



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

**«Μελέτη της αποδόμησης γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται
στα συσκευαστήρια φρούτων σε λυματολάσπη από τη μονάδα
επεξεργασίας αστικών αποβλήτων της πόλης της Λάρισας»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΜΕΤΣΟΒΙΤΗ ΜΑΡΙΑ

Επιβλέπων καθηγητής : Καρούζας Δημήτριος

Λάρισα, 2013

**«Μελέτη της αποδόμησης γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται
στα συσκευαστήρια φρούτων σε λυματολάσπη από τη μονάδα
επεξεργασίας αστικών αποβλήτων της πόλης της Λάρισας»**

**“Study of the degradation of pesticides used in fruit packing plants in
sewage sludge from the municipal wastewater treatment facility of the city
of Larissa”.**

Η Τριμελής επιτροπή αποτελείται από τους:

- Καρούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Μόσιαλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Καρπούζα Δημήτριο, επίκουρο καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη πολύτιμη βοήθειά του που μου παρείχε κατά την ανάθεση, τη διεξαγωγή του πειράματος και την γραπτή παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Η συμβολή του υπήρξε καθοριστική στη συγγραφή και επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στην Δρ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη και τον Δρ. Μόσιαλο Δημήτριο που με ευχαρίστηση δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή για την παρούσα μελέτη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Καραά Παναγιώτη, για την άριστη συνεργασία, αλλά και την πολύτιμη βοήθειά του στη διεξαγωγή της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Παράλληλα, με το κλείσιμο αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών, είναι σημαντικό να αναφέρω ότι το αίσθημα αναζήτησης και διερεύνησης είναι ακόμη πιο έντονο από ότι όταν ξεκίνησα αυτό το πρόγραμμα και η επαφή με ανθρώπους από διάφορα επιστημονικά πεδία ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα και επικοινωνιακή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το «Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών - Ι.Κ.Υ», καθώς η υλοποίηση του συγκεκριμένου μεταπτυχιακού προγράμματος συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του ΕΠ «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) και του ΕΣΠΑ, 2007-2013.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ortho-phenylphenol (OPP), diphenylamine (DPA) και imazalil (IMZ) είναι γεωργικά φάρμακα, τα οποία χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων προκειμένου να περιοριστεί η ποιοτική υποβάθμιση των προϊόντων αυτών κατά την αποθήκευση. Βέβαια, η χρήση τους έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλου όγκου υγρών αποβλήτων με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων και των οποίων η επεξεργασία αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρήση των γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή κοινοτική νομοθεσία. Η απευθείας απόρριψη υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων είτε στο περιβάλλον είτε σε συστήματα επεξεργασίας αστικών αποβλήτων είναι πιθανό να προκαλέσουν σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα. Έτσι κρίθηκε ενδιαφέρον να αξιολογηθεί η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων σε προϊόντα όπως η λυματολάσπη από μονάδες επεξεργασίας αστικών αποβλήτων. Παράλληλα με αυτό τον τρόπο αξιολογήθηκε η προοπτική χρήσης της λυματολάσπης ως υλικό επιτάχυνσης της διαδικασίας αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων που περιέχονται στα απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων σε συστήματα επεξεργασίας των συγκεκριμένων αποβλήτων (π.χ. βιοκλίνες)

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων OPP, DPA και IMZ που περιέχονται στα απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων σε υπόστρωμα λυματολάσπης, το οποίο εμπλουτίστηκε με υγρή ενεργοποιημένη λάσπη από την αερόβια επεξεργασία των υγρών αστικών αποβλήτων της Λάρισας. Όπως προέκυψε από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, το μυκητοκτόνο imazalil παρουσίασε ιδιαίτερα υψηλή υπολειμματικότητα με χρόνους DT50 από 116 ή 94 ημέρες όπως εκτιμήθηκαν από τα μοντέλα κινητικής πρώτης τάξης και Hockey-stick αντίστοιχα. Αντίθετα τα OPP και DPA αποδομήθηκαν με υψηλούς ρυθμούς με χρόνους ημιζωής 7 και 3.6 ημέρες αντίστοιχα. Συνολικά τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η λυματολάσπη που προέρχεται από τα συστήματα επεξεργασίας υγρών αστικών αποβλήτων παρουσιάζει ικανοποιητική ικανότητα αποδόμησης των OPP και DPA, ενώ αντίθετα δεν φαίνεται να επιταχύνει την αποδόμηση του IMZ.

ABSTRACT

Ortho-phenylphenol (OPP), diphenylamine (DPA) and imazalil (IMZ) are pesticides used in fruit packaging plants in order to prevent spoilage of fruits during storage. The application of these pesticides leads to the production of high volumes of wastewaters containing large pesticide loads. Based on European Commission the pretreatment of these wastewaters before their environmental disposal is a prerequisite for authorization of use of those pesticides at EU level. Direct disposal of these wastewaters in the environment or in municipal wastewater treatment facilities entail an unacceptable risk for the environment and the operation of these facilities. Thus it is of outmost interest to investigate the degradation of the pesticides used in the postharvest treatment of fruits on products of such municipal wastewater treatment facilities like sewage sludge. Such studies will also provide preliminary evidence for the potential use of such substrates as enhancers of the degradation of pesticides used in postharvest fruit packaging plants in alternative treatment systems like biobeds.

In this thesis, we studied the degradation of the pesticides ortho-phenylphenol, imazalil and diphenylamine that are contained in waste from packing fruit in sewage sludge obtained from the municipal wastewater treatment facility of the city of Larissa. The sewage sludge was enriched with liquid activated sludge from aerobic treatment of municipal wastewater of Larissa before use.

Our results showed that the fungicide imazalil was the most persistent of the chemicals tested with DT50 values ranging from 94.1 to 116 days as calculated by the hockey stick model or the first order kinetics model respectively. In contrast OPP and DPA degraded rapidly in sewage sludge with DT50 values of 7 and 3.6 days respectively. In conclusion, enriched sewage sludge was effective in rapidly degrading the pesticides OPP and DPA, whereas no acceleration in the degradation of IMZ was achieved.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΡΟΥΤΩΝ	8
1.2 ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΡΟΥΤΩΝ	14
1.2.1 Imazalil (IMZ)	14
1.2.2. Ortho-phenylphenol (OPP).....	19
1.2.3 Diphenylamine (DPA).....	22
1.3. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΤΗΡΙΑ	28
1.4. ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	32
1.5. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ	36
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗΣ.....	36
2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗ.....	38
2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗΣ	39

2.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗΣ	40
2.4.1 Εκτίμηση υγρασίας λυματολάσπης.....	40
2.4.2. Εκτίμηση της υδατοχωρητικότητας της λυματολάσπης	41
2.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗΣ	42
2.5.1. Μέθοδος εκχύλισης.....	42
2.5.2 Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.....	43
2.5.3. Καμπύλες αναφοράς	44
2.6 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	44
2.6.1. Μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης	45
2.6.2. Μοντέλο κινητικής Hockey-stick	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ	48
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
3.1. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ OPP ΣΤΗ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗ	48
3.2 ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ DPA ΣΤΗ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗ	49
3.3 ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΙΜΑΖΑΛΙΛ ΣΤΗ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗ	50
3.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΧΡΟΝΟΥ ΗΜΙΖΩΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ.....	53
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ.....	56
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΡΟΥΤΩΝ

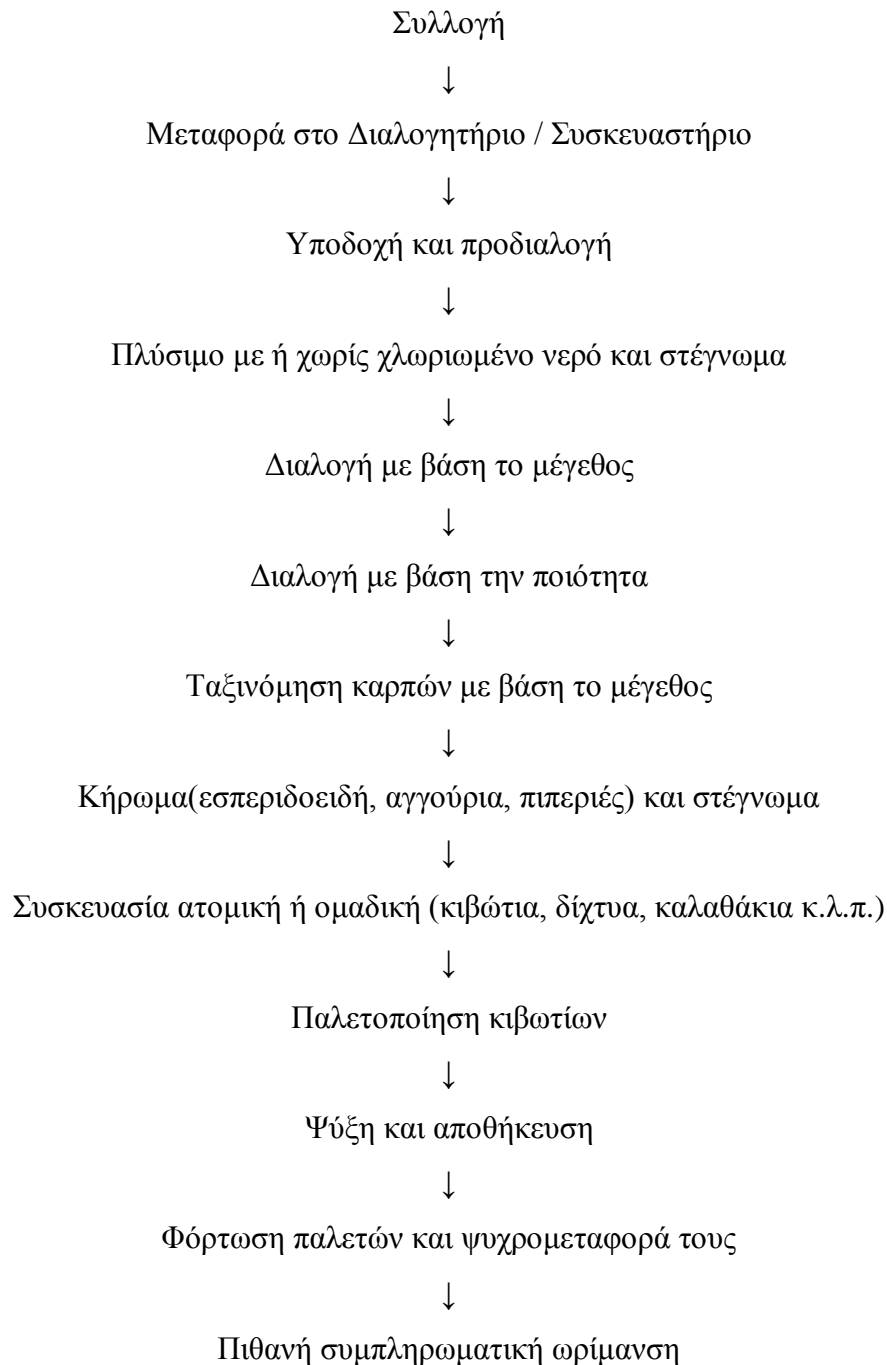
Τα οπωροκηπευτικά αποτελούν έναν από τους δυναμικότερους κλάδους της σύγχρονης ελληνικής γεωργίας, καθώς σημαντικές ποσότητες αυτών προορίζονται για εξαγωγή. Όμως σε ένα περιβάλλον διαρκώς αυξανόμενου ανταγωνισμού πρέπει να διατηρούν υψηλά επίπεδα ποιότητας και να παράγονται με όσο το δυνατόν χαμηλότερο κόστος. Τα οπωροκηπευτικά χαρακτηρίζονται για την υψηλή ευπάθειά τους και απαιτούν κατάλληλες μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις.

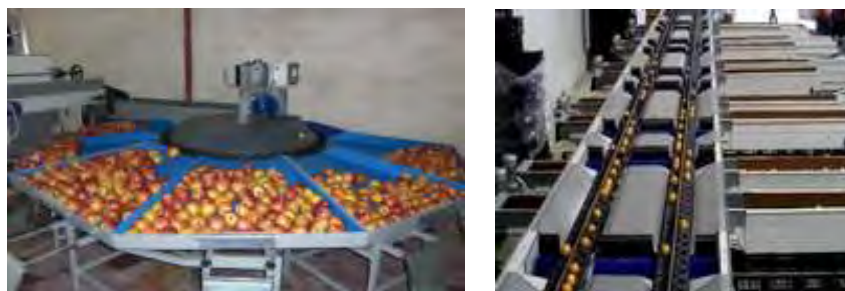
Το πρώτο βήμα στη μετασυλλεκτική ζωή των καρπών (Εικόνα 1) είναι η συλλογή/συγκομιδή, η οποία πρέπει να γίνεται στο άριστο (optimum) στάδιο ανάπτυξης ώστε οι καρποί να έχουν τουλάχιστον φυσιολογικά ωριμάσει. Η γνώση του σταδίου συλλεκτικής ωριμότητας παίζει σπουδαίο ρόλο στη συντήρηση και στην ποιότητα των καρπών.

Με τη φυσιολογική έννοια του όρου, ωριμότητα είναι η μετάβαση από το βλαστικό στο αναπαραγωγικό στάδιο ενώ σε ότι αφορά στους καρπούς διακρίνεται σε φυσιολογική και εμπορική ή οργανοληπτική (Μανωλοπούλου και Λαμπρινός, 1989). Φυσιολογική ωριμότητα είναι το στάδιο της μέγιστης ανάπτυξης του καρπού που συνδυάζεται με την αναπαραγωγική ικανότητά του, ενώ εμπορική είναι το στάδιο που καλύπτει τις απαιτήσεις του καταναλωτή και της αγοράς.

Ποιότητα στα νωπά φρούτα και λαχανικά είναι ο συνδυασμός φυσικών χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων που αναφέρονται στη βρωσιμότητα, στην εμφάνιση και γενικότερα στη χρησιμότητα ενός προϊόντος στο οποίο δίνουν θρεπτική αξία, ικανοποιώντας ταυτόχρονα τον καταναλωτή (Σφακιωτάκης, 1995).

Εικόνα 1 : Μετασυλλεκτικοί χειρισμοί
(πηγή: Kader, 1992; Σφακιωτάκης, 1995)





Εικόνα 2: Γραμμές Διαλογής ταξινόμησης και συσκευασίας μήλων και εσπεριδοειδών

Οι μετασυλλεκτικές ασθένειες των νωπών φρούτων και λαχανικών, που εκδηλώνονται κατά τη διάρκεια της συντήρησης στα ψυγεία ή και στα ράφια των καταστημάτων, αποτελούν τον κύριο παράγοντα πρόκλησης ποσοτικών απωλειών αλλά και ποιοτικής υποβάθμισης και οφείλονται τόσο σε μη παρασιτικά όσο και σε παρασιτικά αίτια (μύκητες, βακτήρια).

Οι μετασυλλεκτικές παρασιτικές ασθένειες ή μετασυλλεκτικές σήψεις προκαλούνται κυρίως από μυκητολογικής αιτιολογίας παθογόνα, ενώ σπανιότερα από τη δράση φυτοπαθογόνων βακτηρίων (Βασιλακάκης & Καραολγανίδης, 2010) Τα γένη των μυκήτων και βακτηρίων που προκαλούν τις σημαντικότερες μετασυλλεκτικές σήψεις των αγροτικών προϊόντων είναι τα: *Botrytis*, *Monilia*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Erwinia* (Εικόνες 3, 4, 5, 6 και 7). Οι μετασυλλεκτικές σήψεις οφείλονται σε προ- και μετά- συλλεκτικούς παράγοντες και μπορεί να είναι το αποτέλεσμα προσυλλεκτικών λανθανουσών μολύνσεων ή επιμολύνσεων και προσβολών από μύκητες και βακτήρια κατά τη συγκομιδή. Τα συμπτώματα των προσβολών εμφανίζονται κατά την αποθήκευση, την μεταφορά ή και μετά την αγορά των νωπών προϊόντων από τον καταναλωτή. Η αντιμετώπισή τους στηρίζεται κυρίως στην εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων προσυλλεκτικά και μετασυλλεκτικά.



Εικόνα 3: Προσβολή μήλου από το μύκητα *Gloeosporium spp.*



Εικόνα 4: Προσβολή πορτοκαλιού από το μύκητα *Phomopsis citri*

Συνοπτικά, οι τεχνικές που μπορούν να εφαρμοστούν για να περιορίσουν σε σημαντικό βαθμό τις μυκητιακές προσβολές των φρούτων είναι:

- Η θερμική επεξεργασία, η οποία περιλαμβάνει την εμβάπτιση φρούτων, όπως τα μάνγκο σε νερό θερμοκρασίας 50°C για 5min.
- Η εφαρμογή μυκητοκτόνων όπως imazalil, thiabendazole, ortho-phenylphenol για προστασία από προσβολές μυκήτων που ανήκουν

κυρίως στα γένη και είδη *Botrytis spp*, *Diplodia spp*, *Alternaria citri*, *Phomopsis sp*, *Diaporthe citri*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*.

