



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή Εργασία

Βιοεμπλουτισμός βιοκλινών για την απομάκρυνση των
μυκητοκτόνων fludioxonil και imazalil από υγρά απόβλητα
συσκευαστηρίων φρούτων

Bioaugmentation of biobeds for the removal of the fungicides
fludioxonil and imazalil from wastewaters from fruit-packaging
plants

Κουτρομπής Κωνσταντίνος

Λάρισα 2020

Βιοεμπλουτισμός βιοκλινών για την απομάκρυνση των μυκητοκτόνων fludioxonil και imazalil από υγρά απόβλητα συσκευαστηρίων φρούτων

Υπεύθυνος Καθηγητής

Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής Επιτροπή:

- Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Σωτήριος Βασιλειάδης, Διδάσκων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κουτρομπής Κωνσταντίνος του Ηλία

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Καρπούζα Δημήτριο, Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθειά του που μου παρείχε κατά την ανάθεση, την διεξαγωγή του πειράματος και την γραπτή παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη και τον κύριο Σωτήριο Βασιλειάδη, διότι δέχτηκαν να συμμετέχουν στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας. Ακόμα οφείλω ευχαριστίες στα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Παπαζλατάνη Χριστίνα, για την βοήθειά της στη διεξαγωγή της πτυχιακής εργασίας αλλά και στην γραπτή παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική και οικονομική τους υποστήριξη, κατά την διάρκεια φοίτησής μου στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περίληψη

Τα συσκευαστήρια φρούτων αποτελούν πηγή υγρών αποβλήτων επιβαρυσμένων με υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων. Στα φάρμακα αυτά ανήκουν και τα δύο μυκητοκτόνα imazalil (IMZ) και fludioxonil (FLD). Η μη ορθολογική διαχείριση των υγρών αποβλήτων αποτελεί κίνδυνο στο περιβάλλον, καθώς η διάχυση έμμοων ρύπων ισοδυναμεί και με την συσσώρευση υπολειμμάτων αυτών των μυκητοκτόνων στον υδροφόρο ορίζοντα. Παρόλη την ανάπτυξη της έρευνας και της τεχνολογίας, δεν βρίσκονται σε εφαρμογή διαδικασίες απορρύπανσης οι οποίες να είναι ταυτόχρονα αποτελεσματικές και οικονομικές. Στην παρούσα μελέτη διερευνείται η βελτιστοποίηση της πολλά υποσχόμενης βιοαπορρύπανσης μέσω των βιοκλινών, με τη μέθοδο του βιοεμπλουτισμού με αποδομητικούς μικροοργανισμούς που μπορούν να αποδομήσουν τα μυκητοκτόνα imazalil και fludioxonil. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την προετοιμασία στηλών έκπλυσης οι οποίες πληρώθηκαν με βιοοργανικό μείγμα, το οποίο περιείχε άχυρο, έδαφος και εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών *Pleurotus ostreatus* σε αναλογίες 25%: 25% : 50% αντίστοιχα. Προτού τοποθετηθεί το υπόστρωμα εντός των στηλών, έγινε εμπλουτισμός του με καλλιέργειες του μύκητα *Mycosphaerella tassiana*, που έχει την δυνατότητα διάσπασης του IMZ, και του βακτηρίου *Ochrobactrum sp.*, που έχει την δυνατότητα να διασπά το FLD. Στις στήλες έκπλυσης εφαρμόστηκε υγρό απόβλητο με συγκεντρώσεις των IMZ και FLD που αντιπροσωπεύουν ένα πραγματικό σενάριο φόρτισης βιοκλίνης με απόβλητα που παράγει μετασυλλεκτική βιομηχανία συσκευασίας φρούτων. Καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής περιόδου λαμβάνονταν δείγματα για ανίχνευση των γεωργικών φαρμάκων στο έκπλυμα των στηλών, στο υγρό απόβλητο που εφαρμόστηκε και, τέλος, στο πληρωτικό υλικό των βιοκλινών. Μέσω του ισοζυγίου μάζας, υπολογίστηκαν και τα υπολείμματα των μυκητοκτόνων τα οποία αποδομήθηκαν εντός των στηλών έκπλυσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το πληρωτικό υλικό κατακράτησε αποτελεσματικά και τα 2 γεωργικά φάρμακα, με πολύ χαμηλά ποσοστά να διαφεύγουν στο έκπλυμα. Η αποδόμηση του FLD από το *Ochrobactrum sp.* και την

ενδογενή μικροβιακή κοινότητα ανήλθε στο 35,4% της συνολικής ποσότητας που εφαρμόστηκε. Από την άλλη η αποδόμηση του IMZ δεν ξεπέρασε το 20% της συνολικής εφαρμοσμένης ποσότητας, γεγονός που υποδηλώνει μη αποτελεσματική δράση του μύκητα *Mycosphaerella tassiana*. Μελλοντικές μελέτες θα εστιάσουν στην ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας και σε διερεύνηση των συνθηκών εφαρμογής του *M. tassiana* με στόχο την αποτελεσματική εφαρμογή του σε μεταγενέστερη μελέτη βιοεμπλουτισμού.

Abstract

Fruitpacking industries are a big source of wastewater heavily loaded with pesticides. Both fungicides imazalil (IMZ) and fludioxonil (FLD) belong to this category of pesticides. Improper management of wastewater poses a danger to the environment, as the diffusion of persistent pollutants is equivalent to the accumulation of residues of these fungicides in the aquifer. Despite the development of research and technology, decontamination procedures that are in place, are both inefficient and expensive. The present study investigates the optimization of promising biodegradation through biobeds, by the method of bioaugmentation with pesticide-degradating microorganisms that can degrade the fungicides imazalil and fludioxonil. The experimental procedure involves the preparation of leaching columns which were filled with an organic biomixture, which contained straw, soil and spent mushroom substrate of *Pleurotus ostreatus* in proportions of 25%: 25%: 50% respectively. Before placing the substrate in the columns, it was enriched with cultures of the fungus *Mycosphaerella tassiana*, which can break down IMZ, and the bacterium *Ochrobactrum sp.*, which can break down FLD. The liquid waste was applied to the leaching columns with concentrations of IMZ and FLD representing a realistic wastewater production scenario from a post-harvest fruit packaging industry. Throughout the experimental period, samples were taken for detection of pesticides in the leachate, in the liquid wastewater applied and, finally, in the biobed biomixture. Through mass balance analysis, the residues of the fungicides which were dissipated at the substrate of the leaching columns were also calculated. The

results showed that the biomixture retained both pesticides effectively, with very low percentages of them, escaping into the leachate. Degradation of FLD by *Ochrobactrum sp.* and the endogenous microbial community corresponded to 35.4% of the total amount applied. On the other hand, the degradation of IMZ did not exceed 20% of the total applied amount, which indicates ineffective degradation of the fungus *Mycosphaerella tassiana*. Future studies will focus on the analysis of the total microbial community and the investigation of the application conditions of *M. tassiana* with the aim of its effective application in a subsequent bioaugmentation study.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	9
1.1 Περιβαλλοντική ρύπανση	9
1.2 Γεωργικά φάρμακα	10
1.2.1 Κατηγοριοποίηση γεωργικών φαρμάκων	10
1.3 Ρύπανση από γεωργικά φάρμακα	12
1.3.1 Σημειακές και μη σημειακές πηγές ρύπανσης	13
1.4 Χαρακτηριστικά των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων	13
1.4.1 Imazalil (IMZ)	13
1.4.2 Fludioxonil (FLD)	16
1.5 Απορρύπανση	18
1.5.1 Βιοαπορρύπανση	19
1.5.2 Χρήση βιοκλινών για την βιοαπορρύπανση	21
1.6 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον βιοεμπλουτισμό	25
1.7 Σκοπός του πειράματος	26
2. Υλικά και Μέθοδοι	28
2.1 Προετοιμασία πληρωτικού υλικού της βιοκλίνης	28
2.2 Προετοιμασία εμβολίων για τον βιοεμπλουτισμό του πληρωτικού υλικού	29
2.2.1 Καλλιέργεια του μύκητα <i>Mycosphaerella tassiana</i>	29
2.2.2 Καλλιέργεια του βακτηρίου <i>Ochrobactrum sp.</i> 3229	
2.2.3 Βιοεμπλουτισμός του πληρωτικού υλικού	34

2.3	Πειραματικός σχεδιασμός στηλών έκπλυσης	35
2.4	Εκχύλιση των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων 3735	
2.4.1	Εκχύλιση από τα δείγματα εκπλύματος και αποβλήτων	37
2.4.2	Εκχύλιση από δείγματα πληρωτικού υλικού	38
2.5	Ποσοτικός προσδιορισμός των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων σε σύστημα HPLC-PDA	39
2.6	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	40
3.	Αποτελέσματα	41
3.1.	Υγρό απόβλητο	41
3.2.	Έκπλυμα από τις βιοκλίνες	42
3.3.	Υπολείμματα των φαρμάκων στο πληρωτικό υλικό	43
3.4.	Ανάλυση του ισοζυγίου μάζας	44
4.	Συζήτηση	46
4.1.1.	Imazalil	46
4.1.2.	Fludioxonil	48
4.2.	Συμπεράσματα	49
4.3.	Μελλοντικές μελέτες	
	50Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
	Βιβλιογραφία	51

1. Εισαγωγή

1.1 Περιβαλλοντική ρύπανση

Η αρχή της Βιομηχανικής επανάστασης στα τέλη του 18^{ου} αιώνα, σήμανε για την ανθρωπότητα ραγδαίες αλλαγές, οι οποίες άλλαξαν για πάντα τον τρόπο ζωής των ανθρώπων. Η εκβιομηχάνιση της παραγωγής επέφερε μεταβολές στους τομείς της οικονομίας, της τεχνολογίας των επιστημών, της κοινωνίας και του πολιτισμού. Η εφαρμογή καινοτομιών στην αγροτική παραγωγή, που κατέληξαν σε περιορισμό της χειρωνακτικής εργασίας και αύξηση της παραγωγής, οι υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης των τεχνολογιών, που οδήγησαν σε διευκόλυνση της μεταφοράς προϊόντων και ανθρώπινου δυναμικού, και οι αλλαγές στην υγιεινή των πόλεων, όσον αφορά τη διαχείριση των απορριμμάτων, την ανάπτυξη των συστημάτων των υπονόμων και την πρόοδο της ιατρικής επιστήμης, οδήγησαν σε αύξηση του πληθυσμού (Barles S., 2014). Παρόλα αυτά, η ανάγκη σίτισης του ολοένα και αυξανόμενου πληθυσμού, σύντομα δεν μπορούσε να καλυφθεί από τις τρέχουσες αγροτικές πρακτικές. (Lengai et al, 2020). Τη λύση έδωσε η ανάπτυξη συνθετικών χημικών προϊόντων τα οποία δρουν είτε ενισχυτικά στην ανάπτυξη των φυτών (π.χ. λιπάσματα) είτε προστατευτικά, μέσω του ελέγχου φυτοπαθογόνων οργανισμών (φυτοπροστατευτικά προϊόντα) (Lengai et al, 2020, Douglass C. North, 2000). Όμως, η υπερβολική χρήση των παραπάνω προϊόντων, σε συνδυασμό με την απόρριψη σε περιβαλλοντικά συστήματα παραπροϊόντων της βιομηχανίας και αστικών αποβλήτων, είχε δραματικές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Σήμερα, για την προστασία του περιβάλλοντος είναι ανάγκη να χρησιμοποιηθεί η πρόοδος της τεχνολογίας για την αντιμετώπιση της ρύπανσης και την μείωσή της στο ελάχιστο.

Μεγάλο μέρος των ρύπων δέχεται ο υδροφόρος ορίζοντας, ο οποίος επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα όλα σχεδόν τα οικοσυστήματα, είτε αυτά είναι θαλάσσια, παράκτια, ή χερσαία (Y. Gang *et al.*, 2018). Σε αυτό το πλαίσιο, το πρώτο βήμα της αλλαγής πραγματοποιήθηκε το 1977 από την Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας (Environmental Protection Agency – EPA) των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, όπου στην νομοθεσία περί καθαρού νερού έγινε προσθήκη λίστας με

συχνούς βιομηχανικούς ρύπους (Philp *et al.* 2005). Έτσι δημιουργήθηκε και η πρώτη λίστα βιομηχανικών ρύπων που προκαλούσαν απειλή στην δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Η επιβάρυνση που προκαλεί κάθε ρύπος στο περιβάλλον υπολογίζεται με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών και τα επίπεδα συγκέντρωσής τους στο περιβάλλον, ενώ καθοριστικό παράγοντα αποτελεί η διαλυτότητα και ο ρυθμός αποικοδόμησής τους. Σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρύπους αποτελούν και τα γεωργικά φάρμακα.

1.2 Γεωργικά φάρμακα

Τα γεωργικά φάρμακα είναι κατηγορία χημικών ενώσεων, φυσικών ή τεχνητών, που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση παθογόνων για τα φυτά οργανισμών, όπως ζιζάνια, μύκητες, έντομα, ακάρεα, νηματώδεις και τρωκτικά. Σύμφωνα με τον Κανονισμό αριθ. 1107/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αποτελούνται από δραστικές ουσίες που προστατεύουν φυτά και φυτικά προϊόντα από την δράση επιβλαβών οργανισμών. Η δράση των ουσιών αυτών διακρίνεται σε αποτροπή, καταστροφή, απώθηση ή περιορισμό του παθογόνου. Επίσης μπορεί να είναι ρυθμιστής της ανάπτυξης του φυτού (USC, 2013; EPA, 2013).

Εκτός από τις δραστικές ουσίες, τα εμπορικά σκευάσματα των γεωργικών φαρμάκων περιέχουν και βοηθητικές ουσίες, που έχουν δευτερεύουσες λειτουργίες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της δραστικής ουσίας και στην απόδοση του εμπορικού σκευάσματος. Συγκεκριμένα βοηθούν τις δραστικές ουσίες να δράσουν ή να φτάσουν στο σημείο δράσης τους, δρουν ως διαλύτες για την διευκόλυνση της εφαρμογής, αυξάνουν την διάρκεια ζωής του εμπορικού σκευάσματος, και προστατεύουν την δραστική ουσία από την φωτοαποδόμηση (USC, 2013; EPA, 2013).

1.2.1 Κατηγοριοποίηση γεωργικών φαρμάκων

Τα γεωργικά φάρμακα περιλαμβάνουν χημικές ενώσεις οι οποίες διαφέρουν ως προς τον οργανισμό-στόχο, τη χημική σύσταση, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τον τρόπο δράσης (Leong et al., 2020). Η πιο κοινή μέθοδος ταξινόμησης γεωργικών φαρμάκων αφορά τους οργανισμούς τους οποίους στοχεύουν (Πίνακας 1). Τα μυκητοκτόνα ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των αντιμικροβιακών γεωργικών φαρμάκων και έχουν ως σκοπό την αναστολή της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων μυκήτων ή των κονιδίων του.

Άλλος ένας τρόπος κατηγοριοποίησης των γεωργικών φαρμάκων είναι με βάση την χημική τους σύνθεση. Οι πληροφορίες σχετικά με τα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά των γεωργικών φαρμάκων είναι πολύ χρήσιμες για τον προσδιορισμό του τρόπου και ρυθμού εφαρμογής και την πιθανή εμφάνιση ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα ορισμένων μυκήτων σε μια δραστική ουσία είναι πολλές φορές και ανθεκτικότητα σε ολόκληρη την κατηγορία όπου ανήκει η εν λόγω δραστική ουσία (Pscheidt and Ocam, 2013).

Τα μυκητοκτόνα συνήθως επιδρούν άμεσα στην αντιμετώπιση των μυκήτων, είτε αναστέλλοντας την δράση τους, είτε την ανάπτυξή τους. Ορισμένα όμως μυκητοκτόνα δρουν έμμεσα, ενεργοποιώντας, δηλαδή, την άμυνα του ίδιου του φυτού (Pscheidt and Ocam, 2013; Chao Yang et al., 2011). Τέλος, οι ρόλοι των φυτοπροστατευτικών φαρμάκων μπορεί να είναι είτε προστασίας, είτε θεραπευτικοί (Pscheidt and Ocam, 2013).

Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά στάδια της ζωής των φυτών, όπως για παράδειγμα στην φάση του σπόρου, κατά την διάρκεια της ανάπτυξης ή μετασυλλεκτικά. Σημαντικός παράγοντας για τον χρόνο κατά τον οποίο θα εφαρμοστούν, είναι ο τρόπος δράσης τους. (Pscheidt and Ocam, 2013). Μια βασική βιομηχανία χρήσης γεωργικών φαρμάκων μετασυλλεκτικά, είναι τα συσκευαστήρια φρούτων. Σημαντικές απώλειες προκύπτουν κατά την αποθήκευση των φρούτων, από φυτοπαθογόνους μύκητες, η αντιμετώπιση των οποίων απαιτεί την χρήση μεγάλων ποσοτήτων μυκητοκτόνων. Η εφαρμογή τους στα φρούτα γίνεται με ποικίλους τρόπους, όπως ψεκασμό ή εμβάπτιση σε πυκνά διαλύματα μυκητοκτόνων. Αποτέλεσμα της χρήσης τους, είναι η παραγωγή υγρών αποβλήτων ιδιαίτερα επιβαρυσμένων με μεγάλες

ποσότητες γεωργικών φαρμάκων (Joseph L. Smilanick *et al.*, 2008) τα οποία χρίζουν επεξεργασίας.

