

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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



«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΣΤΑΜΑΤΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

**«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΜΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΔΑΦΩΝ ΡΥΠΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ
THIABENDAZOLE»**

**«EVALUATION OF BIOAUGMENTATION WITH BACTERIA FOR THE RECOVERY OF
SOILS POLLUTED WITH THE FUNGICIDE THIABENDAZOLE»**

ΛΑΡΙΣΑ 2016

[1]

**Αξιολόγηση του βιολογικού εμπλουτισμού με βακτήρια για την
αποκατάσταση εδαφών ρυπασμένων με το μυκητοκτόνο
thiabendazole.**

Υπεύθυνος καθηγητής

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

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μόσιαλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Το θέμα της Μεταπτυχιακής μου διατριβής προτάθηκε από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Καρπούζα Δημήτριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Καρπούζα Δημήτριο, για τη συνεχή βοήθεια, καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του, οι οποίες και συνετέλεσαν στην ολοκλήρωση της πτυχιακής αυτής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω την Δρ. Ευαγγελία Παπαδοπούλου,, για την πολύτιμη βοήθεια και την πολύωρη καθοδήγηση που μου παρείχε με όλα τα δυνατά μέσα, καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Καρπούζα, την κ. Παπαδοπούλου, και τον κ. Μόσιαλο .

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου και όλη την ομάδα του εργαστηρίου Φυτών Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την άριστη συνεργασία, την βοήθεια, την απaráμιλλη ηθική συμπαράσταση και το φιλικό κλίμα.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, που με στήριξε από την αρχή μέχρι το τέλος, σε όλο αυτό το δύσκολο ταξίδι, με αγάπη, κατανόηση και όλους τους δυνατούς τρόπους.

Λάρισα 2016

Σταματοπούλου Αναστασία

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	5
Περίληψη	7
Abstract.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	9
Εισαγωγή	9
1.1 Συσκευαστήρια φρούτων - Πρακτικές εφαρμογής γεωργικών φαρμάκων.....	9
1.2 Μέθοδοι διαχείρισης υγρών αποβλήτων βιομηχανιών	11
1.2.1 Μέθοδοι διαχείρισης υγρών αποβλήτων που περιέχουν γεωργικά φάρμακα	11
1.2.2. Μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων	13
1.3. Μέθοδοι αποκατάστασης ρυπασμένων εδαφών.....	15
1.3.1. <i>In situ</i> βιοαποκατάσταση	16
1.3.2. <i>Ex situ</i> βιοαποκατάσταση	17
1.4. Thiabendazole	17
1.4.1. Χρήσεις	17
1.4.2. Τρόπος και Μηχανισμός Δράσης.....	18
1.4.3 Φυσικοχημικές Ιδιότητες.....	18
1.4.4. Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά	19
1.4.5. Τοξικότητα.....	19
1.5. Σκοπός της διατριβής.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1. Εδάφη.....	21
2.2. Βακτήρια	22
2.3. Προετοιμασία βακτηριακού εμβολίου	23
2.4. Μέθοδοι προσδιορισμού της ανάπτυξης εμβολίου	24
2.4.1. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας.....	24
2.4.2. Καταμέτρηση του βακτηριακού πληθυσμού σε τριβλία	24
2.4.3. Καταμέτρηση του βακτηριακού πληθυσμού με PCR πραγματικού χρόνου (q-PCR) 24	
2.4.4. Καταμέτρηση του βακτηριακού πληθυσμού με την μέθοδο DAPI	25
2.5. Προσδιορισμός των υπολειμμάτων του TBZ	26
2.5.1.Μέθοδος εκχύλισης TBZ από υδατικά διαλύματα	26
2.5.2. Μέθοδος εκχύλισης TBZ από το έδαφος	26
2.5.3. Μέθοδος ανάλυσης των υπολειμμάτων του TBZ	27
2.6. Περιγραφή Πειράματος.....	27
2.7. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	29
Αποτελέσματα	29
3.1. Προετοιμασία μικροβιακού εμβολίου - μετρήσεις.....	29

3.2. Η αποδόμηση του TBZ στα εδάφη ύστερα από βιολογικό εμπλουτισμό	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	36
Συζήτηση	36
Βιβλιογραφία.....	38

Περίληψη

Μετά τη συγκομιδή, τα φρούτα υποβάλλονται σε εφαρμογές με μυκητοκτόνα στις εγκαταστάσεις των συσκευαστηρίων φρούτων για τον έλεγχο των μολύνσεων από μύκητες κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους. Η πρακτική αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις του τοξικού και έμμονου μυκητοκτόνου Thiabendazole (DT50 εδάφους > 1 έτος). Παρά την περιβαλλοντική νομοθεσία, η οποία επιβάλλει την επεξεργασία των εν λόγω αποβλήτων, στην πράξη ανάλογες μέθοδοι δεν χρησιμοποιούνται με αποτέλεσμα τα συσκευαστήρια φρούτων να απορρίπτουν τα απόβλητά τους σε παρακείμενους αγρούς.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογήσουμε τον βιοεμπλουτισμό (bioaugmentation) ως μέθοδο για την αποκατάσταση εδάφους φυσικά ή τεχνητά ρυπασμένου με το μυκητοκτόνο Thiabendazole. Το προαναφερθέν έδαφος συλλέχθηκε από τοποθεσία που χρησιμοποιείται για την απόρριψη αποβλήτων από γειτονικό συσκευαστήριο φρούτων, με αποτέλεσμα τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης του Thiabendazole (παλαιομένα υπολείμματα) που κυμαινόταν από 12.000 mg / kg, ακριβώς δίπλα στο σωλήνα απόρριψης ως 400, 250 και 15 mg/ kg σε απόσταση 2, 4 και 8 m, αντίστοιχα. Τα δείγματα εμπλουτίστηκαν με ένα consortium πρωτεοβακτηρίων ικανό να αποδομεί το Thiabendazole. Παράλληλα, η ίδια μέθοδος βιοεμπλουτισμού (bioaugmentation) εφαρμόστηκε σε ένα έδαφος με παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά το οποίο αποστειρώθηκε και ακολούθως εμβολιάστηκε με μικρή ποσότητα του φυσικά ρυπασμένου εδάφους ώστε να καταλήξει να έχει και παρόμοια ενδογενή μικροβιακή κοινότητα. Το τελευταίο έδαφος δέχτηκε νέα προσθήκη Thiabendazole σε επίπεδα ανάλογα με αυτά που βρέθηκαν στο φυσικά ρυπασμένο έδαφος.

Η υπόθεσή μας ήταν ότι η βιοαποδόμηση του Thiabendazole από το consortium θα ήταν πιο επιτυχής στο τεχνητά ρυπασμένο έδαφος, όπου τα υπολείμματα είναι πιο βιοδιαθέσιμα σε σύγκριση με το φυσικά ρυπασμένο έδαφος, όπου εκεί αναμένεται παλαιώση του γεωργικού φαρμάκου. Ο βιοεμπλουτισμός (Bioaugmentation) οδήγησε σε δραστική απομάκρυνση του thiabendazole στα τεχνητά και φυσικά ρυπασμένα εδάφη με 400 mg/ kg, με τιμές DT90s 14,6 και 33,9 ημέρες αντίστοιχα. Οι τιμές DT90s στα μη βιοεμπλουτισμένα (bioaugmented) εδάφη των δύο αυτών μεταχειρίσεων κυμάνθηκαν από 192 έως και > 365 ημέρες. Το consortium απέτυχε να αποδομήσει το thiabendazole στο ακραία ρυπασμένο δείγμα εδάφους (12000 mg/kg). Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή προσρόφηση του Thiabendazole στο έδαφος, το consortium φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό ώστε να χρησιμοποιηθεί στον βιοεμπλουτισμό (bioaugmentation) των περιοχών απόρριψης των αποβλήτων, οι οποίες απαντώνται συχνά στις περιοχές παραγωγής φρούτων της Μεσογείου. Μελέτες σε εξέλιξη εξετάζουν την επίδραση

τέτοιων προσεγγίσεων στην ενδογενή μικροβιακή κοινότητα, χρησιμοποιώντας τεχνολογίες αλληλούχησης επόμενης γενιάς.

Abstract

Upon harvest fruits are subjected to fungicides applications in fruit-packaging plants for the control of fungal infestations during storage. This practice results in the production of large wastewater volumes containing high concentrations of the toxic and persistent fungicide thiabendazole (DT50_{soil} > 1 y). Despite environmental legislation which imposes the treatment of those effluents, there are not such methods in place and the fruit-packaging plants are forced to dispose their effluents in nearby fields.

We aimed to use bioaugmentation for the recovery of soil naturally or artificially contaminated with thiabendazole. The former was collected from a site used for the disposal of effluents from a nearby fruit packaging plant resulting in a gradient of concentrations of thiabendazole (aged residues) which ranged from 12000 mg/kg next to the disposal pipe to 400, 250 and 15 mg/kg at a distance of 2, 4 and 8 m. The samples were augmented with a proteobacterial consortium able to degrade thiabendazole. In parallel, the same bioaugmentation approach was applied in a soil with similar physicochemical properties (and similar endogenous microbial community) which was fortified with fresh additions of thiabendazole at the levels found in the naturally contaminated soil.

Our hypothesis was that the thiabendazole-degrading consortium will be more successful in the biodegradation of thiabendazole in the artificially contaminated soil where residues are more bioavailable compared to the naturally contaminated soil where pesticide aging is expected. Bioaugmentation resulted in drastic removal of thiabendazole from the soils with levels 400 mg/kg and below, with DT90s of 14.6 and 33.9 days in the lab- and naturally-contaminated soils (400 mg/kg) respectively, compared to DT90s of 192 and >365 days found in the corresponding non bioaugmented soils. Our consortium failed to degrade thiabendazole in the highly contaminated soil sample (12000 mg/kg). Considering the high recalcitrance of thiabendazole in soil, our consortium seems to be particularly effective to be used in the bioaugmentation of relevant disposal sites which are common in fruit-growing areas in the Mediterranean region. On-going studies are looking at the impact of such approaches on the endogenous microbial community using next generation sequencing approaches.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 Συσκευαστήρια φρούτων - Πρακτικές εφαρμογής γεωργικών φαρμάκων

Τα συσκευαστήρια φρούτων συλλέγουν προϊόντα με σκοπό την διαλογή, τη συσκευασία και την εμπορία αυτών. Τα φρέσκα φρούτα είτε επεξεργάζονται άμεσα είτε αποθηκεύονται υπό συνθήκες ψύξης για την μετέπειτα ασφαλή εμπορία τους (Blanco et al., 2005). Όμως, κατά την αποθήκευσή τους, παρατηρείται συχνά υποβάθμιση της ποιότητάς τους που έχει ως συνέπεια και την υποβάθμιση της εμπορικής τους αξίας. Οι ανάγκες παρατεταμένης αποθήκευσης είναι πολλές φορές μεγάλες και αυτό έχει ως συνέπεια διαταραχές στη φυσιολογία των καρπών. Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως, η υποβάθμιση της ποιότητάς τους οφείλεται στην ανάπτυξη και δράση φυτοπαθογόνων μυκήτων (El Ghaouth et al., 2002, Mattheis and Rudel et al., 2008).

Πολλοί από τους μύκητες που προκαλούν ασθένειες μετά τη συγκομιδή ανήκουν στο φύλο Ascomycota και στους μύκητες *Anamorphici* (*Fungi Imperfecti*). Στην περίπτωση του *Ascomycota*, το αναπαραγωγικό στάδιο του μύκητα (ανάμορφο-*anamorph*) είναι συνήθως που συναντώνται συχνότερα από ότι το αναπαραγωγικό στάδιο (τελεόμορφο – *teleomorph*) (Coates and Johnson, 1997). Οι κύριοι παθογόνοι μύκητες που προκαλούν μετασυλλεκτικές ασθένειες στα φρούτα είναι: στα μηλοειδή ο *Penicillium expansum* και *Phlyctemava gabunda*, στα πυρηνόκαρπα η *Monilinia sp*, στα εσπεριδοειδή ο *Penicillium digitatum* και *Penicillium italicum* ενώ στο επιτραπέζιο σταφύλι, τις φράουλες και τα ακτινίδια ο *Botrytis cinerea* (Marietal., 2009) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Προσβολή από τους μύκητες *P. Expansum* & *B. cinerea* (αριστερά) και από τον μύκητα *Monilia sp.* (πηγές: KristyGrigg-McGuffin, (2013) και BayerΕλλάς, (2007)

Για την αποτελεσματική παρεμπόδιση μυκητολογικών προσβολών ή φυσιολογικών διαταραχών στα προς αποθήκευση φρούτα τα συσκευαστήρια πραγματοποιούν εφαρμογές γεωργικών φαρμάκων (Adaskaveg and Forster, 2009). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται μυκητοκτόνα των οποίων η αποτελεσματικότητα εξαρτάται από το

επίπεδο της μόλυνσης που έχει να αντιμετωπίσει και από την ικανότητα του να διαπεράσει τον ιστό του φρούτου στο οποίο θα εφαρμοστεί. Τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των ασθενειών που προκαλούνται από εισβολές των μυκήτων διαμέσου φυσικών ανοιγμάτων ή πληγών των φρούτων εφαρμόζονται αμέσως μετά την συγκομιδή. Αν όμως η μόλυνση είναι ήδη προχωρημένη πριν γίνει η συγκομιδή των φρούτων, θα είναι δύσκολο να μπορεί να ελεγχθεί το μέγεθος της αλλοίωσης αυτής. Για τις αλλοιώσεις των προϊόντων πριν την συγκομιδή πρέπει να γίνεται εφαρμογή και στις γεωργικές εκτάσεις (Coates and Johnson, 1997), παρόλο που στην παρούσα μελέτη δεν μας αφορά η συγκεκριμένη διαδικασία.

Τα γεωργικά φάρμακα εφαρμόζονται στα συσκευαστήρια με διάφορους τρόπους όπως εμβάπτιση, υποκαπνισμό, ψεκασμό, εμβάπτιση σε πυκνά διαλύματα γεωργικών φαρμάκων ή επικάλυψη με κερί (Flaim and Toller, 1989, Coates και Johnson, 1997). Η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι η εμβάπτιση ή ο ψεκασμός. Για την επικάλυψη με κερί που περιέχει μυκητοκτόνο χρησιμοποιείται γεωργικό φάρμακο σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτό που εφαρμόζεται στο υδατικό διάλυμα. Αυτό συμβαίνει διότι το μυκητοκτόνο που βρίσκεται στο κερί δεν είναι ικανό να καλύψει γρήγορα και να εισχωρήσει σε κάθε σχισμή και πληγή του φρούτου. Ο συνδυασμός της θερμότητας ως μέθοδος μαζί με μυκητοκτόνο είναι πιο αποτελεσματικός σε σχέση με την εφαρμογή του μυκητοκτόνου σε μέτρια θερμοκρασία (Schirraetal., 2011). Αυτό συμβάλλει στη μεγαλύτερη διάχυση και εισχώρηση του γεωργικού φαρμάκου στο εσωτερικό των καρπών και αυτό συμβαίνει επειδή η θερμοκρασία είναι υψηλή, με αποτέλεσμα τον καλύτερο έλεγχο των παθογενειών με μικρότερη ποσότητα μυκητοκτόνων. Ο συνδυασμός της θερμοκρασίας και γεωργικού φαρμάκου έχει ως αποτέλεσμα επιτυχημένο έλεγχο ως προς τις παθογένειες των φρούτων και τη χρήση μικρότερης ποσότητας μυκητοκτόνων (Baur and Schonherr, 1995). Κατά τις εμβαπτίσεις, τα φρέσκα φρούτα αφήνονται να επιπλέουν σε ένα ρεύμα νερού στο οποίο έχει προστεθεί μυκητοκτόνο, όπως thiabendazole (TBZ). Με τον τρόπο αυτόν, τα φρούτα καθαρίζονται από βρωμιές αλλά και από τα σπόρια των μυκήτων της επιφάνειάς τους (Blanco et al., 2005). Υπάρχουν δύο μέθοδοι διαβροχής που χρησιμοποιούνται σήμερα: διαβροχή απευθείας στο φορτηγό μεταφοράς τους ή διαβροχή σε κάδους μεταφοράς. Στην πρώτη κατηγορία, το διάλυμα διαβροχής εφαρμόζεται επάνω στα φρούτα ενώ είναι ακόμη σε κάδους στο φορτηγό.

