



**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας.**

<<Βιοτεχνολογία-Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος>>



**Μεταβολές του πληθυσμού των μυκήτων στο εσωτερικό πιλοτικών
συστημάτων βιοκλινών που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία
υγρών αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων.**

ΜΑΝΘΟΥ ΕΛΕΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

**Μεταβολές του πληθυσμού των μυκήτων στο εσωτερικό πιλοτικών
συστημάτων βιοκλινών που χρησιμοποιούνται για την
επεξεργασία υγρών αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων.**

**Changes in the abundance of fungi within pilot biobed systems used
for the treatment of wastewater from the fruit-packing industry**

Επιβλέπων : Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής

Τριμελής επιτροπή:

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε από την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μάνθου Έλενα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το εργαστηριακό κομμάτι της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του τμήματος κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014 υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Δημήτριου Καρπούζα.

Η ολοκλήρωση αυτής διπλωματικής εργασίας υλοποιήθηκε με την υποστήριξη ενός αριθμού ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου. Καταρχήν, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον κ. Καρπούζα Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τη βοήθεια του καθώς και για τη σημαντική συμβολή στην εκπόνηση και συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Δρ. Ευαγγελία Παπαδοπούλου, γιατί χωρίς τη βοήθειά της η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήταν αδύνατη, για το αμείωτο ενδιαφέρον της καθώς και για τη συμπαράσταση της τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή του. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης, στον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Καρά για την συμβολή του και τη σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε κατά την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Δρ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου και Δρ. Δημήτριο Μόσιαλο για το χρόνο που αφιέρωσαν κατά την παρουσίαση της παρούσας μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην συμφοιτήτριά μου Σιτρά Στεφανία, για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειραματικού μέρους της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	8
1.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΤΗΡΙΑ ΦΡΟΥΤΩΝ.....	11
1.3 ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΣΥΣΚΕΥΑΣΤΗΡΙΑ ΦΡΟΥΤΩΝ.....	19
1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ.....	21
1.5 ΒΙΟΚΛΙΝΕΣ	22
1.5.1 Τι είναι οι βιοκλίνες.....	22
1.5.2 Που χρησιμοποιούνται οι βιοκλίνες	27
1.5.3 Μικροβιολογία των βιοκλινών	29
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	33
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
2.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	33
2.2 ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΒΙΟΜΙΓΜΑΤΟΣ	35
2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	40
2.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑ Qubit™.....	41
2.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ.....	43
2.5.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης	43
2.5.1.1 Ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας βάσεων με PCR πραγματικού χρόνου.....	43
2.5.1.2 Εξαγωγή DNA από πηκτή αγαρόζης	45
2.5.1.3 Ένθεση του καθαρισμένου προϊόντος PCR σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης	47

2.5.1.4 Μετασχηματισμός του πλασμιδιακού φορέα σε δεκτικά κύτταρα E. Coli	48
2.5.1.5 Επιλογή αποικιών με ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και ανάπτυξη τους σε θρεπτικό υλικό LB	50
2.5.1.6 Απομόνωση πλασμιδίων.....	50
2.5.1.7 Ποσοτικοποίηση πλασμιδίων με σύστημα Qubit™	52
2.5.1.8 Αραιώσεις πλασμιδίων	53
2.5.1.9 Δημιουργία καμπύλης αναφοράς με χρήση της PCR πραγματικού χρόνου.....	53
2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	60
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	60
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΞΑΓΩΓΗΣ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΔΑΦΟΥΣ.....	60
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ.....	61
3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΙΣ ΠΙΛΟΤΙΚΕΣ ΒΙΟΚΛΙΝΕΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ q-PCR	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	71
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ολοένα και αυξανόμενη χρήση των γεωργικών φαρμάκων στις καλλιέργειες συμβατικής γεωργίας οδήγησε σε σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις και μεγάλους κινδύνους τόσο για τα οικοσυστήματα όσο και για την υγεία των ανθρώπων, γεγονός που συνέβαλλε στην δημιουργία οικονομικών και ταυτόχρονα αποτελεσματικών συστημάτων, τις λεγόμενες βιοκλίνες, που στόχο έχουν την βιοαπορρύπανση των υγρών αποβλήτων που περιέχουν φυτοφάρμακα και προέρχονται από σημειακές πηγές. Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την μελέτη του πληθυσμού των μυκήτων σε συστήματα πιλοτικών βιοκλινών που χρησιμοποιούνται στην αποτοξικοποίηση των υγρών αποβλήτων που προέρχονται από συσκευαστήρια φρούτων και περιέχουν υπολείμματα διαφόρων μυκητοκτόνων όπως τα imazalil(IMZ), thiabendazole(TBZ), ortho-phenylphenol(OPP), και diphenylamine(DPA). Συλλέχθηκαν δείγματα από τρεις διαφορετικούς ορίζοντες κάθε πιλοτικής βιοκλίνης πριν την έναρξη αλλά και με το πέρας της λειτουργίας τους. Για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων στα δείγματα του βιομίγματος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου. Με βάση τα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων στο εσωτερικό των πιλοτικών βιοκλινών προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στους πληθυσμούς των μυκήτων στις τρεις από τις πέντε βιοκλίνες του πειράματος. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το βάθος καθώς και η εφαρμογή ή όχι εμπλουτισμού παράλληλα με την εφαρμογή των DPA και IMZ στις βιοκλίνες 2 και 4 δεν επηρέασαν σημαντικά τον πληθυσμό των μυκήτων, παρόλα αυτά τα αποτελέσματα για τις βιοκλίνες 3 και 5 έδειξαν ότι ο βιοεμπλουτισμός που εφαρμόστηκε στην βιοκλίνη 5 επηρέασε σημαντικά τον πληθυσμό των μυκήτων σε σχέση με την βιοκλίνη 3 στην οποία δεν εφαρμόστηκε βιοεμπλουτισμός με την παράλληλη εφαρμογή των TBZ και OPP στις δύο αυτές βιοκλίνες, ενώ το βάθος ως κύριος παράγοντας φαίνεται ότι δεν επηρέασε σημαντικά τον πληθυσμό των μυκήτων.

ABSTRACT

The ever increasing use of pesticides in conventional agriculture crops has led to significant environmental effects and great risks for both ecosystems and human health, which contributed to the creation of economic and simultaneously efficient systems, called biobeds, aimed at the biodegradation wastewater containing pesticides from point sources. This work aimed to study the population of fungi in pilot biobed systems used in the detoxification of wastewater from the fruit packaging industry, containing residues of various fungicides such as imazalil (IMZ), thiabendazole (TBZ), ortho- phenylphenol (OPP), and diphenylamine (DPA). Samples were collected from three different horizons from each pilot biobed system before the start and at the end of their operation. To assess the fungal population in samples of biomixture performed real-time PCR. Based on the results, it was found that the application of pesticides within the pilot biobeds systems caused significant changes in populations of fungi in three of the five biobeds experiment. Furthermore, it was found that the depth and/or the application of bioaugmentation alongside the application of DPA and IMZ in biobeds 2 and 4 did not significantly affect the fungal population, however the results on the biobeds 3 and 5 showed that the bioaugmentation applied to biobed 5, significantly affect the population of fungi compared with biobed 3 not applied bioaugmentation with the parallel application of TBZ and OPP in these two biobeds, while the depth as the main factor appears not to significantly affect the population of fungi.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η συνεχώς αυξανόμενη γεωργική παραγωγή τις τελευταίες δύο δεκαετίες οδήγησε στη εντατική χρήση όλο και μεγαλύτερων ποσοτήτων γεωργικών φαρμάκων με εφαρμογές τόσο σε διάφορα στάδια της καλλιέργειας όσο και κατά μεταφορά και αποθήκευση, έπειτα από τη συγκομιδή των προϊόντων. Η χρήση των γεωργικών φαρμάκων στη συμβατική γεωργία στόχο έχει να αποτρέψει την καταστροφή των αγροτικών προϊόντων μέσω του ελέγχου των φυτοπαράσιτων και των ζιζανίων καθώς και τη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών (Bakirci & Hisil, 2011) με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγικότητας των εκμεταλλεύσεων. Παράλληλα, η εφαρμογή τους κατά τη μετασυλλεκτική μεταχείριση των προϊόντων στοχεύει στην προστασία των προϊόντων από μετασυλλεκτικές ασθένειες και σήψεις καρπών που μειώνουν και υποβαθμίζουν την παραγωγή. Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων γίνεται με διάφορους τρόπους, όπως ψεκασμός των υπέργειων τμημάτων του φυτού, επένδυση σπόρων, ή εφαρμογή των φαρμάκων κατευθείαν στο έδαφος όταν πρόκειται για καλλιέργειες, ενώ στις βιομηχανίες μεταχείρισης των αγροτικών προϊόντων συνήθως εφαρμόζονται ψεκασμοί ή εμβάπτιση των φρούτων σε κατάλληλα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Μία μεγάλη ποσότητα γεωργικών φαρμάκων δε φτάνει ποτέ στο στόχο της λόγω της αποδόμησης, διήθησης, εξάτμισης με αποτέλεσμα να δημιουργεί σοβαρά οικολογικά προβλήματα (Chen et al. 2009, Chevillard et al. 2012). Ανάλογα με τον τρόπο εφαρμογής, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και τις εδαφικές συνθήκες, τα γεωργικά φάρμακα μεταφέρονται στο περιβάλλον μέσω διαφόρων οδών και διεργασιών. Η τύχη και η συμπεριφορά ενός γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος είναι συνάρτηση ποικίλων βιοτικών και αβιοτικών αντιδράσεων και ανεξάρτητα από τον τρόπο εφαρμογής τους υπεισέρχονται σε διάφορες διαδικασίες συγκράτησης, μεταφοράς, απομάκρυνσης, μετασχηματισμού

και αποδόμησης τους στο περιβάλλον. Εκεί που τελικά καταλήγουν τα γεωργικά φάρμακα είναι το έδαφος και η παραμονή τους εκεί εξαρτάται από τους παραπάνω παράγοντες (Ζιώγας 2007). Εφόσον καταλήξουν στο έδαφος ένα μέρος αυτών θα αποδομηθεί με τη δράση βιοτικών και αβιοτικών μηχανισμών , ένα άλλο θα απομακρυνθεί μέσω της εξάτμισης, ενώ ένα άλλο θα εκπλυθεί προς τα βαθύτερα εδαφικά στρώματα με αποτέλεσμα τη ρύπανση των υπόγειων υδροφόρων οριζόντων, ή θα μεταφερθεί μέσω της απορροής στα επιφανειακά ύδατα (λίμνες, ποτάμια, θάλασσες) και θα τα μολύνει.

Η ολοένα αυξανόμενη και αλόγιστη χρήση των γεωργικών φαρμάκων έχει επιφέρει σημαντικά προβλήματα τόσο στο περιβάλλον όσο και στους ανθρώπους (Gavrilescu, 2005; Hussain et al., 2009). Τα φυτοφάρμακα έχουν συνδεθεί με ένα ευρύ φάσμα κινδύνων για την υγεία του ανθρώπου, που κυμαίνονται από οξείες επιπτώσεις, όπως πονοκεφάλους και ναυτία, σε χρόνιες επιδράσεις, όπως ο καρκίνος, η αναπαραγωγική βλάβη και η διατάραξη του ενδοκρινικού συστήματος (Blasco, Font, & Picó, 2006). Η ρύπανση των υδάτινων πόρων με γεωργικά φάρμακα προκαλείται από σημειακές και μη σημειακές πηγές. Ο κίνδυνος της ρύπανσης των επιφανειακών υδάτων συνδέεται πιο συχνά με μη σημειακές πηγές μέσω της κάθετης απορροής τους στο έδαφος ύστερα από την εφαρμογή τους στον αγρό. Ωστόσο οι σημειακές πηγές συμβάλλουν σημαντικά στη ρύπανση των επιφανειακών υδάτων από γεωργικά φάρμακα όπως η διαρροή του ψεκαστικού υγρού κατά τη διάρκεια του πλυσίματος του ψεκαστήρα (Müller et al. 2002). Αρκετές μελέτες προσπάθησαν να ποσοτικοποιήσουν τη ρύπανση των υδάτων με γεωργικά φάρμακα (Bach et al., 2005; Huber et al., 2000; Kreuger & Nilsson, 2001; Müller et al., 2002). Σε ορισμένες χώρες όπως το Βέλγιο και η Γερμανία, το κλάσμα εισροών από σημειακές πηγές αγροτικών λυμάτων στο συνολικό φορτίο του ποταμού από γεωργικά φάρμακα εκτιμάται από 40 έως 70-90% (Carter, 2000; Mason et al., 1999). Χαρακτηριστικό παράδειγμα τομέα της μεταποιητικής βιομηχανίας που χαρακτηρίζεται από υψηλές απαιτήσεις στην χρήση νερού ενώ παράλληλα παράγει μεγάλους όγκους ιδιαίτερα επιβαρυνμένων υγρών αποβλήτων με υψηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα αποτελούν τα συσκευαστήρια φρούτων.

Οι βιομηχανίες μεταποίησης φρούτων χρησιμοποιούν σκευάσματα μυκητοκτόνων με σκοπό την πρόληψη και τον περιορισμό μυκητολογικών ασθενειών

που εμφανίζονται κατά την αποθήκευση των φρούτων και λαχανικών. Η μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων κυρίως εσπεριδοειδών, μήλων, αχλαδιών, μπανάνας, περιλαμβάνει την εμβάπτιση ή τον ψεκασμό με πυκνά υδατικά διαλύματα (200-600 mg/L) μυκητοκτόνων όπως imazalil, Ortho-phenylphenol, Thiabendazole, και αντιοξειδωτικών όπως το Diphenylamine, γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή μεγάλου όγκου υγρών αποβλήτων τα οποία απελευθερώνονται στο περιβάλλον και αποτελούν σημαντική σημειακή πηγή ρύπανσης των υδάτινων πόρων (Castillo et al., 2000). Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων θα πρέπει να ακολουθείται από ασφαλή διαχείριση των υγρών αποβλήτων τόσο για την προστασία του περιβάλλοντος όσο και της υγείας των ανθρώπων. Η απευθείας απόρριψη τους, είτε σε συστήματα βιολογικής επεξεργασίας αστικών αποβλήτων είναι πιθανόν να προκαλέσει μη αντιστρεπτές μεταβολές στην λειτουργία τους, είτε σε φυσικά υδατικά συστήματα οδηγεί σε σημαντική υποβάθμιση της οικολογικής τους ποιότητας. Μεγάλη ποικιλία γεωργικών φαρμάκων έχει ανιχνευθεί σε ρηχά νερά, ρυάκια και ποτάμια (Castillo et al., 2000; Dabrowski et al., 2002; Gerecke et al., 2002; Gfrerer et al., 2002; Guo et al., 2007; IFEN, 2004; Jergentz et al., 2005; Neumann et al., 2002; Zhou et al., 2008) η οποία υπερβαίνει τη μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση του 0,1 mg/L για το πόσιμο νερό. Τα υγρά απόβλητα που παράγονται καθώς περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων θα πρέπει πρώτα να αποτοξικοποιούνται και έπειτα να απελευθερώνονται στο περιβάλλον, παρόλα αυτά, απορρίπτονται σε παρακείμενους αγρούς οδηγώντας σε μία μη αποδεκτή περιβαλλοντική ρύπανση που απαιτεί άμεση επέμβαση με στρατηγικές βιο-αποκατάστασης.

Η Ευρωπαϊκή Κοινότητα αναγνωρίζοντας το πρόβλημα διαχείρισης των αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων καθόρισε ως απόλυτη και βασική προϋπόθεση για την χρήση των γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων την εγκατάσταση συστημάτων επεξεργασίας των αποβλήτων που παράγονται (EFSA 2008, EC 2010). Οι μεσογειακές χώρες με ιδιαίτερα υψηλή κάλυψη καλλιεργειών σε εσπεριδοειδή και μηλοειδή είναι αυτές που κινδυνεύουν περισσότερο συμπεριλαμβανομένου και της Ελλάδας, εξαιτίας της ρύπανσης των υδάτινων πόρων από τα απόβλητα των συσκευαστηρίων φρούτων (De Wilde et al., 2010a). Διάφορες χώρες της ΕΕ ερευνούν συστήματα για την απορρύπανση και αποκατάσταση των υπόγειων υδάτινων πόρων. Για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου

συνυπολογίζονται η φύση, η συγκέντρωση, η ποσότητα και το είδος του ρυπαντή, καθώς και το κόστος και η μελλοντική χρήση της γης. Πρώτα εφαρμόζεται η ανάλυση δειγμάτων νερού για τον προσδιορισμό του ρυπαντή και στη συνέχεια ξεκινά η διαδικασία της αποτοξικοποίησης. Μία τέτοια μέθοδος είναι και η βιοαπορρύπανση δηλαδή η χρήση της μεταβολικής ικανότητας μικροοργανισμών που στόχο έχουν την εξυγίανση ρυπασμένων εδαφών και υδροφόρων συστημάτων μέσω της χρήσης των βιοκλινών.

1.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΤΗΡΙΑ ΦΡΟΥΤΩΝ

Η εμφάνιση μυκητολογικών ασθενειών μετά τη συγκομιδή των νωπών φρούτων και λαχανικών, που εκδηλώνονται κατά τη διάρκεια συντήρησης στα ψυγεία, αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες που θα μπορούσε να οδηγήσει στην ποιοτική υποβάθμιση των προϊόντων και σε σημαντικές ποσοτικές και συνεπώς οικονομικές απώλειες. Τα ποσοστά εμφάνισης ασθενειών ποικίλουν και μπορούν να συμβούν σε διάφορα στάδια της μετασυλλεκτικής διαδικασίας όπως για παράδειγμα κατά τη διάρκεια διαφόρων χειρισμών, στη συσκευασία, στη μεταφορά και στην αποθήκευση. Για παράδειγμα, στα εσπεριδοειδή μετά τη συγκομιδή παρατηρείται πράσινη μούχλα (*Penicillium digitatum*) και μπλε μούχλα (*Penicillium italicum*) (βλ. εικόνα 1.1) που οδηγεί στην υποβάθμιση των προϊόντων και σε προβλήματα στην εξαγωγή τους. Από την άλλη πλευρά, ορισμένες μυκητιακές προσβολές που προκαλούνται στα φρούτα από στελέχη των *Penicillium spp.*, *Alternaria spp.* και *Fusarium spp.*, θα μπορούσαν να παράγουν μυκοτοξίνες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ενώ η συχνότητα εμφάνισης τους αυξάνεται κατά την επεξεργασία των φρούτων. Η μόλυνση από μυκοτοξίνες αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την υγεία των ανθρώπων (FAO, 2004) σε βαθμό που οι εκθέσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων δείχνουν ότι το 25% των παγκόσμιων αγαθών επηρεάζονται από μυκοτοξίνες κάθε χρόνο. Παρόλα αυτά η αντιμετώπιση των μυκητολογικών προσβολών στηρίζεται αποκλειστικά στην εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων προσυλλεκτικά και μετασυλλεκτικά.

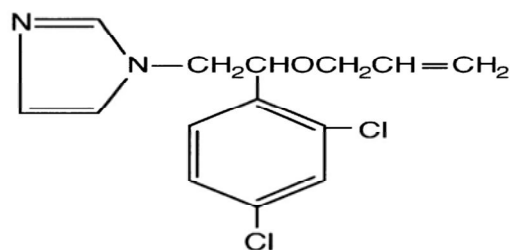
Τα συσκευαστήρια φρούτων στο πλαίσιο της συντήρησης και αποθήκευσης των προϊόντων τους χρησιμοποιούν διάφορα γεωργικά φάρμακα με σκοπό την διατήρηση της φρεσκάδας των φρούτων και την προστασία τους από διάφορες μετασυλλεκτικές ασθένειες καθώς και από τους φυσικούς εχθρούς που προσβάλλουν τα φρούτα σε αποθηκευτικούς χώρους. Για να εμποδίσουν την ανάπτυξη μυκητολογικών προσβολών αλλά και φυσιολογικών υποβαθμίσεων χρησιμοποιούν εγκεκριμένα σκευάσματα γεωργικά φαρμάκων με πιο συνηθισμένα τα imazalil (IMZ), ortho-phenylphenol (OPP), diphenylamine (DPA) και thiabendazole (TBZ).



Εικόνα 1.1 : Μύκητας του γένους *Penicillium spp.* προσβάλλει τα λεμόνια.

➤ **Imazalil (IMZ)**

Το imazalil είναι ένα διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προληπτική και θεραπευτική δράση. Ανήκει στην ομάδα των ιμιδαζολικών που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση εργοστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες των μυκήτων.



Imazalil (IMA)

Εικόνα 1.2 : Χημική δομή του γεωργικού φαρμάκου imazalil.

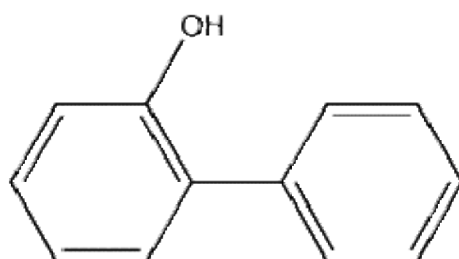
Το imazalil έχει μέτρια διαλυτότητα στο νερό (182 mg/L) και γι' αυτό αναμειγνύεται με υγρό κερί και το μείγμα μπορεί να εφαρμοστεί μέσω ψεκασμού, διαβροχής και άλλων τεχνικών σε φρούτα κατά τη μετασυλλεκτική τους μεταχείριση. Είναι πολύ αποτελεσματικό για την καταπολέμηση σήψεων της αποθήκης σε καρπούς εσπεριδοειδών, μπανάνας και άλλων φρούτων και γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρέως στα συσκευαστήρια φρούτων και όχι μόνο, καθώς καταπολεμά ένα ευρύ φάσμα μυκήτων που προκαλούν ασθένειες σε διάφορα λαχανικά, οπωροφόρα, και καλλωπιστικά. Δρα πολύ αποτελεσματικά εναντίον των μυκήτων του γένους *Penicillium* (βλ. εικόνα 1.2) που προκαλούν σήψεις κυρίως στα εσπεριδοειδή, καθώς και ενάντια στους μύκητες *Botrytis spp.*, *Altenaria citri*, και *Phomopsis sp.* οι οποίοι εμφανίζονται στα φρούτα κατά την αποθήκευση.

