

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Μελέτη και αξιολόγηση του μηχανισμού αποδόμησης του μυκητοκτόνου  
Imazalil από τον μύκητα *Mycosphaerella tassiana*»**

**ΓΚΟΥΝΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ-ΑΙΜΙΛΙΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2021**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**«Μελέτη και αξιολόγηση του μηχανισμού αποδόμησης του μυκητοκτόνου Imazalil από τον μύκητα *Mycosphaerella tassiana*»**

**«Study and evaluation of the dissipation process of the fungicide Imazalil caused by the fungi *Mycosphaerella tassiana*»**

**Επιβλέπων καθηγητής : Καρπούζας Δημήτριος**

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή**

- ***Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας***
- ***Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας***
- ***Βασιλειάδης Σωτήριος, Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας – Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας***

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστήμιου Θεσσαλίας στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος (ΠΜΣ) «Τοξικολογία» με στόχο τη μελέτη της αποδόμησης του μυκητοκτόνου imazalil και άλλων γεωργικών φαρμάκων από τον μύκητα *Mycosphaerella tassiana*.

Έχοντας ολοκληρώσει τη διατριβή αυτή και κατά συνεπεία τις σπουδές μου στο ΠΜΣ «Τοξικολογία» θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην περάτωση των σπουδών μου και στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής εργασίας. Συγκεκριμένα, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή μου και επιβλέποντα της εργασίας κ. Δημήτριο Καρπούζα που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, την υποστήριξη, τη συνεργασία και τη χαρά να δουλέψω στο εργαστήριο του όπου εκπονήθηκε το σύνολο των απαραίτητων πειραμάτων της συγκεκριμένης διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ βαθύτατα την υποψήφια Διδάκτορα Παπαζλατάνη Χριστίνα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την πολύτιμη βοήθεια της, την αλληλεγγύη, την ειλικρινή και ευγενική συνεργασία, καθότι υπήρξε παρούσα καθ' όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της εργασίας και με καθοδήγησε τόσο στο πειραματικό όσο και στο θεωρητικό μέρος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς και παππούδες μου που υπήρξαν συμπαραστάτες και συνοδοιπόροι και με στήριξαν τόσο ηθικά όσο και οικονομικά σε όλη τη διάρκεια των έως τώρα σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σύγχρονη φυτοπροστασία στηρίζεται κατά κύριο λόγο στη χρήση γεωργικών φαρμάκων. Η ρύπανση των φυσικών υδροφόρων συστημάτων από γεωργικά φάρμακα αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό κίνδυνο καθώς αποτελούν τοξικές ουσίες τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το περιβάλλον. Τα υγρά απόβλητα των συσκευαστηρίων φρούτων που συγκεντρώνουν υψηλές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων, όπως imazalil (IMZ), thiabendazole (TBZ), fludioxonil (FLD), *ortho*-phenyl-phenol (OPP) και iprodione (IPR), συχνά διαχειρίζονται μη ορθολογικά και απορρίπτονται απευθείας σε υδάτινους αποδέκτες ή παρακείμενους αγρούς. Λαμβάνοντας υπόψιν την έλλειψη αποτελεσματικών μεθόδων επεξεργασίας αποβλήτων επιβαρυσμένων με τα συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα, η ανάπτυξη μικροβιακών εμβολίων με ικανότητα αποδόμησής τους, προτείνεται ως μία άμεση και αποτελεσματική λύση. Στη παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η ικανότητα του μύκητα *Mycosphaerella tassiana* που αποδομεί το υπολειμματικό μυκητοκτόνο IMZ σε εύρος τιμών pH και αποτιμήθηκε η δράση του παρουσία άλλων φυτοπροστατευτικών ουσιών (TBZ, FLD, OPP, IPR) που χρησιμοποιούνται ευρέως από τα συσκευαστήρια φρούτων και αναμένεται να συνυπάρχουν με το IMZ στα απόβλητα.

Η αποδομητική ικανότητα του μύκητα *M. tassiana* αξιολογήθηκε σε υγρές καλλιέργειες θρεπτικού υποστρώματος MSMN. Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας καθίσταται σαφές ότι ο μύκητας έχει υψηλή δυναμική αποδόμησης του μυκητοκτόνου IMZ, διασπά μερικώς τα FLD και TBZ, ενώ δε μπορεί να αποδομήσει το φαινολικό OPP. Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι επιφέρει μείωση της συγκέντρωσης της 3,5-DCA, κύριου μεταβολίτη του IPR. Επίσης, ο μύκητας παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη και αποδόμηση του IMZ υπό ουδέτερες συνθήκες με τιμή  $DT_{50} = 9.47$  ημέρες.

Συνολικά το στέλεχος του μύκητα *M. tassiana* εμφανίζει αυξημένη ικανότητα να αποδομεί το IMZ σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που το βρίσκουμε στα υγρά απόβλητα από συσκευαστήρια φρούτων. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στη μελέτη του μεταβολικού μονοπατιού και των γενετικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην αποδόμηση του μυκητοκτόνου.

## Περιεχόμενα

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	3
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	4
1. Εισαγωγή .....	8
1.1 Γεωργικά Φάρμακα .....	8
1.1.1 Τρόποι εισόδου των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον .....	9
1.1.2 Περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων .....	12
1.1.3 Τοξικότητα και Βιοσυσσωρευση .....	13
1.2 Απορρύπανση και βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων .....	14
1.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποδομητική ικανότητα των μυκήτων .....	17
1.3 Μύκητες .....	18
1.4 <i>Mycosphaerella tassiana</i> .....	19
1.5 Υπό μελέτη φυτοπροστατευτικές ουσίες .....	21
1.5.1 Imazalil .....	21
1.5.2 Thiabendazole .....	24
1.5.3 <i>ortho</i> -Phenyl-Phenol .....	26
1.5.4 Fludioxonil .....	27
1.5.5 Iprodione .....	30
1.6 Σκοπός της παρούσας εργασίας .....	32
2. Υλικά και μέθοδοι .....	34
2.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος Minimum Salt Medium Nitrogen .....	34
2.2 Μέθοδοι ανάλυσης σε σύστημα HPLC-PDA του εργαστηρίου .....	35
2.2.1 Εκχύλιση των υπολειμμάτων των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων .....	35
2.2.2 Ανάλυση σε σύστημα HPLC-PDA .....	35
2.2.3 Καμπύλες αναφοράς .....	36
2.3 Μέθοδος συλλογής κονιδίων του μύκητα <i>Mycosphaerella tassiana</i> .....	37
2.4 Μέθοδος μέτρησης κονιδίων του μύκητα <i>Mycosphaerella tassiana</i> .....	37
2.5 Πειραματικός σχεδιασμός .....	38
2.5.1 Μελέτη της αποδόμησης του μύκητα <i>Mycosphaerella tassiana</i> παρουσία διάφορων μυκητοκτόνων .....	38
2.5.2 Μελέτη της αποδομητικής ικανότητας και ανάπτυξης του μύκητα <i>Mycosphaerella tassiana</i> σε διάφορες τιμές pH .....	39
2.6 Στατιστική Ανάλυση .....	41
3. Αποτελέσματα .....	44

3.1 Μελέτη της αποδόμησης του μύκητα <i>Mycosphaerella tassiana</i> παρουσία διάφορων μυκητοκτόνων γεωργικών φαρμάκων.....	44
3.1.1 Αποδόμηση του μυκητοκτόνου Imazalil .....	44
3.1.2 Αποδόμηση του μυκητοκτόνου Thiabendazole.....	45
3.1.3 Αποδόμηση του μυκητοκτόνου <i>ortho</i> -phenyl-phenol(OPP).....	47
3.1.4 Αποδόμηση του μυκητοκτόνου Fludioxonil .....	48
3.1.5 Αποδόμηση του μυκητοκτόνου Iprodione.....	50
3.2 Μελέτη της αποδομητικής ικανότητας και ανάπτυξης του μύκητα <i>M. tassiana</i> σε διάφορες τιμές pH.....	52
4. Συζήτηση και Συμπεράσματα .....	64
5. Βιβλιογραφία .....	68

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Γεωργικά Φάρμακα

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ή την αναστολή της ανάπτυξης ενός ευρέως φάσματος επιβλαβών οργανισμών. Ως γεωργικά φάρμακα ορίζονται (1) τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία περιλαμβάνουν δραστικές ουσίες που προστατεύουν φυτά και φυτικά προϊόντα από την δράση επιβλαβών οργανισμών (“ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1107/2009) , και (2) τα βιοκτόνα, που αποτελούνται από δραστικές ουσίες και παρασκευάσματα που επιφέρουν έλεγχο ή αναστολή της ανάπτυξης βλαβερών οργανισμών και τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως σε μη-γεωργικές εκμεταλλεύσεις (ΟΔΗΓΙΑ 98/8/ΕΚ, 1998). Στην παρούσα διατριβή, με τον όρο “γεωργικά φάρμακα” θα αναφερόμαστε μόνο στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και τις δραστικές τους ουσίες.

Τα γεωργικά φάρμακα κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τη χημική τους σύνθεση, τις φυσικοχημικές ιδιότητες, τον τρόπο δράσης και τον οργανισμό-στόχο. Η πιο κοινή μέθοδος ταξινόμησης βασίζεται στον οργανισμό στον οποίο στοχεύουν, βάση της οποίας διακρίνονται σε μυκητοκτόνα (fungicides), βακτηριοκτόνα (bactericides), εντομοκτόνα (insecticides), ακαρεοκτόνα (acaricides), νηματωδοκτόνα (nematicides), ζιζανιοκτόνα (herbicides), τρωκτικοκτόνα (rodenticides) κ.α. (Leong et al., 2020).

Η χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων συμβάλλει καθοριστικά στη βελτίωση της γεωργικής παραγωγής καθώς προστατεύει φυτά και φυτικά προϊόντα από επιβλαβείς οργανισμούς. Ωστόσο, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ενδέχεται να επιφέρουν και μη ευεργετικά αποτελέσματα στη φυτική παραγωγή, κυρίως διότι η μη ορθολογική χρήση τους μπορεί να συνεπάγεται κινδύνους για τον άνθρωπο, τα ζώα και το περιβάλλον, ή επειδή η διάθεσή τους στην αγορά μπορεί να μην συνοδεύεται από



τις απαιτούμενες δοκιμές και την επίσημη αδειοδότηση (“ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1107/2009). Αν και η εισαγωγή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά στην Ευρωπαϊκή Ένωση υπόκειται σε έλεγχο που περιγράφεται στον Κανονισμό 1109/2019, η απερίσκεπτη χρήση τους σε συνδυασμό με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τα καθιστούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρύπους, κάτι που αποτυπώνεται και στην Ευρωπαϊκή Οδηγία Πλαίσιο για το Νερό όπου μεγάλο ποσοστό των ρυπαντών προτεραιότητας στον τομέα της πολιτικής των υδάτων είναι τα γεωργικά φάρμακα (Απόφαση 2455/2001/ΕΚ, 2001).

### **1.1.1 Τρόποι εισόδου των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον**

Τα γεωργικά φάρμακα εισέρχονται στο περιβάλλον μέσω σημειακών και μη-σημειακών πηγών ρύπανσης. Οι μη-σημειακές πηγές ρύπανσης σχετίζονται με την απευθείας εφαρμογή τους στο περιβάλλον, όπως κατά την εφαρμογή τους στον αγρό ή σε δημόσιους και βιομηχανικούς χώρους, όπου μόνο ένα τμήμα του νέφους ψεκασμού καταλήγει στο στόχο.

Σημειακές πηγές ρύπανσης του περιβάλλοντος αποτελούν (1) τα απόβλητα βιομηχανιών που παράγουν ή χρησιμοποιούν γεωργικά φάρμακα όπως οι μονάδες μεταποίησης γεωργικών προϊόντων, (2) οι μη ορθολογικές γεωργικές πρακτικές που ακολουθούν οι χρήστες κατά την παρασκευή του ψεκαστικού υγρού, τον καθαρισμό των ψεκαστικών μηχανημάτων, την απόρριψη των ψεκαστικών υγρών, δοχείων γεωργικών φαρμάκων (κενών ή μη) και φυτικών ή ζωικών υπολειμμάτων που περιέχουν γεωργικά φάρμακα, και (3) από τα αποχετευτικά συστήματα οικισμών (Helweg et al. 2002).

Τα ρέματα με έντονα καλλιεργημένες λεκάνες απορροής ρυπαίνονται από μη-σημειακές πηγές ρύπανσης μέσω απορροής πεδίου και σωλήνων αποστράγγισης. και

από σημειακές πηγές, όπως η έξοδος των εγκαταστάσεων λυμάτων, οι υπερχειλίσεις αποχετεύσεων και η απορροή από τα αγροκτήματα. Λιγότερο σημαντικές είναι οι εισροές με μετατόπιση, άμεσο ψεκασμό ή από την ατμόσφαιρα ως κατακρημνίσεις. Γενικά, εκτιμάται ότι τα εντομοκτόνα που εισάγονται στα ρέματα συνδέονται κυρίως με αιωρούμενη ύλη, ενώ τα ζιζανιοκτόνα μεταφέρονται σε διαλυμένη μορφή. Έχει διερευνηθεί η εισαγωγή ζιζανιοκτόνων από σημειακές πηγές, απορροές αγροκτημάτων και σωλήνες αποστράγγισης αγρού ενώ η εισαγωγή εντομοκτόνων στην υδάτινη φάση έχει τεκμηριωθεί μέχρι τώρα κυρίως μέσω απορροής πεδίου (Neumann et al., 2002).

Ιδιαίτερα σημαντική στην σημειακή ρύπανση εδαφών και επιφανειακών και υπόγειων υδροφόρων συστημάτων, είναι η συνεισφορά των βιομηχανιών μεταποίησης και επεξεργασίας αγροτικών προϊόντων που χρησιμοποιούν γεωργικά φάρμακα (Masiá et al., 2013; Belenguer et al., 2014; Ccancara et al., 2016). Κατά την αποθήκευσή τους τα φρούτα είναι επιρρεπή σε μυκητολογικές μολύνσεις κυρίως από μύκητες του γένους *Penicilium sp.* και *Colletotrichum sp.* (Alkan and Fortes, 2015; Baroncelli et al., 2015; Lima et al., 2021) με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος υποβάθμισης της ποιότητάς τους και μείωση της εμπορικής τους αξίας. Γι' αυτό το λόγο, οι μετασυλλεκτικές αγροβιομηχανίες καταφεύγουν στην χρήση μυκητοκτόνων όπως τα thiabendazole (TBZ), imazalil (IMZ), fludioxonil (FLD) και *ortho*-phenyl phenol (OPP) που χρησιμοποιούνται για την προστασία των μήλων, αχλαδιών, εσπεριδοειδών και μπανανιών. Αποτέλεσμα της χρήσης αυτών, είναι η παραγωγή αποβλήτων με υψηλές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων τα οποία σύμφωνα με την κοινοτική νομοθεσία (Regulation 2019/1021) χρήζουν επεξεργασίας πριν την απόρριψή τους στο περιβάλλον είτε με χρήση συστημάτων διαχείρισης υγρών αποβλήτων είτε μέσω συλλογής και παραλαβής από εξειδικευμένο συνεργείο που ανήκει σε εγκεκριμένη επιχείρηση. Παρά την σχετική νομοθεσία, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν οικονομικά

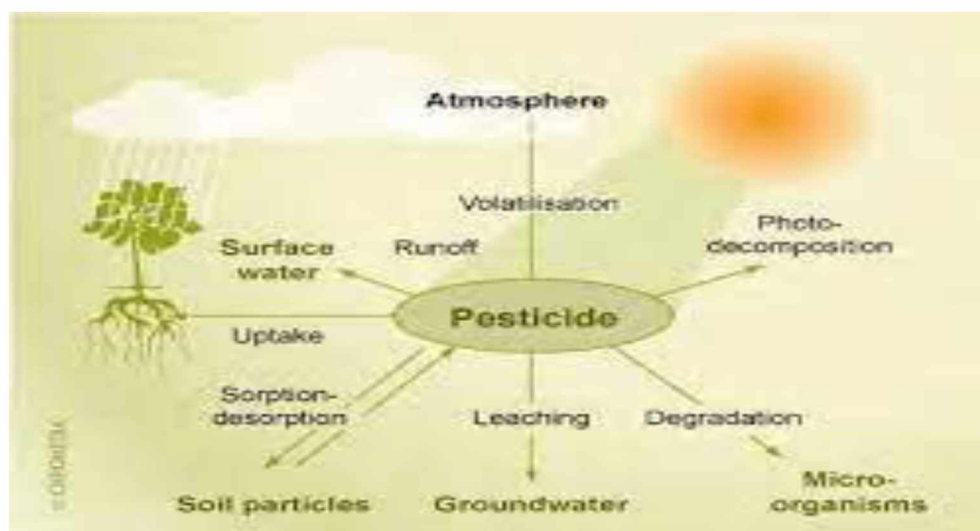
βιώσιμες και αποτελεσματικές μέθοδοι για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων που χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων (Santiago et al., 2011). Για το λόγο αυτό, οι μεταποιητικές αγρο-βιομηχανίες ακολουθούν μη ορθολογικές πρακτικές διαχείρισης των αποβλήτων τους, όπως η απόρριψη σε παρακείμενους αγρούς (land spreading) ή σε μονάδες επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων.

Ένα εργαλείο για την πρόληψη της ρύπανσης από πηγές γεωργικών φαρμάκων είναι ένα βιολογικό σύστημα όπου τα χημικά δεσμεύονται και βιολογικά αποδομούνται, όπως ένα σύστημα βιοκλινών όπου λύματα που περιέχουν υπολείμματα φυτοφαρμάκων διαρρέουν μέσω ενός βιο-οργανικού μίγματος. Παρέχεται ένα σύστημα αντλίας για την άντληση του νερού στην επιφάνεια του βιολογικού μίγματος και το αφήνει να στραγγίσει υπό βαρύτητα, διατηρώντας το βιομίγμα υγρό. Η χρήση αυτού του συστήματος που μελετήθηκε σε ποταμό στην Ιταλία που περιβάλλει αγρόκτημα, μείωσε τις πιθανότητες ρύπανσης του, αφού η ανάλυση των υπολειμμάτων εννέα φυτοπροστατευτικών ουσιών στο νερό, στο βιομίγμα και στο ίζημα μέσα στη δεξαμενή έδειξε ότι η βιοκλίνη λειτουργεί αποτελεσματικά, με απορρύπανση του νερού μεγαλύτερη του 90% (Fait et al., 2007).

Μελέτη των Karas et al. (2016) αποδεικνύει ότι οι βιοενισχυμένες βιοκλίνες παρουσιάζουν υψηλή αποτελεσματικότητα απομόνωσης μεταξύ των φυτοφαρμάκων TBZ, IMZ, OPP και diphenylamine (DPA) η οποία διαφέρει για κάθε ένα αλλά ξεπερνάει το 99.5 % σε κάθε περίπτωση. Οι ενισχυμένες βιοκλίνες παρουσιάζουν υψηλή αποδοτικότητα και παράγουν επεξεργασμένα λύματα των οποίων η περιβαλλοντική διάθεση σε προκαθορισμένη περιοχή διάθεσης εδάφους, δεν ενέχει περιβαλλοντικό κίνδυνο (Karas et al., 2016).

### 1.1.2 Περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων

Μετά την είσοδό των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον, υπάρχουν διάφορες οδοί που μπορεί να ακολουθήσουν όπως η μετακίνηση σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα, η εξάτμιση στον ατμοσφαιρικό αέρα, η προσρόφηση στα κolloειδή του εδάφους και η αποδόμηση από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Διάγραμμα των διεργασιών που διέπουν την τύχη των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον (Yolanda Pico, University of Valencia).

Η πορεία που θα ακολουθήσουν τα γεωργικά φάρμακα στο περιβάλλον συνδέεται στενά με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στο σημείο ρύπανσης, όπως οι βροχοπτώσεις των οποίων η συμβολή είναι σύντομη και απρόβλεπτη, και με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως ο συντελεστής κατανομής νερού / οκτανόλης ( $\text{LogP}_{ow}$ ) και η υδατοδιαλυτότητα που καθορίζουν το πόσο πιθανό είναι η δραστική ουσία να κινηθεί στο έδαφος, και η πτητικότητα (vapor pressure) που δείχνει εάν η ουσία αναμένεται να διαφύγει στην ατμόσφαιρα (Honeycutt R., 1994).

Οι κυριότεροι από τους μηχανισμούς μετακίνησης στο έδαφος είναι η επιφανειακή απορροή (runoff), η στράγγιση (drainage) του νερού της άρδευσης και της βροχής και η κατακόρυφη στράγγιση (leaching) προς τα βαθύτερα στρώματα του εδάφους και τους υπόγειους υδροφόρους ορίζοντες. Πολύ σημαντική είναι η

προσρόφηση των γεωργικών φαρμάκων στην οργανική ύλη του εδάφους η οποία ανάλογα με το πόσο ισχυρή είναι καθορίζει το δυναμικό μετακίνησης των μορίων και την διαθεσιμότητά τους σε μικροοργανισμούς με την ικανότητα να τροποποιούν την χημική τους δομή ή να τα διασπούν πλήρως (Briceño et al., 2007). Η αποδόμηση των χημικών ουσιών από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (υδρόλυση, οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις) είναι μείζονος σημασίας καθώς καθορίζει την υπολειμματικότητα των μορίων.

### **1.1.3 Τοξικότητα και Βιοσυσώρευση**

Η αδυναμία των γεωργικών φαρμάκων να αλληλοεπιδρούν μόνο με τους επιθυμητούς οργανισμούς-στόχους και η μακροχρόνια παραμονή τους στο περιβάλλον ενισχύουν το αρνητικό αντίκτυπο στην ισορροπία των οικοσυστημάτων (Castelo-Grande et al., 2010). Η έγκριση των γεωργικών φαρμάκων για διάθεση στην αγορά απαιτεί δεδομένα σχετικά με τις πιθανές επιβλαβείς επιπτώσεις των δραστικών ουσιών τους στην ανθρώπινη υγεία. Τα δεδομένα αυτά λαμβάνονται από δοκιμές που πραγματοποιούνται συνήθως σε αρουραίους ή κουνέλια, και επικεντρώνονται κυρίως στην οξεία και χρόνια τοξικότητα, την καρκινογένεση, τη γενετοξικότητα, την τερατογένεση και σε δοκιμές ερεθιστότητας (Matthews, 2015).

Με τα πειράματα οξείας τοξικότητας μπορούμε να υπολογίσουμε τη μέση θανατηφόρο δόση ( $LD_{50}$ ) που αποτελεί την απαιτούμενη δόση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να θανατωθεί το ήμισυ των πειραματόζωων. Ακόμα, μπορεί να υπολογιστεί η οξεία θανατηφόρος συγκέντρωση εισπνοής ( $LC_{50}$ ), η οποία είναι η απαιτούμενη συγκέντρωση ώστε να θανατωθούν τα μισά από τα εκτεθειμένα (για 4 ώρες) πειραματόζωα σε ένα γεωργικό φάρμακο. Οι τιμές θανατηφόρας συγκέντρωσης χρησιμοποιούνται όταν η οδός χορήγησης είναι μέσω εισπνοής ή μέσω πόσιμου νερού

(Damalas and Eleftherohorinos, 2011). Η ασφάλεια των χρηστών εξετάζεται και μέσω μελετών πειραματικής έκθεσης υπό τις συνθήκες εφαρμογής των γεωργικών φαρμάκων, όπου, με τη χρήση μαθηματικών μοντέλων, συγκρίνονται τα πειραματικά δεδομένα με το αποδεκτό επίπεδο έκθεσης του χρήστη (Acceptable Operator Exposure Level, AOEL), που έχει οριστεί με Ευρωπαϊκή οδηγία για την κάθε δραστική ουσία. Επιπλέον, πρέπει να αναφερθεί ότι με απόφαση της Ε.Ε., για την ασφάλεια του χρήστη πρέπει να υπάρχει πιστοποίηση των χρηστών, απαιτείται δηλαδή εκπαίδευση και χορήγηση άδειας σε εκείνους που χειρίζονται και εφαρμόζουν τα γεωργικά φάρμακα (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010).