Αυτού του είδους οι εμβαπτίσεις φρούτων απαιτούν μεγάλες ποσότητες νερού και οδηγούν στην παραγωγή μεγάλου όγκου υγρών αποβλήτων, τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις (100-200mg/L) υπολειμματικών χημικών ουσιών, όπως είναι το μυκητοκτόνο TBZ (Johnson et al., 2006, Moggia et al., 2010 Robatscher et al., 2012). Επομένως, τα υγρά απόβλητα που παράγονται από τα συσκευαστήρια αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα ρύπανσης των φυσικών πόρων αν δεν υποστούν επεξεργασία πριν την τελική τους απόρριψη στο περιβάλλον. Μελέτες που έχουν γίνει σε περιοχές που γειτνιάζουν συσκευαστήρια φρούτων έχουν δείξει την ύπαρξη υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων όπως το TBZ στα επιφανειακά υδάτινα συστήματα της Κόστα Ρίκα και της Ισπανίας (Castillo et al., 2000, Campo et al. 2013, Masia et al. 2013). Η υψηλή

τοξικότητα των γεωργικών φαρμάκων που περιέχονται στα απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων καθιστά απαραίτητη την επεξεργασία και αποτοξικοποίηση τους πριν από την τελική απόρριψη τους στο περιβάλλον (Flaim and Toller, 1989). Τον σημαντικό κίνδυνο που ενέχει η διαχείριση των συγκεκριμένων αποβλήτων για το περιβάλλον αναγνώρισε η Ευρωπαϊκή Κοινότητα η οποία έδωσε έγκριση χρήσης για την χρήση γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων υπό την αυστηρή προϋπόθεση ότι τα απόβλητα που παράγονται από την χρήση τους θα πρέπει να υφίστανται επεξεργασία και αποτοξικοποίηση onsite (EC, 2001, EC, 2010). Παρόλα αυτά η έλλειψη αποτελεσματικών μεθόδων για την επεξεργασία των συγκεκριμένων αποβλήτων οδηγεί τα συσκευαστήρια φρούτων στην απόρριψη των υγρών αποβλήτων σε παρακείμενους αγρούς με τελικό αποτέλεσμα την σημειακή ρύπανση του εδάφους με υψηλές συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων. Η συσσώρευση υπολειμμάτων μυκητοκτόνων στο έδαφος απαιτεί την απορρύπανση τους ώστε να μην δημιουργηθούν περαιτέρω προβλήματα για το περιβάλλον.

1.2 Μέθοδοι διαχείρισης υγρών αποβλήτων βιομηχανιών

Μία από τις πιο συνήθεις αλλά όχι πάντα περιβαλλοντικά αποδεκτές μεθόδους διαχείρισης των υγρών αποβλήτων βιομηχανιών, είναι η εφαρμογή τους σε εδάφη. Με αυτή την μέθοδο τα υγρά απόβλητα διασπείρονται στην επιφάνεια του εδάφους και ακολουθεί επεξεργασία που να διασφαλίζει μέγιστο αερισμό ώστε τα γεωργικά φάρμακα που καταλήγουν στο έδαφος να διασπώνται μέσω κυρίως βιοτικών διεργασιών χωρίς να μπορούμε να αποκλείσουμε και τον σημαντικό ρόλο των αβιοτικών διεργασιών για ορισμένα γεωργικά φάρμακα. Το έδαφος είναι γνωστό ότι περιέχει μικροοργανισμούς με ποικίλες μεταβολικές ικανότητες έναντι ξενοβιοτικών ουσιών όπως τα γεωργικά φάρμακα (Krueger and Severn, 1984, Felsot et al., 2003).

Εναλλακτικά τα υγρά απόβλητα μπορούν να αποθηκευτούν σε δεξαμενές αποβλήτων που μπορεί να είναι χωμάτινες, πλαστικές ή τσιμεντένιες (Winterlin et al., 1989). Οι πλαστικές δεξαμενές έχουν βάθος περίπου 0,5-1m και ο πυθμένας τους είναι μονωμένος με πλαστικό υλικό σαν ύφασμα και ένα στρώμα χόματος. Όμοιες με τις πλαστικές είναι και οι τσιμεντένιες δεξαμενές με ίδιο βάθος 0.5-1m και μήκος 8-10m και πλάτος 3.5m. Διαθέτουν 20cm τσιμεντένιο τοίχο και 4 cm χαλίκι στον πυθμένα τους. Επάνω στο χαλίκι υπάρχει στρώμα εδάφους και ένα επιπλέον στρώμα 4cm χαλικιού. Οι δεξαμενές αυτές καλύπτονται, έτσι ώστε να αποφευχθεί η υπερχειλίση λόγω βροχών αλλά και ανοίγονται, ώστε να επιτρέπεται η εξάτμιση νερού (Al Hattab and Ghaly, 2012). Τέλος, χρησιμοποιούνται κλίνης εξάτμισης (evaporationbeds) οι οποίες είναι μονωμένες στον πυθμένα (Al Hattab and Ghaly 2012)

1.2.1 Μέθοδοι διαχείρισης υγρών αποβλήτων που περιέχουν γεωργικά φάρμακα

Τα υγρά απόβλητα από αγροτικές βιομηχανίες που χρίζουν επεξεργασίας θα μπορούσαν να ανακυκλωθούν και αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε βιομηχανίες με υψηλές

απαιτήσεις σε νερό. Παρόλα αυτά η έλλειψη εξειδικευμένων μονάδων επεξεργασίας των συγκεκριμένων αποβλήτων συνήθως οδηγεί στην απόρριψη τους στις μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων ή απελευθερώνονται στο περιβάλλον, εάν το φορτίο των ρύπων είναι χαμηλό και σίγουρα κάτω από τις μέγιστες επιτρεπόμενες τιμές που καθορίζει η περιβαλλοντική νομοθεσία (Gogate και Pandit, 2004). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων που περιέχουν γεωργικά φάρμακα θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σε θερμικές, χημικές και φυσικές. Οι θερμικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την αποτέφρωση και την ανοιχτή καύση. Οι χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την οξείδωση, υδρόλυση, και καθίζηση. Οι φυσικές μέθοδοι βασίζονται στην προσρόφιση από ενεργό άνθρακα, ανόργανα και οργανικά υλικά (Al Hattab και Ghaly, 2012).

Οι φυσικές μέθοδοι, όπως η προσρόφιση, έχει αποδειχθεί ότι είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την απομάκρυνση των μη βιοδιασπώμενων γεωργικών φαρμάκων από υγρά απόβλητα. Ο ενεργός άνθρακας υπήρξε το πλέον κοινό προσροφητικό μέσο για αυτήν τη διαδικασία, λόγω της αποτελεσματικότητας και ευελιξίας του (Aksu, 2005). Είναι ένα υλικό, το οποίο χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά υψηλή ικανότητα προσρόφισης, η οποία οφείλεται στο μεγάλο εμβαδόν επιφάνειάς του και τον υψηλό αριθμό των εσωτερικών πόρων ανά μονάδα μάζας. Σε γενικές γραμμές, τα οργανικά γεωργικά φάρμακα με αρωματικές ομάδες και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό είναι επιδεκτικά στην ενεργοποιημένη προσρόφιση άνθρακα και τα απόβλητα διοχετεύονται διαμέσω ενός στρώματος ενεργού άνθρακα και προσροφώνται στους πόρους του ενεργού άνθρακα. Η ικανότητα προσρόφισης του ενεργού άνθρακα εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των ρυπαντών και τα χαρακτηριστικά του ίδιου του άνθρακα. Εάν στα υγρά απόβλητα προς επεξεργασία περιέχονται και άλλες ουσίες που είναι επιδεκτικές σε προσρόφιση από ενεργό άνθρακα, μπορεί να ανταγωνίζονται με τα γεωργικά φάρμακα για θέσεις προσρόφισης με αποτέλεσμα την μειωμένη αποτελεσματικότητα ή την εκρόφιση ρυπαντών (Aksu, 2005).

Οι βιολογικές μέθοδοι θα μπορούσαν να είναι μια χαμηλού κόστους, πιο φιλική προς το περιβάλλον, και εξίσου αποτελεσματική μέθοδος για την απορρύπανση των ρυπασμένων υγρών αποβλήτων λυμάτων από γεωργικά φάρμακα. Η βιολογική τους επεξεργασία θα μπορούσε γίνει είτε με την μορφή βιολογικού εμπλουτισμού με μικροοργανισμούς (bioaugmentation) (Balestetal., 2008) είτε με την χρήση φυτικής απορρύπανσης όπου χρησιμοποιούνται φυτά για να κατακρατούν περιβαλλοντικούς ρύπους από τα υγρά απόβλητα (Cunningham et al., 1996). Εκτός των παραπάνω έχουν χρησιμοποιηθεί και οι βιοκλίνες (Biobeds) για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων που παράγονται στον αγρό από μη ορθολογικές γεωργικές πρακτικές. Οι βιοκλίνες είναι αποτελεσματικές μέθοδοι για την ελαχιστοποίηση της ρύπανσης του περιβάλλοντος από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων (Castillio, 1997 και Torstensson, 2000). Στην απλούστερη μορφή τους αποτελούνται από ένα κοίλωμα στο έδαφος που μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 0.5-1m βάθος. Ο πυθμένας του κοιλώματος μονώνεται με κατάλληλο υλικό και το υπόλοιπο συμπληρώνεται με ένα οργανικό υπόστρωμα που ονομάζεται

βιομίγμα Η αποτελεσματικότητα των βιοκλινών βασίζεται στην υψηλή ικανότητα βιοαποδόμησης και προσρόφησης του βιομίγματος.



Εικόνα 2. Ένας τύπος βιοκλινών (Phytobac®) που χρησιμοποιούνται στην Γαλλία για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων που παράγονται στον αγρό από μη ορθολογικές πρακτικές πριν ή μετά τον ψεκασμό Πηγή: © Bayer Nordic, 2013

Το παραδοσιακό σουηδικό βιομίγμα αποτελούνται από άχυρο, έδαφος και τύρφη σε % αναλογία κατ' όγκο 50:25:25. Κάθε συστατικό του biomixture παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα των βιοκλινών: Το έδαφος είναι σημαντική πηγή μικροοργανισμών που αποδομούν γεωργικά φάρμακα, το άχυρο παρέχει θρεπτικά στοιχεία για του μικροοργανισμούς και τέλος η τύρφη ελέγχει την υγρασιακή κατάσταση του εδάφους (Castillo et al., 2008).Μια σειρά από μελέτες έδειξαν ότι τόσο το άχυρο όσο και η τύρφη θα μπορούσαν να αντικατασταθούν από άλλα αποτελεσματικά λιγνινοκυτταρινούχα υλικά (μίσχοι σταφυλιών) και κομποστοποιημένα αγροτικά υποπροϊόντα αντίστοιχα (π.χ. λίπασμα από φύλλα ελιάς, τσάμπουρα, και compost από μίσχους σταφυλιών) (Karanasios et al., 2010, Kara nasios et al., 2010b, Karanasios et al., 2012, Karanasios et al., 2012b, Omirou et al., 2012).

1.2.2. Μέθοδοι επεξεργασίας υγρών αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων

Όπως προαναφέρθηκε, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα ενέκρινε την χρήση γεωργικών φαρμάκων όπως το TBZ στα συσκευαστήρια φρούτων υπό την προϋπόθεση να πραγματοποιείται αποτελεσματική διαχείριση των αποβλήτων που παράγονται από την χρήση τους. Μία από τις μεθόδους διαχείρισης και επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων είναι οι βιοκλίνες (Biobeds). Μια πρόσφατη μελέτη από τους Omirouetal (2012) έδειξαν ότι οι βιοκλίνες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια εσπεριδοειδών (που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων TBZ, imazalil και ortho-phenylphenol).

Εκτός των βιοκλινών το μόνο σύστημα που αναπτύχθηκε για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων με υψηλή συγκέντρωση TBZ και έχει κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας είναι το ControlTECECO® από την εταιρεία Technidex, Ισπανίας (Εικόνα 3). Η αποτοξικοποίηση με αυτή τη μέθοδο, βασίζεται στην προσρόφηση των γεωργικών φαρμάκων στην επιφάνεια κόκκων ενεργού άνθρακα (García Portillo et al., 2004) και σε τεχνικές φιλτραρίσματος και μικροδιήθησης, για την απομάκρυνση και τον διαχωρισμό ξένων υλών και οργανικών υλών. Η ελαχιστοποίηση του ρυπαντικού φορτίου και η εφαρμογή του συμμορφώνεται με τις περιβαλλοντικές προδιαγραφές (ISO 14.000) (Technidex, 2011). Το σύστημα αυτό αποδείχτηκε πολύ αποτελεσματικό, όμως η χρήση του σε ευρεία κλίμακα ήταν περιορισμένη, καθώς το κόστος εγκατάστασης και εφαρμογής του ήταν ιδιαίτερα υψηλό.



Εικόνα 3. Το σύστημα CONTROL-TECECO® το οποίο διατίθεται για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων που παράγονται από συσκευαστήρια φρούτων και περιέχουν TBZ. Πηγή: tecnidex.es

Επιπλέον, για την αποτοξικοποίηση των υγρών αποβλήτων δημιουργήθηκε από τους Flaim και Toller (1989) ένα σύστημα διήθησης με φίλτρο, το οποίο αποτελείται από μείγμα τύρφης (peatmoss), κοπριάς, αργίλου και άμμου δολομίτη. Η αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου ως προς την αποτοξικοποίηση του TBZ βρέθηκε να ξεπερνά το 98%. Ωστόσο, η εφαρμογή του για την αποτοξικοποίηση μεγάλου όγκου αποβλήτων υστερούσε. Επίσης, τα υλικά τύρφη και άργιλος αυξάνουν το κόστος εφαρμογής του.

Τέλος σε επίπεδο εργαστηρίου έχουν δοκιμαστεί και μέθοδοι οξειδωσης ή φωτοοξειδωσης των υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων. Πρόσφατες μελέτες από τους Jimenez et al. (2015) έδειξαν ότι φωτοκατάλυση με TiO_2 οδήγησε σε αποτελεσματική απομάκρυνση των imazalil και TBZ από τα υγρά απόβλητα συσκευαστηρίων φρούτων. Παρόμοιες μελέτες από τους Sanchez Perez et al. (2014) έδειξαν ότι συνδυασμός βιολογικής επεξεργασίας μεμβρανών και Fenton-PhotoFenton διεργασιών οξειδωσης ως τριτοβάθμια επεξεργασία των υγρών αποβλήτων μπορούσε να οδηγήσει σε αποτελεσματική απομάκρυνση του TBZ από τα υγρά. Παρόλα αυτά οι παραπάνω δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις γεωργικών

φαρμάκων (0.1 mgL^{-1}) οι οποίες είναι πολλές φορές χαμηλότερες των συγκεντρώσεων των γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων. Επιπρόσθετα τέτοιου είδους αβιοτικές διεργασίες έχει βρεθεί ότι οδηγούν στον σχηματισμό οξειδωμένων προϊόντων με αδιευκρίνιστη τοξικότητα (Sirtori et al. 2014).

Όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν ότι σήμερα υπάρχει μια δεδομένη έλλειψη μεθόδων επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων που να συνδυάζουν αποτελεσματικότητα και χαμηλό κόστος. Αυτή η έλλειψη οδηγείται συσκευαστήρια είτε στην απόρριψη των υγρών αποβλήτων στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αστικών αποβλήτων τα οποία εμφανίζουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα στην απομάκρυνση των μυκητοκτόνων (Masia et al. 2013) είτε στην παράδοση των αποβλήτων σε εξειδικευμένες εταιρείες αποτοξικοποίησης αποβλήτων με ιδιαίτερα υψηλό κόστος για τα συσκευαστήρια είτε τελικά στην απόρριψη τους σε παρακείμενους αγρούς δημιουργώντας ρυπασμένα εδάφη και περαιτέρω περιβαλλοντικά προβλήματα.

1.3. Μέθοδοι αποκατάστασης ρυπασμένων εδαφών

Τα εδάφη που γίνονται αποδέκτες απόρριψης αποβλήτων που περιέχουν οργανικούς ρύπους θα πρέπει να απορρυπανθούν καθώς αποτελούν δεξαμενές για διασπορά της ρύπανσης σε άλλα περιβαλλοντικά υποστρώματα όπως επιφανειακά και υπόγεια νερά. Η βιολογική απορρύπανση που περιλαμβάνει την χρήση μικροοργανισμών για την αποτοξικοποίηση των ρύπων-στόχων αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο αποκατάστασης ρυπασμένων εδαφών. Κατά την βιοαποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών χρησιμοποιούνται αυτόχθονα ή εξωγενή βακτήρια ή μύκητες που έχουν την ικανότητα να αποδομούν οργανικούς ρύπους συμπεριλαμβανομένων και γεωργικών φαρμάκων (Vidali, 2001, Ortiz- Hernández *et al.*, 2011).

Οι μικροοργανισμοί αυτοί επιτυγχάνουν την αποτοξικοποίηση των γεωργικών φαρμάκων είτε χρησιμοποιώντας τα ως πηγή θρεπτικών για την αύξηση και ανάπτυξη τους (καταβολισμός) είτε απλά τα μεταβολίζουν με αργούς ρυθμούς (συμμεταβολισμός) (Suthersan, 1999, Ortiz-Hernández *et al.*, 2013). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να παράγουν ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά ένζυμα (εξαρτώμενη του Mn υπεροξειδάση, λίνινο-υπεροξειδάση και λακκάση) (Diez, 2010, Karigar and Rao, 2011) και μέσω αυτών να οξειδώσουν, ανάγουν ή να υδρολύσουν τα γεωργικά φάρμακα (Ortiz -Hernández *et al.*, 2011). Στην ιδανική περίπτωση, η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων οδηγεί σε παραγωγή απλούστερων μορίων, όπως CO_2 , H_2O , ή ενδιάμεσα που μπορούν να τροφοδοτούν τον αναβολισμό των μικροοργανισμών (πυρροβικό οξύ και ακεταλδεΐδη) (Fetzner, 2002). Επομένως, βασικός παράγοντας για την αποτελεσματικότητα της βιοαποκατάστασης είναι η ύπαρξη μικροβιακού πληθυσμού στο έδαφος ικανού να αποδομεί τους ρύπους-στόχους. Η επιτυχία της βιοαπορρύπανσης εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα των ρύπων, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα οξυγόνου, οι συγκεντρώσεις διαθέσιμων θρεπτικών στοιχείων κτλ (Vidali, 2001).

Διάφοροι μικροοργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιοαπορρύπανση εδαφών ρυπασμένων με γεωργικά φάρμακα όπως α) αερόβια βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphigomonas*, *Rhodococcus*, και *Mycobacterium*, β) λιγνολυτικοί μύκητες *Phanaerochaete chrysosporium* και γ) μεθυλότροφα βακτήρια (Vidali, 2001).

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές βιοαποκατάστασης που εφαρμόζονται, ανάλογα με το βαθμό κορεσμού και αερισμού του εδάφους. Οι *insitu* τεχνικές δημιουργούν ελάχιστη διατάραξη στο εδαφικό οικοσύστημα. Αντίθετα οι *exsitu* τεχνικές εφαρμόζονται στο έδαφος και τα υπόγεια ύδατα σε μέρος το οποίο έχει μετακινηθεί από την περιοχή μέσω ανασκαφής (έδαφος) ή άντλησης νερού (νερό). Οι τεχνικές βιοαποκατάστασης διακρίνονται σε τεχνικές βιοενεργοποίησης και τεχνικές βιολογικού εμπλουτισμού. Κατά την βιοενεργοποίηση πραγματοποιείται η προσθήκη θρεπτικών συστατικών, αερισμός και άλλα, ενώ κατά τον βιολογικό εμπλουτισμό πραγματοποιείται προσθήκη μικροοργανισμών κατάλληλων να διασπών τους ρύπους-στόχους (Vidali, 2001).

1.3.1. *In situ* βιοαποκατάσταση

Οι *in situ* τεχνικές είναι οι πιο επιθυμητές λόγω χαμηλότερου κόστους και λιγότερων απαιτούμενων επεμβάσεων, καθώς παρέχουν αποκατάσταση αποφεύγοντας την ανασκαφή και μεταφορά των ρυπαντών. Η *in situ* αποκατάσταση περιορίζεται από το βάθος του εδάφους που μπορεί να εξυγιανθεί αποτελεσματικά. Οι πιο σημαντικές *in situ* επεμβάσεις σε εδάφη είναι:

Η **βιοενεργοποίηση** που περιλαμβάνει την προσθήκη θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου για τη βοήθεια αυτοχθόνων πληθυσμών των μικροοργανισμών του εδάφους. Αυτές οι θρεπτικές ουσίες είναι βασικά δομικά στοιχεία της ζωής και δίνουν τη δυνατότητα στους μικροοργανισμούς να παράγουν τα απαραίτητα ένζυμα για τη διάσπαση των ρυπαντών. Οι διάφορες μέθοδοι βιοενεργοποίησης που χρησιμοποιούνται είναι ο **βιοαερισμός** (Bioventing). Ο βιοαερισμός είναι η πιο κοινή επιτόπια κατεργασία και περιλαμβάνει την παροχή αέρα και θρεπτικών συστατικών μέσω πηγαδιών στο ρυπασμένο έδαφος για την ενεργοποίηση των βακτηρίων. Ο βιοαερισμός χρησιμοποιεί χαμηλά ποσοστά ροής αέρα και παρέχει μόνο την ποσότητα οξυγόνου που είναι αναγκαία για την βιοαποδόμηση, ελαχιστοποιώντας την πτητικότητα και την απελευθέρωση ρυπαντών στην ατμόσφαιρα. ii) Η **βιοδιασπορά** (biosparging) που περιλαμβάνει την έγχυση αέρα υπό πίεση κάτω από τον υδροφόρο ορίζοντα ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση οξυγόνου των υπόγειων υδάτων και την ενίσχυση του ρυθμού της βιολογικής αποδόμηση των ρύπων φυσικά από τα βακτήρια. Η μέθοδος βιοδιασποράς αυξάνει την ανάμιξη στη ζώνη κορεσμού και αυξάνει την επαφή μεταξύ του εδάφους και των υπόγειων εδαφών. Η ευκολία και το χαμηλό κόστος εγκατάστασης μικρής διαμέτρου των σημείων ένεσης αέρα, επιτρέπει σημαντική ευελιξία του σχεδιασμού και της κατασκευής του συστήματος.

Η δεύτερη μέθοδος *in situ* βιοαποκατάστασης, είναι ο **βιολογικός εμπλουτισμός** (Bioaugmentation). Ο βιολογικός εμπλουτισμός συχνά περιλαμβάνει την προσθήκη αυτοχθόνων μικροοργανισμών ή εξωγενών στις ρυπασμένες τοποθεσίες. Δύο παράγοντες έχει βρεθεί ότι περιορίζουν την αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης μεθόδου: 1) τα μη ενδογενή στελέχη που σπάνια ανταγωνίζονται αρκετά καλά με τον αυτόχθονα πληθυσμό ώστε να αναπτύξουν και να διατηρήσουν τα απαραίτητα επίπεδα πληθυσμού και 2) τα περισσότερα εδάφη με μακροχρόνια έκθεση σε βιοαποδομήσιμες οργανικές ενώσεις έχουν αυτόχθονες μικροοργανισμούς που είναι ικανοί να αποδομήσουν αποτελεσματικά τους ρύπους-στόχους. Ο βιοεμπλουτισμός εφαρμόζεται είτε με την χρήση αμιγών βακτηριακών εμβολίων είτε με την χρήση βακτηριακών κοινοτήτων (*consortia*) (El Fantroussi and Agathos, 2015). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι προσθήκη μικροοργανισμών σε έδαφος με το ζιζανιοκτόνο atrazine οδήγησαν σε σημαντική αύξηση της αποδόμησης του atrazine στο έδαφος (Strong et al., 2000). Η εφαρμογή συνδυασμού βιοενεργοποίησης, μέσω προσθήκης θρεπτικών στοιχείων, και βιολογικού εμπλουτισμού, μέσω εμβολιασμού με το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp., αποδείχτηκε η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την αποκατάσταση εδάφους ρυπασμένου με το ζιζανιοκτόνο atrazin (Silva et al., 2004).

1.3.2. *Ex situ* βιοαποκατάσταση

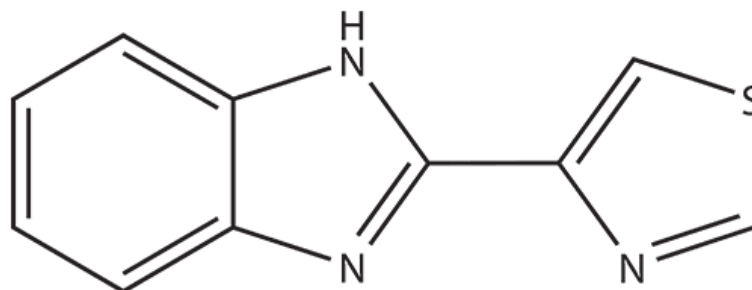
Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν την ανασκαφή ή αφαίρεση του ρυπασμένου εδάφους και μεταφορά του σε κατάλληλα διαμορφωμένη περιοχή όπου και πραγματοποιείται η βιοαποκατάσταση. Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι *ex situ* βιοαποκατάστασης ρυπασμένων εδάφων όπως i) Land-Farming που περιλαμβάνει ανασκαφή, μεταφορά και τοποθέτηση του ρυπασμένου εδάφους σε κατάλληλα διαμορφωμένη κλίση όπου είτε εφαρμόζεται βιοενεργοποίηση είτε βιοεμπλουτισμός για την αποκατάσταση του εδάφους. Η συγκεκριμένη πρακτική περιορίζεται στην εξυγίανση επιφανειακού (10 έως 35 εκατοστά) εδάφους, ii) Η *κομποστοποίηση* (Composting), η οποία περιλαμβάνει την ανάμειξη ρυπασμένου εδάφους με άλλα οργανικά υλικά όπως κοπριά και αγροτικά υποπροϊόντα ώστε να δημιουργηθεί ένα τελικό οργανικό υλικό που θα αποδομηθεί αεροβικά με την διαδικασία της κομποστοποίησης. Η παρουσία αυτών των οργανικών υλικών ενισχύει την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού, iii) Η χρήση βιολογικών σωρών (Biopiles) που είναι μια υβριδική διαδικασία land-farming και κομποστοποίησης. Συνήθως χρησιμοποιούνται για τη αποκατάσταση εδαφών ρυπασμένων με πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες.

1.4. Thiabendazole

1.4.1. Χρήσεις

Tothiabendazole (2-(4-thiazolyl)-1H-benz-imidazole) (TBZ) είναι ένα διασυστηματικό βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο (Εικόνα 4), που εισήχθηκε στη γεωργική πράξη αρχικά ως νηματώδοκτονο (Prousaliset al., 2004). Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ασθνεσιών των φρούτων και των λαχανικών από μύκητες προσυλλεκτικά αλλά κυρίως

μετασυλλεκτικά για τον έλεγχο μυκητολογικών προσβολών από τους μύκητες *Botrytis cinerea*, *Cercosporas*, *Nectriagalligena*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Verticillium* sp (Prousaliset al., 2004, Davidse and Flach, 1987, Allen and Gottlieb., 1970).



Εικόνα 4. Η χημική δομή του TBZ

Το TBZ χρησιμοποιείται σε συσκευαστήρια φρούτων που συσκευάζουν μπανάνες, εσπεριδοειδή και μηλοειδή (Moggia et al., 2010 Robatcher et al., 2012) αλλά και σε συσκευαστήρια πατάτας. Το TBZ επίσης χρησιμοποιείται επίσης ως ευρέως φάσματος παρασιτοκτόνο για την καταπολέμηση εκτοπαρασίτων σε διάφορα ζώα και ανθρώπους (Coulet et al., 1998).

1.4.2. Τρόπος και Μηχανισμός Δράσης

Το TBZ παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μυκήτων παρεμβαίνοντας στην διαδικασία της μίτωσης και της κυτταροδιαίρεσης (Danaher et al., 2007). Ειδικότερη η μυκητοτοξική δράση του TBZ σχετίζεται με την παρεμπόδιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου. Οι μικροσωληνίσκοι σχηματίζονται με πολυμερισμό της πρωτεΐνης β-τομπουλίνη (Watanabe-Akanuma et al., 2005). Η προσκόλληση του TBZ στη β-τομπουλίνη εμποδίζει τον πολυμερισμό της, η άτρακτος δεν σχηματίζεται, η μιτωτική διαίρεση σταματά και ο μύκητας δεν μπορεί να ολοκληρώσει την μίτωση. Σημαντικό όμως ρόλο για τη μυκητοξικότητα του TBZ παίζει και η παρεμπόδιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων του κυτταροπλάσματος από τους οποίους εξαρτάται ο προσανατολισμός της αύξησης των μυκηλιακών υφών (Allen and Gottlieb, 1970, Davidse and Flach, 1978, Lacey, 1990, Danaher et al., 2007, Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010).

1.4.3 Φυσικοχημικές Ιδιότητες

Το TBZ έχει μοριακή μάζα 201,26g/mol, είναι κρυσταλλικό υγρό με σημείο τήξης τους 304-305°C. Έχει μέτρια έως μικρή διαλυτότητα στο νερό (28-30 mg/l στους 25°C) και είναι διαλυτό σε διάφορους οργανικούς διαλύτες. Έχει σχετικά χαμηλή τάση ατμών (5.3×10^{-7} Pa στους 25 °C) και σταθερά Henry ($3,7 \times 10^{-6}$ Pa m³ mol⁻¹) δείχνοντας περιορισμένη πτητικότητα. Έχει log P_{ow} 2,39 (σε pH και 20°C (EC, 2001)).

1.4.4. Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά

Το TBZ είναι ιδιαίτερα υπολειμματικό στο έδαφος με τιμές χρόνου ημιζωής (DT₅₀) που κυμαίνονται από 833-1100 ημέρες σε καλλιεργημένες εκτάσεις σε 1093-144 σε εκτάσεις με αγρ ανάπαυση (USEPA, 2002). Ομοίως συστηματικές έρευνες σε ευρωπαϊκό επίπεδο διαπίστωσαν ότι οι τιμές DT₅₀ του TBZ στο έδαφος τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες ήταν μεγαλύτερες του ενός έτους (EC, 2001).