Πίνακας 1. Οι κατηγορίες γεωργικών φαρμάκων με βάση τους οργανισμούς-στόχους τους και παραδείγματα από κάθε κατηγορία

Τύποι γεωργικών φαρμάκων	Παραδείγματα
Ακαρεοκτόνα	DDT, dicofol, chlorpyrifos, permethrin
Βακτηριοκτόνα	Streptomycin, tetracycline
Μυκητοκτόνα	Cymoxanil, thiabendazole
Ζιζανιοκτόνα	Alachlor, paraquat, 2,4-D
Εντομοκτόνα	Azadirachtin, DDT, chlorpyrifos, malathion
Μαλακιοκτόνα	Metaldehyde, thiodicarb
Νηματωδοκτόνα	Carbofuron, chlorpyrifos, methyl bromide
Μυοκτόνα	Strychnine, Warfarin, zinc phosphide
Τερμιτοκτόνα	Fipronil

1.3 Ρύπανση από γεωργικά φάρμακα

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν βασικό ρυπαντή των υπόγειων υδάτων (European Union, 2019). Η περιβαλλοντική τους επικινδυνότητα αποτυπώνεται σε θεσμοθετήσεις επίσημων φορέων όπως η EPA και η Ευρωπαϊκή Κοινότητα, μέσω των οποίων έχει απαγορευθεί η κυκλοφορία γεωργικών φαρμάκων σημαντικής επικινδυνότητας για το περιβάλλον, ενώ έχουν τεθεί μέγιστα όρια ανίχνευσης στο νερό και σε τρόφιμα. Παράδειγμα αποτελεί ο κανονισμός 396/2005 της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων, για το imazalil (Brancato Alba *et al.*, 2018). Αντίστοιχοι κανονισμοί έχουν οριστεί και για τα υπολείμματα σε τρόφιμα (Medina-Pastor Paula and Giuseppe Triacchini, 2020).

Ένας από τους λόγους της περιβαλλοντικής επικινδυνότητας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι οι εγγενείς ιδιότητες της πλειοψηφίας, που επιτρέπουν τη διασπορά τους, μέσω των μηχανισμών της έκπλυσης και επιφανειακής απορροής, καταλήγοντας σε ρύπανση του εδάφους και των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων. Η ρύπανση του υδροφόρου ορίζοντα από τα γεωργικά φάρμακα πραγματοποιείται μέσω δύο οδών: των σημειακών πηγών και των διάχυτων ή μη σημειακών πηγών.

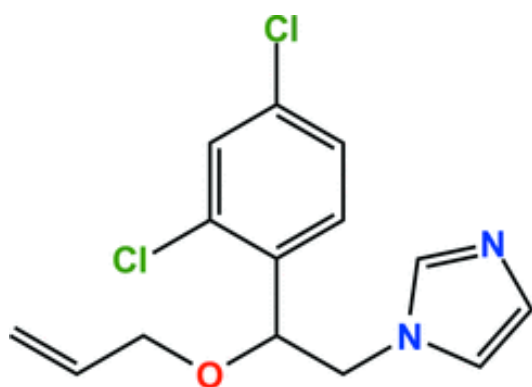
1.3.1 Σημειακές και μη σημειακές πηγές ρύπανσης

Μη σημειακές πηγές ρύπανσης ορίζονται αυτές, που σχετίζονται με την μετακίνηση των γεωργικών φαρμάκων από τον αγρό όπου εφαρμόζονται, σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα (Neumann et al. 2002). Παραδείγματα αποτελούν η υπερβολική χρήση γεωργικών φαρμάκων στον αγρό, η μεταφορά του ψεκαζόμενου γεωργικού φαρμάκου μέσω του αέρα, η εξάτμιση, καθίζηση, επιφανειακή απορροή, έκπλυση, αποστράγγιση και διήθηση των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος του αγρού (Fait et al. 2007). Αντίθετα, σημειακές πηγές αφορούν μη ορθολογικές γεωργικές πρακτικές κατά την προετοιμασία του ψεκαστικού υγρού ή κατά το άδειασμα και πλύσιμο του ψεκαστήρα (Helweg et al. 2002; Müller et al. 2002), και βιομηχανίες που χρησιμοποιούν γεωργικά φάρμακα, όπως οι βιομηχανίες μεταποίησης και επεξεργασίας αγροτικών προϊόντων, όπου μέσω διαρροών, ή εσφαλμένων πρακτικών διαχείρισης των υγρών αποβλήτων (όπως απομάκρυνση και απόρριψη σε παρακείμενους αγρούς, λίμνες και ποτάμια ή σε μονάδες βιολογικού καθαρισμού), συνεισφέρουν σε μεγάλο ποσοστό στην ρύπανση των εδαφών και των επιφανειακών και υπόγειων υδροφόρων συστημάτων (Scanccara et al. 2016; Belenguer et al. 2014; De Wilde et al., 2007).

1.4 Χαρακτηριστικά των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων

1.4.1 Imazalil (IMZ)

Το μυκητοκτόνο imazalil, με την χημική ονομασία 1-[2-(2,4-di-chloro-phen-yl)-2-(prop-2-en-yl-oxy)eth-yl]-1*H*-imidazole, περιέχει έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο και έναν βενζολικό δακτύλιο (Εικόνα 1). Η στεροδιαμόρφωση του μορίου, δίνει την δυνατότητα στον ιμιδαζολικό δακτύλιο να είναι σχεδόν παράλληλος με τον βενζολικό δακτύλιο, επιτρέποντας ισχυρές ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες προσδίδουν μια σταθερή δομή στο χώρο (S.Cheon, 2011) .



Εικόνα 1. Χημική δομή γεωργικού φαρμάκου Imazalil

Δρα μέσω αναστολής της σύνθεσης της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων, παρεμβάλλοντας στη δράση του ενζύμου απομεθυλίωσης του C-14, στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (Siegel and Ragsdale, 1978). Έχει βρεθεί πως η αντιμυκητιακή ενεργότητα των παραγώγων της αζόλης βασίζεται στην ανταγωνιστική αναστολή του CYP51A, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση της εργοστερόλης, ενός συστατικού της μεμβράνης των μυκητιακών κυττάρων (Giavini and Menegola, 2010; Marotta and Tiboni, 2010; MAK Value Documentation, 2015). Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μεγάλου εύρους μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των *Tilletia* και *Helminthosporium* spp. σε φρούτα και λαχανικά. Χρησιμοποιείται γενικότερα έναντι ασθενειών, όπως πράσινη και μαύρη μούχλα, σε διάφορα φρούτα όπως εσπεριδοειδή, μήλα, μπανάνες, αχλάδια κ.α. (Lewis *et al.*, 2016; PPDB, Imazalil).

Το IMZ ταξινομείται ως "Πιθανό καρκινογόνο στον άνθρωπο", σύμφωνα με το Σχέδιο Κατευθυντήριων Οδηγιών της EPA για την Εκτίμηση ως Καρκινογόνο (EPA, 2005). Το IMZ είναι ιδιαίτερα ερεθιστικό για τα μάτια (Κατηγορία I) και

αναμένεται να προκαλέσει μέτρια τοξικότητα και ερεθισμό με χορήγηση δια του στόματος και δια του δέρματος (Κατηγορία II). Δεν είναι ερεθιστικό για το δέρμα και πρακτικά είναι μη-τοξικό μέσω εισπνοής (Κατηγορία IV) (EPA 2005). Συγκεκριμένα το LD₅₀ από το στόμα ορίζεται στα 227 mg/Kg, LD₅₀ δέρματος 2000 mg/Kg, ενώ LC₅₀ εισπνοής 1,84 mg/L (Lewis *et al.*, 2016; PPDB, Imazalil). Το IMZ δεν αποτελεί κίνδυνο μέσω κατάποσης φαγητού και ποτού από προϊόντα που έχουν περάσει από εργοστάσια συσκευασίας φρούτων σύμφωνα με EFSA (EFSA, 2014). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες σε ποντίκια έδειξαν πως το IMZ μπορεί να δράσει ως ενδοκρινικός διαταράκτης (Jin *et al.*, 2019), ηπατοτοξικός παράγοντας (Jin *et al.*, 2018) και έχει τοξική επίδραση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (Tao *et al.*, 2020). Ακόμη εμφανίζει γενετοξικότητα σε καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων (Ilyushina *et al.*, 2020).

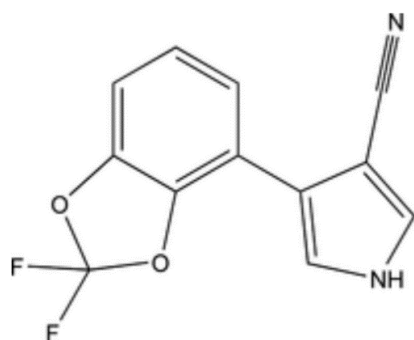
Όσον αφορά την περιβαλλοντική τύχη του, το IMZ είναι μέτρια υδατοδιαλυτό (0.184 gr/L), δεν αναμένεται να εξατμιστεί (πίεση ατμών $1.58 \cdot 10^{-4}$ Pa, 25 °C) και έχει υψηλό συντελεστή κατανομής νερού οκτανόλης ($\log P_{ow} = 2.56$) (EFSA, 2010). Τα παραπάνω υποδηλώνουν πως το IMZ αναμένεται να εμφανίσει χαμηλή κινητικότητα και υψηλή προσρόφηση στο έδαφος. Το IMZ παρουσιάζει σχετικά ταχεία φωτοαποδόμηση με χρόνο ημιζωής 6.1 ημέρες σε pH 7. Από την άλλη, είναι πολύ σταθερό στην υδρόλυση και αποδομείται πολύ αργά στο έδαφος υπό αερόβιες συνθήκες. Οι τιμές DT₅₀, από εργαστηριακές μελέτες σε έδαφος ανέρχονται σε 44 έως 150 περίπου μέρες, ενώ στον αγρό, μόλις 5 με 7 ημέρες. Αντίστοιχα για τις τιμές του DT₉₀ σε έδαφος εντός εργαστηρίου ανέρχεται στις 200 με 4400 σχεδόν ημέρες, ενώ στον αγρό από 54 έως 68 ημέρες (Lewis *et al.*, 2016; PPDB, Imazalil; Papadopoulou *et al.*, 2016). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, σε μελέτες εδάφους εντός εργαστηρίου το μυκητοκτόνο θεωρείται μέτριας εμμονής.

Το IMZ ανήκει στην κατηγορία των ιμιδαζολών. Η πρώτη σύνθεση ιμιδαζόλης πραγματοποιήθηκε από τον Heinrich Debus το 1858 με την χρήση γλυοξάλης και φορμαλδεΐδης σε αμμωνία, τεχνική που χρησιμοποιείται και σήμερα, σε ορισμένες περιπτώσεις (Amita *et al.*, 2013). Η ομάδα των ιμιδαζολών, αποτελεί μια αρκετά μεγάλη οικογένεια μυκητοκτόνων, με πολλές μελέτες πάνω στην δράση τους (Yang

et al., 2012; Vita *et al.*, 2012; Desai *et al.*, 2011; Ramachandran *et al.*, 2011; Vijesh *et al.*, 2011).

1.4.2 Fludioxonil (FLD)

Το μυκητοκτόνο fludioxonil, με τη χημική ονομασία 4-(2,2-Di-fluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1*H*-pyrrole-3-carbo-nitrile, είναι μια οργανική χημική ένωση με φαινολικό δακτύλιο (Εικόνα 2)(Li *et al.*, 2012).



Εικόνα 2. Χημική δομή γεωργικού φαρμάκου Fludioxonil

Η ουσία, $C_{12}H_6F_2N_2O_2$, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2, περιέχει ένα βενζοδιαξολικό δακτύλιο με δύο φθόρια, ο οποίος είναι σχεδόν επίπεδος. Επίσης περιέχει έναν ελαφρό ανεστραμμένο πυρολικό δακτύλιο. Στην κρυσταλλική του μορφή δημιουργούνται μορφές δεσμών συμπεριλαμβανομένων και των δεσμών υδρογόνου, διατηρώντας την σταθερή (Fan-Wei Meng *et al.*, 2012). Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μεγάλου εύρους μυκήτων, που προκαλούν ασθένειες σε φρούτα και λαχανικά όπως γκρι μούχλα, μούχλα χιονιού, μούχλα σποριόφυτου κ.α. Τα φρούτα που αποτελούν στόχο προστασίας από το μυκητοκτόνο αυτό είναι τα μήλα, τα αχλάδια, μούρα, και φράουλες (Lewis *et al.*, 2016; PPDB, Fludioxonil).

Το FLD ταξινομείται ως "Μη καρκινογόνο στον άνθρωπο" από την EPA, όσον αφορά την Εκτίμηση του ως Καρκινογόνο (EPA, 2015). Το FLD αποτελεί ουσία που προκαλεί τοξικότητα σε ήπαρ και νεφρούς, όμως δεν προκαλεί τοξικότητα δια του δέρματος (EPA, 2015). Συγκεκριμένα το LD_{50} από το στόμα ορίζεται άνω του 5000 mg/Kg, LD_{50} δέρματος 2000 mg/Kg, ενώ LC_{50} εισπνοής 2,6 mg/L (Lewis *et al.*, 2016;

PPDB, Fludioxonil). Το IMZ δεν αποτελεί κίνδυνο στην δημόσια υγεία, καθώς ορίζεται ως αμελητέα, ούτε κίνδυνο για κατάποση μέσω φαγητού και ποτού σύμφωνα με EFSA από τα προϊόντα που έχουν περάσει από εργοστάσια συσκευασίας φρούτων (EFSA, 2014).

Όσον αφορά την αποδόμηση του, με βάση τις τιμές DT_{50} , από μελέτες έχει προκύψει πως σε έδαφος εντός εργαστηρίου διαφέρουν αρκετά από τις τιμές του IMZ. Συγκεκριμένα οι τιμές DT_{50} του IMZ κυμαίνονται μεταξύ 119 και 365 ημερών με μέση τιμή τις 164 ημέρες, ενώ στον αγρό, οι τιμές DT_{50} του IMZ κυμαίνονται από 8 με 43 ημέρες, με μέση τιμή τις 20 ημέρες. Τα παραπάνω δεδομένα αφορούν αερόβιες συνθήκες (Lewis *et al.*, 2016; PPDB, Fludioxonil). Με βάση αυτά τα δεδομένα σε έδαφος εντός εργαστηρίου το μυκητοκτόνο θεωρείται έμμοно.

Το FLD ανήκει στην οικογένεια των φαινυλπυρολών, ουσίες που προέρχονται από την πυρολονιτρίνη, έναν μεταβολίτη βακτηρίων από την τρυπτοφάνη (Floss *et al.*, 1971; Kilani *et al.*, 2016). Τα πρώτα μυκητοκτόνα της ομάδας ήταν τα fenpiclonil και fludioxonil και είχαν αντίστοιχη αντιμυκητιακή δράση αλλά ήταν και πιο ανθεκτικά στο φως (Corran *et al.*, 2008; Kilani *et al.*, 2016). Σήμερα το FLD θεωρείται ο βασικός εκπρόσωπος της οικογένειας αυτής στα μυκητοκτόνα. Παρόλη την πολυετή χρήση του μυκητοκτόνου στην αγορά, ακόμα και σήμερα, έπειτα από περισσότερα των 30 χρόνων κυκλοφορίας τους, δεν είναι απολύτως γνωστός ο στόχος τους στην δράση τους έναντι των μυκήτων.

Η δράση του για αρκετά χρόνια φαινόταν να είναι η αναστολή των υβριδικών κινασών ιστιδίνης της κλάσης III, σημαντικές για τους μύκητες. Αυτές λειτουργούν ενεργοποιώντας το μονοπάτι του HOG μιτογόνου (Yoshimi *et al.*, 2005), ενώ οι κινάσες αυτές ανταποκρίνονται στο φάρμακο FLD με υπερπαραγωγή γλυκερόλης προκαλώντας έκρηξη των κυττάρων (Lew, 2010). Αργότερα η μελέτη του Lawry *et al.*, (2017) έφερε στο φως νέες πληροφορίες για την δράση του fludioxonil. Συγκεκριμένα επιβεβαίωσε την δράση του στο μονοπάτι HOG, αλλά ταυτόχρονα απέδειξε πως δεν επηρεάζουν άμεσα τις υβριδικές κινάσες ιστιδίνης, αλλά τις απενεργοποιούν μετατρέποντάς της σε φωσφατάσες (Lawry *et al.*, 2017; Brandhorst and Klein, 2019).

1.5 Απορρύπανση

Καθώς η ρύπανση χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων συνεχίζει να συμβαίνει, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που καλείται να αντιμετωπίσει το ανθρώπινο είδος. Το πρόβλημα της ρύπανσης αποτελεί και κίνδυνο για την δημόσια υγεία, πράγμα που το καθιστά ύψιστης σημασίας. Για την λύση του πολλές είναι οι μέθοδοι που έχουν εμφανιστεί ανά τα χρόνια συμπεριλαμβανομένης και της ανακύκλωσης. Σκοπός των μεθόδων είναι η μείωση των επικίνδυνων ουσιών στα απόβλητα, έτσι ώστε να διατηρηθεί η συγκέντρωσή των ρύπων στο περιβάλλον σε ανεκτά επίπεδα. Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Περιβάλλοντος, η ρύπανση των υδάτων προκαλείται από ουσίες, οι οποίες χωρίζονται σε ανόργανες, χλωριωμένες οργανικές ουσίες, σε άλλες ανθρωπογενείς ουσίες και τέλος σε βαρέα μέταλλα (European Union, 2019). Οι περισσότεροι ρύποι από αυτούς αντιμετωπίζονται μέσω εγκαταστάσεων επεξεργασίας των λυμάτων. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται σε τέτοιες εγκαταστάσεις πραγματοποιείται σε στάδια. Το πρώτο στάδιο αποτελεί την προ επεξεργασία όπου αφαιρούνται φυσικά μεγάλα αντικείμενα από το απόβλητο. Έπειτα έρχεται η πρωτοβάθμια επεξεργασία, όπου τα λύματα διατηρούνται σε δεξαμενές για την να κατακαθίσουν στον πυθμένα τα βαρύτερα στερεά. Το υπερκείμενο, είτε απορρίπτεται στο περιβάλλον, είτε προχωράει σε δεύτερη επεξεργασία. Στη δευτερογενή επεξεργασία ή αλλιώς βιολογική επεξεργασία, αφαιρείται η οργανική ύλη των λυμάτων, τα αιωρούμενα στερεά, καθώς και κάποιοι μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, ιούς και παράσιτα και σε κάποιο βαθμό θρεπτικά συστατικά και χημικές ουσίες. Σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει και άλλο στάδιο επεξεργασίας, πιο αυστηρό, για την απομάκρυνση και των υπόλοιπων θρεπτικών ουσιών προτού γίνει η απόρριψη σε υδάτινα περιβάλλοντα. Επιπλέον τεχνικές θεραπείας, όπως η απολύμανση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομάκρυνση επιβλαβών για την δημόσια υγεία χημικών ουσιών ή και μικροοργανισμών (EEA, 2019). Τεχνικές διαχείρισης επικίνδυνων αποβλήτων, όπως αυτή που αναλύθηκε, καθώς και φυσικές, χημικές και θερμικές τεχνικές ή διήθηση μέσω του εδάφους, δεν αποτελούν πάντα αποτελεσματικές μεθόδους, ενώ σε

πολλές περιπτώσεις αποδεικνύονται δαπανηρές (Campro *et al.*, 2013; Masiá *et al.*, 2013; Mavriou *et al.*, 2020).