- Η χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών όπως diphenylamine και ethoxyquin για περιορισμό της φυσιολογικής υποβάθμισης της ποιότητας των μήλων κατά την αποθήκευσή τους.

Στα εσπεριδοειδή η ένταση και η έκταση των συμπτωμάτων μπορεί να μειωθεί εάν περιοριστεί η απώλεια υγρασίας με κέρωμα ή τύλιγμα με πλαστικό φιλμ, καθώς και με έλεγχο των μυκήτων που προκαλούν γήρανση και σήψεις, με τη χρήση μυκητοκτόνων (Αραμπατζής & Ρεμεδιάκης, 2013). Τα μυκητοκτόνα εφαρμόζονται είτε στη γραμμή του συσκευαστηρίου και πριν την αποθήκευση στα ψυγεία, σε υγρή μορφή (διαλυμένα στο κερί ή με ειδική εγκατάσταση διαλυμένα στο νερό), είτε μέσα στα ψυγεία σε μορφή ατμού με τη χρήση ειδικών συσκευών. Το τύλιγμα κάθε καρπού ξεχωριστά με πλαστικό φιλμ μπορεί να επιμηκύνει τη ζωή, επομένως και την ποιότητα του καρπού, ελατώνοντας την απώλεια βάρους, ενώ παράλληλα συνεχίζονται οι φυσιολογικές λειτουργίες του καρπού. Τα φρούτα που πρόκειται να τυλιχθούν με πλαστικό πρέπει να έχουν υποστεί τις κατάλληλες επεμβάσεις μετασυλλεκτικά με μυκητοκτόνα, ειδάλλως τα αποτελέσματα είναι καταστρεπτικά, αφού μεταξύ της φλούδας του καρπού και του πλαστικού φιλμ δημιουργείται το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη μετασυλλεκτικών σήψεων.



Εικόνα 5: Προσβολή πορτοκαλιού από το μύκητα *Penicillium digitatum*



Εικόνα 6: Προσβολή λεμονιών από το μύκητα *Penicillium digitatum*

Στα μήλα, η πιο συνηθισμένη ασθένεια αυτών που συντηρούνται στο ψυγείο είναι το επιφανειακό έγκαυμα (superficial scald) (Εικόνα 7). Συνήθως τα μήλα κατά τη διάρκεια της ψύξης δεν παρουσιάζουν εμφανή συμπτώματα. Αυτά παρουσιάζονται όταν τα μήλα βγουν από το ψυγείο και μείνουν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 έως 5 μέρες, δηλαδή όταν μεταφέρονται για κατανάλωση. Το επιφανειακό έγκαυμα παρουσιάζεται σαν αλλοίωση του χρωματισμού της επιδερμίδας χωρίς να επηρεάζεται καθόλου η σάρκα. Ο έλεγχος του επιφανειακού εγκαύματος απαιτεί την επικάλυψη με diphenylamine (DPA) (Kgulj, 2007). Οι ποικιλίες Granny Smith και Red Delicious είναι ιδιαίτερα ευπαθείς, ιδίως όταν οι καρποί συγκομίζονται πρώιμα. Έτσι, οι καρποί που είναι πολύ ευπαθείς εμβαπτίζονται σε DPA σε συγκέντρωση 200-600 mg/L πριν αποθηκευτούν .



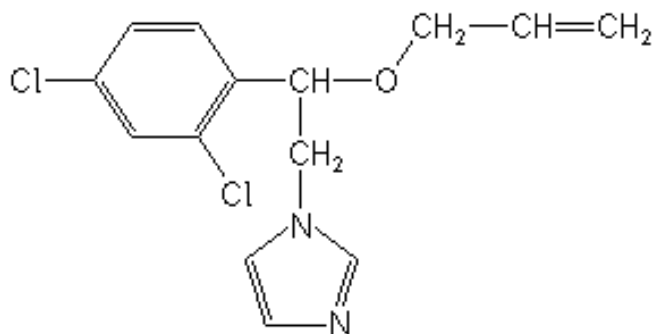
Εικόνα 7: Επιφανειακό έγκαυμα σε μήλα

1.2 ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΡΟΥΤΩΝ

1.2.1 Imazalil (IMZ)

Το imazalil (1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxy)ethyl]-1H-imidazole) (Εικόνα 8) με μοριακό βάρος 297,2 g/mol, είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προληπτική και θεραπευτική δράση, που εισήχθη στη γεωργική πράξη το 1977 με τα εμπορικά ονόματα Fungafloor®, Fungazil® και Fecundal® (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2007). Ανήκει στην ομάδα των μιδαζολικών που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση εργοστερόλης στις κυταρρικές μεμβράνες των μυκήτων. Οι στερόλες έχουν βασικό ρόλο στη δομική σταθεροποίηση των μεμβρανών. Η σύσταση των μεμβρανών είναι όμοια σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, με μερικές εξαιρέσεις, όπως στην περίπτωση των μυκήτων που αντί της χοληστερόλης έχουν εργοστερόλη. Κύτταρα μυκήτων που έχουν εκτεθεί σε μυκητοκτόνα που δρουν ως αναστολείς της εργοστερόλης, χαρακτηρίζονται γενικά από βραχείς βλαστικούς σωλήνες με μορφολογικές ανωμαλίες, όπως διογκώσεις, που συχνά οδηγούν στην εκροή κυτταροπλάσματος. Η βλάστηση των σπορίων και η αρχική ανάπτυξη των βλαστικών σωλήνων δεν επηρεάζονται ορατά. Όμως τελικά η ανάπτυξη σταματά λόγω της αποσύνθεσης και κακής λειτουργίας των κυτταροπλασματικών μεμβρανών. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μυκητοκτόνων της ομάδας αυτής είναι η παρουσία ενός κορεσμένου ή ακόρεστου πενταμελή ή εξαμελή ετεροκυκλικού δακτυλίου, ο οποίος περιέχει άζωτο και βοηθά στη δέσμευση του μυκητοκτόνου στο σημείο δράσεως.

Στα σκευάσματα που κυκλοφορούν στην αγορά περιέχεται ως ρακεμικό μείγμα των δυο εναντιομερών του. Έχει μέτρια διαλυτότητα στο νερό (182 mg/L) και για αυτό αναμειγνύεται με υγρό κερί και το μείγμα μπορεί να εφαρμοστεί μέσω ψεκασμού, διαβροχής και άλλων τεχνικών σε φρούτα κατά τη μετασυλλεκτική τους μεταχείριση.



Εικόνα 8: Χημική δομή του γεωργικού φαρμάκου imazalil

Καταπολεμά ένα ευρύ φάσμα μυκήτων που προκαλούν ασθένειες σε οπορωφόρα, λαχανικά και καλλωπιστικά, όπως για παράδειγμα ωΐδια σε αγγούρια και τριανταφυλλιά. Επίσης χρησιμοποιείται σαν προστατευτικό σπόρων στα σιτηρά και για την καταπολέμηση, μετά από εμβάπτιση, σήψεων της αποθήκης, σε καρπούς εσπεριδοειδών, μπανάνας και άλλα φρούτα. Είναι πολύ αποτελεσματικό εναντίον μυκήτων του γένους *Penicillium*, που προκαλούν σήψεις στους καρπούς και ιδιαίτερα στα εσπεριδοειδή. Επίσης, δρα αποτελεσματικά ενάντια στους μύκητες *Botrytis spp*, *Diplodia spp*, *Alternaria citri*, *Phomopsis sp*, *Diaporthe citri*, οι οποίοι αναπτύσσονται στα φρούτα κατά την αποθήκευσή τους.

Τοξικολογικά Χαρακτηριστικά: Οι ακόλουθες τιμές αναφοράς έχουν οριστικοποιηθεί για την έκθεση των εφαρμογών του imazalil στα συσκευαστήρια: ADI (Αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη) = 0,025 mg / kg σωματικού βάρους / ημέρα AOEL (Αποδεκτά επίπεδα έκθεσης χειριστών) = 0,05 mg / kg σωμ. βάρους / ημέρα (ΕΚ 2010).

Σε πειράματα τοξικότητας που πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους βρέθηκε ότι το imazalil είναι επιβλαβές σε περίπτωση εισπνοής. Δεν προκαλεί μεγάλη αντίδραση στο δέρμα, αλλά προκαλεί σοβαρό ερεθισμό των ματιών. Μετά από επαναλαμβανόμενη χορήγηση παρατηρήθηκαν επιδράσεις κυρίως στο ήπαρ (τροποποιήσεις των βιοχημικών παραμέτρων, αύξηση του βάρους του οργάνου και ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις). Επιπλέον, επηρεάζει τη δράση του κυτοχρώματος P450 και παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα και ανασταλτική δράση κατά της αρωματάσης CYP19, η οποία καταλύει τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. (Kodama et al, 2003). Σε μελέτες καρκινογένεσης, εμφανίσθηκαν όγκοι

του ήπατος σε ιδιαίτερα υψηλές δόσεις (≥ 60 mg / kg σωματικού βάρους / ημέρα), όμως η συνάφεια αυτών των μελετών για τον άνθρωπο δεν είναι σαφής. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το imazalil δεν είναι τοξικό στην αναπαραγωγή και δεν είναι τερατογόνο.

Βέβαια, τα υπολείμματα του imazalil στους καρπούς ως αποτέλεσμα της εφαρμογής του σύμφωνα με την ορθή γεωργική πρακτική δεν φαίνεται να προκαλούν αρνητικές επιδράσεις στην υγεία των ανθρώπων και ζώων. Η Διεθνής Εκτιμώμενη Ημερήσια Πρόσληψη (IEDI) είναι 4% της αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης (ADI).

Υπολειμματικότητα στα φρούτα: Σε όλες τις μελέτες, το imazalil βρέθηκε να είναι το κύριο συστατικό των υπολειμμάτων, αντιπροσωπεύοντας το 89-99% σε πορτοκάλια και μήλα (εμβάπτιση), το 80% σε ντομάτες (διαφυλλική εφαρμογή) και το 17-24% σε άχυρα (επεξεργασίας σπόρων). Το IMZ μεταβολίζεται εύκολα στο μεταβολίτη R014821 (imazalil ethanol). Εκτός από το imazalil και ο μεταβολίτης αυτός απαντάται συχνά μαζί με τη μητρική ένωση στα φρούτα που εφαρμόζεται. Συνεπώς, απαιτείται η πραγματοποίηση συχνών ελέγχων για τυχόν υπολείμματα τόσο του IMZ όσο και του μεταβολίτη R014821, για επιβεβαίωση της ασφάλειας των τροφίμων (EFSA 2010).

Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά: Σε εργαστηριακές μελέτες το imazalil εμφανίζει μέτρια έως πολύ υψηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος υπό αερόβιες συνθήκες και σκοτάδι. Η αποδόμηση του οδηγεί στον σχηματισμό του μεταβολίτη R014821 που σε ορισμένα εδάφη βρέθηκε να συσσωρεύεται στο τέλος της επώασης. Περαιτέρω μελέτες αποδόμησης έδειξαν ότι ο συγκεκριμένος μεταβολίτης παρουσιάζει χαμηλή έως μέτρια υπολειμματικότητα στο έδαφος. Το imazalil παρουσιάζει ιδιαίτερα περιορισμένη κινητικότητα στο έδαφος ενώ και ο κύριος μεταβολίτης του R014821 παρουσιάζει χαμηλή κινητικότητα στο έδαφος. Μελέτες προσρόφησης σε διάφορα εδάφη έδειξαν ότι το imazalil και ο R014821 δεν εμφανίζουν προσρόφηση εξαρτώμενη από το pH. Η πιθανότητα έκθεσης των υπόγειων υδάτων από το imazalil και το κύριο μεταβολικό προϊόν R014821 θεωρείται μικρή.

Σε έρευνα αποδόμησης των δύο εναντιομερών του imazalil μελετήθηκαν στο εργαστήριο πέντε διαφορετικές μεταχειρίσεις: έκθεση στο φως του ήλιου, σκοτάδι,

έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, αποδόμηση σε αποστειρωμένο έδαφος και αποδόμηση σε έδαφος στο οποίο είχαν φυτευτεί σπόροι σιταριού. Η ακτινοβολία, οι μικροοργανισμοί του εδάφους και η παρουσία φυτών σιταριού βοήθησαν στην αποδόμηση του imazalil. Οι χρόνοι ημιζωής του imazalil στο έδαφος στις προαναφερθέντες συνθήκες ήταν 20 (ηλιακό φως), 30.5 (σκοτάδι), 11 (UV), 27.5 (αποστειρωμένο έδαφος), και 21.5 (έδαφος με σιτάρι) ημέρες αντίστοιχα (Chu et al., 2007). Πειράματα φωτόλυσης έδειξαν ότι το imazalil διασπάται άμεσα στο νερό ύστερα από έκθεση σε UV προς παραγωγή τεσσάρων άγνωστων μεταβολικών προϊόντων.

Η πιθανότητα περιβαλλοντικής επιβάρυνσης από την μετασυλλεκτική χρήση του imazalil σε εσπεριδοειδή θεωρείται αμελητέα εάν τα υγρά απόβλητα που παράγονται από την συγκεκριμένη χρήση υποστούν κατάλληλες μεταχειρίσεις για απομάκρυνση των υπολειμμάτων του imazalil (EFSA 2010).

Οικοτοξικότητα: Ο οξύς και βραχυπρόθεσμος κίνδυνος για τα πτηνά, τα θηλαστικά, τις μέλισσες, τους γαιοσκώληκες και τους μικροοργανισμούς του εδάφους εκτιμήθηκε ως χαμηλός όταν το imazalil εφαρμόζεται σύμφωνα με την ορθή γεωργική πρακτική. Η μακροπρόθεσμη εκτίμηση κινδύνου για τα πτηνά και τα θηλαστικά για δευτερογενή δηλητηρίαση μέσω κατανάλωσης γαιοσκωλήκων και ψαριών εκτιμήθηκε ως χαμηλή. Επιπλέον, ο κίνδυνος βιοσυσσώρευσης αξιολογήθηκε ως χαμηλός. Επιπροσθέτως, θεωρείται απίθανο ότι το imazalil θα φθάσει σε αποχετευτικά συστήματα σε σημαντικά επίπεδα ώστε να έχει αντίκτυπο στις διαδικασίες επεξεργασίας νερού, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δεν παρατηρήθηκε αναστολή της βακτηριακής αναπνοής σε ενεργοποιημένη λάσπη.

Σε άλλη έρευνα, μελετήθηκε εάν στελέχη του μύκητα *Penicillium italicum* είχαν την ικανότητα να μεταβολίζουν το imazalil και αν ναι, κατά πόσο ο μεταβολισμός λειτουργεί σαν μηχανισμός ανθεκτικότητας. Μετά από παρατεταμένη επώαση ανιχνεύθηκε στο διήθημα της καλλιέργειας ο μεταβολίτης *1-[2(2,4-dichlorophenyl)-2-(2,3 dihydroxypropyloxy)ethyl]-1H-imidazole* (R42243). Έχει αναφερθεί ότι ο R42243 είναι από τους πρώτους μεταβολίτες του imazalil που σχηματίζονται σε ζώα. Το γεγονός ότι ο R42243 ανιχνεύθηκε μόνο στο μέσο επώασης και το διήθημα της καλλιέργειας δεν είχε την ικανότητα να μεταβολίσει το

imazalil, υποδηλώνει ότι το imazalil μεταβολίζεται διακυτταρικά και ότι ο μεταβολίτης εκκρίνεται στο μέσο καλλιέργειας. Ο R42243 ήταν λιγότερο τοξικός για το *P. italicum* από ότι το imazalil. Κατά συνέπεια, ο μεταβολισμός μπορεί να θεωρηθεί ως ένα στάδιο αποτοξικοποίησης. Τόσο τα άγρια στελέχη όσο και τα ανθεκτικά μεταβόλιζαν το imazalil, αλλά ο μεταβολισμός από τα ανθεκτικά στελέχη ήταν ταχύτερος από ότι από τα άγρια. Αυτό πιθανώς προκαλείται από μια σχετικά ισχυρή αναστολή της ανάπτυξης των άγριων στελεχών από το μυκητοκτόνο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αποτοξικοποίηση του imazalil δεν λειτουργεί σαν μηχανισμός ανθεκτικότητας. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι τα ανθεκτικά στελέχη παρουσίασαν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα στην μικοναζόλη και το R42243, τα οποία είχαν παρόμοια δομή με το imazalil εκτός από την προπενυλ- πλευρική αλυσίδα (Guan et al., 1992).

Νομοθεσία: Η χρήση του imazalil εγκρίθηκε για πρώτη φορά το 1979 σε έντεκα χώρες. Περιελήφθη αρχικά στο Παράρτημα I της κοινοτική οδηγίας 91/414/EEC σχετικά με τη διάθεση γεωργικών φαρμάκων στην αγορά της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Μετά την εκ νέου αξιολόγηση του, το imazalil έχει πάρει έγκριση χρήσης μέχρι 31/7/2021 στις διάφορες χώρες που παράγουν και διακινούν φρούτα όπως Ισπανία, Ιταλία, Κύπρο, Ελλάδα, Γαλλία και Πορτογαλία (ΕΚ, 2010).