Οι επιτρεπτές ποσότητες που εγκρίθηκαν για την έκθεση των εφαρμογών του imazalil στα συσκευαστήρια φρούτων είναι ADI (Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη) = 0,025 mg/kg σωματικού βάρους / ημέρα και AOEL (Αποδεκτά επίπεδα έκθεσης χειριστών) = 0,05 mg/kg σωμ. βάρους /ημέρα. Σε μελέτες που γίνονται στα φρούτα για τον έλεγχο τυχόν υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων το imazalil αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο ποσοστό των υπολειμμάτων και είναι το κύριο συστατικό τους. Έχει βρεθεί πως μεταβολίζεται πολύ εύκολα και γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να γίνονται συχνοί έλεγχοι για τυχόν υπολείμματα του φαρμάκου για την επιβεβαίωση της ασφάλειας των τροφίμων (EFSA 2010). Παρόλα αυτά τα υπολείμματα του imazalil στα φρούτα, εφόσον έχει εφαρμοστεί σύμφωνα με την ορθή γεωργική πρακτική δείχνει να μην έχουν αρνητικές επιδράσεις στην υγεία των καταναλωτών. Η Διεθνής Εκτιμώμενη Ημερήσια Πρόληψη (IEDI) είναι 4% της αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης. (ADI).

Τέλος, το imazalil παρουσιάζει υψηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος (US EPA 2003 EC 2009) με τιμές DT50 που κυμαίνονται από 44 ως 137 ημέρες. Το IMZ όταν εφαρμόζεται σύμφωνα με την ορθή γεωργική πρακτική δεν είναι τοξικό για τα θηλαστικά, τους μικροοργανισμούς, τις μέλισσες, και δεν επιβαρύνει τα υγρά απόβλητα των συσκευαστηρίων έπειτα από την μετασυλλεκτική του χρήση σε εσπεριδοειδή (EFSA 2010). Αντιθέτως το IMZ θεωρείται ιδιαίτερα τοξικό στους υδρόβιους οργανισμούς όπως και αποδεικνύεται από τις ιδιαίτερα χαμηλές τιμές των συντελεστών τοξικότητας για τους διάφορους οργανισμούς - δείκτες όπως ψάρια (LC_{50} acute *Onchorynchus mykiss* = 1.48 mg/l; NOEC chronic = 0.043 mg/l) ασπόνδηλα (EC_{50} *Daphnia magna* 3.5 mg/l), και άλγη (*Pseudokirch subcapitata* E_bC_{50} = 0.87 mg/l and E_rC_{50} = 1.20 mg/l) (EC 2009)

➤ Ortho-phenylphenol (OPP)

Το Ortho-phenylphenol είναι ένα γεωργικό φάρμακο το οποίο έχει μυκητοκτόνο και βακτηριοκτόνο δράση. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των μυκήτων καθώς και των βακτηρίων στα αποθηκευμένα φρούτα και λαχανικά με σκοπό τον περιορισμό των σήψεων που εμφανίζονται κατά την αποθήκευση. Ανήκει στην ομάδα των αρωματικών υδρογονανθράκων και έχει μοριακό βάρος 170,2g/mol.



Εικόνα 1.3 : Χημική δομή του γεωργικού φαρμάκου Ortho-phenylphenol.

Το OPP είναι πτητικό και εμφανίζει περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό. Αποδομείται γρήγορα μέσα σε λίγες ώρες έως κάποιες μέρες στο περιβάλλον (U.S. EPA, 2006) και λόγω της μικρής υπολειμματικότητας του δεν υπάρχει κίνδυνος να επιβαρύνει το περιβάλλον μολύνοντας τα υπόγεια υδροφόρα συστήματα. Το OPP

αποτρέπει την σήψη των φρούτων κατά τη μεταφορά και αποθήκευση. Εφαρμόζεται κυρίως για τον έλεγχο των σήψεων σε εσπεριδοειδή και στα αχλάδια και δρα αποτελεσματικά ενάντια στους μύκητες *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea* και *Phomopsis citri* (βλ. εικόνα 1.2). Οι μέθοδοι εφαρμογής του είναι μέσω της τεχνικής του κερώματος στα εσπεριδοειδή καθώς και η εμφύσηση του σε αφρό ή διάλυμα. Έχει βρεθεί ότι το OPP δεν είναι ιδιαίτερα τοξικό για τον άνθρωπο παρόλα αυτά η επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια προκαλεί ερεθισμούς και εγκαύματα. Για την ασφάλεια των ατόμων που εκτίθενται στο φάρμακο μέσα στα συσκευαστήρια οριστικοποιήθηκαν οι τιμές αναφοράς του OPP που είναι αποδεκτές για την πρόσληψη και έκθεση των εφαρμογέων σε αυτό. Η αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη και τα αποδεκτά επίπεδα έκθεσης στο OPP είναι 0,4 mg / kg σωματικού βάρους / ημέρα (EFSA 2008). Τέλος, έπειτα από ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν σε φρούτα βρέθηκαν ποσότητες υπολειμμάτων του OPP, για το λόγο αυτό επιβάλλεται να αναγράφονται τα υπολείμματα και οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου επάνω στα φρούτα για την ενημέρωση των καταναλωτών



Εικόνα 1.4 : Μύκητας του γένους *Phomopsis citri* σε πορτοκάλι.

Από περιβαλλοντικής άποψης το OPP δεν είναι ιδιαίτερα υπολειμματικό στο έδαφος με DT50 < 1 ημέρα (EFSA 2008). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν για το OPP υψηλότερη υπολειμματικότητα στο έδαφος (DT50 43.3 ημέρες) και σε βιοκλίνες (Omirou et al. 2012). Το OPP γενικά προσροφάται ασθενώς στα εδαφικά κολλοειδή

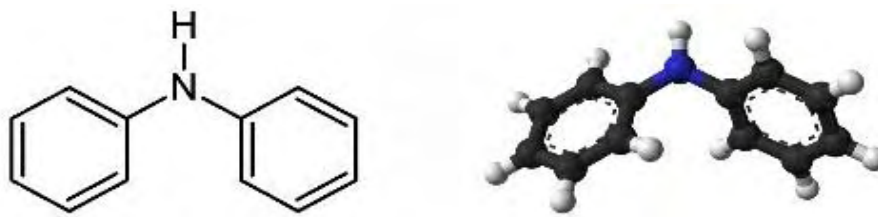
με τιμές $K_{oc} = 894-1793 \text{ ml/g}$ (Zheng et al., 2011) που δείχνουν ότι είναι πιθανό να είναι κινητικό στο έδαφος και να εμφανιστεί ως ρύπος των φυσικών υδροφόρων συστημάτων. Πράγματι μελέτες έχουν αναφέρει την συχνή ανίχνευση υπολειμμάτων του OPP σε επιφανειακά νερά (Jonkers et al. 2010).

Το OPP εμφανίζει υψηλή τοξικότητα σε υδρόβιους οργανισμούς όπως φαίνεται και από τις ιδιαίτερα χαμηλές τιμές των δεικτών τοξικότητας σε οργανισμούς δείκτες όπως ψάρια ($LC_{50} \text{ Onchorhynchus mykiss} = 4 \text{ mg/l}$; $NOEC \text{ 21d} = 0.036 \text{ mg/l}$), ασπόνδυλα ($Daphnia magna \text{ EC}_{50} = 2.7 \text{ mg/l}$) και άλγη ($Pseudokirch subcapitatus \text{ EC}_{50} \text{ βιομάζας και EC}_{50} \text{ ρυθμού ανάπτυξης} = 1.35 \text{ και } 3.57 \text{ mg/l αντίστοιχα}$) (EFSA, 2008).

➤ **Diphenylamine (DPA)**

Το Diphenylamine είναι μία οργανική ένωση η οποία κατατάσσεται τρίτη στο κατάλογο ρύπων προτεραιότητας της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Έχει μοριακό βάρος $169,2 \text{ g/mol}$ και χημικά ανήκει στις αρωματικές αμίνες. Είναι ένα άχρωμο στερεό αλλά στο εμπόριο δείχνει κίτρινο λόγω προσμίξεων. Η διφαινυλαμίνη διαλύεται σε πολλούς οργανικούς διαλύτες, είναι μετρίως διαλυτή στο νερό και χρησιμοποιείται κυρίως για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες.

Μία από τις κύριες χρήσεις του diphenylamine είναι η μετασυλλεκτική εφαρμογή του για την αντιμετώπιση του επιφανειακού εγκαύματος στα μήλα, μία φυσιολογική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την μαύρισμα της εξωτερικής επιφάνειας των μήλων που αναπτύσσεται κατά την αποθήκευση. Μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης προστατεύει τα μηλοειδή από τυχόν οξειδώσεις που προκύπτουν κατά την αποθήκευση. Όταν εμφανίζεται το έγκαυμα στα μήλα η εμπορική και οικονομική τους αξία για την αγορά των νωπών φρούτων μειώνεται δραματικά. Έτσι το DPA χρησιμοποιείται ευρέως σε όλες τις βιομηχανίες φρούτων για την προστασία ενάντια στο επιφανειακό έγκαυμα. Η εφαρμογή του γίνεται με εμβάπτιση, διαβροχή ή ψεκασμό.



Εικόνα 1.5 : Χημική δομή της αντιοξειδωτικής ουσίας Diphenylamine.

Οικοτοξικολογικές μελέτες δείχνουν ότι η DPA και τα παράγωγα της είναι δυνητικά επικίνδυνα για τους υδρόβιους οργανισμούς. Είναι ελαφρώς τοξική όταν έρθει σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια. Παρόλα αυτά, έπειτα από μελέτες που έγιναν σε ποντικούς και αρουραίους βρέθηκε ότι η DPA δεν έχει μεταλλαξιγόνο δράση. Λίγα πράγματα είναι γνωστά για την βιοαποδόμηση της ένωσης, αλλά υπήρξαν αρκετές μελέτες που έδειξαν ότι είναι βιοδιασπώμενη κάτω από αναερόβιες και ανοξικές συνθήκες. Η αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI) για την διφαινυλαμίνη είναι 0,075 mg / kg σωματικού βάρους / ημέρα (EFSA 2008).

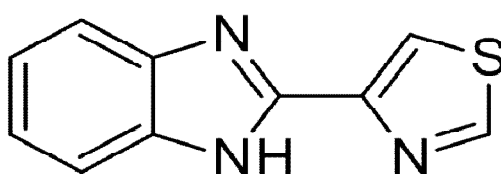
Σύμφωνα με τη νομοθεσία η διφαινυλαμίνη πλέον δεν αποτελεί εγκεκριμένο γεωργικό φάρμακο γιατί δεν υπάρχουν ακριβή στοιχεία που να δείχνουν ότι είναι ασφαλή η χρήση της και δε προκαλεί βλάβες μέσω των υπολειμμάτων της στα φρούτα. Παρόλα αυτά σε ορισμένες χώρες συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας είχε δοθεί κατά το έτος 2012-2013 κατ' εξαίρεση έγκριση 120 ημερών για χρήση της DPA στα συσκευαστήρια φρούτων λόγω της έλλειψης αντίστοιχα αποτελεσματικού αντιοξειδωτικού.

Το DPA παρουσιάζει γενικά χαμηλή υπολειμματικότητα στο περιβάλλον με τιμές DT50 για το έδαφος < 1 ημέρα (US EPA 1998). Το DPA προσροφάται στο έδαφος με τιμές K_{oc} που κυμαίνονται από 1212 ως 6593 ml/g. Γενικά το DPA παρουσιάζει χαμηλή οξεία (LD₅₀ > 2250 mg/kg bw/day) και μεσοπρόθεσμη τοξικότητα σε πουλιά (LD₅₀ > 2293 mg/kg bw/day) ενώ δεν εμφανίζει οξεία τοξικότητα σε θηλαστικά (*Oryctolagus cuniculus* LD₅₀ > 15000 mg/kg bw/day) (EFSA, 2012). Σε αντίθεση, το DPA είναι πολύ τοξικό στους υδρόβιους οργανισμούς όπως μπορεί να διαπιστωθεί από τις ιδιαίτερα χαμηλές τιμές τοξικολογικών δεικτών σε οργανισμούς-δείκτες

ψαριών (EC50 *Oncorhynchus mykiss* 2.2 mg/l), άλγεων (*Selenastrum capricornutum* biomass and growth rate EC50 0.18 and 0.30 mg/l respectively), και ασπονδύλων (*Daphnia magna* EC50 1.2 mg/l) [Drzyzga, 2003; EFSA, 2012].

➤ Thiabendazole (TBZ)

Το Thiabendazole είναι ένα γεωργικό φάρμακο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων για την πρόληψη και τη θεραπεία της πράσινης μούχλας, της σήψης και άλλων ασθενειών που προκαλούνται από μύκητες σε φρούτα και λαχανικά κατά τη μεταφορά και κατά την μακράς διάρκειας αποθήκευση. Το Thiabendazole εφαρμόζεται με εμβάπτιση ή ψεκασμό σε μπανάνες και εσπεριδοειδή για την προστασία και την καταπολέμηση παθογόνων ασθενειών του γένους *Verticillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, και *Botrytis sp.*



Εικόνα 1.6 : Χημική δομή του γεωργικού φαρμάκου Thiabendazole.

Το Thiabendazole είναι ένα μυκητοκτόνο με χαμηλή τοξικότητα στον άνθρωπο, τα πτηνά και τα θηλαστικά, παρ' όλα αυτά σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στην ισορροπία των θυρεοειδικών ορμονών και του ήπατος και είναι ύποπτο για καρκινογένεση. (US EPA, 2002; Muller et al, 2014). Έπειτα από πείραμα που έγινε σε αρουραίους διαπιστώθηκε ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί αδενώματα του θυρεοειδή ενώ παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα στα ψάρια και ασπόνδυλα του γλυκού νερού ειδικά στις εκβολές των ποταμών. Το ανώτατο επιτρεπτό όριο MRL στον άνθρωπο έχει οριστεί στα 100 μg / kg. Το TBZ είναι πολύ τοξικό στους υδρόβιους οργανισμούς όπως είναι ξεκάθαρο και από τους ιδιαίτερα χαμηλούς δείκτες τοξικότητας σε οργανισμούς δείκτες (EC50 *Daphnia magna* = 0.81

mg/l, NOEC 21 days *D. magna* = 0.084 mg/l; LC50 rainbow trout = 0.55 mg/l; EC50 algae (96h) 9.0 mg/l) (EC, 2001).

Το TBZ είναι ιδιαίτερα υπολειμματικό στο έδαφος με τιμές DT50 833-1100 ημέρες σε καλλιεργούμενα εδάφη και 1093-1444 ημέρες σε μη καλλιεργούμενα εδάφη (US EPA, 2002). Παρόμοιες μελέτες στην Ευρώπη έδειξαν επίσης ότι το TBZ ήταν πολύ υπολειμματικό στο έδαφος με DT50 > 1 έτος σε μελέτες εργαστηρίου. Το TBZ προσροφάται ισχυρά στα κολλοειδή του εδάφους με τιμές K_{oc} που κυμαίνονται από 1104 ως 22467 ml/g. Τέτοιες τιμές αποτελούν ένδειξη για χαμηλή κινητικότητα του TBZ στο έδαφος όπως αποδείχθηκε και από άλλες μελέτες (Solel et al., 1979; Omirova et al., 2012)

1.3 ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΣΥΣΚΕΥΑΣΤΗΡΙΑ ΦΡΟΥΤΩΝ

Η εντατική χρήση των γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων αποτελεί κοινή πρακτική σε όλο τον κόσμο (Yang et al., 2007) προκειμένου να περιοριστεί η ποιοτική υποβάθμιση των αγροτικών προϊόντων από μετασυλλεκτικές ασθένειες κατά την μεταφορά και αποθήκευση. Τα γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται ευρέως στη μετασυλλεκτική μεταχείριση των εσπεριδοειδών, μηλοειδών, αχλαδιών και μπανανών είναι τα imazalil (IMZ), ortho-phenylphenol (OPP), diphenylamine (DPA) και thiabendazole (TBZ), τα οποία εφαρμόζονται με διάφορες μεθόδους όπως ψεκασμό διαλυμάτων μυκητοκτόνων, εμβάπτιση σε πυκνά διαλύματα μυκητοκτόνων, και ψεκασμό με την τεχνική της υδρονέφωσης. Τα απόβλητα που προκύπτουν από τη μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων θα πρέπει να υφίστανται κάποια επεξεργασία πριν εναποτεθούν στο περιβάλλον καθώς έπειτα από μελέτες που έγιναν έχει υπολογιστεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του γεωργικού φαρμάκου που χρησιμοποιείται καταλήγει στο περιβάλλον μέσω των υγρών αποβλήτων (Pimentel, 1995) και αντιπροσωπεύει ένα δυνητικό κίνδυνο για τους οργανισμούς-μη στόχους, τον άνθρωπο και τη βιοποικιλότητα των οικοσυστημάτων. Η απευθείας απόρριψη των υγρών αποβλήτων, είτε σε συστήματα βιολογικής επεξεργασίας αστικών αποβλήτων είναι πιθανόν να προκαλέσει μη

αντιστρεπτές μεταβολές στην λειτουργία τους, είτε σε φυσικά υδάτινα συστήματα οδηγεί σε σημαντική υποβάθμιση της οικολογικής τους ποιότητας.

Τα υγρά απόβλητα που παράγονται καθώς περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων θα πρέπει να αποτοξικοποιούνται. Παρόλα αυτά τα επιβαρυνμένα υγρά απόβλητα απορρίπτονται σε παρακείμενους αγρούς οδηγώντας σε μια μη αποδεκτή περιβαλλοντική ρύπανση που απαιτεί άμεση επέμβαση με στρατηγικές βιο-αποκατάστασης. Εάν και υπάρχουν μέθοδοι επεξεργασίας των αποβλήτων όπως χημικές και θερμικές τεχνικές, ή διήθηση μέσω του εδάφους δεν είναι πάντα αποτελεσματικές, κοστίζουν αρκετά και δεν εφαρμόζονται. Έτσι η μέθοδος που συνήθως ακολουθείται είναι η απευθείας εναπόθεση των αποβλήτων στα υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα χωρίς να υποστούν καμία επεξεργασία με αποτέλεσμα την ρύπανση των υδάτινων πόρων όπως τα επιφανειακά και υπόγεια νερά, τη ρύπανση του πόσιμου νερού και τελικά την επιβάρυνση την ανθρώπινης υγείας. Ένα σημαντικό ποσοστό γεωργικών φαρμάκων που καταλήγει στο έδαφος υφίσταται βιολογικές και φυσικοχημικές μετατροπές και βιοαποδομείται (Bending et al., 2006). Η μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων είναι η κύρια οδός για την απομάκρυνση τους από το έδαφος (Aislabie and Lloyd-Jones, 1995; Bending et al., 2006) όμως τα γεωργικά φάρμακα μπορεί να επιδράσουν αρνητικά στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (Monkiedje et al., 2002; Lupwayi et al., 2010) καθώς μερικοί οργανισμοί όπως τα απονιτροποιητικά βακτήρια είναι πολύ ευαίσθητα στα ορισμένα γεωργικά φάρμακα (Ahtiainen et al., 2003). Από την άλλη πλευρά οι μικροβιακές ιδιότητες του εδάφους, ιδιαίτερα αυτές που σχετίζονται με τη βιομάζα, τη δραστηριότητα και την ποικιλομορφία των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους, μπορεί να είναι χρήσιμοι δείκτες των επιπτώσεων των διαταραχών για την υγεία του εδάφους (Hernández-Allica et al., 2006; Mijangos et al., 2006, 2009). Συνεπώς, η τοξικότητα που εμφανίζουν στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, η ρύπανση του περιβάλλοντος, και η συσσώρευση των γεωργικών φαρμάκων στις τροφικές αλυσίδες έκρινε απαραίτητη τη χρήση μεθόδων που θα επεξεργάζονται τα υγρά απόβλητα με σκοπό να περιορίσουν τη ρύπανση των υπόγειων υδροφόρων συστημάτων από μη ορθές γεωργικές πρακτικές. Μία τέτοια μέθοδος αποτοξικοποίησης των υγρών αποβλήτων είναι και η βιοαπορρύπανση.

1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην προστασία του περιβάλλοντος και ειδικότερα στην προστασία των υπόγειων και επιφανειακών υδάτινων πόρων από τη χρήση των γεωργικών φαρμάκων. Η έγκριση και άδεια χρήσης των γεωργικών φαρμάκων από την Ευρωπαϊκή Ένωση απαιτεί τη διεξαγωγή μακροχρόνιων μελετών σε ότι αφορά την επικινδυνότητα των ουσιών αυτών στο περιβάλλον, στον άνθρωπο καθώς και στο αγροτικό οικοσύστημα γενικότερα κατά τη διάρκεια της χρήσης τους από τους γεωργούς. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή ορισμένων μυκητοκτόνων σε συσκευαστήρια φρούτων έχει επιτραπεί από την ΕΕ με την προϋπόθεση ότι τα υγρά απόβλητα που θα προκύπτουν από τις μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις των φρούτων θα αποτοξικοποιούνται και έπειτα θα απορρίπτονται στο περιβάλλον. Μία είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος που χρησιμοποιείται γι' αυτό το σκοπό, η οποία βασίζεται στην προσρόφηση των φυτοπροστατευτικών ουσιών σε ενεργό κοκκώδη άνθρακα (Garcia Portillo et al., 2004). Αν και με το σύστημα αυτό επιτυγχάνεται 7.000 φορές μείωση των συγκεντρώσεων του TBZ, το κόστος του δεν επιτρέπει την εφαρμογή της μεθόδου (ΕΚ, 2000). Για το λόγο αυτό δεν εφαρμόζεται από όλα τα συσκευαστήρια και κυρίως απ' αυτά που είναι μικρού μεγέθους. Μετά από αρκετές μελέτες διαπιστώθηκε ότι η βιοαπορρύπανση των γεωργικών φαρμάκων είναι μία εξίσου αποτελεσματική μέθοδος και αρκετά οικονομική η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ευρέως από τις μονάδες συσκευασίας αγροτικών προϊόντων.

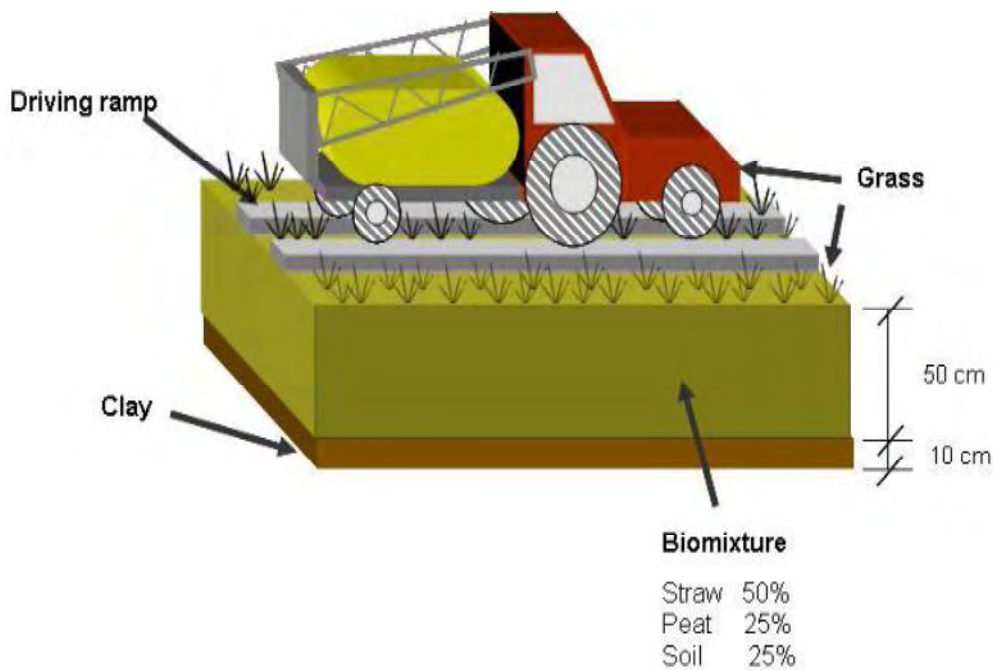
Η βιολογική αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων είναι μία διαδικασία η οποία βασίζεται στην μεταβολική ικανότητα διαφόρων μικροοργανισμών να διασπούν τους οργανικούς ρύπους που εισέρχονται στο έδαφος με σκοπό την πλήρη ανοργανοποίηση τους προς CO₂. Η δραστηριότητα των μικροοργανισμών στο έδαφος εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, ο αερισμός, το pH και αναλόγως επηρεάζεται και η αποτελεσματικότητα της βιοαπορρύπανσης. Πολλές χώρες της ΕΕ ερευνούν διάφορα είδη συστημάτων βιοαπορρύπανσης. Ένα από αυτά είναι και η εγκατάσταση στον αγρό βιοφίλτρων τα οποία ονομάζονται <<βιοκλίνες>>.