1.5.1 Βιοαπορρύπανση

Η βιομηχανία αποτελεί κύρια πηγή ρύπανσης και ο υδροφόρος ορίζοντας είναι ο βασικός αποδέκτης της. Για τον λόγο αυτό, μεγάλη είναι η ανάγκη της μείωσης της απόρριψης των λυμάτων στο περιβάλλον και ταυτόχρονα της μείωσης των ήδη υπαρχόντων λυμάτων σε αυτό (Campos-Mañás *et al.*, 2019; Papadakis *et al.*, 2015). Οι ξενοβιοτικές για το περιβάλλον ενώσεις, όπως είναι και τα συνθετικά γεωργικά φάρμακα, καθώς δεν είναι πάντα απορροφήσιμες από αυτό, ούτε εύκολα διασπώμενες από του αποικοδομητές των οικοσυστημάτων, αποτελούν μεγάλο κίνδυνο για το περιβάλλον. Αποτελεί, επομένως, ανάγκη εύρεσης αποτελεσματικών και οικονομικών τρόπων για την απορρύπανση των λυμάτων. Ο τρόπος που τηρεί όλα τα παραπάνω κριτήρια είναι η βιοαπορρύπανση (Philp *et al.* 2005).

Ως βιοαπορρύπανση χαρακτηρίζεται η χρήση μικροοργανισμών και συγκεκριμένα των μεταβολικών τους ικανοτήτων, για την αποδόμηση και την αποτοξικοποίηση των ρύπων. Η βιοαπορρύπανση μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε μεγάλη κλίμακα πέρα από το εργαστήριο, δίνοντας την δυνατότητα αντιμετώπισης πολλών διαφορετικών χημικών ρύπων ταυτόχρονα σε μεγάλες ποσότητες εξοικονομώντας χρόνο (Chandra R., 2015). Πρακτικά η διαδικασία αυτή αποτελεί μια επιτάχυνση της φυσικής διαδικασίας των αποικοδομητών του περιβάλλοντος διασπώντας τους ρύπους. Είναι μια φιλική για το περιβάλλον διαδικασία καθώς τα τελικά προϊόντα της, εάν είναι πλήρως αποτελεσματική, είναι νερό και διοξείδιο του άνθρακα (Philp *et al.* 2005).

Όπως όλες οι μέθοδοι, ο τρόπος αυτός δεν αποτελεί την τέλεια λύση, αλλά αποτελεί μέθοδο με αρκετά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Βασικό πρόβλημα αποτελεί η προτίμηση των μικροοργανισμών, που θα παίξουν ρόλο στην απορρύπανση, σε φυσικοχημικούς παράγοντες. Τέτοιος παράγοντας είναι η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, η βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου που σχετίζεται άμεσα με τη μορφή που βρίσκεται ο ρύπος, η θερμοκρασία και το pH, καθώς η βέλτιστη

θερμοκρασία και το pH που λειτουργεί ο κάθε μικροοργανισμός διαφέρει μεταξύ τους. Επιπλέον παράγοντες είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και η υγρασία του μέσου (εδάφους), ενώ βασικό ρόλο έχει και ο ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών για θρεπτικά συστατικά και χώρο (ICSS, 2006; ESTCP, 2007).

Η βιοαπορρύπανση μπορεί να επιτευχθεί σε στερεά και θάλασσα, ενώ μπορεί να γίνει με διαφορετικούς τρόπους. Ένας τέτοιος τρόπος είναι η χρήση επιπλέων μικροοργανισμών εμπλουτίζοντας τις ήδη υπάρχοντες βιοκοινότητες, ενώ ο άλλος είναι με την ενεργοποίηση των ήδη υπάρχοντων βιοκοινοτήτων. Οι δύο αυτοί τρόποι χαρακτηρίζονται ως βιοεμπλουτισμός και βιοενεργοποίηση αντίστοιχα (Adams *et al.*, 2015).

Ο βιοεμπλουτισμός χαρακτηρίστηκε αργότερα και από τον Spreight, J. G. (2017) ως μέθοδος αύξησης της αποτελεσματικότητας. Ο βιοεμπλουτισμός έχει ως στόχο την ενίσχυση των βιοκοινοτήτων που υπάρχουν ήδη στο υπόστρωμα, καθώς οι ήδη υπάρχοντες αποικοδομητές της βιοκοινότητας βρίσκονται σε μικρές ποσότητες, ενώ ταυτόχρονα δεν αποτελούν πάντα επαρκή άμυνα έναντι στους ρύπους που δέχονται στην κοινότητα. Με τον τρόπο αυτό, πέρα από τον αυξημένο πληθυσμό που προστίθενται στο υπόστρωμα, προστίθενται και διαφορετικά είδη μικροοργανισμών για να ξεπεραστούν τα παραπάνω προβλήματα. Αποτέλεσμα είναι η μείωση του χρόνου και του κόστους που ξοδεύουν αυτές οι κοινότητες για την αντιμετώπιση των ρύπων (Karanasios *et al.*, 2010; Sniegowski and Springael, 2015). Πολλοί είναι οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να διασπούν ρύπους, όπως και τα γεωργικά φάρμακα. Ορισμένοι από τους μικροοργανισμούς που έχουν μελετηθεί είναι το *Sphingobacterium sp.* C1B που αποδομεί το γεωργικό φάρμακο chlorpyrifos (Verma *et al.*, 2020), τα *Sphingomonas sp.* Strain CDS-1, *Enterobacter sp.* και *Cupriavidus sp.* ISTL7 για την αποδόμηση του carbofuran (Yan *et al.*, 2018; Ekram *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2019) και τα *Fomitopsis pinicola* και *Ralstonia pickettii*, τα οποία αποδομούν το DDT (Purnomo *et al.*, 2020).

Η βιοενεργοποίηση όπως αναφέρθηκε έχει σκοπό την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των ήδη υπάρχοντων μικροοργανισμών για να μπορούν να ανταπεξέλθουν στις απαιτήσεις που τίθενται με την αυξημένη ποσότητα ρύπων στα βιοοικοσυστήματα. Αυτή η μέθοδος πραγματοποιείται με την ρύθμιση των

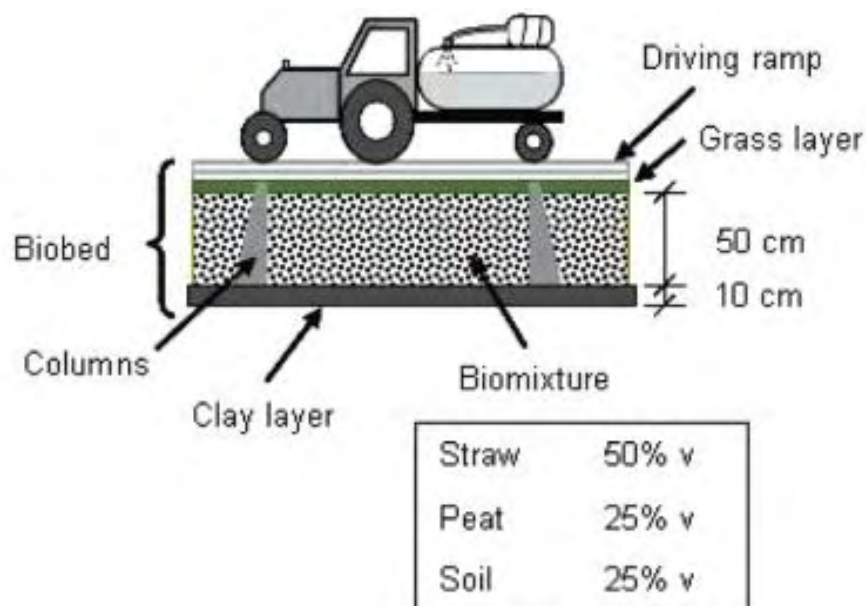
περιβαλλοντικών παραγόντων, ρυθμίζοντας είτε τις θρεπτικές ουσίες, δηλαδή πηγή φωσφόρου, αζώτου, άνθρακα και οξυγόνου, είτε το pH και τη θερμοκρασία, είτε όλα τα παραπάνω, σε περιοχές που έχει υποστεί ήδη ρύπους. Με τον τρόπο αυτό, διεγείρεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών με δυνατότητα διάλυσης των δραστικών ουσιών των ρύπων, καθώς επιδιώκεται με την ρύθμιση να επιτευχθούν οι τέλειες συνθήκες για την ανάπτυξή τους (Spreight J.G., 2017, Adams *et al.*, 2015).

1.5.2 Χρήση βιοκλινών για την βιοαπορρύπανση

Η χρήση μικροοργανισμών όπως βακτήρια και μύκητες που έχουν την ικανότητα να διασπούν τις ουσίες των γεωργικών φαρμάκων σε έδαφος των καλλιεργειών (Castillo and Torstensson, 2007; De Wilde *et al.*, 2009), θα μπορέσει ενδεχόμενος να αποτελέσει λύση στο πρόβλημα της ρύπανσης. Οι βιοκλίνες είναι μια από τις λύσεις αυτές. Αποτελούν κατάλληλο τρόπο για την πραγματοποίηση της αποδόμησης σε υψηλό επίπεδο, χρησιμοποιώντας μείγμα για την κατακράτηση των ρύπων με σκοπό να πραγματοποιηθεί η αποικοδόμηση αυτή. Οι πρώτες βιοκλίνες τέθηκαν σε εφαρμογή στην Σουηδία και έχει αποτελέσει τα τελευταία χρόνια το επίκεντρο για πολλές μελέτες και σε άλλες χώρες (Briceño *et al.*, 2020; Góngora-Echeverría *et al.*, 2017; Chin-Pampillo *et al.*, 2015).

Η χρήση των βιοκλινών είχε αρχικά ως σκοπό την αντιμετώπιση διαρροών από γεωργικά φάρμακα στις γεωργικές εκμεταλλεύσεις. Αποτελούνταν από τρεις διακριτούς ορίζοντες, σε έναν αργιλίου, ένα μεγάλο ορίζοντα αποτελούμενο από πληρωτικό υλικό και τέλος έναν ορίζοντα γρασιδιού, με σειρά από κάτω προς τα πάνω (Εικόνα 3). Το γρασίδι κάλυπτε την βιοκλίνη και έχει πολλαπλούς ρόλους. Αρχικά είχε βασικό ρόλο στην αύξηση της αποτελεσματικότητας ρυθμίζοντας τα επίπεδα υγρασίας, του οξυγόνου, ενώ λειτουργούσε και ως οπτικό μέσο για να γίνει αντιληπτό εάν υπήρχε διαρροή με υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων. Το πληρωτικό υλικό το οποίο αποτελούνταν από άχυρο, τύρφη και έδαφος σε αναλογίες 50:25:25 στη αρχική Σουηδική βιοκλίνη, είχε ως ρόλο την προσρόφηση του φαρμάκου και επίσης αποτελούσε ένα υπόστρωμα για τις αποικίες των αποικοδομητών που θα διασπούσαν τα γεωργικά φάρμακα αυτά. Τέλος το στρώμα

αργιλίου είχε καθαρά προστατευτικό και διαχωριστικό ρόλο μεταξύ του πληρωτικού υλικού και του υπεδάφους (Castillo *et al.*, 2008).



Εικόνα 3. Σύστημα βιοκλίνης. (Castillo *et al.*, 2008)

Οι βιοκλίνες διαχωρίζονται σε δύο ειδών, μία κατηγορία στην οποία ανήκει και η κλασική Σουηδική βιοκλίνη, η οποία ονομάζεται μη διαχωρισμένη και μια διαχωρισμένη. Η διαφορά τους βρίσκεται στο πυθμένα της βιοκλίνης που διαχωρίζει το πληρωτικό υλικό με το υπέδαφος. Στη μη διαχωρισμένη βιοκλίνη το επίπεδο αυτό δεν αποτελείται από αδιαπέραστο συνθετικό υλικό αλλά από αργίλιο και επίσης δεν συλλέγεται το έκπλυμα της. Στον άλλο τύπο, δηλαδή την διαχωρισμένη βιοκλίνη, το επίπεδο αυτό αποτελείται από ένα αδιαπέραστο συνθετικό υλικό, όπως πλαστικό ή τσιμέντο. Αυτός ο τρόπος προϋποθέτει την συλλογή του εκπλύματος το οποίο διαπερνά από ένα σύστημα αποχέτευσης με ένα επίπεδο χαλικιού ή άμμου κάτω από αργίλιο (Cooper *et al.*, 2016).

1.5.2.1 Σύσταση πληρωτικού υλικού

Το πληρωτικό υλικό αποτελεί κύριο συστατικό της βιοκλίνης, καθώς είναι το μέρος της στο οποίο πραγματοποιείται η βιοαποικοδόμηση. Αποτελεί το υλικό που φιλοξενεί την μικροπανίδα και ταυτόχρονα έχει τον ρόλο να κατακρατεί τα φυτοπροστατευτικά φάρμακα έτσι ώστε αυτά και οι μικροοργανισμοί να έρχονται σε επαφή. Η χρήση του το καθιστά κατάλληλο για την βιοαποικοδόμηση των φαρμάκων, διότι αποτελεί ταυτόχρονα φθινό και ανανεώσιμο σύστημα. Επίσης το πληρωτικό υλικό είναι αρκετά εύπλαστο ως προς τις αναλογίες των υλικών του αλλά και ως προς τα ίδια τα υλικά από τα οποία αποτελείται. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να διαφέρει σύμφωνα με το γεωργικό φάρμακο που καλείται να διασπαστεί και σύμφωνα με τους μικροοργανισμούς που καλείται να φιλοξενήσει (Omirou *et al.*, 2012; Karas *et al.*, 2015).

Η Σουηδική βιοκλίνη, όπως αναφέραμε και προηγουμένως, περιέχει πληρωτικό υλικό συγκεκριμένων αναλογιών. Πολλές άλλες όμως μελέτες πάνω στην δράση των βιοκλινών ως μέθοδος βιοαπορρύπανσης, έχουν πειραματιστεί σχετικά με την συνταγή του πληρωτικού υλικού (Omirou *et al.*, 2012; Karas *et al.*, 2015; De Wilde *et al.*, 2010). Οι μελέτες αυτές έχουν ως στόχο την εύρεση αποτελεσματικού πληρωτικού υλικού κάνοντάς το ακόμα πιο φθινό και ενδεχομένως αποτελεσματικότερο, αντικαθιστώντας την τύρφη που αποτελεί το ακριβότερο υλικό από τα τρία. Τα υπόλοιπα δύο υλικά παραμένουν σταθερά στις αλλαγές αυτών συνταγών, καθώς αποτελούν υλικά φθινά και αναντικατάστατα. Συγκεκριμένα το έδαφος προσφέρει ένα μεγάλο εύρος ειδών από μικροοργανισμούς και φυσικά μια ήδη υπάρχουσα ισορροπία μεταξύ μικροοργανισμών και θρεπτικών συστατικών. Το άχυρο από την άλλη προσδίδει την ικανότητα στο πληρωτικό υλικό να κατακρατεί τα γεωργικά φάρμακα, ενώ είναι αποδεδειγμένο ότι έχει μεγάλο ρόλο στη αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων, καθώς η αποδόμηση σχετίζεται άμεσα με το ποσοστό του αχύρου στο πληρωτικό υλικό (Castillo *et al.*, 2007).

Η αντικατάσταση της τύρφης είναι δύσκολη, διότι το υλικό που ενδέχεται να πάρει την θέση της πρέπει να προσδίδει στο πληρωτικό υλικό τις ίδιες ιδιότητες με αυτή. Οι ιδιότητες που προσδίδει η τύρφη στο πληρωτικό υλικό απαριθμούνται στα εξής, (1) ικανότητα προσρόφησης και διατήρησης της υγρασίας, (2) περιέχει

αυξημένη ποσότητα θρεπτικών, (3) έχει σχετικά χαμηλό pH. Αυτά είναι απαραίτητα και για την διευκόλυνση της ανάπτυξης μυκήτων, ιδιαίτερα αυτών της λευκής σήψης που συμμετέχει ενεργά στην αποικοδόμηση (Karanasios *et al.*, 2010). Ορισμένα υλικά που μπορούν να συμμετέχουν στην παραγωγή του πληρωτικού υλικού είναι τα κομποστοποιημένα (Kumari *et al.*, 2019; Papazlatani *et al.*, 2019; Karanasios *et al.*, 2010; Kadian *et al.*, 2008; Omirou *et al.*, 2012; Acosta-Sánchez *et al.*, 2020; Chin-Rampillo *et al.*, 2016). Σε ορισμένες περιπτώσεις, πληρωτικά υλικά έχουν κατασκευαστεί με περισσότερα από 3 υλικά όπως 70% τύρφη, 20% άχυρο, 5% έδαφος και 5% τμήματα κακάο (Tineke De Wilde *et al.*, 2010).

Στην παρούσα μελέτη, για το πληρωτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε, άχυρο, έδαφος και εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών *Pleurotus ostreatus*. Αφού το θρεπτικό υλικό έπαψε να είναι αποτελεσματικό για την καλλιέργεια του μύκητα, χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του πληρωτικού υλικού, καθώς έχει αποδειχθεί πως η ενσωμάτωσή του σε έδαφος και σε βιοκλίνες ακόμα και σε μικρές ποσότητες, αυξάνουν την αποτελεσματικότητα στην αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων (Kadian *et al.*, 2008; Karanasios *et al.*, 2010; Karas *et al.*, 2016). Οι μύκητες λευκής σήψης, όπου ανήκει και ο *P. ostreatus*, χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να αποδομούν την λιγνίνη, ένα πολυφαινολικό πολυμερές, εντός λιγνινοκυτταρικών υποστρωμάτων, όπως και το παστεριωμένο άχυρο. Η διάσπαση αυτή της λιγνίνης πραγματοποιείται με τελικά προϊόντα διοξειδίου του άνθρακα και νερό, μεταβολίτες που μπορούν να απορροφηθούν εύκολα από το περιβάλλον (S. B. Pointing, 2001).

