια ρυπασμένη περιοχή εκτίθενται σε πολλούς αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Αρχικά, οι ρύποι για να αποδομηθούν δημιουργούν ένα χημικό παράγοντα καταπόνησης για το φυτό. Επιπλέον, δευτερογενείς παράγοντες όπως η καταπόνηση από την ξηρασία που προκαλείται από την υψηλή υδροφοβικότητα των ρύπων, η συμπίκνωση του εδάφους ή η έλλειψη θρεπτικών ουσιών που συχνά παρατηρείται σε ρυπασμένες περιοχές, συμβάλλουν στη δημιουργία συνθηκών καταπόνησης για το φυτό.

Το βιοδιαθέσιμο τμήμα ενός ρύπου είναι το μέρος του μορίου του το οποίο εύκολα διατίθεται (και ενδεχομένως αφομοιώνεται) σε ένα οργανισμό. Η βιοδιαθεσιμότητα ωστόσο επηρεάζεται έντονα από την αστάθεια του αντίστοιχου ρύπου (δηλ. το κλάσμα που είναι διαλυτό ή μπορεί εύκολα να αποσπαστεί). Ο ρυθμός βιοαποδόμησης εξαρτάται από την υπάρχουσα ασταθή ποσότητα του ρύπου στην περιοχή, η αύξηση όμως της ποσότητας αυτής αυξάνει και την τοξικότητα στα φυτά. Η φυτοτοξικότητα εξαρτάται επομένως από την βιοδιαθεσιμότητα, είναι δηλαδή μια λειτουργία της ικανότητας πρόσληψης, της βιοχημικής αντιδραστικότητας και της δόσης έκθεσης (Tesar, 2002).

Αν και από παλαιότερες έρευνες έχει διαπιστωθεί αύξηση της ανάπτυξης στα φυτά από τους PAHs (Graf 1965, Sims and Overcash, 1983) νεότερες μελέτες έδειξαν αναστολή της παραγωγής βιομάζας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Δεν είναι όμως ξεκάθαρο αν η μείωση της ανάπτυξης προέρχεται από την άμεση επίδραση της τοξικότητας των PAHs ή από δευτερογενείς παράγοντες (π.χ. αυξημένη καταπόνηση από ξηρασία λόγω υψηλής υδροφοβικότητας, ή έλλειψη θρεπτικών στοιχείων λόγω αυξημένης μικροβιακής δραστηριότητας των αποδομούμενων μικροοργανισμών). Μείωση της ανάπτυξης του βλαστού και των ριζών, διαπιστώθηκε επίσης σε φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε έδαφος στο οποίο είχαν προστεθεί PHCs (Tesar, 2002). Αβιοτικοί, παράγοντες καταπόνησης για τα φυτά είναι γνωστό ότι προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση σε αυτά. Η οξειδωτική καταπόνηση περιγράφει μια κατάσταση στην οποία το επίπεδο των λεγόμενων ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species ή ROS) στο κύτταρο είναι αυξημένο και ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός έχει επιβαρυνθεί υπερβολικά.

2.8 Μεταβολισμός της BPA από τα φυτά

Ο μεταβολισμός της BPA από τα φυτά έχει ερευνηθεί με χρήση αιωρούμενης καλλιέργειας φυτικών κυττάρων, ενζύμων ή απευθείας απορρόφηση της BPA μέσα στο φυτό (Wang, 2008).

Η ένωση μπορεί να απορροφηθεί μέσω των ριζών και να μεταβολισθεί σε διάφορες ενώσεις με γλυκοζιτικές μονάδες. Η γλυκοζυλίωση της BPA συμβαίνει κυρίως στις ρίζες (Kang and Kondo, 2006). Οι Nakajima et al. (2002) βρήκαν ότι η BPA απορροφάται από τις ρίζες, μεταβολίζεται σε β-γλυκοζίτες και οι μεταβολίτες διαμεταθέτονται στα φύλλα (translocation). Αντίθετα οι Nouredin et al. (2004) υποστηρίζουν ότι οι μεταβολίτες της BPA βρίσκονταν κατά 10% περίπου στις ρίζες, κάποιοι στους βλαστούς, αλλά κανείς στα φύλλα (Wang, 2008). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η κατανομή της BPA και των μεταβολιτών της στο φυτό μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το φυτό.

Η γλυκοζυλίωση της BPA θεωρείται ως η κύρια διαδρομή αποδόμησής της στο φυτό. Οι μεταβολίτες της μελετήθηκαν από τον Nakajima και τους συνεργάτες του (Nakajima et al., 2004) οι οποίοι αναγνώρισαν δύο κύρια προϊόντα, τα BPA mono-O-β-D-gentiobioside και το trisaccharide BPA mono-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[β-D-glucopyranosyl-(1→6)] β-D-glucopyranoside, και δυο δευτερεύοντα, τα mono- και di- O-β-D-glucopyranosides.

Επιπρόσθετα, καμιά οιστρογονική δραστηριότητα δε βρέθηκε σε αυτές τις ενώσεις, κάτι το οποίο σημαίνει ότι η γλυκοζυλίωση της BPA από τα φυτά καταστρέφει την οιστρογονικότητα της πρόδρομης ένωσης.

Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο 3

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ *T. PARVIFLORA*

3.1 Γενικά στοιχεία

Το αλμυρίκι με την επιστημονική ονομασία Ταμαρίς (*Tamarix*), αποτελεί γένος αγγειόσπερμων, δικότυλων φυτών που ανήκει στην τάξη των Ιωδών και στην οικογένεια των Ταμαριδοειδών (*Tamaricaceae*). Το γένος *Tamarix* περιλαμβάνει περίπου 50 έως 60 φυτικά είδη της οικογένειας *Tamaricaceae* τα οποία αποτελούν ενδημικά φυτά των ξηρότερων περιοχών της Ευρώπης, της Ασίας και της Βόρειας Αφρικής. Κατά την διάρκεια του τελευταίου αιώνα τα φυτά αυτά έχουν εγκλιματιστεί στην Αμερική και στην Αυστραλία. Η κοινή ονομασία τους στην αγγλική γλώσσα είναι «saltcedar» ή «tamarisk», ενώ στην Ελλάδα απαντώνται κοινώς με την ονομασία «αρμυρίκια» (Lynn et al., 1991, Wikipedia, 2012).



Εικόνα 5. Εκπρόσωπος της οικογένειας των Ταμαριδοειδών..

Πρόκειται για φυλλοβόλους ή αειθαλείς θάμνους ή μικρά δέντρα που φτάνουν σε ύψος τα 1-6m με εξαίρεση το μεγαλύτερο σε μέγεθος είδος *T. Aphylla* το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί μέχρι και τα 15m. Είναι ανθεκτικά στην εδαφική αλατότητα και

στις αλκαλικές συνθήκες και δύνανται να επιβιώνουν μέχρι και σε 15.000ppm διαλυτών αλάτων (Μανουσάκη Ε., 2008).

Βρίσκονται αυτοφυή σε πολλές παραθαλάσσιες περιοχές της Ελλάδας και της Μεσογείου, κοντά σε παραλίες, όχθες ποταμών και σε ρέματα όπου ο υδάτινος ορίζοντας είναι υφάλμυρος. Έχουν δυνατό ριζικό σύστημα, με τις ρίζες τους να διακλαδώνονται φτάνοντας σε μεγάλο βάθος, ενώ χαρακτηρίζονται από λεπτά κλαδιά με γκριζοπράσινο φύλλωμα. Τα φύλλα τους είναι κλιμακωτά, επικαλυπτόμενα, μήκους μερικών χιλιοστών. Επίσης τα άνθη τους είναι μικρά ρόδινα ή λευκορόδινα και διατάσσονται σε μακριές ταξιανθίες με μορφή μακριών ακίδων καθώς φύονται στα άκρα των κλαδιών. Κάθε άνθος μπορεί να παράγει χιλιάδες μικροσκοπικά σπέρματα (διαμέτρου 1mm) που εμπεριέχονται σε μια μικρή κάψουλα που κοσμεύεται συνήθως με μια τούφα τριχιδίων ενισχύοντας την διασπορά τους με τον άνεμο (Μανουσάκη Ε., 2008, Wikipedia, 2012).



Εικόνα 6. Άνθη και φύλλα αλμυρικού.

Τα αρμυρίκια είναι είδη ανθεκτικά όχι μόνο στην αλατότητα του εδάφους, αλλά και στις πλημμύρες και αναπτύσσονται συχνά τόσο σε εδάφη κατακλυζόμενα από αλμυρά ή υφάλμυρα νερά αλλά και γλυκά, όσο και σε μη κατακλυζόμενα εδάφη. Η ανθεκτικότητα τους στην αλατότητα σχετίζεται με την παρουσία αλατωδών εξειδικευμένων αδένων στα φύλλα τους μέσω των οποίων εκκρίνουν τα άλατα στην επιφάνεια των φύλλων. Με τον τρόπο αυτό πέραν της προσαρμοστικότητας που παρουσιάζουν σε μία ποικιλία αλατούχων εδαφών, είναι σε θέση να περιορίσουν τον ανταγωνισμό με άλλα φυτικά είδη λόγω του ότι με την πρόσληψη των αλάτων από τα βαθύτερα υπόγεια ύδατα και την απελευθέρωση τους από τα φύλλα, διαμορφώνουν μια κρούστα αλάτων στην επιφάνεια του εδάφους η οποία είναι καταστρεπτική,

τουλάχιστον προσωρινά, για άλλα φυτικά είδη (Μανουσάκη, 2008, Brotherson and Field, 1987).

Επιπλέον, τα αρμυρίκια αποτελούν φυτά που καταναλώνουν τεράστιες ποσότητες νερού. Ένα και μόνο μεγάλο φυτό μπορεί να απορροφήσει 900 λίτρα νερού ημερησίως (αν και τα ποσοστά εξατμισοδιαπνοής εξαρτώνται από την διαθεσιμότητα του νερού, την πυκνότητα των θαμνώνων και τις καιρικές συνθήκες), με αποτέλεσμα να περιορίζει την ανάπτυξη άλλων φυτών χαμηλώνοντας τον υδροφορέα και μονοπωλώντας τις περιορισμένες πηγές υγρασίας (Μανουσάκη Ε., 2008).

Συνεπώς, πρόκειται για φυτικά είδη τα οποία είναι σε θέση να αναπτύσσονται σε μια ευρεία ποικιλία βιότοπων, να εκμεταλλεύονται τους φυσικούς υδάτινους πόρους, να εξαπλώνονται απεριόριστα και μάλιστα σε βάρος άλλων φυσικών σχηματισμών αντικαθιστώντας άλλη ενδημική παρόχθια βλάστηση και υπό συγκεκριμένες συνθήκες αντιμετωπίζονται ως περιβαλλοντικές απειλές, μιας και συμβάλλουν στην αποξήρανση κολπίσκων και ρευμάτων σε περιοχές απειλούμενες από ξηρασία (Brotherson and Field, 1987, Cleverly et al., 1997).

Το *T. parviflora* είναι φυλλοβόλο φωτόφιλο δέντρο ή θάμνος, με πράσινα λεπιοειδή φύλλα που φτάνει τα 7m ύψος και 5m διάμετρο. Την περίοδο Μαΐου-Ιουνίου αναπτύσσει λευκορόδινα άνθη, τα οποία διατάσσονται σε μακριές ταξιανθίες και φύονται στα άκρα των κλαδιών. Ευδοκίμει σε φτωχά, ξηρά, αμμώδη εδάφη και ηλιόλουστες θέσεις (Αρτεμισάρης, 2012).

3.2 Επιλογή του υπό εξέταση φυτού

Η επιλογή του *T. parviflora* για την παρούσα μελέτη βασίστηκε καταρχάς στην παραδοχή ότι τα δέντρα πιθανόν αποτελούν τον φθηνότερο τύπο φυτού προς χρήση για εφαρμογές φυτοεξυγίανσης. Από προηγούμενες έρευνες πάνω σε βαρέα μέταλλα βρέθηκε ότι ενώ συσσωρεύουν μικρές σχετικά ποσότητες, λόγω της αυξημένης παραγωγής βιομάζας μπορούν να συμβάλλουν ικανοποιητικά στην φυτοεξυγίανση. Παράλληλα, το εκτεταμένο ριζικό τους σύστημα δίνει τη δυνατότητα χρήσης του για

αποκατάσταση ρυπασμένων υπογείων υδάτων, ενώ η πολύ μεγάλη ικανότητα άντλησης νερού και η δυνατότητα ανάπτυξής τους σε φτωχά εδάφη, χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις και καλλιεργητικές φροντίδες, είναι στοιχεία τα οποία οδηγούν στην επιλογή τους για οικονομικό τρόπο εξυγίανσης. Τέλος η ανθεκτικότητά των αλόφυτων στην αλατότητα, ενδέχεται να συνδέεται και με ανθεκτικότητα σε άλλες καταπονήσεις όπως τους οργανικούς ρύπους, δεδομένου ότι εμφανίζουν ανθεκτικότητα και σε παράγοντες όπως το ψύχος, η ξηρασία, ο παγετός κ.α. (Manousaki and Kalogerakis, 2011).

