



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ
ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

Δήμητρα Παναγιώτου του Ιωάννη

Λάρισα 2022

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

CONSTRUCTION AND EVALUATION OF MICROBIAL COMMUNITIES
FOR THE DEGRADATION OF PESTICIDES

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καρπούζας Δημήτριος, (Υπεύθυνος Καθηγητής) Καθηγητής Περιβαλλοντικής
Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Βασιλειάδης Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-
Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Καράς Παναγιώτης, Συμβασιούχος ΠΔ 407 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γεωργικά Φάρμακα

Η χρήση διάφορων χημικών ουσιών για την προστασία των φυτών φαίνεται να έχει τις ρίζες της από αρχαιότατων χρόνων. Πρώτοι οι Σουμέριοι, έπειτα οι αρχαίοι Κινέζοι και τέλος οι αρχαίοι Έλληνες και Ρωμαίοι. Η χρήση τους προήλθε από την ανάγκη των ανθρώπων να μπορούν να προστατεύσουν τις καλλιέργειές τους από ασθένειες και παράσιτα. Βέβαια με τα χρόνια έχει δημιουργηθεί μία μεγάλη ποικιλία συνθετικών προϊόντων για τη διασφάλιση της προστασίας των φυτών αλλά και των προϊόντων τους [1].

Κατά τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, υπάρχει ένας σαφής διαχωρισμός ανάμεσα στους όρους γεωργικά φάρμακα και φυτοπροστατευτικά προϊόντα [2]. Αυτός ο διαχωρισμός είναι και που ορίζει τους κανονισμούς σχετικά με την χρήση τους. Γεωργικό φάρμακο είναι μια ουσία που προλαμβάνει, ελέγχει ή σκοτώνει έναν επικίνδυνο οργανισμό – παράσιτο ή ασθένεια είτε προστατεύει φυτά ή φυτικά προϊόντα κατά την παραγωγή, την αποθήκευση ή τη μεταφορά τους. Πέραν της προστασίας των φυτών χρησιμοποιούνται και για την προστασία της δημόσιας υγείας από διάφορες ασθένειες. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει φάρμακα όπως είναι τα ζιζανιοκτόνα, τα μυκητοκτόνα, τα εντομοκτόνα, τα ακαρεοκτόνα, τα νηματοκτόνα, τα μαλακιοκτόνα, οι ρυθμιστές ανάπτυξης, τα απωθητικά, τα τροφτικοκτόνα και τα βιοκτόνα [3,4].

Σύμφωνα με την Έκθεση της Επιτροπής στο Ευρωπαϊκό κοινοβούλιο και το συμβούλιο στις 20 Μαΐου του 2020 τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την προστασία των φυτών και περιορίζεται εκεί η χρήση τους. Δηλαδή εξαιρεί ουσίες που μπορεί να είναι επιβλαβής για τον άνθρωπο ή άλλους οργανισμούς που δεν επηρεάζουν τα φυτά, όπως για παράδειγμα τα βιοκτόνα, αλλά και ουσιών που είναι επιβλαβής για το περιβάλλον. Για την ελάττωση χρήσης τους το 2009 εγκρίθηκε η οδηγία για αειφόρο χρήση γεωργικών φαρμάκων, από επιτροπή της Ευρωπαϊκής Ένωσης, προωθώντας την διαχείριση παρασίτων με χαμηλές εισροές τους και την βιολογική καλλιέργεια. Ενώ από το 2012 καλεί τα κράτη μέλη της σε αξιολόγηση των εθνικών σχεδίων δράσης αν πενταετία και δημοσίευση των αποτελεσμάτων ώστε μέχρι το 2030 να μειωθεί κατά 50% η χρήση επικίνδυνων ουσιών[5].

1.2 Περιβαλλοντική ρύπανση

Η χρήση γεωργικών φαρμάκων έχει επιτρέψει τον υπερδιπλασιασμό της παραγωγής τροφίμων κατά τον περασμένο αιώνα. Τίποτα όμως τόσο μεγάλο δεν έρχεται χωρίς κάποιο αντίκτυπο και σε αυτήν την περίπτωση είναι η ρύπανση του περιβάλλοντος από την αλόγιστη χρήση γεωργικών φαρμάκων. Έρευνες έχουν τεκμηριώσει την ρύπανση του εδάφους, του αέρα και των υδάτινων οικοσυστημάτων [6]. Η ρύπανση του νερού με γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη γεωργία και τις αστικές περιοχές αποτελεί παγκόσμια ανησυχία. Το 2015 και το 2018, η Ευρωπαϊκή Ένωση δημοσίευσε τις δύο λίστες παρακολούθησης οργανικών ουσιών, οι οποίες κατέδειξαν την ανάγκη παρακολούθησης τους στον τομέα της πολιτικής για τα ύδατα [7].

Η μακροχρόνια συχνή χρήση μπορεί να οδηγήσει σε βιοσυσσώρευση γεωργικών φαρμάκων στις τροφικές αλυσίδες. Η εντατικοποίηση της γεωργίας έχει προκαλέσει την εξαφάνιση πολλών άγριων ειδών φυτών και ζώων. Το ρυπασμένο με γεωργικά φάρμακα νερό αποτελεί απειλή για την υδρόβια μορφή ζωής. Επίσης η έκθεση χερσαίων φυτών μπορεί να προκαλέσει υποθανατηφόρα αποτελέσματα, τραυματίζοντάς τα. Επιπλέον έντομα που δεν αποτελούν κίνδυνο, αλλά είναι χρήσιμα όπως οι μέλισσες για παράδειγμα, εκτίθενται σε τοξικές ουσίες [4]. Έρευνες έχουν δείξει ότι η χρήση εντομοκτόνων και μυκητοκτόνων έχει σταθερές αρνητικές επιπτώσεις στη βιοποικιλότητα [8]. Ακόμα, η χρήση γεωργικών φαρμάκων και λιπασμάτων έχει επιπτώσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους, παρόμοια με την υπερβολική χρήση αντιβιοτικών από τον άνθρωπο, όπως για παράδειγμα βλαβερές επιπτώσεις σε μυκορριζικούς μύκητες που αναπτύσσονται στη ριζόσφαιρα και βοηθούν στην πρόσληψη θρεπτικών ουσιών. Τέλος, έχει μελετηθεί και η αρνητική επίδραση στον άνθρωπο, με υψηλότερες ομάδες κινδύνου να είναι αυτοί που εκτίθενται στα γεωργικά φάρμακα. [9].

Η παραγωγή καλύτερων, ασφαλών και φιλικών προς το περιβάλλον σκευασμάτων φυτοφαρμάκων θα μπορούσε να μειώσει τις βλαβερές συνέπειες που σχετίζονται με τη χρήση φυτοφαρμάκων. Εάν τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται σε κατάλληλες ποσότητες και χρησιμοποιούνται μόνο όταν απαιτείται ή είναι απαραίτητο, οι κίνδυνοι φυτοφαρμάκων μπορούν να ελαχιστοποιηθούν. Άλλες δράσεις για την προστασία του περιβάλλοντος από την χρήση γεωργικών φαρμάκων είναι και η απορρύπανση.

1.1 Μέθοδοι Απορρύπανσης

Η απομάκρυνση των γεωργικών φαρμάκων και των παραγώγων τους από το περιβάλλον είναι υψίστης σημασίας για το περιβάλλον. Η ανάπτυξη μιας ενιαίας καθολικής διαδικασίας για την αφαίρεσή τους είναι εξαιρετικά δύσκολη. Η απορρύπανση των γεωργικών φαρμάκων χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες: βιολογική, χημική και φυσική [10]. Συγκριτικά οι χημικές και φυσικές μέθοδοι απορρύπανσης είναι πιο ακριβές από τις βιολογικές μεθόδους. Οι χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν προηγμένες διαδικασίες οξειδωσης, επεξεργασία UV-h₂O₂ και UV-όζον, κατάλυση με χρήση φωτός και φωτοαποδόμηση κα. [11]. Οι φυσικές μέθοδοι βασίζονται κυρίως στη διαδικασία απορρόφησης ουσιών με χρήση ενεργών ανθράκων, ζεόλιθων, οξειδία σιδήρου κα. [12]. Οι βιολογικές μέθοδοι περιλαμβάνουν βιοαύξηση, βιοδιέγερση, χρήση βακτηρίων, Αρχαίων, γαιοσκώληκων και μυκήτων [13,14].

1.2.1 Απορρύπανση με χρήση μικροοργανισμών και μυκήτων

Η χρήση μικροοργανισμών και μυκήτων για την αποικοδόμηση και την απομάκρυνση των γεωργικών φαρμάκων έχει αποδειχθεί ισχυρό εργαλείο στην απορρύπανση. Για την αποικοδόμηση φαρμάκων η μικροβιακή βιοτεχνολογία διαθέτει μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, υψηλές ταχύτητες μετάλλαξης και ευκολία στην καλλιέργειά τους. Διάφορα είδη βακτηρίων και μυκήτων έχουν απομονωθεί από το περιβάλλον και χαρακτηριστεί κατάλληλα για την βιολογική αποικοδόμηση γεωργικών φαρμάκων. Η δραστηριότητα αποικοδόμησης γεωργικών φαρμάκων από μικροοργανισμούς ρυθμίζεται από έναν αριθμό περιβαλλοντικών παραγόντων όπως το pH, η υγρασία του εδάφους, η θερμοκρασία, ο αερισμός του εδάφους κα. [15]. Το pH, συγκεκριμένα, θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη βιολογική αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων από τους μύκητες [16].

1.2 Environmental Fate

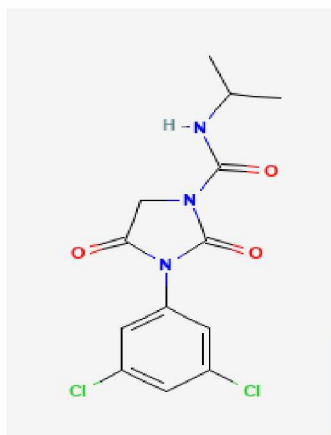
Η περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες. Τα γεωργικά φάρμακα τις περισσότερες φορές οδηγούνται στο έδαφος, όπου εκεί μπορούν να μεταφερθούν ή να αποδομηθούν, και έτσι παράγονται νέες ουσίες. Η μεταφορά των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον πραγματοποιείται μέσω προσρόφησης, έκπλυσης, εξάτμισης, απορροής ή μετατόπισης ψεκασμού και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, η οργανική ύλη και η σύσταση του εδάφους. Κατά τη διαδικασία της προσρόφησης τα γεωργικά φάρμακα συνδέονται με σωματίδια του εδάφους και έτσι συμβαίνει απορροή στα υπέργεια ύδατα ή διαρροή στα υπόγεια ύδατα. Η μεταφορά ουσιών στα υδροφόρα συστήματα οδηγεί στην εμφάνιση δυσμενών επιπτώσεων τόσο στον άνθρωπο και τα ζώα, όσο και στο ευρύτερο περιβάλλον. Επίσης υπάρχει η περίπτωση μετατοπισμού του ψεκασμού μέσω του αέρα, όπου σωματίδια γεωργικών φαρμάκων

παρασύρονται από τον άνεμο σε περιοχές όπου δεν αποτελούν στόχο ψεκασμού ρυπαίνοντας γειτονικά περιβάλλοντα. Ακόμα η διαδικασία πτητοποίησης μπορεί να απομακρύνει σωματίδια γεωργικών φαρμάκων. Τέλος η διαδικασία αποικοδόμησης των γεωργικών φαρμάκων που πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς αλλά και φυτά συσσωρευτές στο φυσικό περιβάλλον μπορεί να παράγει δεύτερους μεταβολίτες λιγότερο, εξίσου ή περισσότερο τοξικούς από τις αρχικές ενώσεις [17].

1.3 Γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν

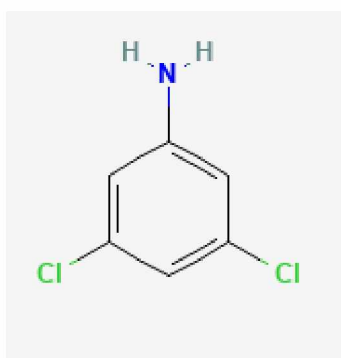
Για τη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε το μυκητοκτόνο Iprodione και ο μεταβολίτης του, η 3,5-διχλωροανιλίνη (3,5-dichloroaniline, 3,5-DCA).

Το iprodione είναι ένα από τα αποτελεσματικά μυκητοκτόνα για την προστασία των καλλιεργειών και τον έλεγχο των παθογόνων μυκήτων των φυτών [18] και εφαρμόζεται μέσω ψεκασμού της φυλλόσφαιρας των φυτών αλλά και στο έδαφος. Ανήκει στην ομάδα των δικαρβοξαμιδικών μυκητοκτόνων και χαρακτηρίζεται μέτρια τοξικό. Η χημική ονομασία της ουσίας είναι 3-(3,5-διχλωρο-φαινυλ)-2,4-διοξο-N-προπαν-2-υλιμιδαζολιδινο-1-καρβοξαμίδιο [19]. Έχει αποδειχθεί ότι είναι μια ουσία που προκαλεί διαταραχές στον ενδοκρινικό σύστημα για μικρού μεγέθους ζώα [20].



EIKONA 1: δομή του iprodione [19]

Η 3,5-διχλωροανιλίνη είναι μεταβολίτης του iprodione και δημιουργείται μέσω μετασχηματισμού τριών σταδίων [21]:



- Το iprodione υδρολύεται σε ισοπροπυλαμίνη και 3,5-διχλωροφαινυλκαρβοξιαμίδιο
- το 3,5-διχλωροφαινυλκαρβοξιαμίδιο μετασχηματίζεται σε όξινη 3,5-δι-χλωρο-φαινυλαινουρία
- η όξινη 3,5-διχλωροφαινυλαινουρία υδρολύεται σε 3,5-διχλωροανιλίνη.

Έρευνες έχουν δείξει ότι είναι τοξική στους νεφρούς [22]. Η ανίχνευσή της στο έδαφος έχει συσχετιστεί με μειώσεις του αριθμού μικροοργανισμών καθώς και τη δραστηριότητά και την ποικιλότητα τους [23]. Η 3,5-διχλωροανιλίνη χαρακτηρίστηκε επίσης τοξικό ισομερές των διχλωροανιλινών [24].

1.4 Βακτήριο & Μύκητας

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια του γένους *Paenarthrobacter* και συγκεκριμένα το στέλεχος TA1.8 και μύκητες του φύλου *Ascomycήτων* και συγκεκριμένα το *Cladosporium Herbarum*.