Ο λόγος που χρησιμοποιούνται μύκητες λευκής σήψης στην απορρύπανση, είναι πως πολλά από τα γεωργικά φάρμακα περιέχουν ουσίες με φαινολικούς δακτυλίους, ενώ ταυτόχρονα τα ένζυμα των μυκήτων αυτών που διασπούν την λιγνίνη δεν είναι εξειδικευμένα. Με τον τρόπο αυτό μπορούν και τα γεωργικά φάρμακα να μεταβολιστούν σε διοξείδιο του άνθρακα και το νερό. Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στην διάσπαση ξενοβιοτικών ουσιών, όπως τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, με την χρήση οξειδωτικών ενζύμων που συμμετέχουν στην αποδόμηση της λιγνίνης (Tuomela and Hatakka, 2019). Οι μελέτες αυτές έχουν πραγματοποιηθεί σε μια πληθώρα μυκήτων της οικογένειας

λευκής σήψης, συμπεριλαμβανομένου και του *Pleurotus ostreatus* δίνοντας θετικά αποτελέσματα για την διάσπαση γεωργικών φαρμάκων όπως και το imazalil (Karas *et al.*, 2010).



Εικόνες 4 και 5. Καλλιέργεια *Pleurotus ostreatus* στην φάρμα Μπουλογιώργος, Τρίκαλα, Ελλάδα.

1.6 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον βιοεμπλουτισμό

Ο μύκητας *Mycosphaerella tassiana*, που χρησιμοποιήθηκε στις βιοκλίνες του πειράματος με βάση την ικανότητά του να διασπά το IMZ, ανήκει στο γένος των *Cladosporium*, και κλάση *Dothideomycetes* στο φύλο *Ascomycota* σύμφωνα με την βάση δεδομένων ταξινόμησης της UniProt. Μύκητες του γένους *Cladosporium* έχει βρεθεί πως έχουν την δυνατότητα για την διάσπαση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, όπως των πυρεθροϊδών (Chen *et al.*, 2011).

Το βακτήριο *Ochrobactrum sp.* χρησιμοποιήθηκε κατά τον βιοεμπλουτισμό στις βιοκλίνες, καθώς έχει την ιδιότητα να διασπά το FLD (Μανριου *et al.*, 2020). Ανήκει στην κλάση *Alpha-proteobacteria* και φύλο *Proteobacteria* σύμφωνα με την βάση δεδομένων ταξινόμησης της UniProt. Βακτήρια του γένους *Ochrobactrum* έχει

βρεθεί πως έχουν την δυνατότητα για την διάσπαση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, όπως το DDT (Pan *et al.*, 2017).

1.7 Σκοπός του πειράματος

Η βιομηχανία μεταποίησης αγροτικών προϊόντων χρησιμοποιεί τεράστιες ποσότητες γεωργικών φαρμάκων για την μείωση των απωλειών μεγάλων ποσοστών της σοδειάς από φυτοπαθογόνους οργανισμούς, ιδιαίτερα φυτοπαθογόνους μύκητες. Για τον λόγο αυτό, μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος, όπως το IMZ και το FLD, χρησιμοποιούνται ευρέως από τα συσκευαστήρια φρούτων, καταλήγοντας στην παραγωγή αποβλήτων ιδιαίτερα επιβαρυσμένων με υπολείμματα των εν λόγω γεωργικών φαρμάκων. Χωρίς ειδική επεξεργασία, η απόρριψη αυτών των αποβλήτων στο περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων γεωργικών φαρμάκων σε υπόγεια και επιφανειακά υδάτινα οικοσυστήματα. Όμως, η έλλειψη αποτελεσματικών και οικονομικά βιώσιμων μεθόδων διαχείρισης των υγρών αποβλήτων οδηγεί τις βιομηχανίες σε μη ορθολογικές πρακτικές όπως η απόρριψη σε παρακείμενους αγρούς.

Ο σκοπός λοιπόν της παρούσας διπλωματικής διατριβής, ήταν η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας βιοκλινών, εμπλουτισμένων με αποδομητικούς μικροοργανισμούς, για την απορρύπανση των μυκητοκτόνων FLD και IMZ από υγρά απόβλητα συσκευαστηρίων φρούτων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε στήλες έκπτυξης που εμπεριείχαν πληρωτικό υλικό αποτελούμενο από άχυρο, έδαφος και εξαντλημένο υπόστρωμα από καλλιέργεια του μύκητα *Pleurotus ostreatus* (ογκομετρική αναλογία 25:25:50 αντίστοιχα). Για τον βιοεμπλουτισμό χρησιμοποιήθηκε το μυκητιακό στέλεχος *Mycosphaerella tassiana*, που έχει την δυνατότητα αποδόμησης του IMZ, και το βακτήριο *Ochrobactrum sp.*, που έχει την δυνατότητα να αποδομεί το FLD. Στις στήλες έκπτυξης εφαρμόστηκε διάλυμα προσομοίωσης υγρών αποβλήτων συσκευαστηρίων φρούτων που βασίστηκε στις πρακτικές τους και σε μετρήσεις που είχαν γίνει σε απόβλητα προηγούμενων ετών. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας πραγματοποιήθηκε μέσω υπολογισμού του ποσοστού της συνολικής εφαρμοσμένης ποσότητας που εκπλύθηκε από την στήλη,

προσροφήθηκε στο πληρωτικό υλικό ή αποδομήθηκε από την μικροβιακή κοινότητα.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Προετοιμασία πληρωτικού υλικού της βιοκλίνης

Το πληρωτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από άχυρο, έδαφος και εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριού (Spend Mushroom Substrate, SMS). Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε συλλέχθηκε από φάρμα του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού (ΕΛΓΟ) «ΔΗΜΗΤΡΑ», στην Λάρισα και δεν είχε υποστεί πρότερη εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων. Το SMS ήταν ευγενική χορηγία της τοπικής μονάδας καλλιέργειας μανιταριού *Pleurotus ostreatus* από τη φάρμα του κυρίου Μπουλογιώργου στα Τρίκαλα Θεσσαλίας. Το άχυρο συλλέχθηκε από τοπική κτηνοτροφική μονάδα. Αρχικά το άχυρο και το SMS τεμαχίστηκαν σε τμήματα των 2-3cm με χρήση πολυκόφτη multi και το έδαφος κοσκινίστηκε για την απομάκρυνση χαλικιών και φυτικών ιστών. Το έδαφος, το άχυρο και το εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριού αναμίχθηκαν σε ογκομετρικές αναλογίες 25%-25%-50% αντίστοιχα για την παρασκευή του πληρωτικού υλικού. (Πίνακας 2) Προσαρμογή της υγρασίας και αερισμός με ανάδευση του κύριου όγκου του πληρωτικού υλικού πραγματοποιούνταν τακτικά, για ένα μήνα με στόχο την προσαρμογή και εγκαθίδρυση της μικροβιακής κοινότητας.

Πίνακας 2. Το pH, η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και άζωτο και ο λόγος του άνθρακα προς το άζωτο των επιμέρους συστατικών και του βιο-οργανικού μείγματος. Τα παραπάνω δεδομένα πάρθηκαν από την μελέτη των Karas *et al.* (2015), καθώς χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες πρώτες ύλες.

Υποστρώματα	pH	Ποσοστό περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα (C)	Ποσοστό συνολικού αζώτου (N)	C/N
Έδαφος	7,55	1,05%	0,13%	8,1
Άχυρο	7,15	79,2%	0,80%	97,8
SMS	6,83	71%	1,20%	59,2
Έδαφος/Άχυρο/SMS	7,10	29,3%	0,30%	97,7

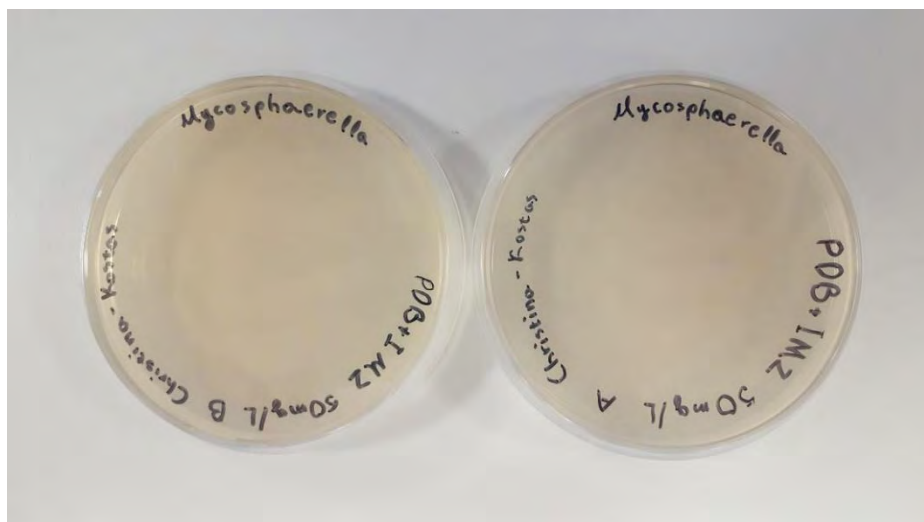
(25:25:50)				
------------	--	--	--	--

2.2 Προετοιμασία εμβολίων για τον βιοεμπλουτισμό του πληρωτικού υλικού

2.2.1 Καλλιέργεια του μύκητα *Mycosphaerella tassiana*

Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες είναι το θρεπτικό υπόστρωμα ζυμού πατάτας (Potato Dextrose Broth, PDB). Για την παρασκευή του PDB προετοιμάστηκε ζυμός πατάτας με 400 gr κομμένης πατάτας και 1L απιονισμένο νερό. Ο ζυμός φιλτραρίστηκε από τα στερεά κομμάτια πατάτας και η θρεπτική του ισχύς ενισχύθηκε με την προσθήκη 20 gr σουκρόζης. Τέλος, προστέθηκαν 15gr άγαρ και ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά. Με το πέρας της αποστείρωσης ακολούθησε προσθήκη υδατικού διαλύματος του εμπορικού σκευάσματος Fungazil™ 50 EC με στόχο τελική συγκέντρωση 50 mg / L και επίστρωση σε τρυβλία υπό αποστειρωμένες συνθήκες.

Αφότου στερεοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα, τα τρυβλία εμβολιάστηκαν με 200 μl από υγρή καλλιέργεια του *M. tassiana* σε PDB εμπλουτισμένο με 50 mg/L IMZ και επωάστηκαν στους 25°C (Εικόνα 6). Η υγρή καλλιέργεια του μύκητα που χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο, παρακολουθούνταν στενά και ανακαλλιεργούνταν με περιοδικότητα εβδομάδας προκειμένου να αποφευχθεί δραματική μείωση των θρεπτικών και του μυκητοκτόνου, ούτως ώστε ο μύκητας να παραμένει σε διαρκή αποδομητική κατάσταση.

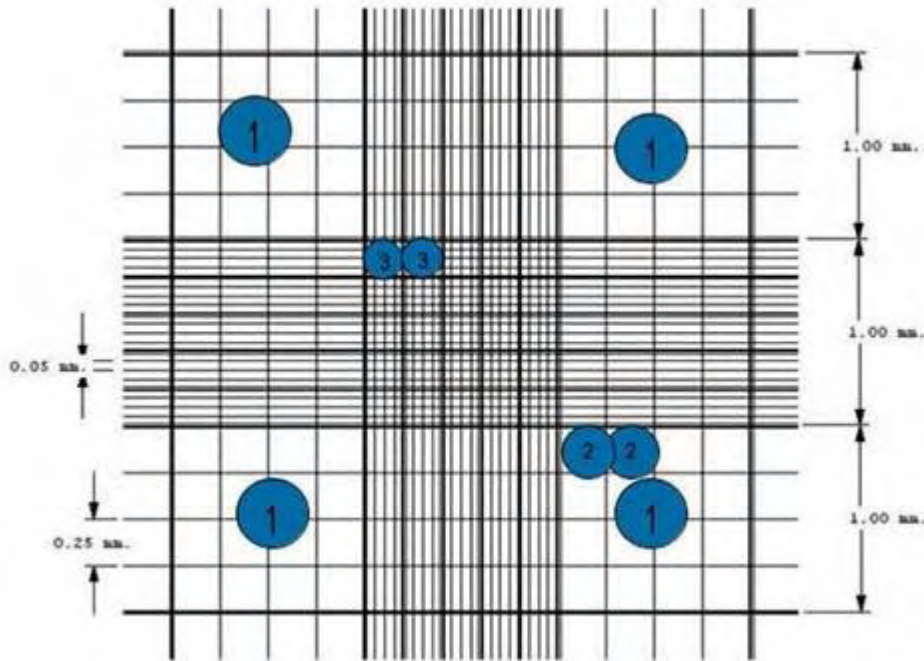


Εικόνα 6. Τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDB με 50 mg / L IMZ, εμβολιασμένα με υγρή καλλιέργεια του μύκητα *Mycosphaerella tassiana*,.

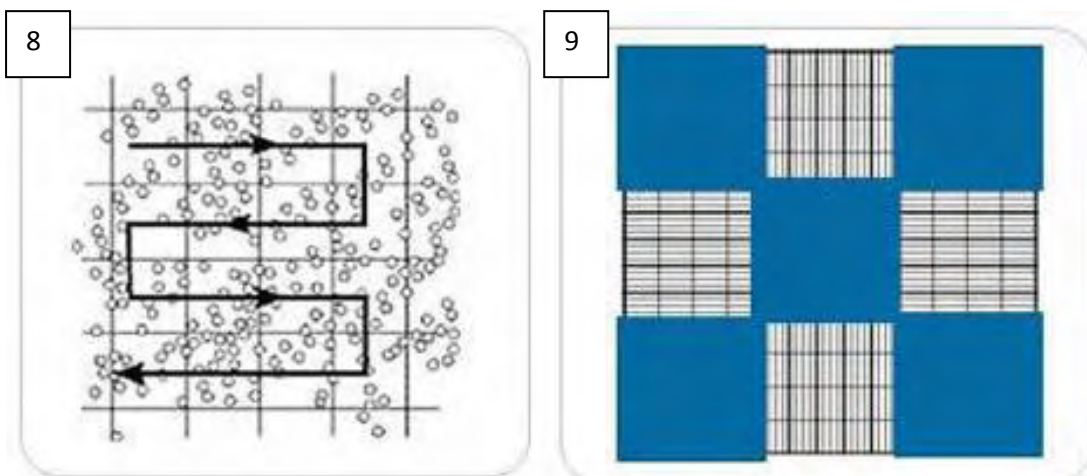
Συλλογή των κονιδίων του μύκητα πραγματοποιήθηκε 12 ημέρες από τον εμβολιασμό των τρυβλίων. Αρχικά προστέθηκε απιονισμένο αποστειρωμένο νερό (dH₂O) στα τρυβλία και ακολούθησε αποκόλληση των κονιδίων με ελαφρύ ξύσιμο της επιφάνειας της καλλιέργειας. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια φυγοκέντρου τύπου falcon (50 ml) και φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά, στα 8500 rpm και στους 15°C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε με προσοχή, το ίζημα επαναδιαλύθηκε με έντονη ανάδευση σε 5 ml διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 0,85% και το δείγμα αποθηκεύτηκε στους 4°C.

Η καταμέτρηση των κονιδίων του μύκητα πραγματοποιήθηκε σε πλάκα Neubauer. Η πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο) είναι μια παχιά κρυστάλλινη αντικειμενοφόρος πλάκα με διαστάσεις 30 x 70 mm και πάχος 4 mm. Η καταμέτρηση πραγματοποιείται στο κέντρο της πλάκας, σε ένα θάλαμο, ο οποίος χωρίζεται σε τρία μέρη, το κεντρικό μέρος του όπου έχει χαραχθεί το πλέγμα καταμέτρησης και δύο ακόμα περιοχές που μπορούν να φορτωθούν ανεξάρτητα. Το πλέγμα της περιοχής καταμέτρησης έχει διαστάσεις 3 mm x 3 mm και έχει 9 τετραγωνικές υποδιαίρεσεις πλάτους 1 mm (Εικόνα 7-1). Τα 4 γωνιακά τετράγωνα της περιοχής καταμέτρησης υποδιαιρούνται επιπλέον σε 16 επιμέρους τετράγωνα πλάτους 0.25 mm για την καταμέτρηση κυττάρων (Εικόνα 7-2)(Dhurba Giri, 2020). Το κεντρικό τετράγωνο χωρίζεται σε 25 επιμέρους τετράγωνα αντί για 16, με πλάτος 0.2 mm. Επίσης σε αυτό πραγματοποιείται επιπλέον υποδιαίρεση και των

τετραγώνων πλάτους 0.2 mm, σε 16 υποδιαίρεσεις το καθένα (Εικόνα 7-3), τα οποία χρησιμοποιούνται για καταμέτρηση των κυττάρων. Η καταμέτρηση πραγματοποιείται μόνο σε τετράγωνα που απεικονίζονται με μπλε στην εικόνα 9. Για να αποφευχθούν τα λάθη κατά την καταμέτρηση ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις, η καταμέτρηση πραγματοποιείται με συγκεκριμένη φορά (Εικόνα 8)(Dhurba Giri, 2020).



Εικόνα 7. Πλέγμα καταμέτρησης του κεντρικού θαλάμου της πλάκας Newbauer. Με τον αριθμό 1 απεικονίζονται τα τετράγωνα πλάτους 1 mm. Με τον αριθμό 2 απεικονίζονται τα τετράγωνα με πλάτος 0.25 mm. Με τον αριθμό 3 απεικονίζονται τα τετράγωνα με 0.2 mm πλάτος.