3.3 Ανασκόπηση σε έρευνες που έχει χρησιμοποιηθεί το γένος *Tamarix* για φυτοαποκατάσταση

Επιστημονικές μελέτες με φυτά του γένους *Tamarix* σε εφαρμογές στη φυτοεξυγίανση, είχαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Σε μελέτη σε περιοχή του Σαν Φραντσίσκο ρυπασμένη με αρσενικό, δημιουργήθηκε με αποτελεσματικότητα ένα σύστημα το οποίο περιελάμβανε 550 δέντρα *T. parviflora* και *Eucalyptus viminalis* με σκοπό να αποτραπεί η περαιτέρω μετακίνηση της ουσίας (Sorel et al., 2003). Η φυτοσυσσώρευση και η φυτοέκκριση καδμίου από φύλλα του είδους *T. smyrnensis* απέδειξε τη σημαντικότητα του φυτού αυτού στην τεχνική (Manousaki et al., 2008). Σε άλλη έρευνα παρατηρήθηκε ο ρόλος του *T. ramosissima* στην απομάκρυνση υπερχλωρικών ιόντων από παρόχθια περιοχή, δείχνοντας ότι είναι φυτά ικανά να συμβάλουν στην οικολογική ισορροπία (Urbansky et al., 2000). Πριν δύο χρόνια στη Σαουδική Αραβία μελετήθηκε με θετικά αποτελέσματα η φυτοσυσσώρευση βαρέων μετάλλων από το *T. aphylla* (Wafa and Taisan, 2009). Οι Diab και Badry διερεύνησαν την βιοαποδόμηση PAHs στην περιοχή της ριζόσφαιρας του *Tamarix nilotica* (Diab et al., 2011) ενώ οι Hegedus et al. χρησιμοποίησαν *Tamarix tetrandia* pall. and *Salix viminalis* για μείωση του νατρίου και του μαγνησίου σε νερά εκροής ιχθυοκαλλιεργειών στην Ουγγαρία (Hegedus et al., 2009).

Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Χρωματογραφία HPLC

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) είναι μια αξιόπιστη και ταχεία μέθοδος ενόργανης ανάλυσης, με εφαρμογές στην επίλυση αναλυτικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων. Ο χρόνος ανάλυσης με την τεχνική αυτή είναι συνήθως της τάξης των μερικών λεπτών, ενώ η ακρίβεια και η επαναληψιμότητά της είναι πολύ καλές. Γενικά, η HPLC είναι μια ευαίσθητη ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική που υπερέχει σε σχέση με τις υπόλοιπες χρωματογραφικές τεχνικές. Ενδείκνυται για την ανάλυση μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ουσιών, ενώ χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό πολλών χημικών ουσιών όπως αμινοξέων, υδατανθράκων, αλκαλοειδών, αφλατοξινών, βιταμινών, φαρμάκων, στεροειδών, αντιβιοτικών, λιπών, κ.α. (Γιαντζή, 2007). Την ανάλυση με HPLC προηγείται η προετοιμασία του δείγματος με κυριότερη την εκχύλιση των ουσιών από το υπό εξέταση δείγμα.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές τεχνικές: η μικροεκχύλιση με ελεύθερη σταγόνα σε συνδυασμό με φθορισμομετρική ανίχνευση (fluorescence detection / FLD) και η απευθείας έγχυση διαλυμάτων (direct injection) σε συνδυασμό με ανιχνευτή φωτοδιόδων (photodiode array / PDA). Η πρώτη χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων όπου οι συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν από 0,5 έως 100ppb ενώ η δεύτερη σε πειράματα όπου οι συγκεντρώσεις ήταν της τάξης των 100ppm.

4.1.1 Μικροεκχύλιση με ελεύθερη σταγόνα

Για την εκχύλιση των ουσιών από το υπό εξέταση δείγμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μικροεκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα (Free Drop MicroExtraction, FDME), μια καινοτόμος μέθοδος σύμφωνα με την οποία η ουσία εκχυλίζεται από την υδατική φάση κατευθείαν μέσα στην οργανική φάση. Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η ισορροπία αποκαθίσταται εντός μερικών λεπτών, αυξάνοντας επομένως την ακρίβεια και την ευαισθησία, μειώνοντας ταυτόχρονα και το συνολικό χρόνο προετοιμασίας του δείγματος (Γιαντζή, 2007).

Βάση της μεθόδου, σε φιαλίδιο που περιέχονται οι κύριες ενώσεις εισάγεται μία μικροσταγόνα ενός μη υδατοδιαλυτού οργανικού διαλύτη. Το κλειστό φιαλίδιο το οποίο περιέχει τις δύο φάσεις και τις ενώσεις που μελετούνται αναδεύεται με τη βοήθεια συσκευής vortex οδηγώντας στη διάσπαση της οργανικής σταγόνας σε μικροσταγόνες παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο ταχύτερες κινητικές εκχύλισης των κύριων ενώσεων. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων και την επανάκτηση/επανασχηματισμό της οργανικής σταγόνας. Με τη βοήθεια μιας μικροσύριγγας η οργανική φάση απομακρύνεται από το υδατικό διάλυμα και εισάγεται σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Γιαντζή, 2007).

4.1.2 Υλικά

Αντιδραστήρια

Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση είναι τα παρακάτω:

1. Δισφαινόλη-A του οίκου Aldrich
2. Ακετονιτρίλιο του οίκου Sigma-Aldrich με βαθμό καθαρότητας για Υγρή Χρωματογραφία $\geq 99,9\%$ και Οκτανόλη του ίδιου οίκου με βαθμό καθαρότητας $\geq 99\%$.
3. Ακετόνη του οίκου Fisher Scientific, καθαρότητας 99,99%.

Χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο (δix απιονισμένο) νερό από σύστημα καθαρισμού ύδατος EASYpureRF, της εταιρίας Barnstead/Thermolyne.

4.1.3 Πειραματικό μέρος

4.1.3.1 Μέθοδος FDME

Σύμφωνα με τη μέθοδο FDME σε φιαλίδια φυγοκέντρου που περιείχαν 20 mL από το υπό εξέταση δείγμα, εισαχθήκανε 50μL οκτανόλης. Σαν αποτέλεσμα αυτής της εισαγωγής, σχηματίστηκε μια μικροσταγόνα της οργανικής φάσης στην επιφάνεια της υδατικής. Το μίγμα καλύφθηκε με καπάκια καλυμμένα με αλουμινόχαρτο, αναδεύτηκε με τη χρήση vortex αναδευτήρα για 2min στις 2500rpm και φυγοκεντρήθηκε για 2min σε 3500rpm για το διαχωρισμό των δύο φάσεων και την ανάκτηση 30μL της οργανικής φάσης με τη βοήθεια μικροσύριγγας. Στη συνέχεια η ανακτημένη ποσότητα αναλύθηκε σε σύστημα HPLC.

4.1.3.2 Αναλύσεις με HPLC

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC από την Shimadzu το οποίο περιλαμβάνει μία αντλία δύο διαλυτών και ένα ανιχνευτή φθορισμού. Η χρωματογραφική στήλη που ήταν Nucleosil 100-5 C18 (250mm x 4,6mm x 5μm, Macherey-Nagel, Duren, Germany). Η κινητή φάση ήταν μίγμα σε αναλογία 80:20 ακετονιτρίλιο : υπερκάθαρο νερό, με ισοκρατική έκλουση και ροή 1mL/min. Ο όγκος του δείγματος προς ανάλυση ήταν 30μL και η ανίχνευση επιτεύχθηκε με ανιχνευτή φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης τα 277nm και εκπομπής τα 300nm. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν 27°C και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 15min (Γιαντζή, 2007).

4.2 Προσδιορισμός χλωροφύλλης

Για τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης, δείγμα νωπών φύλλων βάρους 0,2g για τα φυτά Tamarix λήφθηκαν τυχαία από το κάθε φυτό, πλύθηκαν με νερό βρύσης και απιονισμένο νερό, ζυγίστηκαν και στη συνέχεια μετρήθηκε η χλωροφύλλη σύμφωνα

με την μέθοδο του Harborne (1984). Το δείγμα του φυτικού ιστού τοποθετήθηκε σε ιγδίο από πορσελάνη και ομογενοποιήθηκε με 10mL υδατικού διαλύματος ακετόνης 80% μέχρι πλήρης ομογενοποίησης και σύνθλιψης των κυττάρων. Στην συνέχεια στο εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση δυο φορές από ένα λεπτό την κάθε φορά στις 16000rcf ενώ το καθαρό εκχύλισμα συμπληρώθηκε με διάλυμα ακετόνης 80% έως τελικό όγκο 8mL. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 663 και 646nm σε φασματοφωτόμετρο UV (UV mini 1240 SHIMADZU) στις κατάλληλες αραιώσεις ώστε να βρίσκεται μέσα στο εύρος γραμμικότητας του οργάνου, ενώ διάλυμα ακετόνης 80% χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό διάλυμα για τον μηδενισμό του οργάνου. Η συγκέντρωση της a, b και ολικής χλωροφύλλης υπολογίζεται από τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\text{Ολική Χλωροφύλλη [mg/L]} = 17,3 A_{646} + 7,18 A_{663}$$

$$\text{Χλωροφύλλη a [mg/L]} = 12,21 A_{663} - 2,81 A_{646}$$

$$\text{Χλωροφύλλη b [mg/L]} = 20,13 A_{646} - 5,03 A_{663}$$

όπου A663 και A646 η απορρόφηση στα 663 και 646nm, αντίστοιχα, ενώ οι συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν για 1g νωπού φύλλου (Μανουσάκη, 2008).

4.3 Μελέτη της ικανότητας συγκεκριμένων βακτηρίων απομονωμένα από τις ρίζες, το βλαστό και τα φύλλα του *T. parviflora*, να αποδομούν την BPA

Απομονώθηκαν ενδοφυτικά βακτήρια του φυτού *T. parviflora* το οποίο αναπτύχθηκε σε έδαφος ρυπασμένο με δισφαινόλη (Weyens et al., 2009). Τρία στελέχη, το *Brevundimonas* (strain 10C4), το *Sphingomonas* (strain 15b) και το *Cypriavidus* (strain 19a), επιλέχθηκαν με σκοπό να μελετηθούν οι ρυθμοί αποδόμησης της δισφαινόλης. Βάση φαινοτυπικών τεστ τα τρία αυτά βακτήρια έδειξαν ότι είχαν την ικανότητα να αποδομούν την BPA.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών μέσα, ένα L medium (10g Bacto Tryptone, 5g Bacto Yeast Extract, και 5g NaCl ανά λίτρο) και ένα φτωχό σε θρεπτικά μέσο (M9 medium)

χωρίς οργανική ουσία αλλά μόνο με ανόργανα άλατα (NaHPO_4 , K_2HPO_4 , NaCl , NH_4Cl). Προστέθηκε δισφαινόλη $120\mu\text{g/L}$ στο M9 ως μοναδική πηγή άνθρακα και η ίδια επίσης ποσότητα στο L μέσο.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 30°C σε φιάλες των 250ml οι οποίες περιείχαν 100ml μέσου, με συνεχή ανάδευση στις 120rpm . Η ανάπτυξη των κυττάρων μετρούταν βάση οπτικής πυκνότητας στα 650nm . Η μέτρηση της αποδόμησης της BPA γινόταν με χρωματογραφική ανάλυση στην HPLC από τη μείωση της κορυφής της ένωσης.

Η χρωματογραφική ανάλυση για το πείραμα αυτό έγινε με βαθμωτή έκλουση (gradient elution) από 30% έως 80% ακετονιτρίλιο έως τα 12min , 80% σταθερά για τα επόμενα 2min και 30% για τα τελευταία 3min ώστε να ισορροπήσει η στήλη. Τα υδατικά δείγματα προσθέτονταν με απευθείας έγχυση στη στήλη, αφού είχαν περάσει από φίλτρο $1\mu\text{m}$.

4.4 Πειραματικός Σχεδιασμός

4.4.1 Γενικά στοιχεία

Ως χώρος εγκατάστασης των μονάδων επιλέχθηκε ο περιβάλλοντας χώρος του θερμοκηπίου, πλησίον του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος, ώστε να υπάρχει δυνατότητα χρήσης και σύνδεσης με ηλεκτρικό ρεύμα και νερό, καθώς και χρήσης των χώρων του θερμοκηπίου ως βοηθητικών. Προστασία από το βρόχινο νερό παρείχε ένα στέγαστρο διαστάσεων $5 \times 10\text{m}$ και ύψους $3\text{-}3,2\text{m}$ περίπου, το οποίο κατασκευάστηκε για τις ανάγκες του πειράματος. Το υλικό του ήταν από διάφανη μεμβράνη πολυαιθυλενίου, τοποθετημένη επάνω σε μεταλλικό πλαίσιο. Για την κατασκευή των μονάδων χρησιμοποιήθηκαν δεξαμενές πολυαιθυλενίου χωρητικότητας 1m^3 , κυβικού σχήματος, στις οποίες αφαιρέθηκε η άνω πλευρά. Το εξωτερικό μεταλλικό πλαίσιο διατηρήθηκε για μέγιστη αντοχή.