Άλλο ένα χαρακτηριστικό αυτών των χημικών ουσιών αποτελεί το ότι είναι επιρρεπείς στην βιοσυσσώρευση. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων μιας χημικής ουσίας σε έναν οργανισμό σε συνδυασμό με τον χαμηλό ρυθμό απομάκρυνσης της ουσίας αυτής από έναν οργανισμό, ονομάζεται βιοσυσσώρευση. Τα γεωργικά φάρμακα συσσωρεύονται στους οργανισμούς μέσω της πρόσληψης τροφής, που περιλαμβάνει τόσο την αφομοίωση φυτικών ιστών και ιζήματος όσο και την κατανάλωση μελών της τροφικής αλυσίδας (Gurta, 2020). Οι περισσότερες φυτοπροστατευτικές ουσίες απορροφώνται από το γαστρεντερικό σωλήνα, το δέρμα και τους πνεύμονες και μεταφέρονται στους ιστούς του σώματος των οργανισμών με την κυκλοφορία του αίματος. Η συνεχής και απερίσκεπτη έκθεση του ανθρώπου στα γεωργικά φάρμακα μπορεί να προκαλέσει μακροπρόθεσμα, πολύπλοκα προβλήματα στην υγεία όπως μεταβολικές (He et al., 2020), ορμονικές (Yamazaki et al., 2020) και αναπαραγωγικές διαταραχές (Wang et al., 2016).

## **1.2 Απορρύπανση και βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων**

Η ανεξέλεγκτη ελευθέρωση γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον αποτελεί σημαντικό πρόβλημα και εγείρει ανησυχία για τη δημόσια υγεία και την καλή

λειτουργία των οικοσυστημάτων (Singh and Chen, 2008). Η απορρύπανση ή εξυγίανση αποσκοπεί στην ανάληψη ενεργειών για την αποκατάσταση των υπόγειων υδάτινων φορέων και γενικότερα των φυσικών πόρων που έχουν ρυπανθεί. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τη φύση, τη συγκέντρωση και την ποσότητα του ρυπαντή, το είδος της πηγής ρύπανσης (σημειακή ή διάχυτη, συνεχής ή παροδική), το κόστος και τη διαθέσιμη τεχνολογία, καθώς και τη μελλοντική χρήση της γης. Οι μέθοδοι απορρύπανσης περιλαμβάνουν την απομάκρυνση των ρυπαντών ή την επεξεργασία των ρύπων επιτόπου. Η επιτόπια παρακολούθηση αποτελεί το πρώτο βήμα για την επιλογή της τεχνικής απορρύπανσης και περιλαμβάνει χημικές αναλύσεις δειγμάτων νερού και αερίων με σκοπό να καθορισθούν οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ρυπαντών.

Ως βιοαποδόμηση ή μικροβιακή αποδόμηση ορίζεται η διάσπαση οργανικών ουσιών σε μικρότερα μόρια μέσω της δράσης ενζύμων που παράγονται από ζωντανούς μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν δύο κύριες στρατηγικές για τον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών οργανικών ουσιών: τον συμμεταβολισμό και τον καταβολισμό. Κατά τον συμμεταβολισμό οι μικροοργανισμοί αποδομούν τους ρύπους με βραδείς ρυθμούς και δεν αποκομίζουν ενέργεια για την αύξηση τους, σε αντίθεση με τον καταβολισμό όπου οι ρύποι αποτελούν πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και τους καταβολίζουν με ταχύτατους ρυθμούς. Κατά τη βιοαποδόμηση σύνθετα οργανικά μόρια μετατρέπονται σε απλούστερα μέσω μεταβολικών ή ενζυματικών διεργασιών.

Η μικροβιακή αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων θεωρείται ως μια από τις σημαντικότερες οδούς απομάκρυνσης τους από το περιβάλλον. Η επιλογή του είδους των μικροοργανισμών (βακτήρια μύκητες) που θα χρησιμοποιηθούν εξαρτάται από το είδος του ρύπου που πρέπει να απομακρυνθεί και η παρουσία ή όχι άλλων ρύπων.

Η συμβολή των μυκήτων είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στο περιβάλλον λόγω του ρόλου τους στους βιογεωχημικούς κύκλους, αφού διαθέτουν ένα μεγάλο εύρος ενζύμων για την αποδόμηση χημικών ουσιών. Για παράδειγμα, τα γένη *Aspergillus* (Li S-F et al., 2020; Wang et al., 2021), *Phanerochaete* (Bumpus et al., 1987; Dawen Gao et al., 2010) και *Pleurotus* (Cohen et al., 2002; Mai et al., 2004) αποδεικνύονται ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην αποσύνθεση των αιθέριων ελαίων, των κυτταρινών, των πηκτινών και άλλων πολυμερών των σακχάρων.

Η διάσπαση χημικών ουσιών από τους μύκητες χαρακτηρίζεται ως μυκητιακή αποδόμηση (mycodegradation) ενώ η βιοαποκατάσταση στην οποία χρησιμοποιούνται μύκητες ονομάζεται και μυκητο-αποκατάσταση (mycoremediation). Η επιλογή του κατάλληλου μυκητιακού είδους, που θα στοχεύσει έναν συγκεκριμένο ρύπο, κρίνεται απαραίτητη για την επιτυχή βιοαποκατάσταση ρυπασμένων οικοσυστημάτων. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, το στέλεχος *Cladosporium cladosporioides* έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό στη βιοαποδόμηση του οργανοφωσφορικού παρασιτοκτόνου Chlorpiryfos (Chen S. et al., 2012) όπως επίσης και ο μύκητας *Fusarium proliferatum* Strain CF2 που ευθύνεται για τη βιοαποικοδόμηση του allethrin που μαζί με την tetramethrin και τη resmethrin αποτελούν τα πρώτα συνθετικά πυρεθροειδή (Bhatt P. et al., 2020). Σε μελέτη των León-Santiesteban et al. (2016) αναφέρεται ότι το μυκητιακό στέλεχος *Rhizopus oryzae* CDBB-H-1877 έχει τη δυνατότητα βιοαποδόμησης του pentachlorophenol. Άλλοι μύκητες όπως το *Penicillium chrysogenum*, το *Scedosporium apiospermum*, το *Penicillium digitatum* και το *Fusarium solani* δύνανται επίσης, με τη χρήση μη-λιγνινολυτικών ενζύμων (Zhang et al., 2011), να αποδομήσουν τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB, polychlorinated biphenyls).



### 1.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποδομητική ικανότητα των μυκήτων

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, εκπρόσωποι του βασιλείου των μυκήτων έχουν την ικανότητα να αποδομούν περιβαλλοντικούς ρύπους όπως τα γεωργικά φάρμακα. Η ικανότητά τους αυτή επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία, η υγρασία, η ηλιακή ακτινοβολία και τα θρεπτικά συστατικά. Οι Maqbool et al. (2016) αναφέρουν και περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες όπως το pH, την οικολογία, τον τύπο του υποστρώματος και την εξειδίκευση του ενζύμου. Άλλοι παράγοντες περιλαμβάνουν τον κύκλο ζωής των μυκητιακών στελεχών, τη γεωχημεία του εδάφους και επιφανειοδραστικούς και χηλικούς παράγοντες (Long Yu et al., 2008).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων από μικροοργανισμούς είναι το pH. Σύμφωνα με μελέτη των Long Yu et al., (2008) η βιοαποδόμηση του chlorpyrifos από το μύκητα *Verticillium sp.* σε υγρό θρεπτικό μέσο και εύρος pH (5, 7, 9) είναι βέλτιστη σε pH 7.0 ενώ αύξηση ή μείωση του pH από αυτή την τιμή επηρέασε αρνητικά την αποδομητική ικανότητα του μύκητα. Η μυκητιακή βιοαποδόμηση άλλων παρασιτοκτόνων όπως το cymoxanil και pentimethalin έχει βρεθεί επίσης να είναι η μέγιστη σε pH 7 (Zervakis et al., 2001). Άλλη μελέτη, υποδεικνύει ότι pH για τη μέγιστη αποδόμηση του carbofuran από το μυκητιακό στέλεχος *Pichia anomala* είναι το 7.5 (Yang et al., 2011). Ακόμα, σε συγκαλλιέργεια των στελεχών *Serratia sp.* και *Trichosporon sp.* παρατηρήθηκε μέγιστη αποικοδόμηση του chlorpyrifos σε pH 8 (Hong et al., 2007). Ωστόσο, μελέτη των Maqbool et al., 2016 καταδεικνύει ότι και το ελαφρώς όξινο pH είναι κατάλληλο για βέλτιστη μυκητιακή βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων.

Εκτός από το pH, η μυκητιακή βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων επηρεάζεται αρκετά και από τη θερμοκρασία. Το στέλεχος *Verticillium sp.* παρουσίασε βέλτιστη

αποδόμηση του chlorpyrifos στους 35 °C όταν δοκιμάστηκε σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες (15, 20, 35 °C) (Long Yu et al., 2008). Οι Derbalah και Belal (2008) υποδεικνύουν τους 30°C ως την κατάλληλη θερμοκρασία για βέλτιστη βιοαποδόμηση του cymoxanil από μυκητιακά και βακτηριακά στελέχη. Τέλος, τα γεωργικά φάρμακα pendimethalin, carbofuran και endosulfan αποδομήθηκαν από στελέχη των ειδών *Aspergillus versicolor*, *Pichia anomala* και *Aspergillus terreus* σε βέλτιστη θερμοκρασία 30 ° C (Yang et al., 2011; Hussain et al. 2007).

### 1.3 Μύκητες

Οι μύκητες αποτελούν ένα από τα πέντε βασίλεια των έμβιων όντων. Το βασίλειο των μυκήτων περιλαμβάνει μονοκύτταρους ή πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι μύκητες εμφανίζουν πολύ μεγάλη ποικιλία και ανιχνεύονται σε ποικίλα ενδιαιτήματα. Οι περισσότεροι απαντώνται στο έδαφος και τα φυτά και διατρέφονται από οργανικά συστατικά ζώντων ή νεκρών οργανισμών γι' αυτό και θεωρούνται το "βιολογικό εργαστήριο αποικοδόμησης των οργανικών ουσιών".

Οι μύκητες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τους ζυμομύκητες και τους υφομύκητες. Οι ζυμομύκητες είναι σφαιρικοί ή ελλειψοειδείς σχηματισμοί που αναπαράγονται δια εκβλαστήσεων σε ειδικά θρεπτικά υλικά. Αντίθετα, οι υφομύκητες ή νηματοειδείς μύκητες, αποτελούνται από κυλινδρικούς σχηματισμούς, τις υφές, που μεγαλώνουν με διακλαδώσεις και επιμηκύνσεις σχηματίζοντας χνουδωτές αποικίες. Μια άλλη κατηγορία μυκήτων, οι καλούμενοι δίμορφοι μύκητες, αναπτύσσονται στον ξενιστή ως ζυμομύκητες, ενώ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος λαμβάνουν τη μορφή υφομυκήτων.

Οι μύκητες είναι χημειοοργανότροφοι, δηλαδή αποκτούν ενέργεια μέσω του καταβολισμού των οργανικών ενώσεων. Επίσης, είναι κυρίως αερόβιοι οργανισμοί ενώ ένας μικρός αριθμός είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι. Έχουν απλές διατροφικές

απαιτήσεις καθώς είναι ικανοί να χρησιμοποιούν μια ποικιλία οργανικών υποστρωμάτων για τη σύνθεση μακρομορίων και άλλων απαραίτητων συστατικών για την ανάπτυξή τους, ενώ πολλοί αναπτύσσονται σε ακραία περιβάλλοντα, όπως σε χαμηλό pH, χαμηλή υγρασία, υψηλή συγκέντρωση άλατος ή/και υψηλή θερμοκρασία.

Η σημασία των μυκήτων για το περιβάλλον είναι μεγάλη αφού πολλοί από αυτούς αποδομούν νεκρή οργανική ύλη και σύνθετες ενώσεις σε απλούστερες οργανικές ή ανόργανες ενώσεις. Επίσης, μεγάλης σημασίας είναι οι μύκητες που συμβιώνουν με διάφορα φυτά, γνωστοί ως μυκόρριζα, οι οποίοι σχηματίζουν ινίδια στις ρίζες και βοηθούν τα φυτά στην απορρόφηση νερού, θρεπτικών συστατικών και μετάλλων.

Η χρησιμότητα των μυκήτων για τον άνθρωπο ποικίλλει, από τους επωφελείς ζυμομύκητες και τα εδώδιμα μανιτάρια έως τους παθογόνους μικρομύκητες. Από τα 50.000 - 250.000 είδη μυκήτων που έχουν περιγραφεί, λιγότερα από 300 έχουν συσχετισθεί με την πρόκληση νόσων στον άνθρωπο.

#### **1.4 *Mycosphaerella tassiana***

Οι μύκητες χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες βάση των αναπαραγωγικών τους δομών:

- Τους βασιδιομύκητες (*Phylum Basidiomycota*)
- Τους ασκομύκητες (*Phylum Ascomycota*)
- Τους ατελείς μύκητες (*Imperfect fungi*)
- Τους ζυγομύκητες (*Phylum Zygomycota*)

Στην κλάση των ασκομυκήτων κατατάσσονται οι μύκητες που στην τέλεια μορφή τους σχηματίζουν εγγενείς καρποφορίες που ονομάζονται ασκοί και περιέχουν τα εγγενή σπόρια γνωστά ως ασκοσπόρια. Στην ατελή μορφή τους οι ίδιοι αυτοί μύκητες κατατάσσονται στην κλάση των ατελών μυκήτων (δευτερομύκητες) και έχουν

διαφορετική ονομασία. Ο μύκητας που μελετάμε στην παρούσα διατριβή ανήκει στους ασκομύκητες.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, ο μύκητας *M. tassiana* ακολουθεί της εξής ταξινόμηση:

Βασίλειο: Μύκητες  
Φύλο : Ασκομύκητες  
Υποφύλο : *Pezizomycotina*  
Κλάση : *Dothideomycetes*  
Υποκλάση : *Dothideomycetidae*  
Τάξη : *Capnodiales*  
Οικογένεια : *Mycosphaerellaceae*  
Γένος : *Mycosphaerella*  
Είδος : *Mycosphaerella tassiana*

Το γένος *Mycosphaerella* είναι ένα από τα μεγαλύτερα γένη των ασκομυκήτων που περιλαμβάνει πολλά φυτοπαθογόνα, τα οποία επιδρούν σε σημαντικές οικονομικά καλλιέργειες, αλλά και πολλά σαπροφυτικά είδη. Η μορφολογία των τελομόρφων είναι σχετικά απλή και ομοιόμορφη στη *Mycosphaerella*, αλλά το γένος είναι ανομοιόμορφο στην ποικιλομορφία των σχετικών αναμορφώσεων. Πράγματι, 27 αναμορφικά γένη έχουν σχετιστεί με τη *Mycosphaerella* (von Arx 1983, Sutton & Hennebert 1994), 23 από τα οποία έγιναν αποδεκτά από τους Crous *et al.* (2000). Οι Klebahn (1918) και Laibach (1922) πρότειναν να διαχωριστούν ομάδες ειδών της *Mycosphaerella* με βάση τη συσχέτισή τους με συγκεκριμένο ανάμορφο, αλλά τα γένη που πρότειναν δε χρησιμοποιήθηκαν ευρέως. Πρόσφατες μοριακές μελέτες έδειξαν ότι οι χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν τα αναμορφικά γένη, όπως η δομή των κωνιδίων, το μέγεθος, σχήμα και τα σέπτα, δεν είναι πάντα φυλογενετικά

κατατοπιστικοί και ότι κάποιες γενικές έννοιες για τις αναμορφώσεις πρέπει να αναθεωρηθούν (Crous et al. 2000, Crous, Kang & Braun 2001, Verkley et al. 2004).

Οι έννοιες των ειδών για αυτήν την ομάδα μυκήτων παραμένουν συγκεχυμένες, και ως εκ τούτου η αναγνώριση των ειδών τους είναι εξαιρετικά δύσκολη. Έτσι, η σύγκριση αλληλουχιών DNA έχει γίνει το βασικό χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται για τη διάκριση ειδών του γένους *Mycosphaerella*. (Gavin C. Hunter et al., 2014). Αλληλουχίες της περιοχής του εσωτερικού μεταγραφόμενου διαστήματος (ITS) του οπερονίου του ριβοσωμικού RNA έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά για να ληφθούν υπόψη τα όρια των ειδών στο γένος *Mycosphaerella*. Ωστόσο, οι αλληλουχίες για αυτήν την περιοχή γονιδίου δεν παρέχουν πάντα επαρκή ανάλυση για τη διάκριση μεταξύ ατόμων ενός συμπλέγματος ειδών. (Gavin C. Hunter et al., 2014).

Όπως προαναφέρθηκε, είδη του γένους *Mycosphaerella* θεωρούνται ως μερικά από τα πιο καταστροφικά παθογόνα φύλλων ενός μεγάλου αριθμού οικονομικά σημαντικών φυτών καλλιέργειας. Μεταξύ αυτών, περίπου 60 είδη του γένους *Mycosphaerella* έχουν αναγνωρισθεί να προκαλούν ασθένειες των φύλλων, συνολικά γνωστές ως *Mycosphaerella* Leaf Disease (MLD), μεταξύ διαφόρων ειδών του γένους *Eucalyptus*. Η ασθένεια είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στα νεανικά φύλλα και τους βλαστούς των ευκάλυπτων, όπου η μόλυνση έχει ως αποτέλεσμα την πρόωρη αποφλοίωση και τη διακοπή της ανάπτυξης των δέντρων.

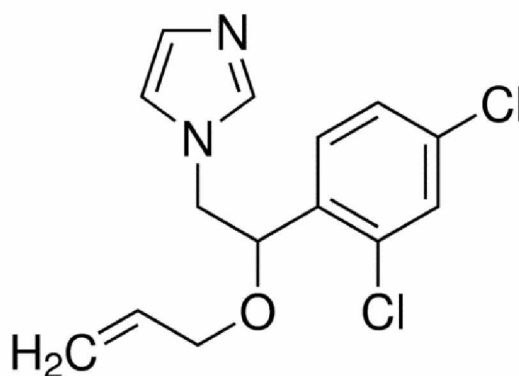
## 1.5 Υπό μελέτη φυτοπροστατευτικές ουσίες

### 1.5.1 Imazalil

Το IMZ (1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxy)ethyl]-1H-imidazole, (Εικόνα 2), είναι μυκητοκτόνο της ομάδας των ιμιδαζολών τα οποία είναι γνωστά ως αναστολείς βιοσύνθεσης της εργοστερόλης. Οι στερόλες έχουν βασικό ρόλο τη δομική

σταθεροποίηση των μεμβρανών των ευκαρυωτικών κυττάρων, με τη χοληστερόλη να απαντάται στα ζωικά κύτταρα και την εργοστερόλη στα μυκητιακά. Κύτταρα μυκήτων που έχουν εκτεθεί σε μυκητοκτόνα που δρουν ως αναστολείς της εργοστερόλης, χαρακτηρίζονται γενικά από βραχείς βλαστικούς σωλήνες με μορφολογικές ανωμαλίες, όπως διογκώσεις, που συχνά οδηγούν στην εκροή κυτταροπλάσματος ενώ η βλάστηση των σπορίων και η αρχική ανάπτυξη των βλαστικών σωλήνων δεν επηρεάζονται ορατά (Maruyama et al., 2007).

Η ανάπτυξη των μυκηλίων σταματά λόγω της αποσύνθεσης και κακής λειτουργίας των κυτταροπλασματικών μεμβρανών. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μυκητοκτόνων της ομάδας των αναστολέων της εργοστερόλης είναι η παρουσία ενός ακόρεστου πενταμελή ετεροκυκλικού δακτυλίου (περιέχει άζωτο), ο οποίος διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην δέσμευση του μυκητοκτόνου στο σημείο δράσεως.



Εικόνα 2: Χημική δομή του Imazalil.

Το IMZ είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο προστατευτικό και θεραπευτικό διασυστημικό μυκητοκτόνο τόσο στην προσυλλεκτική (ωΐδια), όσο και μετασυλλεκτική προστασία φρούτων και λαχανικών (Παθογόνα στόχοι: *Penicillium*, *Alternaria*, *Gloeosporium*, *Phomopsis*, *Phoma spp.*) (Erasmus et al., 2015). Επίσης, χρησιμοποιείται και ως επικαλυπτικό σπόρων (σιτηρά, βαμβάκι) ενάντια σε *Fusarium*

και *Helminthosporium spp.* αντικαθιστώντας τα βενζιμιδαζολικά στις περιπτώσεις όπου η αντοχή των μυκήτων στα βενζιμιδαζόλια μείωσε την αποτελεσματικότητά τους (Maruyama et al., 2007).

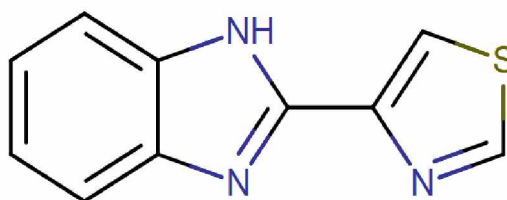
Επιπροσθέτως, το IMZ μεταβολίζεται σε R14821 [1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazole-1-yl)-1-ethanol] και ο μεταβολίτης αυτός ανιχνεύεται συχνά στα εσπεριδοειδή, επομένως απαιτούνται έλεγχοι και για τυχόν υπολείμματα του συγκεκριμένου μεταβολίτη (Yoshiooka et al., 2004). Μύκητες του γένους *Penicillium* που προσβάλλουν τα εσπεριδοειδή, ενοχοποιούνται για την πρόκληση διάφορων ασθενειών (πράσινη μούχλα) και αποτελούν σημαντικά παθογόνα τα οποία αντιμετωπίζει αποτελεσματικά το μυκητοκτόνο IMZ (Papoutsis et al., 2019). Πρόσφατα, η Ευρωπαϊκή Ένωση θέσπισε νέα μέγιστα όρια υπολειμμάτων (MRL) για το IMZ στα εσπεριδοειδή τα 4 mg / kg, ενώ σε άλλα φρούτα όπως οι μπανάνες το MRL ορίστηκε στο κατώτερο όριο ανίχνευσης (LOD = 0.01 mg / kg), που σημαίνει ότι το IMZ δε μπορεί πλέον να εφαρμοστεί μετασυλλεκτικά σε μπανάνες που προορίζονται για διάθεση εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Regulation 2019/1582).

Παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα στον άνθρωπο και στα θηλαστικά. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση, ότι επηρεάζει την δράση του κυτοχρώματος P450 και ότι έχει ανασταλτική δράση εναντίον της αρωματάσης CYP19, οποία καταλύει την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. (Kodama et al., 2003). Επίσης, παρουσιάζει οικοτοξική δράση με τιμή  $LC_{50} = 1.48$  mg/L στο ψάρι *Oncorhynchus mykiss* και τιμή  $EC_{50} = 3.5$  mg/L στο έντομο *Daphnia magna*. Όσον αφορά την περιβαλλοντική του τύχη, αναμένεται να μην εμφανίσει κινητικότητα στο έδαφος, με τιμές  $K_f$  και  $K_{foc}$  τα 126.9 και 4753 ml/gr αντίστοιχα και χρόνο ημιζωής  $DT_{50}$  στο έδαφος 76.3 ημέρες και στο νερό 6.1 ημέρες (Footprint PPDB, 2015). Σχετικά με τα φυσικοχημικά του χαρακτηριστικά, το IMZ παρουσιάζει

διαλυτότητα στο νερό στους 20°C ίση με 184 mg/L, μαζική πυκνότητα 1.35g/ml, σημείο αποδόμησης στους 260 °C, σημείο τήξης στους 51.5 °C και σταθερά pKa = 6.49 στους 25°C.

### 1.5.2 Thiabendazole

Το TBZ (2-(4-thiazolyl)-1H-benz-imidazole, Εικόνα 3), ανήκει στην κατηγορία των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων. Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα είναι τα πρώτα διασυστημικά μυκητοκτόνα που ανακαλύφθηκαν στην περίοδο του '60 και είναι ουσίες με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό.