Εικόνα 8. Παράδειγμα φοράς καταμέτρησης σε υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων.

Εικόνα 9. Απεικόνιση με μπλε των τετραγώνων του πλέγματος που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για καταμέτρηση.

Αρχικά, τοποθετήθηκε μια καλυπτρίδα στην επιφάνεια της πλάκας Neubauer και με πιπέτα ακριβείας μεταφέρθηκαν 10 μl του εναιωρήματος των κονιδίων σε κάθε έναν από τους θαλάμους μέτρησης. Πριν από κάθε μέτρηση πραγματοποιούνταν πολύ καλή ανάδευση του εναιωρήματος προκειμένου να διασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή των κονιδίων. Στη συνέχεια τοποθετήσαμε την πλάκα σε οπτικό μικροσκόπιο και μετρήσαμε τα κονίδια.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των κονιδίων στο αρχικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$M \times Df \times 10^4$$

Όπου M: ο μέσος αριθμός των κονιδίων στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα μέτρησης και Df (Dilution factor) : συντελεστής αραίωσης

Για την παρασκευή του εμβολίου πραγματοποιήθηκε αραίωση του εναιωρήματος κονιδίων σε τελικό όγκο 50 ml με συγκέντρωση 19.5×10^5 κονίδια /ml.

2.2.2 Καλλιέργεια του βακτηρίου *Ochrobactrum sp.*

Το βακτήριο που αποδομεί το FLD καλλιεργήθηκε σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα για την παρασκευή του οποίου ήταν απαραίτητη η προετοιμασία τεσσάρων επιμέρους διαλυμάτων με την παρακάτω σύνθεση.

1) Διάλυμα 1^ο

- 6,33 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 3,09 gr KH_2PO_4
- 0,21 gr KCl
- 350 ml dH_2O

2) Διάλυμα 2^ο

- 0,29 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- 0,17 gr $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,263 gr $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,008 gr $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 220 ml dH_2O

3) Διάλυμα 3°

- 0,0143 gr $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,0034 gr Na_2SeO_3
- 0,0143 gr $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,0145 gr $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,0012 gr H_3BO_3
- 10 ml dH_2O

Όλα τα παραπάνω διαλύματα αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά στους 121°C

4) Διάλυμα 4°

- 2ml του εμπορικού σκευάσματος Scholar 2,5 FS
- 18 ml dH_2O

Το 4° διάλυμα αποστειρώθηκε με χρήση φίλτρου σύριγγας $0.22 \mu\text{m}$ υπό ασηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένο σκεύος. Η τελική συγκέντρωση του FLD στο τέταρτο διάλυμα επιβεβαιώθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Η παρασκευή του θρεπτικού μέσου πραγματοποιήθηκε με ανάμιξη:

- 300 ml από το διάλυμα 1
- 192 ml από το διάλυμα 2
- 0,25 ml από το διάλυμα 3 (των ιχνοστοιχείων)
- Κατάλληλο όγκο του τέταρτου διαλύματος για την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 150 mg / L
- dH_2O για την δημιουργία του τελικού όγκου 500 ml.

Οι καλλιέργειες του βακτηρίου παρακολουθούνταν στενά και ανακαλλιεργούνταν με περιοδικότητα εβδομάδας προκειμένου να αποφευχθεί δραματική μείωση των

θρεπτικών και του μυκητοκτόνου fludioxonil ούτως ώστε το βακτηριακό στέλεχος να παραμένει σε διαρκή αποδομητική κατάσταση.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ζώντων βακτηριακών κυττάρων (Colony Forming Units, cfu) στο σύνολο της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με επίστρωση σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Lauria Bertani (LB) διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ποσότητας της καλλιέργειας με στόχο την ανάπτυξη διακριτών αποικιών για την εύκολη καταμέτρησή τους.

Για τον υπολογισμό των cfu / ml χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$N * Df / V$$

Όπου N: ο αριθμός των αποικιών

Df: ο συντελεστής αραιώσης

V: ο όγκος που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των τρυβλίων

Το τελικό εμβόλιο της καλλιέργειας του *Ochrobactrum sp.* είχε όγκο 380 ml, και συγκέντρωση $650 * 10^8$ cfu/ml.

2.2.3 Βιοεμπλουτισμός του πληρωτικού υλικού

Τα παραπάνω εμβόλια εφαρμόστηκαν στο βιομίγμα μέσω ψεκασμού. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες ώστε να προσαρμοστούν οι αποδομητικοί μικροοργανισμοί στο νέο περιβάλλον (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Εμβολιασμός του βιο-οργανικού μίγματος με τις καλλιέργειες του μύκητα *Mycosphaerella tassiana* και του βακτηρίου *Ochrobactrum sp.*

2.3 Πειραματικός σχεδιασμός στηλών έκπλυσης

Για την αξιολόγηση της ικανότητας βιοαπορρύπανσης αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων χρησιμοποιήθηκαν τρεις πλαστικοί σωλήνες PVC μήκους 90 cm και εσωτερικής διαμέτρου 12,5 cm. Η βάση του κάθε σωλήνα ήταν κλεισμένη με συρμάτινο πλέγμα για την διατήρηση του πληρωτικού υλικού εντός του σωλήνα. Στον πυθμένα των στηλών, τοποθετήθηκε ένα στρώμα πάχους 7 cm από λευκό και καλά πλυμένο χαλίκι που συμβάλλει στην διατήρηση του συνόλου του υποστρώματος, εντός της στήλης, ακολούθως τοποθετήθηκε στρώμα πάχους 80 cm πληρωτικού υλικού βιο-εμπλουτισμένου με τους υπό μελέτη αποδομητικούς μικροοργανισμούς, και τέλος, ένα ακόμα στρώμα πάχους 3 cm πλυμένου χαλικιού για να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη κατανομή του αποβλήτου στην στήλη. Οι στήλες έκπλυσης τοποθετήθηκαν σε όρθια θέση σε προκαθορισμένα σημεία στον τοίχο. Στην εκροή των στηλών τοποθετήθηκαν δοχεία χωρητικότητας 5 L και χωνιά για την συλλογή του εκπλύματος έπειτα από την εφαρμογή του αποβλήτου (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Τρεις στήλες έκπλυσης σταθεροποιημένες στον τοίχο σε όρθια θέση. Στην εικόνα φαίνονται τα χωνιά και τα δοχεία συλλογής του εκπλύματος, οι περισταλτικές αντλίες στον τοίχο, και το δοχείο των 15 L με το υγρό απόβλητο.

Το υγρό απόβλητο που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία, αποτελεί διάλυμα προσομοίωσης που βασίστηκε στις πρακτικές των συσκευαστηρίων φρούτων και σε μετρήσεις που είχαν γίνει σε απόβλητα προηγούμενων ετών. Στην προκειμένη περίπτωση, το υγρό απόβλητο είναι υδατικό διάλυμα των εμπορικών σκευασμάτων Fungazil 500 EC (δ.ο. imazalil) και Scholar 230 EC (δ.ο. fludioxonil) με στόχο τελική συγκέντρωση των imazalil και fludioxonil 0.077 g/L και 0.047 g/L αντίστοιχα. Το απόβλητο τοποθετήθηκε σε δοχεία των 15 L και η εφαρμογή του στις 3 στήλες έκπλυσης πραγματοποιήθηκε με την χρήση περισταλτικών αντλιών και χρονοδιακόπτη, με στόχο την ταυτόχρονη και ενιαία εφαρμογή του στην κορυφή των στηλών. Η εφαρμογή του αποβλήτου έγινε για 100

ημέρες, με περιοδικότητα τεσσάρων ωρών, διάρκεια 5 λεπτά κάθε φορά και ροή 16,5 ml / λεπτό. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε μηχανισμός ανάδευσής του αποβλήτου για 30 λεπτά πριν από κάθε εφαρμογή, για την διατήρηση της ομοιογένειάς του. Ο όγκος του αποβλήτου συμπληρώνονταν εβδομαδιαία.

Κάθε τρεις ημέρες πραγματοποιούνταν συλλογή του εκπλύματος, ογκομέτρηση και λήψη δείγματος σε πλαστικά μπουκαλάκια των 200 ml. Δείγματα λαμβάνονταν και από το υγρό απόβλητο, πριν και μετά την συμπλήρωσή του όγκου του. Τέλος, με το πέρας της πειραματικής περιόδου, οι στήλες έκπλυσης αποσυναρμολογήθηκαν και τεμαχίστηκαν σε 3 επίπεδα (0-20 cm, 20-50 cm και 50-80 cm από την κορυφή των στηλών). Ποσότητα πληρωτικού υλικού από κάθε ένα από τους τρεις οριζόντες συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20 °C έως ότου αναλυθούν για υπολείμματα των IMZ και FLD.

2.4 Εκχύλιση των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων

2.4.1 Εκχύλιση από τα δείγματα εκπλύματος και αποβλήτων

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε και για τα δύο είδη δειγμάτων είναι η εκχύλιση υγρού-υγρού, με χλωροφόρμιο. Αρχικά σε διαχωριστικές χοάνες των 100 ml τοποθετήθηκαν 5 ml δείγματος και 20 ml οργανικού διαλύτη. Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 20 λεπτά. Η χοάνη επαναφέρθηκε σε όρθια θέση, αφέθηκε σε ηρεμία για 5 λεπτά για να διαχωριστούν η υδατική από την οργανική φάση, και η οργανική φάση συλλέχθηκε σε κωνικές φιάλες. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμη μια φορά για την εξασφάλιση της εκχύλισης του συνόλου των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων από το δείγμα. Για την περαιτέρω απομάκρυνση του ύδατος από την οργανική φάση που συλλέχθηκε παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε άνυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$), το οποίο χρησιμοποιείται συχνά ως ξηραντικό μέσο στην οργανική χημεία. Τέλος, η οργανική φάση μεταφέρθηκε σε σφαιρικές φιάλες και τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων ανακτήθηκαν μέσω εξάτμισης του οργανικού διαλύτη με χρήση περιστροφικού

εξατμιστήρα (Rotary Evaporator). Η επαναδιάλυση των δραστικών ουσιών έγινε σε 2 ml μεθανόλης (MeOH). Το τελικό εκχύλισμα διηθήθηκε δια μέσου φίλτρου σύριγγας PTFE με μέγεθος πόρων 0.45 μm, προτού αναλυθεί σε σύστημα HPLC-PDA όπως περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 12. Διαχωριστικές χοάνες στις οποίες έχει προστεθεί το δείγμα και το χλωροφόρμιο. Πίσω από τις χοάνες, φαίνεται το ο περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotary Evaporator) και η αντλία κενού στα δεξιά του.

2.4.2 Εκχύλιση από δείγματα πληρωτικού υλικού

Η εκχύλιση των δύο γεωργικών φαρμάκων από το πληρωτικό υλικό πραγματοποιήθηκε με διαφορετικό πειραματικό πρωτόκολλο. Για την εκχύλιση του IMZ, προστέθηκαν 5 gr πληρωτικού υλικού, 10 ml MeOH και 1 ml υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) σε σωλήνα φυγοκέντρησης τύπου falcon και αναδεύτηκαν εντόνως για 30 λεπτά, στα 300 rpm με χρήση περιστροφικού ανακινητήρα. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά, στα 7500 rpm και το καθαρό υπερκείμενο συλλέχθηκε σε γυάλινα μπουκαλάκια. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε με ακόμη 10 ml MeOH. Με το πέρας και της δεύτερης φυγοκέντρησης, τα καθαρά υπερκείμενο

προστέθηκε σε αυτό του προηγούμενου κύκλου και αποθηκεύτηκε στους -20 °C έως ότου αναλυθεί.

Για την εκχύλιση του FLD, 5 gr πληρωτικού υλικού αναμείχθηκαν με 20 ml MeOH σε κωνική φιάλη. Το μείγμα αναδεύθηκε εντόνως για μια ώρα στα 300 rpm, σε περιστροφικό ανακινητήρα και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στις 7500 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Τα τελικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες διηθήθηκαν μέσω φίλτρου σύριγγας με μεμβράνη PTFE και πόρους διαμέτρου 0,45 μm προτού αναλυθούν σε σύστημα HPLC-PDA.

2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων σε σύστημα HPLC-PDA

Η ανάλυση των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), εξοπλισμένο με στήλη Analytical Shim-pack VP-ODS (150 mm Length x 4.6 mm I.D.) (Shimadzu), προστήλη Guard Column Shim-pack GVP-ODS (5mm Length x 2mm I.D.), και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων Prominence – Diode Array Detector SPD-M20A (Shimadzu). Στις περιπτώσεις όπου ακολουθήθηκε κοινό πειραματικό πρωτόκολλο εκχύλισης των υπολειμμάτων των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων (εκχύλιση υγρού - υγρού) χρησιμοποιήθηκε κινητή οργανική φάση αποτελούμενη από MeOH και ddH₂O με 0.44% NH₃ σε ογκομετρικές αναλογίες 65% : 35%, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό και των 2 γεωργικών φαρμάκων. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι χρόνοι κατακράτησης των υπολειμμάτων των FLD και IMZ ήταν 8.1 και 19.5 λεπτά αντίστοιχα. Στις περιπτώσεις όπου ακολουθήθηκαν διαφορετικά πειραματικά πρωτόκολλα (εκχύλιση στερεού-υγρού), χρησιμοποιήθηκαν κινητές φάσεις αποτελούμενες από MeOH και H₂O σε ογκομετρική αναλογία 70 : 30 για το FLD, και από MeOH και ddH₂O με 0.25% NH₃ σε ογκομετρικές αναλογίες 80% : 20% για το IMZ. Οι χρόνοι κατακράτησης των FLD και IMZ στις προαναφερθείσες συνθήκες είναι 5.8 και 5.4 λεπτά αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ροή της κινητής φάσης

ήταν 1 ml / λεπτό και η ανίχνευση των FLD και IMZ έγινε στα 207 και 204 nm αντίστοιχα.

Απαραίτητη προϋπόθεση για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων ήταν η προετοιμασία πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν με χρήση αναλυτικής δραστικής ουσίας υψηλής καθαρότητας των FLD και IMZ, πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1000 mg/L, από τα οποία στην συνέχεια προετοιμάστηκε σειρά διαλυμάτων σε MeOH με συγκεντρώσεις 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05 και 0.01 mg / L.

2.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για τις στατιστικές αναλύσεις των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ανάλυση t-test. Το t-test ανήκει στις παραμετρικές στατιστικές μεθόδους, οι οποίες αναφέρονται σε τεχνική που καθορίζει την πιθανότητα κατανομής των πιθανοτήτων των μεταβλητών και δίνει συμπεράσματα σχετικά με τις παραμέτρους της κατανομής. Το t-test μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν τα δείγματα ικανοποιούν τις συνθήκες κανονικότητας, ίσης διακύμανσης και ανεξαρτησίας. Διαχωρίζεται σε δύο κατηγορίες, στο ανεξάρτητο t-test, όπου οι δύο ομάδες που συγκρίνονται είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους, και στο εξαρτημένο t-test, όπου αυτές οι ομάδες εξαρτώνται η μία από την άλλη. Συνήθως αυτού του είδους η στατιστική ανάλυση χρησιμοποιείται σε ανεξάρτητες μεταβλητές, όπως και στο παρόν πείραμα (Kim T.K., 2015).

3. Αποτελέσματα

Η ικανότητα του υπό μελέτη πληρωτικού υλικού βιοκλινών να απομακρύνει τα fludioxonil (FLD) και imazalil (IMZ) που περιέχονται σε απόβλητα συσκευαστηρίων φρούτων, εκτιμήθηκε μέσω πειράματος στηλών έκπλυσης. Η αποτελεσματικότητα των στηλών αξιολογήθηκε μέσω υπολογισμού του ισοζυγίου μάζας μεταξύ (1) της ποσότητας των γεωργικών φαρμάκων που εφαρμόστηκε στις στήλες και (2) της ποσότητας που εκπλύθηκε, (3) που κατακρατήθηκε και (4) που αποδομήθηκε κατά την διάρκεια της πειραματικής περιόδου.

3.1 Υγρό απόβλητο

Η συνολική ποσότητα των γεωργικών φαρμάκων που εφαρμόστηκε στις στήλες έκπλυσης υπολογίστηκε από μετρήσεις του υγρού αποβλήτου κατά την εβδομαδιαία αναπλήρωσή του και παρουσιάζεται στο Πίνακα 3. Η αύξηση της ποσότητας των γεωργικών φαρμάκων που παρατηρείται μπορεί να οφείλεται σε σφάλμα είτε κατά την παρασκευή είτε κατά την δειγματοληψία του αποβλήτου.

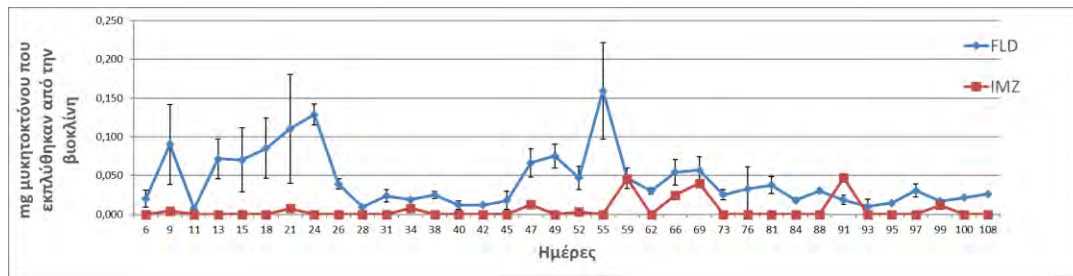
Πίνακας 3. Οι τιμές σε mg των γεωργικών φαρμάκων που εφαρμόστηκαν στις στήλες έκπλυσης σε κάθε χρονικό σημείο αναπλήρωσης του υγρού αποβλήτου και η συνολική ποσότητα που εφαρμόστηκε. Οι τιμές της έναρξης είναι μικρότερες λόγω σφάλματος κατά την παρασκευή του αποβλήτου.