Το στέλεχος TA1.8 απομονώθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος από καλλιέργειες εμπλουτισμού από δείγματα φυλλόσφαιρας και εδάφους και έχει παρατηρηθεί ότι είναι ικανό για την αποικοδόμηση μεγάλου ποσοστού του Iprodione (<99%) [25]. Το απομονωμένο στέλεχος ανήκει στο γένος *Paenarthrobacter* το οποίο μαζί με το *Arthrobacter* περιλαμβάνει βακτηριακά στελέχη με την ικανότητα καταβολισμού γεωργικών φαρμάκων όπως η ατραζίνη (*P. Aurescens TC1*) [26]. Άλλα απομονωμένα μικροβιακά στελέχη με την ικανότητα να αποδομούν το IPR ανήκουν στα ίδια γένη, όπως για παράδειγμα το *Paenarthrobacter YJN-5* [27] και το *Arthrobacter sp. strain C1* [21].

Το είδος *C. herbarum* απομονώθηκε επίσης στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος και περιγράφηκε ικανό για την αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου imazalil. Το συγκεκριμένο είδος επιλέχθηκε καθώς δεν εμφανίζει κάποια παθογένεια σε ορισμένα φρούτα που δοκιμάστηκε και η μη εμφάνιση παθογένειας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η χρήση του για την βιολογική απορρύπανση σε μολυσμένα εδάφη θα είναι κατάλληλο μέσο [28].

1.5 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία μικροβιακών κοινοτήτων για τη διάσπαση του φαρμάκου iprodione (IPR) και εν συνεχεία της 3,5-διχλωροανιλίνης (3,5-DCA), ως προϊόν μεταβολισμού του πρώτου. Παράλληλα μελετήθηκε η ικανότητα του *C. herbarum* να αποικοδομεί διαφορετικές συγκεντρώσεις της 3,5-DCA και εξετάστηκε η μεταβολή της ικανότητάς του παρουσία αυξανόμενης ποσότητας γλυκόζης.

2 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 2.1 Μικροβιακά στελέχη

Η συνθετική μικροβιακή κοινότητα που εξετάστηκε στην παρούσα εργασία αποτελούνταν από το στέλεχος *Paenarthrobacter sp.* TA1.8 που έχει την ικανότητα να αποδομεί το μυκητοκτόνο iprodione (IPR) και τον μύκητα *Cladosporium herbarum* που αποδομεί το μυκητοκτόνο imazalil (IMZ) [25,28]. Οι παραπάνω μικροοργανισμοί ανήκουν στην συλλογή μικροοργανισμών με την ικανότητα να διασπούν γεωργικά φάρμακα του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος. Το *Paenarthrobacter sp.* TA1.8 διατηρούνταν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) σε διάλυμα γλυκερόλης 30%. Καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο MSM (βλέπε ενότητα 2.2) με μόνη πηγή άνθρακα το μυκητοκτόνο IPR. Ο μύκητας *C. herbarum* διατηρούνταν σε διαρκή αποδομητική κατάσταση σε θρεπτικό μέσο MSMN (βλέπε ενότητα 2.2) που περιείχε 50 mg/L του IMZ.

2.1.1 2.1.1 Συλλογή κονιδίων του μύκητα *C. Herbarum*

Τα κονίδια του μύκητα συλλέχθηκαν από υγρή καλλιέργεια του *C. herbarum* σε θρεπτικό μέσο MSMN παρουσία IMZ, έπειτα από επώαση για 4 βδομάδες. Αρχικά η καλλιέργεια αποχύθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρησης (falcon) μέσα από αποστειρωμένο χωνί και τουλουπάνι. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 8000 rpm, για 30 λεπτά στους 16°C. με το πέρας της φυγοκέντρησης απομακρύνθηκε το υπερκείμενο προσεκτικά με χρήση πιπέτας, έως ότου απομείνουν στον σωλήνα φυγοκέντρησης 5 ml. Το εναιώρημα αναδεύτηκε έντονα σε μηχανήμα vortex και η συγκέντρωση των κονιδίων προσδιορίστηκε σε πλάκα Neubauer. Για την μέτρηση των κονιδίων με τη χρήση πλάκας Neubauer έγινε αραιώση του εναιωρήματος 1:10ρ, έπειτα μέτρηση των κονιδίων εντός των 8 περιοχών και τέλος προσδιορισμός των κονιδίων στο εναιώρημα με τον τύπο:

$$\text{Κονίδια/ml} = \left(\frac{\text{κονίδια}}{\text{αριθμός τετραγώνων}} \right) \times \text{Αραίωση} \times 10.000$$

2.2 2.2 Θρεπτικά Μέσα

Τα υγρά θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την περάτωση των πειραμάτων ήταν τα θρεπτικά αλάτων MSM (mineral salt medium) και MSMN (mineral salt medium with N-source). Το κάθε ένα από αυτά αποτελείται από τρία διαφορετικά βασικά διαλύματα (Stock).

Τα συστατικά του κάθε διαλύματος είναι:

- Stock 1 (1000 ml) : 22.7 g KH₂PO₄, 59.7 g Na₂HPO₄ 12.H₂O, 10 g NH₄Cl για MSMN ή 10 g NaCl για MSM

- Stock 2 (1000 ml) : 5 g MgSO₄ 7.H₂O, 0.1 g CaCl₂ 2.H₂O, 0,15 g MnSO₄
- Stock 3 (1000 ml) : 0.46 g FeSO₄ 7.H₂O

Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε dH₂O ως διαλύτης.

Η παρασκευή του MSM (1000 ml) έγινε με ανάμειξη 100 ml stock 1 και 780 ml dH₂O. Ακολούθησε αποστείρωση για 20min σε θερμοκρασία 121 °C και εφόσον ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου, έγινε η προσθήκη των 100 ml stock 2 και 20 ml stock 3, σε ασηπτικές συνθήκες. Για την παρασκευή του MSMN αρχικά αποστειρώθηκαν με θέρμανση 100ml του stock 1, 730 ml dH₂O και 0.15 g υδρολύματος καζεΐνης. Στην συνέχεια, όταν το διάλυμα ήρθε σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες 100 ml του stock 2, και 20 ml του stock 3. Στην συνέχεια ενισχύθηκε η θρεπτική αξία του μέσου με περαιτέρω προσθήκη, υπό ασηπτικές συνθήκες, 50 ml αποστειρωμένου διαλύματος γλυκόζης 10% και 250 μl αποστειρωμένου διαλύματος κοβαλαμίνης (βιταμίνης B12) (100 μg/ml).

Το θρεπτικό MSM χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους *Raenarthrobacter sp.* TA1.8 ενώ το θρεπτικό MSMN χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια του μύκητα *C. herbarum* και της συνθετικής μικροβιακής κοινότητας. Για τις ανάγκες των πειραματικών δοκιμών, στα θρεπτικά μέσα προστέθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες, κατάλληλες ποσότητες διαλύματος IPR σε DMSO.

Για εκτέλεση της τρίτης πειραματικής διαδικασίας δημιουργήθηκαν ακόμα 4 θρεπτικά μέσα MSMN, όπου το καθένα από αυτά περιείχε διαφορετική συγκέντρωση γλυκόζης όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2.2.1**. Οι ποσότητες των υπόλοιπων συστατικών παρέμειναν σταθερές.

Πίνακας 2.2.1: Ποσότητες διαλύματος γλυκόζης 10% και dH₂O για την παραγωγή θρεπτικών μέσων MSMN

MSMN με συγκέντρωση γλυκόζης	Διάλυμα γλυκόζης 10%	dH ₂ O
0 %	δεν έγινε προσθήκη γλυκόζης	780 ml
1 %	100 ml	680 ml
2.5 %	250 ml	530 ml
5 %	500 ml	280 ml

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε LB agar θρεπτικό μέσο για τον προσδιορισμό μονάδων σχηματισμού αποικιών του *Raenarthrobacter sp.* TA1.8. Το LB agar δημιουργήθηκε με τη προσθήκη 7.5g LB broth και 7.5g bacteriological agar σε 500 ml dH₂O. Έπειτα έγινε αποστείρωση του στους 121°C για 21 λεπτά και το θρεπτικό επιστρώθηκε σε 21 τρυβλία των 90mm. Τα στερεοποιημένα τρυβλία αποθηκεύτηκαν στους 4°C.

2.3 Εκχύλιση των IPR και 3,5-DCA

Για την εκχύλιση των IPR και 3,5-DCA από το θρεπτικό μέσο, αναμείχθηκαν 300 μl της καλλιέργειας με 600 μl ακετονιτριλίου (ACN). Έπειτα το διάλυμα αναδεύτηκε έντονα σε vortex για 10 sec και φυγοκεντρήθηκε στα 13300 rpm για 5min . Τέλος με το πέρας της

φυγοκέντρωσης μεταφέρθηκαν 600 μl υπερκειμένου σε γυάλινα φιαλίδια προκειμένου να αναλυθούν σε σύστημα HPLC-PDA.

2.4 Προσδιορισμός Συγκεντρώσεων

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων του IPR και της 3,5-DCA πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων. Η στατική φάση αποτελούνταν από στήλη Athena C18 column (150 mm×4.6 mm) (ANPEL Laboratory Technologies) και κινητή φάση 70 % ACN : 30 % ddH₂O. Οι τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων IPR και 3,5-DCA προσδιορίστηκαν μέσω πρότυπης καμπύλης έπειτα από ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων των ουσιών σε διαλύτη DMSO. Από τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις των διαλυμάτων της κάθε ουσίας σε ACN, συγκέντρωσης 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0.5 mg/L, 0.1 mg/L, 0.05 mg/L και 0.01 mg/L.

2.5 Μελέτη της αποτελεσματικότητας της συνθετικής μικροβιακής κοινότητας έναντι των IPR και 3,5-DCA

Για την μελέτη της αποτελεσματικότητας της συνθετικής μικροβιακής κοινότητας έναντι των IPR και 3,5_DCA προετοιμάστηκαν 9 καλλιέργειες οι οποίες περιείχαν 20ml MSMN και 83μl διάλυμα Iprodione (12000 mg/L) με στόχο τελική συγκέντρωση 50 mg/L. Οι καλλιέργειες εμβολιάστηκαν ανά τριάδα με (i) διάλυμα κονιδίων του μύκητα με στόχο τελική συγκέντρωση 2.508 κονίδια / ml καλλιέργειας, (ii) με καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους *Paenarthrobacter sp.* TA1.8 5×10^8 cfu/ml και (iii) με τους δύο μικροοργανισμούς ταυτόχρονα. Επίσης προετοιμάστηκαν και 2 αβιοτικοί μάρτυρες (abiotic controls) οι οποίοι δεν εμβολιάστηκαν με κανέναν μικροβιακό στέλεχος. Οι ακριβείς ποσότητες του θρεπτικού μέσου, του διαλύματος IPR καθώς και των μικροβιακών εμβολίων αναγράφονται στον **πίνακα 2.5.1**. Η συγκέντρωση των IPR και 3,5DCA στους αβιοτικούς μάρτυρες αξιολογήθηκε με την έναρξη της πειραματικής επώασης (T0). Ακολούθησε μέτρηση έπειτα από διάστημα 8 ωρών και καθημερινά για χρονικό διάστημα 22 ημερών με καθημερινή δειγματοληψία. Την 16η ημέρα της πειραματικής επώασης (T16) έγινε προσθήκη 1ml διαλύματος γλυκόζης 10% σε όλες τις καλλιέργειες και προστέθηκε φρέσκο μυκήλιο στις μεταχειρίσεις, όπου εξ 'αρχής εμβολιάστηκαν με το *C. herbarum* (βλέπε μεταχειρίσεις 2,4 στον πίνακα 2.5.1)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.5.1: Μεταχειρίσεις 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας, ακριβείς ποσότητες θρεπτικού μέσου, διαλύματος IPR και εμβολίου

ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ	MSMN	Διάλυμα iprodione (12000 mg/L)	ΕΜΒΟΛΙΟ
1 – ΑΒΙΟΤΙΚΟΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ (x2)	10 ml	0.042 ml	Δεν πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός

2 – <i>C. herbarum</i> + διάλυμα Iprodione (12000 mg/L) (X3)	20 ml	0.083 ml	0.760 ml κονίδια
3 – <i>Paenarthrobacter</i> <i>TA1.8</i> + διάλυμα Iprodione (12000 mg/L) (X3)	20 ml	0.083 ml	1 ml καλλιέργεια
4 – <i>C. herbarum</i> + <i>Paenarthrobacter TA1.8</i> + διάλυμα Iprodione (12000 mg/L) (x3)	20 ml	0.083 ml	0.760 ml κονίδια + 1 ml καλλιέργεια

2.6 Εκτίμηση της αποδομητικής ικανότητας του μύκητα *C. herbarum* έναντι διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5-DCA.