1.5 ΒΙΟΚΛΙΝΕΣ

1.5.1 Τι είναι οι βιοκλίνες

Οι βιοκλίνες είναι βιολογικά συστήματα τα οποία αποτελούν τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα βιοαπορρύπανσης που έχουν σχεδιαστεί για τη συλλογή και αποτοξικοποίηση των υγρών αποβλήτων που προέρχονται από το άδειασμα, τον καθαρισμό, και το γέμισμα του ψεκαστήρα, μία τυπική σημειακή πηγή ρύπανσης (Castillo et al., 2008). Η ιδέα της βιοκλίνης προέρχεται από τη Σουηδία, όπου εκεί εφαρμόστηκε για πρώτη φορά γύρω στο 1993, ως μία απάντηση στις ανάγκες για απλές αποτελεσματικές μεθόδους που σκοπό έχουν να ελαχιστοποιήσουν τη ρύπανση του περιβάλλοντος από τη χρήση φυτοφαρμάκων. Ο ψεκαστικός εξοπλισμός συνήθως βρίσκεται σε συγκεκριμένο χώρο στον αγρό, κοντά κυρίως σε παροχή νερού με αποτέλεσμα εάν υπάρξει οποιαδήποτε διαρροή και το έδαφος είναι στρωμένο από άμμο ή χαλίκι τότε υπάρχει προφανής κίνδυνος μόλυνσης των υπόγειων υδάτων μέσω της απόπλυσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα απόνερα των ψεκαστήρων είναι από τις πλέον δεσπόζουσες αιτίες ρύπανσης από φυτοφάρμακα. Ωστόσο, η χρήση των βιοκλινών έχει ελαχιστοποιήσει τις πιθανότητες επιβάρυνσης του περιβάλλοντος.

Οι βιοκλίνες ουσιαστικά είναι ορύγματα στο έδαφος περίπου στα 60 εκατοστά τα οποία πληρώνονται με τρία κύρια συστατικά α) ένα στρώμα αργίλου στην κάτω επιφάνεια 10 εκατοστών β) βιομίγμα από έδαφος ή άχυρο ή τύρφη σε αναλογία κατά όγκο 25/50/25% και γ) μία χορτάρينه εδαφοκάλυψη στην επάνω επιφάνεια. Η βιοκλίνη είναι επίσης εξοπλισμένη με ράμπες στην επιφάνεια της οποίας τοποθετείται ο ψεκαστήρας έτσι ώστε τα νερά από το πλύσιμο του να καταλήγουν στην φυτοκαλυμμένη βιοκλίνη (Castillo et al., 2008). Είναι μία απλή και φθηνή κατασκευή στο χώρο των αγροτικών εκμεταλλεύσεων με σκοπό να συλλέγει και να υποβαθμίζει τις διαρροές των γεωργικών φαρμάκων. Η ιδέα είναι οι χειρισμοί των γεωργικών φαρμάκων κατά το γέμισμα του ψεκαστήρα να πραγματοποιούνται επάνω στη βιοκλίνη έτσι ώστε οι όποιες διαρροές συμβαίνουν να καταλήγουν και να αποτοξικοποιούνται μέσα στη βιοκλίνη.



Εικόνα 1.7 : Περιγραφική απεικόνιση της βιοκλίνης.

Το αργιλώδες στρώμα της βιοκλίνης αποτελείται κυρίως από πηλό. Ο πηλός χρησιμοποιείται ως αδιαπέραστο υλικό που μειώνει τη ροή των λυμάτων προς τα κάτω και αυξάνει το χρόνο συγκράτησης των γεωργικών φαρμάκων μέσα στη βιοκλίνη. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματική λειτουργία της αργιλώδους στρώσης είναι ότι πρέπει να είναι υγρή και φουσκωμένη έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ρωγμών και να προληφθούν τυχόν ανεπιθύμητες ροές εκτός της βιοκλίνης.

Επάνω από το πρώτο στρώμα βρίσκεται το βιομίγμα το οποίο θα πρέπει να έχει την ικανότητα να διατηρήσει και να αποδομήσει τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων. Το βιομίγμα είναι ο βασικός παράγοντας που καθορίζει την αποτελεσματικότητα της βιοκλίνης (Castillo et al., 2008). Ένα καλό βιομίγμα προωθεί την υψηλή δέσμευση των ξενοβιοτικών ουσιών και προωθεί τη μικροβιακή δραστηριότητα. Και οι δύο αυτές ιδιότητες επηρεάζονται από τη σύνθεση, την ομοιογένεια, την ηλικία, την υγρασία και την θερμοκρασία του βιομίγματος. Το αρχικό σουηδικό μοντέλο της βιοκλίνης πληρούνταν με βιομίγμα που αποτελείται

από άχυρο, τύρφη, και έδαφος σε ογκομετρικές αναλογίες 50:25:25%. Κάθε συστατικό του βιομύγματος παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της κατακράτησης και αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων. Το άχυρο διεγείρει την ανάπτυξη μηχανισμών αποδόμησης της λιγνίνης από τους μύκητες και το σχηματισμό λιγνινολυτικών ενζύμων (όπως μαγγάνιο, υπεροξειδάσες λιγνίνης και λακκάσες) τα οποία μπορούν να αποδομούν πολλούς και διαφορετικούς οργανικούς ρύπους. Μολονότι το άχυρο φαίνεται να είναι ένα αποτελεσματικό συστατικό του βιομύγματος, η υψηλότερη διαθεσιμότητα άλλων λιγνολιτικών υλικών σε συγκεκριμένες περιοχές έχει οδηγήσει στην χρήση τους ως υποκατάστατα του άχυρου στο βιομύγμα. Έτσι λοιπόν μίσχοι σταφυλιών οι οποίοι περιέχονταν σε βιομύγμα έδειξε να αποδομούν το chlorpyrifos σε ίσες τιμές με το κλασσικό σουηδικό βιομύγμα (Vischetti et al., 2007). Από την άλλη πλευρά, οι φλούδες εσπεριδοειδών έδειξαν μειωμένη ικανότητα διάσπασης σε σύγκριση με το άχυρο (Coppola et al., 2007). Μελέτες έδειξαν ότι εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών (SMS) που αποτελείται από παστεριωμένο άχυρο εμβολιασμένο με τον εδώδιμο μύκητα *Pleurotus ostreatus* είναι εξίσου αποτελεσματικό υποκατάστατο του άχυρου (Kadian et al., 2008). Αυτό το υπόστρωμα απελευθερώνεται σε μεγάλες ποσότητες έπειτα από την ολοκλήρωση παραγωγής μανιταριών και μπορεί να ληφθεί από τις μονάδες παραγωγής χωρίς κανένα κόστος, δεδομένου ότι δεν έχει καμία χρήση για την περαιτέρω παραγωγή μανιταριών. Ο *P. ostreatus* παράγει μη εξειδικευμένα εξωκυτταρικά ένζυμα που έχει βρεθεί ότι καταλύουν καταβολικές αντιδράσεις διαφορετικών δομικά γεωργικών φαρμάκων (Bending et al., 2002). Οι Trevisan et al. (2007) χρησιμοποίησαν το SMS σε μοντέλα βιοκλίνης με ελπιδοφόρα αποτελέσματα, ενώ σε άλλες μελέτες ο εμβολιασμός του βιομύγματος με μύκητες λευκής σήψης απέδειξε ότι διεγείρουν την αποδόμηση των φυτοφαρμάκων (Castillo et al., 2001; Bending et al. 2002). Το έδαφος παρέχει την ικανότητα προσρόφησης και θα πρέπει να περιέχει χούμο και άργιλο που να προωθεί τη μικροβιακή δραστηριότητα. Επιπλέον, το έδαφος αποτελεί μία σημαντική πηγή αποικοδομητικών μικροοργανισμών που μπορούν να δράσουν συνεργικά με τους μύκητες. Η παρουσία των βακτηρίων του εδάφους μπορεί να ενισχύσει την διαδικασία αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων όπως έχει παρατηρηθεί για άλλους οργανικούς ρύπους.

Η τύρφη ως οργανικό υλικό συμβάλλει και αυτή στην ικανότητα προσρόφησης, στον έλεγχο της υγρασίας και στην αβιοτική διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων.

Μειώνει επίσης το pH του βιομίγματος γεγονός που ευνοεί την ενεργοποίηση του λιγνολυτικού ενζυμικού συστήματος των μυκήτων λευκής σήψης και έτσι να επιταχύνουν την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων. Παρόλα αυτά, στην Ελλάδα και γενικά σε όλη τη Νότια Ευρώπη υπάρχουν και άλλα λιγνοκυτταρινούχα υλικά συμπεριλαμβανομένου των υπολειμμάτων καλλιέργειας ηλίανθου (SFR), φύλλα ελιάς, μίσχοι σταφυλιών (GS), φλούδες πορτοκαλιών, καλαμπόκι (CC) , και υπόστρωμα μανιταριών (SMS) τα οποία είναι διαθέσιμα χωρίς κανένα κόστος. Έπειτα από τη δυνητική εφαρμογή τους ως συστατικά του βιομίγματος αποδείχτηκε ότι λειτουργούν αποτελεσματικά στην αποικοδόμηση των γεωργικών φαρμάκων. Ειδικότερα το (GS) φάνηκε να έχει την υψηλότερη προσρόφηση και ικανότητα υποβάθμισης των ξενοβιοτικών ουσιών μεταξύ των λιγνολυτικών υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν και μαζί με το χαμηλό κόστος φάνηκε να είναι ένα αξιόλογο υποκατάστατο της τύρφης η οποία και κοστίζει περισσότερο (Karanasios et al. 2010). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά ένα βιομίγμα που θα αποτελείται από έδαφος, φύλλα ελιάς και GS σε αναλογία 25:25:50 % κατ' όγκο θα μπορούσε να είναι το πιο αποτελεσματικό βιομίγμα για συστήματα βιοκλίνης στην Ελλάδα και ανάλογα με τη διαθεσιμότητα και σε άλλες χώρες.

Το τελευταίο στρώμα που βρίσκεται στην επιφάνεια της βιοκλίνης είναι μια στοιβάδα από γρασίδι η οποία συμβάλλει στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της βιοκλίνης, ειδικά στα ανώτερα στρώματα του βιομίγματος όπου τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων διατηρούνται και αποικοδομούνται. Το γρασίδι βοηθά επίσης στη ρύθμιση της υγρασίας της βιοκλίνης δημιουργώντας προς τα πάνω μεταφορά νερού και μπορεί να παράγει και εκκρίματα ριζών (π.χ. υπεροξειδάσες) για την υποστήριξη μεταβολικών διεργασιών.



Εικόνα 1.8 : Παραδείγματα μοντέλων βιοκλίνης.

Η ικανότητα των βιοκλινών να αποδοθούν τα υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στηρίζεται στην μεγάλη βιολογική δραστηριότητα που τα χαρακτηρίζει καθώς επίσης και στην υψηλή τους προσροφητική τους ικανότητα. Το σύστημα της βιοκλίνης παρουσιάζει διάφορες παραλλαγές ανάλογα με τις ανάγκες και τις συνθήκες της κάθε περιοχής. Οι βιοκλίνες χρησιμοποιούνται στη Σουηδία από το 1993, όταν τα πρώτα μοντέλα κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν. Επί του παρόντος εκτιμάται ότι στη Σουηδία υπάρχουν περισσότερες από 2000 βιοκλίνες που βρίσκονται σε χρήση, οι οποίες συχνά χρησιμοποιούνται για την ασφαλή πλήρωση δεξαμενών καυσίμου των τρακτέρ και άλλων αγροτικών μηχανημάτων.

Το χρονικό διάστημα κατά το οποίο παρατηρούνται τα υψηλότερα επίπεδα γεωργικών φαρμάκων στις βιοκλίνες είναι κατά τη διάρκεια της περιόδου ψεκασμού, τότε δηλαδή που χρησιμοποιούνται εντατικά. Μόλις απορριφθούν τα γεωργικά φάρμακα, συγκεντρώνονται στην άνω επιφάνεια της βιοκλίνης και το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών αποδομείται εντός ενός έτους. Το ύψος της βιοκλίνης μειώνεται κατά περίπου δέκα εκατοστά κάθε χρόνο κάτω από τις σουηδικές συνθήκες, λόγω της υποβάθμισης της οργανικής ύλης, ειδικά του άχυρου (Torstensson 2000). Ο χαμένος όγκος της βιοκλίνης αντικαθίστανται από νέα ποσότητα βιομίσγματος κάθε χρονιά πριν την έναρξη της ψεκαστικής περιόδου. Παρόλα αυτά, η απόδοση του βιομίσγματος μειώνεται και θα πρέπει να αντικαθίστανται από ένα καινούριο ύψος 50 εκατοστών.

Το υλικό που αφαιρείται, καθώς περιέχει μικρές ποσότητες από υπολείμματα φυτοφαρμάκων προτείνεται να κομποστοποιείται για ένα έτος, το οποίο είναι αρκετό για να μειώσει τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Η περιεκτικότητα της βιοκλίνης σε υγρασία είναι ζωτικής σημασίας, δεδομένου ότι επηρεάζει τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου και συνεπώς τη μικροβιακή δραστηριότητα. Υπερκορεσμός της βιοκλίνης σε υγρασία μπορεί να προκαλέσει έκπλυση των γεωργικών φαρμάκων.

Μεγάλο ενδιαφέρον για το σύστημα της βιοκλίνης έδειξαν πολλές χώρες έπειτα από την επιτυχημένη χρήση της στη Σουηδία όπως για παράδειγμα η Αγγλία, το Βέλγιο, η Περού, η Γουατεμάλα, η Γαλλία, η Ιταλία, η Νορβηγία οι οποίες χρησιμοποιούν πλέον τη βιοκλίνη με σκοπό την απορρύπανση των υγρών αποβλήτων. Από την πρώτη εφαρμογή τους στη Σουηδία, οι βιοκλίνες έχουν υποστεί διάφορες τροποποιήσεις με σκοπό να προσαρμοστούν στις διαφορετικές τοπικές συνθήκες.

1.5.2 Που χρησιμοποιούνται οι βιοκλίνες

Μέχρι σήμερα παρατηρείται ολοένα και αυξανόμενη χρήση των βιοκλινών τόσο στην Ευρώπη όσο και στην Νότιο Αμερική. Η αποτελεσματικότητα τους και το χαμηλό τους κόστος τις έχουν εντάξει στις μεθόδους που πρέπει να εφαρμόζονται στους αγρούς για την πλήρη αποτοξικοποίηση των υγρών αποβλήτων που προκύπτουν από το λάθος χειρισμό σε γεωργικές δραστηριότητες όπου χρησιμοποιούνται γεωργικά φάρμακα (Castillo et al., 2008). Καθώς η εκβιομηχάνιση της παραγωγής απαιτεί όλο και μεγαλύτερη χρήση των γεωργικών φαρμάκων στη συμβατική γεωργία, η χρήση των βιοκλινών στον αγρό κρίνεται απαραίτητη τόσο για την προστασία του περιβάλλοντος όσο και για την προστασία του ανθρώπου. Σε ορισμένες χώρες όπως η Ιταλία και η Ελλάδα το αρχικό μοντέλο της βιοκλίνης έχει τροποποιηθεί ώστε να προσαρμοστεί στις τοπικές συνθήκες, μεταβάλλοντας τους τύπους και τα ποσοστά των λιγνοκυτταρικών υποστρωμάτων (Coppola et al., 2007; Castillo et al., 2008; Karanasios et al., 2010). Έπειτα από μελέτες, αποτελεσματική υποβάθμιση τόσο των μεμονωμένων φυτοφαρμάκων όσο και των μειγμάτων τους

έχει αναφερθεί με την χρήση παραδοσιακών όσο και τροποποιημένων μοντέλων βιοκλινών (Fogg et al., 2003; Coppola et al., 2007; Vischetti et al., 2008; Karanasios et al., 2010; Tortella et al., 2010; Fernandez- Alberti et al., 2012; Tortella et al., 2012). Παρόλο που οι βιοκλίνες έχουν πολλά πλεονεκτήματα που τις καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμες στην απορρύπανση των υγρών αποβλήτων, η χρήση τους περιορίζεται προς το παρόν μόνο για την υποβάθμιση των γεωργικών φαρμάκων σε υγρά απόβλητα που παράγονται στον αγρό.

Με την έγκριση της Ευρωπαϊκής Ένωσης να χρησιμοποιούνται γεωργικά φάρμακα στα συσκευαστήρια φρούτων, θεωρήθηκε απαραίτητη η εφαρμογή κατάλληλων πρακτικών διαχείρισης των υγρών αποβλήτων που παράγονται (EC, 2001, 2010) καθώς περιέχουν υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων όπως IMZ, TBZ, OPP, και DPA. Τα συγκεκριμένα απόβλητα αποτελούν σοβαρές σημειακές πηγές ρύπανσης των υδάτινων πόρων με αποτέλεσμα να κρίνεται επιτακτική η ανάγκη αποτοξικοποίησης τους. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν τη συχνή ανίχνευση TBZ και IMZ στα συστήματα επιφανειακών υδάτων της Κόστα Ρίκα, γεγονός που αποδίδεται στην παρουσία συσκευαστηρίων φρούτων δίπλα στα ποτάμια όπου και έγιναν οι μελέτες (Castillo et al., 2000). Η μόνη μέθοδος που εφαρμόζεται σήμερα και βασίζεται στην προσρόφηση των γεωργικών φαρμάκων σε ενεργό άνθρακα (Garcia Portillo et al., 2004) παρότι είναι πολύ αποτελεσματική μέθοδος, είναι απαγορευτική για μικρότερου μεγέθους συσκευαστήρια (EC, 2000). Συνεπώς, οι βιοκλίνες θα μπορούσαν να προσφέρουν μία ολοκληρωμένη λύση τόσο για τα απόβλητα που προκύπτουν στους αγρούς όσο και για τα απόβλητα των συσκευαστηρίων φρούτων. Η ερευνητική ομάδα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είναι η πρώτη που έχει κρίνει ότι οι βιοκλίνες είναι εξίσου κατάλληλες για την απορρύπανση των υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων τόσο για την Ελλάδα, στην οποία βρίσκεται ένα μεγάλος αριθμός συσκευαστηρίων, όσο και για τις υπόλοιπες μεσογειακές που παράγουν μεγάλες ποσότητες φρούτων και ιδιαίτερα εσπεριδοειδών.

1.5.3 Μικροβιολογία των βιοκλινών

Η βιολογική αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων είναι η κύρια διεργασία που γίνεται στο εσωτερικό μίας βιοκλίνης, η οποία έχει ως στόχο την αποτοξικοποίηση των ρυπαντών και την πλήρη εξυγίανση των υδάτινων πόρων από την επιβάρυνση με υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων. Η μικροβιακή διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων μέσα στη βιοκλίνη στηρίζεται στη χρήση της μεταβολικής ικανότητας των μικροοργανισμών που περιέχονται στο βιομίγμα του συστήματος με αποτέλεσμα την πλήρη ανοργανοποίηση τους προς CO₂ και H₂O. Πολλοί είναι οι παράγοντες που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της βιοαποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων. Ο αερισμός, η υγρασία, το ποσοστό των θρεπτικών στοιχείων που περιέχονται στο βιομίγμα, το pH, η θερμοκρασία, καθώς και το είδος και η ποσότητα των ρύπων που εισέρχονται στο βιομίγμα επηρεάζουν την λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας με αποτέλεσμα και την αποτελεσματικότητα της βιοαποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι η εφαρμογή συνδυασμού γεωργικών φαρμάκων μπορεί να μεταβάλει σε σημαντικό βαθμό την αποδομητική ικανότητα των μικροοργανισμών της βιοκλίνης (Vischetti et al., 1996). Επίσης η επαναλαμβανόμενη απόρριψη του ιδίου γεωργικού φαρμάκου στην ίδια βιοκλίνη έχει βρεθεί ότι ενισχύει την αποικοδόμηση του γεωργικού φαρμάκου. Αυτό παρατηρήθηκε για το μυκητοκτόνο metalaxyl (Papini and de Andrea, 2001).

Η μέθοδος της βιοαπορρύπανσης μπορεί να πραγματοποιηθεί με την εφαρμογή δύο διαφορετικών βιολογικών παραλλαγών που είναι η βιοενεργοποίηση (biostimulation) και ο βιοεμπλουτισμός (bioaugmentation). Η βιοενεργοποίηση στηρίζεται στην προσθήκη θρεπτικών ουσιών στο βιομίγμα με σκοπό την τόνωση και ενεργοποίηση του ενδογενούς μικροβιακού πληθυσμού, ενώ ο βιοεμπλουτισμός περιλαμβάνει τον εμβολιασμό του βιομίγματος με πληθυσμούς εξωγενών μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν εξειδικευμένες αποδομητικές ικανότητες και διασπούν μεγαλύτερο ποσοστό οργανικών ρύπων (Bennett et al, 2001).

Οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τους οργανικούς ρύπους, γεγονός που οδηγεί στην πλήρη αποτοξικοποίηση του μορίου στόχου (Raymond et al., 2001; Wiren-Lehr et al., 2002). Μεταξύ των μικροβιακών

κοινοτήτων, μύκητες, βακτήρια και ακτινομύκητες είναι οι κύριοι αποδομητές των γεωργικών φαρμάκων (De Schrijver and De Mot, 1999). Στις περισσότερες περιπτώσεις οι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν τα μόρια των ξενοβιοτικών ουσιών για να τα χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας και θρεπτικών ουσιών (Abdelhafid et al., 2000; Topp, 2001; Parales et al., 2002; Getenga, 2003; Boivin et al., 2005). Οι μύκητες, με την εισαγωγή του γεωργικού φαρμάκου στο βιομίγμα, το μετατρέπουν σε μία νέα μορφή λιγότερο έως καθόλου τοξική ή μεταβολίζεται περαιτέρω από τα βακτήρια (Gianfreda and Rao, 2004). Τη διάσπαση των ρύπων την πραγματοποιούν τα ένζυμα των μικροοργανισμών έπειτα από μία λανθάνουσα περίοδο κατά την οποία οι μικροοργανισμοί προσαρμόζονται στο υπόστρωμα (Dabrowska et al., 2004). Ο ρυθμός αποδόμησης τους είναι συνάρτηση της υπάρχουσας διαθεσιμότητας σε μικροοργανισμούς καθώς και των ενζυμικών συστημάτων τους που είναι ικανά να αποδομήσουν τις ξενοβιοτικές ουσίες (Van Eerd et al., 2003). Πολλά οξειδωτικά ένζυμα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των ρύπων όπως για παράδειγμα οι υπεροξειδάσες και οι λακκάσες (Dur'an and Esposito, 1997, 2000; Dur'an et al., 2002; Dur'an, 2003; Tortella et al., 2005).

Τα βακτήρια προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα με τη χρήση τους στην βιοαπορρύπανση των γεωργικών φαρμάκων στο εσωτερικό της βιοκλίνης. Είναι μικροοργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιούν τους οργανικούς ρύπους ως πηγή θρεπτικών στοιχείων C και N με αποτέλεσμα να συμβάλλουν στην ταχύτερη αποδόμηση τους. Επιπλέον, μεταβολίζουν τους ρύπους τόσο σε αναερόβιες όσο και σε αερόβιες συνθήκες σε αντίθεση με τους μύκητες οι οποίοι είναι υποχρεωτικοί αερόβιοι μικροοργανισμοί (Maloney, 2001 : Pointing, 2001). Παρόλα αυτά, οι μύκητες μεταβολίζουν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων σε αντίθεση με τα βακτήρια που παρουσιάζουν εξειδίκευση σε ορισμένα φάρμακα με αποτέλεσμα να περιορίζεται η χρήση τους μόνο για το μεταβολισμό συγκεκριμένων οργανικών ρύπων. Μεταξύ των μυκήτων, οι μύκητες λευκής σήψης είναι αυτοί που έπειτα από μελέτες που έγιναν, ξεχώρισαν για την συμβολή τους στην αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων.

Οι μύκητες λευκής σήψης αποδείχτηκε ότι διαθέτουν την ικανότητα να αποδομούν την λιγνίνη. Τα συστήματα ενζύμων της υπεροξειδάσης που χρησιμοποιούν είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση ενός σημαντικού αριθμού και ποικιλίας οργανικών

ρύπων, συμπεριλαμβανομένων των αρωματικών υδρογονανθράκων (PAH), των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων, της πενταχλωροφαινόλης και διαφόρων άλλων φυτοφαρμάκων. Οι D' Annibale et al. (2005) μελέτησαν την αποδόμηση των αρωματικών υδρογονανθράκων από μύκητες λευκής σήψης *Phanerochaete chrysosporium* και *Pleurotus pulmonarius* με αποτέλεσμα την υποβάθμιση των οργανικών ρύπων. Αμφότεροι οι μύκητες οδήγησαν στην πλήρη αποτοξικοποίηση του εδάφους, ακόμα και σε παρουσία υψηλής υπολειμματικής συγκέντρωσης αρωματικών υδρογονανθράκων. Οι μύκητες λευκής σήψης (βασιοδιομύκητες) είναι οι μόνοι γνωστοί μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να διασπούν τη λιγνίνη εκτενώς σε CO₂ και H₂O. Αυτοί οι οργανισμοί διασπούν και όλα τα πολυμερή : κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη (Gold and Alic, 1993). Οι *Phanerochaete chrysosporium* και *Trametes versicolor* είναι οι πιο ευρέως μελετημένοι μύκητες λευκής σήψης για (Gold and Alic, 1993). Αυτοί διαθέτουν ένζυμα όπως υπεροξειδάση της λιγνίνης (LIP), η εξαρτώμενη του Mn υπεροξειδάση (MnP), και. Τα συγκεκριμένα εξωκυτταρικά ενζυμικά συστήματα των μυκήτων λευκής σήψης είναι μη ειδικά και χρησιμοποιούνται στην αποδόμηση πολλών ξενοβιοτικών ουσιών συμπεριλαμβανομένων και γεωργικών φαρμάκων (Bending et al., 2002). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι και τα ακτινοβακτήρια μπορούν να παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα που αποδομούν ένα ευρύ φάσμα πολύπλοκων οργανικών ενώσεων και συμβάλλουν στην αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων με αποτέλεσμα οι Benimeli et al., 2008) να προτείνουν τη χρήση τους για την απολύμανση του εδάφους. Παρόλα αυτά, οι μελέτες συνεχίζονται να διεξάγονται με σκοπό την αναγνώριση νέων οργανισμών που είναι ικανοί να αποδομούν τα γεωργικά φάρμακα. Για παράδειγμα, βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas sp.* και *Azospirillum sp.* είχαν την ικανότητα να αποδομούν το ethion (οργανοφωσφορικό) (Foster et al., 2004). Αντίστοιχα βακτήρια των γενών *Flavobacterium sp.* και *Sphingomonas* είχαν την ικανότητα να αποδομούν τα cadusafos και ethoprophos (Karpouzas et al., 2005). Παρόλα αυτά, η κύρια αιτία της υπολειμματικότητας των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος είναι η επικράτηση μη ευνοϊκών συνθηκών για την μικροβιακή αποδόμηση των ουσιών αυτών (Golovlana et al., 1990; Moorman et al., 2001, Fogarty and Tuovinen, 1991; B'uy'uks'onmez et al., 1999; Awasthi et al., 2000; Romantschuk et al., 2000; Peign'e and Girardin, 2004; Khna and Anjaneyulu, 2005).

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Οι βιομηχανίες μεταποίησης και συσκευασίας αγροτικών προϊόντων χρησιμοποιούν όλο και μεγαλύτερες ποσότητες γεωργικών φαρμάκων με σκοπό την προστασία και την καλή συντήρηση της παραγωγής στους χώρους αποθήκευσης, με αποτέλεσμα τα υγρά απόβλητα που απελευθερώνουν στο περιβάλλον να περιέχουν σε κάποιο ποσοστό υπολείμματα των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούν. Συστήματα απορρύπανσης των υγρών αποβλήτων εφαρμόζονται από πολλά συσκευαστήρια φρούτων, παρόλα αυτά λόγω του υψηλού τους κόστους, κρίθηκε απαραίτητη η χρήση νέων συστημάτων που θα 'ναι εξίσου αποτελεσματικά αλλά θα κοστίζουν λιγότερο. Τα συστήματα βιοαπορρύπανσης που χρησιμοποιούν την ικανότητα των μικροοργανισμών να μεταβολίζουν τους οργανικούς ρύπους, αποκτούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του χαμηλού τους κόστους. Μεταξύ των συστημάτων αυτών οι βιοκλίνες ξεχωρίζουν. Παρόλα αυτά, εάν και χρησιμοποιούνται εδώ και κάποια χρόνια στον αγρό, η χρήση τους στα συσκευαστήρια φρούτων είναι ακόμη σε πρώιμο στάδιο και θεωρείται απαραίτητη η διεξαγωγή ερευνών για την κατανόηση και μελέτη της λειτουργίας μίας βιοκλίνης.

Σκοπός του πειράματος είναι να μελετηθούν οι μεταβολές που προκαλούνται στον πληθυσμό των μυκήτων που περιέχονται μέσα στο βιομίγμα, έπειτα από την εφαρμογή υγρών αποβλήτων όπου περιέχονται υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων όπως thiabendazole (TBZ), imazalil (IMZ), ortho-phenylphenol (OPP), diphenylamine (DPA) σε διαφορετικούς συνδυασμούς. Η εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων στις βιοκλίνες πραγματοποιήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία αναλύθηκαν δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν από συστήματα πιλοτικών βιοκλινών που δημιουργήθηκαν και μελετήθηκαν στις εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Οι βιοκλίνες περιείχαν βιομίγμα αποτελούμενο από τρία υλικά τα οποία είναι τα εξής:

- 25% v/v άχυρο
- 25% v/v έδαφος
- 50% v/v SMS (εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών)

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν πέντε κάδοι απορριμμάτων. Στον πυθμένα κάθε κάδου τοποθετήθηκε αμμοχάλικο ώστε να συμβάλλει στον καλό αερισμό του βιομίγματος και την ομοιόμορφη αποστράγγιση των γεωργικών φαρμάκων. Επάνω από το αμμοχάλικο προστέθηκε πλέγμα ώστε να αποφεύγονται τυχόν διαρροές του υποστρώματος στο αμμοχάλικο και στο τέλος προστέθηκε το βιομίγμα. Από τις πέντε βιοκλίνες που κατασκευάστηκαν οι 1, 3 και 4 ήταν όγκου 1 m^3 ενώ οι 2 και 5 ήταν μικρότερου όγκου $0,24\text{ m}^3$. Για 150 ημέρες εφαρμόστηκαν καθημερινά σε όλες τις βιοκλίνες διαλύματα γεωργικών φαρμάκων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα των συσκευαστηρίων φρούτων (Καράς Παναγιώτης PhD υπό προετοιμασία). Στις βιοκλίνες 2 και 5 πραγματοποιήθηκε βιολογικός εμπλουτισμός με βακτήρια που διασπούν τα γεωργικά φάρμακα που εφαρμόστηκαν στις βιοκλίνες, και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα των βιοκλινών 1,3 και 4 στις οποίες δεν πραγματοποιήθηκε βιολογικός εμπλουτισμός με αποδομητικά βακτήρια. Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι επεμβάσεις που δέχτηκαν οι πέντε βιοκλίνες η

κάθε μία ξεχωριστά, από τις οποίες έπειτα συλλέχθηκαν τα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

ΣΧΕΔΙΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ			
ΒΙΟΚΛΙΝΕΣ	ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ		ΒΙΟΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ
ΒΙΟΚΛΙΝΗ 1	OPP	IMZ	
ΒΙΟΚΛΙΝΗ 2	DPA	IMZ	•
ΒΙΟΚΛΙΝΗ 3	TBZ	OPP	
ΒΙΟΚΛΙΝΗ 4	DPA	IMZ	•
ΒΙΟΚΛΙΝΗ 5	TBZ	OPP	

Πίνακας 2.1 : Οι επεμβάσεις με γεωργικά φάρμακα και βιοεμπλουτισμό που δέχτηκαν οι πέντε βιοκλίνες του πειράματος.

Για την εκτέλεση του πειράματος συλλέχθηκαν δείγματα πριν τη τοποθέτηση του βιομίγματος στις βιοκλίνες καθώς και μετά το πέρας των 150 ημερών εφαρμογής των γεωργικών φαρμάκων. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικούς ορίζοντες κάθε βιοκλίνης σε τρεις επαναλήψεις για όλους τους ορίζοντες κάθε βιοκλίνης. Συνολικά συγκεντρώθηκαν 54 δείγματα τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Οι ορίζοντες κάθε βιοκλίνης από όπου έγινε η συλλογή των δειγμάτων είναι οι εξής :

- 0 – 20cm
- 20 – 40cm
- 40 – 60cm

2.2 ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΒΙΟΜΙΓΜΑΤΟΣ

Για την εξαγωγή του DNA από τα 54 δείγματα βιομίγματος χρησιμοποιήθηκε το Power Soil DNA Isolation Kit. Η διαδικασία εξαγωγής του DNA με βάση το πρωτόκολλο είναι η παρακάτω:

1. Προσθήκη 0.5 g του δείγματος στο Power Bead Tube.

Τι συμβαίνει: Με την προσθήκη του δείγματος μέσα στο power bead tube αρχίζει η ομογενοποίηση του δείγματος και η λύση των κυττάρων. Το Power Bead Tube περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο βοηθά τη διασπορά των σωματιδίων του εδάφους, τη διάλυση του χουμικού οξέος και εμποδίζει την λύση του DNA.

2. Σύντομο vortex για ανάμιξη.

Τι συμβαίνει: Με το vortex αναμιγνύονται τα συστατικά μέσα στο Power Bead Tube και ξεκινά η διασπορά του δείγματος.

3. Έλεγχος του διαλύματος C1.

Τι συμβαίνει: Το διάλυμα C1 περιέχει κυρίως SDS για την ολοκληρωτική λύση των κυττάρων. Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο διαλύει τα λιπαρά οξέα και τα λιπίδια που σχετίζονται με την κυτταρική μεμβράνη πολλών μικροοργανισμών.

4. Προσθήκη 60 µl από το διάλυμα C1 και ανακίνηση αρκετές φορές ή σύντομο vortex.

5. Σταθεροποίηση όλων των Power Bead Tubes σε οριζόντια θέση με κολλητική ταινία, τοποθέτηση στο vortex και vortex για 10min .

Τι συμβαίνει: το vortex στο συγκεκριμένο βήμα γίνεται για την ολοκληρωτική ομογενοποίηση και λύση των κυττάρων μέσω της μηχανικής ανακίνησης, ενώ στα προηγούμενα βήματα 1-4 γινόταν λύση των κυττάρων με συνδυασμό χημικών παραγόντων. Με την τυχαία ανακίνηση τα σφαιρίδια παρουσία των παραγόντων διαταραχής συγκρούονται με τα μικροβιακά κύτταρα βοηθώντας στη διάρρηξή τους.

6. Φυγοκέντρηση των Power Bead Tubes στις 10,000xg για 30sec σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

7. Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό μικροσωλήνα των 2ml.

Σημείωση: Το υπερκείμενο αναμένεται να είναι μεταξύ 400-500μl σε αυτό το στάδιο. Ο ακριβής ανακτώμενος όγκος εξαρτάται από την απορροφητικότητα του υλικού εκκίνησης και δεν είναι κρίσιμος για την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας. Το υπερκείμενο μπορεί να είναι σκουρόχρωμο και να εξακολουθεί να περιέχει ορισμένα σωματίδια του εδάφους. Η παρουσία του σκούρου χρώματος καθώς και των σωματιδίων στο μίγμα αναμένεται σε πολλά δείγματα εδάφους σε αυτό το στάδιο. Στα επόμενα βήματα του πρωτοκόλλου που ακολουθούν θα αφαιρεθούν τόσο τα σωματίδια όσο και το χρώμα του μίγματος.

8. Προσθήκη 250 μl από το διάλυμα C2 και vortex για 5sec. Επώαση στους 4°C για 5min.

Τι συμβαίνει: Το διάλυμα C2 χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση αναστολέων. Περιέχει αντιδραστήρια για την καθίζηση των οργανικών και ανόργανων υλικών συμπεριλαμβανομένων χουμικών ουσιών, κυτταρικών υπολειμμάτων και πρωτεϊνών που δεν είναι DNA.

9. Φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1min στις 10,000xg.

10. Μεταφορά πάνω από 600μl υπερκείμενο σε καθαρό μικροσωλήνα των 2ml.

Τι συμβαίνει: Το ίζημα που διαμορφώνεται σε αυτό το στάδιο περιέχει οργανικά και ανόργανα υλικά συμπεριλαμβανομένων χουμικών ουσιών, κυτταρικών υπολειμμάτων και πρωτεϊνών που δεν είναι DNA. Για την καλύτερη ποιότητα και απόδοση του ανακτώμενου DNA προτείνεται η αποφυγή μεταφοράς του ιζήματος μαζί με το υπερκείμενο.

11. Προσθήκη 200μl διαλύματος C3 και σύντομο vortex. Επώαση στους 4°C για 5min.

Τι συμβαίνει: Το διάλυμα C3 είναι το δεύτερο αντιδραστήριο που προστίθεται για την επιπλέον καθίζηση και απομάκρυνση των οργανικών και ανόργανων υλικών συμπεριλαμβανομένων χουμικών ουσιών, κυτταρικών υπολειμμάτων και πρωτεϊνών που δεν είναι DNA.

12. Φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1min στις 10,000xg.

13. Μεταφορά πάνω από 750 μl υπερκείμενο σε καθαρό μικροσωλήνα των 2ml αποφεύγοντας το ίζημα.

Τι συμβαίνει: Το ίζημα σε αυτό το στάδιο περιέχει οργανικά και ανόργανα υλικά συμπεριλαμβανομένων χουμικών ουσιών, κυτταρικών υπολειμμάτων και πρωτεϊνών που δεν είναι DNA. Για την καλύτερη ποιότητα και απόδοση του ανακτώμενου DNA προτείνεται η αποφυγή μεταφοράς του ιζήματος μαζί με το υπερκείμενο.

- 14.** Ανακίνηση για ανάμιξη του διαλύματος C4 πριν τη χρήση του. Προσθήκη 1,2ml από το διάλυμα C4 στο υπερκείμενο (προσοχή να μην υπερβεί το διάλυμα το χείλος του μικροσωλήνα) και vortex για 5sec.

Τι συμβαίνει: Το διάλυμα C4 είναι ένα διάλυμα υψηλής περιεκτικότητας σε οξικό νάτριο. Καθώς το DNA είναι προσροφημένο στην μεμβράνη πυριτικού οξέος σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού, η προσθήκη του διαλύματος θα επιτρέψει τη σύνδεση του DNA, αλλά όχι της οργανικής και ανόργανης ύλης που δεν είναι DNA και μπορεί να είναι ακόμη παρούσα σε μικρές συγκεντρώσεις, με τα Spin Filters.

- 15.** Μεταφορά 675μl μέσα σε φίλτρα φυγοκέντρησης και φυγοκέντρωση στις 10,000xg για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Απομάκρυνση του υγρού και προσθήκη επιπλέον 675μl από το υπερκείμενο στο φίλτρο φυγοκέντρησης και φυγοκέντρωση στις 10,000xg για 1min σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφορά του υπόλοιπου υπερκείμενου στο φίλτρο φυγοκέντρησης και φυγοκέντρωση στις 10,000xg για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.

Τι συμβαίνει: Το DNA επιλεκτικά προσδένεται στη μεμβράνη πυριτικού οξέος του φίλτρου φυγοκέντρησης εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης του άλατος στο προστιθέμενο διάλυμα. Οι προσμείξεις περνούν από την μεμβράνη του φίλτρου αφήνοντας μόνο το DNA προσδεμένο στη μεμβράνη.

- 16.** Προσθήκη 500μl από το διάλυμα C5 και φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30sec στις 10,000xg.

Τι συμβαίνει: Το διάλυμα C5 είναι ένα διάλυμα πλύσης αιθανόλης το οποίο χρησιμοποιείται για περαιτέρω πλύση του DNA που είναι δεμένο στην μεμβράνη του φίλτρου φυγοκέντρησης. Το διάλυμα αυτό αφαιρεί τα υπολείμματα αλατιού, το χουμικό οξύ καθώς και τις άλλες προσμείξεις αφήνοντας μόνο το DNA προσδεμένο στη μεμβράνη.

17. Απομάκρυνση του υγρού από το σωληνάριο συλλογής των 2ml.

Τι συμβαίνει: Το υγρό αυτό περιέχει μόνο οργανικά και ανόργανα απόβλητα που δεν αποτελούν DNA και απομακρύνθηκαν από την μεμβράνη του φίλτρου φυγοκέντρωσης με το διάλυμα πλύσης αιθανόλης.

18. Φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1min στις 10,000xg.

Τι συμβαίνει: Στο στάδιο αυτό απομακρύνονται τα υπολείμματα του διαλύματος C5 (διάλυμα πλύσης αιθανόλης).

19. Προσεκτική τοποθέτηση του φίλτρου φυγοκέντρωσης σε καθαρό μικροσωλήνα των 2ml.

20. Προσθήκη 100μl από το διάλυμα C6 στο κέντρο της άσπρης μεμβράνης του φίλτρου.

Σημείωση: Τοποθετώντας το διάλυμα C6 (αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης) στο κέντρο της μικρής λευκής μεμβράνης εξασφαλίζεται ότι το διάλυμα C6 κάλυψε ολόκληρη την μεμβράνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποτελεσματική και ολοκληρωτική αποδέσμευση του DNA από την μεμβράνη του Spin Filter. Καθώς το διάλυμα C6 περνάει μέσα από την μεμβράνη, το DNA το οποίο μέχρι πρότινος ήταν προσδεμένο πάνω στην μεμβράνη εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης άλατος, αποδεσμεύεται από το διάλυμα C6 το οποίο στερείται άλατος. Το διάλυμα C6 δεν περιέχει EDTA.

21. Φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30sec στις 10,000xg και παραλαβή του DNA που είναι έτοιμο για τις κατάντη εφαρμογές. Το DNA που παραλήφθηκε αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια.

2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA. Πρόκειται για μία διαδικασία κατά την οποία το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA κινείται μέσα σε ένα πορώδες πηκτώμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Μόρια νουκλεϊκών οξέων τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατόν να διαχωριστούν διατηρώντας τις βιολογικές τους ιδιότητες.

Η χρώση των τμημάτων DNA επιτυγχάνεται με χρωστικές που προσδένονται στο DNA όπως το βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο παρεμβάλλεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια και φθορίζει όταν διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Εκθέτοντας το πηκτώμα σε υπεριώδη ακτινοβολία τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μία σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν με σύγκριση γνωστού μεγέθους μορίων DNA (Ρουσίδου, 2010).

Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από το έδαφος για τον έλεγχο της απόδοσης της εκχύλισης και στα προϊόντα των αντιδράσεων PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού προϊόντος.

Για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιούνται τα εξής υλικά :

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50x (Tris-acetate-EDTA): 242g Tris Base, 57.1ml οξικό οξύ και 100ml EDTA (0.5M, pH 8) προστίθενται σε 1lt dH₂O.
- 2) Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης 6x (Loading Buffer): 5ml γλυκερόλη, 1ml Bromophenol blue, 0.5ml TAE 20x και 3.5ml ddH₂O
- 3) Αγαρόζη
- 4) Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

5) Ladder quick-load®, 2-log DNA Ladder (0.1-10.0kb)

Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης περιεκτικότητας 0.7% w/v περιλαμβάνει τα εξής στάδια :

1. Προσθήκη 0.28g αγαρόζης σε 40ml TAE 1x και τοποθέτηση σε φούρνο μικροκυμάτων για 2min προκειμένου να διαλυθεί η σκόνη αγαρόζης.
2. Προσθήκη 1.5ml βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα και προσεκτική ανακίνηση.
3. Μεταφορά του διαλύματος σε ειδική κασέτα και διατήρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έως ότου στερεοποιηθεί το υγρό.
4. Τοποθέτηση της πηκτής αγαρόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Η προετοιμασία των δειγμάτων έτσι ώστε να τρέξουν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη 1μl loading buffer (επιτρέπει την εύκολη τοποθέτηση των δειγμάτων και την παρακολούθησή τους στην πηκτή) σε 3μl DNA. Τα δείγματα στη συνέχεια φορτώνονται στα πηγάδια της πηκτής αγαρόζης με το πρώτο πηγάδι πάντα να φορτώνεται με 3μl ladder. Αφού τοποθετηθούν όλα τα δείγματα πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση με τη βοήθεια τροφοδοτικού στα 90V. Η παρατήρηση του DNA γίνεται με έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑ Qubit™

Η ποσοτικοποίηση του DNA πραγματοποιείται πριν τη PCR πραγματικού χρόνου, ούτως ώστε όλα τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν να έχουν ίδια αρχική συγκέντρωση σε DNA (0.2 ng DNA/μl). Με τον τρόπο αυτό τα διαφορετικά αποτελέσματα που τυχόν θα προκύψουν θα οφείλονται στις αντιδράσεις που

λαμβάνουν χώρα στην PCR πραγματικού χρόνου και όχι στις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε DNA.