Το TBZ έχει κατηγοριοποιηθεί ως μη άμεσα βιοδιασπώμενο. προσροφάται έντονα από τα κολλοειδή του εδάφους με τιμές συντελεστή προσρόφησης K_{oc} 1104-22467 ml/g που μαρτυρούν την μικρή κινητικότητα του στο εδαφικό περιβάλλον (Soleletal. 1979, EC, 2001, Omirou et al., 2012). Επίσης, το TBZ δεν είναι ευαίσθητο σε υδρολυτική διάσπαση σε τιμές pH από 4 ως 9. Αντίθετα, είναι ευαίσθητο σε φωτόλυση στο νερό σε pH 5 εκτιθέμενο σε λάμπα xenon για 96 ώρες στους 25°C (USEPA, 2002). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε νερό ή σε ιζήματα, το TBZ έδειξε μειωμένη υπολειμματικότητα στο νερό (DT₅₀=1.6-2.3 ημέρες) σε σχέση με την υπολειμματικότητα του στο ίζημα που ήταν εμφανώς μεγαλύτερη (DT₅₀=375-4332 ημέρες) (EC, 2001).

1.4.5. Τοξικότητα

Το TBZ φέρει χαμηλή οξεία και δερματική τοξικότητα (κατηγορία III). Δεν είναι μεταλλαξιγόνο, τερατογονικό, νευροτοξικό και γενετοξικό. Παρουσιάζει χαμηλή διατροφική τοξικότητα για τα ποντίκια και τα πουλιά (LC₅₀ ποντικών=3100 mg/kg; LC₅₀ πουλιών >2250 mg/kg, LC_{50short-term} διατροφή πουλιών >5620 mg/kg). Ωστόσο, είναι πολύ τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς (EC₅₀ *Daphniamagna* = 0,81 mg/l. NOEC 21 μέρες, *D. magna* = 0,084 mg/l; LC₅₀ *Oncorhycusmykiss* 0,55 mg/l; EC₅₀ άλγη (96 ώρες) 9.0 mg/l (EC, 2001). Ο κύριος μεταβολίτης του TBZ στους ζωικούς οργανισμούς είναι το 5-hydroxythiabendazole (Cannavan et al., 1998).

1.5. Σκοπός της διατριβής

Από την εφαρμογή του μυκητοκτόνου TBZ στα συσκευαστήρια φρούτων, παράγεται μεγάλος όγκος υγρών αποβλήτων και δεδομένης της απουσίας ενός αξιόπιστου και οικονομικά αποδεκτού συστήματος επεξεργασίας αυτών, συχνά καταλήγουν στο έδαφος αγρών που γειτνιάζουν σε συσκευαστήρια φρούτων. Αποτέλεσμα αυτών των χειρισμών είναι η εμφάνιση αρκετών σημείων σε περιοχές με μεγάλη πυκνότητα συσκευαστηρίων φρούτων όπου έχουν παρατηρηθεί αγροί με υψηλά επίπεδα ρύπανσης με γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων. Έτσι εντοπίστηκε περιοχή απόρριψης αποβλήτων από συσκευαστήριο φρούτων στην Κύπρο που εμφάνιζε αυξημένη και συσσωρευμένη ρύπανση με το μυκητοκτόνο TBZ. Με βάση τα παραπάνω ο κύριος στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η αξιολόγηση του βιοεμπλουτισμού ως μέθοδος αποκατάστασης της ρύπανσης στο συγκεκριμένο έδαφος. Ο βιολογικός εμπλουτισμός εφαρμόστηκε μέσω εφαρμογής ενός consortium βακτηρίων που από προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και

Περιβάλλοντος (PhD Chiara Perruchon 2014) είχε την ικανότητα να διασπά το TBZ και να το χρησιμοποιεί σαν πηγή C and N.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Εδάφη

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν δύο εδάφη. Το πρώτο έδαφος συλλέχθηκε από την Λεμεσό, Κύπρος από περιοχή παρακείμενη συσκευαστηρίου εσπεριδοειδών στην οποία απορρίπτονταν συστηματικά κατά τα τελευταία έτη τα υγρά απόβλητα του συσκευαστηρίου διαμέσου σωλήνας μεταφοράς υγρών. Αποτέλεσμα αυτής της πρακτικής ήταν η εμφάνιση μιας διαβάθμισης των επιπέδων του TBZ στο έδαφος ανάλογα με το απόσταση από το σημείο εκροής των υγρών αποβλήτων. Έτσι τα επίπεδα του TBZ ήταν 12000, 400, 250 και 12 $\mu\text{g}/\text{g}$ εδάφους σε ζώνες 0, 2, 4 και 8 μαπό το σημείο απόρριψης των αποβλήτων στον αγρό.

Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και ένα δεύτερο έδαφος το οποίο ήταν διαθέσιμο στο εργαστήριο (είχε συλλεγεί από αγρό καλλιέργειας πατάτας στην Θήβα) και εμφάνιζε ανάλογα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά με έδαφος από την Κύπρο (Πίνακας 2.1) χωρίς όμως να έχει εκτεθεί στο παρελθόν στο TBZ.

Πίνακας 2.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που χρησιμοποιήθηκαν

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	Έδαφος Κύπρου	Έδαφος Θήβα (Μάρτυρας)
Άργιλος	13,6%	29,6%
Ιλύς	33,6%	28%
Άμμος	52,8%	42,4%
Μηχανική Σύσταση	Άμμο-Αργιλοπηλώδες	Αργιλοπηλώδες
Οργανικός άνθρακας %	1,45	1,17
pH	7,73	7,85

Για τον προσδιορισμό του pH του εδάφους, ζυγίστηκαν 10g εδάφους (ξηρό βάρος) και αναμίχθηκαν σε κωνική φιάλη με 25ml (1/2,5 β/ο) νερού και ακολούθησε ανάδευση για 1 ώρα με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Η πάστα εδάφους αφήθηκε σε ηρεμία για 20 min και ακολούθως προσδιορίστηκε το pH με πεχάμετρο υψηλής ευκρίνειας. Για κάθε έδαφος μετρήθηκε το pH σε δύο ανεξάρτητα δείγματα. Η μηχανική σύσταση και η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα των δύο εδαφών μετρήθηκαν στο εργαστήριο Εδαφολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Εκτός των παραπάνω φυσικοχημικών χαρακτηριστικών προσδιορίστηκαν η υγρασία και η υδατοχωρητικότητα των δύο εδαφών. Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας, μεταφέρθηκαν $5 \pm 0,01$ g εδάφους σε προ-ζυγισμένο δοχείο από αλουμίνιο και έγινε καταγραφή του συνολικού βάρους. Για κάθε δείγμα εδάφους δημιουργήθηκαν 3 επαναλήψεις. Έπειτα, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε προθερμασμένο φούρνο στους 105°C , όπου και παρέμειναν για 16-18 ώρες. Στη συνέχεια τα δείγματα επαναζυγίστηκαν και προσδιορίστηκε η υγρασία του εδάφους σύμφωνα με τον τύπο :

$$\text{MC} = [(W1-W2)*100\%]/(W1-W_{\text{Cont}})$$

Όπου :

MC: η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους

W1: το βάρος του δοχείου με το έδαφος πριν την ξήρανση

W2: το βάρος του δοχείου με το έδαφος μετά την ξήρανση

W_{Cont} : το βάρος του δοχείου

Οπροσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας έγινε βαρομετρικά. Συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν 20g εδάφους και μεταφέρθηκαν σε χωνί όπου είχε τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί (Whatman No1). Στη συνέχεια το έδαφος διαβρέχτηκε επανειλημμένα με απεσταγμένο νερό, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο κορεσμός του. Η ελεύθερη επιφάνεια του χωνιού καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή απώλειας νερού λόγω εξάτμισης. Έπειτα, το έδαφος αφέθηκε σε ηρεμία 12-14 ώρες, ώστε να εξαντληθεί η περίσσεια του νερού. Το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος καταγράφηκε πριν (W1) και μετά (W2) την κατάκλιση. Ακολούθως, η υδατοχωρητικότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{WHC} = (B - X) + (W2 - W1) / X * 100\%$$

Όπου:

WHC: η υδατοχωρητικότητα του εδάφους

B: το βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

X: το ξηρό βάρος εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

W1: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, πριν την κατάκλιση

W2: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, μετά την κατάκλιση

2.2. Βακτήρια

Για να αξιολογηθεί ο βιολογικός εμπλουτισμός ως μέθοδος αποκατάστασης εδαφών ρυπασμένων με το TBZ χρησιμοποιήθηκε μία κοινότητα βακτηρίων, η οποία απομονώθηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου

Θεσσαλίας. Σύμφωνα με τις προηγούμενες πειραματικές μελέτες, το κύριο βακτήριο που ταυτοποιήθηκε και παρουσίασε ικανότητα αποικοδόμησης του TBZ ανήκε στο γένος *Sphingomonas*. Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός του *Sphingomonas* στο συγκεκριμένο consortium συμμετέχουν βακτηρία που ανήκουν στα α- (*Oligotropha*, *Shinella*, *Mesorhizobium*), β- (*Hydrogenophaga*, *Thiobacillus denitrificans*), γ- (*Hydrocarboniphaga*) πρωτεοβακτήρια (Perruchon et al. 2015).

2.3. Προετοιμασία βακτηριακού εμβολίου

Το βακτηριακό consortium που διασπούσε το TBZ καλλιεργούνταν συστηματικά σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων όπου το TBZ αποτελούσε την μοναδική πηγή C (MSMN). Για την παρασκευή του MSMN προετοιμάστηκαν τα τρία παρακάτω αποστειρωμένα διαλύματα αλάτων τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες ποσότητες:

- **Stock 1** (600ml): KH_2PO_4 13,62 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35,82g, NH_4Cl 6g, H_2O (αποσταγμένο)
- **Stock 2** (600ml): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,06g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,09g, H_2O (αποσταγμένο)
- **Stock 3** (100ml): $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,046g, H_2O (αποσταγμένο)

Για την δημιουργία MSMN με TBZ, ποσότητα 40 ml του stock 1 αναμίχθηκε με κατάλληλες ποσότητες stock 2 (40 ml) και 3 (8 ml) και υδατικό διάλυμα TBZ (312 ml). Το υδατικό διάλυμα TBZ που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 50 mg/L και για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκε αναλυτικό πρότυπο της ουσίας TBZ (καθαρότητα 99.9%, Fluca, Perstanal®). Αμέσως μετά την παρασκευή του το υδατικό διάλυμα του TBZ αποστειρώθηκε μέσω διήθησης από φίλτρο σύριγγας. Το θρεπτικό διάλυμα MSMN + TBZ (25 mg/L) σε κάθε περίπτωση εμβολιάζονταν με κατάλληλη ποσότητα από stock γλυκερόλης που διατηρούνταν στους -80°C . Η αρχική βακτηριακή καλλιέργεια στην συνέχεια ανακαλλιεργήθηκε για άλλους δύο κύκλους σε νέες καλλιέργειες MSMN + TBZ ώστε να μεγιστοποιηθεί η αποδομητική ικανότητα της κοινότητας των βακτηρίων. Ακολούθως προετοιμάστηκαν 3 κωνικές φιάλες με 100 ml θρεπτικό μέσο MSMN + TBZ οι οποίες εμβολιάστηκαν με 3.5 ml της τελευταίας ανακαλλιέργειας. Παράλληλα προετοιμάστηκε και τέταρτη κωνική φιάλη που περιείχε επίσης MSMN + TBZ που δεν εμβολιάστηκε με βακτήρια και διατηρήθηκε ως αβιοτικός μάρτυρας. Όλες οι κωνικές φιάλες στην συνέχεια επώαστηκαν στους 25°C στις 160 rpm σε αναδευόμενο επωαστικό θάλαμο. Κατά την διάρκεια της επώασης πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε χρόνο 22, 24, 27, 40 και 50 ώρες και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις προσδιορισμού της αποδόμησης του TBZ σε σύστημα HPLC και μετρήσεις της ανάπτυξης του μετρήσεων οπτικής πυκνότητας, καταμέτρησης αποικιών σε τριβλία, q-PCR και DAPI.

Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων, για τον εμβολιασμό του εδάφους συλλέχθηκαν συνολικά 75 ml καλλιέργειας της βακτηριακής κοινότητας σε MSMN + TBZ στις 50 ώρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό. Ακολούθησε φυγοκέντρηση,

απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση της βακτηριακής βιομάζας σε 25 ml αποστειρωμένο ddH₂O που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 500 g εδάφους.

2.4. Μέθοδοι προσδιορισμού της ανάπτυξης εμβολίου

Ο έλεγχος της ανάπτυξης των βακτηρίων στο υπό επώαση εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο έγινε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, παρασκευή τρυβλίων, αλλά και με τις τεχνικές q-PCR και DAPI.

2.4.1. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Η οπτική πυκνότητα προσδιορίστηκε σε δείγμα 1 ml της καλλιέργειας σε φωτόμετρο υψηλής ευκρίνειας στα 600 nm. Γενικότερα παρατηρήθηκε αύξηση της οπτικής πυκνότητας μετά τις πρώτες 27 ώρες.

2.4.2. Καταμέτρηση του βακτηριακού πληθυσμού σε τριβλία

Η καταμέτρηση του βακτηριακού πληθυσμού πραγματοποιήθηκε με επίστρωση σε τριβλία θρεπτικού μέσου Luria-Bertani (LB). Για την επίστρωση στα τρυβλία παραλήφθηκε από κάθε κωνική φιάλη ποσότητα 1 ml και ακολούθως πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις από 10^{-1} ως 10^{-6} και έγινε τελικά εμβολιασμός των τριβλίων από τις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , με επίστρωση 100 μl. Για κάθε κωνική φιάλη παρασκευάστηκαν 3 τρυβλία. Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία επώαστηκαν στους 27°C για 3 ημέρες και έγινε καταμέτρηση των αποικιών και αναγωγή σε cfu/ml θρεπτικού μέσου.

2.4.3. Καταμέτρηση του βακτηριακού πληθυσμού με PCR πραγματικού χρόνου (q-PCR)

Ο βακτηριακός πληθυσμός, τόσο ο ολικός όσο και του βακτηρίου *Sphingomonas* sp. που αποτελεί το κύριο μέλος-αποδομητή του TBZ στο consortium, προσδιορίστηκαν με q-PCR. Έτσι στις 27, 40 και 50 ώρες συλλέχθηκαν 6 ml από κάθε κωνική φιάλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση και παραλαβή της βακτηριακής βιομάζας η οποία χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή DNA με το εμπορικό κίτ PureLink Genomic DNA (Invitrogen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή. Η ποιότητα του DNA που εκχυλίστηκε ελέγχθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1%, και ακολούθως προσδιορίστηκε με ακρίβεια η συγκέντρωση του DNA στα δείγματα με την χρήση φθορισμομέτρου Qubit ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρίας. Ακολούθως το DNA που παραλήφθηκε χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού και του πληθυσμού του βακτηρίου *Sphingomonas* sp. μέσω q-PCR σε σύστημα BIORAD.