Για την εκτίμηση της αποδομητικής ικανότητας του μύκητα *C. herbarum* έναντι της 3,5-DCA προετοιμάστηκαν και πάλι 9 καλλιέργειες οι οποίες περιείχαν 30 ml MSMN. Οι καλλιέργειες ανά τριάδα περιείχαν διάλυμα 3,5-DCA με στόχο την τελική συγκέντρωση 20 mg/L, 50 mg/L και 100 mg/L και εμβολιάστηκαν με διάλυμα κονιδίων του μύκητα με στόχο την τελική συγκέντρωση 8.000 κονίδια/ml καλλιέργειας. Ακόμη προετοιμάστηκαν και 6 αβιοτικοί μάρτυρες (abiotic controls) οι οποίοι δεν εμβολιάστηκαν. Οι ακριβείς ποσότητες του θρεπτικού μέσου, του διαλύματος 3,5-DCA όπως και του εμβολίου αναγράφονται στον **πίνακα 2.6.1**. Η συγκέντρωση της 3,5-DCA στους αβιοτικούς μάρτυρες αξιολογήθηκε με την έναρξη της πειραματικής επώασης (T0) και ακολούθησαν μετρήσεις για χρονικό διάστημα 17 ημερών για την πρώτη μεχείριση, 22 ημερών για τη δεύτερη και 31 ημερών για την τρίτη. Την 12η ημέρα της πειραματικής επώασης (T11) έγινε προσθήκη 1 ml διαλύματος γλυκόζης 10% σε μία από τις τρεις καλλιέργειες της κάθε μεταχείρισης, προστέθηκε φρέσκο μηκύλιο σε μία άλλη από τις τρεις καλλιέργειες και σε μία καλλιέργεια δεν προστέθηκε τίποτα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.6.1: Ακριβείς ποσότητες θρεπτικού μέσου, διαλύματος 3,5-DCA και εμβολίου 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας

Μεταχειρίσεις		MSMN	Διάλυμα 3,5-DCA (12.000 mg/L)	Εμβόλιο
1 ^η - τελική συγκέντρωση 3,5-DCA 20 mg/L	Αβιοτικοί Μάρτυρες (X2)	10 ml	0.016 ml	-
	<i>C. herbarum</i> + διάλυμα 3,5-DCA 12.000 mg/L (X3)	30 ml	0.050 ml	0,230 ml
2 ^η - τελική συγκέντρωση 3,5-DCA 50 mg/L	Αβιοτικοί Μάρτυρες (X2)	10 ml	0.041ml	-
	<i>C. herbarum</i> + διάλυμα 3,5-DCA 12.000 mg/L (X3)	30 ml	0.125 ml	0,230 ml
3η - τελική συγκέντρωση	Αβιοτικοί Μάρτυρες (X2)	10 ml	0.083 ml	-

3,5-DCA 100 mg/L	<i>C. herbarum</i> + διάλυμα 3,5-DCA 12.000 mg/L (X3)	30 ml	0.250 ml	0,230 ml
------------------	---	-------	----------	----------

2.7 Εκτίμηση της αποδομητικής ικανότητας του μύκητα *C. herbarum* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Για την εκτίμηση της αποδομητικής ικανότητας του μύκητα *C. herbarum* σε θρεπτικά μέσα με αυξανόμενη συγκέντρωση γλυκόζης προετοιμάστηκαν 15 καλλιέργειες, οι οποίες περιείχαν 30 ml MSMN και διάλυμα 3,5-DCA με στόχο την τελική συγκέντρωση 50 mg/L. Στις καλλιέργειες ανά τριάδα προστέθηκαν θρεπτικά μέσα με διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης με τελική συγκέντρωση γλυκόζης 0%, 0.5%, 1%, 2.5% και 5% και εμβολιάστηκαν με διάλυμα κονιδίων του μύκητα με στόχο την τελική συγκέντρωση 4.000 κονίδια / ml καλλιέργειας. Επιπρόσθετα προετοιμάστηκαν 10 αβιοτικοί μάρτυρες (abiotic controls). Οι ακριβείς ποσότητες των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται αναλυτικότερα στον **πίνακα 2.7.1**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.7.1: Ακριβείς ποσότητες θρεπτικού μέσου, διαλύματος 3,5-DCA και εμβολίου

Μεταχειρίσεις		MSMN	Διάλυμα 3,5-DCA (12000 mg/L)	Εμβόλιο
1 – 0% συγκέντρωση γλυκόζης	Αβιοτικοί Μάρτυρες (X2)	10 ml	0.125 ml	0.310 ml
	<i>C. herbarum</i> + διάλυμα 3,5-DCA 12.000 mg/L (X3)	30 ml	0.041 ml	0.310 ml
2 – 0.5% συγκέντρωση γλυκόζης	Αβιοτικοί Μάρτυρες (X2)	10 ml	0.125 ml	0.310 ml
	<i>C. herbarum</i> + διάλυμα 3,5-DCA 12.000 mg/L (X3)	30 ml	0.041 ml	0.310 ml
3 – 1% συγκέντρωση γλυκόζης	Αβιοτικοί Μάρτυρες (X2)	10 ml	0.125 ml	0.310 ml
	<i>C. herbarum</i> + διάλυμα 3,5-DCA 12.000 mg/L (X3)	30 ml	0.041 ml	0.310 ml
4 – 2.5% συγκέντρωση γλυκόζης	Αβιοτικοί Μάρτυρες (X2)	10 ml	0.125 ml	0.310 ml
	<i>C. herbarum</i> + διάλυμα 3,5-DCA 12.000 mg/L (X3)	30 ml	0.041 ml	0.310 ml
5 – 5% συγκέντρωση γλυκόζης	Αβιοτικοί Μάρτυρες (X2)	10 ml	0.125 ml	0.310 ml
	<i>C. herbarum</i> +	30 ml	0.041 ml	0.310 ml

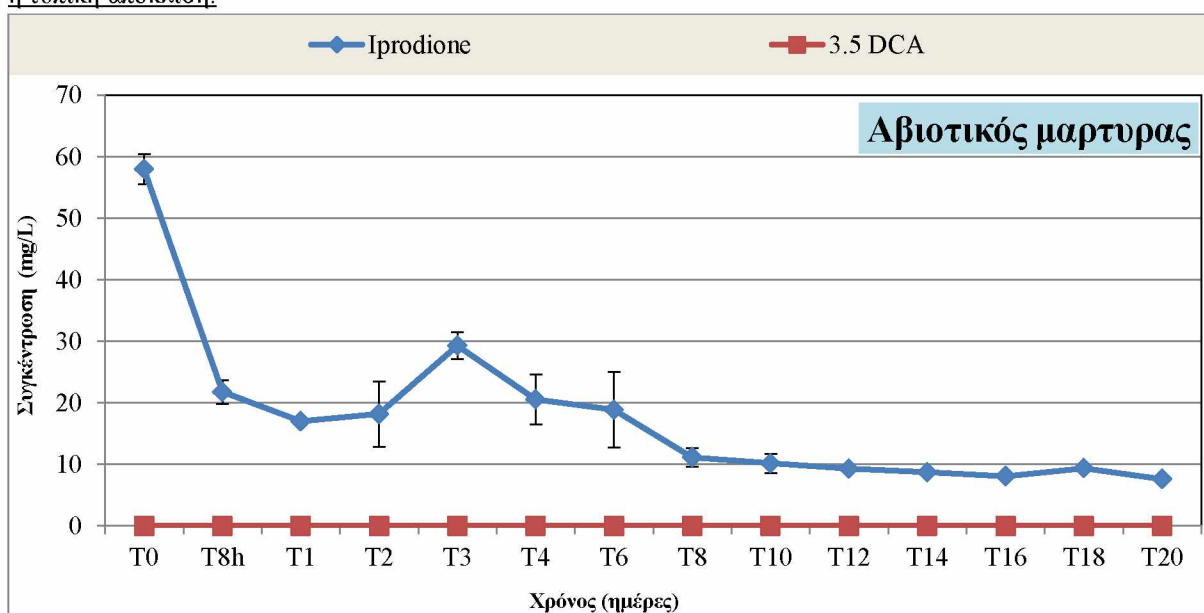
	διάλυμα 3,5-DCA 12.000 mg/L (X3)			
--	--	--	--	--

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μελέτη της αποτελεσματικότητας της συνθετικής μικροβιακής κοινότητας έναντι των IPR και 3,5-DCA

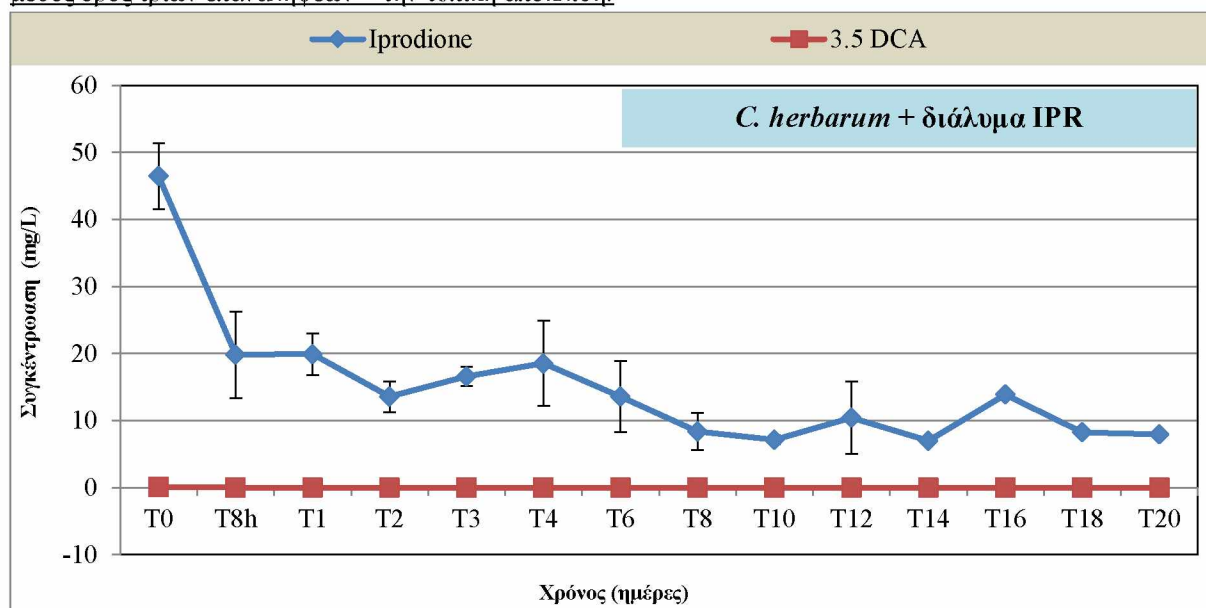
Στο **Διάγραμμα 3.1.1** παρουσιάζεται η αβιοτική αποδόμηση του IPR. Η συγκέντρωση του IPR μειώθηκε σταδιακά στο διάστημα των 21 ημερών (T0-T20). Παράλληλα δεν παρατηρήθηκε παραγωγή 3,5-DCA. Αυτή η αποδόμηση περιγράφηκε από το μοντέλο κινητικής Hockey-Stick (**Πίνακας 3.1.1**) με σταθερά αποδόμησης $K_1=3,194$ mg/L ανά ημέρα και $K_2=0,0061$ mg/L ανά ημέρα [29].

Διάγραμμα 3.1.1: Πρότυπο αποδόμησης του IPR αβιοτικά. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος δύο επαναλήψεων \pm η τυπική απόκλιση.



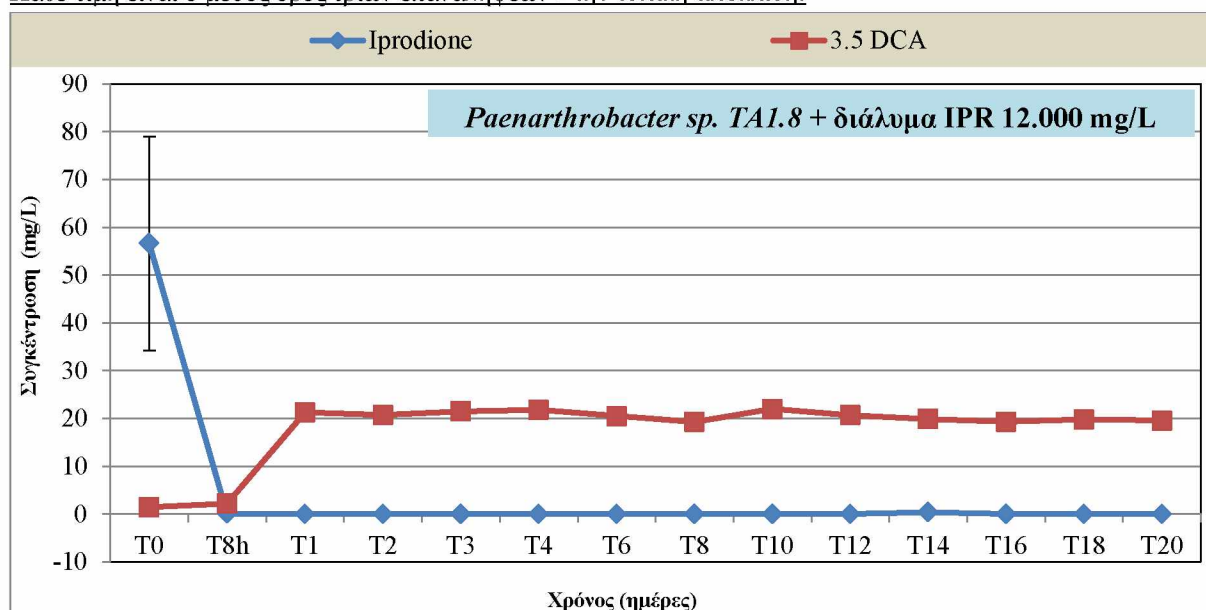
Στο **Διάγραμμα 3.1.2** παρουσιάζεται η αποικοδόμηση του IPR παρουσία του μύκητα *C. herbarum*. Η συγκέντρωση του IPR μειώθηκε σταδιακά και περιγράφηκε ικανοποιητικά από το μοντέλο κινητικής Hockey-Stick (**Πίνακας 3.1.1**) με σταθερά αποδόμησης $K=2.84$ mg/L την ημέρα. Παράλληλα δεν παρατηρήθηκε παραγωγή της 3,5-DCA.

Διάγραμμα 3.1.2: Το πρότυπο αποδόμησης του IPR παρουσία του μύκητα *C. herbarum*. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



Στο **Διάγραμμα 3.1.3** παρουσιάζεται η αποικοδόμηση του IPR από *Paenarthrobacter TA1.8*. Η συγκέντρωση του IPR μειώθηκε σε διάστημα ωρών. Παράλληλα παρατηρήθηκε παραγωγή 3,5-DCA τη δεύτερη ημέρα (T1) με συνολική συγκέντρωση 21.23 mg/L. Η συγκέντρωση της 3,5-DCA παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα στο χρονικό διάστημα της πειραματικής επώασης. Την αποδόμηση IPR και παράλληλη παραγωγή της 3,5-DCA της συγκεκριμένης μεταχείρισης περιγράφηκε από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO, Single First Order), (**Πίνακας 3.1.1**).