Για να εξασφαλιστεί η μη γήρανση του υλικού από την ηλιακή ακτινοβολία, έγινε επίστρωση εξωτερικά με χρώμα Amphivolin. Το Amphivolin είναι προϊόν

νανοτεχνολογίας, οικολογικό και χωρίς διαλύτες, με υψηλό βαθμό ανάκλασης φωτός (συντελεστής ανακλαστικότητας ηλιακής ακτινοβολίας 0,81 – 0,92 (ASTM E 1980, DIN EN 410)), που υπερκαλύπτει τις προδιαγραφές ψυχρών χρωμάτων, παρέχοντας γενικότερη προστασία από καιρικές συνθήκες και ατμοσφαιρικούς ρύπους.

Οι αντλίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν περισταλτικού τύπου μεταβαλλόμενης παροχής V-PER, της εταιρίας FWT (Εικ.7). Η έναρξη / διακοπή της λειτουργίας τους γινόταν χειροκίνητα ή αυτόματα, μέσω δύο εβδομαδιαίων ψηφιακών ηλεκτρικών χρονοδιακοπών, συνδεδεμένων σε ηλεκτρικό πίνακα εσωτερικά του θερμοκηπίου. Για τις δειγματοληψίες, τον έλεγχο της στάθμης των δεξαμενών και κάθε άλλη ανάγκη επικοινωνίας με το εσωτερικό τους, τοποθετήθηκαν ορειχάλκινα ρακόρ δεξαμενών 0,5inch και μεταλλικές σφαιρικές βάνες ίδιας διατομής. Στο κατώτερο σημείο τους, μια σφαιρική βάνα 1inch επέτρεπε το άδειασμά τους.



Εικόνα 7. Οι περισταλτικές αντλίες ανακύκλωσης τοποθετημένες στη μια πλευρά της μονάδας (SBR B').



Εικόνα 8. Στάδιο πλήρωσης της μονάδας με χώμα (SBR A').

Δυνατότητα αερισμού παρείχε δίκτυο σωλήνων πολυαιθυλενίου υψηλής πίεσης (ύδρευσης), συνδεδεμένο με πιεστικό αέρα. Ο κεντρικός σωλήνας διατομής 22mm, διακλαδιζόταν προς τις δύο μονάδες καταλήγοντας στον πυθμένα των δεξαμενών σε τρεις παράλληλους, διάτρητους σωλήνες διατομής 16mm (Εικ.9).



Εικόνα 9. Μέρος του συστήματος αερισμού των μονάδων (αριστερά το πιεστικό και δεξιά το δίκτυο δευτερευόντων αγωγών στον πυθμένα).

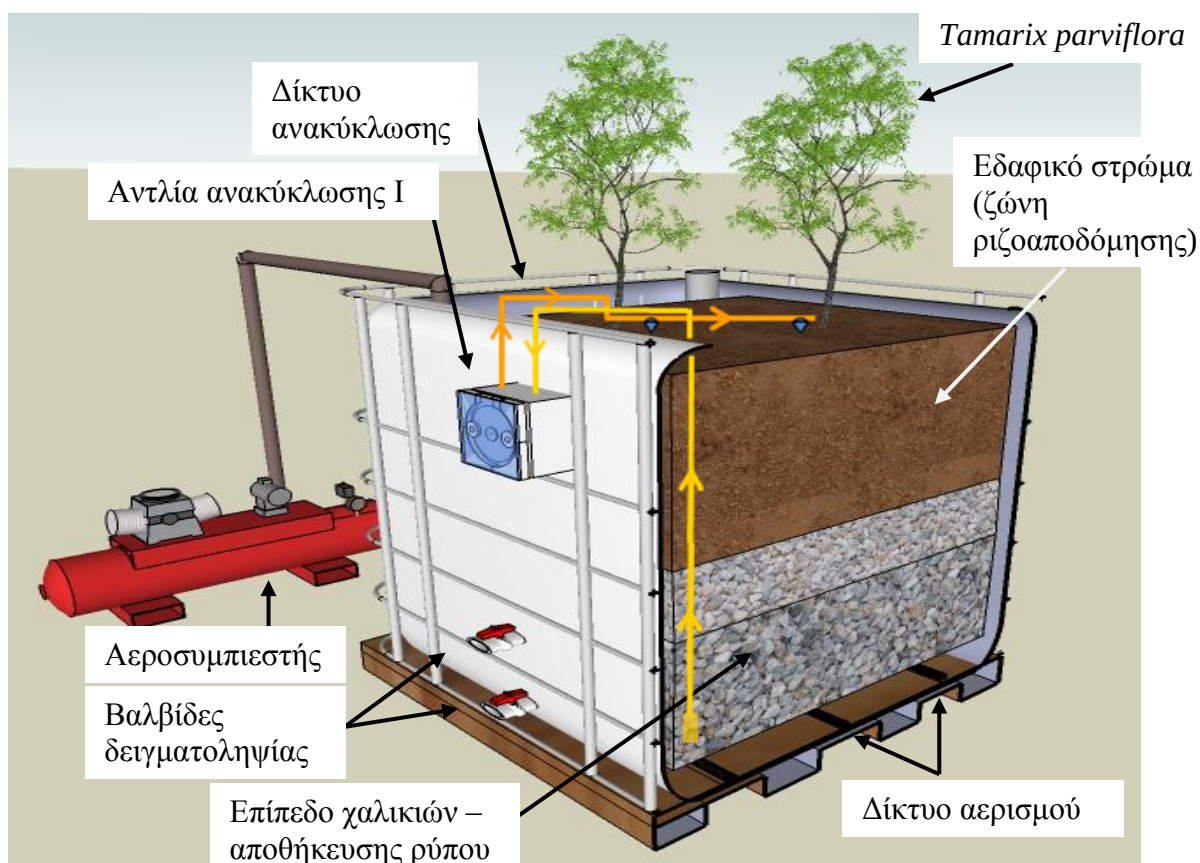
4.4.2 Περιγραφή μονάδας Rhizo SBR Type A'

Η μονάδα αυτή περιείχε 50% χαλίκια (από τον πυθμένα έως τη μέση) και 50% χώμα (από τη μέση έως την επιφάνεια). Το στρώμα χαλικιών, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές πεδίου αποκατάστασης από απόβλητα ελαιοτριβείου (Bodini et al., 2010), χωρίζεται σε δύο τμήματα: το επάνω στρώμα πάχους 15cm αποτελείται από 120L μεσαίου μεγέθους χαλίκια (μέσης διαμέτρου 1,8cm), το οποίο βρίσκεται στο μέσο της μονάδας και εξασφαλίζει το φιλτράρισμα και κατακράτηση του χώματος ώστε να μην εισέλθει στο κατώτερο στρώμα (Εικ. 10).

Το κατώτερο στρώμα αποτελεί τον αποθηκευτικό χώρο του ρυπασμένου νερού και περιλαμβάνει 380L μεγάλου μεγέθους χαλικιών (μέσης διαμέτρου 3,4cm). Ο όγκος υγρού που μπορούσε να αποθηκευτεί στο επίπεδο των χαλικιών ήταν 180L. Μεταξύ

των δύο στρώσεων χαλικιών είχε τοποθετηθεί συρμάτινο πλέγμα με ανοίγματα διαμέτρου 0,5cm.

Το χώμα που χρησιμοποιήθηκε είχε κοσκινιστεί και αναμειχθεί με άμμο (23%) και εδαφοβελτιωτικό (7%) (αποτελούμενο από τύρφη 90%, 210mg/L N, 240mg/L P_2O_5 , 270mg/L K_2O , 100mg/L Mg και 120mg/L S) για αύξηση της διαπερατότητας και της οργανικής ουσίας αντίστοιχα. Ύστερα από εδαφολογική ανάλυση το χώμα χαρακτηρίστηκε ως αμμοαργιλλοπηλώδες (56% άμμος, 24% ιλύς, 20% άργιλλος).



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της μονάδας SBR Α'.



Εικόνα 11. Συνολική άποψη της μονάδας SBR A' (αριστερά) και λεπτομέρεια του σταθμοδείκτη ελέγχου (δεξιά).

Ένας σωλήνας PVC διαμέτρου 75mm, μήκους 1,10m και διάτρητος στο κάτω τμήμα του (Εικ. 8,9), ο οποίος τοποθετήθηκε κατακόρυφα στη μια γωνία της δεξαμενής, είχε σκοπό αφενός την είσοδο του σωλήνα αναρρόφησης (και της ποδοβαλβίδας αναρρόφησης της αντλίας - φίλτρου) για άντληση του νερού από το κάτω στρώμα και αφετέρου την δυνατότητα προσθήκης νερού απευθείας στο επίπεδο των χαλικιών, χωρίς αυτό να διέρχεται πρώτα από το έδαφος. Η κατάθλιψη της αντλίας ήταν συνδεδεμένη με σωλήνα πολυαιθυλενίου 6atm και διατομής 16mm, πάνω στον οποίο είχαν προσαρμοστεί σταλλάκτες για την άρδευση των φυτών (Εικ. 11,12).

Έλεγχος της στάθμης της δεξαμενής, παρείχε ένα σύστημα βασισμένο στην αρχή των συγκοινωνούντων δοχείων αποτελούμενο από κατακόρυφο, βαθμονομημένο σωλήνα τοποθετημένο δίπλα στη μονάδα, ο οποίος λειτουργούσε ως σταθμοδείκτης ελέγχου (Εικ. 11). Η φύτευση των δύο φυτών *T. parviflora* πραγματοποιήθηκε στις 28 Μαρτίου 2011.



Εικόνα 12. Τα φυτά στην SBR A την ημέρα της φύτευσης 28/3/11 (αριστερά) και μετά από 15 μήνες 14/6/12 (δεξιά).

4.4.3 Περιγραφή μονάδας Rhizo SBR Type B'

Η μονάδα αυτή περιείχε 80% χώμα (με αναλογία 22% άμμο, 18% εδαφοβελτιωτικό) και 20% (200L) χαλίκια μέσου μεγέθους (μέσης διαμέτρου 1,8cm). Μία βαθμονομημένη δεξαμενή χωρητικότητας 180L (Εικ. 13) παραπλεύρως της, είχε χρήση αποθηκευτικού μέσου του ρύπου. Στη δεξαμενή αυτή δύο περισταλτικές αντλίες αναλάμβαναν την ανακύκλωση του ρύπου. Η μια αναρροφούσε το ρυπασμένο νερό από τον πυθμένα της, διαμέσου σωλήνα PVC 75mm, στέλνοντάς το στην εξωτερική δεξαμενή αποθήκευσης, ενώ η δεύτερη αναρροφούσε από την εξωτερική

δεξαμενή, καταθλίβοντας στην επιφάνεια της μονάδας. Κατά τα άλλα ο σχεδιασμός της δεξαμενής αρχικά ήταν όμοιος της ‘Rhizo SBR A’.

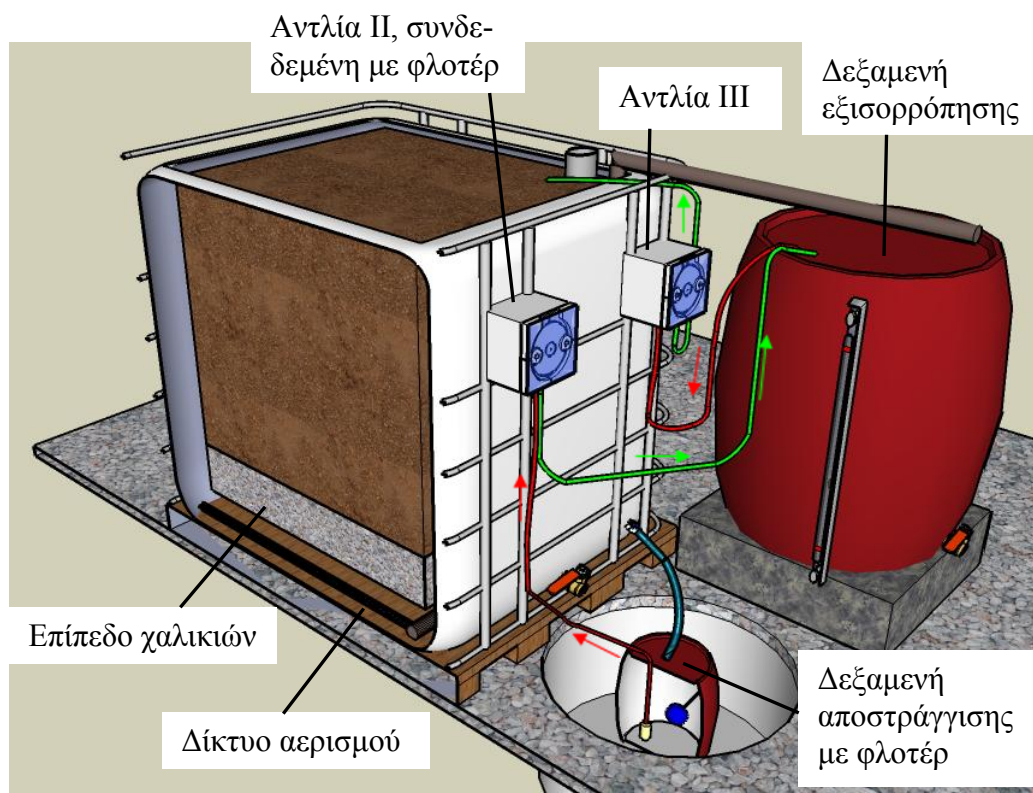
Δοκιμαστική λειτουργία της παραπάνω διάταξης οδήγησε στον εντοπισμό δυο προβλημάτων, αφενός αδυναμία ακριβούς προσδιορισμού του όγκου νερού του συστήματος και αφετέρου την αυξημένη συγκέντρωση στερεών στην περιοχή αναρρόφησης της αντλίας II, ως συνέπεια της λεπτής στιβάδας χαλικιών στον πυθμένα (15cm.). Επιπρόσθετα η λειτουργία των δύο αντλιών ανεξάρτητα μεταξύ τους, δεν εξασφάλιζε την ύπαρξη ισορροπίας της μονάδας εφόσον δεν ήταν δυνατό να βρεθεί τρόπος συγχρονισμού της λειτουργίας τους ανάλογα με τις ανάγκες της μονάδας.