Η ποσοτικοποίηση του DNA γίνεται με το φθορισμόμετρο Qubit™ Assays. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο η διαδικασία μέτρησης είναι η εξής:

1) Χρήση δύο μικροσωλήνων για τα πρότυπα και ενός μικροσωλήνα για κάθε δείγμα.

Σημείωση: Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, σύμφωνα με την οποία ποσοτικοποιείται το DNA στα δείγματα, θα πρέπει τα πρότυπα να μετρηθούν. Το ένα περιέχει την ελάχιστη και το άλλο τη μέγιστη συγκέντρωση DNA.

2) Προετοιμασία του διαλύματος εργασίας διαλύοντας το Qubit™ reagent 1:200 σε ρυθμιστικό Qubit™ buffer.

3) Προετοιμασία των σωλήνων μέτρησης σύμφωνα με τον Πίνακα 2.2.

	Standard Assay Tubes	User Sample Assay Tubes
Όγκος διαλύματος εργασίας	190μl	180-199μl
Όγκος πρότυπου διαλύματος	10μl	-
Όγκος δείγματος που πρέπει να προστεθεί	-	1-20μl
Συνολικός όγκος	200μl	200μl

Πίνακας 2.2: Προετοιμασία των σωλήνων μέτρησης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης DNA με το φθορισμόμετρο Qubit™ Assays.

- 4) Vortex όλων των μικροσωλήνων για 2-3sec.
- 5) Επώαση των δειγμάτων για 2min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Μέτρηση σε σύστημα Qubit 2.0 Fluometer.

2.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Η διαδικασία εκτίμησης του πληθυσμού των μυκήτων χωρίζεται σε δύο μέρη. Το πρώτο περιλαμβάνει την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και το δεύτερο την ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων σύμφωνα με την καμπύλη. Η ποσοτικοποίηση και ο προσδιορισμός των άγνωστων δειγμάτων στην παρούσα μελέτη έγινε με χρήση της απόλυτης ποσοτικοποίησης για αυτό και είναι απαραίτητη η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

2.5.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης περιλαμβάνει τα στάδια που ακολουθούν στη συνέχεια.

2.5.1.1 Ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας βάσεων με PCR πραγματικού χρόνου

Σε αυτό το στάδιο η PCR πραγματικού χρόνου επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας βάσεων DNA σε πολλά αντίγραφα σε πραγματικό χρόνο.

Αρχικά κατασκευάζεται το διάλυμα της PCR πραγματικού χρόνου (master mix), το οποίο περιέχει:

- 5μl από το ρυθμιστικό διάλυμα SYBR fast
- 0.1μl από τους εκκινητές ITS IF και 5,8 SR αντίστοιχα

Στον πίνακα 2.3 που ακολουθεί δίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου.

Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών (5' to 3'')
ITS IF	T CC GTA GGT GAA CCT GCG G
5,8 SR	TCG ATG AAG AAC GCA GCG

Πίνακας 2.3 : Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για τους μύκητες.

- 0.2μl από την φθορίζουσα Rox Low
- 0.4μl από το διάλυμα Bovine Serum Albumin (BSA)

Σημείωση: Το διάλυμα BSA χρησιμοποιείται ως παράγοντας αποκλεισμού των αναστολέων της πολυμεράσης που συνήθως περιέχονται σε DNA εδάφους όπως χουμικά οξέα

- 3.2μl νερό
- 1 μl DNA

Στον πίνακα 2.4 που ακολουθεί παρουσιάζεται το θερμοκυκλοποιητικό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την εκτίμηση του αριθμού αντιγράφων του 18S rRNA των μυκήτων με PCR πραγματικού χρόνου.

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι	Στάδιο
95 °C	3min	1	Αποδιάταξη
95 °C	15sec	35	Αποδιάταξη
63 °C	15sec	35	Υβριδοποίηση
95 °C	1min	1	Καμπύλη Αποδιάταξης
55 °C	30sec	1	
95 °C	30sec	1	

Πίνακας 2.4 : Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων στα δείγματα βιομίγματος των βιοκλινών με PCR πραγματικού χρόνου.

2.5.1.2 Εξαγωγή DNA από πηκτή αгарόζης

Μετά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου το προϊόν που προκύπτει ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 1.3% w/v. Η προετοιμασία της πηκτής αгарόζης 1.3% w/v περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη 0.91 g αгарόζης σε 70 ml TAE 1x και τοποθέτηση σε φούρνο μικροκυμάτων για 2min προκειμένου να διαλυθεί η σκόνη αгарόζης.
2. Προσθήκη 2ml βρωμιούχο αιθίδιο στο διάλυμα και προσεκτική ανακίνηση.
3. Μεταφορά του διαλύματος σε ειδική κασέτα και διατήρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έως ότου στερεοποιηθεί το υγρό.
4. Τοποθέτηση της πηκτής αгарόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Η προετοιμασία των δειγμάτων ούτως ώστε να τρέξουν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη 1μl loading buffer (ρυθμιστικό διάλυμα για έλεγχο των συνθηκών της αντίδρασης) σε 10μl PCR προϊόντος. Τα δείγματα στη συνέχεια φορτώνονται στα πηγάδια της πηκτής αгарόζης με το πρώτο πηγάδι πάντα να φορτώνεται με 3μl ladder. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τίθεται σε λειτουργία και το DNA τρέχει από τον αρνητικά φορτισμένο πόλο προς τον θετικό. Μετά το πέρας επαρκούς χρόνου

ελέγχεται η εικόνα του DNA σε συσκευή UV, στη συνέχεια αποθηκεύεται σε δισκέτα και μετά σε υπολογιστή.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται εξαγωγή DNA από την πηκτή αγαρόζης με τη βοήθεια του **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit**. Η εξαγωγή DNA από την πηκτή αγαρόζης σύμφωνα με το πρωτόκολλο ακολουθεί τα παρακάτω βήματα:

1. Αποκοπή της ζώνης DNA και διαλυτοποίηση της πηκτής αγαρόζης

Με αποστειρωμένο νυστέρι γίνεται αποκοπή της ζώνης DNA από την πηκτή αγαρόζης και αφαιρούνται όλα τα πρόσθετα αγαρόζης. Ζυγίζεται το κομμάτι της πηκτής και τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα. Για κάθε 100mg πηκτής αγαρόζης περιεκτικότητας < 2% γίνεται προσθήκη 200μl Buffer NT1. Για τις πηκτές αγαρόζης περιεκτικότητας > 2% διπλασιάζεται ο όγκος του Buffer NT1 που προστίθεται. Επώαση των δειγμάτων για 5-10min στους 50°C. Σύντομο vortex των δειγμάτων για 2-3min μέχρι η πηκτή αγαρόζης να διαλυθεί τελείως

2. Δέσμευση του DNA

Τοποθέτηση της NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up στήλης σε καθαρό μικροσωλήνα των 2ml και προσθήκη 700μl δείγματος. Φυγοκέντρωση για 30sec στις 11,000xg. Απομάκρυνση του υγρού από τον μικροσωλήνα και επανατοποθέτηση της στήλης στον μικροσωλήνα. Προσθήκη του εναπομείναντος δείγματος, εάν θεωρηθεί απαραίτητο, και επανάληψη του σταδίου της φυγοκέντρωσης.

3. Πλύση της μεμβράνης του φίλτρου

Προσθήκη 700μl από το Buffer NT3 στην NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up στήλη. Φυγοκέντρωση για 30sec στις 11,000xg. Απομάκρυνση του υγρού από το σωλήνα και επανατοποθέτηση της στήλης στον σωλήνα.

4. Ξήρανση της μεμβράνης του φίλτρου

Φυγοκέντρωση για 1min στις 11,000xg για να απομακρυνθεί τελείως το Buffer NT3. Αποφυγή επαφής της κολώνας με το υγρό κατά τη διάρκεια απομάκρυνσής της από το μικροσωλήνα.

5. Εκλούση του DNA

Τοποθέτηση της NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up στήλης σε νέο μικροσωλήνα των 1.5ml. Προσθήκη 20-25μl νερού και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 1min. Φυγοκέντρωση για 1min στις 11,000xg.

Τέλος γίνεται έλεγχος του ανακτώμενου DNA σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 0.7% w/v.

2.5.1.3 Ένθεση του καθαρισμένου προϊόντος PCR σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης

Για την κλωνοποίηση του DNA μετά την PCR πραγματικού χρόνου, το PCR προϊόν εισάγεται σε pGEM πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης. Ο pGEM είναι ευθυγραμμισμένος φορέας ο οποίος στα δύο άκρα του φέρει μονή 3'-τελική θυμίνη.

Αρχικά υπολογίζεται η ποσότητα (ng) του PCR προϊόντος που θα εισαχθεί στον φορέα κλωνοποίησης σύμφωνα με τον τύπο:

$$\frac{\text{ng of vector} \cdot \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \cdot \text{insert: vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

Η συγκέντρωση του PCR προϊόντος εκτιμάται με τη βοήθεια πηκτής αγαρόζης περιεκτικότητας 0.7% w/v.

Η προετοιμασία των δειγμάτων ούτως ώστε να τρέξουν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη 1μl loading buffer σε 5μl PCR προϊόντος. Μετά την ηλεκτροφόρηση ελέγχεται η εικόνα της πηκτής. Η ζώνη του PCR προϊόντος συγκρίνεται με την ζώνη του ladder και εμπειρικά βρίσκεται με ποια αλληλουχία βάσεων του ladder συμπίπτει η αλληλουχία βάσεων του PCR προϊόντος. Για τους μύκητες οι βάσεις είναι 300bp. Στη συνέχεια κατασκευάζεται αντιδραστήριο για τους μύκητες το οποίο περιέχει:

- 5μl από το 2x Buffer
- 0.5μl από τον φορέα κλωνοποίησης pGEM
- 1μl από το ένζυμο λιγάση
- 1.5μl από το PCR προϊόν
- 2μl νερό

Τέλος το αντιδραστήριο επωάζεται για 16-18h στους 4°C.

2.5.1.4 Μετασχηματισμός του πλασμιδιακού φορέα σε δεκτικά κύτταρα E. Coli

Μετά την εισαγωγή του DNA στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο), το πλασμίδιο μεταφέρεται σε δεκτικά κύτταρα E. coli DH5α με την διαδικασία που μετασχηματισμού που περιγράφεται παρακάτω:

1. Διατήρηση των δεκτικών κυττάρων (φυλάσσονται στους -80°C) σε πάγο έως ότου ξεπαγώσουν.
2. Ανάμιξη 80μl δεκτικών κυττάρων με 2μl πλασμιδίου υπό ασηπτικές συνθήκες.
3. Επώαση για 30min σε πάγο.

4. Υδατόλουτρο για 55sec στους 42°C.

5. Επώαση για 2min σε πάγο.

6. Προσθήκη 200μl LB.

Το LB είναι θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο περιέχει:

- 2g NaCl
- 2g Cazein
- 2.5g Yeast extract
- H₂O μέχρι τα 200ml

7. Επώαση για 60min στους 37°C και τακτική ανάδευση

8. Προσθήκη 50μl x-gal (φυλάσσεται στους -20°C) και 10μl IPTG (φυλάσσεται στους 4°C)

9. Επίστρωση σε τρυβλίο.

Τα τρυβλία έχουν θρεπτικό υπόστρωμα LB που περιέχει:

- 5g NaCl
- 5g Cazein
- 2.5g Yeast extract
- 7.5g agar (1.5%)
- H₂O μέχρι τα 500ml
- 1ml αμπικιλίνη συγκέντρωσης 100mg/ml

Σημείωση: Η αμπικιλίνη προστίθεται αφού το διάλυμα αναδευτεί και αποστειρωθεί.
10. Επώαση στους 37°C για 16-18h.

2.5.1.5 Επιλογή αποικιών με ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και ανάπτυξη τους σε θρεπτικό υλικό LB

Μετά το πέρας των 18h επώασης, ελέγχονται οι αποικίες που εμφανίζονται στα τρυβλία. Οι αποικίες διαχωρίζονται στις λευκές και στις γαλάζιες. Οι λευκές αποικίες θεωρούνται ως θετικές ως προς την εισαγωγή του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα και επιλέγονται για περαιτέρω μελέτη. Οι λευκές αποικίες επιλέγονται από τα τρυβλία υπό ασηπτικές συνθήκες με οδοντογλυφίδα και μεταφέρονται σε δοχείο που περιέχει:

- 5ml θρεπτικού υποστρώματος LB
- 5μl αμπικιλίνη συγκέντρωσης 100mg/ml

Τα δοχεία στη συνέχεια μεταφέρονται σε θερμαινόμενο αναδευόμενο επωαστήριο στους 37°C όπου και παραμένουν για 16-18h.

2.5.1.6 Απομόνωση πλασμιδίων

Η απομόνωση του πλασμιδίου από τα δεκτικά κύτταρα *E. coli* που περιέχουν τον πλασμιδιακό φορέα με το ένθεμα γίνεται με τη βοήθεια του **NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)**.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο η διαδικασία απομόνωσης των πλασμιδίων είναι η εξής:

1. Καλλιέργεια και συγκομιδή των βακτηριακών κυττάρων

Παραλαβή του βακτηριακού ιζήματος των μετασχηματισμένων βακτηρίων E.coli με φυγοκέντρηση για 30sec στις 11,000xg 5-10ml καλλιέργειας σε LB. Απόρριψη του υπερκείμενου και αφαίρεση όσο περισσότερου υγρού είναι δυνατό.

2. Λύση κυττάρων

Προσθήκη 500μl Buffer A1, επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με Vortex ή πιπέτα. Έλεγχος του μίγματος ώστε να μην υπάρχουν εναπομείναντα συσσωματώματα κυττάρων προτού προστεθεί το Buffer A2.

Προσθήκη 500μl Buffer A2. Ανάμιξη με ανακίνηση του μικροσωλήνα για 6-8 φορές. Επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5min ή μέχρι το διάλυμα να εμφανιστεί καθαρό.

Προσθήκη 600μl Buffer A3. Ανάμιξη με ανακίνηση του μικροσωλήνα 6-8 φορές.

3. Καθαρισμός του διαλύματος

Φυγοκέντρηση για 10min στις 11,000xg σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

4. Δέσμευση του DNA

Τοποθέτηση της NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) στήλης μέσα σε καθαρό μικροσωλήνα των 2ml και προσθήκη 750μl υπερκείμενου. Φυγοκέντρηση για 1min στις 11,000xg. Απομάκρυνση του υγρού από τον μικροσωλήνα και επανατοποθέτηση της στήλης εντός του μικροσωλήνα.

5. Πλύση της μεμβράνης του φίλτρου

Προσθήκη 500μl Buffer AW προθερμασμένο στους 50°C και φυγοκέντρωση για 1min στις 11,000xg. Απομάκρυνση του υγρού από το μικροσωλήνα και επανατοποθέτηση της NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) στήλης στον μικροσωλήνα.

Προσθήκη 600μl Buffer A4 (περιέχει αιθανόλη) και φυγοκέντρωση για 1min στις 11,000xg. Απομάκρυνση του υγρού και επανατοποθέτηση της στήλης στο μικροσωλήνα.

6. Ξήρανση της μεμβράνης του φίλτρου

Φυγοκέντρωση για 2min στις 11,000xg και απόρριψη του εκπλύματος που συλλέγεται.

7. Έκλυση του DNA

Τοποθέτηση της NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) στήλης σε καθαρό μικροσωλήνα των 1.5ml και προσθήκη 50μl Buffer AE προθερμασμένο στους 70°C. Επώση για 2min στους 70°C. Φυγοκέντρωση για 1min στις 11,000xg και παραλαβή του DNA.

2.5.1.7 Ποσοτικοποίηση πλασμιδίων με σύστημα Qubit™

Σε αυτό το στάδιο ποσοτικοποιούνται τα πλασμίδια προκειμένου στη συνέχεια να υπολογιστούν τα αντίγραφα του DNA που παρήχθησαν. Η ποσοτικοποίηση των πλασμιδίων γίνεται με το **Qubit™ Assays** και η διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια όπως αναγράφεται στην παράγραφο 2.4.

Τα αντίγραφα του DNA υπολογίζονται από τον παρακάτω τύπο:

$$\frac{6.02 \cdot 10^{23} \left(\frac{\text{copies}}{\text{mol}} \right) \cdot \text{DNA amount (g)}}{\text{DNA length (bp)} \cdot 660 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol} \cdot \text{bp}} \right)} = \text{copies DNA}$$

2.5.1.8 Αραιώσεις πλασμιδίων

Μετά τον υπολογισμό των αντιγράφων DNA πραγματοποιούνται αραιώσεις των πλασμιδίων ούτως ώστε να προκύψουν διαλύματα που περιέχουν γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου-στόχου και τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς στην μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν οι διαδοχικές αραιώσεις των πλασμιδίων από 3.6×10^{10} έως 3.6×10^0 αντίγραφα του γονιδίου ITS. Από κάθε αραιώση χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.

2.5.1.9 Δημιουργία καμπύλης αναφοράς με χρήση της PCR πραγματικού χρόνου

Για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς γίνεται χρήση της PCR πραγματικού χρόνου. Κατασκευάζεται το master mix το οποίο περιέχει:

- 5μl Sybr fast
- 0.1μl ITS IF & 0.1μl 5.8SR
- 0.2μl Rox Low
- 0.4μl BSA
- 3.2μl H₂O
- 1 μl DNA

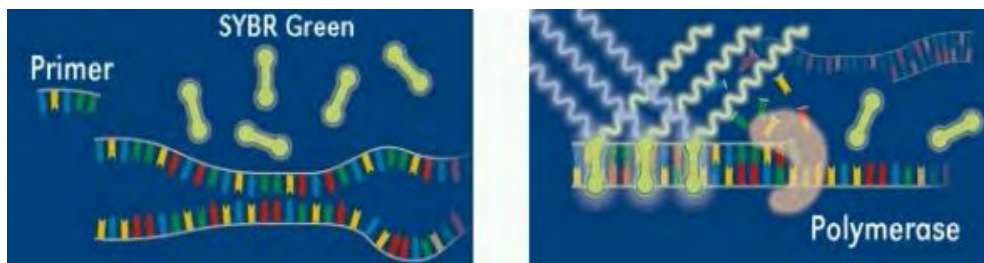
2.5.2 Ποσοτικοποίηση άγνωστων δειγμάτων με χρήση της PCR πραγματικού χρόνου

Για την ποσοτικοποίηση του DNA των 54 άγνωστων δειγμάτων έγινε χρήση της PCR πραγματικού χρόνου.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της αφθονίας μικροοργανισμών σε ένα δείγμα μέσω της μέτρησης του πλήθους των αντιγράφων ενός γονιδίου-δείκτη όπως είναι το 18S rRNA. Η q-PCR χρησιμοποιείται για την μελέτη της έκφρασης γονιδίων και στην περίπτωση αυτή ως εκμαγείο χρησιμοποιείται cDNA αντί DNA. Η παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA που παράγεται στην αντίδραση γίνεται με τη σήμανση των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια κατά τα πρώτα στάδια της αντίδρασης. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από αυτά τα μόρια μετράται σε κάθε κύκλο και συμβάλλει στην ποσοτικοποίηση του προϊόντος. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που πραγματοποιούνται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Ρουσίδου, 2010).

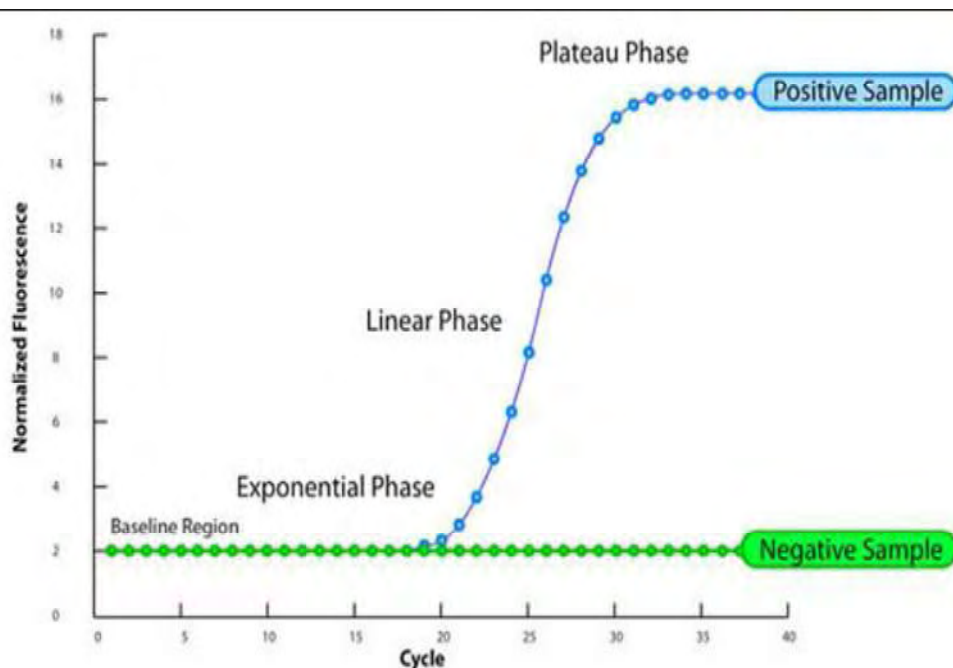
Τα προϊόντα της qPCR ανιχνεύτηκαν με τη βοήθεια της χρωστικής **SYBR Green** η οποία προσδένεται στο DNA χωρίς κάποια προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα. Το κύριο πλεονέκτημα της συγκεκριμένης χρωστικής είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών και για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου. Το μειονέκτημα της SYBR Green είναι ότι προσδένεται κατά την αντίδραση ενίσχυσης στα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται στα οποία συμπεριλαμβάνονται πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύψουν. Η καμπύλη αποδιάταξης είναι η λύση του προβλήματος η οποία διευκολύνει τη διαδικασία βελτιστοποίησης των συνθηκών δίνοντας τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προκύπτει από την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου από τον φθορισμό που οφείλεται στα διμερή των εκκινητών ή στα μη ειδικά προϊόντα (Κορτσινίδου, 2012; Ρουσίδου, 2010).

Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί η χρωστική SYBR Green παρουσιάζεται στην εικόνα 2.1.



Εικόνα 2.1: Λειτουργία χρωστικής SYBR Green. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός, όταν όμως είναι ενσωματωμένη στο DNA σε συνδυασμό με τη διέγερση της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, τότε παράγεται φθορισμός. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Ρουσίδου, 2010).

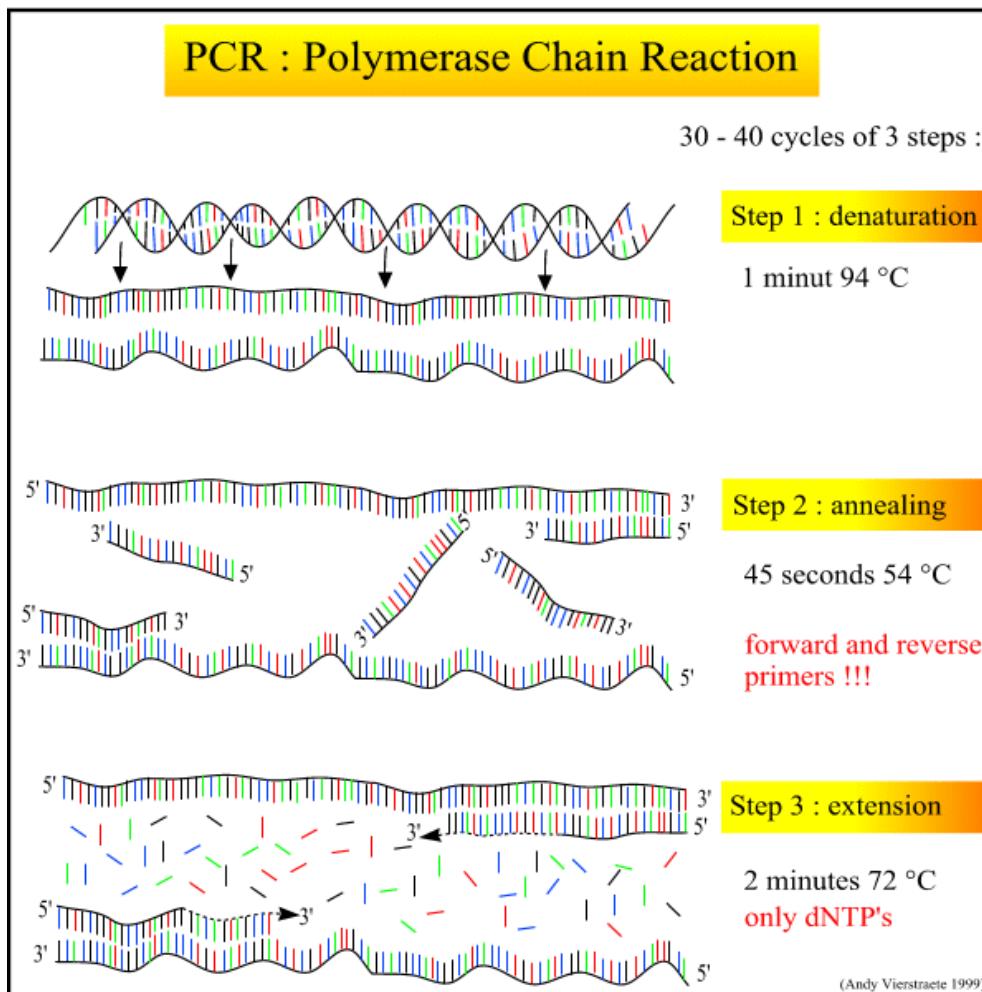
Από τη μέτρηση της αύξησης του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης προκύπτει η καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot). Η καμπύλη ενίσχυσης της PCR πραγματικού χρόνου μπορεί να χωριστεί σε 4 φάσεις. Την φάση στην οποία τα επίπεδα του ενδογενή φθορισμού (background fluorescence) είναι υψηλότερα από τα επίπεδα του φθορισμού που προέρχονται από τα προϊόντα των πρώτων κύκλων της PCR. Την εκθετική φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σε αυτή τη φάση η αντίδραση είναι πιο αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προηγμένη αλληλουχία DNA. Η γραμμική φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA και τέλος, η φάση κορεσμού στην οποία έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων. Στην εικόνα 2.2 παρουσιάζονται οι φάσεις της καμπύλης ενίσχυσης.



Εικόνα 2.2 : Η καμπύλη παρουσιάζει τις τρεις φάσεις στις οποίες διακρίνεται η διαδικασία της PCR. α) Εκθετική φάση (Exponential phase), β) Γραμμική φάση (Linear phase) και γ) Φάση Πλατώ (E. Λιανίδου).

Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης, η ποσότητα των συντιθέμενων προϊόντων είναι ανάλογη της αρχικής ποσότητας και κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης γίνεται η ποσοτικοποίηση των αγνώστων δειγμάτων. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct. Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο-κατώφλι (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Όσο υψηλότερη είναι η αρχική συγκέντρωση του γονιδίου στόχου τόσο μικρότερη είναι η τιμή Ct (Ρουσίδου, 2010).

Στην εικόνα 2.3 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα βασικά στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης



Εικόνα 2.3 : Τα βασικά στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Στάδιο 1 (Step 1): Αποδιάταξη της διπλής αλυσίδας του τμήματος DNA (denaturation), Στάδιο 2 (Step 2): ένωση των εκκινητών σε κάθε αλυσίδα (annealing), Στάδιο 3 (Step 3): Σύνθεση των νέων μορίων DNA (extension).

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων της qPCR παρασκευάζεται master mix το οποίο περιέχει:

- 5μl SYBR fast mix
- 0.1μl από καθένα από τους δύο εκκινητές (ITS IF και 5,8SR)
- 0.2μl Rox Low
- 0.4μl BSA
- 3.2μl H₂O

Σε πιατάκι 96 θέσεων τοποθετούνται πρώτα τα δείγματα για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς (9μl master mix και 1μl από τις αραιώσεις των πλασμιδίων) και στη συνέχεια τα δείγματα (9μl master mix και 1μl DNA κατάλληλα αραιωμένο ώστε να περιέχει 0.2ng DNA από κάθε δείγμα) ενώ διάσπαρτα βρίσκονται τα τυφλά δείγματα τα οποία αποτελούνται από το master mix χωρίς να έχει προστεθεί DNA . Το πιατάκι τοποθετείται σε σύστημα Stratagene q-PCR σύμφωνα με το θερμοκυκλοποιητικό πρόγραμμα που δίνεται στον Πίνακα 2.5.

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι	Στάδιο
95 °C	3min	1	Αποδιάταξη
95 °C	15sec	35	Αποδιάταξη
63 °C	15sec	35	Υβριδοποίηση
95 °C	1min	1	Καμπύλη Αποδιάταξης
55 °C	30sec	1	
95 °C	30sec	1	

Πίνακας 2.5 : Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων στα δείγματα βιομύκτου των βιοκλινών με PCR πραγματικού χρόνου.

Κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης το επιλεγμένο τμήμα δίκλωνου DNA υποβάλλεται σε θερμοκρασία 95°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του. Κατά τη διάρκεια της υβριδοποίησης η θερμοκρασία μειώνεται στους 63°C προκειμένου να επιτευχθεί η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα. Το στάδιο της επιμήκυνσης έχει αφαιρεθεί από την PCR πραγματικού χρόνου για τους μύκητες καθώς η προεπιλεγμένη αλληλουχία προς ενίσχυση διαθέτει μόνο 300bp.

2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

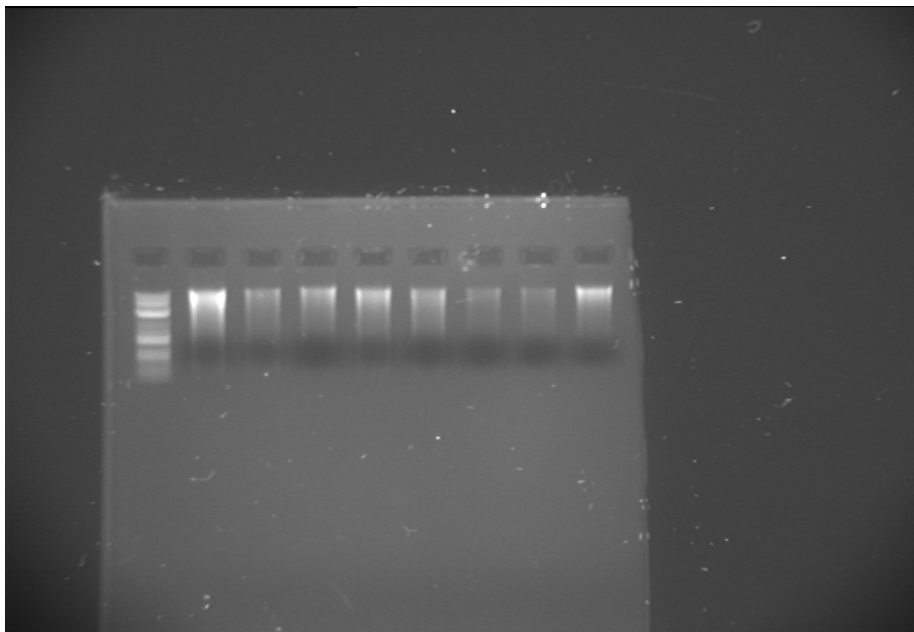
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση των στατιστικών πακέτων Gen Stat 11th Edition (VSN International Ltd) και SPSS 11. Τα δεδομένα εξετάστηκαν με χρήση παραλλακτικότητας μίας ή δύο μεταβλητών με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσο ο χρόνος, τα διάφορα βάθη από τα οποία συλλέχθηκαν τα δείγματα, τα γεωργικά φάρμακα καθώς και ο βιοεμπλουτισμός επηρέασαν τον πληθυσμό των μυκήτων που προϋπήρχαν στις βιοκλίνες στο τέλος της λειτουργίας τους. Η αξιολόγηση έγινε με ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών και με επίπεδο σημαντικότητας $p=0,05$. Στις περιπτώσεις που τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των κυρίων παραγόντων που εξετάστηκαν εφαρμόστηκε το Tukeys test ώστε να διαπιστωθούν τυχόν επιδράσεις του ενός από τους δύο παραγόντων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΞΑΓΩΓΗΣ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΦΟΥΣ

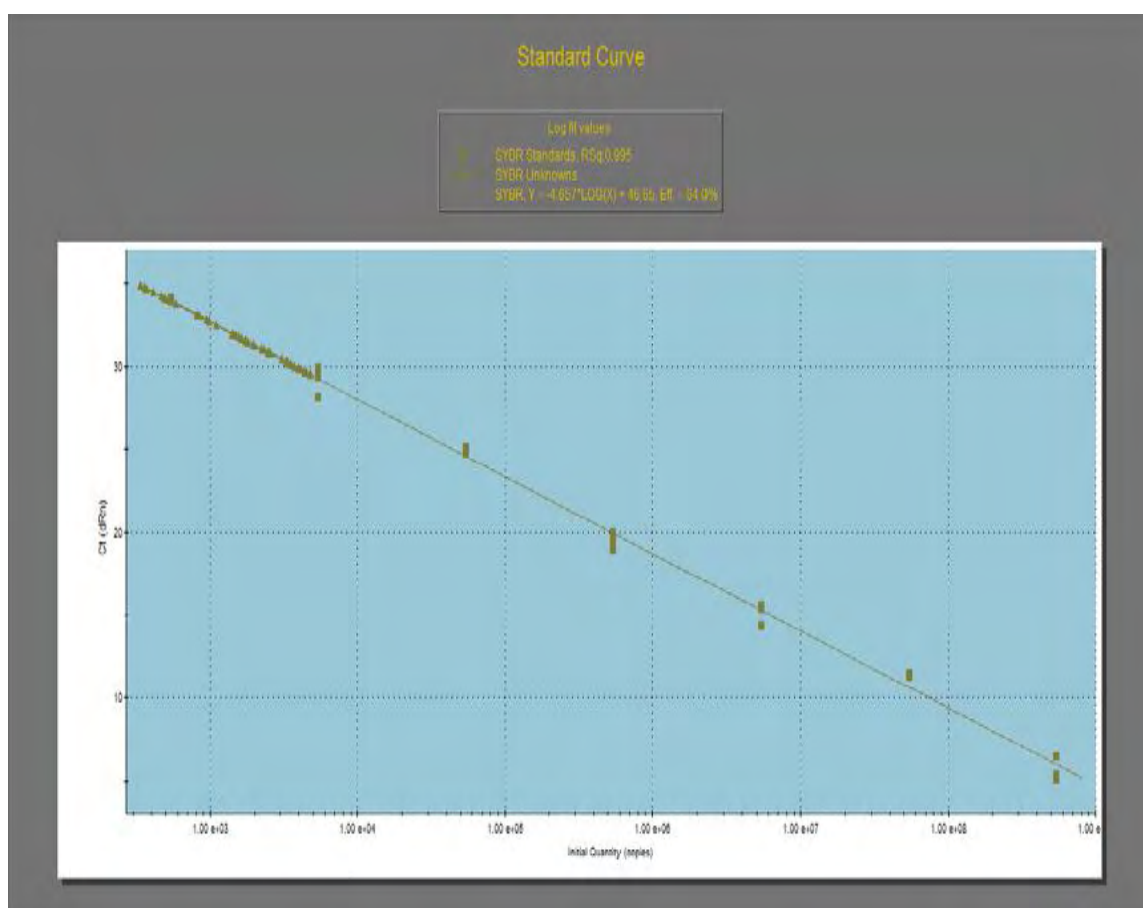
Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από δείγματα βιομίσματος από τις πιλοτικές βιοκλίνες και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 0.7% (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 0.7% εκχυλισμένου DNA από δείγματα βιομίσματος της βιοκλίνης 4. Πρώτη Γραμμή :DNA ladder (3μl), Δεύτερη και Τρίτη Γραμμή : DNA από δείγματα βιομίσματος που συλλέχθηκαν από βάθος 0-20 cm, Γραμμές 4-6 και 7-9 DNA από δείγματα βιομίσματος που συλλέχθηκαν από βάθος 20-40 και 40-60 cm αντίστοιχα. Σε κάθε πηγάδι φορτώθηκαν 3μl DNA και 1μl buffer.

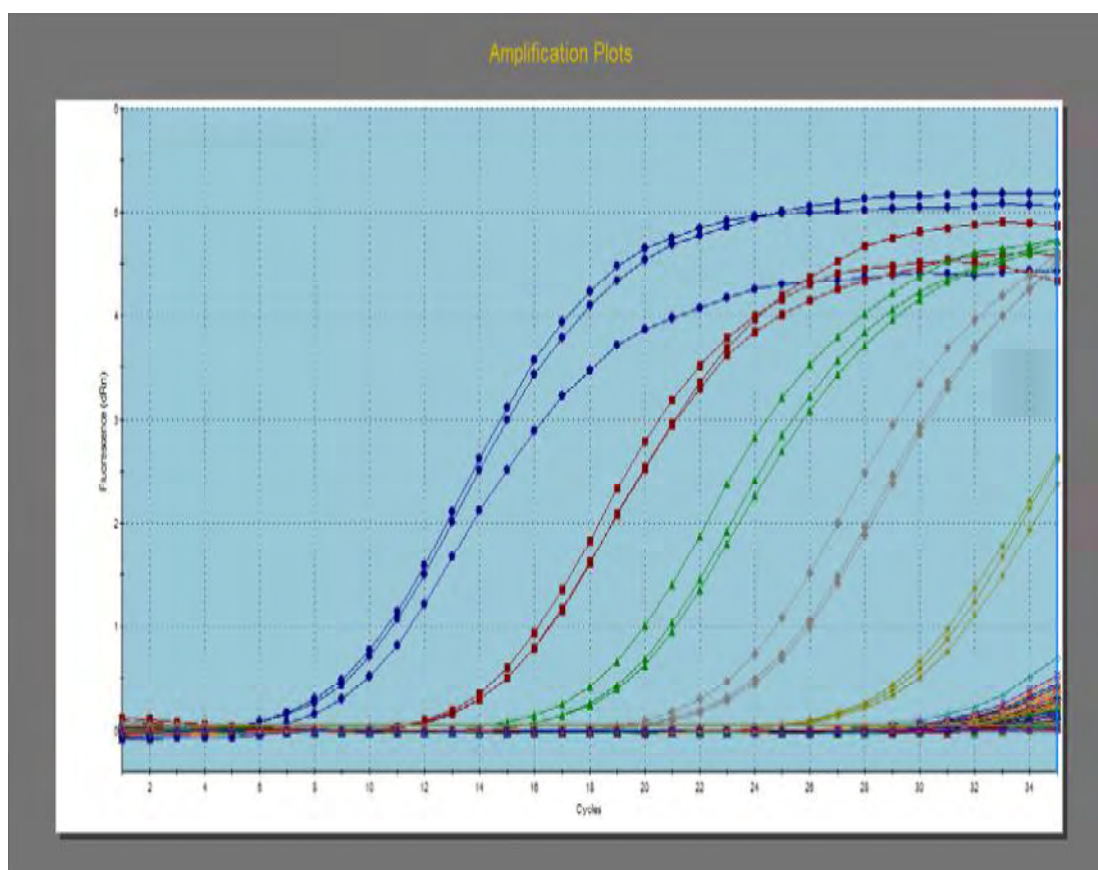
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Με τη χρήση της PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των κοινοτήτων των μυκήτων στα δείγματα εδάφους που μελετήθηκαν. Έπειτα, με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς έγινε ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων των μυκήτων. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε από διαδοχικές αραιώσεις ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης και παρουσιάζει γραμμικότητα $r^2 = 0.993$, στο εύρος τιμών 3.6×10^7 έως 3.6×10^2 αντίγραφων του 18S rRNA γονιδίου (Εικόνα. 3.2)



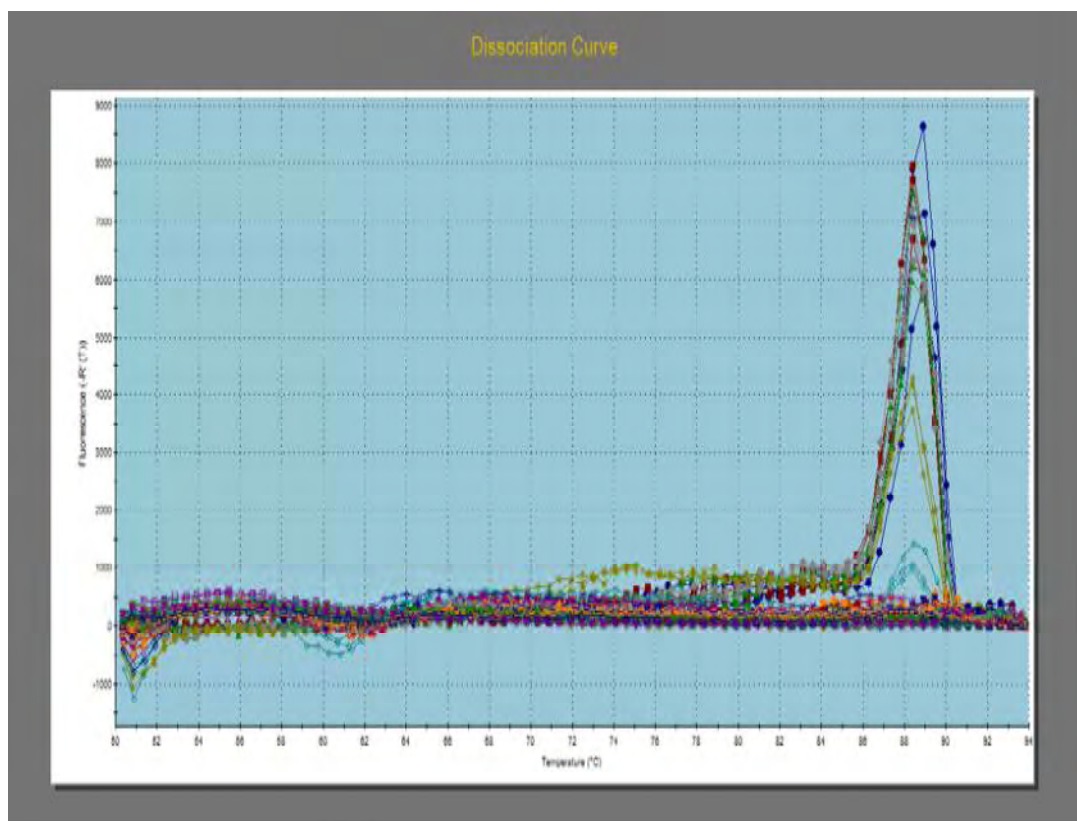
Εικόνα 3.2 : Καμπύλη αναφοράς για την ποσοτικοποίηση του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου ITS των μυκήτων στα δείγματα από το βιομίγμα των πιλοτικών βιοκλινών.

Σύμφωνα με την εικόνα 3.2 όπου απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη, φαίνεται ότι τα άγνωστα δείγματα βρίσκονται εντός των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Στην Εικόνα 3.3 που ακολουθεί παρουσιάζεται η καμπύλη ενίσχυσης.



Εικόνα 3.3 : Καμπύλη ενίσχυσης της q-PCR για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων στα δείγματα βιομύγατος από τις πρότυπες βιοκλίνες.

Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου στο κάθε δείγμα, τόσο χαμηλότερη τιμή C_t εμφανίζουν τα δείγματα. Στην Εικόνα 3.4 που ακολουθεί απεικονίζεται η καμπύλη αποδιάταξης.



Εικόνα 3.4 : Καμπύλη αποδιάταξης του δίκλωνου DNA.

Όπως φαίνεται από την καμπύλη αποδιάταξης παρατηρήθηκε μια κορυφή σε θερμοκρασία 88.5C καταδεικνύοντας την εξειδίκευση της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων στις διάφορες βιοκλίνες.