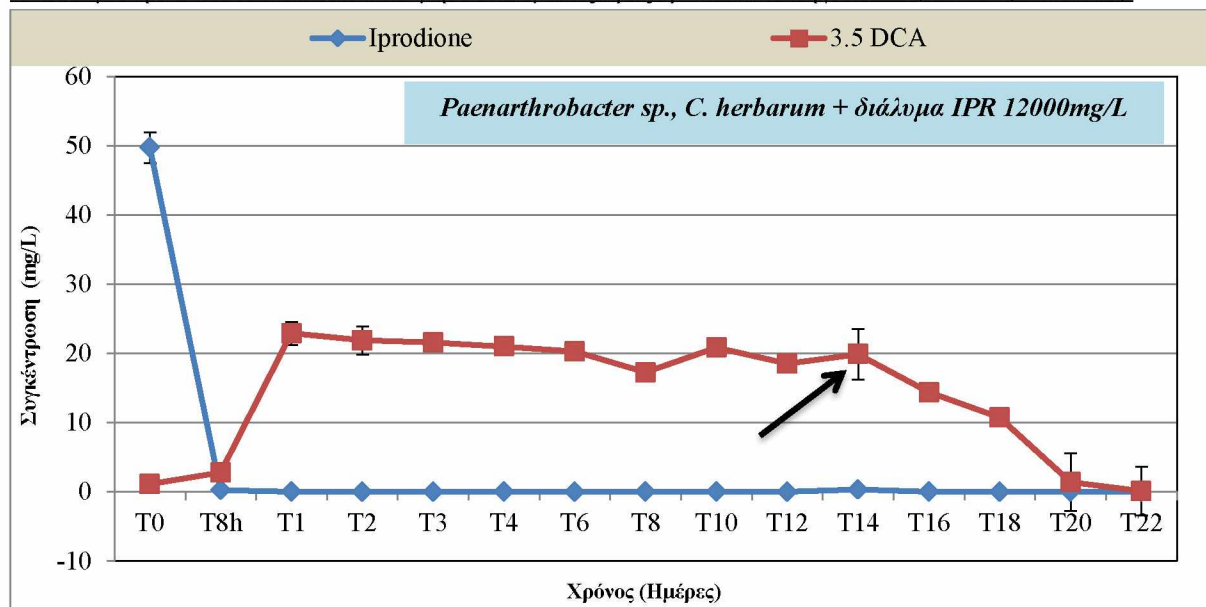
Διάγραμμα 3.1.3: Πρότυπο της αποδόμησης του IPR παρουσία του βακτηρίου *Paenarthrobacter sp. TA1.8*. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



Στο **Διάγραμμα 3.1.4** παρουσιάζεται η ικανότητα αποδόμησης του Iprodione παρουσία του βακτηρίου *Paenarthrobacter TA1.8* και του μύκητα *C. herbarum*. Όπως φαίνεται η

συγκέντρωση του IPR και σε αυτή την περίπτωση μειώθηκε σε διάστημα 8 ωρών και παράλληλα αυξάνεται η συγκέντρωση της 3,5-DCA. Η συγκέντρωση της 3,5-DCA μειώθηκε κατά 99,9 % σε διάστημα 21 ημερών (T22) πειραματικής επώασης. Η αποδόμηση των δύο ουσιών περιγράφηκε από το μοντέλο κινητικής SFO (Πίνακας 3.1.1).

Διάγραμμα 3.1.4: Πρότυπο της αποδόμησης του IPR παρουσία του βακτηρίου *Paenarthrobacter sp. TA1.8* και του μύκητα *C. Herbarum*. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



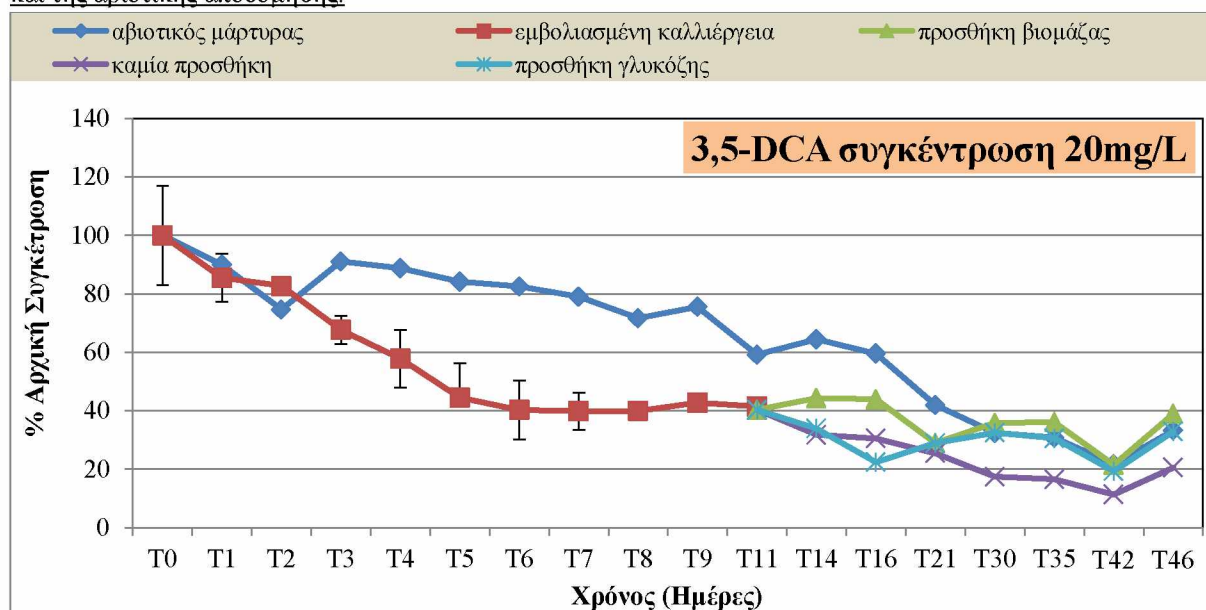
Πίνακας 3.1.1: Χρόνος ημιζωής (DT50), σταθερές αποδόμησης (K) για κάθε μεταχείριση και οι τιμές δοκιμασίας χ^2 . Οι τιμές δοκιμασίας χ^2 συνέβαλαν στην επιλογή του κατάλληλου μοντέλου κινητικής κάθε μεταχείρισης σε συνδυασμό με την οπτική παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

Μεταχείριση	Αβιοτικός μάρτυρας	<i>C. herbarum</i>	<i>Paenarthrobacter sp. TA1.8</i>	Σύνθετη κοινότητα
χ^2 / χ^2 IPR	17,19	15,37	35,74	30,19
χ^2 3,5-DCA	-	-	15,31	29,02
DT50 IPR (Ημέρες)	0,22	0,24	0,15	0,13
DT50 3,5DCA (Ημέρες)	-	-	1,91E+10	19,69
Kdeg IPR (Ημέρα-1)	-	-	4,70	5,18
K1 IPR (Ημέρα-1)	3,19	2,84	-	-
K2 IPR (Ημέρα-1)	0,06	0,05	-	-
Kdeg 3,5-DCA (Ημέρα-1)	-	-	3,64E-11	0,035
K μετατροπής (Ημέρα-1)	-	-	0,36	0,46

3.2 Εκτίμηση της αποδομητικής ικανότητας του μύκητα *C. herbarum* έναντι διαφορετικών συγκεντρώσεων 3,5-DCA.

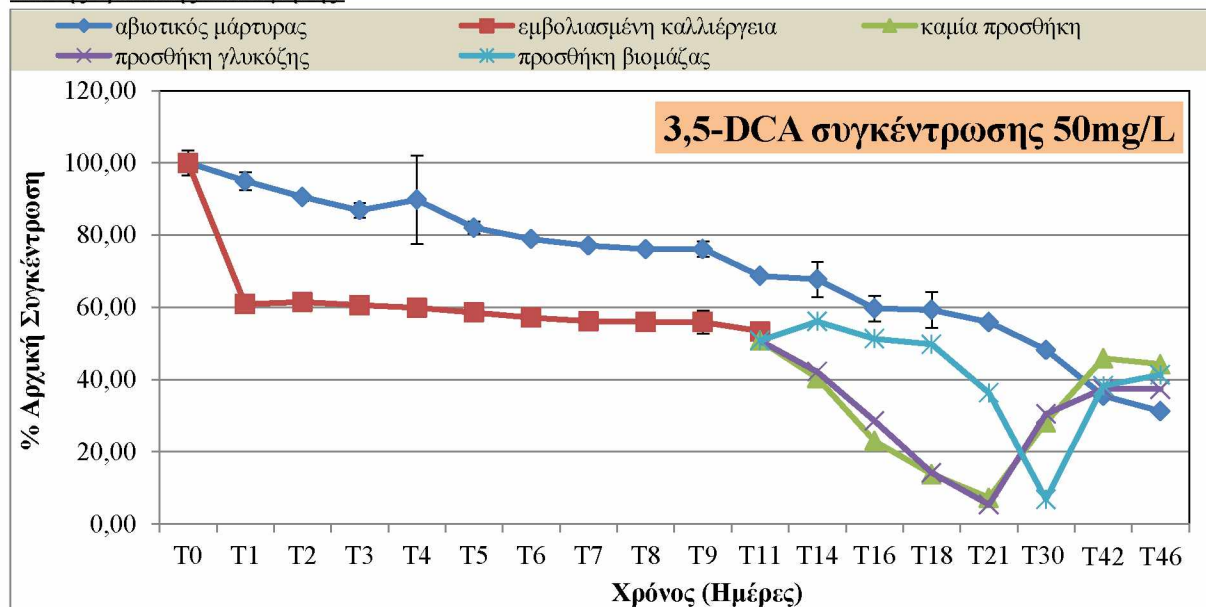
Στο **Διάγραμμα 3.2.1** παρουσιάζεται η ικανότητα του μύκητα *C. Herbarum* να αποδομεί την 3,5-DCA με τελική συγκέντρωση 20 mg/L (1^η μεταχείριση). Η αποδόμηση της περιγράφηκε από το μοντέλο κινητικής SFO για τον αβιοτικό μάρτυρα και για τη μεταχείριση χωρίς καμία προσθήκη, με την προσθήκη βιομάζας και με την προσθήκη διαλύματος γλυκόζης. Πριν οποιαδήποτε προσθήκη περιγράφηκε με το μοντέλο κινητικής Hockey-Stick (T0-T11) (**Πίνακας 3.2.1**).

Διάγραμμα 3.2.1: Πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA συγκέντρωσης 20 mg/L από τον μύκητα *C. herbarum* και της αβιοτικής αποδόμησης.



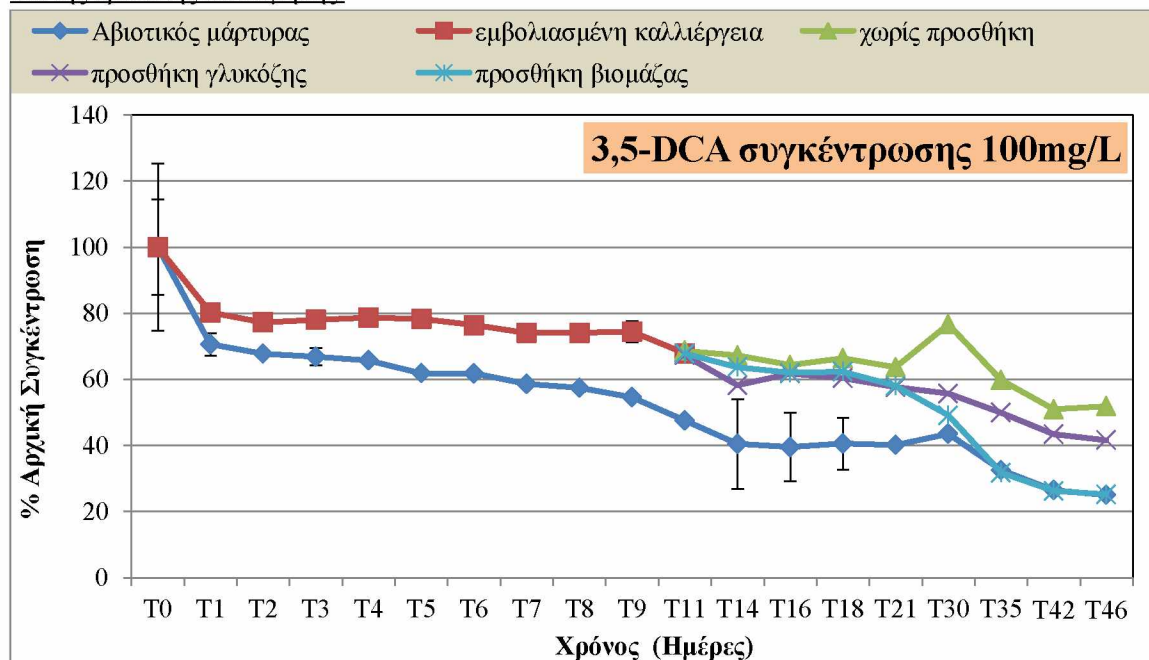
Στο **Διάγραμμα 3.2.2** παρουσιάζεται η ικανότητα αποδόμησης 3,5-DCA με τελική συγκέντρωση 50 mg/L από τον μύκητα *C. herbarum*. Η αποδόμηση της 3,5-DCA περιγράφηκε από το μοντέλο κινητικής Hockey-Stick από T0 έως T11, πριν γίνει δηλαδή καμία νέα προσθήκη. Η αβιοτική αποδόμηση της καθώς και οι μεταχειρίσεις μετά την προσθήκη φρέσκου μυκηλίου, διαλύματος γλυκόζης 10% και καμίας προσθήκης περιγράφηκαν από το μοντέλο κινητικής SFO (**Πίνακας 3.2.1**)

Διάγραμμα 3.2.2: Πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA συγκέντρωσης 50 mg/L από τον μύκητα *C. herbarum* και της αβιοτικής αποδόμησης.



Στο **Διάγραμμα 3.2.3** παρουσιάζεται η αποδομητική ικανότητα του μύκητα *C. herbarum* έναντι της 3,5-DCA με τελική συγκέντρωση 100 mg/L. Η αποδόμηση της σε όλες τις μεταχειρίσεις περιγράφηκε από το μοντέλο κινητικής SFO ακόμη και όταν στις μεταχειρίσεις προστέθηκε φρέσκο μυκήλιο, διάλυμα γυκόζης 10% ή δεν έγινε καμία προσθήκη (**Πίνακας 3.2.1**).

Διάγραμμα 3.2.3: Πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA συγκέντρωσης 100 mg/L από τον μύκητα *C. herbarum* και της αβιοτικής αποδόμησης.



Στον **Πίνακα 3.2.1** δίνονται οι τιμές τις δοκιμασίας χ^2 , των σταθερών αποδόμησης – K και ο χρόνος ημιζωής DT50 της 3,5-DCA για τις τρεις μεταχειρίσεις με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της.

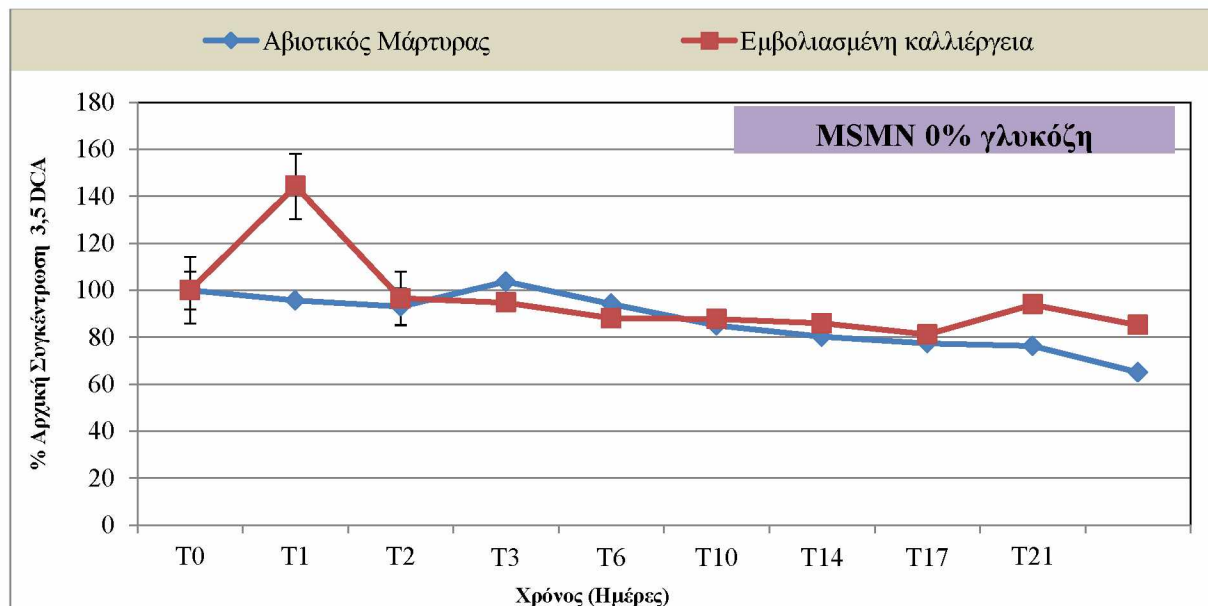
Πίνακας 3.2.1: Χρόνος ημιζωής (DT50), σταθερές αποδόμησης (K) για κάθε μεταχείριση και οι τιμές δοκιμασίας χ^2 .