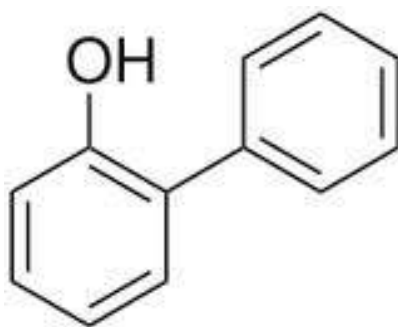
Η Ευρωπαϊκή Κοινότητα (ΕΚ 2011) αναγνωρίζοντας συγκεκριμένα προβλήματα που παρουσιάζει το imazalil, παρείχε έγκριση χρήσης για το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο υπό τις παρακάτω βασικές προϋποθέσεις:

- Να εξασφαλιστεί η εφαρμογή κατάλληλων πρακτικών διαχείρισης των αποβλήτων που απομένουν μετά την εφαρμογή, συμπεριλαμβανομένου, για παράδειγμα, του νερού καθαρισμού του συστήματος διαβροχής. Τα κράτη μέλη που επιτρέπουν την απελευθέρωση των αποβλήτων στο αποχετευτικό σύστημα θα πρέπει να εξασφαλίζουν ότι δεν υπάρχει κανένας απολύτως κίνδυνος.
- Να λαμβάνεται υπόψη ο κίνδυνος για τους υδρόβιους οργανισμούς και τους μικροοργανισμούς του εδάφους και ο μακροπρόθεσμος κίνδυνος για τα πτηνά και τα θηλαστικά που τρέφονται με σπόρους. Οι όροι έγκρισης θα πρέπει να περιλαμβάνουν μέτρα περιορισμού του κινδύνου, κατά περίπτωση.

1.2.2. Ortho-phenylphenol (OPP)

Το OPP είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μυκητοκτόνο και αποτελεί ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα γεωργικά φάρμακα στις ΗΠΑ (Balakrishnan et al., 2002). Χημικά το OPP ανήκει στην ομάδα των αρωματικών υδρογονανθράκων και έχει μοριακό βάρος 170,2 g/mol.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του μυκητοκτόνου OPP και έχουν διατυπωθεί πολλές θεωρίες, αλλά δεν φαίνονται να εξηγούν ικανοποιητικά την πρωταρχική δράση του μυκητοκτόνου. Η επικρατούσα θεωρία αναφέρει ότι το OPP και γενικά οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, στην πυρηνική μεμβράνη και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευαίσθητων μυκήτων. Έτσι, με τη δράση τους δημιουργούνται «ανοίγματα» στην πυρηνική μεμβράνη, αφήνοντας εκτεθειμένα τα χρωμοσώματα στη δράση ελεύθερων ριζών και ενζύμων (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2007).



Εικόνα 9: Χημική δομή του ortho-phenylphenol

Χρήσεις: Το OPP αξιολογήθηκε για πρώτη φορά το 1962 για το έλεγχο μετασυλλεκτικών μυκητολογικών ασθενειών σε φρούτα και λαχανικά. Δεν έχει αναφερθεί να εμφανίζεται ως φυσικό προϊόν (HSDB, 1993). Χρησιμοποιείται ως

απολυμαντικό μυκητοκτόνο σε βιομηχανικές εφαρμογές, σε καλλωπιστικά φυτά, σε βαφές, στην παραγωγή ρητινών, σε κόλλες, σε πρόσθετα σκυροδέματος, καουτσούκ καθώς και ως συντηρητικό ξύλου. Αξίζει να αναφερθεί ότι σαν απολυμαντικό χρησιμοποιείται στον καθαρισμό και την απολύμανση μηχανημάτων σε νοσοκομεία. Είναι πτητικό και παρουσιάζει περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό. Αποδομείται μέσα σε λίγες ώρες έως εβδομάδες στο περιβάλλον (U.S. EPA, 2006). Η πιο σημαντική εφαρμογή του OPP είναι ως μυκητοκτόνο σε εσπεριδοειδή και αγλάδια (Zheng et al., 2010). Δρα αποτελεσματικά ενάντια στους μύκητες *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis citri* και άλλους μύκητες. Αποτρέπει την αλλοίωση φρούτων κατά τη διάρκεια μεταφοράς και αποθήκευσής τους. Σε εσπεριδοειδή εφαρμόζεται με την τεχνική του κερώματος. Άλλες μέθοδοι εφαρμογής είναι η εμβάπτιση σε αφρό ή σε διάλυμα και ο ψεκασμός με γαλάκτωμα νερού-κεριού (Dezman et al, 1986).

Τοξικολογικά χαρακτηριστικά: Έκθεση του πληθυσμού στο OPP μπορεί να συμβεί μέσω του δέρματος, κατόπιν εισπνοής ή από το στόμα αλλά και με την πρόσληψη επεξεργασμένων τροφίμων. Το OPP ανιχνεύτηκε σε 40 από τα 60 δείγματα από συσκευασμένες μπίρες σε συγκεντρώσεις ppb (Coelhan et al., 2006). Το OPP απορροφάται αποτελεσματικά από το γαστρεντερικό σύστημα και μέσω του δέρματος, και αποβάλλεται ταχέως από το σώμα ως OPP γλυκουρονίδιο και θειικά προϊόντα σύζευξης (Bartels et al, 1998 ; Cnubben et al 2002; Timchalk et al, 1998.). Διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι το OPP δεν συσσωρεύεται στο σώμα. Ωστόσο, μικρές ποσότητες OPP έχουν μετρηθεί σε ανθρώπινο λιπώδη ιστό (Onstot και Stanley, 1989). Επαφή με τα μάτια μπορεί να προκαλέσει σοβαρό ερεθισμό και εγκαύματα. Σε μερικά άτομα μπορεί να ερεθίσει το δέρμα αν έρθει σε επαφή με αυτό.

Θεωρείται ότι είναι μετρίως τοξικό μετά από μελέτες σύντομης χορήγησης που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα. Χρόνια χορήγηση σε ζώα οδήγησε σε συστηματικές επιδράσεις, όπως απώλεια βάρους και αναιμία, αλλά δεν παρατηρήθηκε νευρολογική, αναπαραγωγική ή αναπτυξιακή τοξικότητα (Bomhard et al, 2002 ; U.S. EPA 2006). Το OPP όταν εφαρμόστηκε στο δέρμα δεν προκάλεσε καρκινογένεση σε μια διαιτητική μελέτη σε ζώα (NTP, 1986). Σε μελέτες σε ζώα όπου χορηγήθηκαν συστηματικά υψηλές δόσεις του OPP παρατηρήθηκε ο σχηματισμός καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης, οδηγώντας στην παραγωγή δύο μεταβολιτών των *ortho-phenylhydroquinone*

και *ortho-phenylbenzoquinone*. Αυτοί οι μεταβολίτες μπορεί να προκαλέσουν καρκινογένεση μέσω μη γονοτοξικής αναγεννητικής υπερπλασίας της ουροδόχου κύστης (Appel, 2000; Bomhard et al., 2002; Brusick, 2005; Kwok et al., 1999; Nakagawa et al., 1992; Smith et al., 1998; U.S. EPA 2006), ή, λιγότερο πιθανό, με πιθανούς γονοτοξικούς μηχανισμούς (Hagiwara et al., 1984; Ito et al., 1984; Murata et al., 1999; Pathak and Roy, 1993; Zhao et al., 2002).

Η IARC (International Agency for Research on Cancer) έχει κατατάξει το OPP ως μη καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Περαιτέρω πειράματα σε θηλαστικά έδειξαν ότι το OPP προκαλεί αντιδράσεις σε μάτια, δέρμα και αναπνευστικό σύστημα. Σε ποντίκια, το OPP προκάλεσε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αδενώματος του ήπατος, καρκίνο και ηπατοβλάστωμα. Λαμβάνοντας υπόψη την εμφάνιση όγκων του ήπατος σε ποντικούς και όγκους της ουροδόχου κύστης σε αρουραίους, όπου ο μηχανισμός δεν είναι γνωστός, προτάθηκε ο χαρακτηρισμός: «Υποπτο καρκινογένεσης». Η αναπαραγωγή δεν επηρεάστηκε.

Οι ακόλουθες τιμές αναφοράς έχουν οριστικοποιηθεί για την έκθεση των εφαρμογών του *ortho-phenylphenol* στα συσκευαστήρια: Η αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη [Acceptable Daily Intake (ADI)] και τα αποδεκτά επίπεδα έκθεσης των χειριστών [Acceptable Operator Exposure Level (AOEL)] είναι 0,4 mg / kg σωματικού βάρους / ημέρα (EFSA 2008).

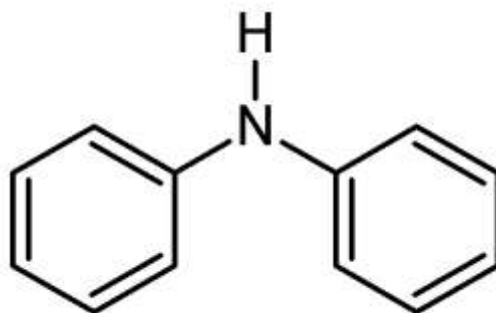
Υπολειμματικότητα στα φρούτα: Ο μεταβολισμός του OPP μελετήθηκε σε πορτοκάλια και αχλάδια που έχουν δεχθεί μετασυλλεκτική εφαρμογή. Στα πορτοκάλια, σημαντικές ποσότητες υπολειμμάτων διείσδυσαν στο φλοιό ενώ εκτός από το OPP βρέθηκε επίσης το 2-phenylhydroquinone ως κύριο μεταβολικό προϊόν. Στα αχλάδια, τα υπολείμματα διείσδυσαν μέσα στον πολτό και δεν ανιχνεύθηκε το 2-phenylhydroquinone. Η τοξικότητα του συγκεκριμένου μεταβολίτη έχει αναφερθεί παραπάνω (Appel, 2000; Bomhard et al., 2002; Brusick, 2005; Kwok et al., 1999; Nakagawa et al., 1992; Smith et al., 1998; U.S. EPA 2006). Συνεπώς αναγνωρίστηκε ότι θα πρέπει να προσδιορίζονται στα φρούτα ως «υπολείμματα» τόσο οι συγκεντρώσεις του OPP όσο και του μεταβολίτη 2-phenylhydroquinone (EFSA 2008).

Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά: Το OPP παραμένει ιδιαίτερα υπολειμματικό σε αβιοτικές συνθήκες στο περιβάλλον. Μία από τις σημαντικές οδούς αποδόμησης του OPP στην ατμόσφαιρα είναι η φωτόλυση, αν και είναι μια αργή διαδικασία, καθώς το OPP μπορεί να αξιοποιήσει μόνο ένα στενό εύρος μήκους κύματος του φωτός για την αντίδραση. Οι βασικές οδοί αποδόμησής του στο νερό είναι η φωτόλυση, η υδρόλυση και η μικροβιακή αποδόμηση. Οι τιμές του χρόνου ημιζωής (DT50) κυμαίνονται από μερικές ώρες μέχρι και εβδομάδες ανάλογα με το περιβαλλοντικό υπόστρωμα που μελετάται (λίμνες, ποτάμια με τρεχούμενα ή στάσιμα νερά). Για παράδειγμα, ο DT50 του OPP σε πλήρως οξυγονωμένο νερό και κάτω από τον ήλιο ήταν 44,3 ώρες σύμφωνα με τους Wick και Gschwend (1988). Στο έδαφος, ο χρόνος ημιζωής εκτιμήθηκε ότι κυμαίνεται μεταξύ 24-168 ωρών (Howard et al, 1991).

Οικοτοξικότητα: Το OPP θεωρείται τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς. Θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα για τον περιορισμό της έκθεσης των επιφανειακών υδροφόρων συστημάτων στο συγκεκριμένο μυκητοκτόνο. Αντίθετα, ο κίνδυνος θεωρείται χαμηλός για τα σπονδυλωτά, τις μέλισσες, τα αρθρόποδα μη στόχους, τους γαιοσκώληκες και τους οργανισμούς του εδάφους. Βρέθηκε ότι η απορρόφησή του είναι σχετικά ταχεία και σχεδόν πλήρης, με απέκκριση μέσω των κοπράνων και του ουροποιητικού συστήματος. Το περισσότερο OPP αποβάλλεται μέσα στις πρώτες 24 ώρες (87,8% στα ούρα και 2,9% στα κόπρανα).

1.2.3 Diphenylamine (DPA)

Το DPA είναι άχρωμο στερεό, ισχυρά βασικό και διαβρωτικό. Είναι εξαιρετικά δραστική ένωση, σχηματίζει πλήθος παραγώγων και παρουσιάζει φωτορυθμιστική δράση. Είναι η τρίτη ένωση στον κατάλογο ρύπων προτεραιότητας της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EE) (Drzyzga 2003). Έχει μοριακό βάρος 169,2 g/mol και χημικά ανήκει στις αρωματικές αμίνες. Ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι απόλυτα γνωστός, υποστηρίζεται όμως ότι προσφέρει αντιοξειδωτική δράση στα φυτά (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2007). Το μόριο του αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα αμινοομάδας (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Χημική δομή του Diphenylamine

Χρησιμοποιείται μετασυλλεκτικά για την αντιμετώπιση του επιφανειακού εγκαύματος των μήλων. Τα περισσότερα συσκευαστήρια φρούτων στην Αγγλία χρησιμοποιούν DPA μετασυλλεκτικά για τον έλεγχο εγκαυμάτων. Αν και αυτό είναι γενικά αποτελεσματικό, τα αποτελέσματα μιας δεδομένης εφαρμογής δεν είναι πάντοτε το ίδιο. Ένας λόγος για αυτό είναι ότι τα φρούτα ποικίλουν σημαντικά στην ευαισθησία τους στο έγκαυμα, ανάλογα με την ποικιλία, την ωριμότητα τους και τις συνθήκες καλλιέργειας. Ιδιαίτερο ρόλο παίζει η θερμοκρασία που σημειώνεται τις ημέρες πριν τη συγκομιδή. Η ποικιλία Golden Delicious είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη. Εγκαύματα μπορεί να προκληθούν και σε ορισμένες άλλες ποικιλίες. Τα μήλα στα οποία έχει εφαρμοσθεί το σκεύασμα δεν θα πρέπει να διατίθενται στην κατανάλωση πριν περάσουν δύο μήνες από την εφαρμογή. Στη συσκευασία τους θα πρέπει να αναγράφεται ότι έχουν εμβαπτισθεί σε DPA.

Σήμερα, εξακολουθεί να υπάρχει μεγάλη συζήτηση σχετικά με την αιτία της δημιουργίας εγκαύματος σε μήλα που έχουν αποθηκευτεί, αλλά οι περισσότεροι συμφωνούν ότι προκαλείται από τις χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης (chilling injury). Η γενική θεωρία είναι ότι το alpha-farnesene, ένα φυσικό πτητικό τερπένιο στα μήλα, οξειδώνεται προς συζευγμένα τριένια που οδηγούν στον τραυματισμό των κυτταρικών μεμβρανών και τελικά στον κυτταρικό θάνατο στις πιο απομακρυσμένες κυτταρικές στοιβάδες του φρούτου.

Χρήσεις: Η πιο σημαντική εφαρμογή του είναι η χρήση του για τον έλεγχο της επιφανειακής νέκρωσης (superficial scald) και καστανόχρωσης της επιδερμίδας των καρπών των μηλοειδών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους. Το DPA και τα παράγωγα του χρησιμοποιούνται ως σταθεροποιητές σε προωθητικά, στην αρωματοποιία, και ως αντιοξειδωτικά στη βιομηχανία ελαστομερών και καουτσούκ. Είναι μητρική ένωση πολλών παραγώγων, τα οποία χρησιμοποιούνται στην παραγωγή βαφών, φαρμακευτικών, χημικών των φωτογραφιών και σε περαιτέρω εφαρμογές μικρής κλίμακας. Το DPA περιγράφεται επίσης και ως φυσικά απαντούμενη ένωση σε κρεμμύδια (Karawya et al, 1984), σε φύλλα μαύρου και πράσινου τσαγιού και σε άλλα φυτά (Nose et al, 1971. Karawya et al, 1984. Wang et al, 2001) καθώς και στο φλοιό εσπεριδοειδών (Piorr και Toth 1967). Χρησιμοποιείται μόνο του ή σε μείγμα με ένα άλλο μυκητοκτόνο, το ethoxyquin, της ομάδας των κινολινών. Η εφαρμογή του γίνεται με εμβάπτιση και ψεκασμό ή διαβροχή των καρπών.