	IMZ (mg)	FLD (mg)
Έναρξη	5,19	5,03
1 ^η βδομάδα	100,7	54,3
2 ^η βδομάδα	178,5	68,5
3 ^η βδομάδα	170,9	65,0
4 ^η βδομάδα	153,5	50,9
5 ^η βδομάδα	175,1	71,2

6 ^η βδομάδα	207,4	84,9
7 ^η βδομάδα	169,2	77,8
8 ^η βδομάδα	180,5	84,7
9 ^η βδομάδα	168,3	66,3
10 ^η βδομάδα	184,0	54,2
11 ^η βδομάδα	202,9	76,6
12 ^η βδομάδα	197,1	145,3
13 ^η βδομάδα	187,4	135,4
14 ^η βδομάδα	218,1	95,2
Σύνολο	2498,7	1135,5

3.2 Έκπλυμα από τις βιοκλίνες

Τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων που εκπλύθηκαν από τις στήλες απεικονίζονται στο Γράφημα 1. Παρατηρούμε πως η ανίχνευση των γεωργικών φαρμάκων στο έκπλυμα των στηλών παραμένει σε χαμηλά επίπεδα καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής επώασης. Η συνολική ποσότητα που εκπλύθηκε αντιστοιχεί στο 0,13% και 0,01% της συνολικής ποσότητας των FLD και IMZ που εφαρμόστηκε. Το FLD ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερες ποσότητες στο υγρό του εκπλύματος σε σύγκριση με το IMZ, από τις πρώτες κιάλας ημέρες της πειραματικής επώασης, με μέγιστη ποσότητα (0.6 mg) να εμφανίζεται κατά την 55^η ημέρα. Από την άλλη, υπολείμματα του IMZ κατά κύριο λόγο δεν ανιχνεύθηκαν στο έκπλυμα των στηλών ή ανιχνεύθηκαν σε εξαιρετικά χαμηλές ποσότητες (< 0.05 mg) κατά την 9^η, 21^η, 34^η, 47^η, 52^η, 59^η, 66^η, 69^η, 91^η και 99^η ημέρα της πειραματικής διάρκειας.

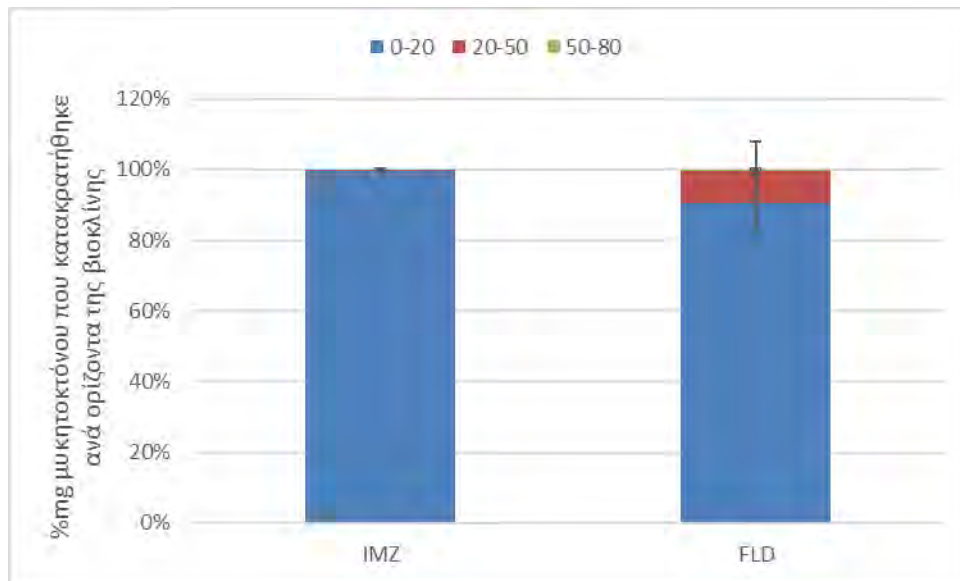


Γράφημα 1. Οι ποσότητες των fludioxonil (FLD) και imazalil (IMZ) που εκπλύθηκαν από τις στήλες έκπλυσης (άξονας y) ως προς την ημέρα συλλογής του εκπλύματος (άξονας x). Κάθε σημείο αποτελεί μέσσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση των τιμών αυτών.

3.3 Υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων στο πληρωτικό υλικό

Η κατανομή των υπολειμμάτων των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων εξετάστηκε σε τρεις οριζόντες του υποστρώματος (0-20, 20-50 και 50-80 cm από την κορυφή των στηλών). Τα αποτελέσματα, εκφρασμένα σε ποσοστά σε σχέση με την ποσότητα του γεωργικού φαρμάκου που εφαρμόστηκε στις στήλες, απεικονίζονται στο Γράφημα 2.

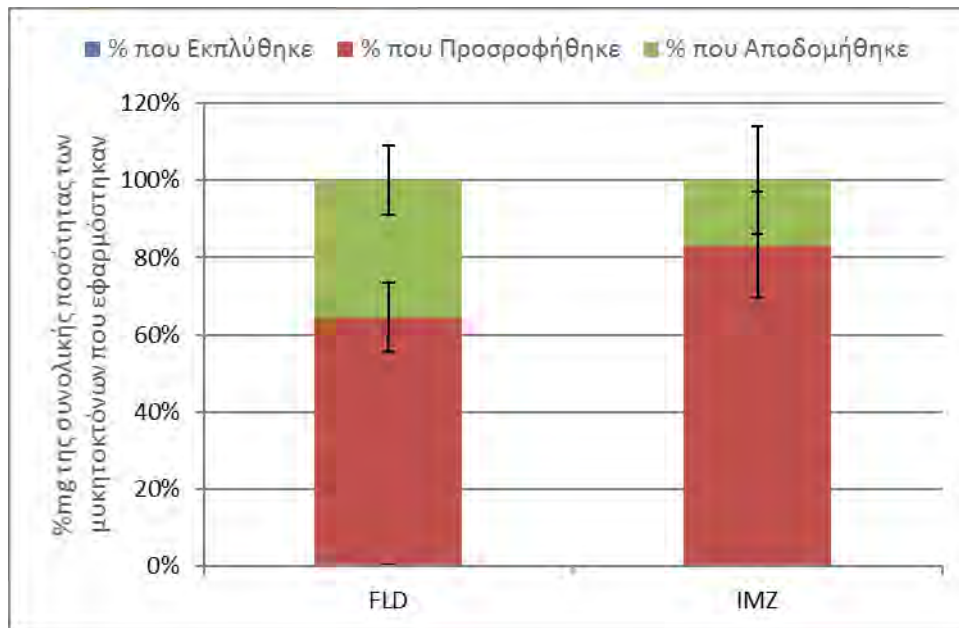
Όπως φαίνεται στο Γράφημα 2, τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων κατακρατήθηκαν κυρίως στον πρώτο οριζόντα της στήλης (0-20 cm), ενώ μικρότερες ποσότητες ανιχνεύθηκαν στους οριζόντες 20-50 και 50-80 cm. Αναλυτικότερα, όσον αφορά το FLD, στο πληρωτικό υλικό των στηλών συνολικά κατακρατήθηκε το 64.4% της συνολικής ποσότητας που εφαρμόστηκε. Από αυτό το ποσοστό, το 90.5% ανιχνεύθηκε στον 0-20 οριζόντα, το 9.1% στον 20-50 οριζόντα και το 0.4% στον 50-80 οριζόντα. Από την άλλη, από τη συνολική ποσότητα του IMZ που εφαρμόστηκε στην στήλη, κατακρατήθηκε το 83.3%. Το IMZ δεν εμφάνισε μεγάλη κινητικότητα στο εσωτερικό της στήλης, καθώς η συντριπτική πλειοψηφία της ποσότητας που προσροφήθηκε (99.7%) ανιχνεύθηκε στον 0-20 οριζόντα και το υπόλοιπο 0.3% στον 20-50 οριζόντα. Το IMZ δεν ανιχνεύθηκε καθόλου στον κατώτερο οριζόντα της στήλης.



Γράφημα 2. Το ποσοστό των γεωργικών φαρμάκων imazalil (IMZ) και fludioxonil (FLD) που ανιχνεύτηκαν στο πληρωτικό υλικό σε σχέση με τον ορίζοντα στο οποίο βρέθηκαν. Κάθε τιμή αποτελείται από τον μέσο όρο των τριών (επαναλήψεων) \pm την τυπική απόκλιση.

3.4 Ανάλυση του ισοζυγίου μάζας

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω αποτελέσματα, υπολογίστηκε το ποσοστό αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων στο πληρωτικό υλικό, μέσω υπολογισμού του ισοζυγίου μάζας μεταξύ της ποσότητας που εφαρμόστηκε και της ποσότητας που εκπλύθηκε και κατακρατήθηκε από τις στήλες έκπλυσης. Η τύχη των FLD και IMZ μετά την εφαρμογή τους στις στήλες έκπλυσης απεικονίζεται στο Γράφημα 3. Όσον αφορά το FLD, παρατηρούμε ότι από την συνολική ποσότητα που εφαρμόστηκε, το 0.14% ανιχνεύθηκε στο έκπλυμα των στηλών, το 64.42% κατακρατήθηκε στο πληρωτικό υλικό και το 35.44% αποδομήθηκε. Από την άλλη, το IMZ σχεδόν ολοκληρωτικά προσροφήθηκε στο πληρωτικό υλικό, με το 83.28% να ανιχνεύεται κατά κύριο λόγο στον 0-20 ορίζοντα της στήλης, το 16.7% να αποδομείται από την μικροβιακή κοινότητα και μόλις το 0.01% να διαφεύγει μέσω του εκπλύματος.



Γράφημα 3. Το ποσοστό των γεωργικών φαρμάκων fludioxonil (FLD) και imazalil (IMZ) που εφαρμόστηκε στις στήλες και εκπλύθηκε, αποδομήθηκε ή κατακρατήθηκε από το πληρωτικό υλικό των στηλών. Κάθε τιμή αποτελεί τον μέσο όρο των τριών στηλών (επαναλήψεις) \pm τυπική απόκλιση.

4 Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων imazalil και fludioxonil, μέσω πειράματος στηλών έκπλυσης βιοεμπλουτισμένων με αποδομητικούς μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων συσκευαστηρίων φρούτων με τα εν λόγω μυκητοκτόνα είναι το μυκητιακό στέλεχος *Mycosphaerella tassiana* που διασπά το imazalil (IMZ) και το βακτήριο που *Ochrobactrum sp.* που διασπά το fludioxonil (FLD). Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα βιοκλινών, που είναι βιοεμπλουτισμένη με τους παραπάνω αποδομητικούς μικροοργανισμούς, για την απομάκρυνση των μυκητοκτόνων FLD και IMZ από τα υγρά απόβλητα συσκευαστηρίων φρούτων.

4.1.1 Imazalil

Το IMZ είναι μυκητοκτόνο και χρησιμοποιείται σε βιομηχανίες συσκευαστηρίων φρούτων, για την αντιμετώπιση ασθενειών στα φρούτα μετά την συλλογή τους. Επειδή τα συσκευαστήρια φρούτων χρησιμοποιούν μεγάλες ποσότητες γεωργικών φαρμάκων σε κάθε εφαρμογή τους, ανιχνεύονται στα υγρά απόβλητά τους μεγάλες ποσότητες και του IMZ. Αυτό καθιστά απαραίτητη την εύρεση μιας αποτελεσματικής μεθόδου διαχείρισης των αποβλήτων, για την απορρύπανσή τους από το φάρμακο αυτό. Για την εγκαθίδρυση μιας τέτοιας μεθόδου πρέπει να έχει επιθυμητά ποσοστά διάσπασης του μυκητοκτόνου και ταυτόχρονα, όσο το δυνατών, μικρότερα ποσοστά έκπλυσης του φαρμάκου.

Στη παρούσα μελέτη, παρατηρήσαμε πως η έκπλυση του IMZ είναι εξαιρετικά μικρή, αντιστοιχώντας μόλις στο 0.01% της συνολικής ποσότητας του IMZ που εφαρμόστηκε στις στήλες έκπλυσης ενώ το 83.3% κατακρατήθηκε από το πληρωτικό υλικό. Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 1.4.1, το IMZ είναι μέτρια υδατοδιαλυτό γεωργικό φάρμακο (υδατοδιαλυτότητα 0.18 gr / L) και παρουσιάζει μεγάλη προσρόφηση στο έδαφος, με εύρος τιμών σταθεράς Frundlich 38.2-195.3 mL g⁻¹. Γενικά, η οργανική ύλη αποτελεί την κύρια προσροφητική επιφάνεια για υδρόφοβα μόρια (De Wilde et al. 2009) και οι Wauchope et al. (2002) επισημαίνουν

ότι μπορεί να αλληλεπιδράσει, σε μικρότερο βαθμό, και με πολικά, υδρόφιλα μόρια. Το πληρωτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε έχει υψηλό οργανικό φορτίο (29.3%), οπότε αναμέναμε το IMZ να παρουσιάσει χαμηλή κινητικότητα σε αυτό. Σε συμφωνία με τα ευρήματα που παρατηρήθηκαν, είναι και οι μελέτες των Karas et al, (2016) και Omirou et al, (2012). Αναλυτικότερα σε μελέτη στηλών έκπλυσης, σε πληρωτικό υλικό ίδιας σύστασης, οι Karas et al, (2016), κατέδειξαν επίσης χαμηλή έκπλυση του IMZ σε ποσοστό 0.12% της συνολικής ποσότητας που εφαρμόστηκε, και υψηλή προσρόφηση σε ποσοστό 42.3%, κατά κύριο λόγο στον πρώτο ορίζοντα (0-20) των στηλών. Παρομοίως οι Omirou et al, (2012) σε μελέτη στηλών έκπλυσης πληρωμένη με βιοργανικό μείγμα αποτελούμενο από παραπροϊόντα οινοπαραγωγικών μονάδων (φλούδες και σπόρους), έδαφος και άχυρο, παρατήρησαν χαμηλή έκπλυση του IMZ η οποία αντιστοιχούσε στο 0.1% της συνολικής εφαρμοσμένης ποσότητας. Η χαμηλή κινητικότητα του IMZ σε διάφορα εδάφη έχει βρεθεί επίσης και σε μελέτες των Qisse et al. (2020).

Στην παρούσα μελέτη, σύμφωνα με το ισοζύγιο μάζας, το 16.7% της συνολικής εφαρμοσμένης ποσότητας αποδομήθηκε από τον μύκητα *Mycosphaerella tassiana* και τη μικροβιακή κοινότητα του πληρωτικού υλικού. Οι Parazlatani et al, (υπό συγγραφή), σε μελέτες στηλών έκπλυσης στις ίδιες πειραματικές συνθήκες αλλά με πληρωτικό υλικό στο οποίο δεν είχε γίνει εφαρμογή αποδομητικού μικροοργανισμού, παρατήρησαν αποδόμηση αντίστοιχη του 21.6% της συνολικής εφαρμοσμένης ποσότητας.

Γενικά, ο βιοεμπλουτισμός θεωρείται μια διαδικασία με απρόβλεπτα αποτελέσματα καθώς η επιτυχία του μπορεί να επηρεαστεί από ποικίλους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες όπως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας και του αποδομητικού μικροοργανισμού, η ικανότητα του αποδομητή να επιβιώνει στο περιβάλλον εφαρμογής, η θερμοκρασία, η περιεχόμενη υγρασία και η αρχική συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου (Cycοή et al, 2017). Επίσης, η πυκνότητα του αρχικού εμβολίου έχει δειχθεί πως παίζει καθοριστικό ρόλο στην σωστή εγκαθίδρυση του μύκητα (Karpozdas and Walker, 2000; Hong Q. et al, 2007). Στην παρούσα μελέτη, το πληρωτικό υλικό εμβολιάστηκε με, κατά προσέγγιση, 9750 κονίδια ανά κυβικό

εκατοστό, ποσότητα πιθανόν μη επαρκής για να εγκαθιδρύσει τον *M. tassiana* στο βιοοργανικό μείγμα. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, οι αλληλεπιδράσεις με την ενδογενή μικροβιακή κοινότητα όσον αφορά τη δημιουργία σχέσεων θηράματος-θηρευτή και τον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα του βιοεμπλουτισμού (Tortella *et al.*, 2013). Το πληρωτικό υλικό των στηλών έκπλυσης αποτελείται από μη αποστειρωμένο έδαφος, το οποίο αποτελεί και την κύρια πηγή της μικροβιακής κοινότητας (Karanasios *et al.*, 2012).

Τέλος, η παρουσία του μυκητοκτόνου FLD στο υγρό απόβλητο πιθανότατα να συνέβαλλε στην ελλιπή αποτελεσματικότητα του μυκηλιακού εμβολίου. Συγκεκριμένα, Το FLD, είναι ένα μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση μυκήτων που ανήκουν στο φύλλο *Ascomycota*, στο οποίο ανήκει και ο *Mycosphaerella tassiana* (European Commission, 2007).

4.1.2 Fludioxonil

Το FLD είναι επίσης ένα μυκητοκτόνο μεγάλου εύρους φάσματος που χρησιμοποιείται σε βιομηχανίες συσκευαστηρίων φρούτων. Όπως και το IMZ, έτσι και το FLD χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλείται από φυτοπαθογόνους μύκητες στα φρούτα μετά την συλλογή τους. Για τον λόγο αυτό ανιχνεύεται στα υγρά απόβλητά μετασυλλεκτικών βιομηχανιών σε μεγάλες ποσότητες. Αφού η χρήση του FLD είναι εκτενής, είναι επιτακτική ανάγκη η εύρεση αποτελεσματικής μεθόδου για την αποτοξικοποίηση των υγρών αποβλήτων από το μυκητοκτόνο αυτό.