Για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των ολικών βακτηρίων και του *Sphingomonas* sp. χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση ποσότητα 0.1 ngDNA (2 μl από δείγματα DNA συγκέντρωσης 0.05 ng/μl). Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 95°C για 3min, 35 κύκλοι με 95°C για 15sec και 62°C για 20sec και τέλος αποδιάταξη με βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας από 60-95°C, ανά 0,5°C και μέτρηση για 0,05sec σε κάθε μια από τις ενδιάμεσες θερμοκρασίες. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις q-PCR και οι συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2. Θα πρέπει να τονιστεί ότι το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αφθονίας του βακτηριακού στελέχους *Sphingomonas* είχαν σχεδιαστεί με βάση την αλληλουχία του 16SrRNA γονιδίου του συγκεκριμένου βακτηρίου και η εξειδίκευση τους είχε επιβεβαιωθεί στο πλαίσιο του διδακτορικού της Chiara Perruchon 2014. Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου 16SrRNA τόσο των ολικών βακτηρίων όσο και του *Sphingomonas* spp. σε όλα τα δείγματα κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς. Για την κατασκευή της καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης που περιείχαν ως ένθεμα το γονίδιο 16S rRNA. Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις 9.6×10^1 έως 9.6×10^8 αντίγραφα του γονιδίου 16S rRNA του *Sphingomonas* και 3.6×10^1 έως 3.6×10^8 αντίγραφα 16S rDNA ολικών βακτηρίων και χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις από κάθε αραιώση για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Πίνακας 2.2. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην q-PCR για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των ολικών βακτηρίων και του βακτηριακού στελέχους *Sphingomonas* sp.

Στόχος	Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
<i>Sphingomonas</i> spp.	SYBR FAST	5
	Colc f (20 pmol/μl)	0,1
	Colc R (20 pmol/μl)	0,1
	ddH ₂ O	3,8
Total bacteria	SYBR FAST	5
	Eub 338(20 pmol/μl)	0,1
	Eub 518 (20 pmol/μl)	0,1
	ddH ₂ O	3,8

2.4.4. Καταμέτρηση του βακτηριακού πληθυσμού με την μέθοδο DAPI

Για την καταμέτρηση του συνόλου των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε συμπληρωματικά η μέθοδος DAPI. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής 4',6 - diamidino - 2 - phenylindole, η οποία έχει την ιδιότητα να προσδέεται και να σημαίνει το βακτηριακό DNA και χρησιμοποιείται ειδικά στον ποιοτικό ή ποσοτικό

προσδιορισμό των βακτηριακών κυττάρων σε υγρές καλλιέργειες σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται από τους Sherr and Sherr (1993) και Sherr et al. (1993). Έτσι, από κάθε κωνική φιάλη, συλλέχθηκαν δείγματα όγκου 8 ml στις 27, 40 και 50 ώρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωλήνες falcon (15ml) με προσθήκη 0,433 ml 1 φορμαλδεΰδης 37%, ώστε η τελική συγκέντρωση φορμαλδεΰδης στο διάλυμα να είναι περίπου 2% και κατόπιν τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 4°C μέχρι την τελική καταμέτρηση των βακτηριακών κυττάρων. Στην συνέχεια εφαρμόστηκε η προαναφερθείσα μέθοδος με χρήση του πρωτόκολλου των Kerrison and Steinke (2010) και καταμετρήθηκε ο βακτηριακός πληθυσμός στις διαφορετικές μεταχειρίσεις.

2.5. Προσδιορισμός των υπολειμμάτων του TBZ

2.5.1. Μέθοδος εκχύλισης TBZ από υδατικά διαλύματα

Η εκχύλιση του μυκητοκτόνου TBZ από υδατικά διαλύματα πραγματοποιήθηκε με χρήση οργανικού διαλύτη μεθανόλης. Έτσι 1 ml από τα θρεπτικά μέσα που περιείχαν TBZ αναμίχθηκαν με 2 ml μεθανόλης. Το μίγμα αναμίχθηκε σε vortex για διάστημα 30 min και στην συνέχεια ακολούθησε έκχυση σε σύστημα HPLC-PDA. Δοκιμές ανάκτησης για την συγκεκριμένη μέθοδο σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (0.1, 1 και 10 mg/l) έδειξαν επίπεδα ανάκτηση πάντοτε > 85%.

2.5.2. Μέθοδος εκχύλισης TBZ από το έδαφος

Η εκχύλιση του TBZ από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παρακάτω μέθοδο: 5g εδάφους μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 100ml και προστέθηκε 10ml μεθανόλης. Ακολούθησε ανάδευση για μία ώρα σε οριζόντιο αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ανάδευση το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε για 5min στις 7500 στροφές/min και το υπερκείμενο που προέκυψε μετά την φυγοκέντριση συλλέχθηκε. Στη συνέχεια στο δείγμα του εδάφους που έμεινε μέσα στην κωνική φιάλη ,πραγματοποιήθηκε ακόμη μία εκχύλιση με την ίδια ποσότητα μεθανόλης και εφαρμόστηκε ξανά η παραπάνω διαδικασία. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε συνένωση των δύο υπερκείμενων που συλλέχθηκαν (συνολικός όγκος 20ml περίπου) σε φιάλη των 50 ml. Ο όγκος που συλλέχθηκε διηθήθηκε με την χρήση οξυανθεκτικού φίλτρου σύριγγας και ακολούθως αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC-PDA όπως περιγράφεται παρακάτω. Σε αρκετές περιπτώσεις τα τελικά εκχυλίσματα αραιώθηκαν 1:10 ως 1:1000 καθώς περιείχαν ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις TBZ που ήταν εκτός των όριων γραμμικότητας της καμπύλης αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του TBZ. Δοκιμές ανάκτησης για την συγκεκριμένη μέθοδο σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (0.1, 1 και 10 mg/kg) έδειξαν επίπεδα ανάκτησης πάντοτε > 85%.

2.5.3. Μέθοδος ανάλυσης των υπολειμμάτων του TBZ

Για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του TBZ χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) Shimadzu Lc-20AD με ανιχνευτή φωτοδιόδων και αυτόματο δειγματολήπτη. Για το διαχωρισμό του TBZ χρησιμοποιήθηκε στήλη RP-C18 Shimadzu CTO-10ASVP (250 mm) με κινητή φάση ακετονιτρίλιο :νερό :αμμωνία (39:60.5:0.5% κ.ο.) και ροή 1 ml/min. Η ανίχνευση του TBZ πραγματοποιήθηκε στα 298nm. Υπό αυτές τις συνθήκες ο χρόνος κατακράτησης του TBZ ήταν 3.7 min. Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του TBZ στα δείγματα εδάφους χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς του TBZ σε μεθανόλη με συγκεντρώσεις 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05 mg/L

2.6. Περιγραφή Πειράματος

Για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του βιολογικού εμπλουτισμού ως μέθοδος αποκατάστασης εδαφών ρυπασμένων με το μυκητοκτόνο TBZ πραγματοποιήθηκε πείραμα μικροκόσμων με το έδαφος από την Κύπρο που παρουσίαζε φυσική ρύπανση και έδαφος από την Θήβα. Το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του βιολογικού εμπλουτισμού και σε έδαφος παρόμοιο με το φυσικά ρυπασμένο έδαφος της Κύπρου το οποίο όμως εμφάνιζε τεχνητή ρύπανση TBZ ύστερα από εργαστηριακές εφαρμογές του μυκητοκτόνου. Η υπόθεση μας ήταν ότι στο τεχνητά ρυπασμένο έδαφος (Θήβα) το TBZ θα είναι πιο βιοδιαθέσιμο λόγω της πρόσφατης εργαστηριακής εφαρμογής του και άρα πιο εύκολα αποδομήσιμο από το μικροβιακό εμβόλιο σε σχέση με το φυσικά ρυπασμένο έδαφος (Κύπρος) όπου λόγω της χρόνιας απόθεσης TBZ έχει επέλθει μια παλαιώση των υπολειμμάτων του TBZ και κατά συνέπεια θα παρουσιάζει μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1, το έδαφος από την Θήβα παρουσίαζε παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά με το έδαφος από την Κύπρο αλλά όχι παρόμοια αυτόχθονη μικροβιακή κοινότητα. Για να καταστήσουμε πλήρως συγκρίσιμα τα δύο εδάφη το έδαφος από την Θήβα (4kg) αποστειρώθηκε σε ξηραντήρα με χλωροφόρμιο (7 ημέρες, 30°C) και ακολούθως εμβολιάστηκε με 5% (κ.β.) από το φυσικά ρυπασμένο έδαφος της Κύπρου. Το έδαφος από την Θήβα ακολούθως επωάστηκε για 2 εβδομάδες στους 25°C ώστε να αποικιστεί από την μικροβιακή κοινότητα του εδάφους από την Κύπρο. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της κατεργασίας ήταν να έχουμε ένα έδαφος με παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και παρόμοια μικροβιακή κοινότητα με το έδαφος από το φυσικά ρυπασμένο έδαφος από την Κύπρο το οποίο όμως δεν παρουσίαζε φυσική ρύπανση με το TBZ. Ακολούθως το έδαφος από την Θήβα διαχωρίστηκε σε 4 υπο-δείγματα (1 kg) τα οποία δέχτηκαν εφαρμογή υδατικού διαλύματος TBZ που παρασκευάστηκε από το εμπορικό σκεύασμα HyKeep® (30% TBZ) με στόχο να έχουμε τελικές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου στο έδαφος ανάλογες με αυτές που μετρήθηκαν στο φυσικά ρυπασμένο έδαφος από την Κύπρο,

12000, 400, 250 και 12 $\mu\text{g/g}$. Έτσι με την ολοκλήρωση των παραπάνω προκατεργασιών καταλήξαμε να έχουμε τις παρακάτω μεταχειρίσεις:

- Φυσικά ρυπασμένο έδαφος με TBZ 12000 $\mu\text{g/g}$
- Φυσικά ρυπασμένο έδαφος με TBZ 400 $\mu\text{g/g}$
- Φυσικά ρυπασμένο έδαφος με TBZ 250 $\mu\text{g/g}$
- Φυσικά ρυπασμένο έδαφος με TBZ 12 $\mu\text{g/g}$
- Τεχνητά ρυπασμένο έδαφος με TBZ 12000 $\mu\text{g/g}$
- Τεχνητά ρυπασμένο έδαφος με TBZ 400 $\mu\text{g/g}$
- Τεχνητά ρυπασμένο έδαφος με TBZ 250 $\mu\text{g/g}$
- Τεχνητά ρυπασμένο έδαφος με TBZ 12 $\mu\text{g/g}$

Καθένα από τα παραπάνω δείγματα διαχωρίστηκε σε δύο υπο-δείγματα των 500 g. Στο πρώτο σετ δειγμάτων εφαρμόστηκαν 25ml βακτηριακού εμβολίου, όπως έχει ήδη περιγραφεί, ώστε να έχουμε πυκνότητα εμβολίου στο έδαφος ίση με 6.5×10^6 κύτταρα *Sphingomonas*/ γεδάφους (ξ.β.). Το δεύτερο σετ δειγμάτων έλαβε την ίδια ποσότητα νερού χωρίς βακτηριακά κύτταρα ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα της ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας των εδαφών να αποδομεί το TBZ χωρίς βιολογικό εμπλουτισμό. Αμέσως μετά την εφαρμογή του εμβολίου / νερού τα δείγματα εδάφους αναμίχθηκαν προσεκτικά με το χέρι και η υγρασία των δειγμάτων προσαρμόστηκε στο 40% της υδατοχωρητικότητας. Καθένα από τα παραπάνω δείγματα διαχωρίστηκε στην συνέχεια σε 3 υποδείγματα των 170 g. Αμέσως μετά τον εμβολιασμό και στις 4, 7, 14, 28, 42, 56, 70 ημέρες 10 g συλλέχθηκαν από κάθε υπο-δείγμα και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του TBZ σε σύστημα HPLC-PDA όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω.

2.7. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα αποδόμησης του TBZ στα διάφορα εδάφη χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των DT50 και DT90 χρησιμοποιώντας το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης.

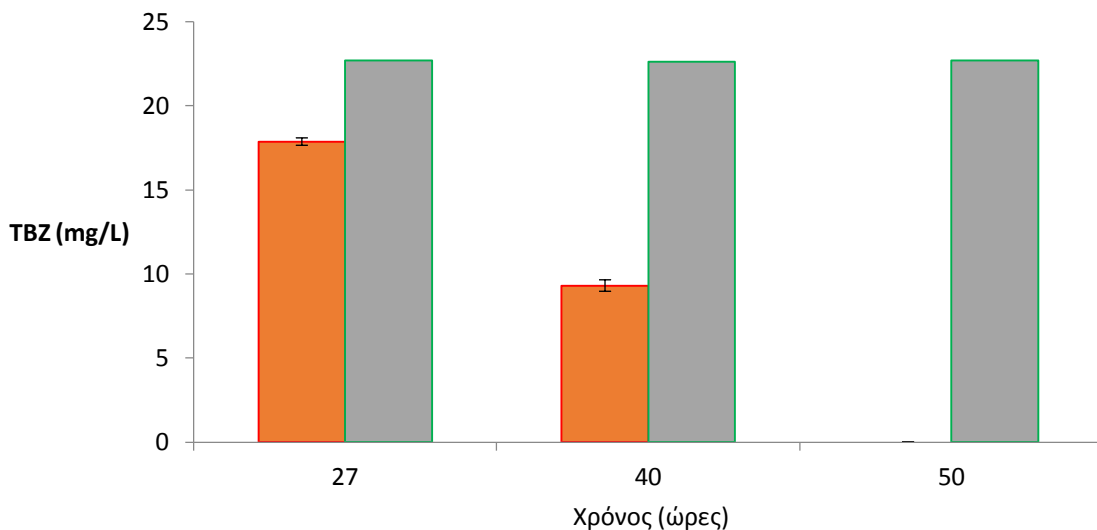
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

Αποτελέσματα

3.1. Προετοιμασία μικροβιακού εμβολίου - μετρήσεις

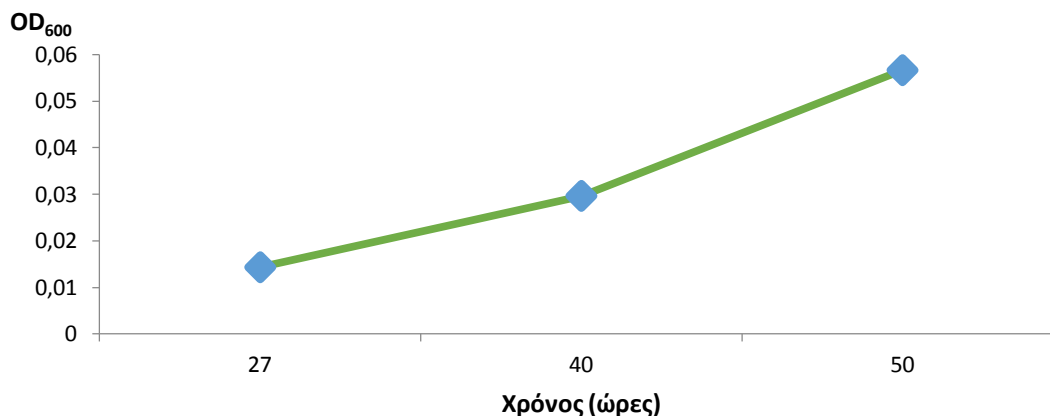
Για τον εμβολιασμό των εδαφών με εμβόλιο γνωστής μικροβιακής πυκνότητας σε ολικά βακτήρια αλλά και του στελέχους *Sphingomonas* που φαίνεται ότι είναι το κύριο μέλος της βακτηριακής κοινότητας που αποδομεί το TBZ, προετοιμάστηκαν καλλιέργειες της βακτηριακής κοινότητας σε MSMN+TBZ και προσδιορίστηκε η αποδόμηση του TBZ αλλά κυρίως η ανάπτυξη των βακτηρίων με διαφορετικές προσεγγίσεις όπως OD600, καταμέτρηση σε τριβλιά, q-PCR και DAPI.