Απορρόφηση, κατανομή, απέκκριση και μεταβολισμός: Το DPA απορροφάται γρήγορα και πλήρως μετά τη χορήγηση από το στόμα. Η κατανομή του φαίνεται να είναι περιορισμένη λαμβάνοντας υπόψη τα χαμηλά επίπεδα υπολειμμάτων του που βρέθηκαν σε ιστούς. Όσον αφορά στο μεταβολισμό του, μεταβολίζεται σχεδόν πλήρως σε περισσότερες πολικές ενώσεις μέσω οξειδωτικής υδροξυλίωσης των φαινυλικών τμημάτων του δακτυλίου και την παραγωγή αρυλο-Ο-σουλφονυλ-συζυγών και Ο-και Ν-γλυκουρονυλ- συζυγών. Μετά από πρόσληψη και μεταβολισμό, η απέκκριση γίνεται μέσω των ούρων και κοπράνων (Das et al 1992). Άμεση μεταλλαξιγόνο ή καρκινογόνο δράση του DPA δεν μπόρεσε να ανιχνευθεί σε διάφορα tests του Ames με διαφορετικές καλλιέργειες του στελέχους *Salmonella typhimurium* (TA 98, TA 100, 1535, TA 1538), σε διάφορα τεστ DNA, καθώς και σε μελέτες με αρουραίους, ποντικούς και σκύλους (GDCh, 1988; Mallon et al., 1988; Das et al., 1992; Rippen, 1997).

Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά: Η διαλυτότητα της ένωσης στο νερό είναι καθοριστική για τη βιοδιαθεσιμότητα και ενδεχόμενες τοξικές επιδράσεις. Ανάλογα με τη θερμοκρασία, το DPA παρουσιάζει μέτρια προς χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (35–45 mg/l) (Meyer, 1977; Layer και Kehe, 1981; GDCh, 1988; Drzyzga, 1996;

USEPA, 1998). Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι είναι σταθερό σε υδατική υδρόλυση σε τιμές pH 5, 7 και 9 (USEPA, 1998) αλλά υφίσταται ταχεία και άμεση υδατική φωτόλυση σε συνθήκες έντονης έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία.

Η βιολογική αποδόμηση του DPA και των υποκατεστημένων διφαινυλαμινών έχει μελετηθεί ελάχιστα μέχρι σήμερα. Οι Gardner et al. (1982) μελέτησαν την αερόβια αποδόμηση του ^{14}C -DPA σε λυματολάσπη και παρατήρησαν ότι σχηματίστηκαν οι παρακάτω μεταβολίτες: 4-υδροξυ-DPA, ένα άγνωστο ισομερές, ανιλίνη και ινδόλη. Στην ίδια μελέτη καταγράφηκε ότι το 35% της αρχικής ποσότητας ^{14}C -DPA δεν διασπάστηκε 6 ώρες μετά την επώαση με λυματολάσπη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, για επιτυχή αποδόμηση του DPA σε συστήματα βιολογικού καθαρισμού απαιτείται χρόνος παραμονής μεγαλύτερος των 6 ωρών. Οι ίδιες ενώσεις ταυτοποιήθηκαν επίσης σε μελέτες σχετικά με την μικροβιακή αποδόμηση και το μεταβολισμό του DPA και παραγώγων του υπό ανοξικές συνθήκες (Drzyzga, 1996; Drzyzga et al., 1996; Drzyzga και Blotevogel, 1997).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, λίγα είναι γνωστά για τη βιοαποικοδόμηση της ένωσης, αλλά έχουν υπάρξει μελέτες, που υποδεικνύουν ότι βιοδιασπάται τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Πρόσφατα απομονώθηκαν δύο βακτηριακά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *Burkholderia* sp. και *Ralstonia* sp. (Kwanghee and Spain, 2009). Τα συγκεκριμένα στελέχη είχαν την δυνατότητα να χρησιμοποιούν το DPA ως μοναδική πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας. Κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του DPA, στοιχειομετρικές ποσότητες ανιλίνης συσσωρεύτηκαν και στη συνέχεια εξαφανίστηκαν. Γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα που καταλύουν τα αρχικά βήματα στην βιοαποικοδόμηση του DPA κλωνοποιήθηκαν από το γενωμικό DNA του *Burkholderia* sp.

Τοξικότητα: Βρέθηκε ότι το DPA δεν προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Παρόλα αυτά, όταν εργαζόμενοι ήρθαν σε επαφή με προϊόντα που περιείχαν DPA παρουσίασαν δερματικές αντιδράσεις (Raith, 1976; Bazin et al., 1986; Hemmer et al., 1997). Σε ανθρώπους που τους χορηγήθηκε αλκοολικό διάλυμα DPA παρατηρήθηκε σχηματισμός εκζέματος, υπέρταση, ταχυκαρδία και ασθένειες της ουροδόχου κύστης (GDCh, 1988). Σε μελέτη ερεθισμού των οφθαλμών σε κουνέλια, 1 από 6 τα ζώα παρουσίασαν σοβαρές και συνεχιζόμενες αντιδράσεις των ματιών και για αυτό οι

ερευνητές πρότειναν την ταξινόμηση της δραστικής ουσίας σαν Χί «ερεθιστικό» και τη φράση R41 κινδύνου "κίνδυνος σοβαρής βλάβης στα μάτια (EFSA 2008).

Παράλληλα, μελετήθηκαν τα αποτελέσματα της από του στόματος χορήγησης DPA σε πείραμα 90-ημερών σε αρουραίους και ποντικούς καθώς και οι επιδράσεις στο δέρμα κουνελιών σε πείραμα 21 ημερών. Υψηλές δόσεις DPA προκάλεσαν διάρροια, αποχρωματισμένα κόπρανα και ούρα, εμετό, αλλαγές στο ήπαρ, στους νεφρούς, στη χοληδόχο κύστη και στο θυρεοειδή αδένα. Η εφαρμογή DPA στο δέρμα δεν έχει εμφανείς ενδείξεις τοξικότητας σε κουνέλια μέχρι 1000 mg / kg σωματικού βάρους / ημέρα.

Πρέπει να αναφερθεί ότι το DPA προκαλεί τραυματισμό των ηπατικών κυττάρων σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα ήπατος αρουραίων (Masubuchi et al., 2000). Επίσης, είναι πιθανό να επιφέρει αναστολή στη σύνθεση των καρβοτενοειδών σε φωτοσυνθετικά βακτήρια (Drzyzga et al. 1996). Σε πείραμα μελέτης της τοξικότητας του DPA σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους παρατηρήθηκε αναστολή της αύξησης του σωματικού βάρους, αύξηση του βάρους του ήπατος, της σπλήνας και των νεφρών και αναιμία και στα δύο φύλα (Yoshida et al., 1989). Σίτιση για δύο χρόνια με DPA σε επίπεδα 0,5% και 1% της διαίτας τους σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους προκάλεσε περιορισμό της ανάπτυξής τους, που εν μέρει όμως οφειλόταν στη μειωμένη πρόσληψη τροφής. Η δίχρονη κατανάλωση DPA προκάλεσε βλάβες μόνο στην ουροφόρο οδό (Ribelin et al., 1967).

Η μακροπρόθεσμη τοξικότητα του DPA εξετάστηκε σε μια μελέτη διάρκειας δύο ετών σε αρουραίους και σε μια 18-μηνιαία μελέτη σε ποντίκια. Αυξημένη θνησιμότητα παρατηρήθηκε σε ποντικούς που υποβλήθηκαν σε αγωγή με 368,0 mg / kg βάρους σώματος / ημέρα και πάνω, κυρίως λόγω κυστίτιδας στα αρσενικά και αμυλοείδωσης στα θηλυκά. Παρατηρήθηκε αυξημένη βλάβη και αποβολή ερυθροκυττάρων μετά από μακροχρόνια χορήγηση, κυστίτιδα με διαστολή της ουροδόχου κύστεως σε αρσενικά και αιμοποίηση προκαλώντας συμφόρηση. Καμία ένδειξη καρκινογένεσης δεν βρέθηκε σε αρουραίους ή ποντίκια.

Μελετήθηκε ακόμη η πιθανότητα πρόκλησης γονιδιακών μεταλλάξεων και χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το DPA δεν προκαλεί μεταλλάξεις σε κανένα από τα βακτηριακά στελέχη που δοκιμάστηκαν. Μη μεταλλαξιόγonos δράση παρατηρήθηκε και σε *in vivo* τεστ μικροπυρήνων σε ποντίκια ή σε *in vivo* / *in vitro* μη προγραμματισμένη σύνθεση DNA σε ηπατοκύτταρα

αρουραίου. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν μικρή επίδραση της διφαινυλαμίνης στα χρωμοσώματα (EFSA 2008). Οι Ardito et al. (1996) αναφέρουν μια μικρή αύξηση ανταλλαγών των αδελφών χρωματίδων μετά από 48 ώρες επίδρασης του DPA σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Μια άλλη μελέτη έδειξε οξειδωτικούς τραυματισμούς του DNA μέσα στα κύτταρα του ήπατος αρουραίων εξαιτίας του DPA (Lodovici et al., 1997).

Η Αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI) για την ουσία diphenylamine είναι 0,075 mg / kg σωματικού βάρους / ημέρα βάσει μελετών (EFSA 2008).

Οικοτοξικότητα: Η διφαινυλαμίνη παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα στα πουλιά και στα θηλαστικά. Έκθεση των πτηνών και των θηλαστικών είναι απίθανο να συμβεί, όταν το DPA εφαρμόζεται σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης (EFSA 2008). Το DPA όμως παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς, όπως φαίνεται από τις τιμές $EC_{50}=4,75\text{mg/l}$ για το βακτήριο *Photobacterium phosphoreum*. Η τιμή αυτή προέκυψε μετά από 30 λεπτά έκθεσης του βακτηρίου στο DPA (Kaiser και Ribo, 1988). Η τιμή αυτή επιβεβαιώθηκε και από τους Drzyzga et al. (1995) με το *Vibrio fischeri* σαν μοντέλο-οργανισμό ($EC_{50}=5,5\text{mg/l}$). Στη Γερμανία το DPA έχει ταξινομηθεί ως οργανικός ρύπος επιπέδου 3, που σημαίνει ότι αποτελεί κίνδυνο για τα υδάτινα οικοσυστήματα (Rippen, 1997).

Νομοθεσία: Με βάση την πιο πρόσφατη αξιολόγηση της ουσίας DPA για καταχώρηση στο Παράρτημα I της κοινοτικής οδηγίας 91/414/EEC δεν ανανεώθηκε η έγκριση χρήσης του συγκεκριμένου γεωργικού φαρμάκου. Τα κύρια προβλήματα για την χρήση του DPA εντοπίστηκαν:

- στην ανεπάρκεια στοιχείων σχετικά με τα επίπεδα σχηματισμού και την τοξικότητα μεταβολιτών του DPA οι οποίοι σχηματίζονται στα φρούτα μετά την εφαρμογή του
- στον πιθανό σχηματισμό νιτροζαμινών κατά την αποθήκευση της δραστικής ουσίας και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των μήλων
- στην έλλειψη στοιχείων σχετικά με την πιθανή βλάβη ή τα προϊόντα της αντίδρασης των υπολειμμάτων diphenylamine σε επεξεργασμένα προϊόντα

Τέλος αναγνωρίστηκε η ανάγκη για επεξεργασία των αποβλήτων που παράγονται από την χρήση τους στα συσκευαστήρια φρούτων καθώς η απευθείας απόρριψη τους είτε

στο περιβάλλον είτε στα συστήματα επεξεργασία αστικών αποβλήτων είναι πιθανό να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στο περιβάλλον και στην λειτουργία των συστημάτων επεξεργασίας αστικών αποβλήτων (European Commission Health and Consumers Directorate – General December 2009). Παρόλα αυτά, σήμερα δεδομένης της παντελούς έλλειψης αποτελεσματικών εναλλακτικών για την προστασία των μηλοειδών από το καφέτιασμα ορισμένες χώρες-μέλη συμπεριλαμβανομένου και της Ελλάδας (Ισπανία, Πορτογαλία) έχουν δώσει κατά εξαίρεση έγκριση 120 ημερών για την χρήση του DPA.

1.3. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΤΗΡΙΑ

Στα συσκευαστήρια φρούτων γίνεται χρήση γεωργικών φαρμάκων προκειμένου να περιοριστεί η ποιοτική υποβάθμιση των προϊόντων αυτών κατά την αποθήκευση. Συνεπώς τα υγρά απόβλητα που προκύπτουν κατά τη μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων θα πρέπει να υποστούν κάποια επεξεργασία πριν την τελική απόρριψη τους στο περιβάλλον. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η επεξεργασία των συγκεκριμένων αποβλήτων αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την χρήση των γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή κοινοτική νομοθεσία. Παρόλα σήμερα η συνήθης πρακτική που ακολουθείται είναι η απόρριψη των συγκεκριμένων αποβλήτων στο έδαφος, σε υδάτινα οικοσυστήματα ή ακόμη και στον σύστημα επεξεργασίας των αστικών υγρών αποβλήτων. Η απευθείας απόρριψη υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων χωρίς προηγούμενη αποτοξικοποίηση αποτελεί σημαντική πηγή σημειακής ρύπανσης ιδιαίτερα για τις παραμεσόγειες χώρες όπου και παράγονται μεγάλες ποσότητες φρούτων και ιδιαίτερα εσπεριδοειδών (Εικόνα 11).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ρύπανση ποταμού στην Κόστα Ρίκα, στα νερά του οποίου ανιχνεύτηκαν υψηλές συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων imazalil και thiabendazole, τα οποία χρησιμοποιούνται σε παρακείμενα συσκευαστήρια μανάνας (Castilo et al, 2000). Σε πρόσφατες μετρήσεις από την ομάδα Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε δείγματα εδάφους από αγρούς

στους οποίους απορρίπτονταν απόβλητα από συσκευαστήρια φρούτων σε περιοχές του νομού Λαρίσης, βρέθηκαν συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου imazalil που ξεπερνούσαν τα 500mg/kg ξηρού εδάφους.



Εικόνα 11: Ρύπανση από απόρριψη αποβλήτων σε υδάτινους όγκους

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην προστασία του περιβάλλοντος και ειδικότερα στην προστασία των υπόγειων και επιφανειακών υδάτινων πόρων από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων. Η έγκριση και άδεια χρήσης των γεωργικών φαρμάκων από την ΕΕ απαιτεί τη διεξαγωγή μακροχρόνιων μελετών σε ότι αφορά την επικινδυνότητα των ουσιών αυτών στο περιβάλλον, στον άνθρωπο καθώς και στο αγροτικό οικοσύστημα γενικότερα κατά τη διάρκεια της χρήσης τους από τους γεωργούς. Η ρύπανση των υδάτινων πόρων με γεωργικά φάρμακα προκαλείται από μη σημειακές και σημειακές πηγές.

Σημειακές πηγές ρύπανσης: Έτσι χαρακτηρίζονται όλες οι πηγές που εκβάλλουν ρύπους σε εντοπισμένα σημεία. Αυτά είναι τα άκρα αγωγών, τάφρων ή αποχετευτικών δικτύων που καταλήγουν σε υδάτινους αποδέκτες. Σε αυτή την κατηγορία ταξινομούνται οι βιομηχανικές μονάδες, οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων που απομακρύνουν μέρος των ρύπων, ενεργά ή εγκαταλελειμμένα ορυχεία, πετρελαιοπηγές και τάνκερς. Επειδή βρίσκονται σε συγκεκριμένο μέρος, συνήθως σε αστικές περιοχές, είναι σχετικά εύκολος ο εντοπισμός τους και κατά συνέπεια η παρακολούθησή τους.

Μη σημειακές πηγές ρύπανσης: Είναι πηγές οι οποίες δεν είναι δυνατόν να εντοπιστούν σε κανένα ειδικό σημείο απορροής. Είναι συνήθως μεγάλες περιοχές που ρυπαίνουν το νερό με επιφανειακή απορροή, υπεδάφια ροή ή απόθεση στην ατμόσφαιρα. Τέτοιες είναι, για παράδειγμα, οι απορροές χημικών στα επιφανειακά νερά και η διαρροή τους στο έδαφος μέσα από χωράφια, υλοτομημένα δάση, ζωοτροφές, δρόμους, αποχετεύσεις κ.ά. Ο έλεγχος της ρύπανσης αυτού του τύπου είναι πολύ δυσχερής, επειδή είναι δύσκολο να εντοπιστούν οι τόσο διαφορετικές και διεσπαρμένες πηγές ρύπανσης.

Ερευνητικά δεδομένα της τελευταίας εικοσαετίας έχουν δείξει ότι περίπου 60% των ποσοτήτων των γεωργικών φαρμάκων που ανιχνεύονται στα υδροφόρα συστήματα προέρχονται από σημειακές πηγές ρύπανσης. Η ελευθέρωση ποσοτήτων γεωργικών φαρμάκων σε παρακείμενα υδατικά οικοσυστήματα ενέχει σοβαρό κίνδυνο για τη λειτουργία και τη βιοποικιλότητα των οικοσυστημάτων. Η μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων, που περιλαμβάνει την εμβάπτιση τους σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων αποτελεί σημαντική πηγή σημειακής ρύπανσης των υδάτινων πόρων με γεωργικά φάρμακα.