Το ποσοστό έκπλυσης του FLD ήταν μόλις 0,14% σε σχέση με την συνολική ποσότητα του μυκητοκτόνου που εφαρμόστηκε στις στήλες ενώ το ποσοστό κατακράτησης αντιστοιχούσε στο 64,4%. Από την ποσότητα που προσροφήθηκε στο πληρωτικό υλικό η πλειοψηφία ανιχνεύθηκε στον πρώτο ορίζοντα (0-20) της στήλης έκπλυσης, καταδεικνύοντας την χαμηλή κινητικότητα του γεωργικού φαρμάκου στο πληρωτικό υλικό. Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονται σε συμφωνία με

άλλες μελέτες που έχουν προηγηθεί. Οι Parazlatani et al, (2019) σε μελέτη προσρόφησης σε πληρωτικό υλικό ίδιας σύστασης με την παρούσα μελέτη, κατέδειξαν υψηλό δυναμικό προσρόφησης με σταθερά Freundlich 123.3 mL/g. Χαμηλή κινητικότητα του FLD παρατηρήθηκε και σε μελέτες των Smalling *et al.* (2018), Arias et al. (2005) και Fenoll *et al.* (2011) οι οποίοι μελετώντας την προσρόφηση γεωργικών φαρμάκων σε διάφορα εδάφη παρατήρησαν συσχέτιση της κινητικότητας του FLD με το περιεχόμενο οργανικού άνθρακα του εδάφους.

Στην παρούσα μελέτη, υπολογίστηκε πως το 35.44% της συνολικής ποσότητας του FLD που εφαρμόστηκε αποδομήθηκε από το βακτήριο *Ochrobactrum sp.* και τη μικροβιακή κοινότητα του πληρωτικού υλικού. Οι Parazlatani et al, (υπό συγγραφή), σε μελέτες στηλών έκπλυσης στις ίδιες πειραματικές συνθήκες αλλά με πληρωτικό υλικό στο οποίο δεν είχε γίνει εφαρμογή αποδομητικού μικροοργανισμού, παρατήρησαν αποδόμηση αντίστοιχη του 16.8% της συνολικής εφαρμοσμένης ποσότητας. Παρόλο που η αποδόμηση του FLD είναι περίπου διπλάσια παρουσία του αποδομητικού βακτηρίου, η διαφορά των 2 τιμών δεν είναι στατιστικά σημαντική (p -value < 0.05). Όπως προαναφέρθηκε, διάφοροι παράγοντες μπορεί να οδήγησαν σε μειωμένη αποτελεσματικότητα του βακτηριακού εμβολίου, είτε βιοτικοί είτε αβιοτικοί.

4.2 Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα αποτελέσματα μπορούμε να καταλήξουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Το υπό μελέτη πληρωτικό υλικό, που αποτελείται από εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριού, έδαφος και άχυρο, εμφάνισε υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι των υπολειμματικών γεωργικών φαρμάκων FLD και IMZ, όσον αφορά την κατακράτησή τους, καθώς και τα 2 γεωργικά φάρμακα ανιχνεύθηκαν σε πολύ μικρές ποσότητες στο έκπλυμα των στηλών.
- Το FLD και το IMZ εμφάνισαν μεγάλα ποσοστά προσρόφησης στο πληρωτικό υλικό των στηλών έκπλυσης

- Η αποδόμηση του FLD από το βακτήριο *Ochrobactrum* sp. ήταν εμφανής. Από την άλλη η αποδόμηση του IMZ από τον μύκητα *M. tassiana* δεν ήταν αποτελεσματική

4.3 Μελλοντικές μελέτες

Μελλοντικές μελέτες θα εστιάσουν στην ταυτοποίηση της μικροβιακής κοινότητας του πληρωτικού υλικού και την επιβεβαίωση της εγκαθίδρυσης των δύο αποδομητικών μικροοργανισμών και την αλλαγή της σύνθεσης της βιοκοινότητας του πληρωτικού υλικού με την εφαρμογή του αποβλήτου. Επιπλέον, θέμα διερεύνησης θα αποτελέσει και η αδυναμία αποτελεσματικής αποδόμησης του IMZ από τον μύκητα *Mycosphaerella tassiana* ούτως ώστε να επιτευχθεί επιτυχής αποδόμηση σε μελλοντικές εφαρμογές βιοεμπλουτισμού.

Βιβλιογραφία

- “1-(2-Allyloxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)Ethyl-1H-imidazole (Imazalil) [MAK Value Documentation, 2014].” 2015. In *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*, 1–51. American Cancer Society.
<https://doi.org/10.1002/3527600418.mb3555444kske5715>.
- A, Kumari, Singh N, and Ramakrishnan B. 2019. “Parameters Affecting Azoxystrobin and Imidacloprid Degradation in Biobed Substrates in the North Indian Tropical Environment.” *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. J Environ Sci Health B*. 2019.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1633857>.
- A, Masiá, Campo J, Vázquez-Roig P, Blasco C, and Picó Y. 2013. “Screening of Currently Used Pesticides in Water, Sediments and Biota of the Guadalquivir River Basin (Spain).” *Journal of Hazardous Materials. J Hazard Mater*. December 15, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.035>.
- Achtenhagen, J., & Kreuzig, R. 2011. “Laboratory tests on the impact of superabsorbent polymers on transformation and sorption of xenobiotics in soil taking 14C-imazalil as an example.” *The Science of the total environment*, 409(24), 5454–5458.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.021>
- Acosta-Sánchez, A., Soto-Garita, C., Masís-Mora, M., Cambronero-Heinrichs, J. C., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. 2020. “Impaired Pesticide Removal and Detoxification by Biomixtures during the Simulated Pesticide Application Cycle of a Tropical Agricultural System.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 195 (June): 110460.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110460>.
- Adams, Godleads Omokhagbor, Prekeyi Tawari Fufeyin, Samson Eruke Okoro, and Igelenyah Ehinomen. 2015. “Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review,” 12.
- Arias, M., A. C. Torrente, E. López, B. Soto, and J. Simal-Gándara. 2005. “Adsorption–Desorption Dynamics of Cyprodinil and Fludioxonil in Vineyard Soils.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (14): 5675–81.
<https://doi.org/10.1021/jf048023a>.
- As, Purnomo, Sariwati A, and Kamei I. 2020. “Synergistic Interaction of a Consortium of the Brown-Rot Fungus *Fomitopsis Pinicola* and the Bacterium *Ralstonia Pickettii* for

- DDT Biodegradation.” *Heliyon*. Heliyon. June 7, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04027>.
- Barles, Sabine. 2014. "History of waste management and the social and cultural representations of waste." *The Basic Environmental History*. Springer, Cham, 199-226. <https://www.springerprofessional.de/en/history-of-waste-management-and-the-social-and-cultural-represen/6840312>.
- Belenguer, Vicent, Francisco Martinez-Capel, Ana Masiá, and Yolanda Picó. 2014. “Patterns of Presence and Concentration of Pesticides in Fish and Waters of the Júcar River (Eastern Spain).” *Journal of Hazardous Materials* 265 (January): 271–79.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.016>.
- Brancato Alba, Daniela Brocca, Luis Carrasco Cabrera, Chloe De Lentdecker, Zoltan Erdos, Lucien Ferreira, Luna Greco, et al. 2018. “Updated Review of the Existing Maximum Residue Levels for Imazalil According to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005 Following New Toxicological Information.” *EFSA Journal* 16 (10).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5453>.
- Campo, J., Masiá, A., Blasco, C., & Picó, Y. 2013. “Occurrence and Removal Efficiency of Pesticides in Sewage Treatment Plants of Four Mediterranean River Basins.” *Journal of Hazardous Materials* 263: 146–57.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.061>.
- Ccancapa, Alexander, Ana Masiá, Vicente Andreu, and Yolanda Picó. 2016. “Spatio-Temporal Patterns of Pesticide Residues in the Turia and Júcar Rivers (Spain).” *The Science of the Total Environment* 540 (January): 200–210.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.063>.
- Chen, S., Hu, Q., Hu, M., Luo, J., Weng, Q., & Lai, K. 2011. “Isolation and Characterization of a Fungus Able to Degrade Pyrethroids and 3-Phenoxybenzaldehyde.” *Bioresource Technology* 102 (17): 8110–16.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.055>.
- Cheon, Sanghun, Yong Woon Shin, Ki-Min Park, Jineun Kim, and Tae Ho Kim. 2011. “Imazalil: 1-[2-(2,4-Dichlorophenyl)-2-(Prop-2-Enyloxy)Ethyl]-1H-Imidazole.” *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online* 67 (Pt 6): o1459.
<https://doi.org/10.1107/S1600536811018241>.
- Chin-Pampillo, J. S., Masís-Mora, M., Ruiz-Hidalgo, K., Carazo-Rojas, E., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. 2016. “Removal of Carbofuran Is Not Affected by Co-Application of Chlorpyrifos in a Coconut Fiber/Compost Based Biomixture after Aging or Pre-

- Exposure.” *Journal of Environmental Sciences* 46: 182–89.
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.12.026>.
- Chin-Pampillo, Juan Salvador, Karla Ruiz-Hidalgo, Mario Masís-Mora, Elizabeth Carazo-Rojas, and Carlos E. Rodríguez-Rodríguez. 2015. “Adaptation of Biomixtures for Carbofuran Degradation in On-Farm Biopurification Systems in Tropical Regions.” *Environmental Science and Pollution Research* 22 (13): 9839–48.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4130-6>.
- Corran, A., Knauf-Beiter, G., & Zeun, R. 2008. “Fungicides acting on signal transduction.” *Modern Crop Protection Compounds*, 561-580.
- C.V, Papazlatani, Karas PA, Tucacat G, and Karpouzas DG. 2019. “Expanding the Use of Biobeds: Degradation and Adsorption of Pesticides Contained in Effluents from Seed-Coating, Bulb Disinfestation and Fruit-Packaging Activities.” *Journal of Environmental Management. J Environ Manage.* October 15, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.122>.
- Cycoń, Mariusz, Agnieszka Mrozik, and Zofia Piotrowska-Seget. 2017. “Bioaugmentation as a Strategy for the Remediation of Pesticide-Polluted Soil: A Review.” *Chemosphere* 172 (April): 52–71. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.129>.
- De Vita, D., Scipione, L., Tortorella, S., Mellini, P., Di Rienzo, B., Simonetti, G., D'Auria, F. D., Panella, S., Cirilli, R., Di Santo, R., & Palamara, A. T. 2012. “Synthesis and Antifungal Activity of a New Series of 2-(1H-Imidazol-1-Yl)-1-Phenylethanol Derivatives.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 49: 334–42.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.01.034>.
- Desai, N. C., Maheta, A. S., Rajpara, K. M., Joshi, V. V., Vaghani, H. V., & Satodiya, H. M. 2014. “Green Synthesis of Novel Quinoline Based Imidazole Derivatives and Evaluation of Their Antimicrobial Activity.” *Journal of Saudi Chemical Society* 18 (6): 963–71. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.11.021>.
- Dhurba Giri. 2020. “Manual Cell Counting With Neubauer Chamber.” *LaboratoryInfo, Hematology*. <https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>
- E, Giavini, and Menegola E. 2010. “Are Azole Fungicides a Teratogenic Risk for Human Conceptus?” *Toxicology Letters. Toxicol Lett.* October 5, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.07.005>.
- E, Karanasios, Tsiropoulos Ng, Karpouzas Dg, and Menkissoglu-Spiroudi U. 2010. “Novel Biomixtures Based on Local Mediterranean Lignocellulosic Materials: Evaluation for

- Use in Biobed Systems.” *Chemosphere*. Chemosphere. August 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.003>.
- Ekram, Md Akhtar-E., Indrani Sarker, Md Sifat Rahi, Md Atikur Rahman, Ananda K. Saha, and Md Abu Reza. 2020. “Efficacy of Soil-borne Enterobacter Sp. for Carbofuran Degradation: HPLC Quantitation of Degradation Rate.” *Journal of Basic Microbiology* 60 (5): 390–99. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900570>.
- EFSA (2010) ‘Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance imazalil’, *EFSA Journal*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 8(3). doi: 10.2903/j.efsa.2010.1526.
- Environmental Security Technology Certification Program (ESTCP). 2007. “In Situ Substrate Addition to Create Reactive Zones for Treatment of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons.” March 2007. https://clu-in.org/download/contaminantfocus/dnapl/Treatment_Technologies/ER-9920-C&P.pdf.
- EPA, US. 2003. “Reregistration Eligibility Decision for Imazalil.” Case No. 2325. p. 74. https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/2325red_imazalil.pdf.
- EPA (2005) Pesticides - R.E.D. Fact Sheet – Imazalil, <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/2325fact.pdf>
- Environmental Protection Agency (EPA). 2015. “Fludioxonil; Pesticide Tolerances”. <https://www.federalregister.gov/d/2015-20019>
- European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. 2007. “Review report for the active substance fludioxonil, Finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 9 October 2007 in view of the inclusion of fludioxonil in Annex I of Directive 91/414/EEC”
- European Environment Agency (EEA). 2019. “Urban Waste Water Treatment for 21st Century Challenges.” <https://www.eea.europa.eu/publications/urban-waste-water-treatment-for>.
- European Food Safety Authority. 2010. “Conclusion on the Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Imazalil.” *EFSA Journal* 8 (3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1526>.
- European Food Safety Authority. 2014. “Guidance on the Assessment of Exposure of Operators, Workers, Residents and Bystanders in Risk Assessment for Plant Protection Products.” *EFSA Journal* 12 (10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3874>.

- F, Marotta, and Tiboni Gm. 2010. "Molecular Aspects of Azoles-Induced Teratogenesis." Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. Expert Opin Drug Metab Toxicol. April 2010. <https://doi.org/10.1517/17425251003592111>.
- Fait, Gabriella, Marco Nicelli, George Fragoulis, Marco Trevisan, and Ettore Capri. 2007. "Reduction of Point Contamination Sources of Pesticide from a Vineyard Farm." Environmental Science & Technology 41 (9): 3302–8. <https://doi.org/10.1021/es062706k>.
- Fenoll, J., Ruiz, E., Flores, P., Vela, N., Hellín, P., & Navarro, S. (2011). Use of farming and agro-industrial wastes as versatile barriers in reducing pesticide leaching through soil columns. Journal of hazardous materials, 187(1-3), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.012>
- Floss, H. G., Manni, P. E., Hamill, R. L., & Mabe, J. A. 1971. "Further studies on the biosynthesis of pyrrolnitrin from tryptophan by Pseudomonas." Biochemical and biophysical research communications, 45(3), 781-787. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(71\)90485-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(71)90485-2).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2003. "International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides." <http://www.fao.org/3/y4544e/y4544e00.htm>.
- G, Briceño, Lamilla C, Leiva B, Levio M, Donoso-Piñol P, Schalchli H, Gallardo F, and Diez Mc. 2020. "Pesticide-Tolerant Bacteria Isolated from a Biopurification System to Remove Commonly Used Pesticides to Protect Water Resources." PLoS One. PLoS One. June 29, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234865>.
- Gang Y, Won EJ, Ra K, Choi JY, Lee KW, Kim K. 2018. "Environmental Assessment of Contaminated Marine Sediments Treated with Solidification Agents: Directions for Improving Environmental Assessment Guidelines." *Marine Environmental Research* 139 (August): 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.011>.
- Góngora-Echeverría, Virgilio René, Fabrice Martin-Laurent, Carlos Quintal-Franco, German Giácoman-Vallejos, and Carmen Ponce-Caballero. 2017. "Agricultural Effluent Treatment in Biobed Systems Using Novel Substrates from Southeastern Mexico: The Relationship with Physicochemical Parameters of Biomixtures." *Environmental Science and Pollution Research* 24 (10): 9741–53. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8643-z>.
- Gupta, J, Rathour R, Singh R, and Thakur Is. 2019. "Production and Characterization of Extracellular Polymeric Substances (EPS) Generated by a Carbofuran Degrading

- Strain Cupriavidus Sp. ISTL7.” *Bioresource Technology*. Bioresour Technol. June 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.054>.
- Helweg, Arne, Henrik Bay, Hans Peter Birk Hansen, Mette Rabolle, Alex Sonnenborg, and Lars Stenvang. 2002. “Pollution at and below sites used for mixing and loading of pesticides” *Intern. J. Environ. Anal. Chem* 82 (8–9): 583–590. <https://doi.org/10.1080/03067310290009497>.
- Hong, Qing, Zhonghui Zhang, Yuanfan Hong, and Shunpeng Li. 2007. “A Microcosm Study on Bioremediation of Fenitrothion-Contaminated Soil Using Burkholderia Sp. FDS-1.” *International Biodeterioration & Biodegradation* 59 (1): 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.07.013>.
- International Centre for Soil and Contaminated Sites (ICSS) 2006. “Manual for Biological Remediation Techniques.” <https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/3065.pdf>
- Ilyushina, N. A. et al. (2020) ‘Genotoxicity of mixture of imidacloprid, imazalil and tebuconazole’, *Toxicology Reports*. Elsevier Inc., 7, pp. 1090–1094. doi: [10.1016/j.toxrep.2020.08.021](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.021).
- Jin, C. et al. (2018) ‘Insights Into a Possible Influence on Gut Microbiota and Intestinal Barrier Function During Chronic Exposure of Mice to Imazalil’, *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. NLM (Medline), 162(1), pp. 113–123. doi: [10.1093/toxsci/kfx227](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx227).
- Jin, C. et al. (2019) ‘Maternal exposure to imazalil disrupts the endocrine system in F1 generation mice’, *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 486, pp. 105–112. doi: [10.1016/j.mce.2019.03.002](https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.03.002).
- JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues). 2000. “Pesticide Residues in Food 2000: Imazalil.” <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v00pr08.htm>.
- JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues). 2001. “Pesticide Residues in Food 2001: Toxicological Evaluations. Imazalil (Addendum).” <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr06.htm>.
- Joseph L.Smilanick, Monir F.Mansour, Franka Mlikota Gabler, DavidSorenson. 2008. “Control of Citrus Postharvest Green Mold and Sour Rot by Potassium Sorbate Combined with Heat and Fungicides.” *Postharvest Biology and Technology* 47 (2): 226–38. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.020>.