Εικόνα 3: Χημική δομή του Thiabendazole([DrugBank Online | Database for Drug and Drug Target Info](#)).

Τα βενζιμιδαζολικά είναι ευρέως φάσματος προστατευτικά και θεραπευτικά μυκητοκτόνα, αποτελεσματικά εναντίον πολλών φυτοπαθογόνων μυκήτων, (*Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Nectria galligena*, *Sclerotinia fructicola*, *Verticillium sp.*, *Cercospora sp.* κλπ), εκτός των Φυκομυκήτων και των Ωομυκήτων. Εφαρμόζονται προσυλλεκτικά αλλά και μετασυλλεκτικά για την προστασία φρούτων και άλλων αποθηκευμένων προϊόντων (Danaher et al., 2007). Το TBZ ήταν το πρώτο βενζιμιδαζόλιο που βγήκε στην αγορά πριν από 40 χρόνια. Στη συνέχεια ακολούθησαν και άλλα εναλλακτικά βενζιμιδαζόλια αλλά το TBZ συνεχίζει



να χρησιμοποιείται επειδή είναι σχετικά φθινό σε σχέση με τα νεότερα σκευάσματα (Cannavan et al., 1998).

Το TBZ ανήκει στα μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στην αύξηση και στην ανάπτυξη των μυκηλιακών κυττάρων, παρεμποδίζοντας τις διεργασίες της μίτωσης και της κυτταροδιαίρεσης μέσω παρεμβολής στον πολυμερισμό της τουμπουλίνης και συνεπώς στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου (Danaher et al., 2007).

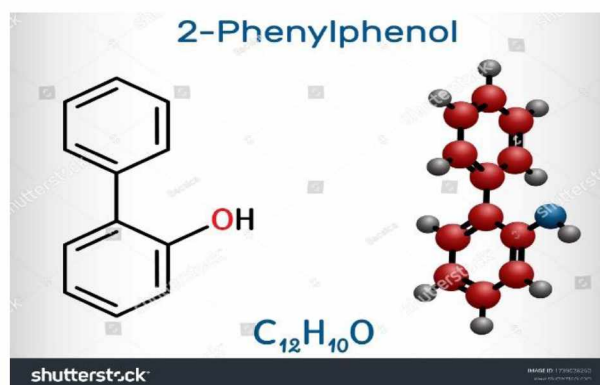
Στα ζώα, το TBZ μετασχηματίζεται ύστερα από υδροξυλίωση του άνθρακα 5 (C5) του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου στον κύριο μεταβολίτη του, το 5-hydroxythiabendazole (5 H-TBZ) (Cannavan et al., 1998).

Τα βενζιμιδαζολικά φάρμακα γενικά θεωρούνται ασφαλή σε δόσεις 20 με 30 φορές πάνω από τη συνιστώμενη. Αναφορές για οξεία τοξικότητα ζώων από βενζιμιδαζολικά είναι περιορισμένες. Αντίθετα, κύρια τοξική επίδραση τους αποτελεί η τερατογένεση που πρωτοαναφέρθηκε για το σκεύασμα parbendazole (PAR) (Danaher et al., 2007).

Το TBZ είναι ύποπτο για καρκινογένεση προκαλώντας αδενώματα του θυμοειδή και υπερπλασία των κυτταροοιστρογόνων σε αρουραίους (91/414/EEC/Thiabendazole). Ακόμα, εμφανίζει υψηλή τοξικότητα τους υδρόβιους οργανισμούς με  $LC_{50}$  στον *Oncorhynchus mykiss* τα 0.55 mg/L και  $EC_{50}$  στην *Daphnia magna* τα 0.81 mg/L. (Footprint PPDB, 2015). Παρουσιάζει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (30 mg/L), έχει μαζική πυκνότητα 1.4 g/ml, σημείο τήξης τους 297°C και σταθερά  $pK_a = 4.73$  στους 25°C. Όσον αφορά την περιβαλλονική του τύχη, το TBZ είναι ένα ιδιαίτερα έμμοιο μυκητοκτόνο με χαμηλή κινητικότητα στο έδαφος ( $K_f = 35.5$  ml/gr,  $K_{foc} = 2091$  ml/gr) και χρόνο ημιζωής ( $DT_{50}$ ) που ξεπερνά το έτος (κατά προσέγγιση 500 ημέρες) στο έδαφος και τις 203 ημέρες στο νερό.

### 1.5.3 *ortho*-Phenyl-Phenol

Το OPP (Εικόνα 4), έχει ευρεία χρήση στη μετασυλλεκτική προστασία λαχανικών και φρούτων, κυρίως εσπεριδοειδών, για αποφυγή προσβολών κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και αποθήκευσης από *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis citri* κ.α. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει ως ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων (MRL) του OPP τα 10 mg/kg σε εσπεριδοειδή και τα 20 mg/kg σε αχλάδια (Regulation 2018/78, EU).



Εικόνα 4: Χημική δομή του *ortho*-phenyl-phenol

Έχουν γίνει πολλές μελέτες από τις αρχές της δεκαετίας του 1960 και έχουν διατυπωθεί πολλές θεωρίες για τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του OPP αλλά δεν φαίνεται να εξηγούν ικανοποιητικά την πρωταρχική δράση του μυκητοκτόνου.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν διάφορες αναφορές σχετικά με την μικροβιακή αποδόμηση του OPP. Οι Sembiring και Winter, (1989), απομόνωσαν το βακτηριακό στέλεχος BIO από το ίζημα υγρών αποβλήτων βιομηχανίας ζάχαρης που περιείχαν το μυκητοκτόνο OPP. Το στέλεχος BIO είχε την δυνατότητα να διασπά το OPP (4.2 mmol/L) με ρυθμούς μέχρι και 0.4 mmol/L την ημέρα. Άλλες μελέτες από καλλιέργειες εμπλουτισμού εδάφους στο οποίο απορρίπτονται λύματα, είχαν σαν αποτέλεσμα την απομόνωση ενός αμιγούς στελέχους *Sphingomonas*

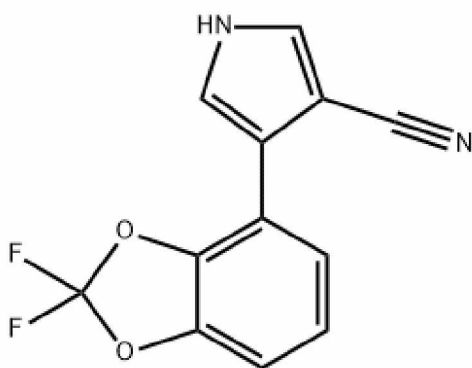
*haloaromaticamans* P3 ικανό να αποδομήσει γρήγορα το OPP και να το χρησιμοποιήσει ως πηγή ενέργειας (Perruchon et al., 2016). Το στέλεχος που απομονώθηκε, *S. haloaromaticamans*, ήταν σε θέση να μεταβολίζει έως και 150 mg/L του OPP εντός 7 ημερών, σε ένα ευρύ φάσμα pH (4,5-9) και θερμοκρασιών (4-37 ° C), και παρουσία άλλων γεωργικών φαρμάκων (TBZ, diphenylamine) που χρησιμοποιούνται από κοινού στη βιομηχανία συσκευασίας φρούτων (Perruchon et al., 2016). Τέλος, οι μύκητες λευκής σήψης *Trametes versicolor* και *Pleurotus ostreatus* αποδείχθηκε ότι επίσης διαθέτουν αποτελεσματική αποικοδομητική ικανότητα έναντι του φαινολικού OPP διασπώντας πλήρως έως και 50 mg/L του OPP (Karas et al., 2011).

Το OPP είναι ύποπτο για καρκινογένεση στον άνθρωπο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε ζώα, το OPP έδειξε ότι προκαλεί διαταραχή στην ανάπτυξη, μείωση γονιμότητας και βλάβη στα νεφρά (Kolbe et al., 2006). Η τοξικότητα που εμφανίζει το OPP σε υδρόβια σπονδυλωτά και ασπόνδυλα είναι μέτρια ( $LC_{50}$  *Oncorhynchus mykiss* = 4 mg/L και  $EC_{50}$  *Daphnia magna* = 2.7 mg/L) (Footprint PPDB, 2015). Όσον αφορά τα φυσικοχημικά του χαρακτηριστικά, το OPP είναι υδατοδιαλυτό (560 mg/L) και έχει μαζική πυκνότητα 1.22g/ml, σημείο τήξης στους 56.7 °C και σταθερά  $pK_a=9.4$  στους 25°C. Το OPP παρουσιάζει μέτρια κινητικότητα ( $K_f=8.68$  ml/g και  $K_{foc}=347$  ml/g) και χαμηλή υπολειμματικότητα ( $DT_{50}=4$  ημέρες) στο έδαφος ενώ είναι σταθερό σε υδατικά υποστρώματα. (Footprint PPDB, 2015).

#### 1.5.4 Fludioxonil

Το FLD (Εικόνα 5) είναι μυκητοκτόνο επιφανειακής δράσης, ανήκει στην ομάδα των φαινυλοπυρρόλων και δρα προληπτικά, παρεμποδίζοντας τη βλάστηση των σπόρων και την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα. Το FLD διεγείρει τη σύνθεση της

γλυκερόλης, ενός ρυθμιστή της ωσμωτικής ενδοκυτταρικής πίεσης των μυκήτων. Ο τρόπος δράσης του είναι να αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης, κατά το πρώτο στάδιο της γλυκολυτικής πορείας, μειώνοντας τον ρυθμό ανάπτυξης των μυκηλίων.



Εικόνα 5: Χημική δομή του Fludioxonil

Το FLD χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο σε διάφορες καλλιέργειες φρούτων και οπωροκηπευτικών, ιδίως σε μούρα και σόγια καθώς και για γκαζόν και χλοοτάπητες. Χρησιμοποιείται επίσης ως αντιμικροβιακό για χαλιά, κουρτίνες και στεγανωτικά υλικά.

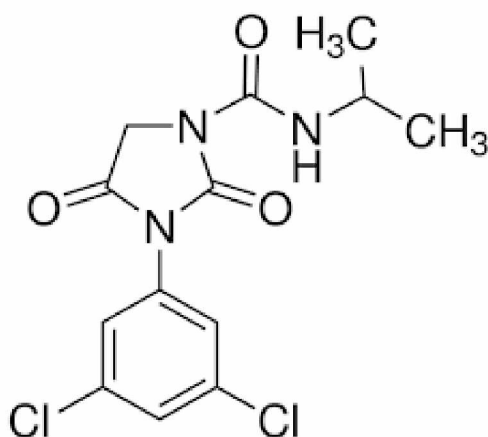
Οι εργαζόμενοι που το χρησιμοποιούν ή το παράγουν μπορεί να εισπνεύσουν σωματίδια ή να έχουν άμεση επαφή με το δέρμα. Η έκθεση στο γενικό πληθυσμό γίνεται μέσω των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά. Δεν έχουν αναφερθεί δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία υπαλλήλων που παράγουν FLD ή έρχονται σε επαφή με προϊόντα που το περιέχουν από την έναρξη της ιατρικής παρακολούθησης το 1992. Ελαφρός ερεθισμός των ματιών εμφανίστηκε σε ορισμένα εργαστηριακά ζώα μετά από άμεση έκθεση των ματιών στο FLD ενώ δεν παρατηρήθηκε ερεθισμός του δέρματος ή αλλεργικές δερματικές αντιδράσεις σε πειραματόζωα μετά από έκθεση στο δέρμα.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας δήλωσε ότι το FLD είναι απίθανο να προκαλέσει κίνδυνο καρκινογένεσης στον άνθρωπο. Το Πρόγραμμα Παρασιτοκτόνων του Γραφείου της EPA έχει ταξινομήσει το FLD ως μη ταξινομήσιμο ως προς την καρκινογένεση του ανθρώπου. Η πιθανότητα το FLD να προκαλέσει καρκίνο στον άνθρωπο δεν έχει αξιολογηθεί από το πρόγραμμα EPA IRIS των ΗΠΑ, τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο ή την 13η Έκθεση του Εθνικού Τοξικολογικού Προγράμματος των ΗΠΑ για τις Καρκινογόνες ουσίες (SRC) [Fludioxonil | C12H6F2N2O2 - PubChem \(nih.gov\)](#). Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν τοξικές επιδράσεις σε ζώα σε χαμηλές έως μέτριες δόσεις. Δεν παρατηρήθηκε αυξημένη υπογονιμότητα, άμβλωση ή γενετικές ανωμαλίες σε πειραματόζωα που έτρωγαν δίαιτες που περιέχουν FLD πριν και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Επίσης, το FLD δεν προκάλεσε καρκίνο σε δια βίου μελέτες έκθεσης σε πειραματόζωα. (*Brandhorst et al., 2018*). Το FLD εμφανίζει τοξικότητα σε ιχθύες ( $LC_{50}$  *Oncorhynchus mykiss* = 0.23 mg/L) και σε υδρόβια ασπόνδυλα ( $EC_{50}$  *Daphnia magna* = 0.4 mg/L).

Εάν το σκεύασμα απελευθερωθεί στο έδαφος ή στο νερό, προσροφάται στα κολλοειδή του εδάφους ( $K_f$  = 3312 ml/ g και  $K_{foc}$  = 132100 ml/g (*Footprint PPDB, 2015*)). Το FLD δεν μεταφέρεται στον αέρα από το έδαφος ή το νερό (τάση ατμών ίση με  $3.90 \cdot 10^{-04}$  mPa) ούτε μπορεί να διαλυθεί σε υδατικά υποστρώματα (διαλυτότητα ίση με 1.8 mg/L) αλλά μπορεί να συσσωρευτεί σε υδρόβιους μικροοργανισμούς. Όσον αφορά τα φυσικοχημικά του χαρακτηριστικά, το FLD παρουσιάζει μαζική πυκνότητα 1.54 g/ml, σημείο αποδόμησης = 306 °C, σημείο τήξης στους 199.8°C και σταθερά pKa = 0 στους 25°C (*Footprint PPDB, 2015*).

### 1.5.5 Iprodione

Το IPR [3-(3,5-διχλωροφαινυλο)-N-ισοπροπυλο-2,4-διοξοϊμιδαζολιδινο-1-καρβοξαμίδιο] (Εικόνα 6) είναι προστατευτικό δικαρβοξαμίδιο μυκητοκτόνο επαφής με ευρύ φάσμα δράσης που αναστέλλει τη βλάστηση των σπορίων των μυκήτων και μυκηλιακής ανάπτυξης. Χρησιμοποιείται ευρέως σε σιτηρά, οπωροφόρα, λαχανικά, καλλωπιστικά, και αμπέλια. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό εναντίον μυκήτων όπως οι *Botrytis cinerea*, *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Corticium sp*, *Aspergillus sp*, *Fusarium sp*, *Helminthosporium sp*, *Rhizoctonia sp*. (Grabke et al, 2013; Minambres et al., 2009). Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί έγκριση χρήσης του iprodione από την ΕΕ και ως νηματοδοκτόνο για τον έλεγχο νηματωδών του γένους *Meloidogyne sp* σε προστατευόμενες καλλιέργειες (EFSA, 2013). Το iprodione δρα σε όλες τις φάσεις του κύκλου ανάπτυξης των μυκήτων.



Εικόνα 6: Χημική δομή του Iprodione

Το IPR έχει ταξινομηθεί ως πιθανό καρκινογόνο (USEPA, 1998). Είναι γνωστό για τη μείωση της παραγωγής τεστοστερόνης, και μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει

καθυστέρηση κατά την ανάπτυξη του αρσενικού αρουραίου στο στάδιο της εφηβείας (Blystone et al., 2007).

Εμφανίζει διαλυτότητα στο νερό στους 20°C ίση με 6.8mg/L, σημείο τήξης τους 134 °C, σημείο αποδόμησης τους 233 °C και μαζική πυκνότητα ίση με 1.0 g/ml. Επίσης, δεν προσροφάται ισχυρά στα εδαφικά κolloειδή με  $K_{oc}$  700 ml/g (*Footprint PPDB, 2015*) και κατά συνέπεια εμφανίζει υψηλή κινητικότητα, με αποτέλεσμα υπολείμματα του να εντοπίζονται συχνά σε υπόγεια ύδατα που έχουν εκπλυθεί από αγροτικές περιοχές (Ludvigsen et al., 2004) αλλά και σε επιφανειακά νερά (Sequinatto et al., 2013). Ακόμα, διασπάται πολύ γρήγορα στο νερό υπό αερόβιες συνθήκες ενώ βραδύτερη αποδόμηση συνήθως παρατηρείται υπό αναερόβιες συνθήκες. Το IPR διασπάται εύκολα όταν εκτεθεί σε UV ακτινοβολία και διασπάται γρήγορα στο φυτό μετά τη λήψη από τις ρίζες ενώ όταν δρα μόνο του ή σε συνδυασμό με διάφορα άλλα μυκητοκτόνα δεν είναι φυτοτοξικό.

Το IPR είναι μετρίως υπολειμματικό στο έδαφος με χρόνους ημιζωής που κυμαίνονται από 7 έως περισσότερο από 100 ημέρες (Walker et al 1984,1986,1987). Το pH έχει βρεθεί ότι επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την υπολειμματικότητά του με ταχύτερη υδρόλυσή του να παρατηρείται σε αλκαλικά εδάφη. Γενικότερα, το αλκαλικό pH ευνοεί τόσο την αβιοτική όσο και την βιοτική αποδόμηση του IPR (Campos et al., 2015) ενώ αντίστροφα παρατηρείται ιδιαίτερα υψηλή υπολειμματικότητα του iprodione σε όξινα υποστρώματα όπως βιομίγματα με βάση την τύρφη όπου καταγράφηκαν χρόνοι ημιζωής > 1 έτος (Karanasios et al. 2010b). Στο πλαίσιο αυτό ο στοχευμένος βιοεμπλουτισμός τέτοιων όξινων βιομιγμάτων με μικροοργανισμούς που έχουν την εξειδικευμένη ικανότητα να μεταβολίζουν το IPR ίσως να αποτελεί μια επωφελή στρατηγική για την επιτυχή αποδόμηση του (Campos et al., 2017).

Ένας δεύτερος παράγοντας που καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την υπολειμματικότητα του στο έδαφος είναι η προηγούμενη επαναλαμβανόμενη χρήση του στο ίδιο έδαφος που οδηγεί στην εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης και απώλειας της μυκητοκτόνου δράσης του επηρεάζοντας το έδαφος και τις επιφυτικές μικροβιακές κοινότητες, με επιπτώσεις στην ομοιόσταση του συστήματος φυτού-εδάφους και στη γεωργική παραγωγή (Katsoula A. et al., 2020).

Εδάφη που παρουσιάζουν επιταχυνόμενη βιοαποικοδόμηση του IPR έχουν χρησιμοποιηθεί ως πηγή για την απομόνωση βακτηρίων που διασπών το iprodione (Athiel et al., 1995), όπως βακτήρια του γένους *Arthrobacter* (Campos et al., 2015).

Περαιτέρω μελέτες σε εδάφη που εμφάνιζαν ταχύτατη βιοαποδόμηση του IPR έδειξαν ότι μεταβολίζεται ταχύτατα προς 3,5-διχλωροανιλίνη (3,5-DCA) που αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη και άλλων δικαρθοξαμιδικών μυκητοκτόνων (Vanni et al., 2000). Ο μεταβολίτης αυτός θεωρείται το πιο έμμοно ισομερές της διχλωροανιλίνης στο έδαφος και αποδείχτηκε ότι είναι ισχυρό νεφροτοξικό σε αρουραίους και τοξικό για τους μικροοργανισμούς του εδάφους (Vanni et al., 2000). Η συσσώρευση του IPR και των υπολειμμάτων του 3,5-DCA σε φυσικούς πόρους θα μπορούσε να είναι επιβλαβής για την ανθρώπινη υγεία και την ποιότητα του περιβάλλοντος.

## 1.6 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Πολύ συχνά στα υγρά απόβλητα βιομηχανιών που επεξεργάζονται και συσκευάζουν φρούτα, λαχανικά και καλλωπιστικά είδη, ανιχνεύονται υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων.

Τα μυκητοκτόνα IMZ, TBZ, OPP, FLD και IPR χρησιμοποιούνται συχνά ως μετασυλλεκτικά επικαλυπτικά φρούτων με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται σε μεγάλες ποσότητες στα υγρά απόβλητα των μεταποιητικών βιομηχανιών. Η διαχείριση αυτών



των αποβλήτων τα οποία συχνά καταλήγουν χωρίς καμία επεξεργασία σε επιφανειακά ή υπόγεια υδροφόρα συστήματα εγείρει ιδιαίτερη ανησυχία όσον αφορά την περιβαλλοντική ρύπανση.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της ικανότητας αποδόμησης του μυκητοκτόνου imazalil από τον μύκητα *Mycosphaerella tassiana*, και η αποτίμηση της δράσης του παρουσία άλλων φυτοπροστατευτικών ουσιών (TBZ, FLD, OPP, IPR), με στόχο την εφαρμογή του στην αποτοξικοποίηση αποβλήτων συσκευαστηρίων φρούτων. Ο μύκητας *Mycosphaerella tassiana* απομονώθηκε από έδαφος που λάμβανε τακτική απόρριψη λυμάτων από βιομηχανία συσκευασίας φρούτων και ταυτοποιήθηκε από την υποψήφια διδάκτορα Χριστίνα Παπαζλατάνη στα πλαίσια της διδακτορικής της διατριβής. Ειδικότερα, στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η αποδομητική ικανότητα του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα MSMN και συγκεντρώσεις 50 mg/L των παραπάνω γεωργικών φαρμάκων.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η αποδομητική ικανότητα του μύκητα έναντι του μυκητοκτόνου IMZ σε εύρος τιμών pH (4.0, 6.5, 8.1) προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα που ευνοούν την ταχύτερη αποδόμηση του μυκητοκτόνου από αυτόν.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος Minimum Salt Medium Nitrogen (MSMN)

Η καλλιέργεια του απομονωμένου μύκητα που αποδομεί το γεωργικό φάρμακο imazalil (IMZ) έλαβε χώρα στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα αλάτων (MSMN). Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος MSMN απαραίτητη είναι η προετοιμασία των διαλυμάτων Stock 1, Stock 2, Stock 3, Γλυκόζης 10% και βιταμίνης B12 100 mg/L. Τα διαλύματα Stock 1 και Stock 2 και το διάλυμα γλυκόζης 10% (Πίνακας 1) αφότου παρασκευάστηκαν, αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 121 °C υπό πίεση 2.1 atm για 20 min. Το Stock 3 και το διάλυμα της βιταμίνης B12 (Πίνακας 1) είναι θερμοευαίσθητα, οπότε αποστειρώθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής με τη χρήση αποστειρωμένης σύριγγας και φίλτρου PES 0.22 μm.

Πίνακας 1 Σύνθεση επιμέρους διαλυμάτων για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος MSMN

Stock 1 (1L)	22,7 gr $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 59,7 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10 gr $\text{NH}_4\text{Cl}$
Stock 2 (1L)	5 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 gr $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,15 gr $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Stock 3 (1L)	0,46 gr $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Διάλυμα Γλυκόζης 10% (1L)	100 gr Glucose Monohydrate
Διάλυμα βιταμίνης B12 (1L)	100mg

Για την παρασκευή 1000 ml θρεπτικού υποστρώματος MSMN αρχικά αναμείχθηκαν 100 ml διαλύματος Stock 1, 0.15 gr υδρολύματος καζεΐνης και 730 ml

απιονισμένου ύδατος. Το μίγμα αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 °C υπό πίεση 2.1 atm για 20 min. Στην συνέχεια σε αποστειρωμένο θάλαμο νηματικής ροής προστέθηκαν 100 ml Stock 2, 20 ml Stock 3, 50 ml διαλύματος γλυκόζης 10% και 250 μl διαλύματος βιταμίνης B12.