Μεταχειρίσεις 20 mg/L	Αβιοτικός μάρτυρας	Πριν την προσθήκη	Με προσθήκη βιομάζας	Με προσθήκη γλυκόζης	Χωρίς προσθήκες
χ^2	6,37	4,32	22,98	14,83	2,37
DT50 (Ημέρες)	20,58	4,69	346,1	1,70E+11	20,22
K_parent_sink / k1 (Ημέρες-1)	3,37E-02	1,48E-01	2,00E-03	4,08E-12	3,43E-02
K2 (Ημέρες-1)	-	1,31E-10	-	-	-
50 mg/L	Αβιοτικός μάρτυρας	Πριν την προσθήκη	Με προσθήκη βιομάζας	Με προσθήκη γλυκόζης	Χωρίς προσθήκες
χ^2	2,75	0,75	10,89	41,47	39,89
DT50 (Ημέρες)	26,24	15,99	7,91	7,78E+10	23,43
K_parent_sink / k1 (Ημέρες-1)	2,64E-02	0,68	8,76E-02	8,911E-12	2,96E-02
K2 (Ημέρες-1)	-	1,41E-02	-	-	-
100 mg/L	Αβιοτικός μάρτυρας	Πριν την προσθήκη	Με προσθήκη βιομάζας	Με προσθήκη γλυκόζης	Χωρίς προσθήκες
χ^2	11,54	4,95	5,80	2,47	6,22
DT50 (Ημέρες)	21,33	29,75	26,2	88,87	1,74E+10
K_parent_sink / k1 (Ημέρες-1)	3,25E-02	2,33E-02	2,65E-02	7,80E-03	3,988E-11
K2 (Ημέρες-1)	-	-	-	-	-

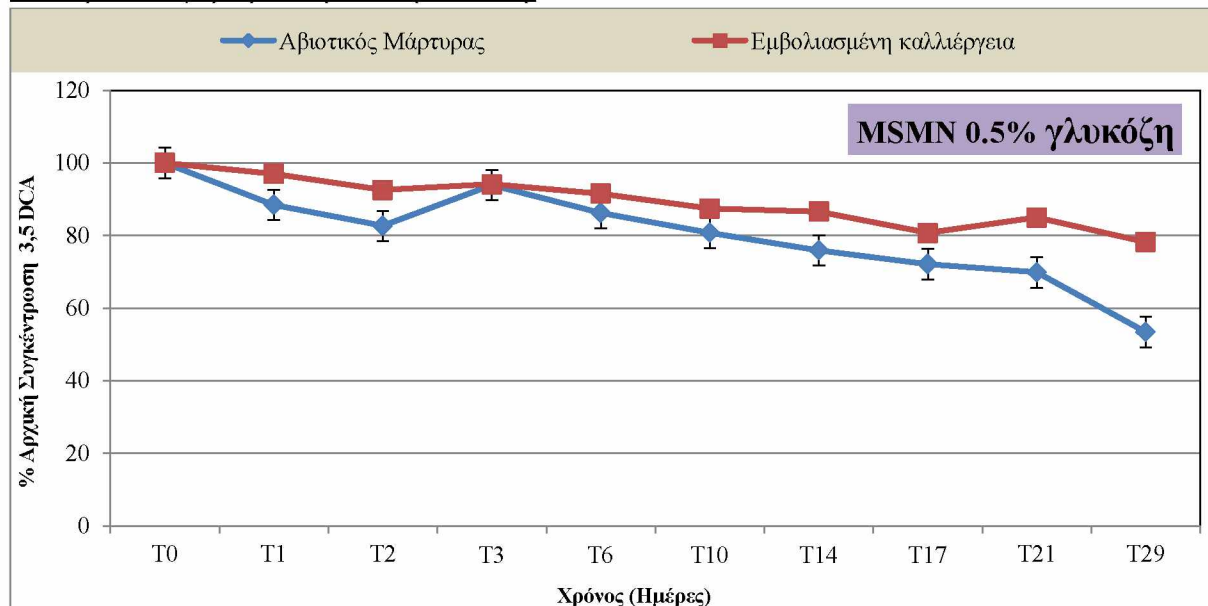
3.3 Εκτίμηση της αποδομητικής ικανότητας του μύκητα *C. herbarum* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Στα **Διαγράμματα (3.3.1-3.3.5)** παρουσιάζεται η αποδόμηση της 3,5-DCA από το μύκητα *C. herbarum* ανεπτυγμένο σε θρεπτικά μέσα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Στις πέντε μεταχειρίσεις η αποδόμηση της 3,5-DCA περιγράφηκε από το μοντέλο κινητικής SFO (**Πίνακας 3.3.1**). Ακόμα δεν παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό αποδόμησης της όπως στις προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες (βλ. 3.1 και 3.2)

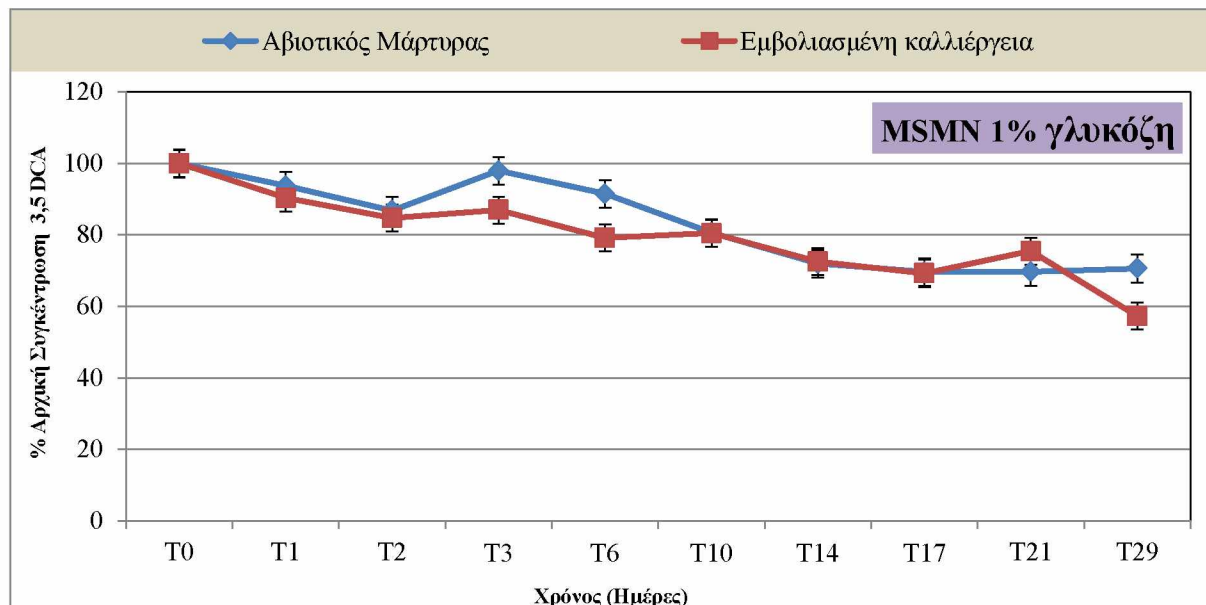
Διάγραμμα 3.3.1: Πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA παρουσία του μύκητα *C. herbarum* σε θρεπτικό μέσο MSMN τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 0%. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων καλλιέργειας και 2 αβιοτικού μάρτυρα ± την τυπική απόκλιση.



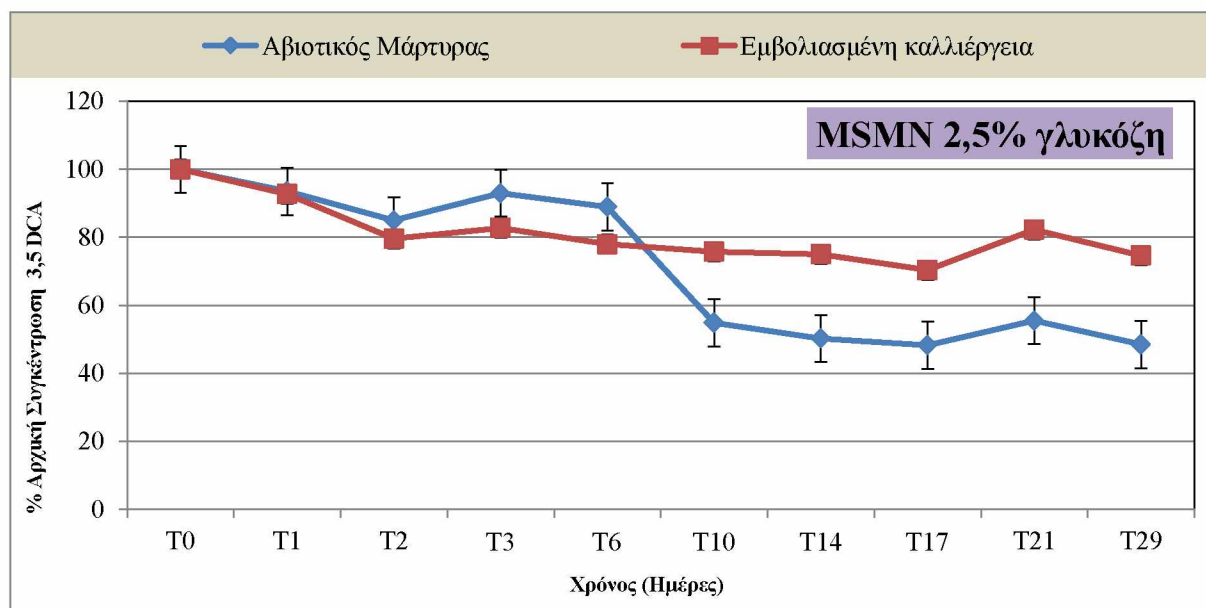
Διάγραμμα 3.3.2: Πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA παρουσία του μύκητα *C. herbarum* σε θρεπτικό μέσο MSMN τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 0.5%. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων καλλιέργειας και 2 αβιοτικού μάρτυρα ± την τυπική απόκλιση.



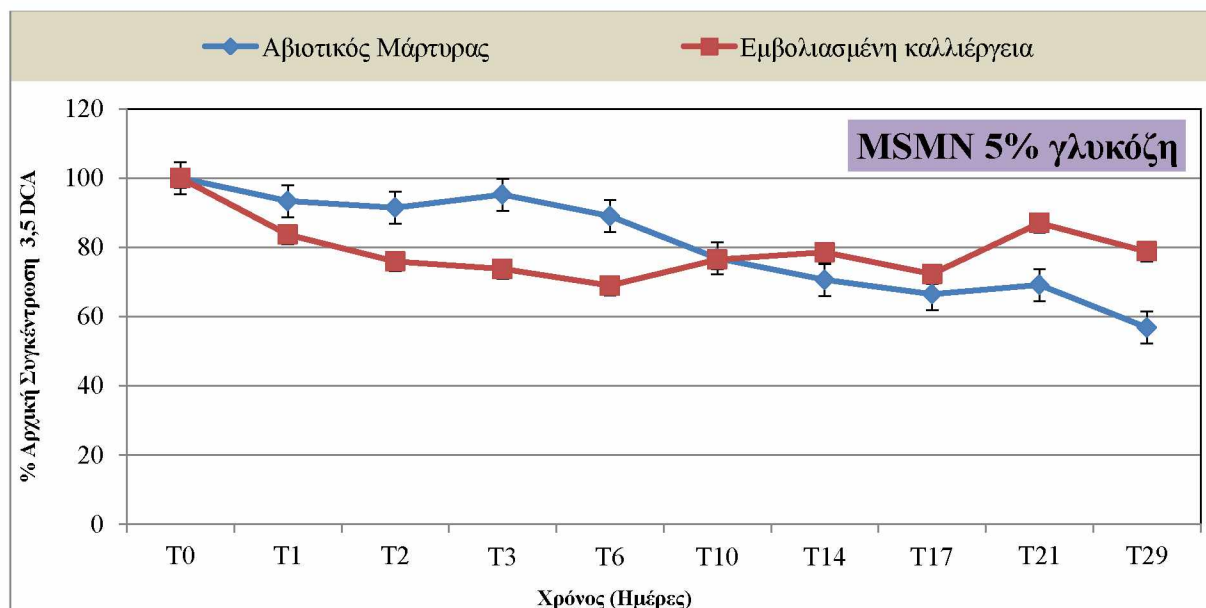
Διάγραμμα 3.3.3: Πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA παρουσία του μύκητα *C. herbarum* σε θρεπτικό μέσο MSMN τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 1%. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων καλλιέργειας και 2 αβιοτικού μάρτυρα ± την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.3.4: Πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA παρουσία του μύκητα *C. herbarum* σε θρεπτικό μέσο MSMN τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 2,5%. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων καλλιέργειας και 2 αβιοτικού μάρτυρα ± την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.3.5: Πρότυπο αποδόμησης της 3,5-DCA παρουσία του μύκητα *C. herbarum* σε θρεπτικό μέσο MSMN τελικής συγκέντρωσης γλυκόζης 5%. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων καλλιέργειας και 2 αβιοτικού μάρτυρα ± την τυπική απόκλιση.