Εικόνα 13. Η μονάδα SBR B’ βάση του αρχικού σχεδιασμού (αριστερά) και στην τελική της μορφή, βάση του τροποποιημένο σχεδιασμού (δεξιά).

Για τους παραπάνω λόγους έγινε επανασχεδιασμός της μονάδας, ο οποίος βασίστηκε στην προσθήκη εξωτερικής δεξαμενής αποστράγγισης, για τη συλλογή της περίσσειας του στραγγιζομένου νερού, μέσω της οποίας γίνεται η μεταφορά του στην προϋπάρχουσα εξωτερική δεξαμενή των 180L (Εικ. 13,14,15). Η εκροή γίνεται μέσω ρακόρ δεξαμενής τοποθετημένο 6cm από τον πυθμένα της μονάδας, στο οποίο είναι συνδεδεμένη σφαιρική βάνα η οποία παρέχει τη δυνατότητα διακοπής της εκροής. Από την βάνα ένας διάφανος σωλήνας πολυαιθυλενίου διαμέτρου 16mm καταλήγει στη χαμηλότερου επιπέδου βοηθητική δεξαμενή, για την μετακίνηση του νερού από υπερχειλίση με φυσική ροή. Ο διάφανος σωλήνας επιτρέπει τον έλεγχο της εκροής.

Ηλεκτρικό φλοτέρ εσωτερικά της δεξαμενής των 40L είναι ρυθμισμένο να ενεργοποιεί και να διακόπτει την αντλία II όταν η στάθμη του νερού φτάνει σε συγκεκριμένο ύψος (27,5L και 10,5L αντίστοιχα).



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της μονάδας SBR B'.

Η αντλία III, υπεύθυνη για την μετακίνηση του νερού από την δεξαμενή εξισορρόπησης στην επιφάνεια του χώματος εντός της μονάδας, παραμένει συνδεδεμένη στον ηλεκτρικό χρονοδιακόπτη από όπου γίνεται ο προγραμματισμός της λειτουργίας της. Οι δύο δεξαμενές των 40 και 180 λίτρων είναι βαθμονομημένες, με την δεύτερη να έχει εγκατεστημένο εξωτερικό σταθμοδείκτη για συνεχή παρακολούθηση της στάθμης, ενώ η μέτρηση της στάθμης στη δεξαμενή αποστράγγισης γινόταν μέσω φορητού σταθμοδείκτη. Για τη διατήρηση του όγκου νερού του συστήματος σταθερού, η επιφάνεια της κεντρικής μονάδας καλύφθηκε με μεμβράνη πολυαιθυλενίου εξασφαλίζοντας την αποφυγή απωλειών από εξάτμιση.

Η μονάδα, απουσία φυτών, χρησιμοποιήθηκε κυρίως ως μονάδα αναφοράς με την προοπτική στο μέλλον να μετατραπεί σε μονάδα φυτοαποκατάστασης.



Εικόνα 15. Λεπτομέρεια του συστήματος αποστράγγισης της μονάδας.

4.4.4 Κύκλος λειτουργίας των αντλιών

Για την SBR A', από την έναρξη του πειράματος (23 Μαΐου) έως τις 24 Ιουνίου η αντλία λειτουργούσε αδιάκοπα για δυο ημέρες και έμενε κλειστή για άλλες δυο. Από τις 24 Ιουνίου και μέχρι το τέλος του πειράματος, η λειτουργία της αντλίας ορίστηκε στη μια μέρα με χρόνο παύσης τις τρεις ημέρες, ώστε να διασφαλιστεί η καλύτερη ανάπτυξη των μικροοργανισμών καθώς και των ίδιων των φυτών. Μετά τις 15 Νοεμβρίου, λόγω αυξημένης υγρασίας ο χρόνος παύσης αυξήθηκε ακόμα περισσότερο στις 4 ημέρες.

Στη δεύτερη μονάδα (SBR B'), η λειτουργία της αντλίας ΙΙΙ, υπεύθυνη για την τροφοδοσία της κύριας μονάδας με νερό, λειτουργούσε αδιάκοπα. Η λειτουργία της αντλίας ΙΙ γινόταν μέσω ηλεκτρικού φλοτέρ στη δεξαμενή αποστράγγισης και για όσο χρόνο όριζε αυτό.

Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Χαρακτηρισμός εδάφους

Δείγμα χώματος από τις πιλοτικές μονάδες δόθηκε για ανάλυση από την οποία προέκυψαν τα ακόλουθα:

- Οργανική ουσία (%): 1,7
- Ολικό CaCO_3 (%): 6,69
- pH: 8
- Άμμος (%): 56
- Ιλύς (%): 24
- Άργιλος (%): 20
- Χαρακτηρισμός: αμμοαργιλλοπηλώδες
- Ηλεκτρική Αγωγιμότητα: 0,9 (mS/cm)

Πρόκειται για ένα αμμοαργιλλοπηλώδες έδαφος, με χαμηλή οργανική ουσία και, όπως αναμένεται, χαμηλή ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (ΙΑΚ) και περιεκτικότητα σε κολλοειδείς επιφάνειες. Το έδαφος κρίθηκε συνεπώς κατάλληλο για να έχουμε αποτελέσματα για δυο λόγους:

α) Γιατί τα περισσότερα αλόφυτα και σίγουρα τα αρμυρίκια αναπτύσσονται καλά σε πτωχά αμμώδη εδάφη (ενώ μπορεί να έχουν προβλήματα αερισμού στις ρίζες τους σε βαριά εδάφη).

β) Αναμένουμε μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα των οργανικών ρυπαντών (οι φαινολικοί ρύποι προσροφώνται στα ανόργανα κολλοειδή και μειώνεται η διαθεσιμότητα τους), έστω και χωρίς την προσθήκη χηλικών ενώσεων, επομένως μεγάλο δυναμικό για τις μεταχειρίσεις φυτοαποκατάστασης (αλλά και πιθανότητα εμφάνισης φυτοτοξικότητας / μικροβιακής τοξικότητας σε μεγάλες δόσεις). Επιπλέον τα ριζικά εκκρίματα και η απόθεση στη ρίζα (*rhizodeposition*) αναμένεται να βοηθήσουν στην αύξηση της οργανικής ουσίας ίσως και της ΙΑΚ, σε ένα τέτοιο έδαφος και τα αποτελέσματα να είναι μάλλον μετρήσιμα (με το μειονέκτημα όμως, ένα τέτοιο σύστημα να είναι επιρρεπές σε συνθήκες εκπλήσσεις των ρυπαντών αν η φυτοαποκατάσταση δεν λειτουργεί γρήγορα).

5.2 Βαθμονόμηση

5.2.1 Βαθμονόμηση φθορισμομετρικού ανιχνευτή (FLD)

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε αφενός σε υπερκάθαρο νερό και αφετέρου σε μήτρα που δημιουργήθηκε από νερό δικτύου μετά από διήθηση του από χώμα της μονάδας (soil matrix).

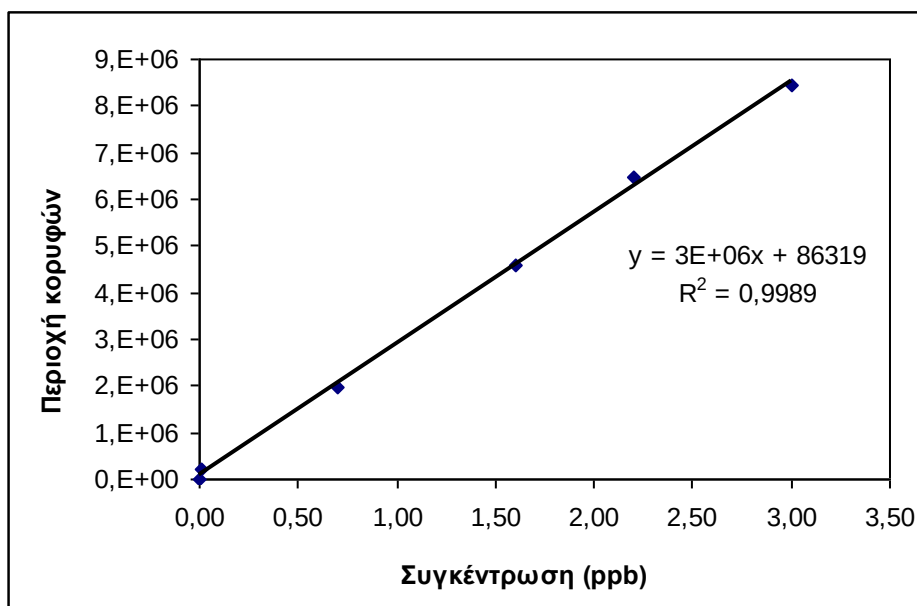
Υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (Standard Deviation – stdev) η οποία προκύπτει από τον λόγο (Area δείγματος) / (Μέση τιμή δειγμάτων), καθώς και η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation – RSD) η οποία για μια σειρά μετρήσεων ισούται με τον λόγο (τυπική απόκλιση) / (μέση τιμή), ως ποσοστό επί τοις εκατό.

Στην πρώτη περίπτωση αναλύθηκαν 14 δείγματα από έξι συγκεντρώσεις, επιμολυσμένων δειγμάτων υπερκάθαρου νερού από 0,01 έως 3 $\mu\text{g l}^{-1}$. Η γραμμικότητα κρίθηκε ικανοποιητική, με συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9991$.

Πίνακας 4. Υπολογισμός τυπικής και σχετικής τυπικής απόκλισης.

Concentration (ppb)	Area	Avg Area	St. Deviation	RSD %
blank	70465 57473	63969	9187	14,36
0,05	209954 215625 216410	213996	3523	1,65
0,10	334394 337521 321221	331045	8651	2,61
0,40	1300938 1171978 1271198	1248038	67527	5,41
0,70	2050762 2080946	2065854	21343	1,03
1,00	2940380 2622681	2781531	224647	8,08
1,60	4700031 4628727	4664379	50420	1,08
2,20	6327383 6753189	6540286	301090	4,60
3,00	8809774 8247936	8528855	397279	4,66

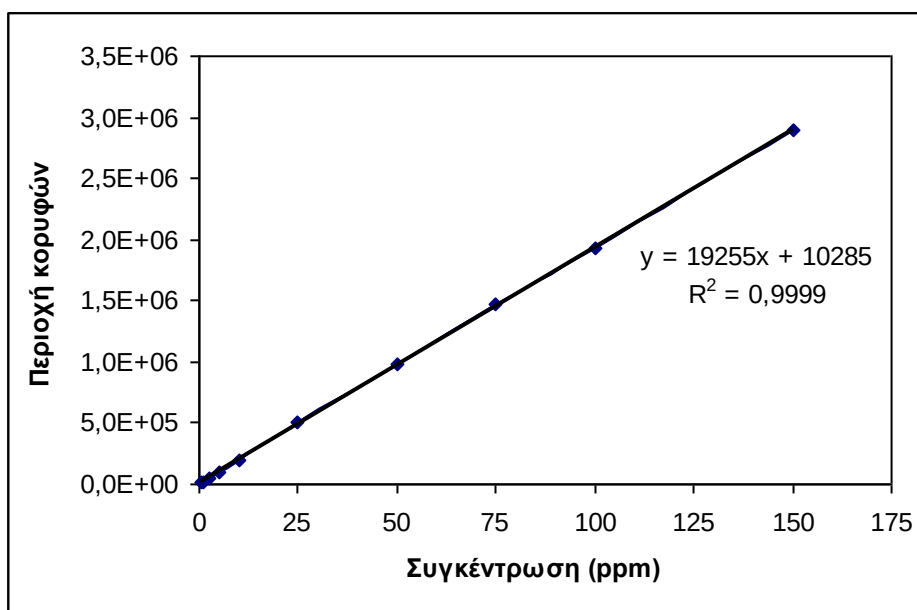
Στην περίπτωση της μήτρας από χώμα, διεξήχθησαν 21 αναλύσεις, 2 ή 3 για κάθε συγκέντρωση και δύο τυφλά δείγματα, στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων όπως προηγουμένως. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται ενδεικτικά στον Πιν. 4. Η γραμμικότητα της μεθόδου κρίθηκε άριστη, με συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9989$.