Τέλος, για τις ανάγκες των πειραματικών δοκιμών στο MSMN προστέθηκε και ποσότητα από υδατικά διαλύματα των εμπορικών σκευασμάτων FUNGAZIL® 500 EC (IMZ), SCHOLAR ® 230 SC (FLD), TECTO ® 50% SC (TBZ), FOAMER ® 20 EC (OPP) και ROVRAL ® 50 SC (IPR).

## **2.2 Μέθοδοι ανάλυσης σε σύστημα HPLC-PDA του εργαστηρίου**

### **2.2.1 Εκχύλιση των υπολειμμάτων των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων**

Για την εκχύλιση των υπολειμμάτων των IMZ και FLD από την υγρή καλλιέργεια του μύκητα παραλήφθηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες, 200 μl καλλιέργειας και αναμίχθηκαν με 800 μl μεθανόλης (MeOH), ενώ για τα TBZ και OPP χρησιμοποιήθηκαν 300 μl καλλιέργειας και 600 μl MeOH. Η εκχύλιση των υπολειμμάτων του IPR και του κύριου μεταβολίτη του 3,5-DCA έγινε με ανάμιξη 300 μl καλλιέργειας και 600 μl ακετονιτριλίου (ACN). Σε όλες τις περιπτώσεις τα δείγματα αναδεύθηκαν σε vortex για 10-12 sec, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στα 13300 rpm και τέλος μεταφορά του υπερκείμενου σε φιαλίδια HPLC, προκειμένου να αναλυθούν στο σύστημα της HPLC.

### **2.2.2 Ανάλυση σε σύστημα HPLC-PDA**

Η ανάλυση και ο προσδιορισμός της αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων στις υγρές καλλιέργειες του πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

(HPLC, Shimadzu Corp.) με στήλη Analytical Shim-pack VP-ODS (150 mm Length x 4.6 mm I.D.) (Shimadzu), προστήλη Guard Column Shim-pack GVP-ODS (5mm Length x 2mm I.D.). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων Prominence – Diode Array Detector SPD-M20A (Shimadzu). Ο προσδιορισμός του μυκητοκτόνου IMZ στο σύστημα HPLC έγινε ισοκρατικά με κινητή φάση αποτελούμενη από MeOH (80% v/v) και υδατικό διάλυμα NH<sub>3</sub> 0.25% (20% v/v). Η ανίχνευση του IMZ πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 204 nm και χρόνος κατακράτησης του ήταν 5.4 min. Ο διαχωρισμός του FLD πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά με κινητή φάση MeOH : H<sub>2</sub>O 70 : 30 % v/v. Υπό αυτές τις συνθήκες ο χρόνος κατακράτησης ήταν στα 5.6 min. Η ανίχνευση του FLD έγινε στα 207 nm. Για τον προσδιορισμό των μυκητοκτόνων TBZ και OPP χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση αποτελούμενη από ACN και υδατικό διάλυμα 0.25% NH<sub>3</sub> σε ογκομετρικές αναλογίες 25:75 και 60:40 αντίστοιχα. Η ανίχνευση των TBZ και OPP πραγματοποιήθηκε στα 210 nm και 245 nm και οι χρόνοι κατακράτησης ήταν 7.4 και 4.6 min αντίστοιχα. Ο διαχωρισμός των IPR και 3,5-DCA πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά με κινητή φάση 70% ACN και 30 % H<sub>2</sub>O. Η ανίχνευση και των 2 μορίων έγινε στα 220 nm και οι χρόνοι κατακράτησης ήταν 4.3 και 3.7 min για το IPR και την 3,5-DCA αντίστοιχα.

### 2.2.3 Καμπύλες αναφοράς

Ο ποσοτικός προσδιορισμός όλων των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε με χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Αρχικά παρασκευάστηκαν πρότυπα διάλυματα 1000 µg/ml σε MeOH για όλα τα υπό μελέτη γεωργικά φάρμακα από τα παρακάτω αναλυτικά πρότυπα υψηλής καθαρότητας, TBZ (99.9%), IMZ (99.8%), OPP (99.9%), FLD (99.9%), IPR (99%) και 3.5-DCA (≥99.7%).

Ακολούθως παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 10, 5, 2, 1, 0.5 , 0.1, 0.05 και 0.01 µg/ml σε MeOH με διαδοχικές αραιώσεις, ενώ αργότερα έγινε έγχυση του καθενός από τα πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC. Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε συσχετίστηκε με την συγκέντρωση της εκάστοτε αναλυτικής ουσίας ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

### **2.3 Μέθοδος συλλογής κονιδίων του μύκητα *Mycosphaerella tassiana***

Με σκοπό τη δημιουργία κονιδιακού εμβολίου για τον εμβολιασμό των καλλιεργειών, επιστρώσαμε το μυκητιακό στέλεχος σε τρυβλία με MSMN + IMZ τα οποία επώασαμε στους 25°C για 2 βδομάδες. Η συλλογή των κονιδίων πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, με μεταφορά 5 ml αποστειρωμένου NaCl 0.85% στο τρυβλίο με αποστειρωμένο σιφόνιο και απόξυση της επιφάνειας του ώστε να αποκολληθούν τα κονίδια. Στη συνέχεια, το εναιώρημα των κονιδίων μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες φυγοκέντρησης των 50 ml και ακολούθησε ακόμα μία πλύση του τρυβλίου με NaCl για τη συλλογή του συνόλου των κονιδίων. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 8000 rpm για 30 min στους 16°C. Το υπερκείμενο, απομακρύνθηκε προσεκτικά και το κονιδιακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 5ml NaCl 0.85% μετά από έντονη ανάδευση (vortex) για 20 sec.

### **2.4 Μέθοδος μέτρησης κονιδίων του μύκητα *Mycosphaerella tassiana***

Η μέτρηση των κονιδίων του μύκητα πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της πλάκας Neubauer ή αιμοκυτταρόμετρου. 10 µl του κονιδιακού εναιωρήματος τοποθετήθηκαν στις εσοχές της πλάκας, η οποία στη συνέχεια μεταφέρθηκε για παρατήρηση και μέτρηση των κονιδίων στο οπτικό μικροσκόπιο Leica.

Η πλάκα Neubauer αποτελεί την πιο διαδομένη, απλή και εύχρηστη μέθοδο για μέτρηση κυττάρων, και στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των κονιδίων του μύκητα *M. tassiana*. Η πλάκα Neubauer είναι ένα πλακίδιο σε μέγεθος 30x70 mm και πάχος 4 mm. Ο θάλαμος καταμέτρησης είναι η κεντρική περιοχή όπου πραγματοποιούνται οι μετρήσεις των κυττάρων. Ο θάλαμος αποτελείται από τρία μέρη: 1) το κεντρικό τμήμα, όπου το πλέγμα μέτρησης έχει χαραχθεί με λέιζερ στο γυαλί και 2) οι διπλοί θάλαμοι/περιοχές καταμέτρησης που μπορούν να μετρηθούν ανεξάρτητα. Το πλέγμα μέτρησης της πλάκας έχει μέγεθος 3x 3 mm και διαθέτει 9 τετραγωνικές υποδιαίρεσεις πλάτους 1 mm. Το κεντρικό τετράγωνο χωρίζεται σε 25 τετράγωνα πλάτους 0.2 mm (200μm). Καθένα από τα 25 κεντρικά τετράγωνα υποδιαιρείται σε 16 μικρά τετράγωνα. Επομένως, η κεντρική διάταξη αποτελείται από 400 μικρά τετράγωνα. Τέλος, η γυάλινη καλυπτρίδα που τοποθετείται πάνω στην πλάκα Neubauer είναι ένα τετράγωνο γυαλί πλάτους 22 mm, το οποίο καλύπτει την κεντρική περιοχή της πλάκας. Ο θάλαμος έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε η απόσταση μεταξύ του πυθμένα του θαλάμου και της καλυπτρίδας να είναι 0.1 mm.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των κονιδίων στο αρχικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:  $\text{Κονίδια} / \text{ml} = (\text{Κονίδια} / (\text{αριθμός\_τετραγώνων} * \text{βάθος\_τετραγώνων} * \text{παράγοντας\_αραίωσης})) * 1000$

## **2.5 Πειραματικός σχεδιασμός**

### **2.5.1 Μελέτη της αποδόμησης του μύκητα *Mycosphaerella tassiana* παρουσία διάφορων μυκητοκτόνων**

Στόχος του πειράματος ήταν η μελέτη της απόκρισης του μύκητα παρουσία των μυκητοκτόνων γεωργικών φαρμάκων IMZ, FLD, TBZ, OPP και IPR, τα οποία

χρησιμοποιούνται ευρέως από τα συσκευαστήρια φρούτων και αναμένεται να συνυπάρχουν με το IMZ στα υγρά απόβλητα. Έτσι, με βάση τις παρατηρήσεις μας μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την απόκριση του συγκεκριμένου μύκητα σε μυκητοκτόνα με τα οποία πιθανόν θα έρθει σε επαφή κατά τη χρήση του για απορρύπανση αποβλήτων των συσκευαστηρίων φρούτων. Για το σκοπό αυτό προετοιμάστηκαν 15 καλλιέργειες του μύκητα *M. tassiana* σε MSMN, στις οποίες ανά 3 προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα των υδατικών διαλυμάτων των εμπορικών σκευασμάτων των υπό μελέτη μυκητοκτόνων, ούτως ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι 50 mg/L. Παράλληλα προετοιμάστηκαν και 2 μεταχειρίσεις για κάθε μυκητοκτόνο οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν με το μυκητιακό στέλεχος και χρησιμοποιήθηκαν ως αβιοτικοί μάρτυρες. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 25°C, υπό ανάδευση στα 160 rpm. Κάθε 2 ημέρες γίνονταν εκτίμηση της συγκέντρωσης των μυκητοκτόνων στο σύστημα HPLC-PDA.

### **2.5.2 Μελέτη της αποδομητικής ικανότητας και ανάπτυξης του μύκητα**

#### ***Mycosphaerella tassiana* σε διάφορες τιμές pH**

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, αξιολογήσαμε την αποδομητική ικανότητα του μύκητα σε εύρος pH, με στόχο την εύρεση συνθηκών μέγιστης αποδόμησης, μελετώντας παράλληλα με την αποδόμηση του IMZ και την ανάπτυξη του μυκηλιακού στελέχους σε εύρος pH. Για το σκοπό αυτό αρχικά προετοιμάστηκαν θρεπτικά μέσα MSMN στα οποία το pH προσαρμόστηκε στις τιμές 4 και 8.1 με προσθήκη υπό ασηπτικές συνθήκες αποστειρωμένου διαλύματος HCl 5M ή NaOH 5M αντίστοιχα, καθώς και ένα θρεπτικό μέσο σε ουδέτερο pH. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει την προετοιμασία 24 καλλιεργειών του μύκητα για κάθε τιμή pH (4.0,

6.5 και 8.1). Σε 12 από αυτές τις καλλιέργειες προστέθηκε ποσότητα του υδατικού διαλύματος του εμπορικού σκευάσματος του IMZ ούτως ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 50 mg/L ενώ στις υπόλοιπες 12 δεν προστέθηκε το μυκητοκτόνο. Παράλληλα για κάθε τιμή pH προετοιμάστηκαν και 2 αβιοτικοί μάρτυρες με 50 mg/L IMZ, οι οποίοι δεν εμβολιάστηκαν με το μυκητιακό στέλεχος. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 25°C, υπό ανάδευση στα 160 rpm. Η αποδόμηση του IMZ ελέγχονταν τακτικά σε σύστημα HPLC-PDA. Σε συγκεκριμένα σημεία της αποδόμησης του IMZ, 3 καλλιέργειες με το μυκητοκτόνο και 3 χωρίς το μυκητοκτόνο, απομακρύνονταν από την καλλιέργεια και αξιολογούνταν η ανάπτυξη του μύκητα, μέσω προσδιορισμού του βάρους της υγρής και ξηρής βιομάζας, του αριθμού των κονιδίων και του pH των καλλιεργειών.

Αναλυτικότερα, για την συλλογή του συνόλου της βιομάζας του μύκητα, πραγματοποιήθηκε απόχυση της καλλιέργειας μέσα από αποστειρωμένο χωνί και τουλουπάνι. Η βιομάζα του μύκητα που κατακρατήθηκε στο τουλουπάνι, μεταφέρθηκε σε ειδικά δοχεία από αλουμινόχαρτο και επώαστηκε στους 70°C για 16 ώρες. Στην συνέχεια αξιολογήθηκε το ξηρό βάρος της. Παράλληλα, το διηθημένο υπερκείμενο της καλλιέργειας που προέκυψε, φυγοκεντρήθηκε στα 8000 rpm, στους 16°C για 30 λεπτά και τα κονίδια επαναδιαλύθηκαν σε όγκο 5 ml. Στην συνέχεια προσδιορίστηκε ο αριθμός των κονιδίων σε οπτικό μικροσκόπιο, με χρήση της πλάκας Neubauer, όπως περιγράφεται παραπάνω. Τέλος, από κάθε καλλιέργεια, συλλέχθηκαν 5 ml υπερκειμένου τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της τιμής pH της καλλιέργειας.



## 2.6 Στατιστική Ανάλυση

Για την αξιολόγηση της αποδομητικής ικανότητας του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν δύο κινητικά μοντέλα, το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO, Single First Order) και το διαφασικό μοντέλο Hockey Stick, βάση των οποίων υπολογίστηκαν ο χρόνος ημιζωής ( $DT_{50}$ ) και ο ρυθμός διάσπασης των γεωργικών φαρμάκων ( $k_{deg}$ ).

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πακέτου R και του προγράμματος R studio και η ανάλυση κινητικής με τη χρήση των μοντέλων που αναφέρονται παραπάνω. Η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου βασίστηκε στη δοκιμή  $\chi^2$  και σε οπτική αξιολόγηση των δεδομένων αποδόμησης. Η δοκιμή  $\chi^2$  συνίσταται ως εργαλείο σύγκρισης μοντέλων και ως συμπληρωματικό εργαλείο για αξιολόγηση της καλής προσαρμογής ενός μεμονωμένου μοντέλου. Ιδανικά, η τιμή σφάλματος για το  $\chi^2$  ώστε να είναι αποδεκτό, πρέπει να είναι κάτω από 15% για τους μεταβολίτες και τις μητρικές ουσίες (*FOCUS Work Group on Degradation Kinetics. 2006*).

Η απλή κινητική πρώτης τάξης (Single First Order Kinetics- SFO) είναι μια απλή εκθετική εξίσωση με δύο μόνο παραμέτρους. Υποθέτει ότι ο αριθμός των μορίων των γεωργικών φαρμάκων είναι μικρός σε σχέση με τον αριθμό των αποικοδομητικών μικροοργανισμών και των ενζύμων τους ή του αριθμού των μορίων νερού στην περίπτωση της υδρόλυσης. Κατά συνέπεια, ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης των φαρμάκων ( $dM/dt$ ) είναι σε οποιοδήποτε χρονική στιγμή άμεσα ανάλογος με την πραγματική συγκέντρωση που απομένει στο σύστημα. Στην κινητική πρώτης τάξης, ο χρόνος για μείωση της συγκέντρωσης κατά ένα ορισμένο ποσοστό είναι σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και ανεξάρτητος από την αρχική συγκέντρωση της φυτοπροστατευτικής ουσίας. Για παράδειγμα, ο χρόνος για τη μείωση της συγκέντρωσης από 100% σε 50% της αρχικής ποσότητας είναι όμοιος με το χρόνο

μείωσης από 50% σε 25% της αρχικής ποσότητας. Έτσι, οι τιμές  $DT_{50}$  και  $DT_{90}$  είναι εύκολο να ερμηνευθούν και το μοντέλο SFO χρησιμοποιείται συχνά για να περιγράψει την αποδόμηση που αφορά την περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων.

Η αποδόμηση, όμως, δε μπορεί πάντα να περιγραφεί με το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης. Μια γρήγορη αρχικά μείωση της συγκέντρωσης του γεωργικού φαρμάκου μπορεί συχνά να ακολουθείται από βραδύτερη μείωση. Αυτό συνήθως αναφέρεται ως το μοντέλο κινητικής δεύτερης τάξης Hockey-Stick (HS) το οποίο αποτελείται από 2 διαδοχικές καμπύλες πρώτης τάξης. Η συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου αρχικά μειώνεται σύμφωνα με την κινητική πρώτης τάξης με σταθερή ταχύτητα  $k_1$ . Σε κάποιο συγκεκριμένο χρονικό σημείο, η σταθερά ρυθμού μεταβάλλεται σε διαφορετική τιμή  $k_2$ . Για τυπικά μοντέλα κινητικής δεύτερης τάξης, η σταθερά ρυθμού  $k_1$  είναι συνήθως μεγαλύτερη από την  $k_2$ .

Η ανάλυση συσχέτισης (correlation analysis) χρησιμοποιείται με σκοπό να υπολογιστεί ο βαθμός συσχέτισης δύο μεταβλητών και να προσδιοριστεί η κατεύθυνση της μεταξύ τους σχέσης. Ο συντελεστής συσχέτισης κατά Spearman χαρακτηρίζεται ως μη – παραμετρικός και υπολογίζεται ως εξής:

$$r_R = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

όπου  $n$  : το πλήθος των παρατηρήσεων του δείγματος,  $d_i$ : είναι η διαφορά των τάξεων των τιμών  $x_i$  και  $y_i$  μιας παρατήρησης  $i$ . Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman λαμβάνει τιμές στο διάστημα  $[-1, +1]$ . Τιμές του συντελεστή συσχέτισης κοντά στο 1 ή το -1 υποδηλώνουν γραμμική συσχέτιση (θετική ή αρνητική), ενώ σε τιμές κοντά στο μηδέν υπάρχει απουσία συσχέτισης. Ο όρος “θετική” σημαίνει πως όταν μια μεταβλητή ( $x$ ) αυξάνεται ή μειώνεται, μια άλλη μεταβλητή ( $y$ ) αυξάνεται ή μειώνεται αντιστοίχως. Μια σημαντικότητα ( $p$ -value) υπολογίζεται για να καθορίσει την πιθανότητα μια

συγκεκριμένη συσχέτιση να εμφανιστεί κατά τύχη και αντιπροσωπεύει το βαθμό σπανιότητας ενός ορισμένου αποτελέσματος. Μια τιμή p-value μικρότερη από 0,05 σημαίνει ότι υπάρχει λιγότερο από 5% πιθανότητα μια συγκεκριμένη σχέση μεταξύ μεταβλητών να εμφανίστηκε κατά τύχη.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, οι μεταβλητές που θα αναλυθούν για τη μεταξύ τους συσχέτιση είναι ο ρυθμός αποδόμησης του imazalil, η βιομάζα του μυκηλίου, οι μεταβολές του pH και τα κονιδία στο εύρος τιμών pH ανάπτυξης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο εντολών "corrplot" (Taiyun Wei et al., 2017) μέσω λογισμικού R Studio.

Πίνακας 2 Οι μαθηματικές εξισώσεις που περιγράφουν τη διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων για τα δύο μοντέλα κινητικής που χρησιμοποιήθηκαν (FOCUS 2006).

Μοντέλο Κινητικής	Μαθηματική Εξίσωση	Παράμετροι
<b>SFO</b>	$M = M_0 e^{-kt}$	$M_0$ : Αρχική συγκέντρωση $k$ : Συντελεστής κινητικής
<b>Hockey Stick</b>	$M = M_0 e^{-k_1 t}$ για $t \leq t_b$ $M = M_0 e^{-k_1 t_b} e^{-k_2(t-t_b)}$ για $t > t_b$	$M_0$ : Αρχική συγκέντρωση $k_1, k_2$ : Συντελεστής κινητικής $t$ : χρονικό σημείο όπου αλλάζει ο συντελεστής κινητικής

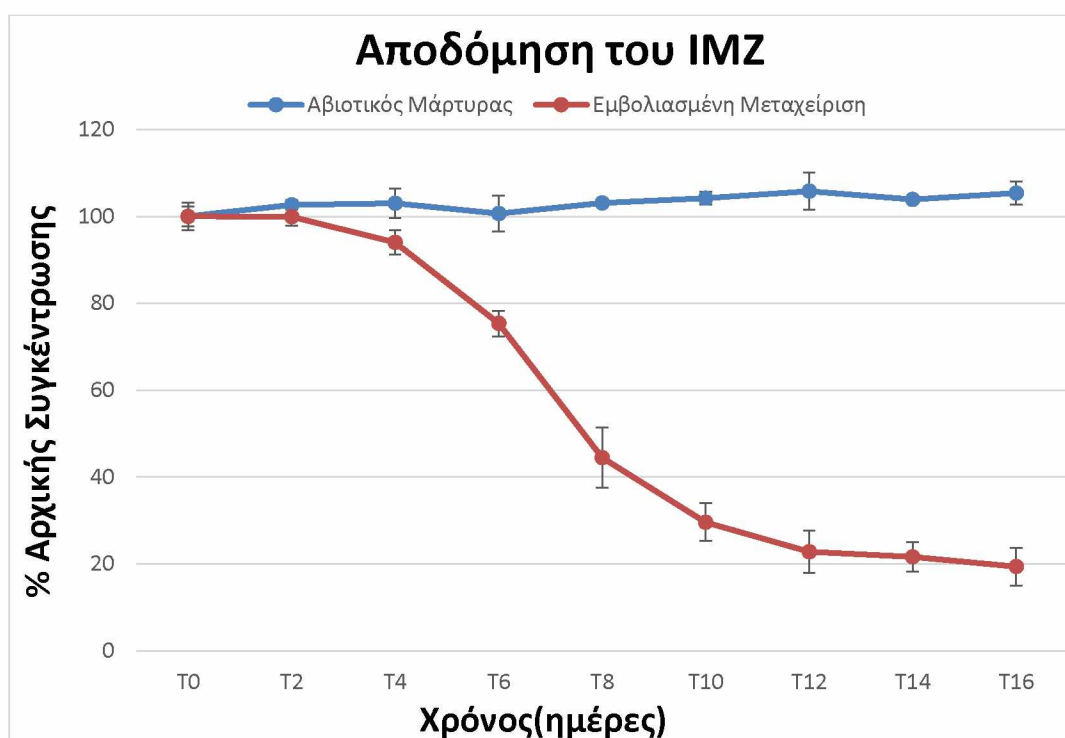
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Μελέτη της αποδόμησης του μύκητα *Mycosphaerella tassiana* παρουσία

#### διάφορων μυκητοκτόνων γεωργικών φαρμάκων

##### 3.1.1 Αποδόμηση του μυκητοκτόνου Imazalil

Ο μύκητας *Mycosphaerella tassiana* αποδόμησε το 80 % του IMZ στην υγρή καλλιέργεια κατά την πειραματική διάρκεια των 16 ημερών (Διάγραμμα 1), με σταθερά αποδόμησης 0.106 mg / ημέρα, όπως υπολογίστηκε από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO) (Πίνακας 3). Παράλληλα με την αποδόμηση παρατηρήσαμε και ανάπτυξη του μύκητα στα εμβολιασμένα δείγματα (Εικόνα 7).