Στον **Πίνακα 3.3.1** δίνονται οι τιμές τις δοκιμασίας χ^2 , των σταθερών αποδόμησης – K και ο χρόνος ημιζωής DT50 της 3,5-DCA (50 mg/L) για τις πέντε διαφορετικές μεταχειρίσεις με αυξανόμενη συγκέντρωση γλυκόζης των θρεπτικών μέσων MSMN

Πίνακας 3.3.1: Χρόνος ημιζωής (DT50), σταθερές αποδόμησης (K) για κάθε μεταχείριση και οι τιμές δοκιμασίας χ^2

Μεταχειρίσεις	Γλυκόζη 0%	Γλυκόζη 0,5%	Γλυκόζη 1%	Γλυκόζη 2,5%	Γλυκόζη 5%
χ^2	12,19	1,988	4,447	6,545	8,434
DT50 (Ημέρες)	63,79	88,85	46,49	91,33	384
k_parent_sink/k1 (Ημέρες-1)	0,01087	0,007801	0,01491	0,007589	0,001805

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία στοχεύει στην δημιουργία μικροβιακών κοινοτήτων, αποτελούμενων από στελέχη βακτηρίου και μύκητα [30–32]. Οι συγκεκριμένη μικροβιακή κοινότητα είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του IPR και του μεταβολίτη του. Η 3,5-DCA, ως μεταβολίτης του IPR, είναι τοξική ουσία για τους οργανισμούς που θα εκτεθούν σε αυτή [33,34]. Επίσης είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι όχι μόνο η 3,5-διγλωροανιλίνη αλλά και το ίδιο το iprodione είναι τοξικό για οργανισμούς που θα εκτεθούν σε αυτό και πιθανά καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο [23,34,35].

Παρά τα δεδομένα ερευνών για τοξικότητα των δύο ουσιών και της περιβαλλοντικής ρύπανσης που προκαλούν, λίγες έρευνες έχουν γίνει για αποκατάσταση ρυπασμένου περιβάλλοντος. Επομένως κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω έρευνα για την αποκατάσταση

του ρυπασμένου περιβάλλοντος από τις ουσίες αυτές. Ακόμη να τονίσουμε σε αυτό το σημείο ότι έχουν απομονωθεί κάποια είδη βακτηρίων με την ικανότητα να αποδομούν πλήρως ή μερικώς το μυκητοκτόνο IPR, αλλά δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η αποδόμηση του εν λόγω γεωργικού φαρμάκου και των μεταβολιτών του από μύκητες. Συγκεκριμένα για την αποικοδόμηση του IPR έχουν απομονωθεί το *Arthrobacter sp.* στέλεχος MA6 [36], συνδυασμός των *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas sp.* και *Pseudomonas paucimobilis* [37], *Arthrobacter sp.* στέλεχος C1 [21], *Microbacterium sp.* στέλεχος CQH-1 [38], *Paenarthrobacter sp.* στέλεχος TA1.8 [25]. Για την αποικοδόμηση της 3,5-διχλωροανιλίνης έχουν ταυτοποιηθεί το *Pseudomonas putida* στέλεχος T57, το *Bacillus megaterium* στέλεχος IMT21 [39] και το *Rhodococcus sp.* στέλεχος T1-1 [40]. Στην περίπτωση του τελευταίου η 3,5-DCA προκύπτει από τον μεταβολισμό του Vinclozolin και όχι του IPR.

Σε δημοσιεύσεις τονίζεται ότι η χρήση μυκήτων για την βιολογική αποικοδόμηση δεν έχει μελετηθεί ακόμα όσο θα έπρεπε, ενώ είναι οργανισμοί με υψηλές ικανότητες μεταβολισμού αρωματικών αμινών. Επίσης θα πρέπει να μελετηθεί και η ικανότητα τους για αποικοδόμηση ουσιών σε πραγματικές περιβαλλοντικές συνθήκες [41].

Συμπερασματικά, λοιπόν, για τη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία παρατηρήσαμε ότι ο μύκητας είναι ικανός για αποικοδόμηση της 3,5-DCA μόνο παρουσία του βακτηρίου που μπορεί να αποδομεί το IPR. Από τα αποτελέσματα μπορούμε να δούμε ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά αποικοδόμησης της 3,5-διχλωροανιλίνης, βρίσκονται στις καλλιέργειες όπου έχουν συνδυαστεί ο *C. herbarum* με το *Paenarthrobacter* στέλεχος TA1.8. Σε καλλιέργεια του μύκητα μόνο παρατηρήσαμε ότι ο *C. herbarum* δεν κατάφερε να αποδομήσει ταχέως της 3,5-DCA. Μελλοντικές δοκιμές θα εστιάσουν στην αποσαφήνιση των παραγόντων που επηρεάζουν την αποδόμηση της 3,5-DCA από τον μύκητα *C. herbarum* και την εύρεση των ιδανικών συνθηκών για την επιτυχή πλήρη αποδόμηση του IPR και των μεταβολιτών του από την συνθετική μικροβιακή κοινότητα.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Flint ML, van den Bosch R. A History of Pest Control. In: Flint ML, van den Bosch R (eds.). *Introduction to Integrated Pest Management*. Boston, MA: Springer US, 1981, 51–81.
2. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides (Text with EEA relevance). <https://web.archive.nationalarchives.gov.uk/eu-exit/https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02009L0128-20190726>.
3. Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C *et al.* Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Front Public Health* 2016;**4**:148.
4. Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K *et al.* Effects of Pesticides on Environment. In: Hakeem KR, Akhtar MS, Abdullah SNA (eds.). *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science*. Cham: Springer International Publishing, 2016, 253–69.
5. REPORT FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL.

6. Carvalho FP. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 2017;**6**:48–60.
7. Pietrzak D, Kania J, Malina G *et al.* Pesticides from the EU First and Second Watch Lists in the Water Environment. *CLEAN – Soil, Air, Water* 2019;**47**:1800376.
8. Geiger F, Bengtsson J, Berendse F *et al.* Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology* 2010;**11**:97–105.
9. Aktar MdW, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol* 2009;**2**:1–12.
10. Marican A, Durán-Lara EF. A review on pesticide removal through different processes. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018;**25**:2051–64.
11. Quiroz MA, Bandala ER, Martínez-Huitle CA. *Advanced Oxidation Processes (AOPs) for Removal of Pesticides from Aqueous Media*. IntechOpen, 2011.
12. Andrunik M, Bajda T. Removal of Pesticides from Waters by Adsorption: Comparison between Synthetic Zeolites and Mesoporous Silica Materials. A Review. *Materials (Basel)* 2021;**14**:3532.
13. Aislabie J, Lloyd-Jones G. A review of bacterial degradation of pesticides. *Australian Journal of Soil Research* 1995;**33**:925–42.
14. Bose S, Kumar PS, Vo D-VN *et al.* Microbial degradation of recalcitrant pesticides: a review. *Environmental Chemistry Letters* 2021;**19**:3209–28.
15. Huang Y, Xiao L, Li F *et al.* Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules* 2018;**23**:2313.
16. Maqbool Z, Hussain S, Imran M *et al.* Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016;**23**:16904–25.
17. Tudi M, Daniel Ruan H, Wang L *et al.* Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *Int J Environ Res Public Health* 2021;**18**:1112.
18. Oiki S, Yaguchi T, Urayama S-I *et al.* Wide distribution of resistance to the fungicides fludioxonil and iprodione in *Penicillium* species. *PLoS one* 2022;**17**:e0262521.
19. PubChem. Iprodione.
20. Blystone CR, Lambricht CS, Furr J *et al.* Iprodione delays male rat pubertal development, reduces serum testosterone levels, and decreases ex vivo testicular testosterone production. *Toxicol Lett* 2007;**174**:74–81.
21. Campos M, Perruchon C, Vasiliadis S *et al.* Isolation and characterization of bacteria from acidic pristine soil environment able to transform iprodione and 3,5-dichloroaniline. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2015;**104**:201–11.
22. Lo H-H, Brown PI, Rankin GO. Acute nephrotoxicity induced by isomeric dichloroanilines in Fischer 344 rats. *Toxicology* 1990;**63**:215–31.

23. Vasileiadis S, Puglisi E, Papadopoulou ES *et al.* Blame it on the metabolite: 3,5-dichloroaniline rather than the parent compound is responsible for the decreasing diversity and function of soil microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 2018;**84**, DOI: 10.1128/AEM.01536-18.
24. Valentovic MA, Ball JG, Anestis DK *et al.* Comparison of the in vitro toxicity of dichloroaniline structural isomers. *Toxicol In Vitro* 1995;**9**:75–81.
25. Katsoula A, Vasileiadis S, Sapountzi M *et al.* The response of soil and phyllosphere microbial communities to repeated application of the fungicide iprodione: Accelerated biodegradation or toxicity? *FEMS Microbiology Ecology* 2020;**96**, DOI: 10.1093/femsec/fiaa056.
26. Mongodin EF, Shapir N, Daugherty SC *et al.* Secrets of Soil Survival Revealed by the Genome Sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLOS Genetics* 2006;**2**:e214.
27. Yang Z, Jiang W, Wang X *et al.* An Amidase Gene, *ipaH*, Is Responsible for the Initial Step in the Iprodione Degradation Pathway of *Paenarthrobacter* sp. Strain YJN-5. *Appl Environ Microbiol* 2018;**84**:e01150-18.
28. Papazlatani CV, Kolovou M, Gkounou EE *et al.* Isolation, characterization and industrial application of a *Cladosporium herbarum* fungal strain able to degrade the fungicide imazalil. *Environmental Pollution* 2022;**301**:119030.
29. FOCUS 2006. "Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration." EC Document Reference Sanco/10058/2005 version 2.0.
30. de Lima DP, dos Santos E dos A, Marques MR *et al.* Fungal bioremediation of pollutant aromatic amines. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2018;**11**:34–44.
31. Tas DO, Pavlostathis SG. Occurrence, Toxicity, and Biotransformation of Pentachloronitrobenzene and Chloroanilines. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2014;**44**:473–518.
32. Wołejko E, Jabłońska-Trypuć A, Wydro U *et al.* Soil biological activity as an indicator of soil pollution with pesticides – A review. *Applied Soil Ecology* 2020;**147**:103356.
33. Racine CR, Ferguson T, Preston D *et al.* The role of biotransformation and oxidative stress in 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA) induced nephrotoxicity in isolated renal cortical cells from male Fischer 344 rats. *Toxicology* 2016;**341–343**:47–55.
34. Lai Q, Sun X, Li L *et al.* Toxicity effects of procymidone, iprodione and their metabolite of 3,5-dichloroaniline to zebrafish. *Chemosphere* 2021;**272**:129577.
35. Bernardes PM, Andrade-Vieira LF, Aragão FB *et al.* Toxicological effects of commercial formulations of fungicides based on procymidone and iprodione in seedlings and root tip cells of *Allium cepa*. *Environ Sci Pollut Res* 2019;**26**:21013–21.
36. Athiel P, Alfizar, Mercadier C *et al.* Degradation of iprodione by a soil *Arthrobacter*-like strain. *Appl Environ Microbiol* 1995;**61**:3216–20.
37. Mercadier C, Vega D, Bastide J. Iprodione degradation by isolated soil microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* 1997;**23**:207–15.

38. Cao L, Shi W, Shu R *et al.* Isolation and characterization of a bacterium able to degrade high concentrations of iprodione. *Can J Microbiol* 2018;**64**:49–56.

39. Yao X-F, Khan F, Pandey R *et al.* Degradation of dichloroaniline isomers by a newly isolated strain, *Bacillus megaterium* IMT21. *Microbiology* **157**:721–6.

40. Lee J-B, Sohn H-Y, Shin K-S *et al.* Microbial biodegradation and toxicity of vinclozolin and its toxic metabolite 3,5-dichloroaniline. *J Microbiol Biotechnol* 2008;**18**:343–9.

41. Silar P, Dairou J, Cocaign A *et al.* Fungi as a promising tool for bioremediation of soils contaminated with aromatic amines, a major class of pollutants. *Nat Rev Microbiol* 2011;**9**:477–477.

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

6.1 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Πίνακας 6.1 : Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων συγκέντρωσης 1^{ης} πειραματικής επώασης (Μελέτη της αποτελεσματικότητας της συνθετικής μικροβιακής κοινότητας έναντι των IPR και 3,5-DCA).

Date	Time	Treatment	IPR HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV	3.5D CA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV
17.08.21	T0	Cntrl A	6,247	56,223	57,969	2,469				0	0	0	0,000
		Cntrl B	6,635	59,715						0	0		
		MA	4,932	44,388	46,461	4,941				0,027	0,243	0,081	0,140
		MB	4,766	42,894						0	0		
		MC	5,789	52,101						0	0		
		TA1.8 A	7,888	70,992	56,64	22,396				0,17	1,53	1,377	0,180
		TA1.8 B	3,426	30,834						0,158	1,422		
		TA1.8 C	7,566	68,094						0,131	1,179		
		M+ TA1.8 A	5,406	48,654	49,74	2,225				0,124	1,116	1,113	0,014
		M+ TA1.8 B	5,363	48,267						0,125	1,125		
		M+ TA1.8 C	5,811	52,299						0,122	1,098		
17.08.21	T8h	Cntrl A	2,568	23,112	21,771	1,896	39,87	37,56	3,2715	0	0	0	0,000
		Cntrl B	2,27	20,43			35,24			0	0		
		MA	2,093	18,837	19,8	6,467	32,49	34,16	11,155	0	0	0	0,000
		MB	2,966	26,694			46,05			0	0		
		MC	1,541	13,869			23,92			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0,081	0,140	0,00	0,14	0,242	0,191	1,719	2,169	0,392
		TA1.8 B	0,027	0,243			0,42			0,271	2,439		
		TA1.8 C	0	0			0,00			0,261	2,349		
		M+	0,048	0,432	0,25	0,22	0,75	0,445	0,39	0,35	3,177	2,775	0,41

Date	Time	Treatment	IPR HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV	3.5D CA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV
		TA1.8 A			8	8		1	32	3			9
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			0,26	2,34		
		M+ TA1.8 C	0,038	0,342			0,59			0,312	2,808		
18.08.21	T1	Cntrl A	1,864	16,776	16,9875	0,299	28,94	29,304	0,516	0	0	0	0,000
		Cntrl B	1,911	17,199			29,67			0	0		
		MA	2,44	21,96	19,899	3,106	37,88	34,327	5,3588	0	0	0	0,000
		MB	1,814	16,326			28,16			0	0		
		MC	2,379	21,411			36,94			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,000	0,00	0	0	2,374	21,366	21,231	1,064
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,469	22,221		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,234	20,106		
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,000	0,00	0	0	2,472	22,248	22,89	1,636
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			2,75	24,75		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			2,408	21,672		
19.08.21	T2	Cntrl A	2,437	21,933	18,1755	5,314	37,84	31,354	9,1668	0	0	0	0,000
		Cntrl B	1,602	14,418			24,87			0	0		
		MA	1,638	14,742	13,53	2,273	25,43	23,34	3,9208	0	0	0	0,000
		MB	1,212	10,908			18,82			0	0		
		MC	1,66	14,94			25,77			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,000	0,00	0	0	2,236	20,124	20,679	0,518
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,35	21,15		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,307	20,763		
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,000	0,00	0	0	2,693	24,237	21,876	2,055
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			2,322	20,898		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			2,277	20,493		
20.08.21	T3	Cntrl A	3,084	27,756	29,2995	2,183	47,88	50,543	3,7655	0	0	0	0,000
		Cntrl B	3,427	30,843			53,21			0	0		
		MA	2,005	18,045	16,545	1,440	31,13	28,541	2,4838	0	0	0	0,000
		MB	1,824	16,416			28,32			0	0		
		MC	1,686	15,174			26,18			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,000	0,00	0	0	2,331	20,979	21,471	0,633
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,465	22,185		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,361	21,249		