Σχήμα 1. Παρουσίαση της γραμμικότητας στον FLD στην περίπτωση της μήτρας από χώμα της μονάδας.

5.2.2 Βαθμονόμηση ανιχνευτή φωτοδιόδων (PDA)

Αντίστοιχα, για την εύρεση της καμπύλης αναφοράς στον PDA, δημιουργήθηκαν 22 διαλύματα δέκα διαφορετικών συγκεντρώσεων από 0,5 έως 150ppm. Η γραμμικότητα κρίθηκε άριστη με $r^2 = 0,9999$.



Σχήμα 2. Παρουσίαση της γραμμικότητας στον PDA στην περίπτωση της μήτρας από χόμα της μονάδας.

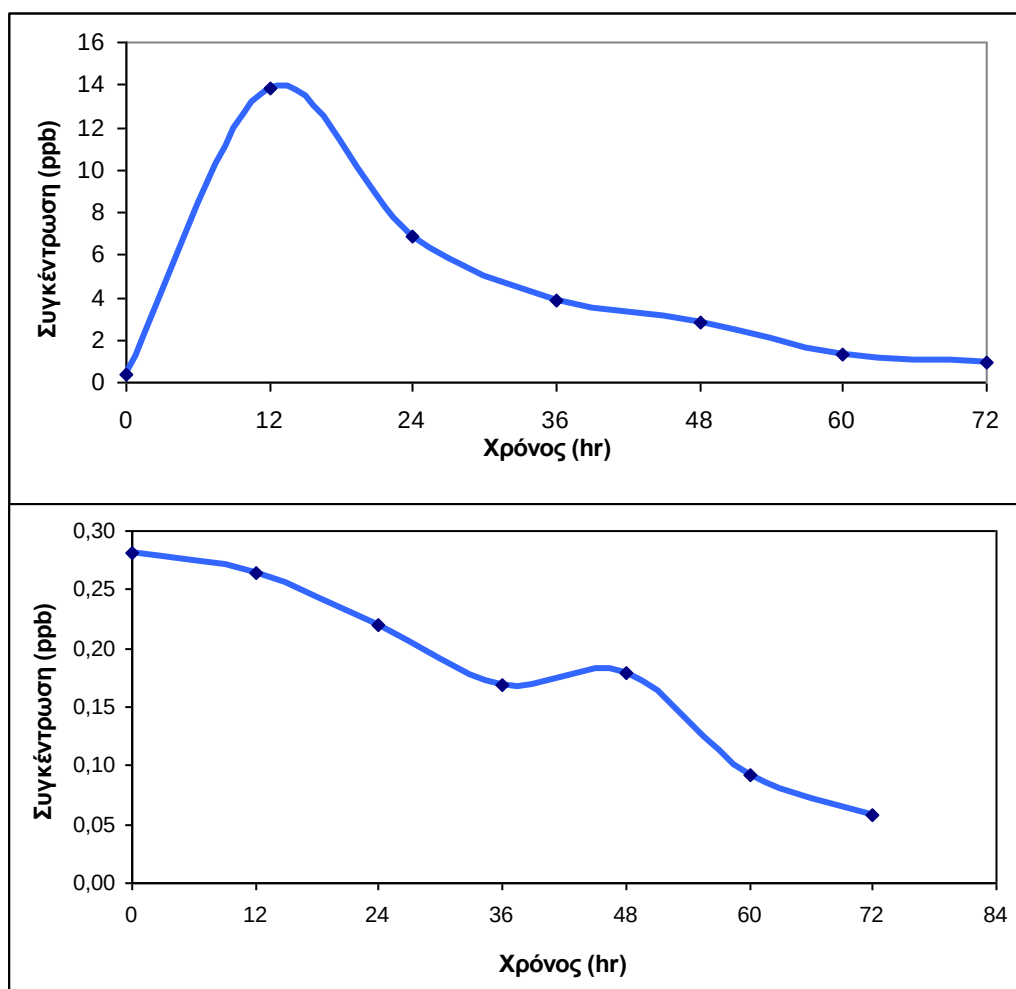
5.3 Ρυθμοί απομάκρυνσης της BPA από τις μονάδες

5.3.1 Μονάδα SBR A'

Διάφορα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την παρατήρηση της τύχης της δισφαινόλης στο σύστημα, για διαφορετικές συγκεντρώσεις και με διαφορετικό τρόπο εισαγωγής της στο σύστημα. Σε κάθε περίπτωση γινόταν ζύγιση της ένωσης και διάλυσή της σε γυάλινο κλειστό δοχείο με ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα. Λόγω δυσδιαλυτότητας της ένωσης στο νερό, λαμβάνονταν υπόψη ώστε η προστιθέμενη ποσότητα να είναι αρκετά κάτω από τα όρια διαλυτότητας, ενώ η διαδικασία διαρκούσε επί μακρόν (έως και 4 ημέρες) και με τη βοήθεια θέρμανσης όταν αυτό κρινόταν απαραίτητο.

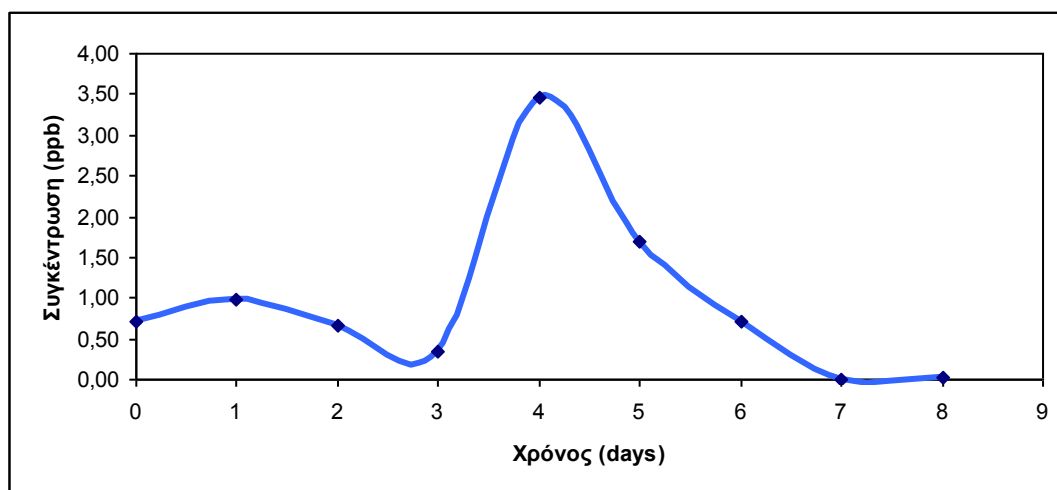
Στην περίπτωση της προσθήκης της ένωσης στη δεξαμενή αποθήκευσης (στρώμα χαλικιών), η αντλία λειτουργούσε διαρκώς για διάστημα 3 ημερών και παρέμενε κλειστή για 4 ημέρες. Η παροχή της αντλίας ήταν ρυθμισμένη στα 6L/hr και δειγματοληψίες γινόντουσαν κάθε 12hr. Ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης της ένωσης στην υγρή φάση, παρουσιάζεται στα ακόλουθα διαγράμματα (Σχ.3).

Η μείωση αυτή δεν αντιστοιχεί εξολοκλήρου στην αποδόμηση, εφόσον η ανακύκλωση προκαλούσε αρχικά αραιώση του διαλύματος, ενώ σε 25hr όλος ο όγκος του υγρού στο κάτω μέρος της δεξαμενής όπου είχε γίνει η προσθήκη της ένωσης, είχε κάνει ένα πλήρη κύκλο προς την επιφάνεια του εδάφους. Τη χρονική στιγμή $T=0$ κατά την οποία έγινε η προσθήκη, η μηδενική συγκέντρωση που μετρήθηκε αποδίδεται στην ανομοιογένεια του διαλύματος στον χώρο των χαλικιών λόγω ελλιπούς ανάδευσης έως τη στιγμή εκείνη.



Σχήμα 3. Ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης της BPA στην μονάδα SBR Α'. Επάνω παρουσιάζεται ο ρυθμός μείωσης κατά τον πρώτο κύκλο (0-3 ημέρες μετά την προσθήκη) και κάτω κατά τον δεύτερο κύκλο (8-10 ημέρες μετά την προσθήκη) μετά από τετραήμερη διακοπή λειτουργίας. Η 5^η ημέρα αναφέρεται στην έναρξη του δεύτερου κύκλου.

Η δεύτερη περίπτωση αφορούσε στην μελέτη της πορείας της BPA μετά από προσθήκη της, έπειτα από διάλυσή της, απευθείας στην επιφάνεια του εδάφους. Ακολούθησε συνεχή λειτουργία της αντλίας για 4 ημέρες, διακοπή για 3 ημέρες και επαναλειτουργία για άλλες 4 (Σχ.4). Ο τρόπος αυτός εισαγωγής της BPA στο σύστημα έγινε με σκοπό να υπάρχει μια πιο σαφής εικόνα της πορείας της ένωσης, χωρίς να μεσολαβεί η αραίωση στον συνολικό όγκο νερού όπως συνέβαινε στην προηγούμενη περίπτωση. Με την παροχή της αντλίας να παραμένει σταθερή (6L/hr), φαίνεται ότι μετά το τέλος του πρώτου κύκλου (4^η ημέρα λειτουργίας της αντλίας) μετράται σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης στο κάτω μέρος της δεξαμενής, ενώ μετά το τέλος του δεύτερου κύκλου (8^η ημέρα) η συγκέντρωση πρακτικά μηδενίζεται.

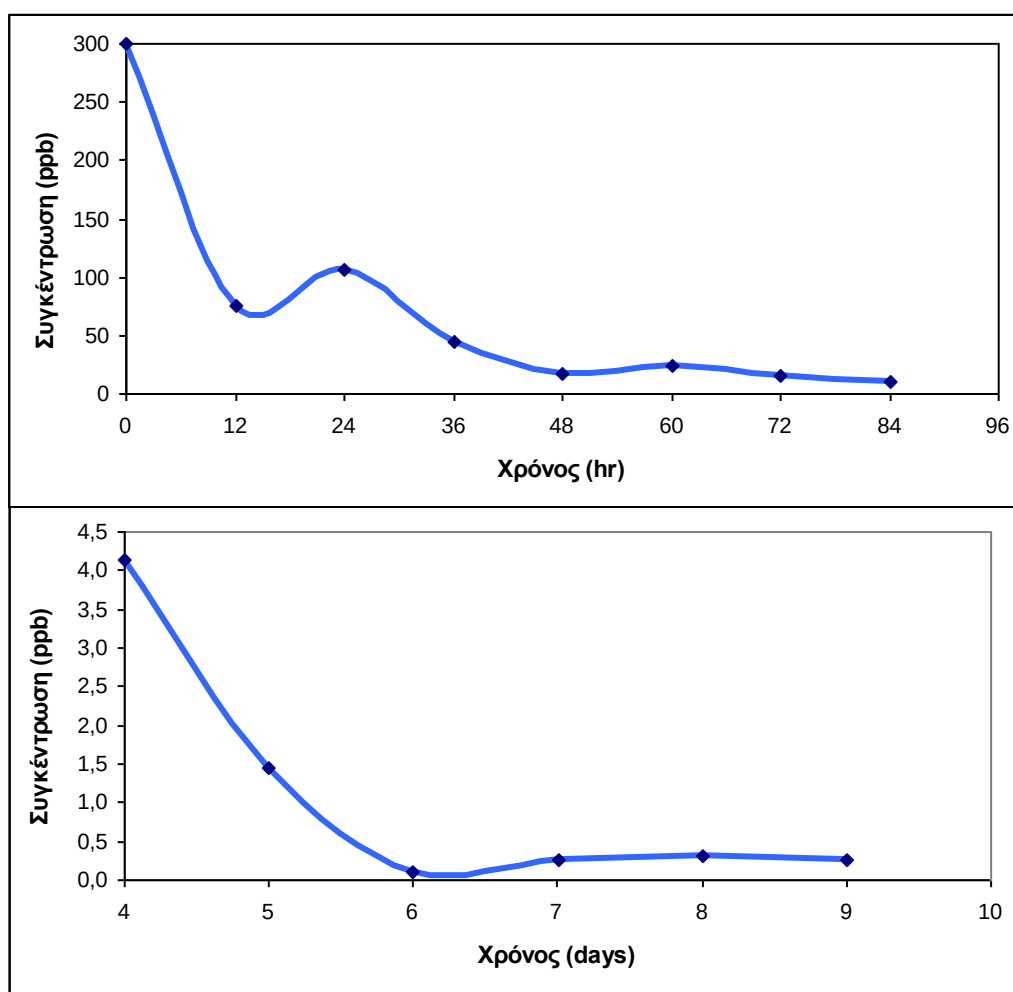


Σχήμα 4. Απεικόνιση της συγκέντρωσης της BPA στην υγρή φάση μετά από προσθήκη στην επιφάνεια του εδάφους.