Βιοκλίνες: Τα τελευταία δέκα χρόνια έχουν εφαρμοστεί στην Ευρώπη (Σουηδία, Νορβηγία, Βέλγιο, Γαλλία και Αγγλία) απλά συστήματα επεξεργασίας αποβλήτων από τη γεωργική πρακτική που στοχεύουν στον περιορισμό του προβλήματος της ρύπανσης των υπόγειων υδροφόρων συστημάτων από μη ορθές γεωργικές πρακτικές. Το πρώτο σύστημα αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1990 στη Σουηδία από τον Lenard Torstensson και την ομάδα του και ονομάστηκε βιοκλίνη. Οι βιοκλίνες ουσιαστικά είναι ορύγματα στο έδαφος τα οποία πληρώνονται με οργανικά υποστρώματα που ονομάζονται βιομίγματα από έδαφος/άχυρο/τύρφη σε αναλογία κατά όγκο 25/50/25 % και στην επιφάνεια των οποίων τοποθετούνται ράγες επί των οποίων τοποθετείται ο ψεκαστήρας έτσι ώστε τα νερά από το πλύσιμο τους να καταλήγουν στην φυτοκαλυμμένη βιοκλίνη. Η αναλογία κατά όγκο άχυρο: τύρφη: έδαφος 50:25:25% συνιστάται σε βιοκλίνες πεδίου αφού εκεί υπάρχει υψηλή μικροβιακή δραστηριότητα και χαμηλό pH, συνθήκες ευνοϊκές για την αποικοδόμησης λιγνίνης (Castillo & Torstensson, 2007). Η αποτελεσματικότητά τους συνίσταται στα φυσικοχημικά και

βιολογικά χαρακτηριστικά των βιομιγμάτων που ευνοούν την προσρόφηση και μικροβιακή διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων με αποτέλεσμα μείωση του φορτίου τους κατά 95 ως 99% (Karanasios et al., 2010). Το κόστος της κατασκευής και της λειτουργίας των βιοκλινών είναι ιδιαίτερα χαμηλό.

Μέχρι σήμερα, οι βιοκλίνες έχουν χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά για την αποτοξικοποίηση αποβλήτων που παράγονται κατά τον χειρισμό των ψευδοκλαστικών μηχανημάτων στις γεωργικές εκμεταλλεύσεις. Η ερευνητική ομάδα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είναι η πρώτη που έχει προτείνει και αξιολογήσει τις βιοκλίνες για την αποτοξικοποίηση των υγρών αποβλήτων που παράγουν τα συσκευαστήρια φρούτων προωθώντας μια λύση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο στην Ελλάδα αλλά και στις υπόλοιπες παραμεσόγειες χώρες που αποτελούν σημαντικούς παραγωγούς φρούτων και ιδιαίτερα εσπεριδοειδών. Σύμφωνα με τους (Omirou, et al. 2012) οι βιοκλίνες θα μπορούσαν να είναι μία πολύτιμη λύση για την αποβολή των υγρών αποβλήτων που παράγονται πριν και μετά τη συγκομιδή από βιομηχανίες εσπεριδοειδών.

Σύστημα Control Eco Tec ® : Η εταιρεία TECNIDEX κατασκεύασε το σύστημα CONTROL ECO TEC για την επεξεργασία των αποβλήτων που προκύπτουν από τα συσκευαστήρια. Η χωρητικότητά του επιτρέπει την επεξεργασία μεγάλου όγκου αποβλήτων. Η ικανότητα του συστήματος να απομακρύνει τα γεωργικά φάρμακα από τα υγρά απόβλητα των συσκευαστηρίων στηρίζεται σε φυσικο-χημικές διεργασίες, καθίζηση, διήθηση και προσρόφηση. Το συγκεκριμένο σύστημα είναι κατοχυρωμένο με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας.

Μία παραλλαγή του συστήματος αυτού αποτελεί η πατέντα US 6,709,585 που αφορά ένα σύστημα καθαρισμού των αποβλήτων που προέρχονται από μονάδες επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών. Για τον καθαρισμό των αποβλήτων η μεταχείριση που ακολουθείται είναι η εξής: συμβατική διήθηση, ενεργός άνθρακας, βιολογική αποδόμηση. Το σύστημα αποτελείται από μία δεξαμενή, όπου συλλέγεται το υγρό. Η δεξαμενή έχει μία είσοδο αέρα για την εισαγωγή του πεπιεσμένου αέρα που αναμιγνύεται με το υγρό, βελτιώνοντας έτσι την αποδόμηση των τοξικών ουσιών του υγρού. Ανάλογα με το επίπεδο τοξικότητας του υγρού στη δεξαμενή, μεταφέρεται στα κατάλληλα υποσυστήματα απολύμανσης. Το επεξεργασμένο υγρό διέρχεται μέσα από έναν αντιδραστήρα, ο οποίος περιλαμβάνει ένα στρώμα από χώμα σε μια σειρά

από διαπερατό τσιμεντόλιθο. Το υγρό εφαρμόζεται στο άνω μέρος του στρώματος μέσω ενός δικτύου σωλήνων στάγδην άρδευσης. Ο αντιδραστήρας περιέχει μικροοργανισμούς. Το υγρό διοχετεύεται σε ένα φίλτρο ενεργού άνθρακα. Αυτό το φίλτρο μπορεί να περιλαμβάνει ένα στρώμα αλουμινίου με υπερμαγγανικό κάλιο για τα τοξικά υλικά. Η τελική φάση του συστήματος απορρύπανσης είναι μια ανοιχτή διαπερατή πισίνα, η οποία από τη μία απομακρύνει ένα σημαντικό τμήμα του νερού με εξάτμιση και επιπλέον βελτιώνει την ποιότητα του νερού με την εξάλειψη των ιχθών των φυτοφαρμάκων. Παράλληλα μπορεί να συμπεριληφθεί στο σύστημα ένα συμβατικό σύστημα οζονοποίησης για την εισαγωγή όζοντος στη δεξαμενή περιστροφής (Garcia Portillo et al. 2004).

1.4. ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Σύμφωνα με τους Hue et al. (1988) η λυματολάσπη είναι πλούσια σε άζωτο, φώσφορο, οργανική ουσία και κάποια μέταλλα. Ακόμη μπορεί να έχει βαρέα μέταλλα. Αποτελείται περίπου από 70% νερό και το υπόλοιπο είναι οργανικά και ανόργανα στερεά. Σύμφωνα με τους (Βλυσίδης 2010) είναι κύριο παραπροϊόν των διεργασιών επεξεργασίας αποβλήτων. Είναι ετερογενές υλικό, η σύσταση του οποίου ποικίλλει από πόλη σε πόλη και μάλιστα από τη μια μέρα στην άλλη στην ίδια πόλη. Η σύστασή της κατά κύριο λόγο εξαρτάται από την πυκνότητα του πληθυσμού της πόλης από την οποία προέρχεται και από τη βιομηχανική δραστηριότητα της πόλης.

Οι τέσσερις κύριες ομάδες συστατικών που περιέχονται στη λυματολάσπη είναι :

1. Θρεπτικά συστατικά των φυτών (άζωτο, φώσφορο και κάλιο)
2. Δυνητικά τοξικά βαρέα μέταλλα
3. Οργανικοί ρύποι
4. Παθογόνοι παράγοντες.

Έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα σε μελέτες αποδόμησης διάφορων γεωργικών φαρμάκων. Έτσι οι Chen και Liu (2009) μελέτησαν την αποδόμηση των εναντιομερών του metalaxyl σε υπόστρωμα λυματολάσπης υπό αναερόβιες συνθήκες. Η λυματολάσπη που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα προήλθε από τη

μονάδα επεξεργασίας λυμάτων Hangzhou. Όσον αφορά στο ρακεμικό μίγμα του metalaxyl αυτό άρχισε να αποδομείται μετά από τρεις μέρες. Αντίθετα το R-metalaxyl αποδομήθηκε με βραδύτερους ρυθμούς. Σύμφωνα με τους Fatherepure et al (1988) το εξαχλωροβενζόλιο μετατράπηκε σε τρι-χλωροβενζόλιο και δι-χλωροβενζόλιο σε υπόστρωμα λυματολάσπης υπό αναερόβιες συνθήκες. Η μετατροπή ολοκληρώθηκε σε τρεις εβδομάδες.

Οι Lallai και Mura (2009) μελέτησαν την αποδόμηση της 2-μονοχλωροφαινόλης. Η προσθήκη λυματολάσπης σε αποστειρωμένο έδαφος δεν είχε καμία επίδραση στο ρυθμό αποδόμησης της 2-μονοχλωροφαινόλης, ανεξάρτητα από την ποσότητα της ενεργοποιημένης λυματολάσπης που προστίθεται. Η λυματολάσπη που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από μονάδα επεξεργασίας λυμάτων στο Cagliari (Ιταλία). Χρησιμοποιήθηκε αερόβια λυματολάσπη γιατί είχε βρεθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι μπορεί να αποδομεί ορισμένες χλωροφαινόλες. Η προσθήκη φάνηκε να επιδρά μόνο στα αυτόχθονα εδάφη. Σε αυτή την περίπτωση, ο ρυθμός αποδόμησης από 55% περίπου σε εδάφη χωρίς προσθήκη λυματολάσπης, έφτασε το 90% περίπου σε εδάφη με προσθήκη.

Οι Lemmon και Pylyriw (1992) μελέτησαν την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων diazinon, chlorpyrifos και isofenphos σε κομμένο γρασίδι και λυματολάσπη. Τα γεωργικά αυτά φάρμακα αποδομήθηκαν και σε έξι εβδομάδες δεν ανιχνεύονταν υπολείμματα. Οι Boyd και Shelton (1984) μελέτησαν την αναερόβια αποδόμηση της μονο-χλωροφαινόλης και της δι-χλωροφαινόλης υπό αναερόβιες συνθήκες. Βρέθηκε ότι η λυματολάσπη αποδόμησε την 2,4-διχλωροφαινόλη.

Οι Baric et al (1984) απομόνωσαν βακτήρια από λυματολάσπη, η οποία προήλθε από μονάδα επεξεργασίας λυμάτων στο Luling (Louisiana, U.S.A.) τα οποία είχαν την ικανότητα διάσπασης των γεωργικών φαρμάκων malathion, gusathion και dimethoate. Οι Knoll και Winter (1987) μελέτησαν την αναερόβια αποδόμηση φαινόλων και βενζοϊκών από ομάδες μικροοργανισμών της λυματολάσπης. Η αποδόμηση της φαινόλης πραγματοποιήθηκε αργά. Η διάσπαση της φαινόλης δεν άρχισε από την πρώτη μέρα εφαρμογής της σε λυματολάσπη. Αντίθετα, η αποδόμηση του βενζοϊκού άρχισε αμέσως μετά την εφαρμογή του σε λυματολάσπη και πραγματοποιήθηκε ταχύτερα. Η λυματολάσπη που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από μείγμα επεξεργασμένης λυματολάσπης πρώτου σταδίου και δεύτερου σε αναλογία 1:1 από το Barbing (Regensburg).

Σύμφωνα με τους Gereche et al (2006) οι χημικές ενώσεις Tetrabromobisphenol A (TBBPA), hexabromocyclododecane (HBCD) και decabromodiphenyl ether (DecaBDE) αποδομήθηκαν σε υπόστρωμα λυματολάσπης υπό αναερόβιες συνθήκες. Η λυματολάσπη που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα προήλθε από μονάδα επεξεργασίας λυμάτων στο Dübendorf της Ελβετίας, η οποία εξυπηρετεί 45.00 άτομα και λειτουργεί στους 37°C.

Οι McIntyre et al (1981) μελέτησαν την αποδόμηση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε υπόστρωμα λυματολάσπης από την κοιλάδα Hogsmill με ολικά στερεά 40,5 g/l. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκαν τα εντομοκτόνα diazinon, malathion και ethyl parathion. Η συγκέντρωση του diazinon παρέμεινε σταθερή κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι συγκεντρώσεις των malathion και ethyl parathion μειώθηκαν με το πέρασμα του χρόνου. Οι Buser et al (2000) μελέτησαν την αποδόμηση του εντομοκτόνου toxaphene σε υπόστρωμα λυματολάσπης (υπό αναερόβιες συνθήκες). Το toxaphene αποτελείται από 200 περίπου ενώσεις, κάποιες εκ των οποίων είναι τα chlorobornanes και τα chlorocamphenes. Βρέθηκε ότι οι ενώσεις αυτές καθώς και ενώσεις με παρόμοια δομή αποδομήθηκαν ταχύτατα. Η αποδόμηση του toxaphene σε λυματολάσπη πραγματοποιήθηκε κατά κύριο λόγο μέσω αναγωγικής αποχλωρίωσης, οδηγώντας σε HxSed, HpSed, TC2 και άλλους ανθεκτικούς μεταβολίτες. Η λυματολάσπη που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από μονάδα επεξεργασίας αποβλήτων στο Wädenswil της Ελβετίας. Περιείχε 3% ξηρής ουσίας και φαινόταν ανεπαρκής σε θρεπτικά συστατικά.

1.5. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως προαναφέρθηκε, η μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων από τις βιομηχανίες μεταποίησης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων, τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων. Η διαχείριση αυτών των αποβλήτων αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα καθώς η πιο συχνή κατάληξή τους είναι στο έδαφος, σε υδάτινα οικοσυστήματα ή στον αστικό βιολογικό καθαρισμό με ανεξέλεγκτες συνέπειες για την λειτουργία του. Για τον λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η αποδόμηση των γεωργικών

φαρμάκων που περιέχονται στα απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων σε λυματολάσπη από το σύστημα επεξεργασίας αστικών λυμάτων της Λάρισας. Τα αποτελέσματα που θα προκύψουν μπορούν να μας δώσουν πληροφορίες τόσο για την ικανότητα της μικροβιακής κοινότητας που αναπτύσσεται στα συστήματα αστικών βιολογικών καθαρισμών να αποδομούν τέτοιου είδους ουσίες αλλά θα μας προσφέρουν και πληροφορίες για την πιθανότητα χρήσης τέτοιων υλικών σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (όπως οι βιοκλίνες ή ανάλογα συστήματα) ως ενισχυτικά της μικροβιακής αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων που περιέχονται στα απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗΣ

Συνολικά παρελήφθησαν 10kg λυματολάσπης από το βιολογικό καθαρισμό Λάρισας. Το σύνολο της ποσότητας ξηράνθηκε μερικώς για μία εβδομάδα προκειμένου να φτάσει στο 50% της υδατοχωρητικότητας της. Ακολούθησε κοσκίνισμα της λυματολάσπης με κόσκινο διαμέτρου πόρων 3mm (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Κοσκίνισμα της λυματολάσπης

Η αερόβια λάσπη που χρησιμοποιήθηκε προέκυψε ύστερα από αναερόβια χώνευση της λάσπης που συλλέχθη από τις δεξαμενής πρωτοβάθμιας καθίζησης και αναμίχθηκε στην συνέχεια με μικρότερες ποσότητες λάσπης από τις δεξαμενές δευτεροβάθμιας καθίζησης. Ειδικότερα η λάσπη που συγκεντρώνεται στις πρωτοβάθμιες καθιζήσεις οδηγείται σε παχυντή όγκου 600m³ και από εκεί στους αναερόβιους χωνευτές. Ο παχυντής αυξάνει τη συγκέντρωση των στερεών στη λάσπη. Η αναερόβια χώνευση συντελείται στη μεσόφιλη περιοχή θερμοκρασιών

(35°C) σε δύο δίδυμους χωνευτές όγκου 1.600m³ ο καθένας. Οι χωνευτές είναι αντιδραστήρες συνεχούς ροής με πλήρη ανάμειξη και εργάζονται σε περιοχή υψηλού φορτίου. Με την αναερόβια χώνευση σταθεροποιείται η λάσπη, δεν αποδίδει άσχημες οσμές, είναι αποθηκεύσιμη και μπορεί να αφυδατωθεί. Η σταθεροποίηση αυτή είναι αποτέλεσμα της μείωσης κατά 50% περίπου της οργανικής ύλης. Η αναερόβια χώνευση οδηγεί στην παραγωγή βιοαερίου που αποθηκεύεται σε αεριοφυλάκιο όγκου 300m³ και καίγεται για την παραγωγή ενέργειας.

Η χωνεμένη λάσπη συγκεντρώνεται σε δεξαμενή 400m³ και από εκεί αντλείται προς το σταθμό μηχανικής αφυδάτωσης. Προϊόν της αφυδάτωσης είναι λάσπη με ξηρά συστατικά 25 έως 30% κατά βάρος και η οποία αποτελεί άριστο λίπασμα για ορισμένες καλλιέργειες.