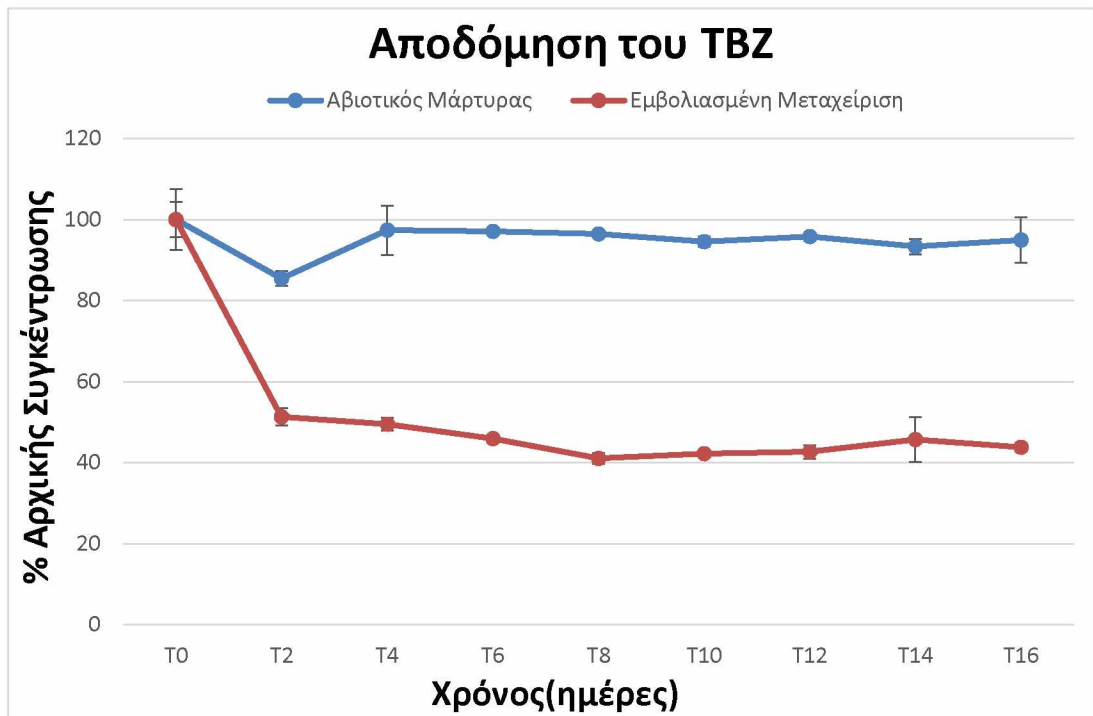
Διάγραμμα 1 : Αποδόμηση του IMZ σε καλλιέργεια MSMN που εμβολιάστηκε με το μύκητα *M. tassiana* (κόκκινη γραμμή) και στον άβιοτικό μάρτυρα (μπλε γραμμή).



Εικόνα 7: Οι καλλιέργειες του μυκητιακού στελέχους *M. tassiana* σε MSMN με IMZ, στο πέρας της επωαστικής περιόδου.

### 3.1.2 Αποδόμηση του μυκητοκτόνου Thiabendazole

Η συγκέντρωση του TBZ από το μυκητιακό στέλεχος παρουσιάζει μια μείωση έως την δεύτερη ημέρα της επώασης και στη συνέχεια παραμένει σχετικά σταθερή, (Διάγραμμα 2). Η αποδόμηση περιγράφηκε ικανοποιητικά από το μοντέλο κινητικής Hockey Stick (HS) με σταθερές αποδόμησης 0.334 και 0.00674 mg/ημέρα και το σημείο καμπής τις 2 ημέρες (Πίνακας 3). Οι σταθερές αποδόμησης για τον αβιοτικό μάρτυρα είναι 0.029 και  $1.65 \cdot 10^{-12}$  mg/ημέρα. Παράλληλα παρατηρήθηκε έντονη ανάπτυξη του μύκητα (Εικόνα 8).



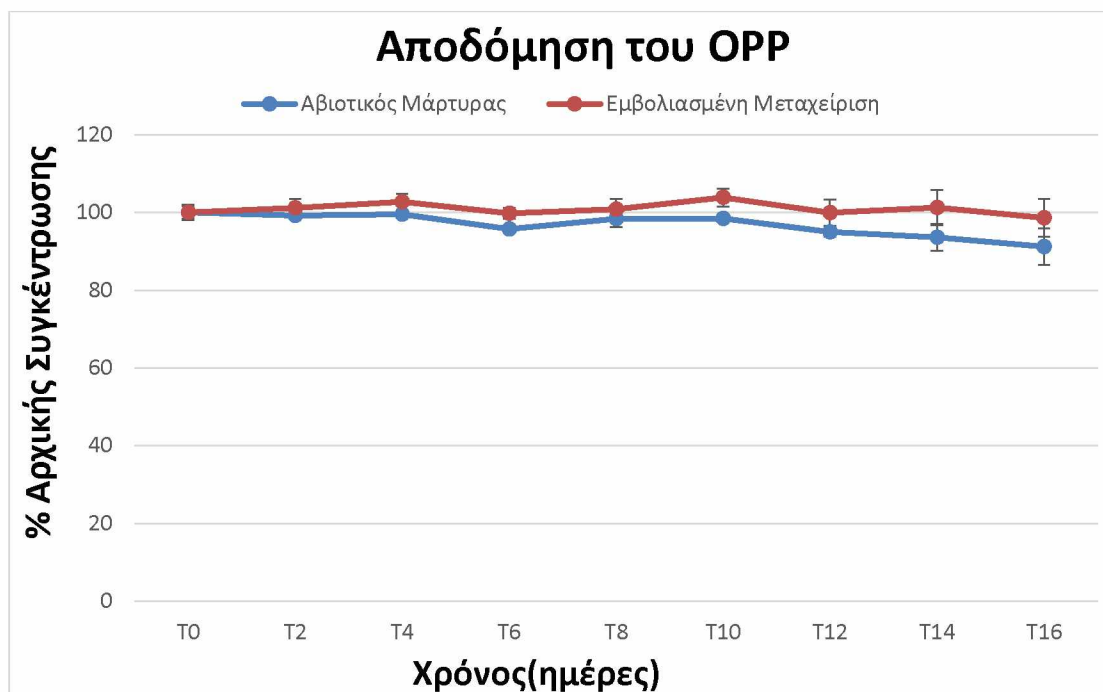
Διάγραμμα 2: Αποδόμηση του TBZ σε καλλιέργεια MSMN που εμβολιάστηκε με το μύκητα *M. tassiana* (κόκκινη γραμμή) και στον αβιοτικό μάρτυρα (μπλε γραμμή).



Εικόνα 8: Οι καλλιέργειες του μυκητιακού στελέχους *M. tassiana* σε MSMN με TBZ, στο πέρας της επωαστικής περιόδου.

### 3.1.3 Αποδόμηση του μυκητοκτόνου *ortho*-phenyl-phenol(OPP)

Ο μύκητας *Mycosphaerella tassiana* δεν κατάφερε να αποδομήσει το μυκητοκτόνο OPP (Διάγραμμα 3) ενώ δεν σημειώθηκε μυκηλιακή ανάπτυξη (Εικόνα 9).



Διάγραμμα 3 : Αποδόμηση του OPP σε καλλιέργεια MSMN που εμβολιάστηκε με το μύκητα *M. tassiana* (κόκκινη γραμμή) και στον αβιοτικό μάρτυρα (μπλέ γραμμή).

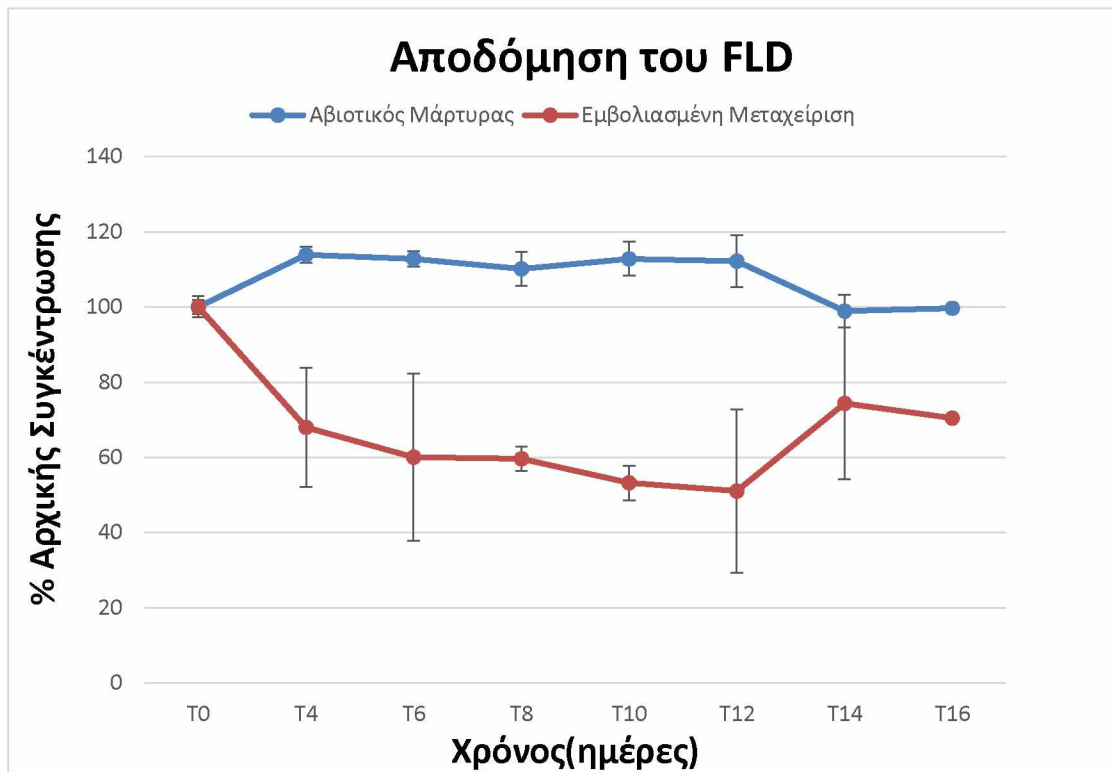


Εικόνα 9: Οι καλλιέργειες του μυκητιακού στελέχους *M. tassiana* σε MSMN με OPP, στο πέρας της επωαστικής περιόδου.

#### 3.1.4 Αποδόμηση του μυκητοκτόνου Fludioxonil

Η συγκέντρωση του FLD μειώθηκε έως το 50 % της αρχικής συγκέντρωσης κατά την διάρκεια της επωαστικής περιόδου. Η αποδόμηση του FLD περιγράφηκε ικανοποιητικά από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης με ρυθμό αποδόμησης 0.02435 mg /ημέρα για την εμβολιασμένη καλλιέργεια και  $2.738 \cdot 10^{-3}$  mg /ημέρα για τον αβιοτικό μάρτυρα (Πίνακας 3). Στο τέλος της πειραματικής περιόδου δεν παρατηρήθηκε σημαντική ανάπτυξη της μυκηλιακής βιομάζας (Εικόνα 10).





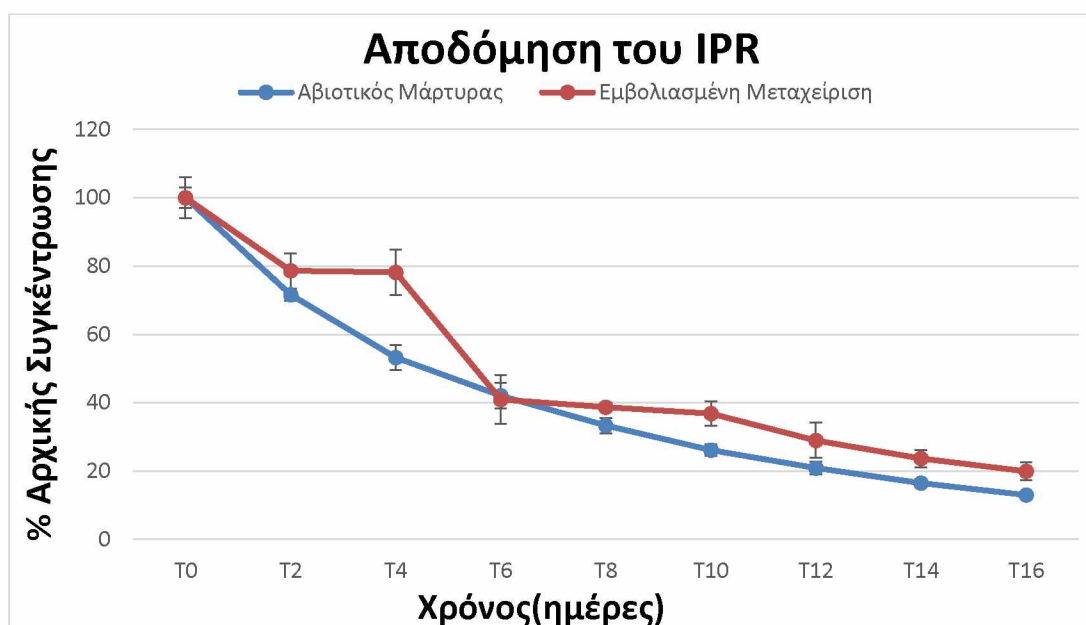
Διάγραμμα 4 : Αποδόμηση του FLD σε καλλιέργεια MSMN που εμβολιάστηκε με το μύκητα *M. tassiana* (κόκκινη γραμμή) και στον αβιοτικό μάρτυρα (μπλέ γραμμή).



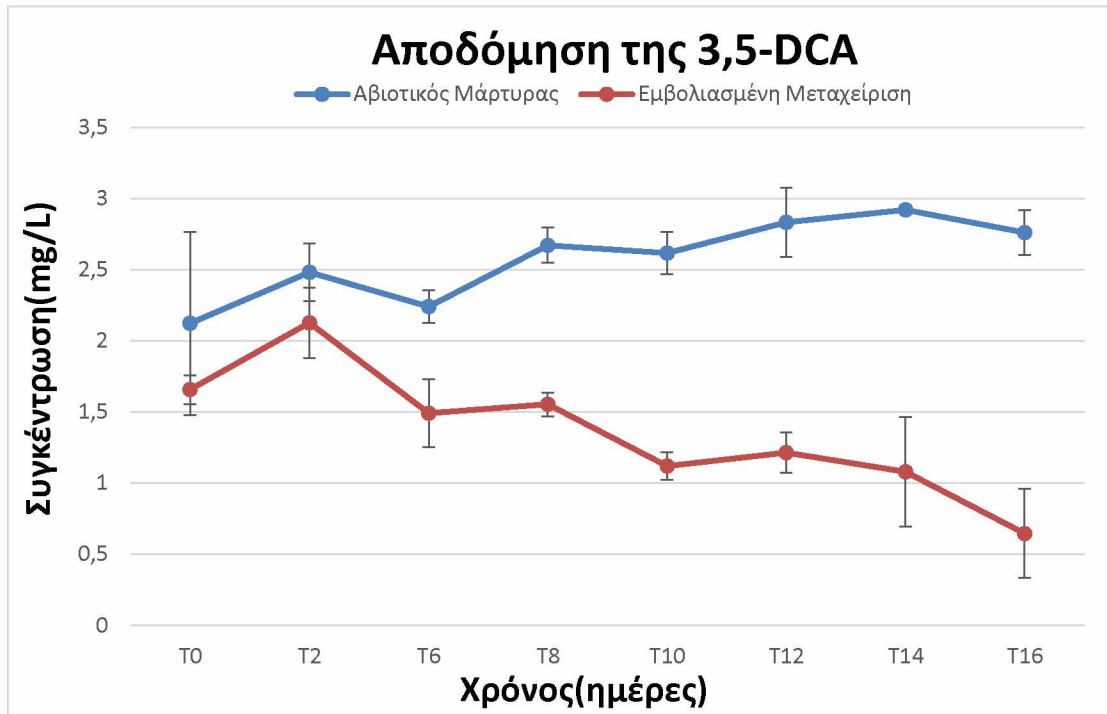
Εικόνα 10: Οι καλλιέργειες του μυκητιακού στελέχους *M. tassiana* σε MSMN με FLD, στο πέρας της επωαστικής περιόδου.

### 3.1.5 Αποδόμηση του μυκητοκτόνου Iprodione

Η συγκέντρωση του μυκητοκτόνου IPR παρουσιάζει μείωση και στην εμβολιασμένη καλλιέργεια και στον αβιοτικό μάρτυρα (Διάγραμμα 5) με ρυθμούς αποδόμησης 0.109 και 0.134 mg/ημέρα αντίστοιχα (Πίνακας 3). Παράλληλα με την συγκέντρωση του IPR, παρακολούθησαμε και την πορεία της συγκέντρωσης της 3,5-DCA, η οποία αυξάνεται καθώς μειώνεται η συγκέντρωση του IPR (Διάγραμμα 6). Ο συντελεστής σχηματισμού της 3,5-DCA από το IPR είναι 0.358 και 1 για τον αβιοτικό μάρτυρα και την εμβολιασμένη καλλιέργεια αντίστοιχα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η συγκέντρωση της 3,5-DCA μειώνεται μετά την 2<sup>η</sup> ημέρα στην εμβολιασμένη καλλιέργεια σε αντίθεση με τον αβιοτικό μάρτυρα όπου συνεχίζει να συσσωρεύεται (Διάγραμμα 6). Ο ρυθμός αποδόμησης της 3,5-DCA είναι 0.687 και 0.079 mg/ημέρα στην εμβολιασμένη καλλιέργεια και στον αβιοτικό μάρτυρα αντίστοιχα. Κατά την διάρκεια της επωαστικής περιόδου, παρατηρήθηκε ανεμπόδιστη ανάπτυξη της *M. tassiana* (Εικόνα 11).



Διάγραμμα 5 : Αποδόμηση του IPR σε καλλιέργεια MSMN που εμβολιάστηκε με το μύκητα *M. tassiana* (κόκκινη γραμμή) και στον αβιοτικό μάρτυρα (μπλέ γραμμή).



Διάγραμμα 6 : Αποδόμηση της 3,5-DCA σε καλλιέργεια MSMN που εμβολιάστηκε με το μύκητα *M. tassiana* (κόκκινη γραμμή) και σε καλλιέργεια MSMN χωρίς μύκητα (μπλέ γραμμή).



Εικόνα 11: Οι καλλιέργειες του μυκητιακού στελέχους *M. tassiana* σε MSMN με IPR, στο πέρας της επωαστικής περιόδου.

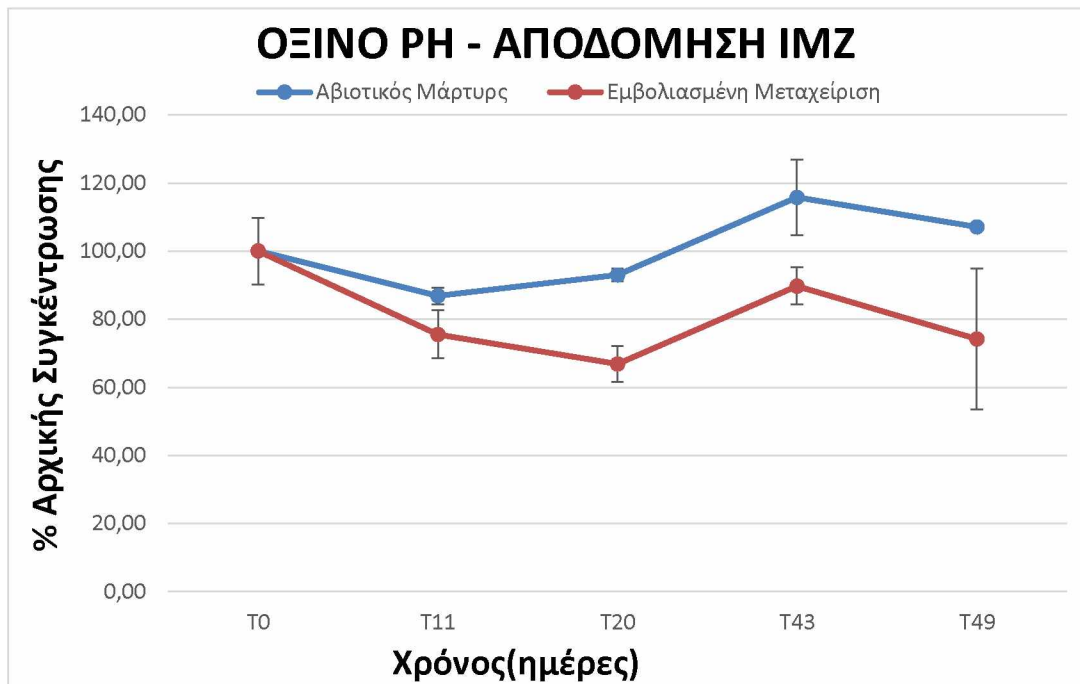
Πίνακας 3 Τα μοντέλα κινητικής και οι παράμετροι αποδόμησης των υπό μελέτη μυκητοκτόνων από το μυκητιακό στέλεχος *M. tassiana*.

Γεωργικά Φάρμακα	Μεταχειρίσεις	Μοντέλο Κινητικής	$\chi^2$	DT <sub>50</sub> (ημέρες)	K <sub>deg</sub> (ημέρες <sup>-1</sup> )	k <sub>1</sub> (ημέρες <sup>-1</sup> )	k <sub>2</sub> (ημέρες <sup>-1</sup> )
IMZ	Αβιοτικός Μάρτυρας	SFO	1.412	1.785*10 <sup>12</sup>	3.888*10 <sup>-13</sup>		
	Εμβολιασμένη Μεταχείριση	SFO	15.5	6.538	0.106	-	-
TBZ	Αβιοτικός Μάρτυρας	HS	3.227	3.848*10 <sup>11</sup>		0.029	1.65*10 <sup>-12</sup>
	Εμβολιασμένη Μεταχείριση	HS	3.697	2.076	-	0.334	0.00674
FLD	Αβιοτικός Μάρτυρας	SFO	4.53	253.1	2.738*10 <sup>-3</sup>	-	-
	Εμβολιασμένη Μεταχείριση	SFO	14.84	28.47	0.02435	-	-
IPR	Αβιοτικός Μάρτυρας	SFO	3.431	5.185	0.134	-	-
	Εμβολιασμένη Μεταχείριση	SFO	7.342	6.381	0.109	-	-
3,5-DCA	Αβιοτικός Μάρτυρας	SFO	14.79	8.825	0.079		
	Εμβολιασμένη Μεταχείριση	SFO	12.05	1.01	0.687	-	-

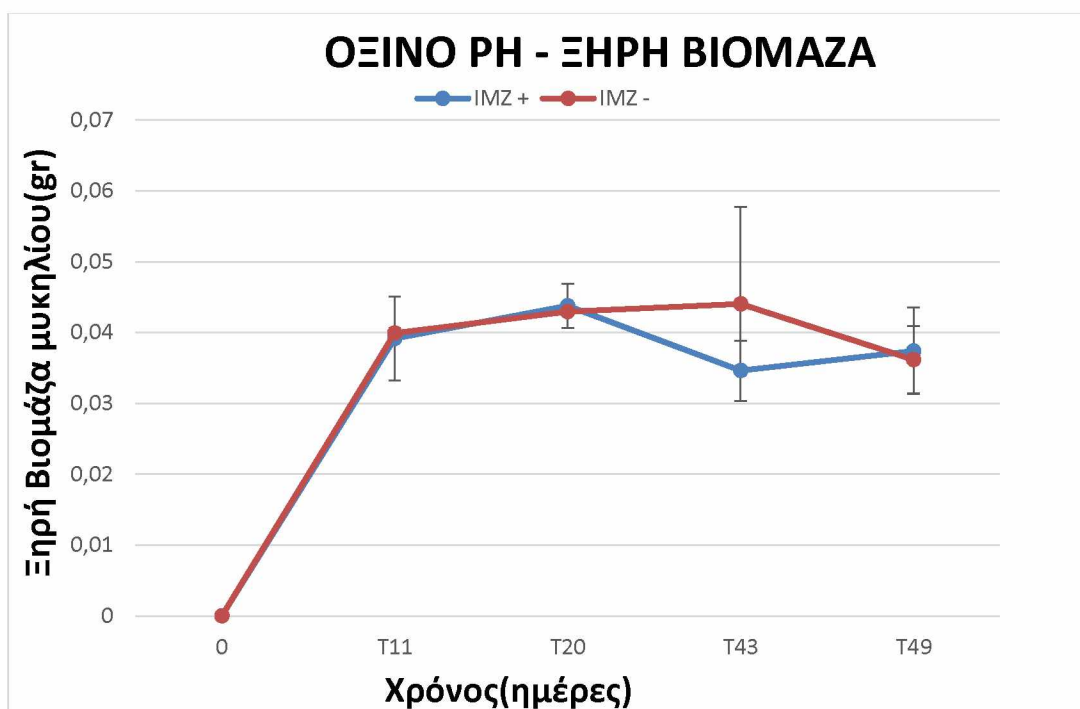
### 3.2 Μελέτη της αποδομητικής ικανότητας και ανάπτυξης του μύκητα *M.*

#### *tassiana* σε διάφορες τιμές pH

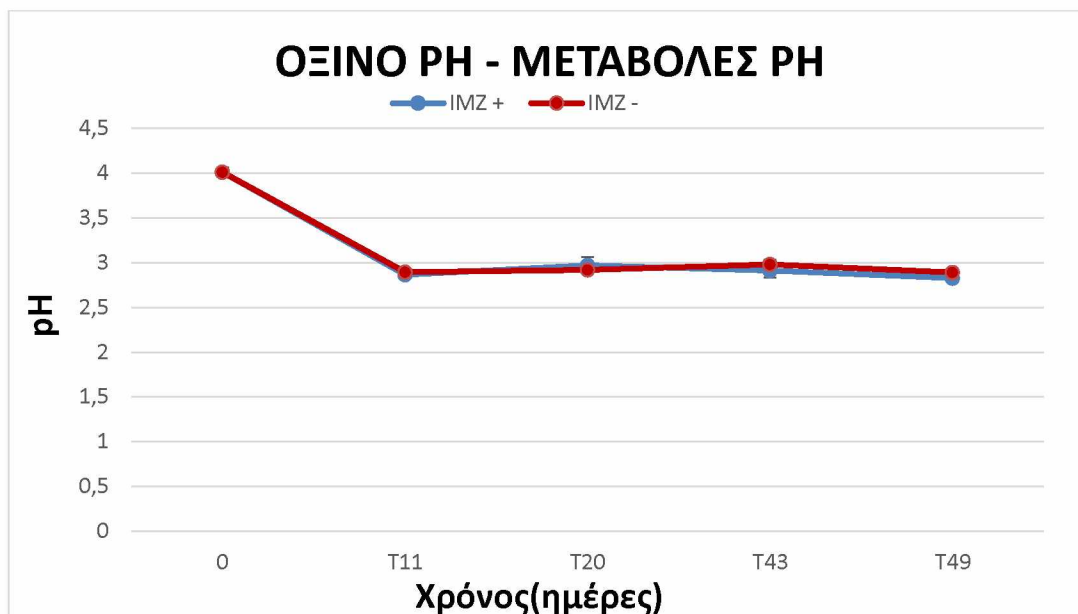
Η ανάπτυξη και αποδομητική ικανότητα του μύκητα *Mycosphaerella tassiana* μελετήθηκε σε θρεπτικό μέσο MSMN και συγκέντρωση 50 mg/L IMZ σε όξινες (pH=4.0), ουδέτερες (pH=6.5) και αλκαλικές (pH=8.1) συνθήκες. Στα διαγράμματα που ακολουθούν, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αποδόμησης του IMZ, των μετρήσεων της υγρής και ξηρής βιομάζας του μύκητα, των μεταβολών του pH και του αριθμού των παραγόμενων κονιδίων του μύκητα σε θρεπτικό μέσο MSMN.