5.3.2 Μονάδα SBR B'

Η μονάδα SBR B' λειτούργησε ως μονάδα ελέγχου και τα πειράματα διεξήχθησαν απουσία φυτών. Στην περίπτωση αυτή υπήρχε συνεχής επανακύκλωση του ρύπου, μέσω του συστήματος στράγγισης, όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, ενώ η προσθήκη της διαλυμένης ένωσης γινόταν στην εξωτερική δεξαμενή εξισορρόπησης. Η δειγματοληψία γινόταν από τη δεξαμενή εξισορρόπησης, ενώ κάθε φορά γινόταν μέτρηση του όγκου των δύο εξωτερικών δεξαμενών.

Εδώ παρουσιάζεται πείραμα κατά το οποίο η ποσότητα της BPA υπολογίστηκε να υπερβαίνει τις περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις, ώστε να είναι πιο εμφανής η εικόνα της πορείας της στο σύστημα. Είναι φανερό ότι η προσρόφηση στο έδαφος, ειδικά λόγω της σύστασής του (αυξημένη οργανική ουσία λόγω εδαφοβελτιωτικού) παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην συγκέντρωση που ανιχνεύεται στην υγρή φάση.



Σχήμα 5. Απεικόνιση της συγκέντρωσης της BPA στην υγρή φάση μετά από προσθήκη στην επιφάνεια του εδάφους.

Στην περίπτωση της μονάδας αυτής η λειτουργία της μονάδας ήταν διαρκής, χωρίς τη μεσολάβηση διαστήματος παύσης αυτής, όπως συνέβαινε στην μονάδα SBR A', παρουσία φυτών.

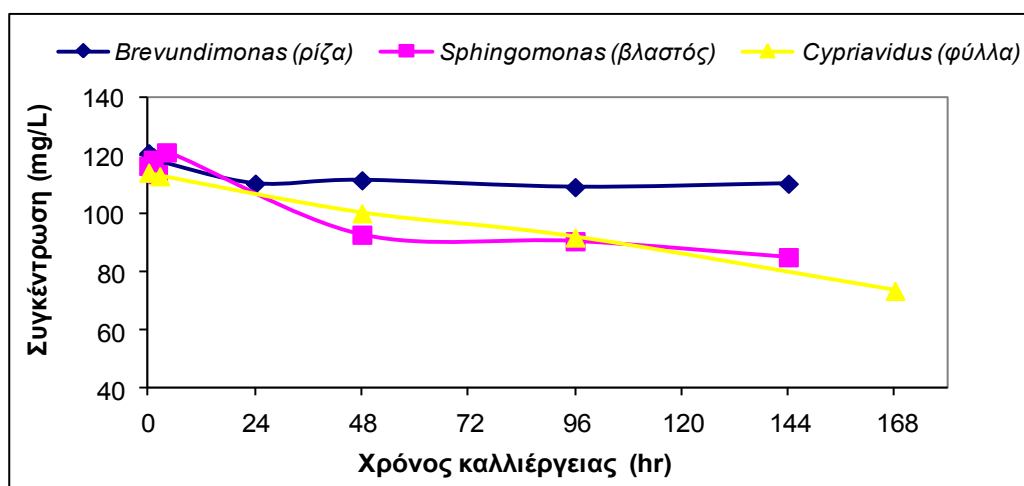
Συγκρίνοντας τους ρυθμούς μείωσης της συγκέντρωσης της BPA στην υγρή φάση στις δυο δεξαμενές, παρατηρείται αρχικά παραπλήσια μείωση και στις δυο ως ποσοστό επί τοις εκατό από την αρχική συγκέντρωση. Στην SBR A' η μείωση είναι της τάξης του 93,3% σε 72hr ενώ στη δεύτερη 92,7% για τον ίδιο χρόνο. Τα ποσοστά όμως αυτά αναφέρονται σε διαφορετικές μάζες χώματος στις δυο μονάδες (κατά 30% μεγαλύτερη στην SBR B') συνεπώς και μεγαλύτερη προσροφούμενη μάζα της ένωσης στην SBR B'.

Προκειμένου λοιπόν να αποδειχθεί η επίδραση των φυτών στην αποδόμηση της ένωσης στο σύστημα, αποφασίστηκε η μελέτη της ικανότητας ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα φυτά, να διασπών της BPA.

5.4 Ρυθμοί αποδόμησης της BPA από ενδοφυτικά βακτήρια του *T. parviflora*

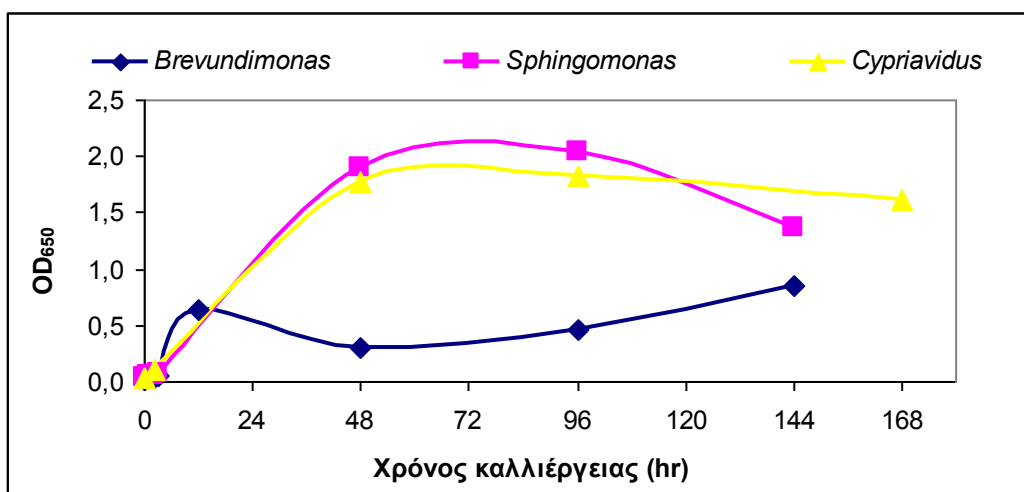
Από τα τρία υπό εξέταση στελέχη τα οποία αναπτύσσονταν παρουσία δισφαινόλης, λαμβάνονταν δείγματα κάθε 24hr προκειμένου να μελετηθούν οι ρυθμοί αποδόμησης της δισφαινόλης, έπειτα από χρωματογραφική ανάλυση. Παράλληλα μετριόταν η ανάπτυξη των κυττάρων βάση οπτικής πυκνότητας στα 650nm (OD₆₅₀).

Τα αποτελέσματα για το L medium έδειξαν μείωση 9,6% σε 4 ημέρες για το *Brevundimonas* (strain 10C4), 22,2% για το *Sphingomonas* (strain 15b), 19,5% για το *Cypriavidus* (strain 19a) και 35,6% για το τελευταίο σε 7 ημέρες (Σχ.6). Για τα παραπάνω χρονικά διαστήματα δείγματα αναφοράς έδειχναν μηδενική μείωση της συγκέντρωσης της BPA απουσία βακτηρίων.

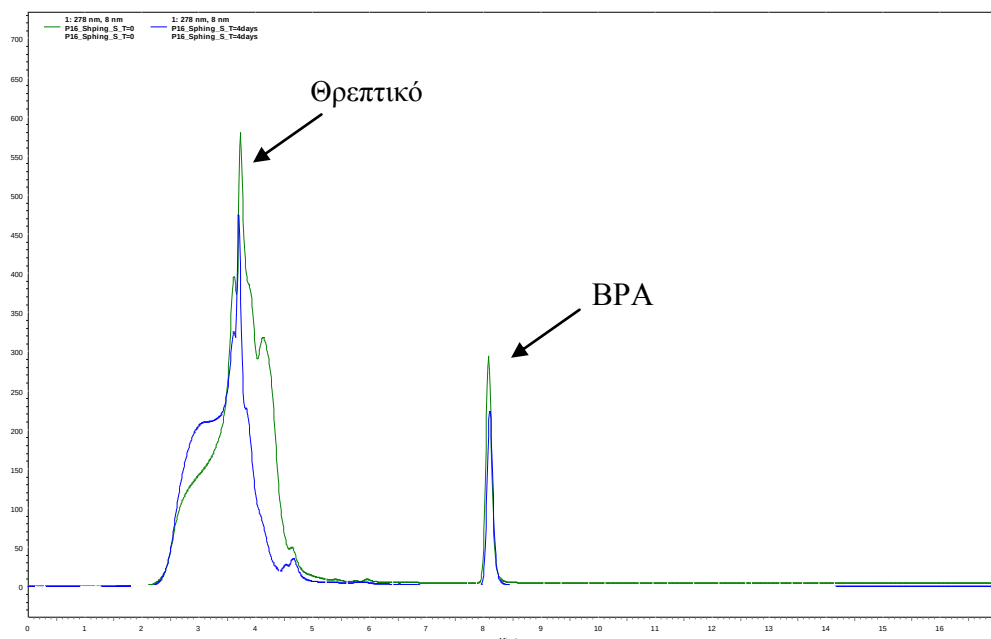


Σχήμα 6. Ρυθμός αποδόμησης της BPA από απομονωμένα ενδοφυτικά βακτήρια του *T. parviflora*, στο πλούσιο L-θρεπτικό.

Εξετάζοντας την ανάπτυξη των κυττάρων στα δύο στελέχη με τη μεγαλύτερη ικανότητα αποδόμησης BPA (*Sphingomonas* (strain 15b) και *Cypriavidus* (strain 19a)), παρατηρούμε έντονη αύξηση αυτών το πρώτο 48ωρο, σταθεροποίηση για τις επόμενες 48hr και μια μικρή πτωτική τάση στη συνέχεια (Σχ.7). Η εικόνα του *Brevundimonas* (strain 10C4), δείχνει εμφανώς πιο μειωμένη ανάπτυξη των κυττάρων.

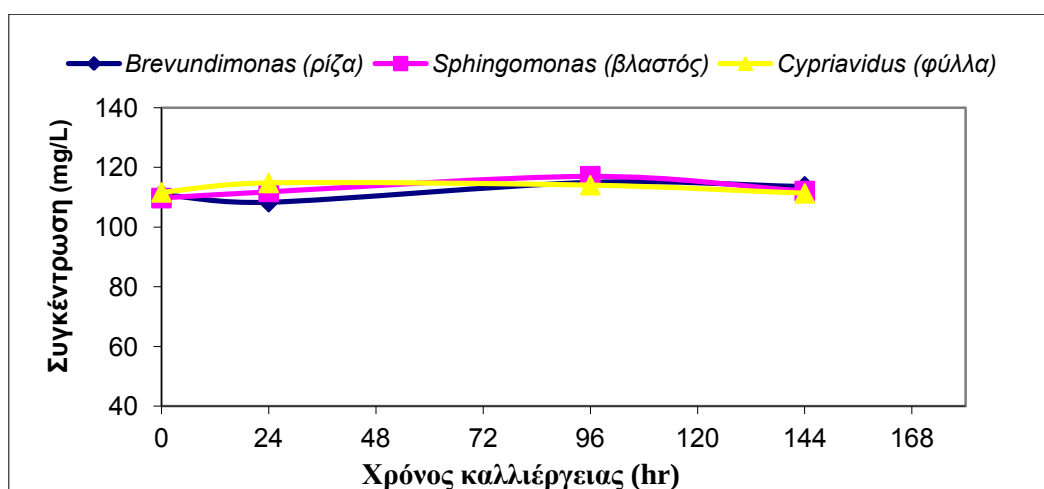


Σχήμα 7. Πορεία ανάπτυξης των κυττάρων των ενδοφυτικών βακτηρίων κατά την καλλιέργειά τους στο πλούσιο L-θρεπτικό, παρουσία δισφαινόλης.



Σχήμα 8. Χρωματογραφική απεικόνιση της αποδόμησης της δισφαινόλης από βακτήρια *Sphingomonas* (strain 15b) απομονωμένα από βλαστούς του *T. parviflora*. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται το χρωματογράφημα τη χρονική στιγμή $T = 0$ και με μπλε την $T = 4\text{days}$.