Εικόνα 13 : Εξαγωγή λυματολάσπης

2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗ

Αρχικά, μέρος της ποσότητας της λυματολάσπης διαχωρίστηκε σε 3 υποδείγματα και σε κάθε ένα από αυτά έγινε εφαρμογή ενός εκ των γεωργικών φαρμάκων OPP, DPA, IMZ εφαρμόζοντας κατάλληλη ποσότητα από διαλύματα συγκέντρωσης 2000 mg/L, έτσι ώστε να επιτύχουμε συγκέντρωση στη λυματολάσπη 35 mg/kg για τα IMZ και DPA και 45mg/kg για το OPP. Οι συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν επιλέχτηκαν ώστε να προσομοιάζουν τις πραγματικές συνθήκες λειτουργίας μιας βιομηχανίας επεξεργασίας φρούτων που παράγει περίπου 18m³ υγρών αποβλήτων από κάθε γεωργικό φάρμακο συγκέντρωσης 50 mg/L με εξαίρεση το μυκητοκτόνο OPP όπου παράγεται ο ίδιος όγκος αποβλήτων με συγκέντρωση 75 mg/L. Για την επεξεργασία και αποδόμηση των αποβλήτων θεωρήθηκε ότι τα απόβλητα διοχετεύονται σε μία βιοκλίνη 30m² και βάθους 1m, και με βάση την ειδική πυκνότητα των υποστρωμάτων υπολογίστηκαν οι αρχικές συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν.

Για την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων στην λυματολάσπη χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά σκευάσματα των γεωργικών φαρμάκων όπως δίδονται παρακάτω:

1. Imazalil (FUNGAZIL 50%)
2. Ortho-phenylphenol (FOAMER 12,8%)
3. Diphenylamine (NO SCALD 31,8%)

Μετά την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων στην λυματολάσπη ακολούθησε προσαρμογή της υδατοχωρητικότητας στα δείγματα της λυματολάσπης στο 50% της υδατοχωρητικότητας. Η προσαρμογή της υγρασίας πραγματοποιήθηκε με προσθήκη, υγρής μη επεξεργασμένης ενεργοποιημένης λάσπης από την αερόβια επεξεργασία των υγρών αποβλήτων του βιολογικού καθαρισμού της Λάρισας αντί νερού. Η υγρή ενεργοποιημένη λάσπη αποτελεί πλούσια πηγή ιδιαίτερα ενεργών καταβολικά μικροοργανισμών. Έτσι με την προσθήκη αυτή είχαμε ως στόχο να εμπλουτίσουμε την επεξεργασμένη λυματολάσπη με μικροοργανισμούς που είναι προσαρμοσμένοι σε υψηλούς μεταβολικούς ρυθμούς ώστε να επιταχύνουμε την ταχύτερη αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων. Αφού τα δείγματα αναμίχθηκαν

ενδεδειγμένα με τα χέρια στην συνέχεια το κάθε δείγμα λυματολάσπης με το γεωργικό φάρμακο χωρίστηκε σε υπο-δείγματα των 20 g και τοποθετήθηκε σε μικρά πλαστικά σακουλάκια με τρεις επαναλήψεις για κάθε χρόνο. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία 25°C. Σε χρόνους 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21, 42 και 56 ημέρες μετά την εφαρμογή των OPP και DPA τρεις επαναλήψεις από κάθε μεταχείριση απομακρύνονταν από τον επωαστικό θάλαμο και αποθηκεύονταν στη κατάψυξη μέχρι να αναλυθούν σε σύστημα HPLC-UV. Παράλληλα, για το γεωργικό φάρμακο IMZ οι χρόνοι δειγματοληψίας ήταν 0, 7, 14, 21, 42, 56, 70 και 100 ημέρες μετά την εφαρμογή του και τρεις επαναλήψεις από κάθε μεταχείριση απομακρύνθηκαν από τον επωαστικό θάλαμο και αποθηκεύτηκαν στη κατάψυξη μέχρι να αναλυθούν σε σύστημα HPLC-UV.

2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗΣ

Για την ανάλυση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της λυματολάσπης μετρήθηκε το ολικό άζωτο, ο ολικός άνθρακας, ο ολικός φώσφορος και το pH αυτής. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Π.Ε.Γ.Ε.Α.Λ Κεντρικής Ελλάδος (Λάρισα) από το διδακτορικό φοιτητή Παναγιώτη Καρά. Η μέτρηση του ολικού αζώτου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kjeldahl, του ολικού άνθρακα με υγρή πέψη με πυκνό θειικό οξύ και του ολικού φωσφόρου με τη μέθοδο των Sposito et. al, (1982). Η μέτρηση του pH έγινε σε αναλογία 1:5 λυματολάσπης – απιονισμένου νερού. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δείγμα λυματολάσπης πριν την προσθήκη της αερόβιας φάσης και μετά την προσθήκη αερόβιας φάσης. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 2.1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της λυματολάσπης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη πριν (I) και μετά (II) την ανάμιξη με ενεργοποιημένη λάσπη από την δευτεροβάθμια αερόβια επεξεργασία.

	Ολικός P (mg/kg ξηρού βάρους)	Ολικός C (% ξηρό βάρος)	Ολικό N (% ξηρό βάρος)	pH
Δείγμα I	11,56	10,2%	2,11	7,4
Δείγμα II	14,25	11,5%	3,08	7,3

2.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗΣ

2.4.1 Εκτίμηση υγρασίας λυματολάσπης

Για να μετρήσουμε το ξηρό βάρος της λυματολάσπης, αρχικά ζυγίζουμε 10g λυματολάσπης (3 επαναλήψεις) και τα τοποθετούμε σε προζυγισμένα αλουμινόχαρτα. Τοποθετούμε τα αλουμινόχαρτα στους 100°C για 16 ώρες στο ξηραντήριο. Ξαναζυγίζουμε και παίρνουμε τον μέσο όρο των μετρήσεων. Η υγρασία του εδάφους προσδιορίζεται με βάση τον τύπο:

$$MC = [(W_1 - W_2) \times 100\%] / (W_1 - W_{cont})$$

Όπου:

MC: η υγρασία του εδάφους

W₁: το βάρος του δοχείου με τη λυματολάσπη πριν την ξήρανση

W₂: το βάρος του δοχείου με τη λυματολάσπη μετά την ξήρανση

W_{cont}: το βάρος του δοχείου

2.4.2. Εκτίμηση της υδατοχωρητικότητας της λυματολάσπης

Για τον προσδιορισμό της υδατοχωρητικότητας του δείγματος λυματολάσπης που μελετάμε, αρχικά ζυγίζουμε ορισμένη ποσότητα λυματολάσπης και την τοποθετούμε σε χωνί με διηθητικό χαρτί, του οποίου το βάρος έχει καταγραφεί. Το χωνί τοποθετείται πάνω σε κωνική φιάλη. Στη συνέχεια, η λυματολάσπη διαβρέχεται με νερό μέχρι να εξασφαλισθεί ο κορεσμός και καλύπτεται η επιφάνεια της κωνικής φιάλης για αποφυγή τυχόν απώλειας νερού από την εξάτμιση. Η λυματολάσπη παραμένει για να στραγγίσει η περίσσεια ύδατος για περίπου 16 ώρες και κατόπιν ξαναζυγίζουμε τη λυματολάσπη με το χωνί και το διηθητικό χαρτί (Εικόνα 14). Η υδατοχωρητικότητα του δείγματος υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{WHC} = [(B-X) + (W_2-W_1)/X] \times 100\%$$

Όπου:

WHC: η υδατοχωρητικότητα της λυματολάσπης

B: το βάρος της λυματολάσπης που προστέθηκε στο χαρτί

X: το ξηρό βάρος της λυματολάσπης

W₁: το βάρος του χωνιού με τη λυματολάσπη και το διηθητικό χαρτί πριν εμποτιστεί με νερό

W₂: το βάρος του χωνιού με τη λυματολάσπη και το διηθητικό χαρτί μετά τον εμποτισμό και τη στράγγιση



Εικόνα 14: Προσδιορισμός υδατοχωρητικότητας της λυματολάσπης

2.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗΣ

2.5.1. Μέθοδος εκχύλισης

Για τα DPA και OPP ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος εκχύλισης. Έτσι, σε 10g λυματολάσπης προστέθηκαν 25 ml ακετονιτρίλιο και ακολούθησε ανάδευση (200 rpm) για 1.5 h σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε (7500 rpm, 5 min) και το καθαρό υπερκείμενο αφού διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι να αναλυθεί σε σύστημα HPLC-UV.

Για το IMZ η μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η εξής: 5g αναμίχθηκαν με 10 ml μεθανόλης και 1 ml διαλύματος NaOH (1N συγκέντρωσης) και ακολούθησε ανάδευση για 30 min. Το υπερκείμενο εκχύλισμα παραλήφθηκε σε πλαστικό φιαλίδιο και στη συνέχεια προστέθηκαν άλλα 10 ml μεθανόλης στο υπόστρωμα και ακολούθησε ανάδευση για ακόμα 30 min. Τέλος, το υπερκείμενο ενώθηκε με το προηγούμενο, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε (7500 rpm, 10 min) και το καθαρό υπερκείμενο αφού διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι να αναλυθεί σε σύστημα HPLC-UV.

Για όλα τα γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (0.5, 5 και 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εκχύλισης και παραλαβής των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων από τα δείγματα λυματολάσπης. Τα επίπεδα ανάκτησης για όλα τα γεωργικά φάρμακα και σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης ήταν > 80%.

2.5.2 Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης

Για την ανάλυση και προσδιορισμό των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σύστημα HPLC Marathon III, που ήταν εξοπλισμένο με σύστημα αντλιών με βαθμιδωτή έκλυση, όγκο έγχυσης 20 μl , ανιχνευτή UV ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό Clarify® για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Ο διαχωρισμός των διαφόρων γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης (RP) C18, Nucleosil (150 x 4.6mm, 5 μm id) (Macherey – Nagel GmbH, Germany) με διάφορες κινητές φάσεις που περιγράφονται παρακάτω και ροή 1 ml min^{-1} .

Imazalil: Για τον προσδιορισμό του μυκητοκτόνου imazalil χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική έκλυση με κινητή φάση μεθανόλη (80%) + υδατικό διάλυμα NH_3 0.25% (20%). Η ανίχνευση του imazalil πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 204 nm και ο χρόνος κατακράτησης του ήταν 3,2 min.

Ortho-phenylphenol: Για τον προσδιορισμό του μυκητοκτόνου OPP πραγματοποιήθηκε έκλυση ισοκρατικά με κινητή φάση ακετονιτρίλιο (49%) + νερό (50.5%) + αμμωνία 25% (0.5%). Η ανίχνευση του OPP πραγματοποιήθηκε στα 254 nm και ο χρόνος κατακράτησης ήταν 3,4 min.

Diphenylamine: Η έκλυση του DPA έγινε ισοκρατικά με κινητή φάση ακετονιτρίλιο (60%) + νερό (30 + μεθανόλη (10%) και η ανίχνευση του πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 210 nm και ο χρόνος κατακράτησης του ήταν 3,5 min.

2.5.3. Καμπύλες αναφοράς

Ο ποσοτικός προσδιορισμός όλων των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον λόγο αυτό αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ για όλα τα γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν σε μεθανόλη. Ακολούθως παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 10, 5, 2, 1, 0.5 και $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ σε μεθανόλη με διαδοχικές αραιώσεις και έγινε έγχυση 20 μl από καθένα από τα πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC. Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών τους με την βοήθεια του λογισμικού Clarity®.

2.6 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα δεδομένα αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων στο χρόνο προσαρμόστηκαν σε δύο μοντέλα κινητικής, το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (First Order Kinetics, FOK) και το διαφασικό μοντέλο Hockey Stick για τον υπολογισμό του χρόνου ημιζωής και του ρυθμού διάσπασης των imazalil, OPP και DPA. Η επιτυχής προσαρμογή των δεδομένων στο μοντέλο κινητικής αξιολογήθηκε μέσω υπολογισμού του συντελεστή χ^2 (%) σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\chi^2 = \frac{\sum (C - O)^2}{(err/100)^2} \quad (1)$$

Όπου:

C = υπολογιζόμενη τιμή,

O = πειραματική τιμή,

\bar{O} = μέσος όρος πειραματικών τιμών

err = σφάλμα.

Ο συντελεστής χ^2 αποτελεί μέτρο της ακρίβειας με την οποία το μοντέλο κινητικής περιγράφει τα πειραματικά δεδομένα και θεωρείται ότι τιμές $< 15\%$ υποδηλώνουν χαμηλή συμφωνία μεταξύ μοντέλου και πειραματικών δεδομένων

2.6.1. Μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης

Το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (2)$$

Όπου:

C: η συνολική ποσότητα της χημικής ουσίας στο χρόνο t

C₀: η συνολική ποσότητα της χημικής ουσίας στο χρόνο t=0

k: ρυθμός αποδόμησης

Σύμφωνα με την εξίσωση (2) ο χρόνος DT₅₀, δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για αποδόμηση του 50% της αρχικής ποσότητας της υπό μελέτη ουσίας υπολογίζεται από την εξίσωση (3)

$$DT_{50} = \frac{\ln 2}{k} \quad (3)$$

Η εξίσωση κινητικής πρώτης τάξης είναι μια απλή εκθετική εξίσωση με μόνο δύο παραμέτρους (C₀, k). Προϋποθέτει ότι ο αριθμός μορίων των γεωργικών φαρμάκων είναι μικρός συγκριτικά με τον αριθμό των μικροοργανισμών και των ενζύμων τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο ρυθμός της μεταβολής της συγκέντρωσης του γεωργικού φαρμάκου (dC/dt) να είναι σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο ευθέως ανάλογος της πραγματικής συγκέντρωσης του γεωργικού φαρμάκου που απομένει στο σύστημα. Ο χρόνος για τη μείωση της συγκέντρωσης κατά ένα ορισμένο ποσοστό είναι σταθερός κατά τη διάρκεια του πειράματος και ανεξάρτητος από την αρχική συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου.

2.6.2. Μοντέλο κινητικής Hockey-stick

Το μοντέλο κινητικής Hockey-Stick χρησιμοποιείται στις περισσότερες περιπτώσεις ως εναλλακτικό του FOK όταν το τελευταίο δεν μπορεί να περιγράψει με ακρίβεια την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων στο χρόνο (FOCUS 2006). Το συγκεκριμένο μοντέλο κινητικής είναι διφασικό και αποτελείται από δύο διαδοχικές καμπύλες πρώτης τάξης όπως περιγράφονται στις εξισώσεις (4) και (5):

$$\text{για } t \leq t_b \text{ είναι: } C = C_0 * e^{-k_1 t} \quad (4)$$

$$\text{για } t > t_b \text{ είναι: } C = C_0 * e^{-k_1 t_b} * e^{-k_2 (t - t_b)} \quad (5)$$

Όπου:

C: η συγκέντρωση της ουσίας στο χρόνο t

C₀: η συγκέντρωση της ουσίας που εφαρμόζεται στο χρόνο t=0

k₁: ρυθμός διάσπασης για χρόνο t < t_b

k₂: ρυθμός διάσπασης για χρόνο t > t_b

t_b: το χρονικό σημείο στο οποίο μεταβάλλεται ο ρυθμός διάσπασης από k₁ σε k₂.