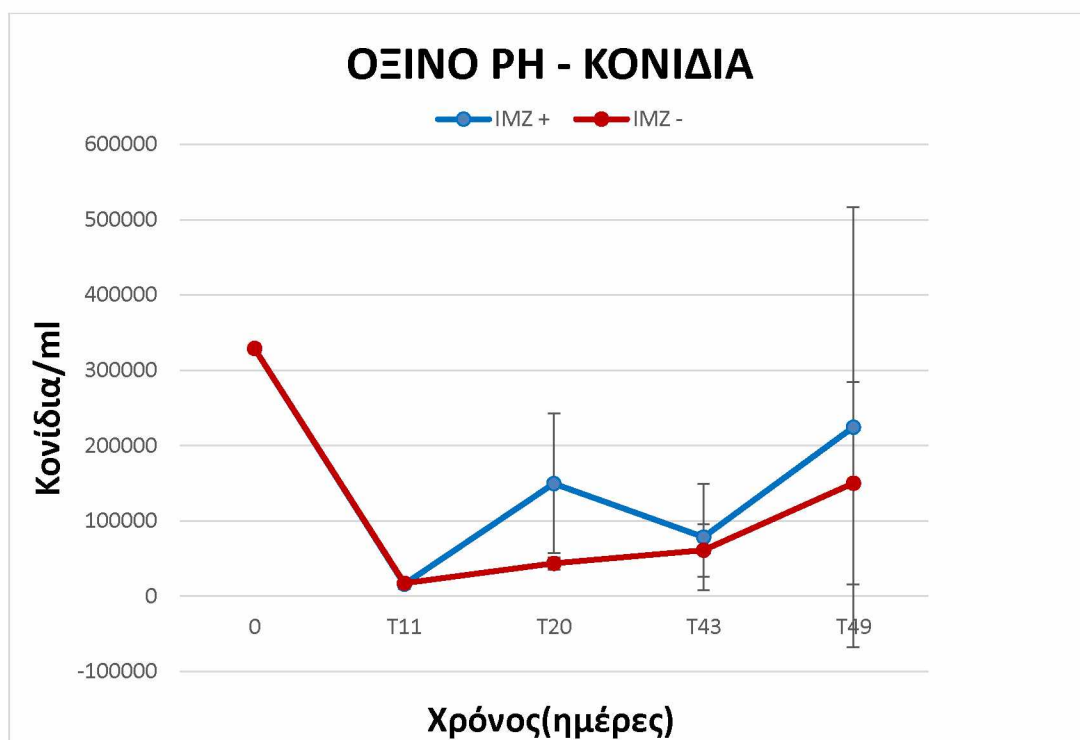
Διάγραμμα 7: Πρότυπο αποδόμησης του ΙΜΖ από τον μύκητα *M. tassiana* σε θρεπτικό μέσο MSMN, pH=4.0 και 50mg/L αρχική συγκέντρωση του ΙΜΖ.



Διάγραμμα 8: Το ξηρό βάρος βιομάζας του μύκητα *M. tassiana* σε θρεπτικό μέσο MSMN, pH=4.0 και 50 mg/L αρχική συγκέντρωση του ΙΜΖ.



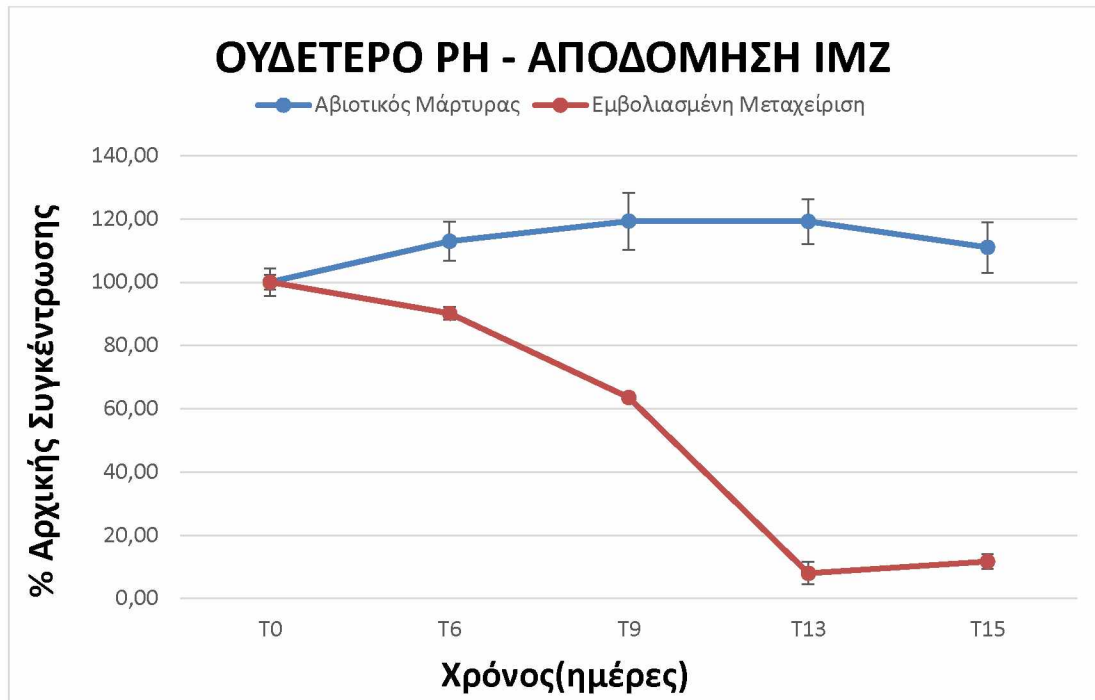
Διάγραμμα 9: Οι μεταβολές στο pH της όξινης μεταχείρισης όπως μετρήθηκαν στο πέρας του χρόνου.



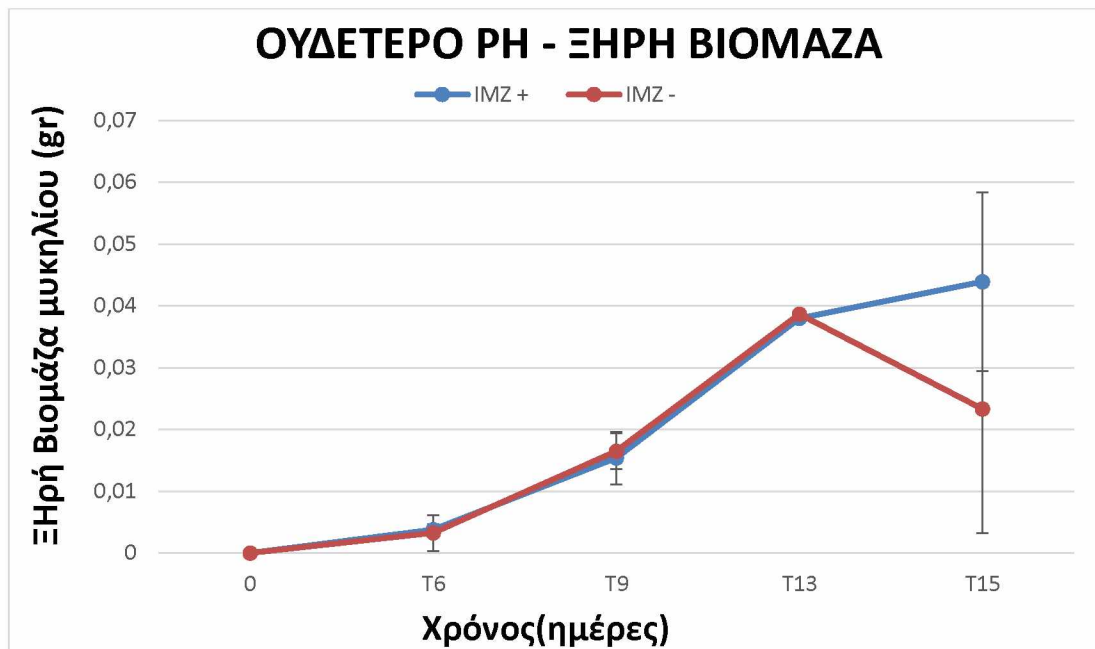
Διάγραμμα 10: Οι μεταβολές στον αριθμό των παραγόμενων κονιδίων του μύκητα της όξινης μεταχείρισης όπως μετρήθηκαν στο πέρας του χρόνου.

Όπως βλέπουμε από το Διάγραμμα 7, ο μύκητας σε όξινο pH αποδόμησε μερικώς το IMZ, με σταθερά αποδόμησης 0.0031 mg/ημέρα όπως περιγράφηκε από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Πίνακας 4). Επίσης, παρατηρούμε ταχεία αύξηση της βιομάζας μέχρι την 11<sup>η</sup> ημέρα τόσο για τη μεταχείριση παρουσία IMZ όσο και για εκείνη απουσία IMZ (Διάγραμμα 8). Ακόμα, παρατηρούμε πτώση του pH μέχρι την 11<sup>η</sup> ημέρα κατά 1 μονάδα και σταθεροποίηση του έπειτα για το υπόλοιπο της επωαστικής περιόδου (Διάγραμμα 9). Επίσης, παρατηρήθηκε μια αρχική μείωση των παραγόμενων κονιδίων και αύξηση μέχρι το τέλος της επωαστικής περιόδου μέχρι τα  $2.24 \cdot 10^5$  και  $1.50 \cdot 10^5$  κονίδια/ml όταν ο μύκητας αναπτύχθηκε παρουσία ή απουσία του IMZ αντίστοιχα (Διάγραμμα 10).

Τέλος, σύγκριση κατά ζεύγη του ξηρού βάρους της βιομάζας, των μεταβολών του pH και των παραγόμενων κονιδίων για κάθε χρονικό σημείο, όταν ο μύκητας μεγάλωσε παρουσία και απουσία του IMZ καταδεικνύει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές ( $p \text{ value} < 0.05$ ).

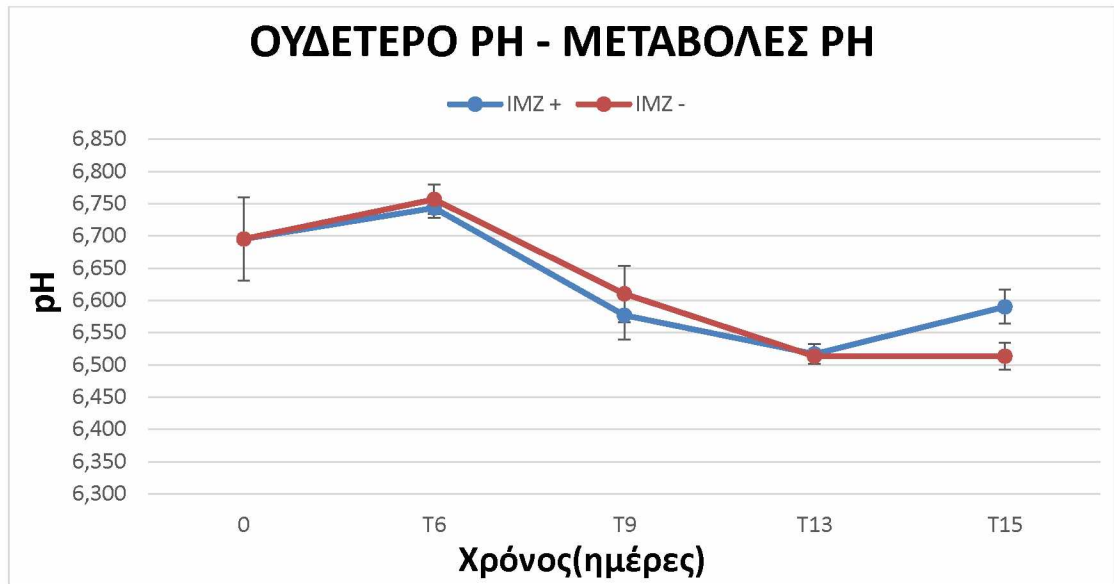


Διάγραμμα 11: Πρότυπο αποδόμησης του ΙΜΖ από τον μύκητα *M. tassiana* σε θρεπτικό μέσο MSMN, pH=6.5 και 50mg/L αρχική συγκέντρωση του ΙΜΖ.

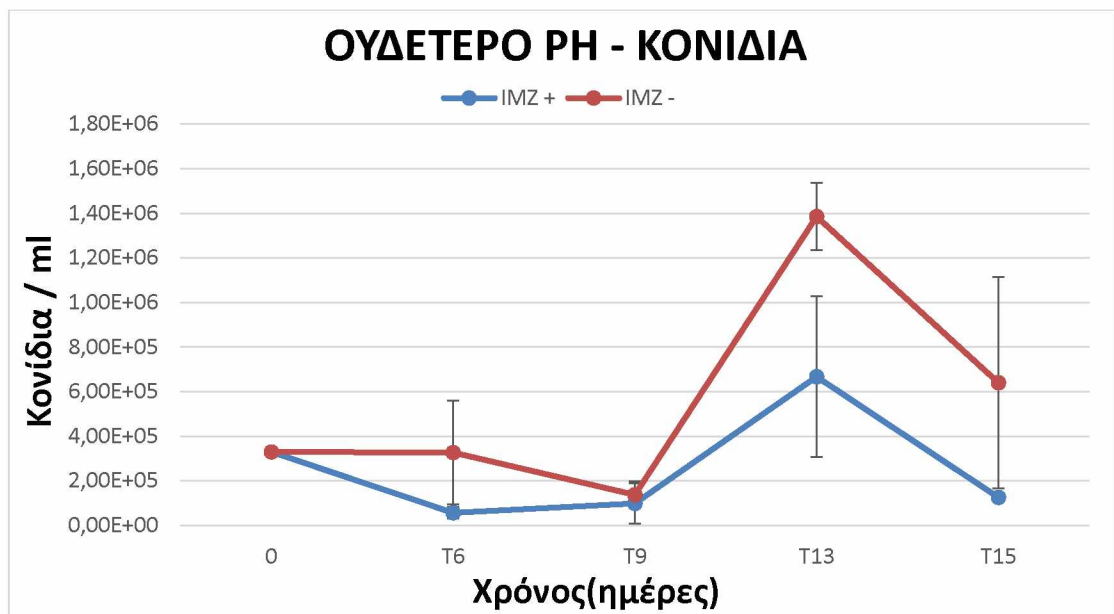


Διάγραμμα 12: Το ξηρό βάρος βιομάζας του μύκητα *M. tassiana* σε θρεπτικό μέσο MSMN, pH=6.5 και 50 mg/L αρχική συγκέντρωση του ΙΜΖ.





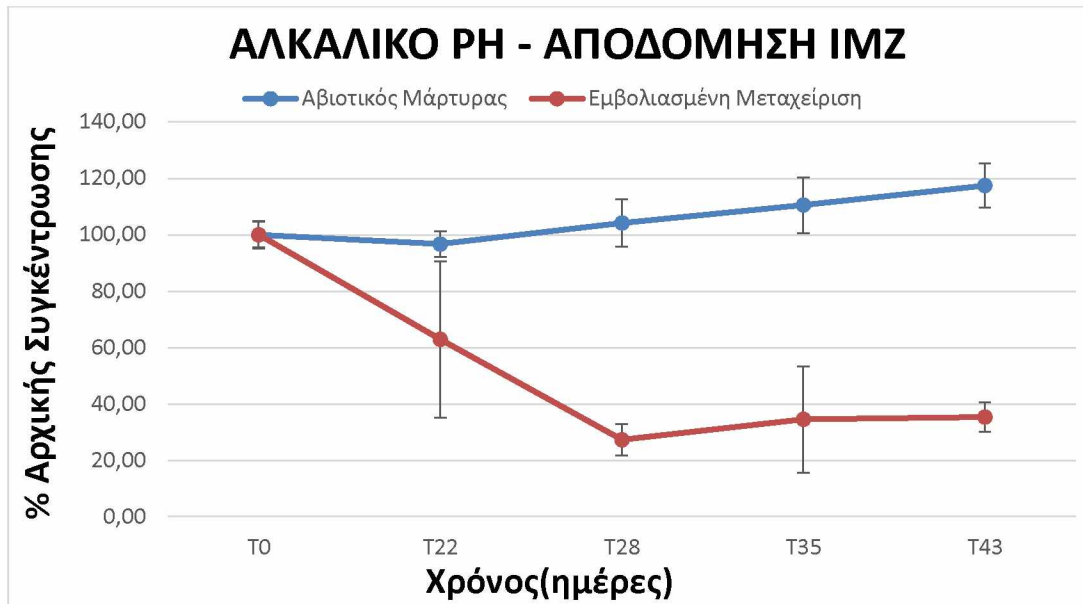
Διάγραμμα 13: Οι μεταβολές στο pH της ουδέτερης μεταχείρισης όπως μετρήθηκαν στο πέρας του χρόνου.



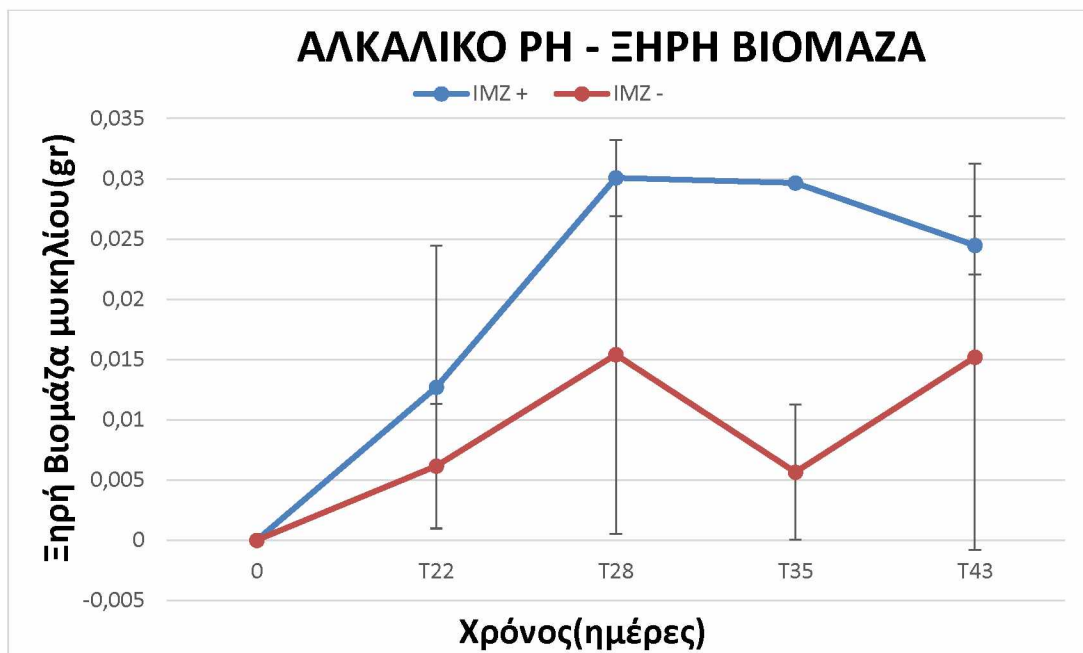
Διάγραμμα 14: Οι μεταβολές στον αριθμό των παραγόμενων κονιδίων του μύκητα της ουδέτερης μεταχείρισης όπως μετρήθηκαν στο πέρας του χρόνου.

Όπως παρατηρούμε από το Διάγραμμα 11, σε θρεπτικό υπόστρωμα MSMN και σε ουδέτερο pH (6.5) ο μύκητας έχει καταφέρει να αποδομήσει σε διάστημα 15 ημερών σχεδόν όλη την ποσότητα του IMZ, και αυτή είναι και η ταχύτερη αποδόμηση που παρατηρήθηκε στα 3 διαφορετικά pH που μελετήθηκαν, με σταθερά αποδόμησης 0.096 mg/ημέρα όπως περιγράφηκε από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Πίνακας 4). Παράλληλα, παρατηρούμε μέγιστη συγκέντρωση των παραγόμενων κονιδίων τη χρονική στιγμή T13, με  $1.38 \cdot 10^6$  και  $6.66 \cdot 10^5$  κονίδια/ml για τις μεταχειρίσεις όπου ο μύκητας μεγάλωσε απουσία και παρουσία IMZ (Διάγραμμα 14).

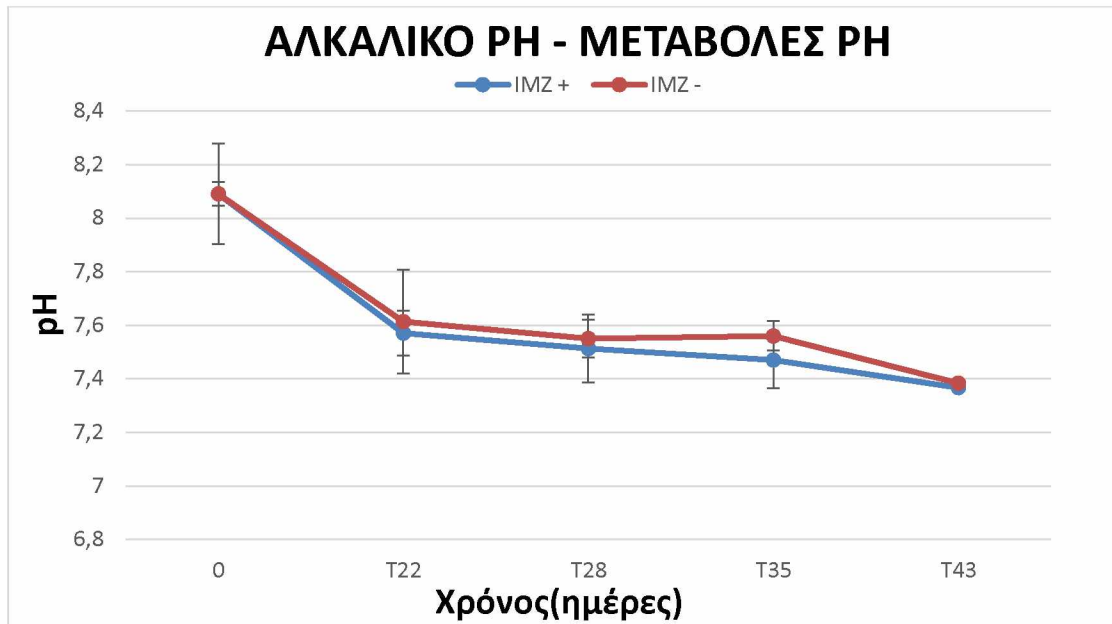
Σύγκριση κατά ζεύγη του ξηρού βάρους της βιομάζας και των παραγόμενων κονιδίων για κάθε χρονικό σημείο, όταν ο μύκητας μεγάλωσε παρουσία και απουσία του IMZ καταδεικνύει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές ( $p\text{-value} < 0.05$ ). Όμως, παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p\text{-value} = 0.019$ ) στις τιμές pH του χρόνου T15 όπου παρουσία του μυκητοκτόνου το pH είναι υψηλότερο (6.59) απ' ότι απουσία του (6.51) (Διάγραμμα 13).