Η πορεία αποδόμησης του TBZ παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.1. Η βακτηριακή κοινότητα αποδόμησε το TBZ κατά 20, 60 και 100% στις 27, 40 και 50 ώρες αντίστοιχα ενώ δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη αποδόμηση του TBZ στον αβιοτικό μάρτυρα.



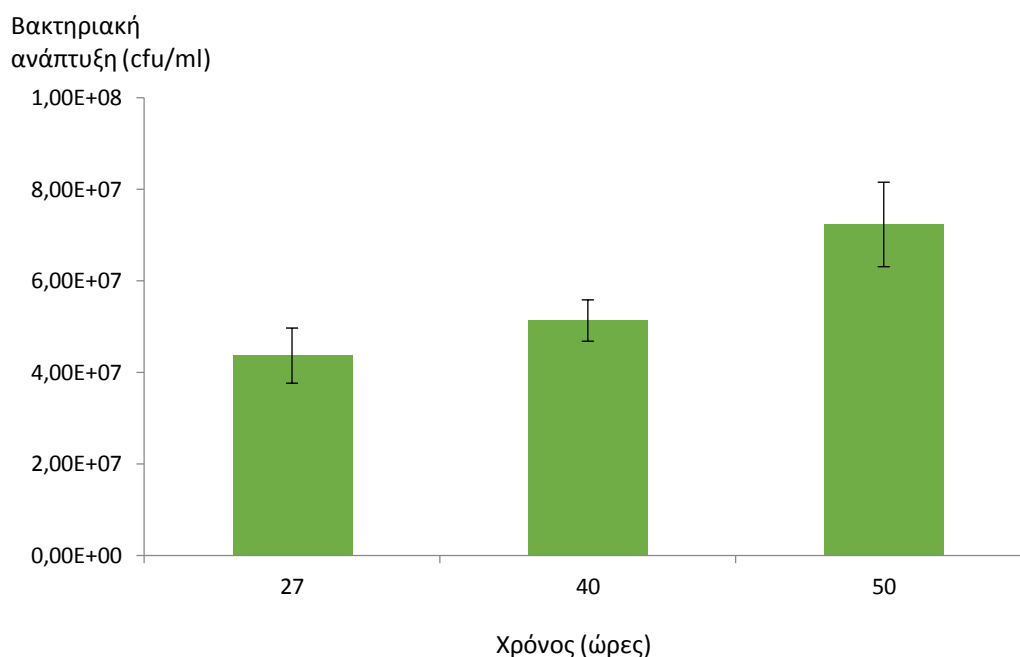
Διάγραμμα 3.1. Η αποδόμηση του TBZ από την βακτηριακή κοινότητα (πορτοκαλί ράβδοι) σε θρεπτικό μέσο MSMN + TBZ καθώς και στον μη εμβολιασμένο μάρτυρα (γκρι ράβδοι).

Η ανάπτυξη των βακτηρίων όπως προσδιορίστηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.2. Γενικότερα παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της βακτηριακής ανάπτυξης με την πάροδο του χρόνου με μέγιστη τιμή OD600 0.06 στις 50 ώρες οπότε και είχε ολοκληρωθεί η αποδόμηση του TBZ (Διάγραμμα 3.1).



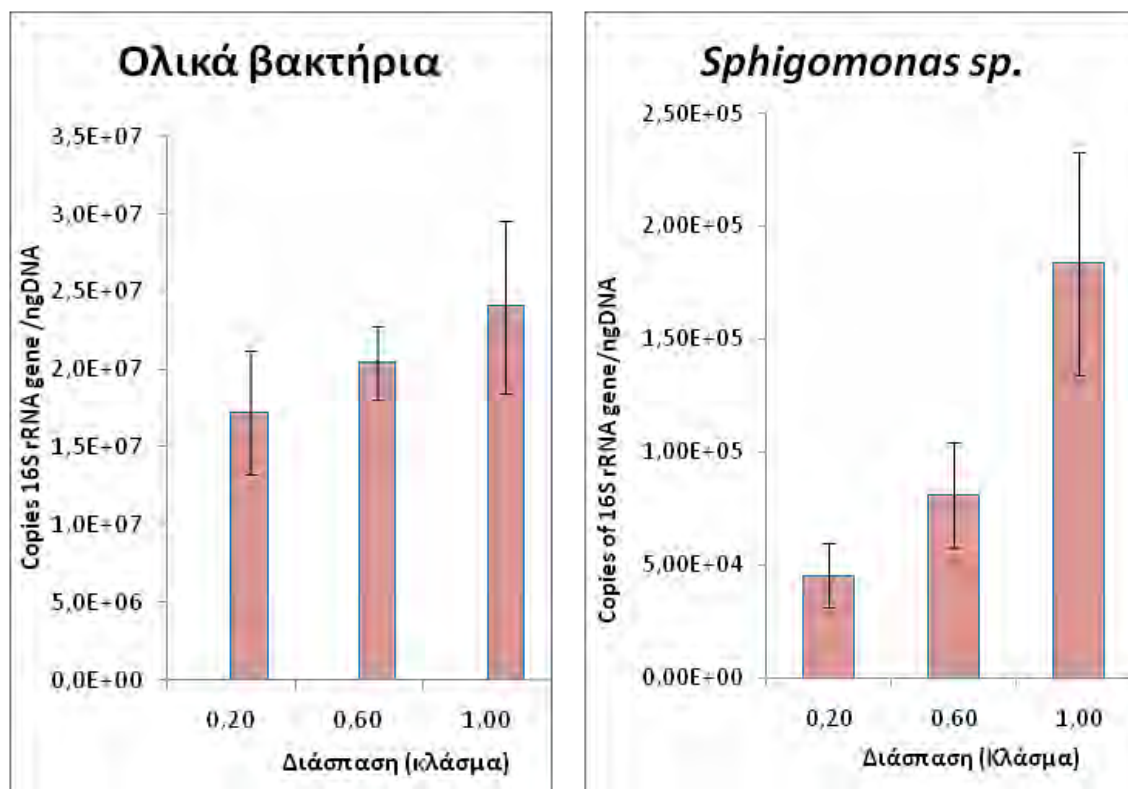
Διάγραμμα 3.2. Η αύξηση της βακτηριακής κοινότητας που διασπά το TBZ σε θρεπτικό μέσο MSMN + TBZ κατά την πορεία αποδόμησης του TBZ όπως προσδιορίστηκε με μέτρησης της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm (OD600).

Η αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού στο θρεπτικό μέσο MSMN+TBZ κατά την πορεία αποδόμησης του TBZ προσδιορίστηκε και με επίστρωση σε τριβλία LB. Και με αυτή την μέθοδο παρατηρήθηκε μια σταδιακή αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού με την πάροδο του χρόνου και όσο προχωρούσε η αποδόμηση του TBZ με τις μέγιστες τιμές να παρατηρούνται στις 50 ώρες που συμπίπτει με την ολοκλήρωση της αποδόμησης του μυκητοκτόνου (Διάγραμμα 3.3).



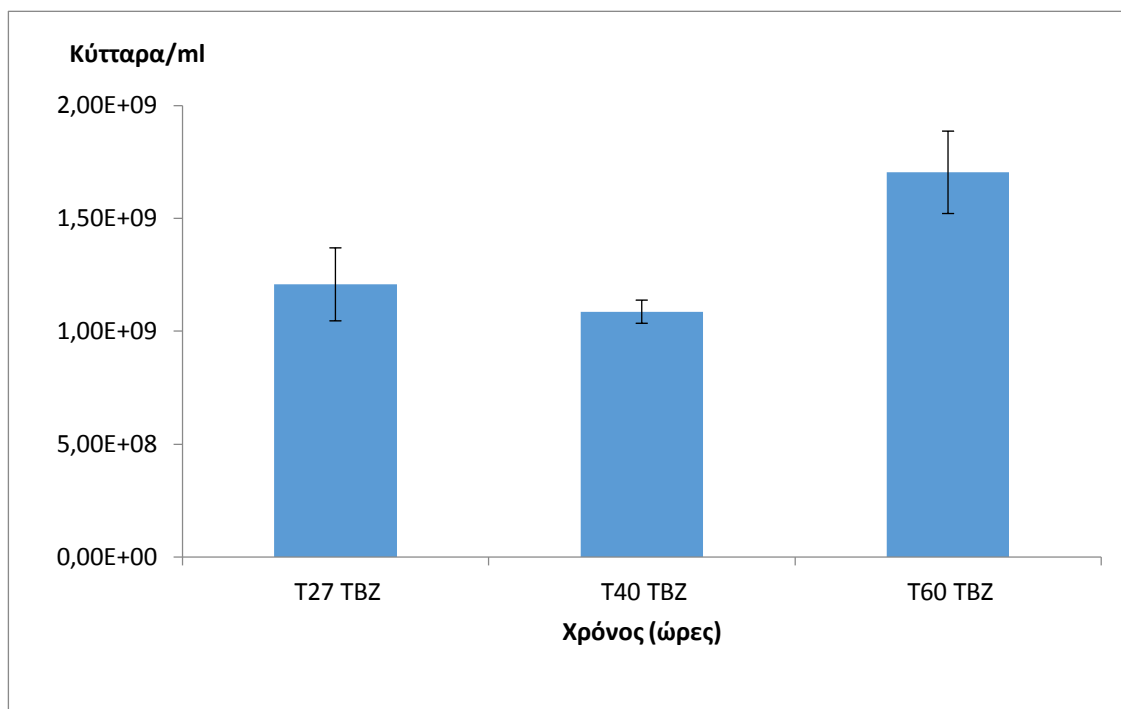
Διάγραμμα 3.3. Η αύξηση της βακτηριακής κοινότητας που διασπά το TBZ σε θρεπτικό μέσο MSMN + TBZ κατά την πορεία αποδόμησης του TBZ όπως προσδιορίστηκε με καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν ύστερα από επίστρωση σε τριβλία LB.

Η πορεία ανάπτυξης των ολικών βακτηρίων καθώς και του στελέχους *Sphingomonas* sp. όπως προσδιορίστηκε με q-PCR παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.4. Γενικότερα παρατηρήθηκε μια σταδιακή αύξηση του πληθυσμού των ολικών βακτηρίων με τον χρόνο. Αντίστοιχα παρατηρήθηκε μια αύξηση του πληθυσμού του στελέχους *Sphingomonas* η οποία ήταν ιδιαίτερα σημαντική μεταξύ 40 και 50 ωρών που αποτέλεσε και το σημείο μέγιστης αποδόμησης του TBZ (Διάγραμμα 3.4).



Διάγραμμα 3.4. Η αύξηση της βακτηριακής κοινότητας που διασπά το TBZ σε θρεπτικό μέσο MSMN + TBZ κατά την πορεία αποδόμησης του TBZ όπως προσδιορίστηκε με q-PCR για την ολική βακτηριακή κοινότητα και για το στέλεχος *Sphingomonas*.

Επιπλέον, ακολουθώντας την μέθοδο DAPI προσδιορίστηκε με υψηλή ακρίβεια ο αριθμός των ζωντανών βακτηριακών κυττάρων κατά την πορεία αποδόμησης του TBZ σε θρεπτικό μέσο MSMN+TBZ. Γενικότερα δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων ως τις 40 ώρες ενώ σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στον αριθμό των βακτηριακών κυττάρων στις 50 ώρες που συμπίπτει με την ολοκλήρωση της αποδόμησης του TBZ και με την φάση ταχείας αποδόμησης του μυκητοκτόνου (Διάγραμμα 3.5).

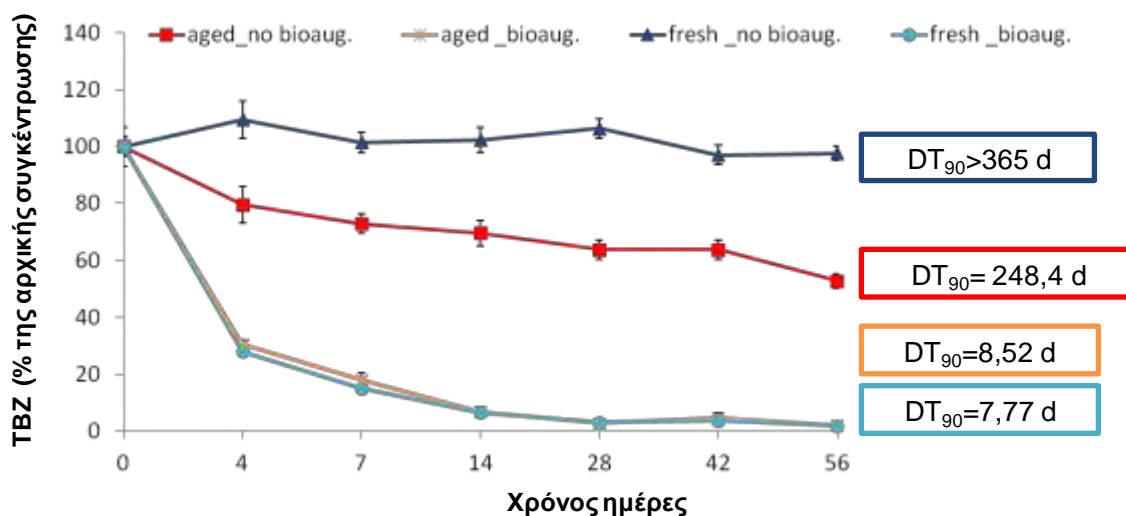


Διάγραμμα 3.5. Η συγκέντρωση των ολικών ζωντανών βακτηριακών κυττάρων (cells/ml) στο θρεπτικό μέσο MSMN + TBZ κατά την πορεία αποδόμησης του TBZ όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DAPI.

3.2. Η αποδόμηση του TBZ στα εδάφη ύστερα από βιολογικό εμπλουτισμό

Στα Διαγράμματα 3.6 ως 3.9 παρουσιάζεται η αποδόμηση του TBZ στα φυσικά και τεχνητά ρυπασμένα εδάφη ύστερα από εφαρμογή ή όχι βιολογικού εμπλουτισμού. Έτσι στα δείγματα εδάφους που παρουσίαζαν επίπεδα ρύπανσης 12 mg/kg TBZ παρατηρήθηκε ότι ο βιολογικός εμπλουτισμός τόσο του φυσικά όσο και του τεχνητά ρυπασμένου εδάφους οδήγησε σε σημαντική επιτάχυνση της αποδόμησης του TBZ (DT90 7.8-8.5 ημέρες) σε σύγκριση με την περιορισμένη αποδόμηση του μυκητοκτόνου στα μη εμπλουτισμένα δείγματα (DT90 = 248 ως και >365 ημέρες) (Διάγραμμα 3.6).

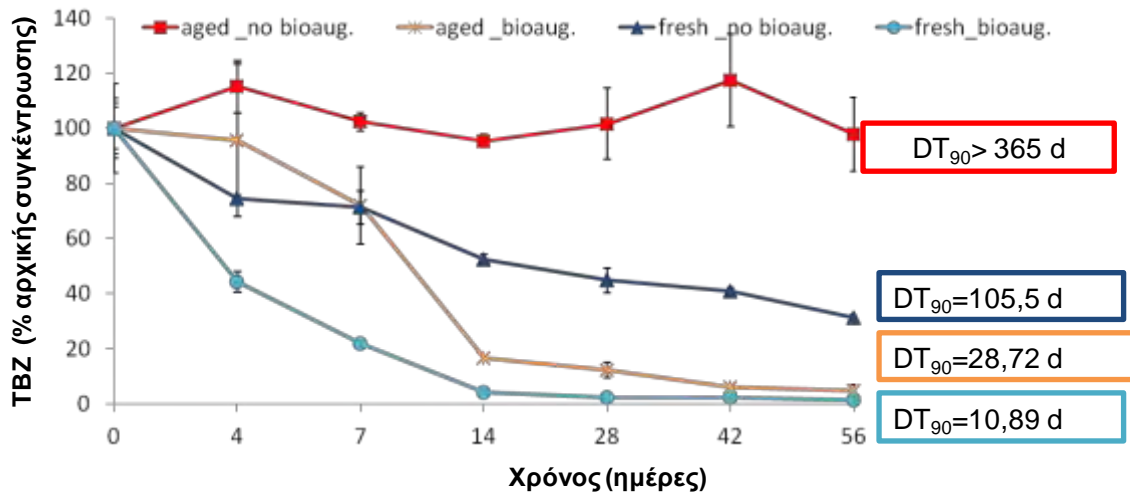
Επίπεδο Ρύπανσης: 12 mg/Kg ξ.β.