Η συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου κατά την αρχική φάση μειώνεται με ρυθμό k₁ σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής FOK. Σε ένα ορισμένο χρονικό σημείο (που αναφέρεται ως breakpoint), ο ρυθμός διάσπασης του γεωργικού φαρμάκου μεταβάλλεται σε k₂. Για τα τυπικά διφασικά μοντέλα, ο συντελεστής k₁ είναι συνήθως μεγαλύτερος του k₂. Το συγκεκριμένο διφασικό πρότυπο αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων αποδίδεται σε μια αρχική ταχεία φάση αποδόμησης της άμεσα διαθέσιμης ποσότητας του γεωργικού φαρμάκου που βρίσκεται διαλυμένη στο εδαφικό διάλυμα ακολουθούμενη από μια σημαντικά βραδύτερη φάση αποδόμησης όπου αποδομούνται με βραδείς ρυθμούς οι ποσότητες του γεωργικού φαρμάκου που είναι λιγότερο διαθέσιμες προς μικροβιακή ή χημική αποδόμηση (Scow 1993). Εναλλακτικά η βραδύτερη δεύτερη φάση αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων μπορεί να αποδοθεί σύμφωνα με τον Anderson (1987) λόγω της περιορισμένης

διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών και πηγών άνθρακα υπό εργαστηριακές συνθήκες. Ο υπολογισμός του DT50 για το συγκεκριμένο διφασικό μοντέλο κινητικής πραγματοποιείται με την χρήση των εξισώσεων (6) και (7) ανάλογα με το αν το DT50 παρουσιάζει τιμή $>$ ή $<$ του t_b .

$$\text{Για } DT_x \leq t_b \text{ είναι: } DT_x = \frac{\ln \frac{100}{100-x}}{k_1} \quad (6)$$

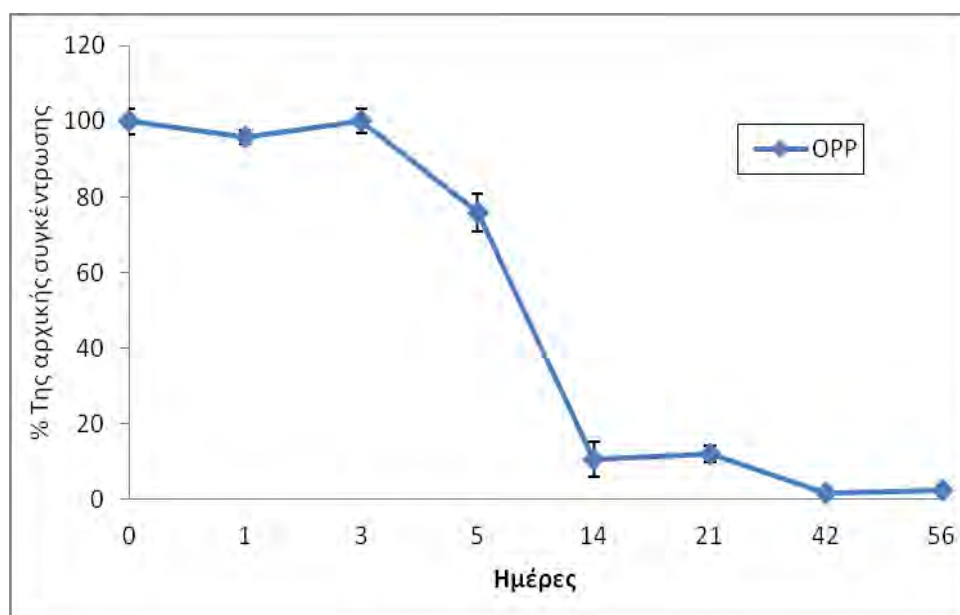
$$\text{Για } DT_x > t_b \text{ είναι: } DT_x = t_b + \frac{[\ln \frac{100}{100-x} - k_1 * t_b]}{k_2} \quad (7)$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ OPP ΣΤΗ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗ

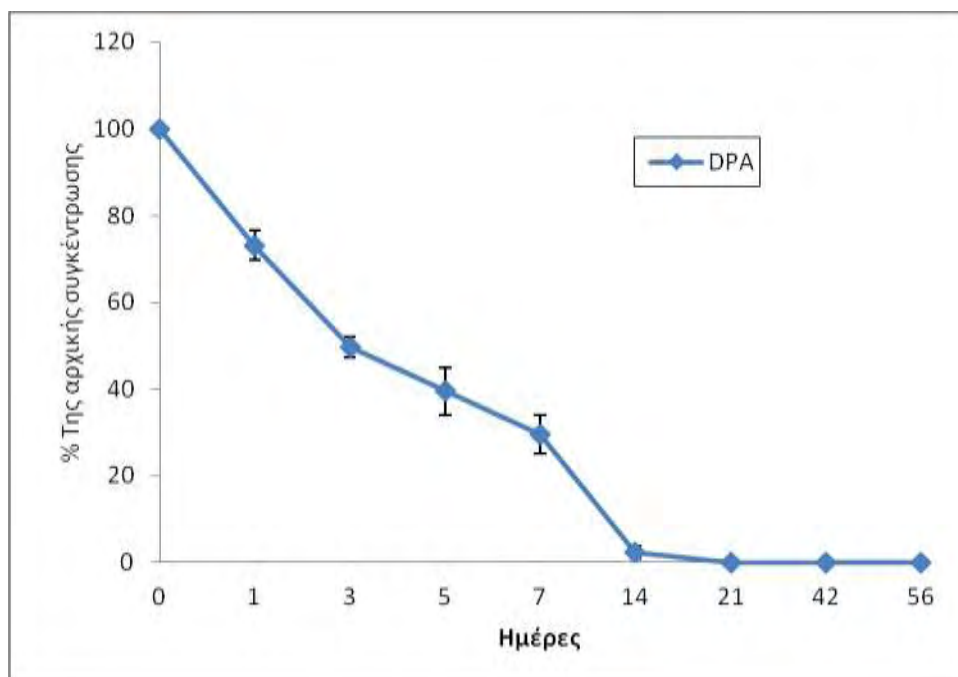
Γενικότερα παρατηρήθηκε μια ταχεία αποδόμηση του μυκητοκτόνου OPP στην εμπλουτισμένη λυματολάσπη που περιγράφεται από μια σχετικά βραδεία αποδόμηση κατά τις πρώτες 5 ημέρες και μια φάση ταχύτατης μείωσης της συγκέντρωσης του από τις 5 ημέρες και ύστερα. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου η αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου έφτασε στο 98% της αρχικής συγκέντρωσης που εφαρμόστηκε (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Η αποδόμηση του ortho-phenylphenol σε υπόστρωμα λυματολάσπης που είχε εμπλουτιστεί με ενεργοποιημένη λάσπη από την αερόβια δευτεροβάθμια επεξεργασία των αστικών αποβλήτων του βιολογικού καθαρισμού της Λάρισας. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

3.2 ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ DPA ΣΤΗ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗ

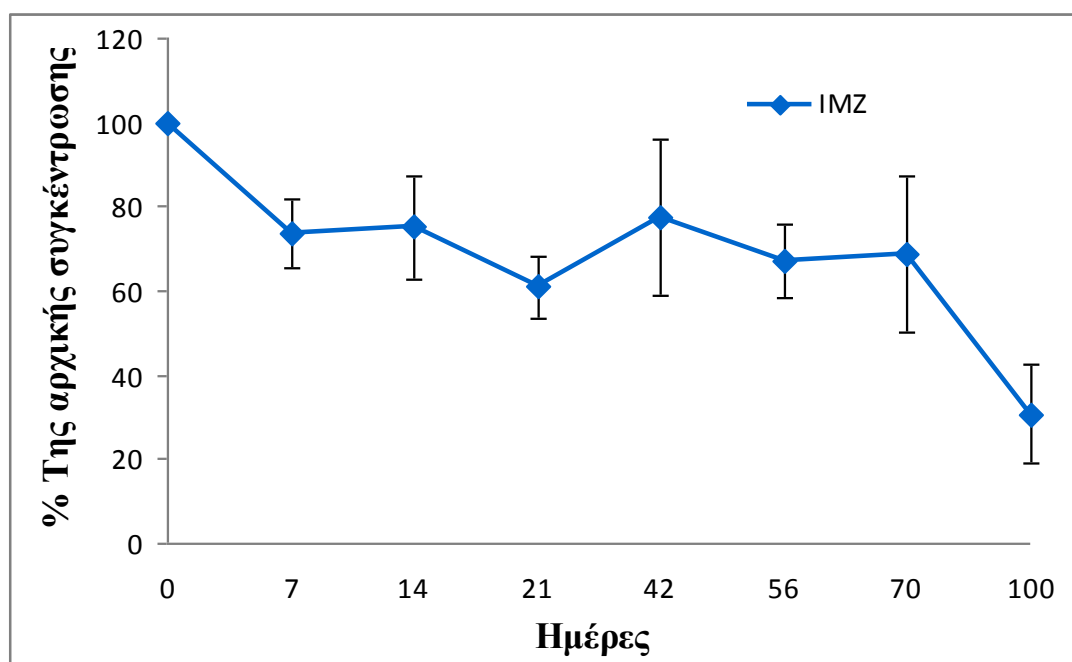
Το DPA αποδομήθηκε με ταχείς ρυθμούς κατά την πρώτες 14 ημέρες αμέσως μετά την εφαρμογή του στην λυματολάσπη με αποδόμηση του 98% της αρχικής συγκέντρωσης που εφαρμόστηκε στο διάστημα αυτό ενώ από τις 21 ημέρες και μετά δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα του DPA στην λυματολάσπη (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Η αποδόμηση του diphenylamine σε υπόστρωμα λυματολάσπης που είχε εμπλουτιστεί με ενεργοποιημένη λάσπη από την αερόβια δευτεροβάθμια επεξεργασία των αστικών αποβλήτων του βιολογικού καθαρισμού της Λάρισας. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

3.3 ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΙΜΑΖΑΛΙΛ ΣΤΗ ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗ

Το imazalil αποδομήθηκε καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος με βραδείς ρυθμούς συγκριτικά με τα άλλα δύο γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν. Έτσι κατά τις πρώτες 70 ημέρες μετά την εφαρμογή του imazalil παρατηρήθηκε διάσπαση μόνο του 30% της αρχικής ποσότητας του μυκητοκτόνου που με την ολοκλήρωση του πειράματος έφτασε στο 70% της αρχικής ποσότητας του γεωργικού φαρμάκου που εφαρμόστηκε (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3: Η αποδόμηση του imazalil σε υπόστρωμα λυματολάσπης που είχε εμπλουτιστεί με ενεργοποιημένη λάσπη από την αερόβια δευτεροβάθμια επεξεργασία των αστικών αποβλήτων του βιολογικού καθαρισμού της Λάρισας. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

3.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΧΡΟΝΟΥ ΗΜΙΖΩΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ

Αρχικά έγινε η εκτίμηση και ο υπολογισμός των χρόνων ημιζωής των γεωργικών φαρμάκων με τη βοήθεια του μοντέλου κινητικής πρώτης τάξης. Ενώ παράλληλα, υπολογίστηκε το χ^2 τεστ ως μέτρο του κατά πόσο το μοντέλο κινητικής περιγράφει αποτελεσματικά την αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου. Για τα γεωργικά φάρμακα IMZ και DPA το μοντέλο FOK περιέγραψε με ακρίβεια το πρότυπο αποδόμησης τους στο χρόνο καθώς οι τιμές του συντελεστή $\chi^2 < 15$. Έτσι για τα IMZ και DPA οι τιμές DT50 στη εμπλουτισμένη λυματολάσπη ήταν 115.5 και 3.6 ημέρες αντίστοιχα (Πίνακας 3.1). Αντίθετα για το μυκητοκτόνο OPP το πρότυπο αποδόμησης του στον χρόνο δεν περιγράφηκε με ακρίβεια από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης όπως αποδεικνύεται από τις τιμές χ^2 που ήταν οριακά > 15 . Ενδεικτικά όμως υπολογίστηκε η τιμή DT50 για το OPP στην εμπλουτισμένη λυματολάσπη και ήταν 7.0 ημέρες.

Πίνακας 3.1: Οι τιμές των παραμέτρων που περιγράφουν την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων OPP, IMZ, DPA σε εμπλουτισμένη λυματολάσπη όπως υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης.

Παράμετροι	OPP	IMZ	DPA
DT50 (ημέρες)	7,0	115,5	3,6
k (d ⁻¹)	0,099	0,006	0,194
r ²	0,906	0,455	0,985
χ^2 (%)	16,2	13,4	8,9

Ακολούθως τα δεδομένα αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων στην εμπλουτισμένη λυματολάσπη χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του χρόνου ημιζωής με το διφασικό μοντέλο κινητικής Hockey-Stick (HS). Αυτό κατέστη απαραίτητο ιδιαίτερα για το OPP όπου το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης απέτυχε οριακά να περιγράψει με ακρίβεια την κινητική αποδόμησης του στην εμπλουτισμένη λυματολάσπη. Παρόλο αυτά και το μοντέλο HS δεν κατάφερε να περιγράψει με επαρκή ακρίβεια το

πρότυπο αποδόμησης του OPP στο χρόνο καθώς η τιμή του συντελεστή χ^2 ήταν 18.6. Παρόλα αυτά ο χρόνος DT50 για το OPP όπως υπολογίστηκε με βάση το μοντέλο κινητικής HS ήταν 7 ημέρες, ίδιος με την τιμή που εκτιμήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο κινητικής FOK. Το HS χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την περιγραφή της αποδόμησης των DPA και IMZ στο χρόνο με τιμές DT50 3,6 και 94,1 ημέρες αντίστοιχα.

Πίνακας 3.2: Οι τιμές των παραμέτρων που περιγράφουν την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων OPP, IMZ, DPA σε εμπλουτισμένη λυματολάσπη όπως υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης

Παράμετροι	OPP	IMZ	DPA
DT50 (ημέρες)	7,0	94,1	3,6
k_1 (d^{-1})	0,099	0,049	0,194
k_2 (d^{-1})	0,047	0,005	0,009
t_b (ημέρες)	43,6	5,1	57,0
r^2	0,906	0,532	0,982
χ^2 (%)	18,6	13,4	10,0

Συνολικά, και τα δύο μοντέλα κινητικής επιβεβαίωσαν ότι το IMZ αποτέλεσε το περισσότερο υπολειμματικό γεωργικό φάρμακο σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δύο γεωργικά φάρμακα, DPA και OPP, που αποδομήθηκαν ταχύτατα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα υγρά απόβλητα που παράγονται κατά τη μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων περιέχουν υψηλό φορτίο γεωργικών φαρμάκων και η απευθείας απόρριψή τους στα υδάτινα οικοσυστήματα χωρίς καμία επεξεργασία αποτελεί σημαντική πηγή ρύπανσης. Μέχρι σήμερα, αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων σε διάφορα υποστρώματα. Η αποδόμηση αυτών των γεωργικών φαρμάκων, όμως, δεν μπορεί να προβλεφθεί πάντα με ακρίβεια. Κάποια υποστρώματα είναι περισσότερο και κάποια λιγότερο κατάλληλα. Κάποια είναι περισσότερο και κάποια λιγότερο οικονομικά συμφέροντα. Η λυματολάσπη είναι ένα υπόστρωμα που δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η αποδόμηση των φαρμάκων imazalil, ortho-phenylphenol και dihydrophenylamine σε υπόστρωμα λυματολάσπης που προέκυψε ύστερα από αναερόβια χώνευση της λάσπης από τις πρωτοβάθμιες δεξαμενές καθίζησης του συστήματος επεξεργασίας υγρών αστικών αποβλήτων της Λάρισας. Στην παρούσα εργασία η λυματολάσπη που χρησιμοποιήθηκε είχε εμπλουτιστεί στο εργαστήριο με υγρή ενεργοποιημένη λάσπη από την αερόβια επεξεργασία των υγρών αστικών αποβλήτων της Λάρισας.

Όπως προέκυψε από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, το μυκητοκτόνο imazalil παρουσίασε ιδιαίτερα υψηλή υπολειμματικότητα με τιμές DT50 από 94,1 ως 115,5 ημέρες όπως υπολογίστηκαν από τα μοντέλα κινητικής FOK και HS αντίστοιχα. Ακολούθησε το μυκητοκτόνο OPP με χρόνους DT50 7 ημέρες ενώ την χαμηλότερη υπολειμματικότητα την παρουσίασε το DPA με χρόνο DT50 = 3.6 ημέρες. Προηγούμενες μελέτες υπολειμματικότητας των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων σε λυματολάσπη δεν είναι διαθέσιμες παρά μόνο κάποιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε έδαφος ή σε άλλα οργανικά υποστρώματα και τα αποτελέσματά μας φαίνονται σύμφωνα με αυτές τις μελέτες. Έτσι οι Omirou et al. (2012) ανέφεραν τιμές DT50 = 28,6 ημέρες για το IMZ στο έδαφος ενώ στην ίδια μελέτη οι τιμές DT50 για το ίδιο μυκητοκτόνο σε οργανικά υποστρώματα βιοκλινών κυμάνθηκαν

από 15,5 ως 48 ημέρες. Προηγούμενες μελέτες σε διάφορα εδάφη στις Η.Π.Α. έδειξαν τιμές DT50 για το IMZ μεταξύ 44 και 128 ημερών (USEPA 2003). Αντίστοιχες μελέτες στην Ευρώπη έδειξαν ιδιαίτερα υψηλή υπολειμματικότητα για το IMZ με DT50 >300 ημέρες (EC 2009). Παρόμοιες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του κ. Παναγιώτη Καρά και δεν έχουν δημοσιευτεί ακόμη έδειξαν τιμές DT50 για το IMZ από 79 ημέρες στο έδαφος ως 24.2 ημέρες σε μίγμα εδάφους με εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών σε ογκομετρική αναλογία 50:50.

Παρόμοια εικόνα υπάρχει και για το μυκητοκτόνο OPP που παρουσίασε γενικά χαμηλή υπολειμματικότητα στην λυματολάσπη με χρόνους ημιζωής από 7 ως 9.4 ημέρες ανάλογα με το μοντέλο κινητικής που χρησιμοποιήθηκε. Σε παρόμοιες μελέτες στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του κ. Παναγιώτη Καρά που δεν έχουν δημοσιευτεί ακόμη έδειξαν τιμές DT50 < 2 ημέρες σε έδαφος και λοιπά οργανικά υποστρώματα. Αντίστοιχα, οι Omirou et al. (2012) παρατήρησαν τιμές DT50 σε έδαφος και οργανικά υλικά από 43.3 ως 4.9 ημέρες αντίστοιχα.

Τέλος το DPA εμφάνισε την χαμηλότερη υπολειμματικότητα στην λυματολάσπη με τιμή DT50 = 3.6 ημέρες ανεξάρτητα από το μοντέλο κινητικής που χρησιμοποιήθηκε. Η ταχύτατη αποδόμηση του DPA στην λυματολάσπη είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες σε άλλα οργανικά υλικά και έδαφος όπου το DPA παρουσίασε τιμές DT50 = 1.7-1.9 ημέρες (Ph.D. Π. Καράς).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η υψηλότερη υπολειμματικότητα του IMZ σε σχέση με τα OPP και DPA που παρουσιάζεται ως γενικότερη εικόνα σε προηγούμενες μελέτες σε έδαφος και άλλα οργανικά υλικά επιβεβαιώνεται και στην λυματολάσπη. Συγκρινόμενα με προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε οργανικά υλικά που χρησιμοποιούνται σε συστήματα βιοκλινών η λυματολάσπη ακόμη και εμπλουτισμένη με ενεργοποιημένη λάσπη από τον βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας δεν φαίνεται να παρουσιάζει αυξημένη ικανότητα αποδόμησης του ιδιαίτερα υπολειμματικού μυκητοκτόνου IMZ. Αντίθετα παρουσιάζει μια ικανοποιητική αποδομητική ικανότητα έναντι των δύο άλλων γεωργικών φαρμάκων που μελετήθηκαν.