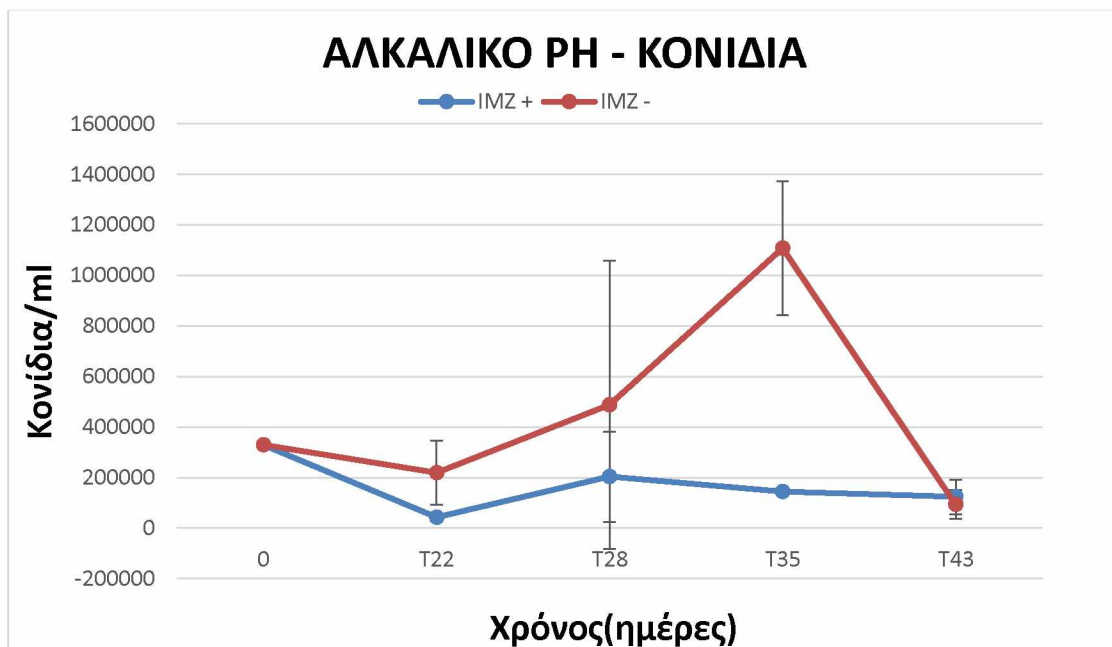
Διάγραμμα 15: Πρότυπο αποδόμησης του IMZ από τον μύκητα *M. tassiana* σε θρεπτικό μέσο MSMN, pH=8.1 και 50mg/L αρχική συγκέντρωση του IMZ.



Διάγραμμα 16: Το ξηρό βάρος βιομάζας του μύκητα *M. tassiana* σε θρεπτικό μέσο MSMN, pH=8.1 και 50 mg/L αρχική συγκέντρωση του IMZ.



Διάγραμμα 17: Οι μεταβολές στο pH της αλκαλικής μεταχείρισης όπως μετρήθηκαν στο πέρας του χρόνου.

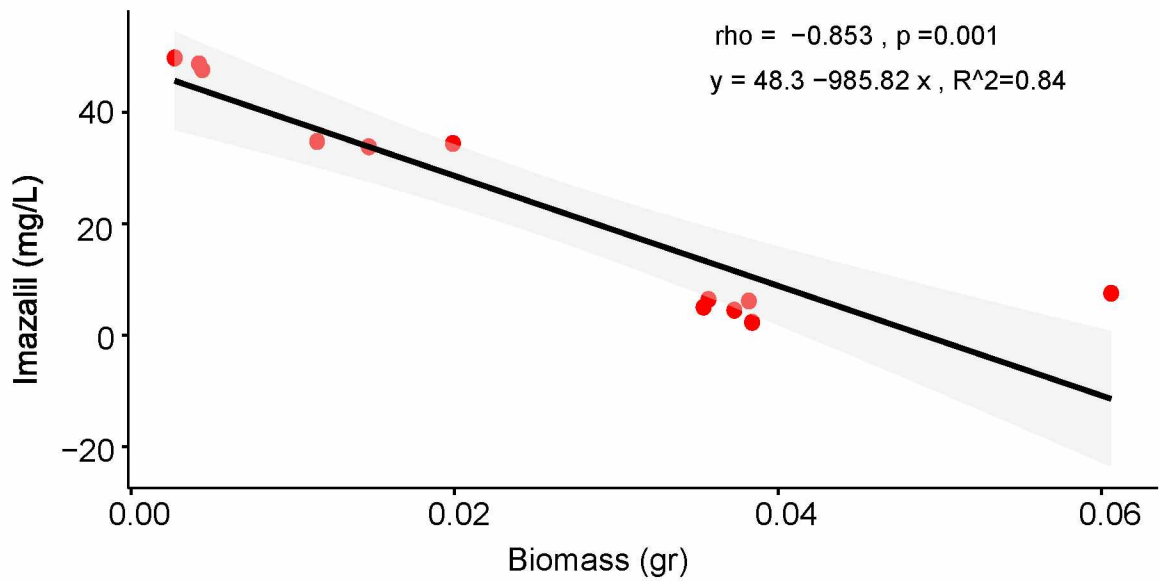


Διάγραμμα 18: Οι μεταβολές στον αριθμό των παραγόμενων κονιδίων του μύκητα της αλκαλικής μεταχείρισης όπως μετρήθηκαν στο πέρας του χρόνου.

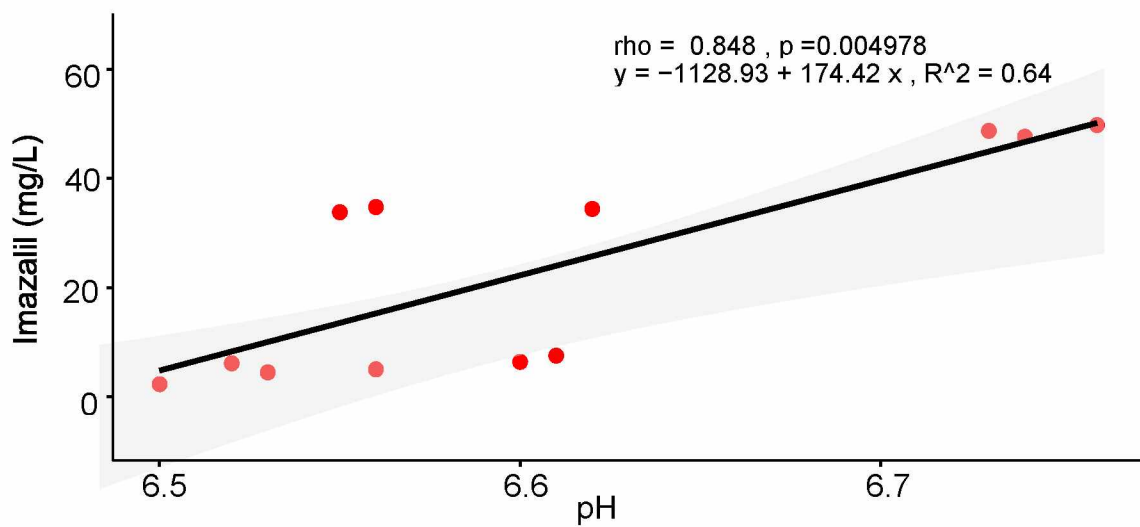
Σύμφωνα με το Διάγραμμα 15, ο μύκητας σε αλκαλικό pH αποδομεί πάνω από το 30% (27.26%) της αρχικής συγκέντρωσης του IMZ σε 28 ημέρες με σταθερά αποδόμησης 0.031 mg/ημέρα όπως περιγράφηκε από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Πίνακας 4). Η ξηρή βιομάζα σε αλκαλικό περιβάλλον παρουσιάζει ραγδαία αύξηση για τη μεταχείριση όπου ο μύκητας μεγάλωσε παρουσία IMZ ενώ σαφώς μικρότερη είναι η ανάπτυξη απουσία του IMZ (Διάγραμμα 16). Αναφορικά με τις μεταβολές στο pH, παρατηρούμε ότι ελαττώνεται και για τις 2 μεταχειρίσεις μέχρι περίπου την τιμή pH = 7.3 (Διάγραμμα 17). Επιπλέον, παρατηρούμε στο Διάγραμμα 18 την υψηλότερη συγκέντρωση κονιδίων για τη μεταχείριση όπου ο μύκητας μεγάλωσε απουσία IMZ. Ο μέγιστος αριθμός κονιδίων που μετρήθηκε για την αλκαλική μεταχείριση ήταν  $2.03 \cdot 10^5$  κονίδια/ml παρουσία IMZ και  $1.11 \cdot 10^6$  κονίδια / ml απουσία IMZ.

Τέλος, σύγκριση κατά ζεύγη του ξηρού βάρους της βιομάζας, των μεταβολών του pH και των παραγόμενων κονιδίων για κάθε χρονικό διάστημα όταν ο μύκητας μεγάλωσε παρουσία και απουσία του IMZ καταδεικνύει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές (p value < 0.05).

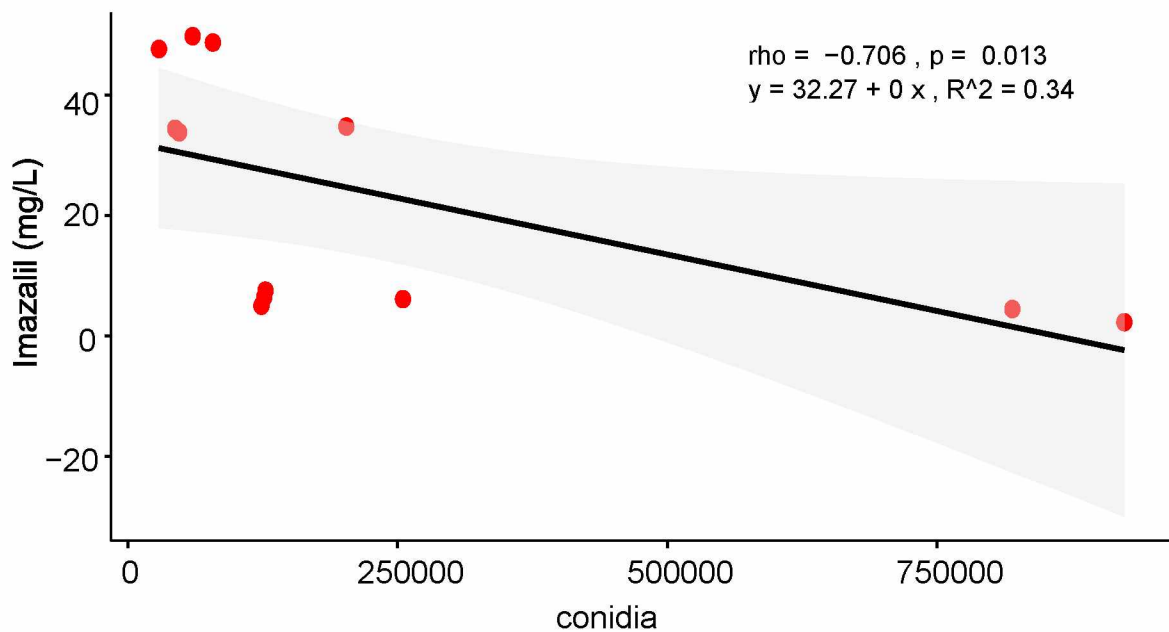
Η ανάλυση συσχέτισης που πραγματοποιήθηκε μεταξύ της αποδόμησης του IMZ και της ανάπτυξης βιομάζας του μύκητα, έδειξε στατιστική σημαντική (p-value = 0.001) αρνητική συσχέτιση με συντελεστή Spearman -0.853 μόνο σε ουδέτερες συνθήκες pH (Διάγραμμα 19). Επίσης, στατιστικά σημαντική συσχέτιση (p < 0.05) παρατηρήθηκε μόνο σε ουδέτερες συνθήκες ανάπτυξης μεταξύ της αποδόμησης του IMZ και των μεταβολών στο pH και της αποδόμησης του IMZ και της παραγωγής κονιδίων του μύκητα με συντελεστές συσχέτισης Spearman 0.848 και -0.706 και p-values 0.005 και 0.013 αντίστοιχα (Διάγραμμα 20, 21).



Διάγραμμα 19: Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ της αποδόμησης του IMZ και της ανάπτυξης βιομάζας του μύκητα σε pH=6.5.



Διάγραμμα 20: Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ της αποδόμησης του IMZ και των μεταβολών του pH σε pH=6.5.



Διάγραμμα 21: Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ της αποδόμησης του IMZ και της παραγωγής κονιδίων του μύκητα σε pH=6.5.

Πίνακας 4 Τα μοντέλα κινητικής και οι παράμετροι αποδόμησης του μυκητοκτόνου IMZ από το μυκητιακό στέλεχος *M. tassiana* σε εύρος τιμών pH.

Γεωργικό Φάρμακο	pH	Μεταχείριση	Μοντέλο Κινητικής	$\chi^2$	$K_{deg}$ (ημέρες <sup>-1</sup> )	DT <sub>50</sub> (ημέρες)
IMZ	4.0	Αβιοτικός Μάρτυρας	SFO	8.104	$4.251 \cdot 10^{-13}$	$1.63 \cdot 10^{12}$
		Εμβολιασμένη Μεταχείριση	SFO	11.3	0.0031	220.4
	6.5	Αβιοτικός Μάρτυρας	SFO	4.563	$1.593 \cdot 10^{-12}$	$4.353 \cdot 10^{11}$
		Εμβολιασμένη Μεταχείριση	SFO	25.85	0.096	7.2
	8.1	Αβιοτικός Μάρτυρας	SFO	5.621	$1.125 \cdot 10^{-8}$	616034
		Εμβολιασμένη Μεταχείριση	SFO	14.43	0.031	22.07

#### 4. Συζήτηση και Συμπεράσματα

Τα υγρά απόβλητα που παράγονται κατά την μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων και λαχανικών περιέχουν υψηλό φορτίο μυκητοκτόνων και η απόρριψή τους σε περιβαλλοντικά μέσα χωρίς καμία προηγούμενη επεξεργασία είναι πιθανό να προκαλέσει σημαντική περιβαλλοντική ρύπανση. Το IMZ είναι ένα τυπικό μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται μετά τη συγκομιδή για τον έλεγχο ενός ευρέος φάσματος μυκητιακών ασθενειών σε φρούτα και λαχανικά. Εξαιτίας όμως της επιβλαβούς δράσης που μπορεί να έχουν τα μυκητοκτόνα και άλλα γεωργικά φάρμακα στην ανθρώπινη υγεία και τα οικοσυστήματα, η ασφάλεια των τροφίμων και η απορρύπανση του περιβάλλοντος από υπολείμματα τοξικών ουσιών αποτελούν θέματα μείζονος σημασίας και χρήζουν αποτελεσματικής αντιμετώπισης. Η βιολογική αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων είναι μία επιθυμητή, αποτελεσματική και οικονομική προσέγγιση για την απομάκρυνση των συγκεκριμένων ρύπων από περιβαλλοντικούς αποδέκτες και υγρά απόβλητα.

Το imazalil είναι ιδιαίτερα υπολειμματικό με μέσο χρόνο ημιζωής στο έδαφος 76.3 ημέρες (EFSA, EU Pesticides Database – European Commission). Οι Chan-Cheng et al. (2020) σε πρόσφατη μελέτη αναφέρουν χρόνο ημιζωής 33 ημέρες μετά από εφαρμογή σε βιοοργανικό υλικό σε συγκέντρωση  $\approx 50$  mg/Kg. Άλλη μελέτη των Omirou et al. (2012) οι οποίοι εφάρμοσαν το IMZ σε τελική συγκέντρωση 35 mg / Kg σε ένα μίγμα μυκητοκτόνων, αναφέρει τιμές  $DT_{50}$  28,6 ημέρες στο έδαφος και σε οργανικά υποστρώματα 15,5 έως 48 ημέρες. Τέλος, οι Maruyama et al. (2007) αναφέρουν μείωση της συγκέντρωσης του IMZ κατά 80% μετά από αντίδραση που πραγματοποιήθηκε με το οξειδωτικό ένζυμο λακκάση και το 4-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήσαμε τον μύκητα *Mycosphaerella tassiana* που έχει την ικανότητα να αποδομεί το μυκητοκτόνο IMZ. Όσον αφορά την



αποδομητική του ικανότητα, ενάντια στο IMZ, παρατηρήσαμε ότι ο *M. tassiana* αποδομήσε το μυκητοκτόνο σε θρεπτικό υπόστρωμα MSMN και συγκέντρωση 50 mg/L με τιμή  $DT_{50} = 6.5$  και 7.2 ημέρες. Μελέτες για τους μύκητες λευκής σήψης (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*) καταδεικνύουν ότι αποδομούν πλήρως 20 mg/L IMZ σε χρονικό διάστημα 10 ημερών και θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος αχύρου ενώ σε θρεπτικά υποστρώματα εκχυλίσματος εδάφους η αποδόμηση του φαρμάκου δεν καθίσταται δυνατή (Karas et al., 2011).

Όπως έχει προαναφερθεί (Ενότητα 1.2), μέσω της διαδικασίας του καταβολισμού οι μικροοργανισμοί μπορούν να καταβολίζουν ταχύτατα τους ρύπους, οι οποίοι αποτελούν για αυτούς πηγή ενέργειας και συμβάλλουν στην ανάπτυξή τους. Όμως, το θρεπτικό μέσο MSMN που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη περιέχει γλυκόζη σε ποσοστό 0.5% (Ενότητα 2.1) η οποία αποτελεί πηγή άνθρακα, με αποτέλεσμα να συμβάλλει στην ανάπτυξη του μυκηλίου γεγονός που καταδεικνύει ότι κάποιοι μύκητες δε χρησιμοποιούν τα γεωργικά φάρμακα ως πηγές άνθρακα και αζώτου. Άλλες μελέτες για τα ζιζανιοκτόνα φαινυλουρίας αναφέρουν επίσης ότι οι μύκητες δεν τα χρησιμοποιούν ως θρεπτική πηγή (Berger, 1998; Rønhede et al., 2007). Παρομοίως, στην παρούσα διατριβή το μυκητοκτόνο δεν αποτελούσε τη μοναδική πηγή C και N γεγονός που σημαίνει ότι το στέλεχος του μύκητα που μελετήσαμε δε χρησιμοποιεί το IMZ με σκοπό την κάλυψη των ενεργειακών του αναγκών και ίσως η αυξημένη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών να έχει θετική επίδραση και στην αποδομητική ικανότητα του μύκητα έναντι του μυκητοκτόνου IMZ, χωρίς όμως να είναι γνωστό το μεταβολικό μονοπάτι που ακολουθεί η χημική ουσία.

Παράλληλα, αξιολογήθηκε η ικανότητα του μύκητα να δράσει αποδομητικά έναντι των μυκητοκτόνων TBZ, OPP, FLD και IPR τα οποία χρησιμοποιούνται από τα

συσκευαστήρια φρούτων και αναμένεται να συνυπάρχουν μαζί με το IMZ στα απόβλητα και παρατηρήσαμε ότι το στέλεχος του μύκητα δεν αποδομεί ή αποδομεί μερικώς τα μυκητοκτόνα TBZ, OPP, FLD και IPR. Συγκεκριμένα, ο *M. tassiana*, δε μπορεί να αποδομήσει το φαινολικό OPP, το οποίο αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξή του. Άλλοι μύκητες, όπως ο *Trametes versicolor*, έχουν την ικανότητα να αποδομούν πλήρως και ταχύτατα υψηλές συγκεντρώσεις του OPP ενώ αποδομούν μερικώς τα μυκητοκτόνα IMZ και TBZ επίσης σε υψηλές συγκεντρώσεις (Karas et al., 2011). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η συγκέντρωση του μεταβολίτη του IPR, της 3,5-DCA, παρουσιάζει μείωση στην εμβολιασμένη καλλιέργεια, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται στην αποδόμησή της από τον μικροοργανισμό ή στην προσρόφησή της στη βιομάζα του.

Επίσης, στη συγκεκριμένη διατριβή διερευνήθηκε η αποδομητική ικανότητα του μύκητα *Mycosphaerella tassiana* ενάντια στο μυκητοκτόνο IMZ σε ποικίλα pH. Σχετικά με την αποδομητική ικανότητα του *M. tassiana* σε όξινο (4.0), ουδέτερο (6.5), και αλκαλικό (8.1) pH, παρατηρήσαμε βέλτιστη αποδόμηση του IMZ στο ουδέτερο pH με σταθερά αποδόμησης 0.096 mg/ημέρα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αρκετές μελέτες συσχετίζουν την επίδραση του pH με την αποδόμηση περιβαλλοντικών ρύπων από μύκητες, όπως για παράδειγμα οι Derbalah and Belal, (2008) και οι Xu et al. (2007) οι οποίοι αναφέρουν βέλτιστη αποδόμηση σε τιμές pH 7 ή 8. Ο μύκητας *Mucor racemosus* έδειξε υψηλή αποδομητική ικανότητα του εντομοκτόνου dieldrin σε εύρος pH 4,0 έως 8,0 με καλύτερη επίδοση να καταγράφεται σε ελαφρώς όξινες συνθήκες (Kataoka et al., 2010). Ο μύκητας εδάφους *Mortierella* αξιολογήθηκε για την αποδομητική του ικανότητα και βρέθηκε ότι μπορεί να αποδομεί το ζιζανιοκτόνο diuron (Ellegaard-Jensen L. et al., 2012). Τέλος, μελέτη των Zhao et al., (2010)

καταδεικνύει ότι το μυκητιακό στέλεχος *P. oxalicum* ZHJ6 παρουσιάζει μέγιστη αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου methamidophos σε όξινο pH (pH=5).

Ακόμα, η παρούσα μελέτη καταδεικνύει στατιστική σημαντική αρνητική συσχέτιση της ξηρής βιομάζας και των κονιδίων του μύκητα με την αποδόμηση του IMZ ενώ παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των μεταβολών του pH και της αποδόμησης του IMZ, μόνο στο ουδέτερο pH. Ειδικότερα, όσο αυξάνονται τα παραγόμενα κονίδια και η βιομάζα του μυκηλίου τόσο μειώνεται η συγκέντρωση του IMZ, ενώ αντίθετα όσο μειώνεται το pH, μειώνεται και η συγκέντρωση του IMZ. Από την άλλη, η αύξηση της βιομάζας που παρατηρήθηκε στο όξινο pH αποτελεί και τη μεγαλύτερη αύξηση της βιομάζας του μυκηλίου και στις 3 συνθήκες pH. Σε άλλες μελέτες, προέκυψε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου chlorpyrifos μειώνεται η μυκηλιακή βιομάζα στα 22 μυκητιακά στελέχη που μελετήθηκαν (Sangeetha et al., 2016), ενώ οι Bhalerao et al. (2007) επισημαίνουν ότι παρουσία του γεωργικού φαρμάκου endosulfan 350 mg/L η παραγόμενη βιομάζα του μύκητα *Aspergillus niger* ήταν πολύ υψηλότερη σε σύγκριση με την ανάπτυξη απουσία του φαρμάκου.