Διάγραμμα 3.6. Η αποδόμηση του TBZ σε εδάφη φυσικά (aged) ή τεχνητά (fresh) ρυπασμένα με το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο (12 mg/kg) στα οποία εφαρμόστηκε (bioaug) ή όχι (no bioaug) βιολογικός εμπλουτισμός με κοινότητα βακτηρίων που αποδομεί το TBZ *in vitro*. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση. Στο δεξί άκρο του διαγράμματος παρουσιάζονται και οι τιμές DT90 όπως υπολογίστηκαν εφαρμόζοντας το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης στα δεδομένα αποδόμησης.

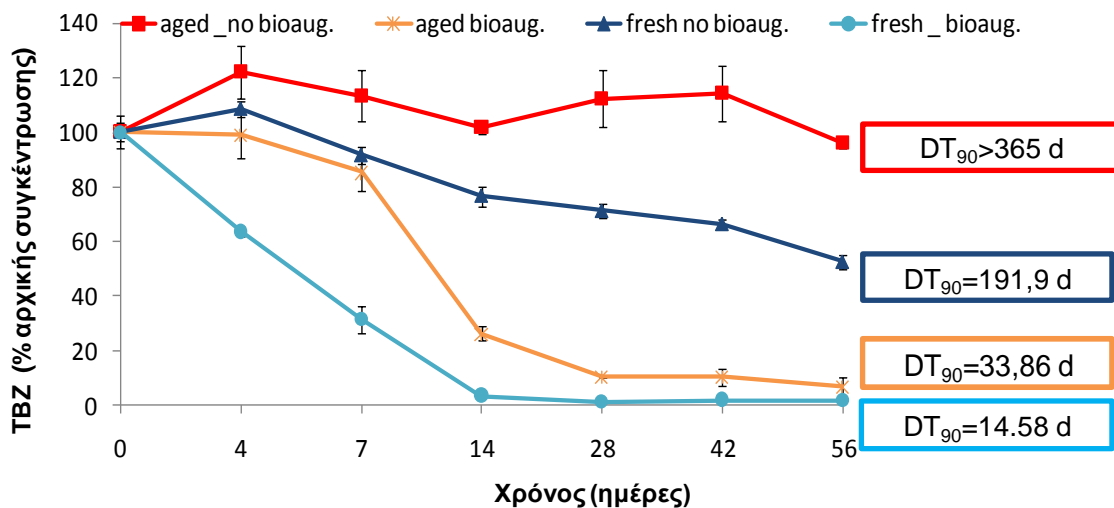
Στα εδάφη με επίπεδο ρύπανσης 250 mg/kg, επίσης παρατηρήθηκε σημαντική επιτάχυνση της αποδόμησης του TBZ ύστερα από βιολογικό εμπλουτισμό τόσο των τεχνητά όσο και στα φυσικά ρυπασμένων δειγμάτων με τα πρώτα να εμφανίζουν παρόλα αυτά συγκριτικά ταχύτερη αποδόμηση του TBZ (DT90 = 10.9 ημέρες) σε σχέση με τα τελευταία (DT90 = 28.7 ημέρες). Από την άλλη μεριά στα δείγματα που δεν εμβολιάστηκαν με την βακτηριακή κοινότητα δεν παρατηρήθηκε καμία αποδόμηση του TBZ (φυσικά ρυπασμένο έδαφος, DT90 > 365 ημέρες) ή παρατηρήθηκε βραδεία αποδόμηση όπως στο τεχνητά ρυπασμένο έδαφος (DT90 = 105.5 ημέρες) (Διάγραμμα 3.7). Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στα εδάφη με επίπεδο ρύπανσης 400 mg/kg όπου ο βιολογικός εμπλουτισμός των τεχνητά ρυπασμένων εδαφών οδήγησε σε ταχύτατη αποδόμηση του TBZ (DT90 = 14.6 ημέρες) ακολουθούμενο από το αντίστοιχα φυσικά ρυπασμένο έδαφος που είχε υποστεί βιοεμπλουτισμό όπου παρατηρήθηκε βραδύτερη αλλά επιτυχής και πλήρης αποδόμηση του TBZ (DT90 = 33.9 ημέρες) (Διάγραμμα 3.8). Από την άλλη μεριά, παρατηρήθηκε μια βραδεία αποδόμηση του TBZ στο μη βιοεμπλουτισμένο τεχνητά ρυπασμένο έδαφος (DT90 = 191.9 ημέρες) ενώ και πάλι η αποδόμηση του TBZ στο φυσικά ρυπασμένο μη βιοεμπλουτισμένο έδαφος ήταν πολύ περιορισμένη (DT90 > 365 ημέρες).

Επίπεδο ρύπανσης: 250 mg/Kg ξ.β.



Διάγραμμα 3.7. Η αποδόμηση του TBZ σε εδάφη φυσικά (aged) ή τεχνητά (fresh) ρυπασμένα με το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο (250 mg/kg) στα οποία εφαρμόστηκε (bioaug) ή όχι (no bioaug) βιολογικός εμπλουτισμός με κοινότητα βακτηρίων που αποδομεί το TBZ invitro. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση. Στο δεξί άκρο του διαγράμματος παρουσιάζονται και οι τιμές DT₉₀ όπως υπολογίστηκαν εφαρμόζοντας το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης στα δεδομένα αποδόμησης.

Επίπεδο ρύπανσης: 400 mg/Kg ξ.β.

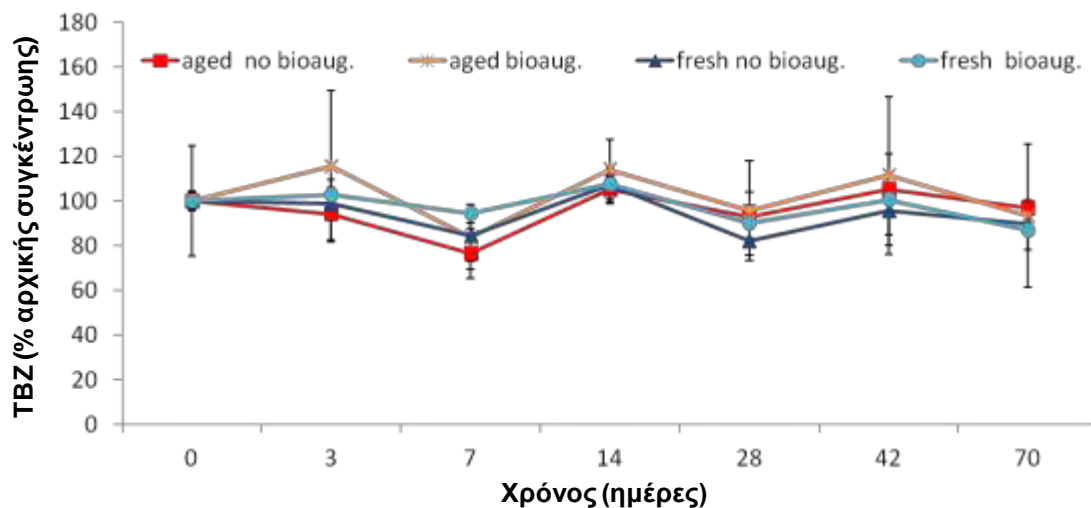


Διάγραμμα 3.8. Η αποδόμηση του TBZ σε εδάφη φυσικά (aged) ή τεχνητά (fresh) ρυπασμένα με το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο (400 mg/kg) στα οποία εφαρμόστηκε (bioaug) ή όχι (no bioaug) βιολογικός εμπλουτισμός με κοινότητα βακτηρίων που αποδομεί το TBZ in vitro. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση. Στο δεξί άκρο του διαγράμματος παρουσιάζονται και οι τιμές DT₉₀ όπως υπολογίστηκαν εφαρμόζοντας το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης στα δεδομένα αποδόμησης.

Τέλος στο έδαφος με το υψηλότερο επίπεδο ρύπανσης, 12000 mg/kg, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση του TBZ σε καμία από τις μεταχειρίσεις,

βιοεμπλουτισμένες ή μη, καταδεικνύοντας την αποτυχία του μικροβιακού εμβολίου να απομακρύνει τόσο υψηλές συγκεντρώσεις TBZ ακόμη και όταν αυτές είναι βιοδιαθέσιμες (Διάγραμμα 3.4.).

Επίπεδο ρύπανσης: 12000 mg/Kg ξ.β.



Διάγραμμα 3.9. Η αποδόμηση του TBZ σε εδάφη φυσικά (aged) ή τεχνητά (fresh) ρυπασμένα με το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο (12000 mg/kg) στα οποία εφαρμόστηκε (bioaug) ή όχι (no bioaug) βιολογικός εμπλουτισμός με κοινότητα βακτηρίων που αποδομεί το TBZ *in vitro*. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Συζήτηση

Η εφαρμογές γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων οδηγεί στην παραγωγή μεγάλου όγκου υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων όπως το TBZ και τα οποία σύμφωνα με την κείμενη Ευρωπαϊκή νομοθεσία θα πρέπει να υποστούν επεξεργασία και αποτοξικοποίηση onsite (EC 2010). Η παντελής έλλειψη αποτελεσματικών μεθόδων για την αποτοξικοποίηση των συγκεκριμένων αποβλήτων αλλά και το αυξημένο κόστος των διαθέσιμων μεθόδων (Control TecEco® και παραλαβή και επεξεργασία από εξειδικευμένες εταιρείες) ωθεί τα συσκευαστήρια φρούτων στην απόρριψη των συγκεκριμένων αποβλήτων σε παρακείμενους αγρούς με αποτέλεσμα την δημιουργία περιοχών με συσσωρευμένες υψηλές συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων μυκητοκτόνων και ιδιαίτερα του TBZ που παρουσιάζει υψηλή εμμονή στο εδαφικό περιβάλλον (Omirou et al. 2012; Karas et al. 2015). Βασισόμενη στα παραπάνω στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την πιθανότητα εφαρμογή βιολογικού εμπλουτισμού για την αποκατάσταση ενός φυσικά ρυπασμένου εδάφους που συλλέχθηκε από περιοχή της Κύπρου και παρουσίαζε διαβάθμιση στα επίπεδα ρύπανσης με TBZ. Παράλληλα μελετήθηκε και η αποτελεσματικότητα του βιολογικού εμπλουτισμού σε αντίστοιχο έδαφος, με παρόμοια μικροβιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, το οποίο επιφορτίστηκε τεχνητά με αντίστοιχες συγκεντρώσεις TBZ.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων προέκυψε ότι επίπεδα εμβολίου ίσα με 6.5×10^6 κατάφερε να απομακρύνει με επιτυχία ως και 400 mg/kg TBZ τόσο από τα τεχνητά ρυπασμένα όσο και από τα φυσικά ρυπασμένα εδάφη. Αντίθετα τα βακτήρια δεν κατάφεραν να αποδομήσουν το TBZ όταν εμβολιάστηκαν στο έδαφος με το υψηλότερο επίπεδο TBZ που ήταν 12000 mg/kg. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο βιολογικός εμπλουτισμός για την αποκατάσταση εδαφών από περιοχές απόρριψης αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων αποτελεί μια αποτελεσματική λύση εφόσον υπάρχει μικροβιακό εμβόλιο που μπορεί να αποδομήσει αποτελεσματικά το μυκητοκτόνο, όπως στην περίπτωση μας αλλά και εφόσον τα επίπεδα του TBZ στο έδαφος δεν είναι υπερβολικά υψηλά (12000 mg/kg). Αυτή είναι και η πρώτη μελέτη αξιολόγησης του βιολογικού εμπλουτισμού ως μέθοδος αποκατάστασης εδαφών ρυπασμένων με το μυκητοκτόνο TBZ. Προηγούμενες μελέτες σε εδάφη ρυπασμένα με άλλους οργανικούς ρύπους και γεωργικά φάρμακα όπως 2,4,6-trichlorophenol (Andreoni et al., 1998), p-nitrophenol (Labana et al., 2005) atrazine (Silva et al., 2004) έδειξαν ότι βιολογικός εμπλουτισμός με βακτήρια όπως *Alcaligenes eutrophus*, *Arthrobacter* sp., και *Pseudomonas* sp. αντίστοιχα οδήγησαν σε επιτυχή μείωση του φορτίου των ρύπων.

Η αποτυχία του μικροβιακού εμβολίου να αποδομήσει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις TBZ στο έδαφος πιθανότατα οφείλεται στην τοξική δράση αυτών των επιπέδων του

TBZ στο μικροβιακό εμβόλιο και γενικότερα στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Προηγούμενες μελέτες από την Papadopoulou et al. (2016) έδειξαν ότι το TBZ σε συγκέντρωση 50 mg/kg δεν εμφάνισε τοξική επίδραση στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους αλλά αντίστοιχα πειράματα σε υψηλότερα επίπεδα TBZ δεν πραγματοποιήθηκαν.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι το μικροβιακό εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε επέτυχε να αποδομήσει 250 και 400 mg/kg TBZ σε φυσικά ρυπασμένο έδαφος με σχετικά βραδύτερους ρυθμούς συγκριτικά με την αποδόμηση του TBZ στα ίδια επίπεδα σε έδαφος τεχνητά ρυπασμένο. Η βραδύτερη αποδόμηση του TBZ στο φυσικά ρυπασμένο έδαφος πιθανότατα οφείλεται στην μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του μυκητοκτόνου στα συγκεκριμένα εδάφη λόγω της μακροχρόνιας παραμονής τους στο έδαφος. Αντίθετα στα τεχνητά ρυπασμένα εδάφη μεγαλύτερη ποσότητα TBZ θα ήταν διαθέσιμη προς αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς που προστέθηκαν στο έδαφος. Προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει ότι το φαινόμενο της 'παλαιώσης' (aging) αποτελεί σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την υπολειμματικότητα των γεωργικών φαρμάκων και ιδιαίτερα των έμμονων που παραμένουν στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα (Hatzinger and Alexander 1995, Alexander 2000).

Γενικότερα τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι ο βιολογικός εμπλουτισμός αποτελεί μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο για την αποκατάσταση εδαφών από σημεία απόρριψης υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων. Έτσι το βακτηριακό εμβόλιο που έχει απομονωθεί από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος έχει την προοπτική να χρησιμοποιηθεί για την αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών που έχουν εντοπιστεί σε περιοχές της Ελλάδας με έντονη παρουσία συσκευαστηρίων μηλοειδών (Αγιά, Τύρναβος, Πήλιο) και εσπεριδοειδών (Πελοπόννησος, Κρήτη) καθώς και σε περιοχές της Κύπρου. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην βελτιστοποίηση των μεθόδων εμβολιασμού και στην τυποποίηση του εμβολίου ώστε να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητά του.

Βιβλιογραφία

Adaskaveg J. E., Kanetis L., Soto-Estrada A., Förster H., (2004). "A new era of postharvest decay control in citrus with the simultaneous introduction of three new "reduced-risk" fungicides". *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 3: 999-1004.

Aksu Z., 2005. "Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review". *Process Biochem.*, 40: 997-1026.