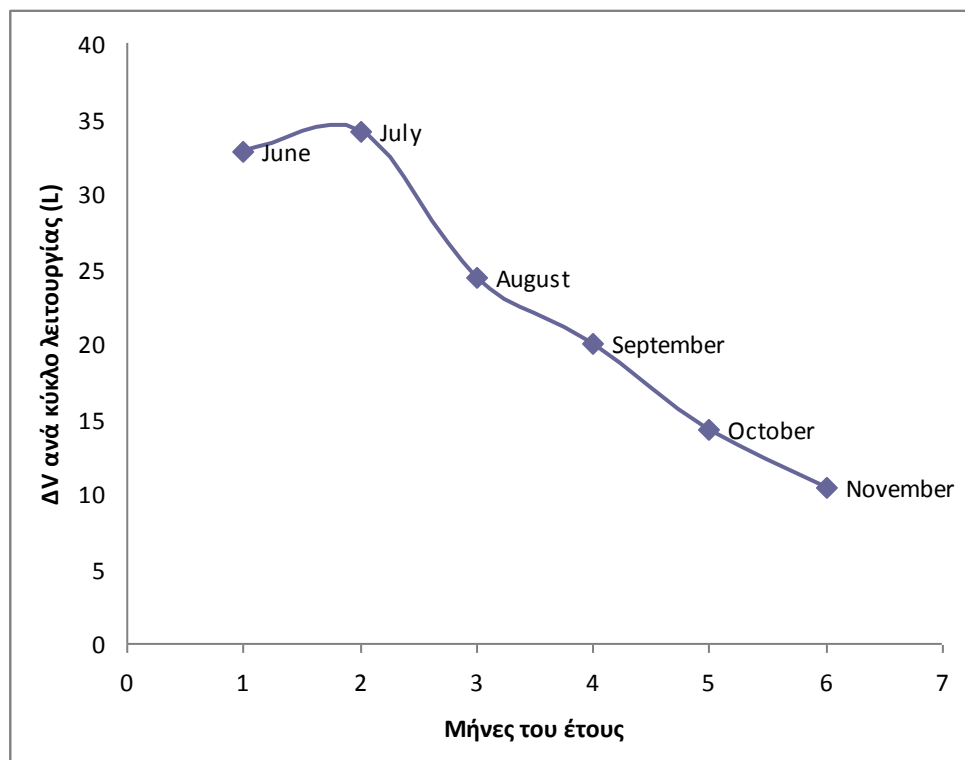
Εφαρμόζοντας αντίστοιχη μεθοδολογία για τα ίδια στελέχη στο θρεπτικό M9, και μοναδική πηγή για τα βακτήρια την BPA, τα αποτελέσματα έδειξαν μηδενική αποδόμηση μετά από 6 ημέρες, εικόνα που αναμενόταν ήδη από την παρατήρηση της ανάπτυξης των κυττάρων ή οποία ήταν επίσης από μηδενική έως ελάχιστη. Προτείνεται περαιτέρω διερεύνηση με τροποποίηση διαφόρων παραμέτρων, όπως για παράδειγμα του αριθμού βακτηρίων που προσθέτονται στο διάλυμα.



Σχήμα 9. Ρυθμός αποδόμησης της BPA από απομονωμένα ενδοφυτικά βακτήρια του *T. parviflora*, στο θρεπτικό M9.

5.5 Ρυθμός απωλειών από εξατμισοδιαπνοή

Οι συνολικές απώλειες νερού της μονάδας SBR A' ανά κύκλο λειτουργίας της αντλίας, υπολογιζόταν λαμβάνοντας μέτρηση από τον βαθμονομημένο σταθμοδείκτη. Τους θερινούς μήνες όπου η εξατμισοδιαπνοή ήταν υψηλή, οι συνολικές απώλειες άγγιζαν τη μέγιστη τιμή των 48L μέσα σε ένα κύκλο λειτουργίας της αντλίας (1 ημέρα λειτουργίας : 3 ημέρες παύση). Υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν τον μήνα Ιούλιο (μέση τιμή 34L), ενώ τον Νοέμβριο η μέγιστη τιμή έφτανε τα 18,4L, με μέση τιμή τα 10,4L. Οι μέσες τιμές των συνολικών απωλειών του συστήματος για τους μήνες Ιούνιο - Νοέμβριο παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα (Σχ. 9).



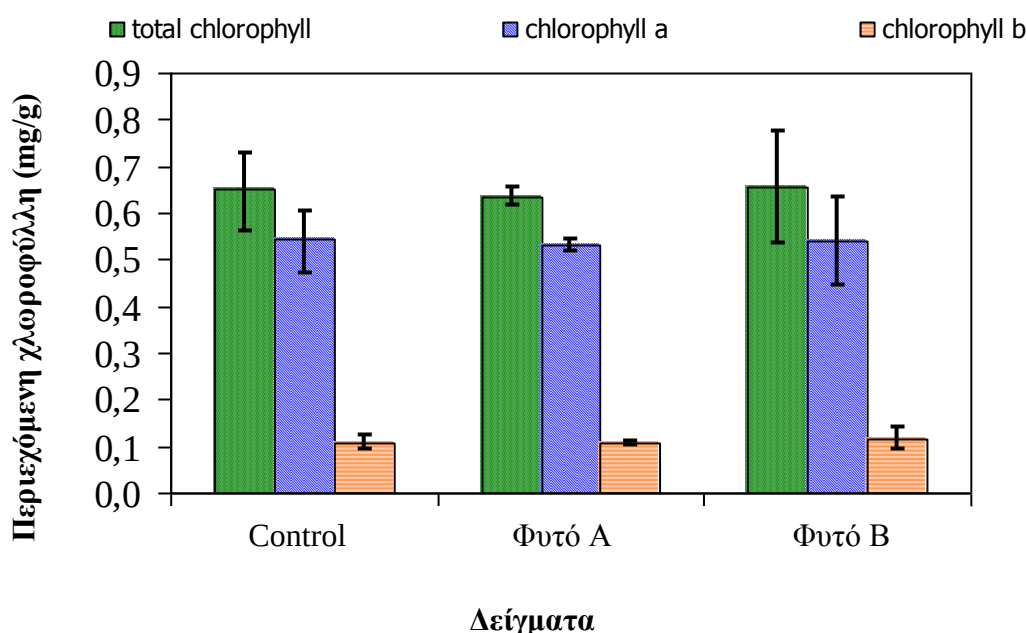
Σχήμα 10. Μέσος μηνιαίος ρυθμός συνολικών απωλειών σε νερό της μονάδας SBR A'.

5.6 Έλεγχος τοξικότητας από την παρουσία της BPA στα φυτά

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η εμφάνιση τοξικότητας από οργανικούς ρύπους στα φυτά περιλαμβάνει αναστολή της βλαστικότητας, της ανάπτυξης και της

φωτοσυνθετικής ικανότητάς τους. Παράλληλα αναστολή της βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και μεταβολή της αναλογίας χλωροφύλλης a/b, αναφέρονται ως ενδείξεις φυτοτοξικότητας από άλλους ρύπους όπως βαρέα μέταλλα.

Μετά από επαναλαμβανόμενα πειράματα και συνεχείς προσθήκες της ένωσης σε συγκεντρώσεις έως 15μg/L, δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα τοξικότητας (αναστολή ανάπτυξης, χλώρωση ή μείωση της βιομάζας. Επίσης δείγματα φύλλων λήφθηκαν από τα δύο φυτά της μονάδας και από φυτά που αναπτύσσονταν σε γλάστρες και δεν είχαν επιμολυνθεί (control). Τα αποτελέσματα αναλύσεων δεν έδειξαν καμία αξιόλογη μεταβολή στην περιεχόμενη χλωροφύλλη (Σχ.10) ούτε και στην αναλογία



Σχήμα 11. Απεικόνιση της ολικής χλωροφύλλης (πράσινες μπάρες), της χλωροφύλλης a (μπλε μπάρες) και χλωροφύλλης b (κόκκινες μπάρες), σε φυτά αναφοράς (control) και στα δύο φυτά της μονάδας (Φυτό A και B).

5.7 Συμπεράσματα – Προτάσεις

Οι πιλοτικές μονάδες οι οποίες κατασκευάστηκαν κατά την εργασία αυτή λειτούργησαν ικανοποιητικά βάσει του αρχικού τους σχεδιασμού ή κατόπιν τροποποιήσεων. Ειδικά στη μονάδα SBR A', λόγω απλούστερου σχεδιασμού, καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων δεν παρατηρήθηκαν προβλήματα ή οποιεσδήποτε

ενδείξεις δυσλειτουργίας, πέρα από αυτά που οφείλονταν σε φυσική φθορά αναλώσιμων τμημάτων της αντλίας και τα οποία επιδιορθώνονταν.

Η μονάδα SBR B' λόγω πιο πολύπλοκου σχεδιασμού παρουσίασε διάφορες προκλήσεις κατά την λειτουργία της. Σε περιόδους υψηλών βροχοπτώσεων, η επιφανειακής απορροή προς τη δεξαμενή αποστράγγισης η οποία βρισκόταν κάτω από το επίπεδο του εδάφους, προκαλούσε την ανύψωσή της λόγω του αέρα που περιείχε εσωτερικά, κάτι το οποίο επιλύθηκε με ισχυρή αγκύρωσή της στο έδαφος. Διακοπή ρεύματος προκαλούσε μη επανεκκίνησή της από τον ηλεκτρικό χρονοδιακόπτη όταν αυτό επανερχόταν, με αποτέλεσμα την υπερχειλίση της δεξαμενής αποστράγγισης και την απώλεια του ρυπασμένου νερού στο έδαφος. Επίσης, η μεγάλη απόσταση που διένυαν τα σωληνάκια αναρρόφησης και κατάθλιψης από τη δεξαμενή αποστράγγισης προς τη δεξαμενή εξισορρόπησης και την κυρίως δεξαμενή, προκαλούσε ορισμένες φορές διακοπή άντλησης λόγω αυξημένου φορτίου. Για όλους τους παραπάνω λόγους ήταν αναγκαίος ο τακτικός έλεγχος λειτουργίας της μονάδας SBR B'.

Ενδοφυτικά βακτήρια τα οποία απομονώθηκαν από βλαστούς, φύλλα και ρίζες των αλμυρικών της μονάδας, όπως αυτά αναπτύχθηκαν παρουσία δισφαινόλης, έδειξαν ότι έχουν την ικανότητα να αποδομούν την ένωση σε ποσοστό έως 20% σε τέσσερις ημέρες (*Sphingomonas* (strain 19a) και *Cypriavidus* (strain 15b)), για συγκεκριμένη βιομάζα βακτηρίων. Ωστόσο περαιτέρω έρευνα διεξάγεται για διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων και βελτιστοποίηση της μεθόδου.

Σχετικά με την τύχη της δισφαινόλης παρουσία του *T. parviflora*, προκαταρκτικά πειράματα δεν οδήγησαν σε ασφαλές συμπέρασμα όσον αφορά την απορρόφηση της ένωσης στους ιστούς του φυτού. Η βελτιστοποίηση όμως της μεθόδου εκχύλισης της BPA από φυτικά τμήματα είναι υπό εξέταση, ειδικά για την απομόνωση προϊόντων εκχύλισης τα οποία βρίσκονται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις και οι οποίες εμποδίζουν την ανίχνευση της δισφαινόλης και των παραγώγων της.

Ως προτάσεις για περαιτέρω έρευνα αποτελούν πειράματα βιοενίσχυσης (bioaugmentation) με συγκεκριμένες καλλιέργειες βακτηρίων καθώς και η επίδραση της παροχής οξυγόνου μέσω αερισμού στο ριζικό σύστημα ή τον χώρο αποθήκευσης του ρύπου (εφόσον είναι ήδη εγκατεστημένο το ανάλογο σύστημα στις μονάδες). Επίσης η μελέτη της επίδρασης της αλατότητας στην ανάπτυξη των φυτών και τη δυνατότητα φυτοαποκατάστασης, όπως και η παρουσία μίγματος ρυπογόνων ουσιών (ταυτόχρονη παρουσία διαφορετικών οργανικών ή οργανικών και ανόργανων ενώσεων).

Η φυσική αποδόμηση της δισφαινόλης σε ένα ανοιχτό σύστημα όπως αυτό των πιλοτικών μονάδων δημιουργεί αρκετές προκλήσεις στην ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων. Σε συνδυασμό όμως με πειράματα μικρής κλίμακας μπορεί να δώσει πληροφορίες οι οποίες θα έχουν εφαρμογή στο πεδίο.

Βιβλιογραφία

Διεθνής βιβλιογραφία

1. Alberta Environment, Environmental Sciences Division, Salt Contamination Assessment & Remediation Guidelines, T/606, May 2001, <http://environment.ov.ab.ca/info/library/6144.pdf> (last access 12/9/2012).
2. Alexander H.C., D. Dill, W. Smith, D. Guiney, B. Dorn, 1988. Bisphenol A: Acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7, 19-26.
3. Anderson T. A., T. L. Kruger, J. R. Coats, 1994. Enhanced degradation of a mixture of three herbicides in the rhizosphere of a herbicide-tolerant plant, *Chemosphere*, 28, 1551- 1557.
4. Bernhardt R., 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts, *Journal of Biotechnology* 124 128–145.
5. Birkett W. J, J. N. Lester, 2003. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process, CRC Press LLC, London, ISBN 1-84339-031-0.
6. Bowles D., E. K. Lim, B. Poppenberger, F. E. Vaistij, 2006. Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 567-97.
7. Brede C., P. Fjeldal, I. Skjevrak, H. Herikstad, 2003. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing, *Food Additives and Contaminants*, 20, 684-689.
8. Brotherson J.D., D. Field, 1987. Tamarix: Impacts of a successful weed. *Rangelands*, 9, 110-112.
9. Chaudhry Q., M. Blom-Zandstra, S. Gupta, E.J. Joner, 2005. Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment, *Environmental Science and Pollution Research*, 12. 34-48.
10. Cleverly J.R., S.D Smith, A. Sala, D.A. Devitt, 1997. Invasive capacity of *Tamarix ramosissima* in a Mojave Desert floodplain: the role of drought. *Oecologia*, 111, 12-18.