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το στέλεχος *Mycosphaerella tassiana* έχει δυνατότητα χρήσης ως μικροβιακό εμβόλιο σε βιολογικά συστήματα για την αποτοξικοποίηση των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων των συσκευαστηρίων φρούτων, που περιέχουν μαζί με το IMZ και άλλα μυκητοκτόνα γεωργικά φάρμακα αλλά όχι OPP. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στη μελέτη και τον καθορισμό του μεταβολικού μονοπατιού των χημικών αυτών ουσιών.

## 5. Βιβλιογραφία

### Ελληνική Βιβλιογραφία

Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, Σ. της Ε. Έ. ΟΔΗΓΙΑ 91/414/ΕΟΚ, ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ.

Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, Σ. της Ε. Έ. (2009α) ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1107/2009 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ.

ΕΚ, ΟΔΗΓΙΑ 2009/128/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 21<sup>ης</sup> Οκτωβρίου 2009 σχετικά με την κοινή θέση του Συμβουλίου που αφορά τον καθορισμό πλαισίου κοινοτικής δράσης με σκοπό την επίτευξη ορθολογικής χρήσης των γεωργικών φαρμάκων, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0128&from=EN>

ΕΚ, ΟΔΗΓΙΑ 1998/8/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 16<sup>ης</sup> Φεβρουαρίου για τη διάθεση βιοκτόνων στην αγορά.

ΕΚ, 2455/2001/ΕΚ Απόφαση Του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου Και Του Συμβουλίου της 20ής Νοεμβρίου 2001 για τη θέσπιση του καταλόγου ουσιών προτεραιότητας στον τομέα της πολιτικής των υδάτων και τροποποίησης της οδηγίας 2000/60/ΕΚ.

ΕΚ, 850/2004/ΕΚ Κανονισμός Του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου Και Του Συμβουλίου της 29<sup>ης</sup> Απριλίου 2004 για τους έμμοτους ρύπους και την τροποποίηση της οδηγίας 79/117/ΕΟΚ

Ζιώγας Β., Μάρκογλου Α., 2010. Γεωργική Φαρμακολογία – Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. Εκδόσεις Β.Ζιώγας και Α. Μάρκογλου.

### Ξένη Βιβλιογραφία

Aktar, W., Sengupta, D. and Chowdhury, A. (2009) 'Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards', *Interdisciplinary Toxicology*. *Interdiscip Toxicol*, 2(1), pp. 1–12. doi: 10.2478/v10102-009-0001-7.

Alkan, N., Fortes, A.M., 2015. Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to post-harvest fungal pathogens. *Frontiers in Plant Science* 6, 889. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00889>.

Arx, J. A. von (1983) *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*, ser. C 86: 15–54.

Athiel P., Alfizar, C. Mercadier, D. Vega, J. Bastide, P. Davet, B. Brunel, J.C. Cleyet-Marel, 1995. Degradation of iprodione by a soil *Arthrobacter*-like strain *App. Environ. Microbiol.*, 61, pp. 3216-3220

Baroncelli, R., Zapparata, A., Sarrocco, S., Sukno, S.A., Lane, C.R., Thon, M.R., Vannacci, G., Holub, E., Sreenivasaprasad, S., 2015. Molecular Diversity of Anthracnose Pathogen Populations Associated with UK Strawberry Production

Suggests Multiple Introductions of Three Different Colletotrichum Species. PLOS ONE 10, e0129140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129140>

Barr, D.P. and Aust, S.D. (1994) Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology*, 28, 78A-87A.

Belenguer, Vicent, Francisco Martinez-Capel, Ana Masiá, and Yolanda Picó. 2014. "Patterns of Presence and Concentration of Pesticides in Fish and Waters of the Júcar River (Eastern Spain)." *Journal of Hazardous Materials* 265 (January): 271–79. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.016>.

Berger, B. M. (1998) 'Parameters influencing biotransformation rates of Phenylurea herbicides by soil microorganisms', *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Academic Press Inc., 60(2), pp. 71–82. doi: 10.1006/pest.1998.2324.

Bhalerao, T. S. and Puranik, P. R. (2007) 'Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*', *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(4), pp. 315–321. doi: 10.1016/j.ibiod.2006.09.002.

Bhatt, P., Zhang, W., Lin, Z., Pang, S., Huang, Y., Chen, S., 2020. Biodegradation of Allethrin by a Novel Fungus *Fusarium proliferatum* Strain CF2, Isolated from Contaminated Soils. *Microorganisms* 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040593>

Blystone, C. R., Furr, J., Lambright, C. S., Howdeshell, K. L., Ryan, B. C., Wilson, V. S., LeBlanc, G. A. & Gray, L. E. Jr (2007) Prochloraz inhibits testosterone production at dosages below those that affect androgen-dependent organ weights or the onset of puberty in the male Sprague–Dawley rat. *Toxicological Sciences* 97, 65–74.

Braun, U., Crous, P. W., Dugan, F., Groenewald, J. Z. & de Hoog, G. S. (2003) Phylogeny and taxonomy of Cladosporium-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycological Progress* 2: 3–18.

Briceño G, Palma G, Durán N (2007) Influence of Organic Amendment on the Biodegradation and Movement of Pesticides. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37(3):233–271. <https://doi.org/10.1080/10643380600987406>.

Bumpus, J. A. and Aust, S. D. (1987) 'Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the lignin degrading system', *Bio Essays*, pp. 166–170. doi: 10.1002/bies.950060405.

Campos, M., C. Perruchon, P. A. Karas, D. Karavasilis, M. C. Diez, and D. G. Karpouzias. 2017. "Bioaugmentation and Rhizosphere-Assisted Biodegradation as Strategies for Optimization of the Dissipation Capacity of Biobeds." *Journal of Environmental Management* 187 (February): 103–10. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.031>.

Campos M., Perruchon C., Karpouzias D.G., Vasileiadis S., Menkissoglu Spiroudi, U., Diez M.C. (2015) Isolation and characterization of bacteria from acidic pristine soil

environment able to transform iprodione and 3,5- dichloraniline. *International Biodeterioration and Biodegradation* 104: 201-211.

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.

Castelo-Grande, T. et al. (2010) ‘Remediation of soils contaminated with pesticides: A review’, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, pp. 438–467. doi: 10.1080/03067310903374152.

Ccancapa, Alexander, Ana Masiá, Vicente Andreu, and Yolanda Picó. 2016. “Spatio-Temporal Patterns of Pesticide Residues in the Turia and Júcar Rivers (Spain).” *The Science of the Total Environment* 540 (January): 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.063>.

Chan-Cheng, M. et al. (2020) ‘Ecotoxicological test based on inhibition of fungal laccase activity: Application to agrochemicals and the monitoring of pesticide degradation processes’, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier Inc., 195 (February), p. 110419. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110419.

Chen, S., Liu, C., Peng, C., Liu, H., Hu, M., Zhong, G., 2012. Biodegradation of Chlorpyrifos and Its Hydrolysis Product 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol by a New Fungal Strain *Cladosporium cladosporioides* Hu-01. *PLOS ONE* 7, e47205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047205>.

Cohen, R., Persky, L. and Hadar, Y. (2002) ‘Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*’, *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Appl Microbiol Biotechnol*, pp. 582–594. doi: 10.1007/s00253-002-0930-y.

Commission Regulation (EU) 2018/78 of 16 January 2018 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for 2-phenylphenol, bensulfuron-methyl, dimethachlor and lufenuron in or on certain products.

Crous PW, Aptroot A, Kang JC, Braun U, Wingfield MJ (2000). The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Studies in Mycology* 45: 107–121.

Crous, P. W., Kang, J.-C. & Braun, U. (2001) A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. *Mycologia* 93: 1081–1101.

Damalas, C.A. and Eleftherohorinos, I.G. (2011) Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8, 1402-1419. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph8051402>.

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

Dawen Gao, Lina Du, Jiaoling Yang, Wei-Min Wu & Hong Liang (2010) A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control, *Critical Reviews in Biotechnology*, 30:1, 70-77, DOI: 10.3109/07388550903427272

Derbalah, A. S. and Belal, E. B. (2008) ‘Chemistry and Ecology Biodegradation kinetics of cymoxanil in aquatic system Biodegradation kinetics of cymoxanil in aquatic system’, *Chemistry and Ecology*, 24(3), pp. 169–180. doi: 10.1080/02757540802032173.

EFSA (2010) ‘Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance imazalil’, *EFSA Journal*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 8(3). doi: 10.2903/j.efsa.2010.1526.

Ellegaard-Jensen, L. and Rosendahl, S. (2012) *PhD thesis Fungal degradation of pesticides construction of microbial consortia for bioremediation Title: Fungal degradation of pesticides-construction of microbial consortia for bioremediation Academic advisor: Preface.*

Erasmus, A., Lennox, C.L., Korsten, L., Lesar, K., Fourie, P.H., 2015. Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options. *Postharvest Biology and Technology* 107, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.008>.

EFSA (European Food Safety Authority), 2013. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for iprodione according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal* 2013;11(10):3438, 94 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3438.

FOCUS (2006) Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration The Final Report of the Work Group on Degradation Kinetics of FOCUS (FORum for the Co-ordination of pesticide fate models).

Fait, Gabriella, Marco Nicelli, George Fragoulis, Marco Trevisan, and Ettore Capri. 2007. “Reduction of Point Contamination Sources of Pesticide from a Vineyard Farm.” *Environmental Science & Technology* 41 (9): 3302–8. <https://doi.org/10.1021/es062706k>.

Gavin C. Hunter, Brenda D. Wingfield, Pedro W. Crous and Michael J. Wingfield, 2014. A multi-gene phylogeny for species of *Mycosphaerella* occurring on Eucalyptus leaves. *STUDIES IN MYCOLOGY* 55: 147–161.

Gerard J. M. Verkley , Pedro W. Crous , J. Z. (Ewald) Groenewald , Uwe Braun and Andre Aptroot (2004), *Mycosphaerella punctiformis* revisited: morphology, phylogeny, and epitypification of the type species of the genus *Mycosphaerella* (Dothideales, Ascomycota), *Mycol. Res.* 108 (11): 1271–1282, DOI: 10.1017/S0953756204001054.

- Grabke, a, Fernández-Ortuño, D., Amiri, a, Li, X., Peres, N. a, Smith, P., Schnabel, G., (2013). Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. *Phytopathology First*, 396–402. doi:10.1094/PHYTO-06-13-0156-R.
- Gupta, S. and Gupta, K. (2020) ‘Bioaccumulation of Pesticides and Its Impact on Biological Systems’, in *Pesticides in Crop Production*. Wiley, pp. 55–67. doi: 10.1002/9781119432241.ch4.
- He, B. et al. (2020) ‘Pesticides-induced energy metabolic disorders’, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139033.
- Helweg, Arne, Henrik Bay, Hans Peter Birk Hansen, Mette Rabølle, Alex Sonnenborg, and Lars Stenvang. 2002. “Pollution at and below Sites Used for Mixing and Loading of Pesticides.” *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 82 (8–9): 583–90. <https://doi.org/10.1080/03067310290009497>.
- Honeycutt RC, Schabacker DJ (1994) *Mechanisms Of Pesticide Movement Into Ground Water*, 1st edition. CRC Press, Boca Raton.
- Hong, Q. et al. (2007) ‘A microcosm study on bioremediation of fenitrothion-contaminated soil using *Burkholderia* sp. FDS-1’, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(1), pp. 55–61. doi: 10.1016/j.ibiod.2006.07.013.
- Hussain, S. et al. (2007) ‘Biodegradation of a-and b-endosulfan by soil bacteria’, Springer. doi: 10.1007/s10532-007-9102-1.
- Karanasios, E., Tsiropoulos, N., Karpouzas, D.G., Ehalotis C., (2010) Degradation and adsorption of pesticides in compost-based biomixtures as potential substrates for biobeds in south Europe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(16): 9147-9156.
- Karas PA, Perruchon C, Karanasios E, Papadopoulou ES, Manthou E, Sitra S, Ehalotis C, Karpouzas DG (2016) Integrated biodepuration of pesticide-contaminated wastewaters from the fruit-packaging industry using biobeds: Bioaugmentation, risk assessment and optimized management. *Journal of Hazardous Materials* 320:635–644. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.071>.
- Karas, P. A. et al. (2011) ‘Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi’, *Biodegradation*, 22(1), pp. 215–228. doi: 10.1007/s10532-010-9389-1.
- Kataoka, R. et al. (2010) ‘Biodegradation of dieldrin by a soil fungus isolated from a soil with annual endosulfan applications’, *Environmental Science and Technology*, 44(16), pp. 6343– 6349. doi: 10.1021/es1000227.
- Katsoula, A., S. Vasileiadis, M. Sapountzi, and Dimitrios G. Karpouzas. 2020. “The Response of Soil and Phyllosphere Microbial Communities to Repeated Application of the Fungicide Iprodione: Accelerated Biodegradation or Toxicity?” *FEMS Microbiology Ecology* 96 (6). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa056>.
- Klebahn, H. (1918) *Haupt- und Nebenfruchtformen der Askomyzeten*. Borntraeger, Leipzig.
- Kodama S., Yamamoto A., Ohura T., Matsunaga A. and Kanbe T. (2003). Enantioseparation of Imazalil residue in orange by Capillary Electrophoresis with 2-



hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin as a chiral selector. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 51, 6128-6131.

Kolbe N. and Andersson J.T. (2006). Simple and Sensitive Determination of *o*-Phenylphenol in Citrus Fruits Using Gas Chromatography with Atomic Emission or Mass Spectrometric Detection. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 54, 5736-5741.

Laibach, F. (1922) Untersuchungen über einige *Ramularia*- und *Ovularia*-Arten und ihre Beziehungen zur Ascomycetengattung *Mycosphaerella* II. *Zentralblatt für Bakteriologie Abt. II*, 55: 284–293.

León-Santesteban, H. H. et al. (2016) 'Pentachlorophenol removal by *Rhizopus oryzae* CDBBH-1877 using sorption and degradation mechanisms', *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. John Wiley and Sons Ltd, 91(1), pp. 65–71. doi: 10.1002/jctb.4566.

Leong, W. H. et al. (2020) 'Application, monitoring and adverse effects in pesticide use: The importance of reinforcement of Good Agricultural Practices (GAPs)', *Journal of Environmental Management*. Academic Press, p. 109987. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.109987.

Li S-F, Wang H, Chen J-L, Zhu H-X, Yao R-S, Wu H (2020) Degradation and Transformation of Lignin by a Fungus *Aspergillus Flavus* Strain F-1. *Iranian Journal of Biotechnology* 18(3):62–69. <https://doi.org/10.30498/ijb.2020.155690.2461>.

Lima, P.G., Freitas, C.D.T., Oliveira, J.T.A., Neto, N.A.S., Amaral, J.L., Silva, A.F.B., Sousa, J.S., Franco, O.L., Souza, P.F.N., 2021. Synthetic antimicrobial peptides control *Penicillium digitatum* infection in orange fruits. *Food Research International* 147, 110582. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110582>.

Liu Y.H., Chung Y.C. and Xiong Y. (2001). Purification and characterization of a dimethoate-degrading enzyme of *Aspergillus niger* ZHY256, isolated from sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3746-3749.

Long Yu, Y. et al. (2008) 'Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi', *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, pp. 294–303. doi: 10.1016/j.ibiod.2007.10.001.

Ludvigsen, G. H., Vandsemb, S., & Lode, O. (2004). Pesticider i avrenning fra norske golfbaner. *Vanni*, 2, 2004.

Mai, C., Schormann, W., Majcherczyk, A. et al. Degradation of acrylic copolymers by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 479–487 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1668-5>

Maqbool, Z. et al. (2016) 'Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review', *Environmental Science and Pollution Research*. Springer Verlag, 23(17), pp. 16904–16925. doi: 10.1007/s11356-016-7003-8.

Maruyama, T. et al. (2007) 'Laccase-mediated degradation and reduction of toxicity of the postharvest fungicide imazalil', *Process Biochemistry*, 42(3), pp. 459–461. doi: 10.1016/j.procbio.2006.09.011.

Masiá, Ana, Julián Campo, Pablo Vázquez-Roig, Cristina Blasco, and Yolanda Picó. 2013. "Screening of Currently Used Pesticides in Water, Sediments and Biota of the Guadalquivir River Basin (Spain)." *Journal of Hazardous Materials* 263, Part 1 (December): 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.035>.

Matthews, G. (2015) 'Pesticides: health, safety and the environment'. Available at: [https://books.google.com/books?hl=el&lr=&id=3-vGBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP7&ots=kOw9FWkDza&sig=UHAgV0xmpF1jc4QvPkSN\\_P5dBwE](https://books.google.com/books?hl=el&lr=&id=3-vGBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP7&ots=kOw9FWkDza&sig=UHAgV0xmpF1jc4QvPkSN_P5dBwE).

Miñambres, G., Conles, M., Lucini, E., Verdenelli, R., Meriles, J., Zygadlo, J., (2009). Application of thymol and iprodione to control garlic white rot (*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial communities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 161–70. doi:10.1007/s11274-009-0155-7.

Neumann, Michael, Ralf Schulz, Karin Schäfer, Wolfgang Müller, Wilfried Mannheller, and Matthias Liess. 2002. "The Significance of Entry Routes as Point and Non-Point Sources of Pesticides in Small Streams." *Water Research* 36 (4): 835–42. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00310-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00310-4).

Omirou, M. et al. (2012) 'Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies', *Environmental Pollution. Environ Pollut*, 166, pp. 31–39. doi: 10.1016/j.envpol.2012.03.001.

Papoutsis, K. et al. (2019) 'Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold)', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, pp. 479–491. doi: 10.1016/j.tifs.2019.02.053.

Perruchon, C., Patsioura, V., Vasileiadis, S., Karpouzas, D.G., 2016. Isolation and characterisation of a *Sphingomonas* strain able to degrade the fungicide ortho-phenylphenol. *Pest Management Science* 72, 113–124. <https://doi.org/10.1002/ps.3970>.

Regulation (EU) 2019/1021 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL - of 20 June 2019 - on Persistent Organic Pollutants." 2019 Official Journal of the European Union (L 229/5): 33.

Regulation (EU) 2019/1582 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL - of 25 September 2019 - amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 as regards maximum residue levels for imazalil in or on certain products.

Regulation (EU) 2018/78 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL - of 16 January 2018- amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 as regards maximum residue levels for 2-phenylphenol, bensulfuron-methyl, dimethachlor and lufenuron in or on certain products.

Rønhede, S. et al. (2007) 'Mineralization of hydroxylated isoproturon metabolites produced by fungi', *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7), pp. 1751–1758. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.01.037.

Sangeetha, M. et al. (2016) 'Biodegradation of Pesticide using Fungi Isolated from Paddy Fields of Thanjavur District, India', *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 5(10), pp. 348–354. doi: 10.20546/ijcmas.2016.510.039.

Santiago, Dunia E, Elisenda Pulido Melián, Cristina Fernández Rodríguez, José A. Ortega Méndez, Sebastián O. Pérez-Báez, and José M. Doña-Rodríguez\*. 2011. "Degradation and Detoxification of Banana Postharvest Treatment Water Using Advanced Oxidation Techniques." *Green and Sustainable Chemistry* 1 (August): 39–46. <https://doi.org/10.4236/gsc.2011.13008>.

Sembiring T. and Winter J. (1989). Anaerobic degradation of o-phenylphenol by mixed and pure cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 89-92.

Sequinatto, L., Reicher, J.M., Dos Santos, D.R., Reinert, D.J., Copetti, A.C.C. (2013). Occurrence of agrochemicals in surface waters of shallow soils and steep slopes cropped to tobacco. *Química Nova* 36, 768–72.

Silva, V. et al. (2019) 'Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 653, pp. 1532–1545. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.441.

Singh D. and Chen S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 399-417.

Sutton, B. C. & Hennebert, G. (1994) Interconnections amongst anamorphs and their possible contribution to ascomycete systematics. In *Ascomycete Systematics: problems and perspectives in the nineties* (D. L. Hawksworth, ed.): 77–100. [NATO ASI SERIES No. 269.] Plenum Press, New York.

Taiyun Wei, M. et al. (2017) Package 'corrplot' Title Visualization of a Correlation Matrix.

T. Tristan Brandhorst, Bruce S. Klein, 2018. Uncertainty surrounding the mechanism and safety of the post-harvest fungicide fludioxonil, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.037>.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1998. Registration Eligibility Decision (RED) Iprodione. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Online at: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/2335.pdf>.

Vanni, A., Gamberini, R., Calabria, A., Pellegrino, V., (2000). Determination of presence of fungicides by their common metabolite, 3,5-DCA, in compost. *Chemosphere* 41, 1–6.

Verkley, G. J. M., Starink-Willemse, M., Iperen, A. van & Abeln, E. C. A. (2004) Phylogenetic analyses of *Septoria* species based on the ITS and LSU-D2 regions of nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* 96: 558–571.

Walker, A., (1987). Further observations on the enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. *Pesticide Science* 21, 219–31.

Walker, A.; Brown, P.A.; Entwistle, A.R.(1986) Enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. *Pestic. Sci.* 1986, 17 (2), 183–193.

Walker, A.; Entwistle, A.R.; Dearnaley, N.Y.(1984) Evidence for enhanced degradation of iprodione in soils treated previously with this fungicide. In *Monograph 27, Soils and Crop Protection Chemicals*; Hance, R.J., Ed.; British Crop Protection Council: Croydon, UK, 1984; 117–123.

Wang, X. et al. (2016) 'Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review', Environmental Research. Academic Press Inc., pp. 86–104. doi: 10.1016/j.envres.2016.05.003.

Wang Z, Wu W, Cui L, Li X, Kulyar MF-A, Xiong H, Zhou N, Yin H, Li J, Li X (2021) Isolation, characterization, and interaction of lignin-degrading bacteria from rumen of buffalo (*Bubalus bubalis*). Journal of Basic Microbiology 61(8):757–768. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100068>.

Xu JL., He J., Wang ZC., Wang K., Li WJ., Tang SK., Li SP. (2007). *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim degrading bacterium. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 57, 2754-2757.

Yamazaki, K. et al. (2020) 'Associations between prenatal exposure to organochlorine pesticides and thyroid hormone levels in mothers and infants: The Hokkaido study on environment and children's health', Environmental Research. Academic Press Inc., 189, p. 109840. doi: 10.1016/j.envres.2020.109840.

Yang, L. et al. (2011) 'Biodegradation of carbofuran by *Pichia anomala* strain HQ-C-01 and its application for bioremediation of contaminated soils', Springer. doi: 10.1007/s00374-011-0602-0.

Yoshioka N., Akiyama Y., Teranishi K. (2004). Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. Journal of Chromatography A., 1022, 145- 150.

Zervakis, O. et al. (2001) Mycelium Growth Kinetics and Optimal Temperature Conditions for the Cultivation of Edible Mushroom Species on Lignocellulosic Substrates, Folia Microbiol.

Zhang, Z. et al. (2011) 'Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8', Bioresource Technology, 102(5), pp. 4111–4116. doi: 10.1016/j.biortech.2010.12.064.

Zhao, R. et al. (2010) 'Isolation and characterization of *Penicillium oxalicum* ZHJ6 for biodegradation of methamidophos', Elsevier.

Zhao, R. bang, Bao, H. ying and Liu, Y. xia (2010) 'Isolation and Characterization of *Penicillium oxalicum* ZHJ6 for Biodegradation of Methamidophos', Agricultural Sciences in China. Elsevier, 9(5), pp. 695–703. doi: 10.1016/S1671-2927(09)60145-0.

91/414/EEC/ Thiabendazol-7603/VI/97-Final.

#### Διαδικτυακές Πηγές

- 1) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1519916532783&uri=CELEX:32018R0078>
- 2) [DrugBank Online | Database for Drug and Drug Target Info](#)
- 3) [PPDB - Pesticides Properties DataBase \(herts.ac.uk\)](#)
- 4) [PubChem \(nih.gov\)](#)