3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΙΣ ΠΙΛΟΤΙΚΕΣ ΒΙΟΚΛΙΝΕΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ q-PCR

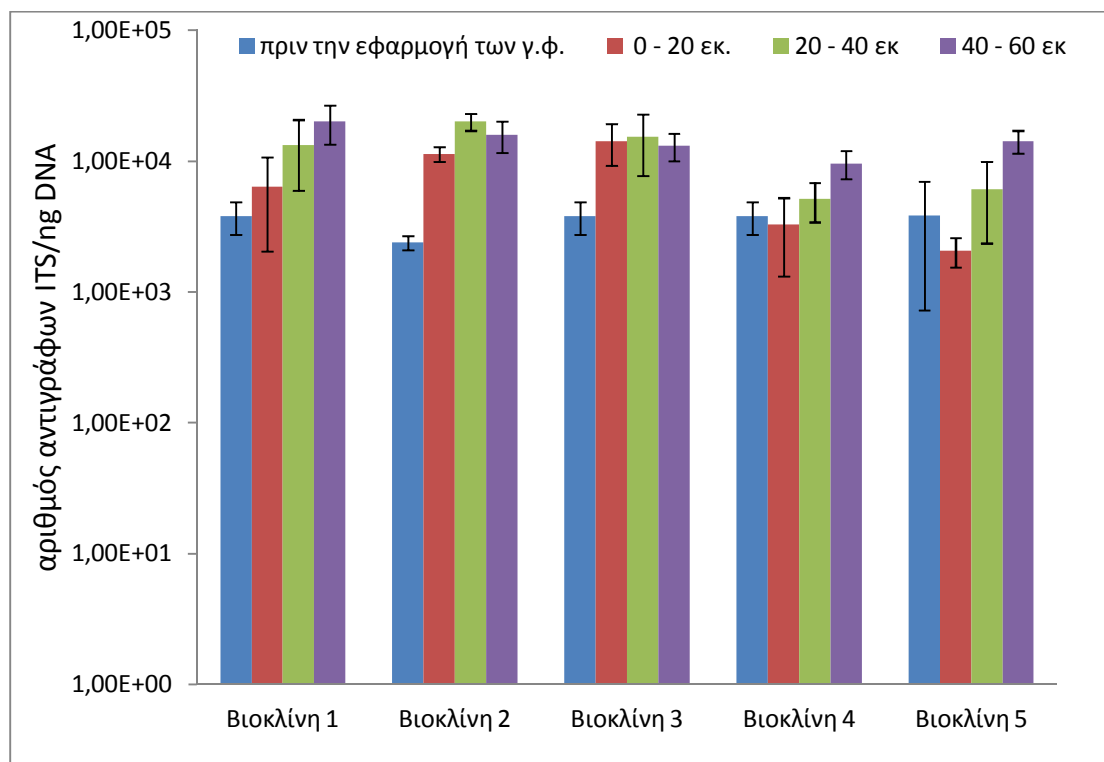
Ο πληθυσμός των μυκήτων στα δείγματα βιομύγατος που συλλέχθηκαν από τις πέντε πιλοτικές βιοκλίνες πριν και μετά από την 150ήμερη λειτουργία τους από 3 διαφορετικά βάθη παρουσιάζεται ως αριθμός αντιγράφων του ITS γονιδιακού τύπου.

Για να διαπιστωθεί η επίδραση διαφορετικών παραγόντων στον πληθυσμό των βακτηρίων τα δεδομένα αναλύθηκαν με διαφορετικές προσεγγίσεις που παρουσιάζονται παρακάτω :

Προσέγγιση 1: Στην πρώτη προσέγγιση εξετάστηκε η μεταβολή του πληθυσμού των μυκήτων στις πέντε πιλοτικές βιοκλίνες του πειράματος, έπειτα από την πεντάμηνη εφαρμογή υγρών αποβλήτων που περιείχαν γεωργικά φάρμακα. Έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας μίας μεταβλητής όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι ο χρόνος και με τη μέθοδο αυτή συγκρίθηκαν οι μεταβολές στους πληθυσμούς των μυκήτων πριν και μετά το πέρας των πέντε μηνών. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δείχνουν διαφορές μεταξύ των πέντε βιοκλινών (Πίνακας 3.1).

Βιοκλίνη (γ.φ. που εφαρμόστηκαν)	Πιθανότητα P
1(OPP+IMZ)	0.001**
2(DPA+IMZ)	0.000***
3(TBZ+OPP)	0.000***
4(DPA+IMZ)	0.353
5(TBZ+OPP)	0.202

Πίνακας 3.1 : Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων έπειτα από την πεντάμηνη εφαρμογή τους στους πληθυσμούς των μυκήτων των βιοκλινών. Πιθανότητες που έχουν σημειωθεί με *, ** και *** αντιστοιχούν σε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο <0.001, 0.01 και 0.05 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3.1 : Οι μεταβολές στο πληθυσμό των μυκήτων στις πέντε πιλοτικές βιοκλίνες όπως προσδιορίστηκε με q-PCR ανάλυση των αντιγράφων του γονιδιακού τύπου ITS πριν και μετά την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο των τριών επαναλήψεων για κάθε ορίζοντα \pm την τυπική απόκλιση.

Πιο αναλυτικά, στο Διάγραμμα 3.1. φαίνεται ότι στις βιοκλίνες 1, 2, 3 η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στον πληθυσμό των μυκήτων ($p < 0,05$). Παρατηρείται αυξητική τάση στην μεταβολή του πληθυσμού των μυκήτων έπειτα από την εφαρμογή των συνδυασμών OPP+IMZ, DPA+IMZ, TBZ+OPP στις πρώτες τρεις βιοκλίνες, ανεξάρτητα από το βάθος του ορίζοντα από τον οποίο συλλέχθηκαν τα επιμέρους δείγματα. Αντιθέτως, στις βιοκλίνες 4 και 5 δεν εμφανίζονται σημαντικές μεταβολές στον πληθυσμό των μυκήτων που περιέχονται στο βιομίγμα των βιοκλινών του πειράματος.

Προσέγγιση 2 : Στην προσέγγιση αυτή εξετάστηκε η μεταβολή του πληθυσμού των μυκήτων υπό την επίδραση του βάθους των βιοκλινών καθώς και των μεταχειρίσεων που αυτές δέχτηκαν. Έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών όπου στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι το βάθος των βιοκλινών και οι μεταχειρίσεις που δέχτηκε κάθε βιοκλίνη καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση (Πίνακας 3.2).

Παράγοντες	Πιθανότητα P
Βάθος	0.001**
Βιοκλίνη	0.000***
Βάθος * Βιοκλίνη	0.080

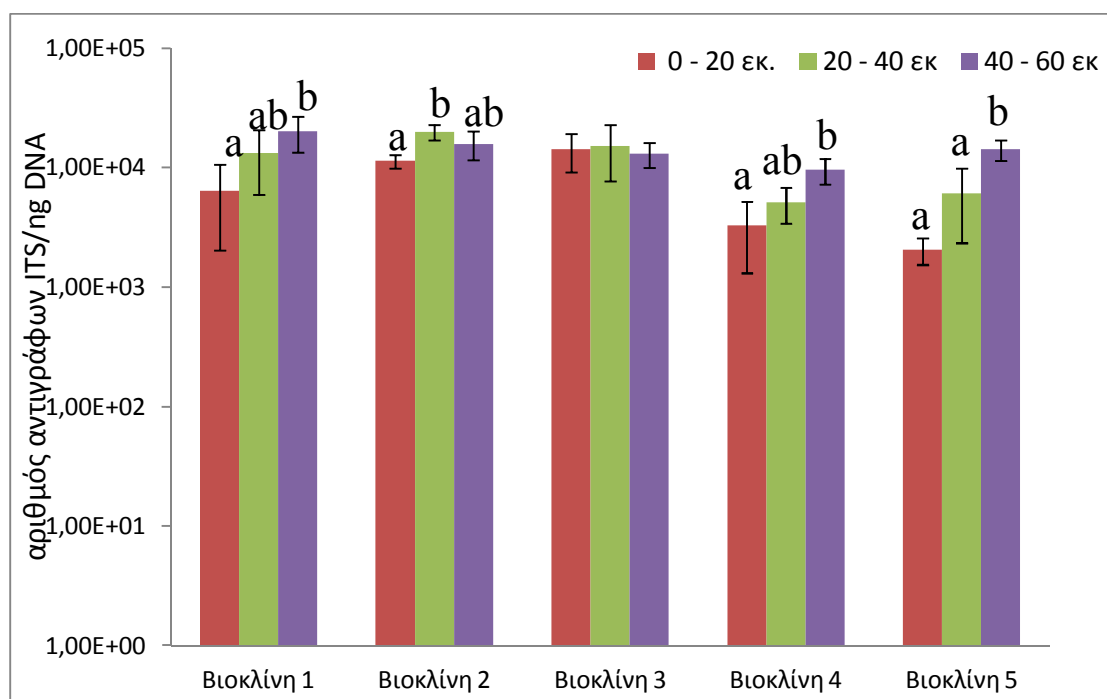
Πίνακας 3.2 : Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση του βάθους συλλογής των δειγμάτων από τις πιλοτικές βιοκλίνες καθώς και των μεταχειρίσεων που αυτές δέχτηκαν στον πληθυσμό των μυκήτων που περιέχονταν στο βιομίγμα τους. Πιθανότητες που έχουν σημειωθεί με *, ** και *** αντιστοιχούν σε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο <0.001, 0.01 και 0.05 αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.2, το βάθος των βιοκλινών και οι μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν σε κάθε βιοκλίνη επηρέασαν σε σημαντικό βαθμό ($p < 0.05$) τον πληθυσμό των μυκήτων που περιέχονταν στο βιομίγμα των βιοκλινών. Αντιθέτως, η αλληλεπίδραση μεταξύ του βάθους συλλογής των δειγμάτων καθώς και των μεταχειρίσεων που δέχτηκε κάθε βιοκλίνη δεν επηρέασε σημαντικά τον πληθυσμό των μυκήτων.

Έπειτα, εξετάστηκε η επίδραση του βάθους σε κάθε βιοκλίνη. Έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας μίας μεταβλητής που έδειξε ότι το βάθος ως κύριος παράγοντας δεν επηρέασε σημαντικά τον πληθυσμό των μυκήτων στο εσωτερικό του βιομίγματος των βιοκλινών 1 και 3. Αντιθέτως, ο παράγοντας αυτός φαίνεται ότι επηρέασε σημαντικά ($p < 0.05$) τις βιοκλίνες 2, 4 και 5 (Πίνακας 3.3).

Βιοκλίνες (γ.φ. που εφαρμόστηκαν)	Πιθανότητα P
1 (OPP+IMZ)	0.094
2 (DPA+IMZ)	0.040*
3 (TBZ+OPP)	0.879
4 (DPA+IMZ)	0.021*
5 (TBZ+OPP)	0.014*

Πίνακας 3.3 : Η επίδραση του βάθους των βιοκλινών στον πληθυσμό των μυκήτων έπειτα από την ολοκλήρωση του πειράματος, σύμφωνα με την ανάλυση παραλλακτικότητας μιας μεταβλητής ως προς το βάθος για κάθε πιλοτική βιοκλίνη ξεχωριστά. Πιθανότητες που έχουν σημειωθεί με *, ** και *** αντιστοιχούν σε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο <0.001, 0.01 και 0.05 αντίστοιχα.



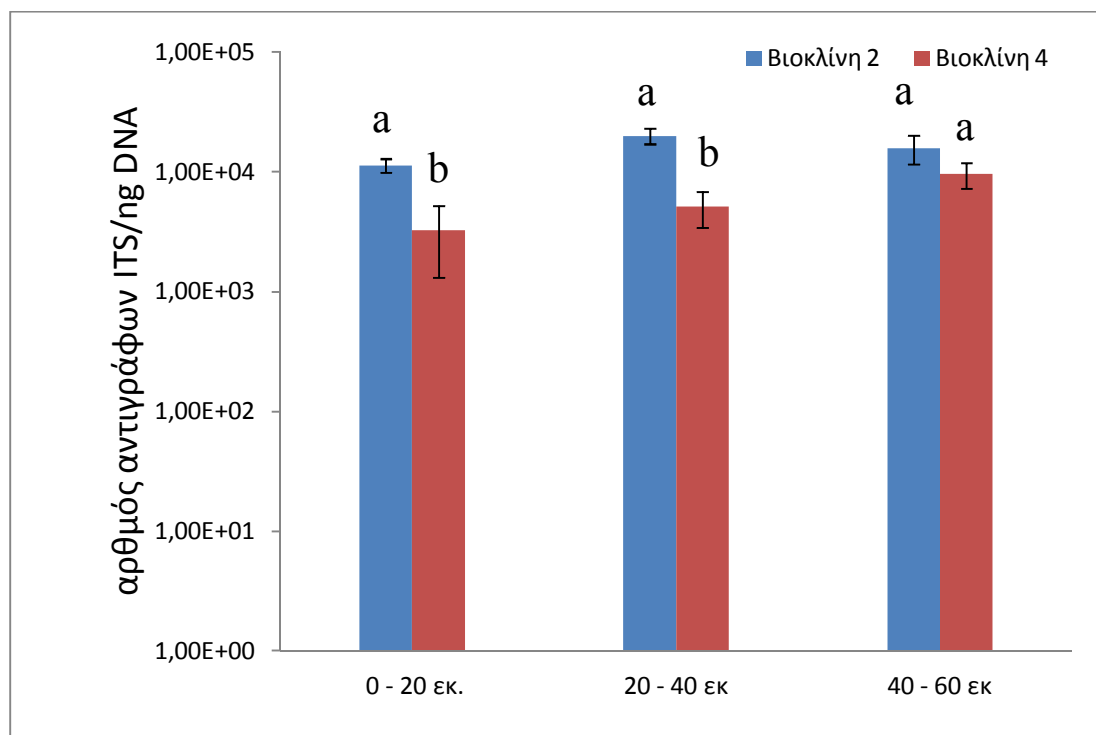
Διάγραμμα 3.2 : Οι μεταβολές στον πληθυσμό των μυκήτων στα δείγματα που συλλέχθηκαν από τους τρεις διαφορετικούς ορίζοντες των πέντε πιλοτικών βιοκλινών με το πέρας του πειράματος. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο των τριών επαναλήψεων για κάθε ορίζοντα \pm την τυπική απόκλιση. Το επίπεδο σημαντικότητας είναι το 5%. Η παρουσία διαφορετικών γραμμάτων επάνω από τα βάθη σε κάθε βιοκλίνη δείχνουν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του πληθυσμού των μυκήτων στους τρεις ορίζοντες (0-20, 20-40 και 40-60 cm) στις βιοκλίνες 2, 4 και 5.

Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.2 οι χαμηλότερες τιμές αφθονίας για του μύκητες καταγράφηκαν στην πλειοψηφία των βιοκλινών στον επιφανειακό ορίζοντα 0-20 cm και οι αντίστοιχες υψηλότερες στο βαθύτερο ορίζοντα των βιοκλινών 40-60 cm. Αυτό το πρότυπο παρατηρήθηκε στις βιοκλίνες 1, 4 και 5 όπου και η αφθονία των μυκήτων στον επιφανειακό ορίζοντα ήταν σημαντικά χαμηλότερη από την αντίστοιχη αφθονία των μυκήτων στους ορίζοντες 40-60 cm. Αντίθετα στην βιοκλίνη 2 παρατηρήθηκε διαφορετικό πρότυπο όπου και πάλι η χαμηλότερη αφθονία μυκήτων καταγράφηκε στον επιφανειακό ορίζοντα αλλά αυτή την φορά σημαντικά υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν στο ενδιάμεσο ορίζοντα.

Προσέγγιση 3 : Στην τρίτη και τελευταία προσέγγιση εξετάστηκε κατά πόσο το βάθος των βιοκλινών και η εφαρμογή ή όχι βιολογικού εμπλουτισμού (βιοκλίνες 2 και 4 vs βιοκλίνες 3 και 5 αντίστοιχα) επηρεάζει τον πληθυσμό των μυκήτων. Έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας για τις βιοκλίνες 2 vs 4, και από τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης διαπιστώθηκε ότι οι κύριοι παράγοντες που στην προκειμένη περίπτωση είναι το βάθος και ο βιοεμπλουτισμός καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση επηρέασε σημαντικά τον πληθυσμό των μυκήτων ($p < 0.05$) (Πίνακας 3.4).

Παράγοντες	Πιθανότητα
Βάθος	0.006**
Βιοεμπλουτισμός	0.000***
Βάθος * Βιοεμπλουτισμός	0.035*

Πίνακας 3.4 : Τα αποτελέσματα από την ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών όπου μελετήθηκε η επίδραση του βάθους και του βιοεμπλουτισμού ως κύριοι παράγοντες καθώς και η αλληλεπίδραση τους στον πληθυσμό των μυκήτων στις βιοκλίνες 2 και 4 στις οποίες εφαρμόστηκε DPA και IMZ ενώ στην βιοκλίνη 2 εφαρμόστηκε και βιοεμπλουτισμός. Πιθανότητες που έχουν σημειωθεί με *, ** και *** αντιστοιχούν σε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο < 0.001 , 0.01 και 0.05 αντίστοιχα.

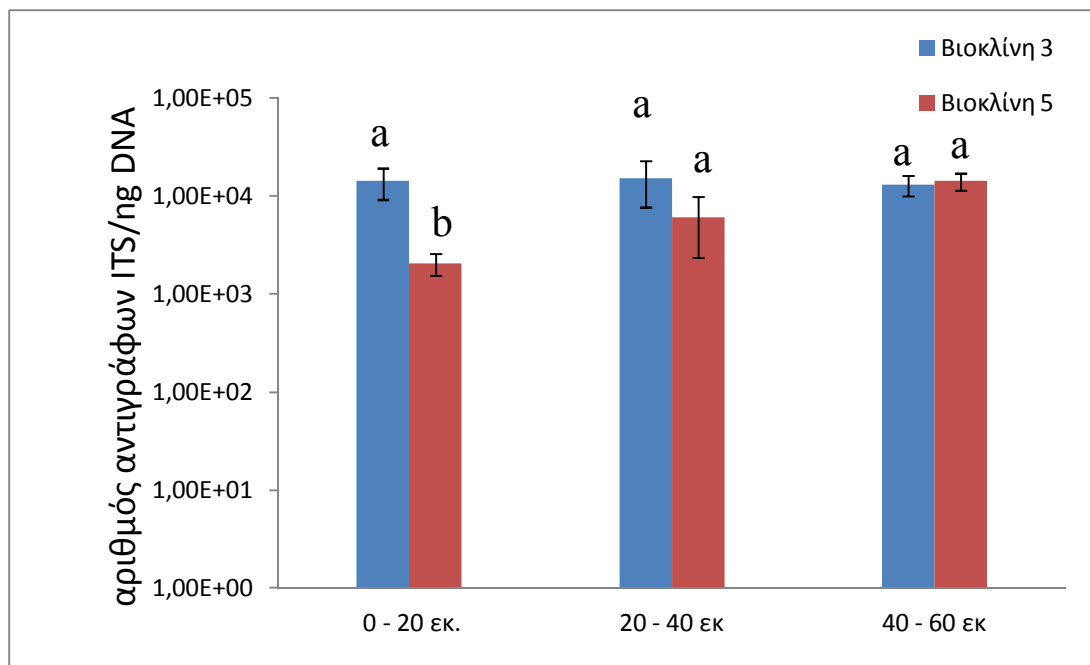


Διάγραμμα 3.3 : Οι μεταβολές στον πληθυσμό των μυκήτων των βιοκλινών 2 και 4 στις οποίες εφαρμόστηκε DPA και IMZ με την παράλληλη εφαρμογή βιοεμπλουτισμού μόνο στην βιοκλίνη 2. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο των τριών επαναλήψεων για κάθε ορίζοντα \pm την τυπική απόκλιση. Το επίπεδο σημαντικότητας είναι το 5%. Η παρουσία διαφορετικών γραμμάτων επάνω από τα βάθη 0-20cm και 20-40cm δείχνουν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του πληθυσμού των μυκήτων για το κάθε ορίζοντα στις δύο πιλοτικές βιοκλίνες, ενώ η παρουσία ίδιων γραμμάτων επάνω από το βάθος 40-60cm δείχνει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του πληθυσμού των μυκήτων στον συγκεκριμένο ορίζοντα ανάμεσα στις δύο πιλοτικές βιοκλίνες.

Αντιθέτως, η ανάλυση παραλλακτικότητας που πραγματοποιήθηκε για τις βιοκλίνες 3 vs 5 διαπιστώθηκε ότι μόνο βιοεμπλουτισμός ως κύριος παράγοντας επηρέασε σημαντικά ($p < 0.05$) τον πληθυσμό των μυκήτων, ενώ το βάθος ως κύριος παράγοντας καθώς και η αλληλεπίδραση του με τον βιοεμπλουτισμό δεν επηρέασε σημαντικά τον πληθυσμό των μυκήτων (Πίνακας 3.5).

Παράγοντες	Πιθανότητα P
Βάθος	0.183
Βιοεμπλουτισμός	0.012*
Βάθος*Βιοεμπλουτισμός	0.076

Πίνακας 3.5 : Τα αποτελέσματα από την ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών όπου αξιολογήθηκε η επίδραση του βάθους και του βιοεμπλουτισμού ως κύριοι παράγοντες καθώς και η αλληλεπίδραση τους στον πληθυσμό των μυκήτων στις πιλοτικές βιοκλίνες 3 και 5 στις οποίες εφαρμόστηκαν TBZ και OPP ενώ στην βιοκλίνη 5 εφαρμόστηκε και βιοεμπλουτισμός.



Διάγραμμα 3.4 : Οι μεταβολές στον πληθυσμό των μυκήτων των βιοκλινών 3 και 5 στις οποίες εφαρμόστηκε TBZ και OPP με την παράλληλη εφαρμογή βιοεμπλουτισμού μόνο στην βιοκλίνη 5. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο των τριών επαναλήψεων για κάθε ορίζοντα \pm την τυπική απόκλιση. Το επίπεδο σημαντικότητας είναι το 5%. Η παρουσία ίδιων γραμμάτων επάνω από τα βάθη 20-40cm και 40-60cm δείχνουν ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του πληθυσμού των μυκήτων για το κάθε ορίζοντα στις δύο πιλοτικές βιοκλίνες, ενώ η παρουσία διαφορετικών γραμμάτων επάνω από το βάθος 0-20cm δείχνει ότι υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ του πληθυσμού των μυκήτων στο συγκεκριμένο ορίζοντα ανάμεσα στις δύο πιλοτικές βιοκλίνες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα το οποίο περιελάμβανε τη χρήση πέντε πιλοτικών βιοκλινών στις οποίες εφαρμόστηκε μία ποσότητα υγρών αποβλήτων τα οποία περιελάμβαναν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων για την προστασία των καρπών από διάφορες μυκητολογικές ασθένειες. Δείγματα από κάθε βιοκλίνη συλλέχθηκαν πριν την έναρξη του πειράματος αλλά και με την ολοκλήρωση του δηλαδή μετά το πέρας 150 ημερών κατά τις οποίες εφαρμόζονταν στις βιοκλίνες τα απόνερα των συσκευαστηρίων φρούτων. Σκοπός του πειράματος ήταν να εκτιμηθεί και να αξιολογηθεί η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του βιομίγματος, και πιο συγκεκριμένα στην αφθονία των μυκήτων. Εάν και η λειτουργία των βιοκλινών βασίζεται στην αυξημένη μεταβολική ικανότητα των μικροοργανισμών να διασπούν τυχόν ξενοβιοτικές ουσίες που εισέρχονται στο εσωτερικό αυτών των πιλοτικών συστημάτων, ελάχιστα πράγματα είναι γνωστά για τους μικροοργανισμούς αυτούς και κατά πόσο επηρεάζονται από την αλληλεπίδρασή τους με τα διάφορα γεωργικά φάρμακα που εισέρχονται στο βιομίγμα των βιοκλινών. Για την εκτίμηση των μεταβολών στους μύκητες του βιομίγματος χρησιμοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου, ενώ μόλις πρόσφατα ξεκίνησε η διαδικασία πιστοποίησης σε επίπεδο ISO για την χρήση της ως εργαλείο για την εκτίμηση της βακτηριακής βιομάζας στο έδαφος (Karpouzas et al, 2014).