Συνολικά τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η λυματολάσπη από τα συστήματα επεξεργασίας υγρών αστικών αποβλήτων παρουσιάζει ικανοποιητική ικανότητα αποδόμησης των OPP και DPA ενώ αντίθετα δεν φαίνεται να επιταχύνει

την αποδόμηση του IMZ. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην αξιολόγηση της αποδόμησης των παραπάνω γεωργικών φαρμάκων σε έδαφος εμπλουτισμένο με λυματολάσπη καθώς και σε λυματολάσπη μη εμπλουτισμένη με ενεργοποιημένη λάσπη από την αερόβια επεξεργασία των υγρών αστικών αποβλήτων ώστε να πάρουμε μια πληρέστερη εικόνα για την πιθανότητα χρήσης της λυματολάσπης σε μίγματα με έδαφος ή άλλα οργανικά υλικά για την ταχεία αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διεθνής:

- Appel KE. The carcinogenicity of the biocide *ortho*-phenylphenol. Arch Toxicol 2000.
- Balakrishnan S, Uppala P.T, Rupa D.S, Hasegawa L., Eastmond D.A. Detection of micronuclei, cell proliferation and hyperdiploidy in bladder epithelial cells of rats treated with o-phenylphenol. 2002
- Barik S, Munnecke DM, Fletcher JS. Bacterial degradation of three dithioate pesticides. 1984
- Bartels M.J, Brzak K.A, Bormett G.A. Determination of *ortho*-phenylphenol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997.
- Bartels M.J, McNett D.A, Timchalk C, Mendrala A.L, Christenson W.R, Sangha G.K, Brzak K.A, Shabrang S.N. Comparative metabolism of *ortho*-phenylphenol in mouse, rat and man. Xenobiotica 1998.
- Basford, B. Biobeds. 2010
- Boivin P, Guine V. preserving water quality in agriculture: biobed rotation to vertical. 2011

- Bomhard E.M, Brendler-Schwaab S.Y, Freyberger A, Herbold B.A, Leser K.H, Richter M. O-phenylphenol and its sodium and potassium salts: a toxicological assessment. Crit Rev Toxicol 2002.
- Boyd SA, Shelton DR. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. 1984
- Brusick D. Analysis of genotoxicity and the carcinogenic mode of action for *ortho*-phenylphenol. Environ Mol Mutagen 2005
- Buser HR, Haglund P, Müller MD, Poiger T, Rappe C. Rapid anaerobic degradation of toxaphene in sewage sludge. 2000
- Castillo LE, Reupert C, Solis F. Pesticides residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the North Atlantic Zone of Costa Rica. 2000
- Castillo M, Torstensson L, Stenström, J. Biobeds for environmental protection from pesticide use-a review. 2008
- Chen S, Liu W. Enantioselective degradation of metalaxyl in anaerobic activated sewage sludge. 2009
- Chu B.L, Guo B.Y, Peng Z, Wang Z, Guo G, Lin J.M. Studies on degradation of imazalil enantiomers in soil using capillary electrophoresis. 2007
- Cnubben N.H, Elliott G.R, Hakkert B.C, Meuling W.J, van de Sandt J.J. Comparative in vitro-in vivo percutaneous penetration of the fungicide *ortho*-phenylphenol. Regul Toxicol Pharmacol 2002.
- Coelhan M, Bromig K.H, Glas K, Roberts AL. Determination and levels of the biocide *ortho*-phenylphenol in canned beers from different countries. J Agric Food Chem 2006.

- Commission Directive 2010/57/EU of 26 August 2010 amending Annex I to Council Directive 91/414/EEC to renew the inclusion of imazalil as active substance. Official Journal of the European Union L225/5.
- Del Pilar Castillo M, Torstensson L. Effect of biobed composition, moisture, and temperature on the degradation of pesticides. 2007
- Dezman DJ, Nagy S, Brown GB. Postharvest fungal decay control chemicals: Treatments and residues in citrus fruits. 1986
- Drzyzga O. Diphenylamine and derivatives in the environment: a review. 2003
- EFSA. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance diphenylamine. 188, 1-60. September 2008
- EFSA. Conclusion on pesticide peer review. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 2-phenylphenol December 2008.
- EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance imazalil. 2010
- Environmental Protection Agency (EPA) USA. Reregistration eligibility decision for imazalil Case No. 2325. p.74. 2003
- European Commission. Draft re-assessment report and proposed decision of the Netherlands prepared in the context of the renewal of the inclusion of imazalil in Annex I of Council Directive 91/414. Volume 3, Annex B, B8. Fate and Behaviour. 2009.
- European Commission Health & Consumers Directorate-General. Directorate E – Safety of the food chain. Diphenylamine. December 2009.

- European Commission Health & Consumers Directorate-General. Directorate E – Safety of the food chain. Imazalil. June 2010.
- European Commission Health & Consumers Directorate-General. Directorate E – Safety of the food chain.2 –phenylphenol. October 2010.
- European Commission Health & Consumers Directorate-General. Directorate E – Safety of the food chain. June 2011.
- Fathepure BZ., Tiedje JM., Boyd S.A. Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzenes in anaerobic sewage sludge. 1988
- Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, Berlin, Germany. The carcinogenicity of the biocide ortho-phenylphenol. Division for Plant Protection Products and Pesticides. 2000.
- Focus kinetics. Generic guidance for Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. November 2011.
- Fogg, P, Boxall A, Walker A, Jukes A. Leaching of pesticides from biobeds: effect of biobed depth and water loading. 2004
- Fogg P, Boxall A, Walker A, Jukes A. Effect of different soil textures on leaching potential and degradation of pesticides in biobeds. 2004
- Garcia Portillo M, Avino ES, Vicente JO, De Andr`es RL, Jimenez MdlAS, Blanco JPL. Purification system for wastewater coming from fruit and vegetable processing plants and phytosanitary treatments in the field. United States Patent, US 6,809,585 B1. 2004

- Gerecke A.C., Giger W., Hartmann P.C., Heeb N.V, Kohler H-P. E., Schmid P., Zennegg M., Kohler M. Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge. 2006
- Guan J, Van Leemput L, Posthumus M.A, De Waard M.A. Metabolism of imazalil by wild-type and DMI-resistant isolates of *Penicillium italicum*. 1992.
- Hagiwara A, Shibata M, Hirose M, Fukushima S, Ito N. Long-term toxicity and carcinogenicity study of sodium *o*-phenylphenate in B6C3F1 mice. Food Chem Toxicol 1984.
- Hazardous Substances Data Bank (H.S.D.B.) 1993
- Howard PH, Boethling RS, Jarvis WS, Meylan WM, Michalenco EM. Handbook of environmental degradation rates. 1991
- Hue NV, Silva JA, Arifin R. Sewage sludge soil interactions as measured by plant and soil chemical composition. 1988
- Ito N, Fukushima S, Shirai T, Hagiwara A, Imaida K. Drugs, food additives and natural products as promoters in rat urinary bladder carcinogenesis. IARC Sci Publ 1984.
- Johnson, D. S. Allen, J. G.; Warman, T. M. Post-harvest application of diphenylamine and ethoxyquin for the control of superficial scald on Bramley's Seedling apples. 1980
- Jonkers N, Sousa A, Galante-Oliveira S, Barroso C, Kohler H, Giger W. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. 2009

- Kader A., Postharvest Technology of Horticultural Crops. 1992.
- Karanasios E, Tsiropoulos N, Karpouzas D, Menkissoglu-Spiroudi U. Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: evaluation for use in biobed systems. 2010
- Karawya, M.S., Abdel Wahab, S.M., El-Olemy, M.M., Farrag, N.M. Diphenylamine, an antihyperglycemic agent from onion and tea. 1984.
- Kodama S, Yamamoto A, Ohura T, Matsunaga A, Kanbe T. Enantioseparation of Imazalil residue in orange by Cappillary Electrophoresis with 2-hydroxypropyl- α -cyclodextrine as a chiral selector. 2003
- Kreuzig R, Hartmann C, Teigeler J, Høltge S, Cvetkovic B , Schlag P. Development of a novel concept for fate monitoring of biocides in liquid manure and manured soil taking ^{14}C -imazalil as an example. 2010
- Krulj, L. Effect of hydrocolloid edible coatings on quality of apple and pepper fruit. 2007
- Kwok E.S, Buchholz B.A, Vogel J.S, Turteltaub K.W, Eastmond D.A. Dose-dependent binding of *ortho*-phenylphenol to protein but not DNA in the urinary bladder of male F344 rats. Toxicol Appl Pharmacol 1999.
- Lallai A, Mura G. Biodegradation of 2-chlorophenol in forest soil: Effect of inoculation with aerobic sewage sludge. 2009
- Lemmon CR, Pylypiw HM. Degradation of diazinon, chlorpyrifos, isofenphos, and pendimethalin in grass and compost. 1992

- Masubuchi Y, Yamada S, Horie T. Possible mechanism of hepatocyte injury induced by diphenylamine and its structurally related nonsteroidal anti-inflammatory drugs. 2000
- McIntyre A.E, Lester J.N, Perry R. Persistence Of Organophosphorus Insecticides In Sewage Sludges. 1981
- Murata M, Moriya K, Inoue S, Kawanishi S. Oxidative damage to cellular and isolated DNA by metabolites of a fungicide *ortho*-phenylphenol. Carcinogenesis 1999.
- Nakagawa Y, Tayama S, Moore G.A, Moldeus P. Relationship between metabolism and cytotoxicity of *ortho*-phenylphenol in isolated rat hepatocytes. Biochem Pharmacol 1992.
- National Toxicology Program (NTP). Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of *ortho*-phenylphenol (CAS No. 90-43-7) in Swiss CD-1 mice (dermal studies). 1986.
- Nose, M., Nakatani, Y., Yamanishi, T. Studies on the flavor of green tea. Part IX. Identification and composition of intermediate and high boiling constituents in green tea flavor. 1971.
- Onstot J.D, Stanley J.S. Identification of SARA compounds in adipose tissue. U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), Office of Toxic Substances; 1989.
- Omirou M, Dalias P., Costa C., Papastefanou C., Dados A., Ehaliotis C., Karpouzas D.G., Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production industry: laboratory, column and field studies. *Environmental Pollution* 166: 31-39. 2012

- Official Journal of the European Union. Commission directive 2010/81/EU of 25 November 2010 .Amending Council Directive 91/414/EEC as regards an extension of the use of the active substance 2-phenylphenol .
- Pathak D.N, Roy D. *In vivo* genotoxicity of sodium *ortho*-phenylphenol: phenylbenzoquinone is one of the DNA-binding metabolite(s) of sodium *ortho*-phenylphenol. *Mutat Res* 1993.
- Piorr, W., Toth, L.,. Nachweis und bestimmung von biphenyl, o-hydroxybiphenyl und diphenylamin mittels dunnschichtchromatographie, gaschromatographie und spektrofluorimetrie. *Z. Lebensm. Forsch.* 1967
- Savides M, Oehme F. Urinary metabolism of orally administered *Ortho*-phenyl phenol in dogs and cats. 1980
- Shin K, Spain J. Pathway and Evolutionary Implications of Diphenylamine Biodegradation by *Burkholderia* sp. Strain JS667. 2009
- Smith R.A, Christenson W.R, Bartels M.J, Arnold L.L, St John M.K, Cano M, et al. Urinary physiologic and chemical metabolic effects on the urothelial cytotoxicity and potential DNA adducts of *o*-phenylphenol in male rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998.
- Sposito G., Lund L. J. and Chang A. C., (1982). Trace Metal Chemistry in Arid-zone Field Soils Amended with Sewage Sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in Solid Phases. *Soil Science Society of America Journal*, 46: 2: 260-264.
- Sultan AS, EI-Sayed HB Yousef EI-D. Chemical, physical and biological characteristics of sewage water (sludge and effluent).

- Timchalk C, Selim S, Sangha G, Bartels M.J. The pharmacokinetics and metabolism of ¹⁴C/¹³C-labeled *ortho*-phenylphenol formation following dermal application to human volunteers. Hum Exp Toxicol 1998.
- Thomas J, Ribelin W, Wilson R, Keppler D, DeEds F. Chronic toxicity of diphenylamine to albino rats. 1967
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Reregistration Eligibility Decision (RED) for 2-phenylphenol and salts (Orthophenylphenol or OPP). 2006.
- Wang, L.Q., Qin, G.W., Chen, S.N., Li, C.J. Three diterpene glucosides and a diphenylamine derivative from *Pieris formosa*. 2001.
- Wick LY, Gschwend PM. Source and chemodynamic behaviour of diphenyl sulfone and *ortho*- and *para*-hydroxybiphenyl in a small lake receiving discharges from an adjacent superfund site. 1998
- Yoshida J, Shimoji N, Furuta K, Takamura N, Uneyama C, Yazawa R, Imaida K, Hayashi Y. Twenty-eight day repeated dose toxicity testing of diphenylamine in F344 rats. 1989
- Zhao S, Narang A, Gierthy J, Eadon G. Detection and characterization of DNA adducts formed from metabolites of the fungicide *ortho*-phenylphenol 2002.
- Zheng C, Focks A, Ellebrake K, Eggers T, Fries E. Sorption of *ortho*-Phenylphenol to Soils. 2011

Ελληνική:

- Αξιολόγηση των βιοκλινών για την απορρύπανση υγρών αποβλήτων γεωργικής προέλευσης. Food Lab.2008
- Αραμπατζής Χ, Ρεμεδιάκης Χ. Η αποθήκευση των εσπεριδοειδών. PREPAC.
- Βασιλακάκης Μ. Γενική και Ειδική Δενδροκομία.. 2004
- Βασιλακάκης Μ, Καραογλανίδης Γ, Μηνάς Ι. Εφαρμογές όζοντος για περιορισμό των απωλειών κατά τη συντήρηση των οπωροκηπευτικών.
- Βασιλακάκης Μ. Μετασυλλεκτική Φυσιολογία, Μεταχείριση Οπωροκηπευτικών και Τεχνολογία. 2006
- Βιοκλίνες και Απορρύπανση επιβαρυσμένων αποβλήτων γεωργικής προέλευσης από φυτοπροστατευτικές ουσίες. 2010
- Βλυσίδης Α, Μάη Σ .Ενεργειακή Αξιοποίηση της ιλύος που παράγεται κατά την επεξεργασία των λυμάτων. 2010
- Ζιώγας Β, Μάρκογλου Α. Γεωργική Φαρμακολογία. 2007
- Μανωλοπούλου Ε., Λαμπρινός Γ, Συντήρηση με Ψύξη Φρούτων και Λαχανικών. ΟΠΕ: Οργανισμός Προώθησης Εξαγωγών, Ινστιτούτο Εξαγωγικών Σπουδών (ΙΕΣ) 1989.
- Σφακιωτάκης Ε, Μετασυλλεκτική Φυσιολογία και Τεχνολογία Νωπών Οπωρολαχανικών Προϊόντων. 1995.

Ιστοσελίδες:

1. <http://www.agrotypos.gr/pharmacy/index.asp?mod=productCard&ProductAA=1350&id=54097>
2. <http://archivehealth.in.gr/environ/Article.asp?ArticleId=18446&CurrentTopId=18436&IssueTitle=%D4%EF+%D0%E5%F1%E9%E2%DC%EB%EB%EF%ED+%EC%E1%F2>
3. http://www.bayernorden.com/ebbsc/cms/en/sustainability_new/Baeredygtig_u_dvikling/ProduktansvarBiobede.html
4. <http://www.biobeds.info>
5. http://www.ecodonet.gr/pollutants_greek_1.3_1.php
6. <http://www.interempresas.net/Horticulture/Articles/77027-25-years-of-Tecnidex.html>
7. <http://www.lakoniacoop.gr/gr/?page=4&item=24227>
8. http://www.lib.teiher.gr/webnotes/steg/Methodoi_Antimetopisis_Fytoparasiton/kef6.pdf
9. <http://www.postharvest.biz/en/company/control-tec-eco-for-the-waste-water-treatment-in-packinghouses/ id:20196.seccion:productcatalog.producto:10291/>
10. <http://www.tecnidex.es>
11. <http://detail.china.alibaba.com/buyer/offerdetail/654047308.html>
12. <http://en.wikipedia.org/wiki/2-Phenylphenol>
13. <http://en.wikipedia.org/wiki/Diphenylamine>
14. http://portal.kathimerini.gr/4dcgi/ w_articles_kathglobal 1 28/11/2011 4167 19
15. <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/pages/N2I3A>
16. <http://scorecard.goodguide.com/chemical-profiles/html/2phenylphenol.html>