Date	Time	Treatment	IPR HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV	3.5D CA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	2,406	21,654	21,549	0,855
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			2,483	22,347		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			2,294	20,646		
21.08.21	T4	Cntrl A	2,601	23,409	20,5425	4,054	40,38	35,437	6,9931	0	0	0	0,000
		Cntrl B	1,964	17,676			30,49			0	0		
		MA	2,866	25,794	18,516	6,372	44,50	31,941	10,992	0	0	0	0,000
		MB	1,549	13,941			24,05			0	0		
		MC	1,757	15,813			27,28			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	2,298	20,682	21,759	1,143
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,551	22,959		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,404	21,636		
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	2,275	20,475	20,979	0,744
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			2,426	21,834		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			2,292	20,628		
23.08.21	T6	Cntrl A	2,577	23,193	18,8505	6,141	40,01	32,518	10,594	0	0	0	0,000
		Cntrl B	1,612	14,508			25,03			0	0		
		MA	2,156	19,404	13,563	5,313	33,47	23,397	9,1651	0	0	0	0,000
		MB	1,002	9,018			15,56			0	0		
		MC	1,363	12,267			21,16			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	2,245	20,205	20,499	0,384
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,262	20,358		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,326	20,934		
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	2,284	20,556	20,253	0,540
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			2,181	19,629		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			2,286	20,574		
25.08.21	T8	Cntrl A	1,354	12,186	11,1285	1,496	21,02	19,197	2,5799	0	0	0	0,000
		Cntrl B	1,119	10,071			17,37			0	0		
		MA	0,772	6,948	8,346	2,755	11,99	14,397	4,753	0	0	0	0,000
		MB	0,73	6,57			11,33			0	0		
		MC	1,28	11,52			19,87			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	2,017	18,153	19,239	1,967
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,39	21,51		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,006	18,054		

Date	Time	Treatment	IPR HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV	3.5D CA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	1,929	17,361	17,262	0,516
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			1,969	17,721		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			1,856	16,704		
27.08.21	T10	Cntrl A	1,254	11,286	10,161	1,591	19,47	17,528	2,7446	0	0	0	0,000
		Cntrl B	1,004	9,036			15,59			0	0		
		MA	0,754	6,786	7,125	0,675	11,71	12,291	1,1639	0	0	0	0,000
		MB	0,743	6,687			11,54			0	0		
		MC	0,878	7,902			13,63			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	2,567	23,103	21,969	1,207
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,456	22,104		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,3	20,7		
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	2,394	21,546	20,82	0,841
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			2,211	19,899		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			2,335	21,015		
29.08.21	T12	Cntrl A	1,013	9,117	9,2835	0,235	15,73	16,015	0,4062	0	0	0	0,000
		Cntrl B	1,05	9,45			16,30			0	0		
		MA	0,836	7,524	10,41	5,393	12,98	17,958	9,3034	0	0	0	0,000
		MB	0,786	7,074			12,20			0	0		
		MC	1,848	16,632			28,69			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	2,214	19,926	20,652	0,853
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,399	21,591		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,271	20,439		
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	2,085	18,765	18,51	0,853
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			1,951	17,559		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			2,134	19,206		
31.08.21	T14	Cntrl A	0,992	8,928	8,703	0,318	15,40	15,013	0,5489	0	0	0	0,000
		Cntrl B	0,942	8,478			14,63			0	0		
		MA	0,847	7,623	6,954	0,649	13,15	11,996	1,1196	0	0	0	0,000
		MB	0,768	6,912			11,92			0	0		
		MC	0,703	6,327			10,91			0	0		
		TA1.8 A	0,048	0,432	0,357	0,066	0,75	0,6158	0,1144	2,251	20,259	19,866	1,214
		TA1.8 B	0,037	0,333			0,57			2,056	18,504		
		TA1.8 C	0,034	0,306			0,53			2,315	20,835		

Date	Time	Treatment	IPR HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV	3.5D CA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV
		M+ TA1.8 A	0,037	0,333	0,321	0,082	0,57	0,5537	0,1409	2,611	23,499	19,875	3,654
		M+ TA1.8 B	0,044	0,396			0,68			1,799	16,191		
		M+ TA1.8 C	0,026	0,234			0,40			2,215	19,935		
02.09.21	T16	Cntrl A	0,777	6,993	8,0415	1,483	12,06	13,872	2,5579	0	0	0	0,000
		Cntrl B	1,01	9,09			15,68			0	0		
		MA	0,864	7,776	13,842	12,727	13,41	23,878	21,955	0	0	0	0,000
		MB	0,587	5,283			9,11			0	0		
		MC	3,163	28,467			49,11			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,000	0,00	0	0	2,277	20,493	19,281	1,172
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,133	19,197		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,017	18,153		
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,000	0,00	0	0	1,598	14,382	14,388	1,224
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			1,463	13,167		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			1,735	15,615		
04.09.21	T18	Cntrl A	0,804	7,236	9,3555	2,997	12,48	16,139	5,1707	0	0	0	0,000
		Cntrl B	1,275	11,475			19,80			0	0		
		MA	0,934	8,406	8,205	0,965	14,50	14,154	1,6652	0	0	0	0,000
		MB	0,795	7,155			12,34			0	0		
		MC	1,006	9,054			15,62			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,000	0,00	0	0	2,127	19,143	19,749	0,622
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,265	20,385		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,191	19,719		
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,000	0,00	0	0	1,262	11,358	10,722	0,823
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			1,088	9,792		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			1,224	11,016		
06.09.21	T20	Cntrl A	0,691	6,219	7,5915	1,941	10,73	13,096	3,3484	0	0	0	0,000
		Cntrl B	0,996	8,964			15,46			0	0		
		MA	0,964	8,676	7,932	1,997	14,97	13,683	3,4446	0	0	0	0,000
		MB	0,63	5,67			9,78			0	0		
		MC	1,05	9,45			16,30			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,000	0,00	0	0	2,108	18,972	19,545	0,711
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,26	20,34		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,147	19,323		

Date	Time	Treatment	IPR HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV	3.5D CA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	0,201	1,809	1,4085	4,179
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			0,112	1,008		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			0,957	8,613		
08.09.21	T2	Cntrl A	0,652	5,868	6,876	1,426	10,12	11,862	2,4591	0	0	0	0,00
		Cntrl B	0,876	7,884			13,60			0	0		
		MA	0,868	7,812	6,402	1,257	13,48	11,044	2,1679	0	0	0	0,00
		MB	0,6	5,4			9,32			0	0		
		MC	0,666	5,994			10,34			0	0		
		TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	2,09	18,81	19,6956	0,798
		TA1.8 B	0	0			0,00			2,262	20,358		
		TA1.8 C	0	0			0,00			2,2132	19,9188		
		M+ TA1.8 A	0	0	0	0,00	0,00	0	0	0,012	0,108	0,099	3,523
		M+ TA1.8 B	0	0			0,00			0,01	0,09		
		M+ TA1.8 C	0	0			0,00			0,689	6,201		

6.2 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 : Συγκεντρωτικοί Πίνακες 2ης πειραματικής επώασης - Εκτίμηση της αποδομητικής ικανότητας του μύκητα *C herbarum* έναντι διαφορετικών συγκεντρώσεων 3.5-DCA.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.2.1 : Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων συγκέντρωσης 2^{ης} πειραματικής επώασης, 1^η μεταχείριση.

Date	Time	Tested Concentration	Treatment	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV
04.10.21	T0	20	Cntrl A	6,412	19,236	20,6535	2,005	93,14	100,00	9,71
	αβιοτικός μάρτυρας	mg /L	Cntrl B	7,357	22,071			106,86		
	εμβολιασμένη καλλιέργεια		Sample A	8,523	25,569	21,498	3,641	118,94	100,00	16,94
			Sample B	6,791	20,373			94,77		
			Sample C	6,184	18,552			86,30		
05.10.21	T1	20	Cntrl A	2,567	23,103	18,5625	6,421	111,86	89,88	31,09
		mg /L	Cntrl B	1,558	14,022			67,89		
			Sample A	2,233	20,097	18,36	1,769	93,48	85,40	8,23
			Sample B	1,84	16,56			77,03		
			Sample C	2,047	18,423			85,70		
06.10.21	T2	20	Cntrl A	4,147	12,441	15,402	4,187	60,24	74,57	20,27
		mg /L	Cntrl B	6,121	18,363			88,91		
			Sample A	5,948	17,844	17,765	0,635	83,00	82,64	2,95
			Sample B	5,698	17,094			79,51		
			Sample C	6,119	18,357			85,39		
07.10.21	T3	20	Cntrl A	6,666	19,998	18,792	1,706	96,83	90,99	8,26
		mg /L	Cntrl B	5,862	17,586			85,15		
			Sample A	4,813	14,439	14,533	1,038	67,16	67,60	4,83
			Sample B	4,515	13,545			63,01		
			Sample C	5,205	15,615			72,63		
08.10.21	T4	20	Cntrl A	6,502	19,506	18,3195	1,678	94,44	88,70	8,12
		mg /L	Cntrl B	5,711	17,133			82,95		
			Sample A	3,339	10,017	12,423	2,103	46,60	57,79	9,78
			Sample B	4,638	13,914			64,72		
			Sample C	4,446	13,338			62,04		
09.10.21	T5	20	Cntrl A	6,211	18,633	17,367	1,790	90,22	84,09	8,67
		mg /L	Cntrl B	5,367	16,101			77,96		
			Sample A	2,252	6,756	9,555	2,515	31,43	44,45	11,70
			Sample B	3,875	11,625			54,07		
			Sample C	3,428	10,284			47,84		
10.10.21	T6	20	Cntrl A	6,029	18,087	17,0265	1,500	87,57	82,44	7,26
		mg /L	Cntrl B	5,322	15,966			77,30		
			Sample A	2,06	6,18	8,64	2,178	28,75	40,19	10,13
			Sample B	3,441	10,323			48,02		
			Sample C	3,139	9,417			43,80		
11.10.21	T7	20	Cntrl A	5,859	17,577	16,299	1,807	85,10	78,92	8,75
		mg /L	Cntrl B	5,007	15,021			72,73		

Date	Time	Tested Concentration	Treatment	3,5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV
			Sample A	2,346	7,038	8,556	1,367	32,74	39,80	6,36
			Sample B	3,23	9,69			45,07		
			Sample C	2,98	8,94			41,59		
12.10.21	T8	20	Cntrl A	5,258	15,774	14,79	1,392	76,37	71,61	6,74
		mg /L	Cntrl B	4,602	13,806			66,85		
			Sample A	2,643	7,929	8,566	0,554	36,88	39,85	2,58
			Sample B	2,944	8,832			41,08		
			Sample C	2,979	8,937			41,57		
13.10.21	T9	20	Cntrl A	5,522	16,566	15,591	1,379	80,21	75,49	6,68
		mg /L	Cntrl B	4,872	14,616			70,77		
			Sample A	2,871	8,613	9,166	0,484	40,06	42,64	2,25
			Sample B	3,124	9,372			43,59		
			Sample C	3,171	9,513			44,25		
15.10.21	T11	20	Cntrl A	4,747	14,241	12,204	2,881	68,95	59,09	13,95
		mg /L	Cntrl B	3,389	10,167			49,23		
			Sample A	2,884	8,652	8,887	0,476	40,25	41,34	2,22
			Sample B	2,858	8,574			39,88		
			Sample C	3,145	9,435			43,89		
18.10.21	T14	20	Cntrl A	4,698	14,094	13,293	1,133	68,24	64,36	5,48
		mg /L	Cntrl B	4,164	12,492			60,48		
			Sample A	3,17	9,51			44,24		
			Sample B	2,272	6,816			31,71		
			Sample C	2,425	7,275			33,84		
20.10.21	T16	20	Cntrl A	4,382	13,146	12,291	1,209	63,65	59,51	5,85
		mg /L	Cntrl B	3,812	11,436			55,37		
			Sample A	3,144	9,432			43,87		
			Sample B	2,182	6,546			30,45		
			Sample C	1,602	4,806			22,36		
25.10.21	T21	20	Cntrl A	3,793	11,379	8,6475	3,863	55,09	41,87	18,70
		mg /L	Cntrl B	1,972	5,916			28,64		
			Sample A	2,068	6,204			28,86		
			Sample B	1,822	5,466			25,43		
			Sample C	2,069	6,207			28,87		
03.11.21	T30	20	Cntrl A	1,987	5,961	6,6885	1,029	28,86	32,38	4,98
		mg /L	Cntrl B	2,472	7,416			35,91		
			Sample A	2,563	7,689			35,77		
			Sample B	1,243	3,729			17,35		
			Sample C	2,324	6,972			32,43		
08.11.21	T35	20	Cntrl A	2,154	6,462	6,3465	0,163	31,29	30,73	0,79
		mg /L	Cntrl B	2,077	6,231			30,17		
			Sample A	2,582	7,746			36,03		
			Sample B	1,182	3,546			16,49		
			Sample C	2,186	6,558			30,51		

Date	Time	Tested Concentration	Treatment	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV
15.11.21	T42	20	Cntrl A	1,807	5,421	4,4655	1,351	26,25	21,62	6,54
		mg /L	Cntrl B	1,17	3,51			16,99		
			Sample A	1,538	4,614			21,46		
			Sample B	0,806	2,418			11,25		
			Sample C	1,379	4,137			19,24		
19.11.21	T46	20	Cntrl A	2,273	6,819	6,8505	0,045	33,02	33,17	0,22
		mg /L	Cntrl B	2,294	6,882			33,32		
			Sample A	2,786	8,358			38,88		
			Sample B	1,469	4,407			20,50		
			Sample C	2,354	7,062			32,85		

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.2.2 : Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων συγκέντρωσης 2^{ης} πειραματικής επώασης, 2^η μεταχείριση.