Για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων, τα δεδομένα του πειράματος αναλύθηκαν με τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις, για να διαπιστωθεί η επίδραση διαφόρων παραγόντων στους πληθυσμούς των μυκήτων. Αρχικά και σύμφωνα με την πρώτη προσέγγιση αξιολογήθηκε η επίδραση του χρόνου που στο συγκεκριμένο πείραμα είναι 150 ημέρες καθημερινής εφαρμογής των αποβλήτων που περιείχαν διαφορετικούς συνδυασμούς γεωργικών φαρμάκων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σημαντικές μεταβολές στους πληθυσμούς των μυκήτων πραγματοποιήθηκαν στις τρεις πρώτες βιοκλίνες στις οποίες εφαρμόστηκαν τα εξής μίγματα γεωργικών

φαρμάκων: OPP+IMZ στην βιοκλίνη 1, DPA+IMZ στην βιοκλίνη 2, και TBZ+OPP στην βιοκλίνη 3. Σε αυτές τις βιοκλίνες παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας των μυκήτων με την πάροδο του χρόνου και την εφαρμογή των υγρών αποβλήτων στις βιοκλίνες, παρόλα αυτά στις άλλες δύο βιοκλίνες δεν παρατηρήθηκε καμία ιδιαίτερη μεταβολή σε σχέση με τον πληθυσμό που υπήρχε πριν την έναρξη του πειράματος. Η αύξηση αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει μια πρώτη ένδειξη ότι οι μύκητες ευνοούνται από την εφαρμογή των συνδυασμών των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων λόγω της συμμετοχής τους στην αποδόμηση τους. Παρόλα αυτά απόλυτα συμπεράσματα θα μπορούσαν να εξαχθούν μόνο εάν υπήρχε στην πειραματική διάταξη και μια βιοκλίνη όπου εφαρμοζόταν μόνο νερό χωρίς γεωργικά φάρμακα. Από τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν προέκυψε κάποιο πρότυπο επίδρασης ενός γεωργικού φαρμάκου στην αφθονία των μυκήτων.

Σύμφωνα με την δεύτερη προσέγγιση, εξετάστηκε η επίδραση του βάθους από το οποίο συλλέχθηκαν τα δείγματα από κάθε βιοκλίνη καθώς και των μεταχειρίσεων που αυτές δέχθηκαν. Και οι δύο ως κύριοι παράγοντες επηρέασαν σημαντικά τον πληθυσμό των μυκήτων και πιο συγκεκριμένα, το βάθος επηρέασε περισσότερο τους πληθυσμούς στις βιοκλίνες 2, 4 και 5 όπου το χαμηλότερο ποσοστό των μυκήτων εμφανίζεται στον πρώτο ορίζοντα 0-20 cm από τον οποίο συλλέχθηκαν τα δείγματα. Αυτό το αποτέλεσμα πιθανόν να εξηγείται από την συσσώρευση των γεωργικών φαρμάκων στον συγκεκριμένο ορίζοντα με συνέπεια την σημαντική μείωση του πληθυσμού των μυκήτων. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από τους Omirou et al (2012) που παρατήρησαν ότι τα IMZ, TBZ και λιγότερο το OPP συσσωρεύτηκαν στα επιφανειακά στρώματα των βιοκλινών και δεν μετακινήθηκαν παραπέρα. Μετρήσεις που έγιναν παράλληλα στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής του Π. Καρα έπιβεβαίωσαν ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των IMZ και TBZ βρέθηκαν στα 0-20 cm όπου και εμφανίζονται οι χαμηλότερες τιμές αφθονίας για τους μύκητες.

Με βάση και την τελευταία προσέγγιση, εξετάστηκε κατά πόσο το βάθος και ο βιοεμπλουτισμός που εφαρμόστηκε στις βιοκλίνες 2 και 5 σε σύγκριση πάντα με τις αντίστοιχες βιοκλίνες 3 και 4 που δεν εμβολιάστηκαν με αποδομητικούς μικροοργανισμούς, προκάλεσαν μεταβολές στην αφθονία των μυκήτων. Αρχικά, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων των βιοκλινών 2 και 4 τα οποία έδειξαν ότι ο

βιοεμπλουτισμός που εφαρμόστηκε στη βιοκλίνη 2 αύξησε σημαντικά την αφθονία των μυκήτων στους ορίζοντες 0-20 cm και 20-40 cm σε σχέση με την βιοκλίνη 4, ενώ τα αποτελέσματα για τις βιοκλίνες 3 και 5 έδειξαν ότι ο βιοεμπλουτισμός που εφαρμόστηκε στην βιοκλίνη 5 προκάλεσε σημαντική αύξηση του πληθυσμού των μυκήτων στον ορίζοντα 0-20 cm ενώ στους υπόλοιπους ορίζοντες δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές και για τις δύο βιοκλίνες. Η θετική επίδραση του βιοεμπλουτισμού στην αφθονία των μυκήτων ειδικότερα στα επιφανειακά στρώματα φαίνεται ότι ήταν ενιαία και για τις δύο βιοκλίνες και ανεξάρτητη από την εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων που δέχτηκαν. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί στην ταχύτερη βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων από τα εξειδικευμένα αποδομητικά βακτήρια που προστέθηκαν στις βιοκλίνες με αποτέλεσμα να περιοριστεί η επίδραση των μυκητοκτόνων στους μύκητες των βιοκλινών. Εναλλακτικά είναι πιθανή μια συνεργιστική δράση των εξωγενών βακτηρίων με τους ενδογενείς μύκητες ώστε να επιτύχουν τον καταβολισμό και αποτοξικοποίηση των γεωργικών φαρμάκων που καταλήγουν στις βιοκλίνες. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να εξακριβώσουν την φύση των προτεινόμενων αλληλεπιδράσεων.

Συμπερασματικά, και με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνεται ότι οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών και συγκεκριμένα των μυκήτων που περιέχονται στο βιομίγμα κάθε πιλοτικής βιοκλίνης επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η σύσταση και το είδος των γεωργικών φαρμάκων, η χρονική διάρκεια κατά την οποία εφαρμόζονται τα γεωργικά φάρμακα στις βιοκλίνες, καθώς και ο βιοεμπλουτισμός και τα διάφορα βάθη από τα οποία συλλέγονται τα δείγματα εδάφους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alireza Farokhcheh, Naader Alizadeh <<Determination of diphenylamine residue in fruit samples using spectrofluorimetry and multivariate analysis>>

André Luiz Meleiro Porto, Gliseida Zelayarøn Melgar, Mariana Consiglio Kasemodel and Marcia Nitschke <<Biodegradation of Pesticides>>

Andreas C. Gerecke, Walter Giger, Paul C. Hartmann, Norbert V. Heeb, Hans-Peter E. Kohler, Peter Schmid, Markus Zennegg, Martin Kohler <<Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge>>

Arno Erasmus, Cheryl L. Lennox, Hennie Jordaan, Joseph L. Smilanick, Keith Lesard, Paul H. Fourie <<Imazalil residue loading and green mould control in citrus packhouses>>

Bahrudin Saad, Noor Hana Haniff, Muhammad Idiris Saleh, Noor Hasani Hashim, Ahamad Abu, Norhayati Ali <<Determination of ortho-phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection>>

Bill Basford <<Bioremediation systems in the UK. Current position, systems, regulation and future possibilities >>

Borja Muñoz-Leoz, Estilita Ruiz-Romera, Iñaki Antigüedad, Carlos Garbisu <<Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity>>

Brian A. Sanderson, Naoko Araki, Jennifer L. Lilley, Gilberto Guerrero, L. Kevin Lewis <<Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis>>

Csilla Muller, Leontin David, Vasile Chis, Simona Cinta Pinzaru <<Detection of thiabendazole applied on citrus fruits and bananas using surface enhanced Raman scattering>>

Costantino Vischetti, Ettore Capri, Marco Trevisan, Cristiano Casucci, Piero Perucci <<Biomassbed: a biological system to reduce pesticide point contamination at farm level>>

Costantino Vischetti, Elga Monaci, Alessandra Cardinali, Cristiano Casucci, Piero Perucci <<The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture>>

Chu Xiaoqiang, Fang Hua, Pan Xuedong, Wang Xiao, Shan Min, Feng Bo, Yu Yunlong <<Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial populations>>

C.S. Benimelia, M.S. Fuentes, C.M. Abatea, M.J. Amoroso <<Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth>>

C. Vidya Lakshmi, Mohit Kumar, Sunel Khanna <<Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil>>

David R. Rudell, James P. Mattheis, John K. Fellman <<Evaluation of diphenylamine derivatives in apple peel using gradient reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet–visible absorption and atmospheric pressure chemical ionization mass selective detection>>

Debarati Paul, Gunjan Pandey, Janmejay Pandey and Rakesh K. Jain <<Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration>>

Dharini Sivakumar, Silvia Bautista-Banos <<A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage>>

Douglas Barraza, Kees Jansen, Berna van Wendel de Joode, Catharina Wesseling <<Pesticide use in banana and plantain production and risk perception among local actors in Talamanca, Costa Rica>>

Drzyzga O., (2003) <<“Diphenylamine and derivatives in the environment: A Review”. Chemosphere, 53: 809-818>>

Eiki Watanabe, Yoshihiro Yoshimura, Yojiro Yuasa, Hiroyuki Nakazawa <<Immunoaffinity column clean-up for the determination of imazalil in citrus fruits>>

Environmental Protection Agency (EPA) USA, (1998) <<Reregistration eligibility Decision FACTS for diphenylamine, EPA-738-F-97-010>>

Environmental Protection Agency (EPA) USA, (2006) <<Reregistration eligibility decision for 2-phenylphenol and salts (orthophenylphenol or opp) 739-R-06-004>

Environmental Protection Agency (EPA) USA, (2005) <<Reregistration eligibility for imazalil FACTS, EPA-738-F-04-011>>

Environmental Protection Agency (EPA) USA. (2002) <<Reregistration eligibility for Thiabendazole EPA-738-F-02-002>>

European Food Safety Authority (EFSA), (2012) <<Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance diphenylamine>>

European Food Safety Authority (EFSA), (2010) <<Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance imazalil>>

European Food Safety Authority (EFSA), (2008) <<Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 2-phenylphenol>>

European Food Safety Authority (EFSA), (2014) <<Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for thiabendazole according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005>>

European Food Safety Authority (EFSA), (2008) <<”Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 2-phenylphenol” EFSA Scientific Report 217:1-67>>

European Commission (EC), (2009) <<Draft Assessment Report, Initial risk assessment provided by the rapporteur member state the Netherlands for the existing substance imazalil, Volume 1, pp. 1-151>>

European Commission (EC), (2001) <<Review report for the active substance thiabendazole finalised in the Standing Committee on Plant Health at its meeting on 12 December 2000 in view of the inclusion of thiabendazole in Annex I of Directive 91/414/EEC. 7603/VI/97-final>>

Evangelos Karanasios, Nikolaos G. Tsiropoulos & Dimitrios G. Karpouzas <<On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide wastewaters: recent biotechnological advances and future perspectives>>

Evangelos Karanasios, Dimitrios G. Karpouzas & Nikolaos G. Tsiropoulos <<Key parameters and practices controlling pesticide degradation efficiency of biobed substrates>>

Evangelos Karanasios, Nikolaos G. Tsiropoulos, Dimitrios G. Karpouzas, Urania Menkissoglu-Spiroudi <<Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials : Evaluation for use in biobed systems>>

Evangelos C. Karanasios, Nikolaos G. Tsiropoulos, Dimitrios G. Karpouzas <<Quantitative and qualitative differences in the metabolism of pesticides in biobed substrates and soil>>

Heather D. VanGuilder, Kent E. Vrana, Willard M. Freeman <<Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis>>

Gabriela Briceno and Graciela Palma <<Influence of organic amendment on the biodegradation and movement of pesticides>>

Gary D. Bending, Maxime Friloux, Allan Walker <<Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential>>

Giuseppe Altieri, Giovanni Carlo Di Renzo, Francesco Genovese, Mariarosaria Calandra, Maria Concetta Strano <<A new method for the postharvest application of imazalil fungicide to citrus fruit>>

Gozde Turkoz Bakırcı, Dilek Bengu Yaman Acay, Fatih Bakırcı, Semih Otles <<Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey>>

G.R. Tortella, O. Rubilar, M.d.P. Castillo, M. Cea, R. Mella-Herrera, M.C. Diez <<Chlorpyrifos degradation in a biomixture of biobed at different maturity stages >>

Gwenaél Imfeld, Stéphane Vuilleumier <<Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review>>

Health Assessment Section Medical Toxicology Branch Department of Pesticide Regulation California Environmental Protection Agency (2007) <<*Ortho*-phenylphenol (opp) and sodium *ortho*-phenylphenate (sopp) risk characterization document dietary exposure >>

Joanna M. Norton <<Fungi for Bioremediation of Hydrocarbon Pollutants>>

John W. Raymond, Tony N. Rogers, David R. Shonnard, Andrew A. Kline <<A review of structure-based biodegradation estimation methods>>

John O. Thomas, William E. Ribelin, Robert H. Wilson, Douglas C. Keppler, and Floyd Deeds <<Chronic Toxicity of Diphenylamine to Albino Rats>>

Jonkers N, Sousa A, Galante-Oliveira S, Barroso CM, Kohler HPE and Giger W (2010) <<Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. Environmental Science and Pollution Research 17: 834–843>>

Jun Song, Charles F. Forney, Michael A. Jordan <<A method to detect diphenylamine contamination of apple fruit and storages using headspace solid phase micro-extraction and gas chromatography/mass spectroscopy>>

Kwanghee A. Shin and Jim C. Spain <<Pathway and Evolutionary Implications of Diphenylamine Biodegradation by *Burkholderia* sp. Strain JS667>>

Konstantina Kravvariti, Nikolaos G Tsiropoulos, and Dimitrios G. Karpouzas <<Degradation and adsorption of terbuthylazine and chlorpyrifos in biobed biomixtures from composted cotton crop residues>>

Kristel Sniegowski, Karolien Bers, Kris Van Goetem, Jaak Ryckeboer, Peter Jaeken, Pieter Spanoghe & Dirk Springael <<Improvement of pesticide mineralization in on-farm biopurification systems by bioaugmentation with pesticide-primed soil >>

L. Candela Z K. J. Wallis Z R. M. Mateos <<Non-point pollution of groundwater from agricultural activities in Mediterranean Spain: the Balearic Islands case study>>

Laura Koontz <<Agarose Gel Electrophoresis>>

Laura Coppola, Francesca Comitini, Cristiano Casucci¹, Vesna Milanovic, Elga Monaci¹, Maria Marinozzi¹, Manuela Taccari, Maurizio Ciani, and Costantino Vischetti <<Fungicides degradation in an organic biomixture : impact on microbial diversity>>

Laura Coppola and Marco Trevisan <<Biopurification System between Research and Technology Transfer>>

Luisa E. Castillo, Clemens Ruepert, and Efrain Solis <<Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the north atlantic zone of costa rica>>

Luisa Eugenia Castillo, Eduardo Martínez, Clemens Ruepert, Candida Savage, Michael Gilek, Margareth Pinnock, Efrain Solis <<Water quality and macroinvertebrate community response following pesticide applications in a banana plantation, Limon, Costa Rica>>

Manish M. Shah, David P. Barr, Namhyun Chung and Steven D. Aust <<Use of white rot fungi in the degradation of environmental chemicals>>

Mareli Kellerman, Arno Erasmus, Paul J.R. Cronje, Paul H. Fourie
<<Thiabendazole residue loading in dip, drench and wax coating applications
to control green mould and chilling injury on citrus fruit>>

M. Mari, P. Bertolini and G.C. Pratella <<Non-conventional methods for the
control of post-harvest pear diseases>>

María del Pilar Castillo¹, Lennart Torstensson and John Stenström <<Biobeds–
a swedish contribution to environmental protection from pesticide
pollution>>

Maria del Pilar Castillo, Lennart Torstensson, and John Stenström <<Biobeds
for Environmental Protection from Pesticide Uses A Review>>

**Maria Marinozzi & Laura Coppola & Elga Monaci & Dimitrios G. Karpouzas &
Evangelia Papadopoulou & Urania Menkissoglu-Spiroudi & Costantino
Vischetti** <<The dissipation of three fungicides in a biobed organic substrate
and their impact on the structure and activity of the microbial community>>

**Ma. Laura Ortiz-Hernandez, Enrique Sanchez-Salinasi, María Luisa Castrejon
Godinez, Edgar Dantan Gonzalez, Elida Carolina Popoca Ursino**
<<Mechanisms and strategies for pesticide biodegradation: opportunity for
waste, soils and water cleaning>>

M. Mari, P. Bertolini and G.C. Pratella <<Non-conventional methods for the
control of post-harvest pear diseases>>

M. Cristina Diez, Gonzalo R. Tortella, Gabriela Briceño, Maria del Pilar Castillo, Jorge Díaz, Graciela Palma, Carolina Altamirano, Carolina Calderón, Olga Rubilar <<Influence of novel lignocellulosic residues in a biobed biopurification system on the degradation of pesticides applied in repeatedly high doses>>

M.C. Diez <<Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants>>

M. Dua, A. Singh, N. Sethunathan, A. K. Johri <<Biotechnology and bioremediation: successes and limitations>>

M. Omirou, P. Dalias, C. Costa, C. Papastefanou, A. Dados, C. Ehaliotis, D.G. Karpouzas <<Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies>>

M. Vidali <<Bioremediation. An overview>>

Oliver Drzyzga <<Diphenylamine and derivatives in the environment: a review>>

Panagiotis A. Karas, Chiara Perruchon, Katerina Exarhou, Constantinos Ehaliotis, Dimitrios G. Karpouzas <<Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi>>

Panagiotis A. Karas, Chiara Perruchon, Katerina Exarhou, Constantinos Ehaliotis, Dimitrios G. Karpouzas <<Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi>>

Paul Fogg, Alistair B.A. Boxall, Allan Walker and Andrew A. Jukes <<Pesticide degradation in a 'biobed' composting substrate>>

Paul Fogg, ABA Boxall, A Jukes and A Walker <<Biobeds phase 3 : the development and evaluation of a biological system for the disposal of pesticide waste and washings>>

Paul Fogg, Alistair BA Boxall, Allan Walker and Andrew Jukes <<Degradation and leaching potential of pesticides in biobed systems>>

Paul Fogg <<Fate and behaviour of pesticides in biobeds>>

Pascal Boivin, Véronique Guiné <<Preserving water quality in agriculture: biobed rotation to vertical>>

Pesticide Outlook – August (2000) <<How pesticides get into water – and proposed reduction measures>>

Silvia Isabel de Sousa Fragoeiro <<Use of fungi in bioremediation of pesticides>

Solel Z., Sandler D., Dinoor A., (1979) <<“Mobility and persistence of carbendazim and thiabendazole applied to soil via drip irrigation”. *Phytopathology*, 69: 1273-1277>>

Steven D. Aust <<Mechanisms of Degradation by White Rot Fungi>>

Suzi Levi <<Biostimulation and enhancement of pesticide degradation around water abstraction fields>>

Tatsuo Maruyama, Chiho Komatsu, Junji Michizoe, Shinji Sakai, Masahiro Goto <<Laccase-mediated degradation and reduction of toxicity of the postharvest fungicide imazalil>>

Tineke De Wilde, Pieter Spanoghe, Christof Debaer, Jaak Ryckeboer, Dirk Springael and Peter Jaeken <<Review-Overview of on-farm bioremediation systems to reduce the occurrence of point source contamination>>

Tineke De Wilde, Pieter Spanoghe, Jaak Ryckeboer, Peter Jaeken, Dirk Springael <<Sorption characteristics of pesticides on matrix substrates used in biopurification systems>>

Torstensson, L. <<”Experiences of biobeds in practical use in Sweden” Pest. Outlook. 2000, 206-211>>

Yueming Jiang, Zhaoqi Zhang, Daryl C. Joyce, Saichol Ketsa <<Postharvest biology and handling of longan fruit (*Dimocarpus longan* Lour.)>>

U.S. Department of health and human services public health service national institutes of health <<toxicology and carcinogenesis studies of ortho-phenylphenol (cas no. 90-43-7) alone and with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (cas no. 57-97-6) in swiss cd-1 mice (dermal studies) >>

U.S. Environmental Protection Agency (EPA), (2003) <<"Reregistration Eligibility Decision for imazalil", chemical list B, case number 2325>>

U.S. Environmental Protection Agency (EPA), (2002) <<Reregistration Eligibility Decision-Thiabendazole>>

Wageningen UR Wageningen, Netherlands March 20th – 21st 2013 <<4th European Biobed Workshop Applied Plant Research (PPO)>>

Zheng C., Focks A., Ellebrake K., Eggers T., Fries E., (2011) <<"Sorption of ortho-phenylphenol to soils". Clean- Soil, Air, Water, 39: 116-120>>

Δραγασάκη Ειρήνη <<Διερεύνηση της γνώσης των παραγωγών στην χρήση των φυτοφαρμάκων και την επιβάρυνση τους στην ανθρώπινη υγεία στην περιοχή της Ιεράπετρας.>>

Εξάρχου Αικατερίνη <<Μελέτη της διάσπασης μυκητοκτόνων που περιέχονται σε υγρά απόβλητα από την μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων>>

Κάρας Παναγιώτης <<Αξιολόγηση επιλεγμένων μυκήτων για την αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων σε υγρά απόβλητα της αγροτικής-μεταποιητικής βιομηχανίας>>

Μετσοβίτη Μαρία <<Μελέτη της αποδόμησης γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων σε λυματολάσπη από τη μονάδα επεξεργασίας αστικών αποβλήτων της πόλης της Λάρισας>>

Μπεμπέλου Ελευθερία <<Διερεύνηση του ρόλου των επιφυτικών μικροοργανισμών στην αποδόμηση φυτοπροστατευτικών ουσιών>>

Μούλας Κωνσταντίνος <<Συνέχιση της μελέτης επίδρασης διασυστηματικών γεωργικών φαρμάκων στη σύσταση της κοινότητας επιφυτικών μυκήτων>>

Ρουσίδου Κωνσταντίνα <<Επίδραση συνθετικών και βιολογικών γεωργικών φαρμάκων στη δομή και την αφθονία των νιτροδωποιητικών βακτηρίων και αρχαίων>>

Χρυσή Λασπίδου, Δημήτριος Καρπούζας, Αθανάσιος Κούγκολος <<Ο τομέας του περιβάλλοντος στη Θεσσαλία: παρούσα κατάσταση και προοπτικές>>

Σελίδες στο διαδίκτυο

<http://www.sciencedirect.com/>

<http://www.biobeds.org/>

<http://onlinelibrary.wiley.com/>