11. Cousins I.T., C.A. Staples, G.M. Klecka, D. Mackay, 2002. A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8, 5, 1107-1135.
12. Crain A., Eriksen M., Iguchi T., Jobling S., Laufer H., LeBlanc G., Guillette L., 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*, 24, 225–239.
13. Di Tomaso J., 1998. Impact, biology, and ecology of saltcedar (*Tamarix* spp.) in the southwestern United States, *Weed Technology*, 12, 326–336.
14. Dorn P. B., C. Chou, J. J. Gentempo, 1987. Degradation of bisphenol A in natural waters, *Chemosphere*, 16, 1501-1507.
15. Edwards R., D. P. Dixon, V. Walbot, 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health, *Trends in Plant Science*, 5, 193-198.
16. Eman A. D., K. A. B. Reham, 2011. Biodegradation of PAH compounds in the rhizosphere of *Tamarix nilotica*: A salt tolerant wild plant. *Journal of American Science*, 7.
17. Fent G., W. Hein, M. Moendel, R. Kubiak, 2003. Fate of 14C-bisphenol A in soils, *Chemosphere*, 51, 735–746.
18. Ferro A.M., S.A. Rock, J. Kennedy, J.J. Herrick, D.L. Turner, 1999. Phytoremediation of soils contaminated with wood preservatives: greenhouse and field evaluations, *International Journal of Phytoremediation*, 1, 289–306.
19. Furhacker M., S. Scharf, Weber H., 1999. Bisphenol A: emissions from point sources, *Chemosphere*, 41, 751-756.
20. Gatidou G., N. Thomaidis, A. Stasinakis, T. Lekkas, 2007. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 1138, 32–41.
21. Gerhardt K., E. X.D. Huang, R. Bernard, R.G. Glick, M.B. Greenberg, 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges, *Plant Science*, 176, 1, 20-30.

22. Gerzabek M. H., T. G. Reichenauer, 2006. Innovative in situ methoden zur sicherung und sanierung von altablagerungen und altstandorten. ISBN 10: 3850767728 / ISBN 13: 9783850767729.
23. Gräf W., 1965. *Medizinische Klinik*, 60, 561.
24. Harrison M. J., 1999. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 361-389.
25. Hegedus R., T. Kosaros, D. Gal, F. Pekar, M. Birone Onsik, G. Lakatos, 2009. Potential phytoremediation function of energy plants (*Tamarix tetrandia* pall. and *Salix viminalis* l.) in effluent treatment of an intensive fish farming system using geothermal water. *Acta Universitatis Sapientiae Agriculture and Environment*, 1, 31-37.
26. Huang X.-D., Y.S. El-Alawi, D. Penrose, B.R. Glick, B.M. Greenberg, 2004. A multiprocess phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils, *Environmental Pollution*, 130, 465-476.
27. Huang X.-D., Y.S. El-Alawi, J. Gurska, B.R. Glick, B.M. Greenberg, 2005. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils, *Microchemical Journal*, 81, 139 - 147.
28. Jiang J.Q., Q. Yin, J.L. Zhou , P. Pearce, 2005. Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters, *Chemosphere*, 61, 544-550.
29. Kahn R. A., S. Bak, I. Svendsen, B. A Halkier, B. Lindberg Møller, 1997. Isolation and reconstitution of cytochrome P450ox and in vitro reconstitution of the entire biosynthetic pathway of the cyanogenic glucoside dhurrin from sorghum, *Plant Physiology*, 115, 1661-1670.
30. Kang J. H., Y. Katayama, F. Kondo, 2006. Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals, *Toxicology*, 217, 81-90.
31. Kang J.H., F. Kondo, 2006. Distribution and biodegradation of bisphenol A in water hyacinth, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77, 500-507.

32. Kang J.H., K. Kito, F. Kondo, 2003. Factors influencing the migration of bisphenol A from cans, *Journal of Food Protection*, 66, 1444–1447.
33. Kang J.H., N. Ri, F. Kondo, 2004. *Streptomyces* sp. strain isolated from river water has high bisphenol A degradability. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 178-180.
34. Kang, J. H., F. Kondo. 2002. Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 265-269.
35. Katayama A., R. Bhula, G. Burns, E. Carazo, A. Felsot, D. Hamilton, C. Harris, Y.-H. Kim, G. Kleter, W. Koerdel, J. Linders, J.W. Peijnenburg, A. Sabljic, R. Stephenson, D. Racke, B. Rubin, K. Tanaka, J. Unsworth, R.D. Wauchope, 2010. Bioavailability of xenobiotics in the soil environment, *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, 203, 1–86.
36. Krishnan A.V., P. Stathis, S.F. Permuth, L. Tokes, D. Feldman, 1993. Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving, *Endocrinology*, 132, 2279-2286.
37. Lenz, K., V. Beck and M. Fuerhacker. 2004. Behavior of bisphenol A, 4-nonylphenol and 4-nonylphenol ethoxylates (4-NP1EO, 4-NP2EO) in oxidative water treatment processes, *Water Science Technology*, 50, 141-147.
38. Loffredo E., E. Gattullo, A. Traversa, N. Senesi, 2010. Potential of various herbaceous species to remove the endocrine disruptor bisphenol A from aqueous media, *Chemosphere*, 80, 1274–1280.
39. Lynch J.M., 1990. Beneficial interactions between micro-organisms and roots, *Biotechnology Advances*, 8, 335-346.
40. Maffini M., B. Rubin, C. Sonnenchein, A. Soto, 2006. Endocrine disruptors and reductive health: the case of bisphenol A, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179–186.
41. Manousaki E., J. Kadukova, N. Papadantonakis, N. Kalogerakis, 2008. Phytoextraction and phytoexcretion of Cd by the leaves of *Tamarix smyrnensis* growing on contaminated non saline and saline soils. *Environmental Research*, 106, 326-332.

42. Manousaki E., N. Kalogerakis, 2011. Halophytes-An Emerging Trend in Phytoremediation, *International Journal of Phytoremediation*, 13, 10, 959-969.
43. Marrs K. A., 1996. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 127-158.
44. Martin J. K., 1977. Factors influencing the loss of organic carbon from wheat roots, *Soil Biology and Biochemistry*, 9, 1-7.
45. Masuda M., Y. Yamasaki, S. Ueno, A. Inoue, 2007. Isolation of bisphenol A-tolerant/degrading *Pseudomonas monteilii* strain N-502, *Extremophiles*, 11, 355-362.
46. Meagher R.B., 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants, *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 153-162.
47. Mohapatra, D., S. Brar, R. Tyagi, R. Surampalli, 2010. Physico-chemical pretreatment and biotransformation of wastewater and wastewater sludge – fate of bisphenol A, *Chemosphere*, 78, 923–941.
48. Mondel M. 2001. Adsorption/desorption of Bisphenol A on four different soils. Final report by staatliche lehr- und forschungsanstalt, Neustadt an der Weinstrasse, D-40789.
49. Newman L. A., C. M. Reynolds, 2005. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants, *Trends in Biotechnology*, 23, 6-8.
50. Oehlmann J., M. Oetken, U. Schulte-Oehlmann, 2008. A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption, *Environmental Research*, 108, 140–149.
51. Pilon - Smits E., 2005. Phytoremediation, *The Annual Review of Plant Biology*, 56, 15-39.
52. Pirker K. F., J. Ferreira Severino, T. G. Reichenauer, B. A. Goodman, 2008. Free radical processes in green tea polyphenols (GTP) investigated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, *Biotechnology Annual Review*, 14, 349-401.
53. Rea P. A., 1999. MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast *Journal of Experimental Botany*, 50, 895-913.

54. Reichenauer G.T., J.J.Germida, 2008. Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *ChemSusChem*, 1, 8-9, 708-17.
55. Sandermann H., 1992. Plant metabolism of xenobiotics, *Trends in Biochemical Science*, 17, 2, 82-84.
56. Sax N., R. Lewis, 1996. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. 9th edition, New York, Van Nostrand Reinhold.
57. Sicker D., M. Frey, M. Schulz, A. Gierl, 2000. Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants, *International Review of Cytology*, 198, 319-346.
58. Sims R. C., M. R. Overcash, 1983. Fate of Polynuclear Aromatic Compounds (PNAs) in Soil-Plant Systems, *Residue reviews*, 88, 1-68.
59. Smith M.J., T.H. Flowers, H.J. Duncan, J. Alder, 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues, *Environmental Pollution*, 141. 519-525.
60. Sorel D., C. J. Neville, M. T. Rafferty, K. C. Chiang, C. B.Andrews, 2003. Hydraulic containment using phytoremediation and a barrier wall to prevent arsenic migration. *Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds*, Monterey, CA, USA, 9.
61. Spivack J., Leib T., J. Lobos, 1993. Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 10, 7323-7329.
62. Staples C., U. Friederich, T. Hall, G. Klecka, E. Mihaich, L. Ortego, N. Caspers, S. Hentges, 2010. Estimating potential risks to terrestrial invertebrates and plants exposed to bisphenol A in soil amended with activated sludge biosolids. Toxicity of BPA in plants, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 2, 467–475.
63. Stralis-Pavese N., A.Sessitsch, A.Weilharter, T. Reichenauer, J.Riesing, J.Csontos, J.C.Murrell and L.Bodrossy, 2004. Optimisation of diagnostic microarray for application in analysing landfill methanotroph communities under different plant covers, *Environmental Microbiology*, 6, 347-363.
64. Subramanya N., 2007. Biodegradation of bisphenol A and ibuprofen by ammonia oxidizing bacteria. MSc thesis, Texas A&M University.

65. Taylor P., Reuters 2010. Experts demand European action on plastics chemical, 2010. http://www.reuters.com/article/2010/06/22/us-chemical-bpa-health-idUSTRE65L6JN20100622?loomia_ow=t0:s0:a49:g43:r3:c0.084942:b35124310:z0 (last access 5/10/2012).
66. Tesar M., T. Reichenauer, A. Sessitsch, 2002. Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel, *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1883-1892.
67. U.S. Environmental Protection Agency, EPA/600/R-99/107, 2000. Introduction to phytoremediation. <http://www.clu-in.org/download/remed/introphyto.pdf> (last access 12/9/2012).
68. Urbansky E. T., M. L. Magnuson, C. A. Kelty, S. K. Brown, 2000. Perchlorate uptake by salt cedar (*Tamarix ramosissima*) in the Las Vegas Wash riparian ecosystem. *The Science of the Total Environment*, 256, 227-232.
69. Vogt T., P. Jones, 2000. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends in Plant Science*, 5, 380-386.
70. Wafa'a A., A. Taisan, 2009. Suitability of using *Phragmites australis* and *Tamarix aphylla* as vegetation filters in industrial areas. *American Journal of Environmental Sciences*, 5, 740-747
71. Wang B.Y., 2008. Environmental Biodegradation Research Focus, Nova Science Publishers, Nova Science Publishers Inc.
72. Weyens N., S. Taghavi, T. Barac, D. Lelie, J. Boulet, T. Artois, R. Carleer, J. Vangronsveld, 2009. Bacteria associated with oak and ash on a TCE-contaminated site: characterization of isolates with potential to avoid evapotranspiration of TCE, *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 830-843.
73. Whipps J.M., 1990. Carbon economy, editor: J.M. Lynch, *The Rhizosphere*, Wiley, New York, 59-97.
74. White P.M. Jr., D.C. Wolf, G.J. Thoma, C.M. Reynolds, 2006. Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil, *Water, Air and Soil Pollution*, 169, 207-220.

75. Wikipedia, 2012,
<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BB%CE%BC%CF%85%CF%81%CE%AF%CE%BA%CE%B9> (last access 20/11/2012).
76. Willey N., 2007. Methods in biotechnology, phytoremediation methods and reviews, Humana Press, Totowa, New Jersey, 23.
77. Yamamoto T., A. Yasuhara, H. Shiraishi, O. Nakasugi, 2001. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates, *Chemosphere*, 42, 415-418.

Ελληνική βιβλιογραφία

1. Αθανασιάδου Δ., 2008. Μελέτη παρουσίας στεροειδών ενδοκρινικών διαταρακτών στο Θερμαϊκό. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
2. Αρτεμισάρης, <http://www.antemisaris.gr/product.aspx?iid=3306>, τελευταία πρόσβαση 20/11/2012.
3. Γιαντζή Ε., 2007. Προσδιορισμός δισφαινόλης Α, οκτυλφαινόλης και νονυλφαινόλης σε υδατικά διαλύματα με χρήση της τεχνικής μικροεκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.
4. Ζαμπετάκης Α.Λ., Β.Θ. Μανιός, Γ. Καρατζάς, 2005. Καινοτομικές μέθοδοι εξυγίανσης ρυπασμένων εδαφών και υπόγειων υδάτων. Η τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης., *Heleco '05*, TEE, Αθήνα.
5. Ζαμπετάκης Α.Λ., 2000. Αποκατάσταση εδαφών δια της μεθόδου της φυτοεξυγίανσης. Παρουσίαση μαθηματικού μοντέλου για την πρόσληψη ξενοβιοτικών ουσιών από τα φυτά. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.
6. Μανουσάκη Ε., 2008. Χαρακτηρισμός της ικανότητας μεσογειακών φυτών για απομάκρυνση Pb και Cd από ρυπασμένα εδάφη. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.
7. Πανταζίδου Μ., Α. Ξενίδης, Ν. Παπασιώπη, 2006. Σημειώσεις μαθήματος «Αποκατάσταση ρυπασμένων χώρων», Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του ΕΜΠ, Επιστήμη και Τεχνολογία Υδατικών Πόρων.