- Karanasios, Evangelos, Nikolaos G. Tsiropoulos, and Dimitrios G. Karpouzas. 2012. "On-Farm Biopurification Systems for the Depuration of Pesticide Wastewaters: Recent Biotechnological Advances and Future Perspectives." *Biodegradation* 23 (6): 787–802. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9571-8>.
- Karas PA, Perruchon C, Karanasios E, Papadopoulou ES, Manthou E, Sitra S, Ehaliotis C, Karpouzas DG. 2016. "Integrated Biodepuration of Pesticide-Contaminated Wastewaters from the Fruit-Packaging Industry Using Biobeds: Bioaugmentation, Risk Assessment and Optimized Management." *Journal of Hazardous Materials* 320 (December): 635–44. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.071>.
- Kilani, Jaafar, and Sabine Fillinger. 2016. "Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance." *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02014>.
- Kim, T. K. 2015. "T test as a parametric statistic." *Korean journal of anesthesiology*, 68(6), 540. <https://doi.org/10.4097/kjae.2015.68.6.540>
- Kreuzig, R., Hartmann, C., Teigeler, J., Höltge, S., Cvetković, B., & Schlag, P. 2010. "Development of a novel concept for fate monitoring of biocides in liquid manure and manured soil taking ¹⁴C-imazalil as an example." *Chemosphere*, 79(11), 1089–1094. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.014>
- Lengai, G. M., Muthomi, J. W., & Mbega, E. R. 2020. "Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production." *Scientific African*, 7, e00239. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00239>.
- Leong, W. H. et al. (2020) 'Application, monitoring and adverse effects in pesticide use: The importance of reinforcement of Good Agricultural Practices (GAPs)', *Journal of Environmental Management*. Academic Press, p. 109987. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.109987.
- Lewis, Kathleen A., John Tzilivakis, Douglas J. Warner, and Andrew Green. 2016. "An International Database for Pesticide Risk Assessments and Management." *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, March. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10807039.2015.1133242>.
- Omirou M, Dalias P, Costa C, Papastefanou C, Dados A, Ehaliotis C, and Karpouzas DG. 2012. "Exploring the Potential of Biobeds for the Depuration of Pesticide-Contaminated Wastewaters from the Citrus Production Chain: Laboratory, Column

- and Field Studies.” *Environmental Pollution* (Barking, Essex : 1987). *Environ Pollut.* July 2012. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.001>.
- Maria del Pilar Castillo, and Lennart Torstensson. 2007. “Effect of Biobed Composition, Moisture, and Temperature on the Degradation of Pesticides.” Research-article. American Chemical Society. World. June 16, 2007. <https://doi.org/10.1021/jf0707637>.
- Marina Celia Campos-Mañas, Patricia Plaza-Bolaños, Ana Belén Martínez-Piernas, José Antonio Sánchez-Pérez, Ana Agüera. 2019. “Determination of Pesticide Levels in Wastewater from an Agro-Food Industry: Target, Suspect and Transformation Product Analysis.” *Chemosphere* 232 (October): 152–63. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.147>.
- Marinozzi, Maria, Laura Coppola, Elga Monaci, Dimitrios G. Karpouzas, Evangelia Papadopoulou, Urania Menkissoglu-Spiroudi, and Costantino Vischetti. 2013. “The Dissipation of Three Fungicides in a Biobed Organic Substrate and Their Impact on the Structure and Activity of the Microbial Community.” *Environmental Science and Pollution Research* 20 (4): 2546–55. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1165-9>.
- Mavriou Zografina, Ioanna Alexandropoulou, Paraschos Melidis, Dimitrios G. Karpouzas, and Spyridon Ntougias. 2020. “Biotreatment and Bacterial Succession in an Upflow Immobilized Cell Bioreactor Fed with Fludioxonil Wastewater.” *Environmental Science and Pollution Research*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09231-z>.
- Medina-Pastor Paula, and Giuseppe Triacchini. 2020. “The 2018 European Union Report on Pesticide Residues in Food.” *EFSA Journal* 18 (4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6057>.
- Meng, F.-W., G.-F. Hou, Y.-H. Yu, and J.-S. Gao. 2012. “4-(2,2-Difluoro-1,3-Benzodioxol-4-Yl)-1H-Pyrrole-3-Carbonitrile.” *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online* 68 (1): o222–o222. <https://doi.org/10.1107/S1600536811054523>.
- MI, Gullino, Tinivella F, Garibaldi A, Kemmitt Gm, Bacci L, and Sheppard B. 2010. “Mancozeb: Past, Present, and Future.” *Plant Disease. Plant Dis.* September 2010. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-9-1076>.
- Müller, Karin, Martin Bach, Holger Hartmann, Michael Spiteller, and Hans-Georg Frede. 2002. “Point- and Nonpoint-Source Pesticide Contamination in the Zwesten Ohm Catchment, Germany.” *Journal of Environmental Quality* 31 (1): 309–18. <https://doi.org/10.2134/jeq2002.3090>.

- N, Kadian, Gupta A, Satya S, Mehta Rk, and Malik A. 2008. “Biodegradation of Herbicide (Atrazine) in Contaminated Soil Using Various Bioprocessed Materials.” *Bioresource Technology*. Bioresour Technol. July 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.064>.
- National Center for Biotechnology Information 2020. PubChem Compound Summary for CID 6212, Chloroform. Retrieved October 7, 2020 from
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloroform>.
- Neumann, Michael, Ralf Schulz, Karin Schäfer, Wolfgang Müller, Wilfried Mannheller, and Matthias Liess. 2002. “The Significance of Entry Routes as Point and Non-Point Sources of Pesticides in Small Streams.” *Water Research* 36 (4): 835–42.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00310-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00310-4).
- North C. Douglass 2000. “Δομή και μεταβολές στην οικονομική ιστορία.” A. Αλεξιάδη, Αθήνα: Κριτική, 45. <https://www.politeianet.gr/books/9789602181751-north-c-douglass-kritiki-domi-kai-metaboles-stin-oikonomiki-istoria-145783>.
- Odukkathil, G., & Vasudevan, N. 2020. “Bacteria amended clay biochar composite biobed system to treat agriculture runoff.” *Journal of environmental management*, 269, 110694. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110694>
- Ortega, Humberto E., Daniel Torres-Mendoza, and Luis Cubilla-Rios. 2020. “Patents on Endophytic Fungi for Agriculture and Bio- and Phytoremediation Applications.” *Microorganisms* 8 (8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081237>.
- Castillo Mdelp, Torstensson L, and Stenström J. 2008. “Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Use--a Review.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *J Agric Food Chem*. August 13, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf800844x>.
- Karas P, Metsoviti A, Zisis V, Ehaliotis C, Omirou M, Papadopoulou ES, Menkissoglou-Spiroudi U, Manta S, Komiotis D, and Karpouzas DG. 2015. “Dissipation, Metabolism and Sorption of Pesticides Used in Fruit-Packaging Plants: Towards an Optimized Depuration of Their Pesticide-Contaminated Agro-Industrial Effluents.” *The Science of the Total Environment*. *Sci Total Environ*. October 15, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.086>.
- Karpouzas, D. G., and A. Walker. 2000. “Factors Influencing the Ability of *Pseudomonas* Putida Strains EpI and II to Degrade the Organophosphate Ethoprophos.” *Journal of Applied Microbiology* 89 (1): 40–48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01080.x>.

- PA, Karas, Perruchon C, Exarhou K, Ehaliotis C, and Karpouzas DG. 2011. "Potential for Bioremediation of Agro-Industrial Effluents with High Loads of Pesticides by Selected Fungi." *Biodegradation*. February 2011.
<https://doi.org/10.1007/s10532-010-9389-1>.
- Papadakis, E. N., Tsaboula, A., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Vryzas, Z., & Papadopoulou-Mourkidou, E. 2015. "Pesticides in the Surface Waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and Environmental Risk Assessment." *Science of The Total Environment* 536: 793–802.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.099>.
- Papadopoulou, Evangelia S., Bella Tsachidou, Sławomir Sułowicz, Urania Menkissoglu-Spiroudi, and Dimitrios G. Karpouzas. 2016. "Land Spreading of Wastewaters from the Fruit-Packaging Industry and Potential Effects on Soil Microbes: Effects of the Antioxidant Ethoxyquin and Its Metabolites on Ammonia Oxidizers." *Applied and Environmental Microbiology* 82 (2): 747. <https://doi.org/10.1128/AEM.03437-15>.
- Pesticide Properties DataBase (PPDB). "Imazalil (Ref: R 023979)." Last Updated 15/07/2020 <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/390.htm>
- Pesticide Properties DataBase (PPDB). "Fludioxonil (Ref: CGA 173506)." Last Updated 11/11/2019
<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/330.htm?fbclid=IwAR0jZpPjwHUQG-Ic3X1Fju3Mnv6a-0yiesJxwJvCKQpNQOsuhNs53NpVSQ>
- Philp, J. C., Bamforth, S., Singleton, I., & Atlas, R. M. 2005. "Environmental pollution and restoration: a role for bioremediation." In *Bioremediation* (pp. 1-48). American Society of Microbiology.
- Pose-Juan, E., Rial-Otero, R., Paradelo, M., & López-Periago, J. E. 2011. "Influence of the adjuvants in a commercial formulation of the fungicide "Switch" on the adsorption of their active ingredients: cyprodinil and fludioxonil, on soils devoted to vineyard." *Journal of hazardous materials*, 193, 288–295.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.07.074>
- Pscheidt, J. W., & Ocamb, C. M. 2013. "Fungicide theory of use and mode of action." *Pacific Northwest Plant Disease Management Handbook*.
<https://pnwhandbooks.org/node/275/print>.
- Qisse, Najat, Marouane EL Alouani, Laila EL Azzouzi, Imane EL Fadil, Hamid Saufi, Mohammed Alaoui EL Belghiti, Abdallah Zrineh, and Mohammed EL Azzouzi. 2020. "Adsorption of Imazalil Herbicide onto Moroccan Agricultural Soils: Kinetic

- and Isotherm Adsorption Studies.” *Groundwater for Sustainable Development 11* (October): 100468. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2020.100468>.
- Ramachandran, R., Rani, M., Senthana, S., Jeong, Y. T., & Kabilan, S. 2011. “Synthesis, Spectral, Crystal Structure and in Vitro Antimicrobial Evaluation of Imidazole/Benzotriazole Substituted Piperidin-4-One Derivatives.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (5): 1926–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.02.036>.
- Regulation (EC) No 850/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on persistent organic pollutants and amending Directive 79/117/EEC. 2020. “EUR-Lex - 32004R0850 - EN - EUR-Lex.” <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32004R0850>.
- Rj, Cooper, Fitt P, Hiscock Km, Lovett Aa, Gumm L, Dugdale Sj, Rambohul J, et al. 2016. “Assessing the Effectiveness of a Three-Stage on-Farm Biobed in Treating Pesticide Contaminated Wastewater.” *Journal of Environmental Management. J Environ Manage.* October 1, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.047>.
- Rr, Lew. 2010. “Turgor and Net Ion Flux Responses to Activation of the Osmotic MAP Kinase Cascade by Fludioxonil in the Filamentous Fungus *Neurospora Crassa*.” *Fungal Genetics and Biology : FG & B. Fungal Genet Biol.* August 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.007>.
- Saxena, Gaurav, and Ram Naresh Bharagava. 2016. “Ram Chandra: Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste.” *Clean Technologies and Environmental Policy* 18 (3): 979–80. <https://doi.org/10.1007/s10098-015-1084-9>.
- Sb, Pointing. 2001. “Feasibility of Bioremediation by White-Rot Fungi.” *Applied Microbiology and Biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol.* October 2001. <https://doi.org/10.1007/s002530100745>.
- Siegel, M. R., & Ragsdale, N. N. 1978. “Antifungal mode of action of imazalil.” *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 9(1), 48-56.
- Sm, Lawry, Tebbets B, Kean I, Stewart D, Hetelle J, and Klein Bs. 2017. “Fludioxonil Induces Drk1, a Fungal Group III Hybrid Histidine Kinase, To Dephosphorylate Its Downstream Target, Ypd1.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Antimicrob Agents Chemother.* January 24, 2017. <https://doi.org/10.1128/AAC.01414-16>.
- Smalling, K. L., Hladik, M. L., Sanders, C. J., & Kuivila, K. M. 2018. “Leaching and sorption of neonicotinoid insecticides and fungicides from seed coatings.” *Journal of*

- environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes, 53(3), 176–183. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1405619>
- Sniegowski, Kristel, and Dirk Springael. 2015. “Establishment of Multiple Pesticide Biodegradation Capacities from Pesticide-primed Materials in On-farm Biopurification System Microcosms Treating Complex Pesticide-contaminated Wastewater.” *Pest Management Science* 71 (7): 986–95. <https://doi.org/10.1002/ps.3876>.
- Speight, J. G. 2017. “Removal of Organic Compounds from the Environment.” *Environmental Organic Chemistry for Engineers*; Butterworth-Heinemann: Oxford, UK, 387-432.
- T, De Wilde, Spanoghe P, Debaer C, Ryckeboer J, Springael D, and Jaeken P. 2007. “Overview of On-Farm Bioremediation Systems to Reduce the Occurrence of Point Source Contamination.” *Pest Management Science*. *Pest Manag Sci*. February 2007. <https://doi.org/10.1002/ps.1323>.
- T, De Wilde, Spanoghe P, Ryckeboer J, Jaeken P, and Springael D. 2009. “Sorption Characteristics of Pesticides on Matrix Substrates Used in Biopurification Systems.” *Chemosphere*. *Chemosphere*. March 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.037>.
- TT, Brandhorst, and Klein BS. 2019. “Uncertainty Surrounding the Mechanism and Safety of the Post-Harvest Fungicide Fludioxonil.” *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. *Food Chem Toxicol*. January 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.037>.
- Tao, H. et al. (2020) ‘Toxic effects and mechanisms of three commonly used fungicides on the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2’, *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 263, p. 114660. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114660.
- Tortella, G., Durán, N., Rubilar, O., Parada, M., & Diez, M. C. 2015. “Are white-rot fungi a real biotechnological option for the improvement of environmental health?” *Critical reviews in biotechnology*, 35(2), 165-172. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.823597>
- Tuomela, M., & Hatakka, A. 2019. “Oxidative fungal enzymes for bioremediation.” In *Comprehensive Biotechnology: Environmental and Related Biotechnologies* (pp. 224-239). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00349-9>.

- Publications Office of the European Union. 2019. "Industrial Waste Water Treatment : Pressures on Europe's Environment." Website. Publications Office of the European Union. September 16, 2019. <http://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/aa63a387-d8fe-11e9-9c4e-01aa75ed71a1/language-en>.
- UniProt Database. Accessed October 6 of 2020 <https://www.uniprot.org/taxonomy/>
- United States Code (USC), 2013 Edition "Title 7 – AGRICULTURE CHAPTER 6 - INSECTICIDES AND ENVIRONMENTAL PESTICIDE CONTROL SUBCHAPTER II - ENVIRONMENTAL PESTICIDE CONTROL Sec. 136 – Definitions" *U.S. Government Publishing Office* https://www.govinfo.gov/content/pkg/USCODE-2013-title7/html/USCODE-2013-title7-chap6-subchapII-sec136.htm#136_1
- US EPA, OCSPP. 2013. "Basic Information about Pesticide Ingredients." Overviews and Factsheets. US EPA. October 30, 2013. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>.
- Verma, Amita, Sunil Joshi, and Deepika Singh. 2013. "Imidazole: Having Versatile Biological Activities." Research Article. *Journal of Chemistry*. Hindawi. October 31, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/329412>.
- Verma, Shalini, Dharam Singh, and Subhankar Chatterjee. 2020. "Biodegradation of Organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos by Sphingobacterium Sp. C1B, a Psychrotolerant Bacterium Isolated from Apple Orchard in Himachal Pradesh of India." *Extremophiles*, September, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01203-y>.
- Vijesh, A. M., Isloor, A. M., Telkar, S., Peethambar, S. K., Rai, S., & Isloor, N. 2011. "Synthesis, Characterization and Antimicrobial Studies of Some New Pyrazole Incorporated Imidazole Derivatives." *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (8): 3531–36. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.005>.
- Wauchope, R. Don, Simon Yeh, Jan B. H. J. Linders, Regina Kloskowski, Keiji Tanaka, Baruch Rubin, Arata Katayama, et al. 2002. "Pesticide Soil Sorption Parameters: Theory, Measurement, Uses, Limitations and Reliability." *Pest Management Science* 58 (5): 419–45. <https://doi.org/10.1002/ps.489>.
- Wc, Yang, Li J, Li J, Chen Q, and Yang Gf. 2012. "Novel Synthetic Methods for N-Cyano-1H-Imidazole-4-Carboxamides and Their Fungicidal Activity." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. *Bioorg Med Chem Lett*. February 1, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.11.115>.

- Wilde, Tineke De, Christof Debaer, Jaak Ryckeboer, Dirk Springael, and Pieter Spanoghe. 2010. "The Influence of Small- and Large-scale Composting on the Dissipation of Pesticide Residues in a Biopurification Matrix." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90 (7): 1113–20. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3919>.
- X, Pan, Xu T, Xu H, Fang H, and Yu Y. 2017. "Characterization and Genome Functional Analysis of the DDT-Degrading Bacterium *Ochrobactrum* Sp. DDT-2." *The Science of the Total Environment*. Sci Total Environ. August 15, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.052>.
- Yan, Xin, Wen Jin, Guang Wu, Wankui Jiang, Zhangong Yang, Junbin Ji, Jiguo Qiu, Jian He, Jiandong Jiang, and Qing Hong. 2018. "Hydrolase CehA and Monooxygenase CfdC Are Responsible for Carbofuran Degradation in *Sphingomonas* Sp. Strain CDS-1." *Applied and Environmental Microbiology* 84 (16). <https://doi.org/10.1128/AEM.00805-18>.
- Yang, Chao, Chantal Hamel, Vladimir Vujanovic, and Yantai Gan. 2011. "Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms." Review Article. *ISRN Ecology*. Hindawi. October 31, 2011. <https://doi.org/10.5402/2011/130289>.
- Yoshimi, Akira, Kaihei Kojima, Yoshitaka Takano, and Chihiro Tanaka. 2005. "Group III Histidine Kinase Is a Positive Regulator of Hog1-Type Mitogen-Activated Protein Kinase in Filamentous Fungi." *Eukaryotic Cell* 4 (11): 1820. <https://doi.org/10.1128/EC.4.11.1820-1828.2005>.
- Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, Σ. της Ε. Έ. (2009) *ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1107/2009 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ*.