Alexander M (2000) Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. *Environmental Science and Technology* 34: 4259-4265

Al Hattab M. T., Ghaly A. E, (2012). "Disposal and treatment methods for pesticide containing wastewaters: critical review and comparative analysis". *J. Environ. Prot.*, 3: 431-453

Allen, P.M., Gottlieb, D. (1970). *Mechanism of action of the fungicide thiabendazole, 2-(4'-thiazolyl) bendimidazole*. *Appl Microbiol*20: 919-926.

AndreoniV., BaggiG, Colombo M., CavalcaL., Zangrossi M. and Bernasconi S., (1998). *Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by a specialized organism and by indigenous soil microflora: bioaugmentation and self-remediability for soil restoration*, *Letters in Applied Microbiology*, 27, 86-92

Balest L., Mascolo G., Di Iaconi C., Lopez A., (2008). "Removal of endocrine disrupter compounds from municipal wastewater by an innovative biological technology", *Water Sci. Technol.*, 58 (4): 953-956.

Baur P., Schonherr J., (1995). "Temperature dependence of the diffusion of organic compounds across plant cuticles". *Chemosphere*, 30: 1331-1340

Blanco A. M., Masini G., Petracci N., Bandoni J. A, (2005) .*"Operations management of a packaging plant in the fruit industry"*, *J. Food Eng.*, 70: 299-307.

Campo J., Masia A., Blasco C., Pico Y., (2013).*"Occurrence and removal efficiency of pesticides in sewage treatment plants of four Mediterranean River Basins"*, *J. Hazard. Mater*, 263 Pt1: 146-157.

Cannavan A., Haggan A.S. and Kennedy D.G. (1998). Simultaneous determination of thiabendazole and its major metabolite, 5-hydroxythiabendazole, in bovine tissues using gradient liquid chromatography with thermospray and atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 718, 103-113.

Castillo L. E., Ruepert C., Solis F., (2000). "Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the North Atlantic Zone of Costa Rica", *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 1942-1950.

Castillo M. D. P., Torstensson L., Stenström J., (2008). "Biobeds for environmental protection from pesticide use: A review". *J. Agric. Food Chem.*, 56: 6206-6219.

Coates L., Johnson G., (1997). "Postharvest disease of fruit and vegetables". In: *plant pathogens and plant diseases*, Brown J. F., Ogle H. J. eds., Rockvale Publications, Armidale, Australia. Chapter 33, pp. 533-547.

Coulet M., Eeckhoutte C., Larrieu G. et al., (1998). "Comparative metabolism of thiabendazole in cultured hepatocytes from rats, rabbits, calves, pigs, and sheep, including the formation of protein-bound residues." *J. Agric. Food Chem.*, 46, 742-748.

Cunningham S. D., Anderson T. A., Schwab P. A., Hsu F. C., (1996). "Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants", *Adv. Agron.*, 56: 55-114.

Danaher M, De Ruyckb, Z., Crooks, S.R.H., Dowling, G., O'Keeffe, M. (2007). *Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices*, *Journal of Chromatography B* **845**: 1–37.

Davidse, L.C., Flach, W. (1978) *Interaction of thiabendazole with fungal tubulin*, *Biochimica et Biophysica Acta* **543**: 82-90.

Diez M. C., (2010). "Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants", *J. Soil. Sci. Plant. Nutr.*, 10 (3): 244-267.

El Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Droby, S., Smilanick, J.L., Korsten, L. (2002). *Biological control of postharvest diseases of citrus fruits*. In: *Gnanamanickam SS (ed) Biological Control of Crop Diseases*, University of Madras-Guindy Chennai, Tamil Nadu, India, pp 291–312.

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.

European Commission (EC), (2010). *Review report for the active substance imazalil finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 9 July 2010 in view of the renewal of inclusion of Imazalil in Annex I of Directive 91/414/EEC*. SANCO/11318/2010 rev.2. p. 8.

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.

EC. 2010. Commission Directive 2010/77/EU of 10 November 2010 amending Council Directive 91/414/EEC as regards the expiry dates for inclusion in Annex I of certain active substances. L293/48

El Fantroussi S, Belkacemi M, Top EM, Mahillon J, Naveau H, Agathos SN (1999). *Bioaugmentation of a soil bioreactor designed for pilot-scale anaerobic bioremediation studies*, Environ Sci Technol, 33:2992-3001.

Fantroussi Saïd El, Agathos Spiros N, (2015). *Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation*, Current Opinion in Microbiology, Science Direct, Volume 8, Issue 3, June 2005, Pages 268–275

Felsot A. S., Racke K. D., Hamilton D. J., (2003). “*Disposal and degradation of pesticide waste*”. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 177: 123-200.

Fetzner S., (2002). “*Biodegradation of Xenobiotics*”. In: Biotechnology, Doelle and Da Silva eds., Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK.

Flaim, G.M., Toller, G. (1989). *Treatment of postharvest pesticide residues, gric Ecos Environ* **27**: 505-511

Garcia Portillo M., Avino E. S., Vicente J. O., De Andres R. L., Jimenez M. A. S., Blanco J. P. L., (2004). “*Purification system for wastewater coming from fruit and vegetable processing plants and phytosanitary treatments in the field*”. United States Patent, US 6,709,585 B1, p. 9.

Gogate P. R., Pandit A. B., (2004). “*A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions*”, *Adv. Environ. Res.*, 8: 501-551.

Hatzinger PB, Alexander M (1995) Effect of Aging of Chemicals in Soil on Their Biodegradability and Extractability. *Environmental Science and Technology* 29:537-545

Jimenez Margarita, Maldonado Manuel Ignacio, Rodriguez Eva Maria, Hernandez-Ramirez Aracely, Saggiaro Enrico, Carra Irene and Sanchez Perez Jose Antonio, (2013). *Supported TiO₂ solar photocatalysis at semi-pilot scale: degradation of pesticides found in citrus processing industry wastewater, reactivity and influence of photogenerated species*, Society of Chemical Industry, DOI 10.1002/jctb.4299

Jimenez, M., Maldonado, M.I., Rodriguez, E.M., Hernandez-Ramirez, A., Saggiaro, E., et al. 2015. Supported TiO₂ solar photocatalysis at semi-pilot scale: degradation of pesticides found in citrus processing industry wastewater, reactivity and influence of photogenerated species. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 90, 149-157.

Johnson, D.S., Allen, J.G., Warman, T.M. (2006). *Post-harvest application of diphenylamine and ethoxyquin for the control of superficial scald on Bramley's seedling apples*, *J Sci Food Agric* 31:1189–1194.

Karas P., Metsoviti A., Zisis V., Ehaliotis C., Omirou M., Papadopoulou E., Menkissoglu- Spiroudi U., Komioti D., Manta S., Karpouzas D.G. 2015. Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized depuration of their pesticide-contaminated agro-industrial effluents. *Science of the Total Environment* 530-531,129-139

Karanasios E., Papadi-Psyllou A., Karpouzas D. G., Tsiropoulos N., (2012). "Optimization of water management and biomixture composition for maximizing the pesticide depuration of peat-free biobed systems", *J. Environ. Qual.*, 41 (6): 1787-1795.

Karanasios E., Tsiropoulos N., Karpouzas D. G., (2012b). "On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide-wastewaters: recent advances and future perspectives", *Biodegradation*, 23 (6): 787-802.

Karanasios E., Tsiropoulos N., Karpouzas D. G., Ehaliotis C., (2010). "Degradation and adsorption of pesticides in compost-based biomixtures as potential substrates for biobeds in south Europe", *J. Agric. and Food Chem.*, 58 (16): 9147-9156.

Karanasios E., Tsiropoulos N., Karpouzas D. G., Menkissoglu-Spiroudi U., (2010b). "Novel biomixtures based on local Mediterranean ligninocellulosic materials: evaluation for use in biobeds", *Chemosphere*, 80 (8): 914-921.

Karigar C. S., Rao S. S., (2011). "Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review", *Enzyme Res.*, Article ID 805187, 11.

Kerrison, Philip, and Michael Steinke. "DAPI staining protocol."

Krueger R. F., Severn D. J., (1984). "Regulation of pesticide disposal". In: *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, ACS Symposium Series, 259: 3-15.

Lacey, E. (1990). *Mode of action of bendimidazoles*, *Parasitology Today* 6: 112-115.

Labana Sumeet ,Gunjan Pandey, Debarati Paul ,Narinder K. Sharma ,Aparajita Basu, and Rakesh K. Jain, *Pot and Field Studies on Bioremediation of p-Nitrophenol Contaminated Soil Using Arthrobacter protophormiae RKJ100*, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39(9), pp 3330–3337

Mari M., Neri F., Bertolini P., (2009). "New approaches for postharvest disease control in Europe". In: *postharvest pathology, plant pathology in the 21st century*, Vol. 2, Prusky D., Gullino M. L. eds., Springer Science +Business Media B. V., Chapter 9.

Masia A., Campo J., Vazquez-Roig P., Blasco C., Pico Y., (2013). "Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain)", *J. Hazard. Mater.*, 263 Pt1: 95-104.

- Mattheis, J.M., Rudell, D.R. (2008). *Diphenylamine metabolism in «Braeburn» apples stored under conditions conducive to the development of internal brown rot*, *J. Agric. Food Chem.* **56**: 3381-3385.
- Moggia, C., Moya-Leon, M.A., Pereira, M., Yuri, J.A., Lobos, G.A. (2010) . *Effect of DPA and 1-MCP on chemical compounds related to superficial scald of Granny Smith apples*. *Spanish Journal of Agricultural Research* **8**: 178-187
- Moggia, C., Moya-Leon, M.A., Pereira, M., Yuri, J.A., Lobos, G.A. (2010). *Effect of DPA and 1-MCP on chemical compounds related to superficial scald of Granny Smith apples*, *Spanish Journal of Agricultural Research* **8**: 178-187.
- Omirou M., Dalias P., Costa C., Papastefanou C., Dados A., Ehaliotis C., Karpouzas D. G., (2012). “*Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: laboratory, column and field studies*”, *Environ. Pollut.*, 166: 31-39.
- Omirou M., Dalias P., Costa C., Papastefanou C., Dados A., Ehaliotis C., Karpouzas D. G., (2012). “*Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: laboratory, column and field studies*”, *Environ. Pollut.*, 166: 31-39.
- Ortiz-Hernández M. A., Sánchez-Salinas E., Olvera-Velona A., Folch-Mallol J. L., (2011). “*Pesticides in the Environment: Impacts and its Biodegradation as a Strategy for Residues Treatment*”, In: *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*, Stoytcheva M. ed., InTech, Chapter 27, pp.551-575
- Ortiz-Hernandez M. L., Sanchez-Salinas E., Dantan-Gonzalez E., Castrejon-Godinez M. L., (2013). “*Pesticide biodegradation: mechanisms, genetics, and strategies to enhance the process*”, In: *Biodegradation- Life of Science*, Dr. Rolando Chamy ed., InTech, Chapter 10, pp. 251-287.
- Papadopoulou E.S., Tsachidou P., Menkissoglu-Spiroudi U., Karpouzas D.G., (2016) Land spreading of wastewaters from the fruit-packaging industry: are there any effects on soil microbes? The case of the antioxidant ethoxyquin and its metabolites on ammonia oxidizers. *Applied and Environmental Microbiology* (available on line, doi:10.1128/AEM.03437-15)
- Perruchon C, Pantoleon A., Chatzinotas A., Donner E., Vasileiadis S., Omirou M., Karpouzas D.G., (2015) Deciphering the roles of the members of a bacterial consortium in the degradation of thiabendazole: combining SIP-DGGE with meta-omics. 13th Bageco Conference, Milan, 14-18 June 2015
- Prousalis, K.P., Polygenis, D.A., Syrokou A., Lamari F.N., Tsegenidis, T. (2004). *Determination of carbendazim, thiabendazole, and o-phenyl phenol residues in lemons by HPLC following sample clean-up by ion-pairing*, *Anal Bioanal Chem* **379**: 458-463.

Robatscher, P., Eisenstecken, D., Sacco, F., Pohl, H., Berger, J., Zanella, A., Oberhuber, M. (2012) . *Diphenylamine residues in apples caused by contamination in fruit storage facilities*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 60: 2205-2211.

Sanchez Perez, J.A., Carra, A., Sirtori, C., Aguera, A., Esteban, B. 2014. Fate of thiabendazole through the treatment of a simulated agro-food industrial effluent by combined MBR/Fenton processes at mg/L scale. Water Research 51, 55-63

Schirra M., D'Aquino S., Cabras P., Angioni A., (2011). "*Control of postharvest diseases of fruit by heat and fungicides: efficacy, residue levels, and residue persistence*, A review". J. Agric. Food Chem., 59: 8531–8542.

Suzuki, Marcelino T., Evelyn B. Sherr, and Barry F. Sherr. "DAPI direct counting underestimates bacterial abundances and average cell size compared to AO direct counting." Limnology and Oceanography 38.7 (1993): 1566-1570.

Sirtori, C., Aguera, A., Carra, I., Sanchez Perez, J.A. 2014. Identification and monitoring of thiabendazole transformation products in water during Fenton degradation by LC-QTOF-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry 406: 5323–5337

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

Strong LC, McTavish H, Sadowsky MJ, Wackett LP (2000). *Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant Escherichia coli expressing atrazine chlorohydrolase*, Environ Microbiol, 2:91-98.

Silva E, Fialho AM, Sa-Correia I, Burns RG, Shaw LJ (2004). Combined bioaugmentation and biostimulation to clean up soil contaminated with high concentrations of atrazine, Environ Sci Technol 2004, 38:632-637

Suthersan S. S., (1999). "*In situ bioremediation*". In: *Remediation engineering: design concepts*, Suthersan S. S. ed., Boca Raton: CRC Press LLC, Chapter 5.

Torstensson L., (2000). "*Experiences of biobeds in practical use in Sweden*", Pestic. Outlook, 11: 206-212.

Torstensson L., Castillo M. d. P., (1997). "*Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spraying equipment*". Pestic. Outlook, 8: 24-27.

Vidali M., (2001). "*Bioremediation. An overview*", Pure Appl. Chem., 73 (7): 1163–1172.

Watanabe-Akanuma M., Ohta T., Sasaki Y., (2005). "A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria and cultured human cells", *Toxicol. Lett.*, 158: 213-219.

Winterlin W., Seiber J. N., Craigmill A., Baier T., Woodrow J., Walker G., (1989). "Degradation of pesticide waste taken from a highly contaminated soil evaporation pit in California", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18: 734-747.

Ζιώγας Β., Μακρόγλου, Α. (2007). Γεωργική Φαρμακολογία, Αθήνα

Ciarra Perruchon, (2014), *Isolation and study of bacteria able to degrade pesticides contained in the wastewaters produced by the fruit-packaging industry*, thesis for the degree of Doctor of Philosophy, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly

Ηλεκτρονικές πηγές:

<http://www.tecnidex.es/69378/reuse-and-treatment-of-phytosanitary-water--control-tec-eco>

Πηγές εικόνων:

(Begin Editable "author" Kristy Grigg-McGuffin, (2013). *Rots the Problem? Dealing with Pre-harvest and Storage Disease*, Ontario.ca (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs) <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/hort/news/orchnews/2013/on-0913a6.htm>

Bayer Ελλάς, 2007, Ασθένειες/Ροδακινιά

http://www.bayercropscience.gr/index.asp?a_id=210&sel1=sel1a,56,35&sel2=sel2a,6&asth_id=188

©Bayer Nordic, 2013, Sustainability and Product Stewardship, Biobeds -environmental protection in agriculture, Science for a better life
<http://www.nordic.bayer.com/en/sustainability/sustainabledevelopment/product-stewardship---biobeds>

PubChem, Compound Thiabendazole
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>