Date	Time	Tested Concentration	Treatment	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV
04.10.21	T0	50	Cntrl A	5,817	52,353	52,6725	0,452	99,39	100,00	0,86
	αβιοτικός μάρτυρας	mg /L	Cntrl B	5,888	52,992			100,61		
	εμβολιασμένη καλλιέργεια		Sample A	7,995	71,955	73,7775	49,571	97,53	100,00	3,49
			Sample B	17,731	159,579			216,30		
			Sample C	8,4	75,6			102,47		
05.10.21	T1	50	Cntrl A	5,661	50,949	49,9995	1,343	96,73	94,93	2,55
		mg /L	Cntrl B	5,45	49,05			93,12		
			Sample A	4,988	44,892	44,6355	0,486	60,85	60,82	0,66
			Sample B	5,039	45,351			61,47		
			Sample C	4,931	44,379			60,15		
06.10.21	T2	50	Cntrl A	5,341	48,069	47,655	0,585	91,26	90,47	1,11
		mg /L	Cntrl B	5,249	47,241			89,69		
			Sample A	5,11	45,99	45,3285	0,662	62,34	61,42	0,90
			Sample B	5,031	45,279			61,37		
			Sample C	4,963	44,667			60,54		
07.10.21	T3	50	Cntrl A	5,165	46,485	45,72	1,082	88,25	86,80	2,05
		mg /L	Cntrl B	4,995	44,955			85,35		
			Sample A	4,962	44,658	45,0045	0,657	60,53	60,56	0,89
			Sample B	4,893	44,037			59,69		
			Sample C	5,039	45,351			61,47		
08.10.21	T4	50	Cntrl A	5,761	51,849	47,2725	6,472	98,44	89,75	12,29
		mg /L	Cntrl B	4,744	42,696			81,06		
			Sample A	4,883	43,947	44,424	0,705	59,57	59,81	0,96
			Sample B	4,836	43,524			58,99		
			Sample C	4,989	44,901			60,86		
09.10.21	T5	50	Cntrl A	4,868	43,812	43,1865	0,885	83,18	81,99	1,68

Date	Time	Tested Concentration	Treatment	3,5DC A HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV
		mg/L	Cntrl B	4,729	42,561			80,80		
			Sample A	4,799	43,191	43,7175	1,049	58,54	58,55	1,42
			Sample B	4,683	42,147			57,13		
			Sample C	4,916	44,244			59,97		
10.10.21	T6	50	Cntrl A	4,66	41,94	41,5215	0,592	79,62	78,83	1,12
		mg/L	Cntrl B	4,567	41,103			78,04		
			Sample A	4,647	41,823	42,4035	0,734	56,69	57,12	1,00
			Sample B	4,625	41,625			56,42		
			Sample C	4,776	42,984			58,26		
11.10.21	T7	50	Cntrl A	4,547	40,923	40,59	0,471	77,69	77,06	0,89
		mg/L	Cntrl B	4,473	40,257			76,43		
			Sample A	4,6	41,4	41,751	0,729	56,11	56,09	0,99
			Sample B	4,516	40,644			55,09		
			Sample C	4,678	42,102			57,07		
12.10.21	T8	50	Cntrl A	4,459	40,131	40,059	0,102	76,19	76,05	0,19
		mg/L	Cntrl B	4,443	39,987			75,92		
			Sample A	4,548	40,932	41,481	0,667	55,48	55,93	0,90
			Sample B	4,536	40,824			55,33		
			Sample C	4,67	42,03			56,97		
13.10.21	T9	50	Cntrl A	4,368	39,312	40,0905	1,101	74,63	76,11	2,09
		mg/L	Cntrl B	4,541	40,869			77,59		
			Sample A	4,409	39,681	41,8275	2,388	53,78	55,87	3,24
			Sample B	4,446	40,014			54,24		
			Sample C	4,886	43,974			59,60		
15.10.21	T11	50	Cntrl A	4,056	36,504	36,1575	0,490	69,30	68,65	0,93
		mg/L	Cntrl B	3,979	35,811			67,99		
			Sample A	4,16	37,44	39,213	1,793	50,75	53,36	2,43
			Sample B	4,408	39,672			53,77		
			Sample C	4,554	40,986			55,55		
18.10.21	T14	50	Cntrl A	4,16	37,44	35,6535	2,526	71,08	67,69	4,80
		mg/L	Cntrl B	3,763	33,867			64,30		
			Sample A	3,312	29,808			40,40		
			Sample B	3,452	31,068			42,11		
			Sample C	4,595	41,355			56,05		
20.10.21	T16	50	Cntrl A	3,636	32,724	31,4145	1,852	62,13	59,64	3,52
		mg/L	Cntrl B	3,345	30,105			57,16		
			Sample A	1,883	16,947			22,97		
			Sample B	2,338	21,042			28,52		
			Sample C	4,201	37,809			51,25		
22.10.21	T18	50	Cntrl A	3,671	33,039	31,194	2,609	62,73	59,22	4,95
		mg/L	Cntrl B	3,261	29,349			55,72		
			Sample A	1,132	10,188			13,81		
			Sample B	1,16	10,44			14,15		

Date	Time	Tested Concentration	Treatment	3.5DC A HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV
			Sample C	4,076	36,684			49,72		
25.10.21	T21	50	Cntrl A	3,329	29,961	29,4165	0,770	56,88	55,85	1,46
		mg /L	Cntrl B	3,208	28,872			54,81		
			Sample A	0,594	5,346			7,25		
			Sample B	0,436	3,924			5,32		
			Sample C	2,973	26,757			36,27		
03.11.21	T30	50	Cntrl A	3,022	27,198	25,389	2,558	51,64	48,20	4,86
		mg /L	Cntrl B	2,62	23,58			44,77		
			Sample A	2,301	20,709			28,07		
			Sample B	2,494	22,446			30,42		
			Sample C	0,555	4,995			6,77		
15.11.21	T42	50	Cntrl A	2,114	19,026	18,675	0,496	36,12	35,45	0,94
		mg /L	Cntrl B	2,036	18,324			34,79		
			Sample A	3,759	33,831			45,86		
			Sample B	3,066	27,594			37,40		
			Sample C	3,133	28,197			38,22		
19.11.21	T46	50	Cntrl A	2,057	18,513	16,434	2,940	35,15	31,20	5,58
		mg /L	Cntrl B	1,595	14,355			27,25		
			Sample A	3,624	32,616			44,21		
			Sample B	3,058	27,522			37,30		
			Sample C	3,384	30,456			41,28		

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.2.3 : Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων συγκέντρωσης 2^{ης} πειραματικής επώασης, 3^η μεταχείριση.

Time	Tested Concentration	Treatment	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV
T0	100	Cntrl A	15,174	136,566	123,876	17,946	110,24	100,00	14,49
Αβιοτικός μάρτυρας	mg /L	Cntrl B	12,354	111,186			89,76		
εμβολιασμένη καλλιέργεια		Sample A	16,504	148,536	114,903	29,144	129,27	100,00	25,36
		Sample B	11,01	99,09			86,24		
		Sample C	10,787	97,083			84,49		
T1	100	Cntrl A	5,632	84,48	87,4425	4,190	68,20	70,59	3,38
	mg /L	Cntrl B	6,027	90,405			72,98		
		Sample A	6,264	93,96	91,5675	2,593	81,77	80,19	2,26
		Sample B	5,945	89,175			77,61		
		Sample C	6,22	93,3			81,20		
T2	100	Cntrl A	5,616	84,24	83,9175	0,456	68,00	67,74	0,37
	mg /L	Cntrl B	5,573	83,595			67,48		
		Sample A	6,009	90,135	88,83	1,321	78,44	77,20	1,15
		Sample B	5,835	87,525			76,17		

Time	Tested Concentration	Treatment	3,5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV
		Sample C	5,898	88,47			77,00		
T3	100	Cntrl A	5,67	85,05	82,755	3,246	68,66	66,80	2,62
	mg /L	Cntrl B	5,364	80,46			64,95		
		Sample A	5,997	89,955	89,9475	0,541	78,29	78,01	0,47
		Sample B	5,996	89,94			78,27		
		Sample C	5,934	89,01			77,47		
T4	100	Cntrl A	5,369	80,535	81,3525	1,156	65,01	65,67	0,93
	mg /L	Cntrl B	5,478	82,17			66,33		
		Sample A	6,16	92,4	90,645	1,835	80,42	78,62	1,60
		Sample B	5,926	88,89			77,36		
		Sample C	5,981	89,715			78,08		
T5	100	Cntrl A	5,107	76,605	76,5525	0,074	61,84	61,80	0,06
	mg /L	Cntrl B	5,1	76,5			61,76		
		Sample A	5,937	89,055	89,07	1,542	77,50	78,29	1,34
		Sample B	5,939	89,085			77,53		
		Sample C	6,116	91,74			79,84		
T6	100	Cntrl A	5,163	77,445	76,5	1,336	62,52	61,76	1,08
	mg /L	Cntrl B	5,037	75,555			60,99		
		Sample A	5,853	87,795	86,9175	1,740	76,41	76,40	1,51
		Sample B	5,736	86,04			74,88		
		Sample C	5,968	89,52			77,91		
T7	100	Cntrl A	4,808	72,12	72,5325	0,583	58,22	58,55	0,47
	mg /L	Cntrl B	4,863	72,945			58,89		
		Sample A	5,771	86,565	84,7425	1,896	75,34	74,01	1,65
		Sample B	5,528	82,92			72,17		
		Sample C	5,71	85,65			74,54		
T8	100	Cntrl A	4,806	72,09	71,13	1,358	58,20	57,42	1,10
	mg /L	Cntrl B	4,678	70,17			56,65		
		Sample A	5,829	87,435	85,005	2,442	76,09	74,10	2,13
		Sample B	5,505	82,575			71,86		
		Sample C	5,695	85,425			74,35		
T9	100	Cntrl A	4,452	66,78	67,5975	1,156	53,91	54,57	0,93
	mg /L	Cntrl B	4,561	68,415			55,23		
		Sample A	5,917	88,755	85,215	3,580	77,24	74,43	3,12
		Sample B	5,445	81,675			71,08		
		Sample C	5,743	86,145			74,97		
T11	100	Cntrl A	3,893	58,395	58,86	0,658	47,14	47,52	0,53
	mg /L	Cntrl B	3,955	59,325			47,89		
		Sample A	5,256	78,84	78,0525	0,793	68,61	67,88	0,69
		Sample B	5,151	77,265			67,24		
		Sample C	5,193	77,895			67,79		
T14	100	Cntrl A	4,131	61,965	50,1225	16,748	50,02	40,46	13,52
	mg /L	Cntrl B	2,552	38,28			30,90		
χωρίς προσθήκη		Sample A	5,148	77,22			67,20		

Time	Tested Concentration	Treatment	3,5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	% Initial Concentration	AV	STDEV
προσθήκη γλυκόζης		Sample B	4,457	66,855			58,18		
προσθήκη βιομάζας		Sample C	4,876	73,14			63,65		
T16	100	Cntrl A	3,864	57,96	48,885	12,834	46,79	39,46	10,36
	mg /L	Cntrl B	2,654	39,81			32,14		
		Sample A	4,923	73,845			64,27		
		Sample B	4,727	70,905			61,71		
		Sample C	4,746	71,19			61,96		
T18	100	Cntrl A	3,808	57,12	50,205	9,779	46,11	40,53	7,89
	mg /L	Cntrl B	2,886	43,29			34,95		
		Sample A	5,083	76,245			66,36		
		Sample B	4,62	69,3			60,31		
		Sample C	4,774	71,61			62,32		
T21	100	Cntrl A	3,429	51,435	49,6875	2,471	41,52	40,11	2,00
	mg /L	Cntrl B	3,196	47,94			38,70		
		Sample A	4,872	73,08			63,60		
		Sample B	4,414	66,21			57,62		
		Sample C	4,441	66,615			57,97		
T30	100	Cntrl A	3,787	56,805	53,9025	4,105	45,86	43,51	3,31
	mg /L	Cntrl B	3,4	51			41,17		
		Sample A	5,866	87,99			76,58		
		Sample B	4,262	63,93			55,64		
		Sample C	3,759	56,385			49,07		
T35	100	Cntrl A	2,835	42,525	40,2825	3,171	34,33	32,52	2,56
	mg /L	Cntrl B	2,536	38,04			30,71		
		Sample A	4,574	68,61			59,71		
		Sample B	3,822	57,33			49,89		
		Sample C	2,43	36,45			31,72		
T42	100	Cntrl A	2,217	33,255	32,745	0,721	26,85	26,43	0,58
	mg /L	Cntrl B	2,149	32,235			26,02		
		Sample A	3,899	58,485			50,90		
		Sample B	3,321	49,815			43,35		
		Sample C	2,005	30,075			26,17		
T46	100	Cntrl A	2,117	31,755	30,9525	1,135	25,63	24,99	0,92
	mg /L	Cntrl B	2,01	30,15			24,34		
		Sample A	3,971	59,565			51,84		
		Sample B	3,182	47,73			41,54		
		Sample C	1,926	28,89			25,14		

6.3 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3 : Συγκεντρωτικοί Πίνακες 3^{ης} πειραματικής επώασης - Εκτίμηση της αποδομητικής ικανότητας του μύκητα *C. herbarum* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.3.1 : Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων συγκέντρωσης 3^{ης} πειραματικής επώασης, 1^η μεταχείριση.

Date	Time	Tested Concentration	Treatment 0% glucose	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	Initial concentration	AV	STDEV
23/11/2021	T0	50 mg/L	Cntrl A	4,638	41,742	39,4965	3,176	105,69	100,00	8,04
			Cntrl B	4,139	37,251			94,31		
			Sample A	5,137	46,233	39,738	5,625	116,34	100,00	14,15
			Sample B	4,056	36,504			91,86		
			Sample C	4,053	36,477			91,79		
24/11/2021	T1	50 mg/L	Cntrl A	4,216	37,944	37,7415	0,286	96,07	95,56	0,73
			Cntrl B	4,171	37,539			95,04		
			Sample A	7,077	63,693	57,345	5,542	160,28	144,31	13,95
			Sample B	6,097	54,873			138,09		
			Sample C	5,941	53,469			134,55		
25/11/2021	T2	50 mg/L	Cntrl A	3,841	34,569	36,747	3,080	87,52	93,04	7,80
			Cntrl B	4,325	38,925			98,55		
			Sample A	4,843	43,587	38,346	4,564	109,69	96,50	11,49
			Sample B	3,916	35,244			88,69		
			Sample C	4,023	36,207			91,11		
26/11/2021	T3	50 mg/L	Cntrl A	4,769	42,921	40,9365	2,807	108,67	103,65	7,11
			Cntrl B	4,328	38,952			98,62		
			Sample A	4,525	40,725	37,635	2,693	102,48	94,71	6,78
			Sample B	3,976	35,784			90,05		
			Sample C	4,044	36,396			91,59		
29/11/2021	T6	50 mg/L	Cntrl A	4,185	37,665	37,1745	0,694	95,36	94,12	1,76
			Cntrl B	4,076	36,684			92,88		
			Sample A	4,383	39,447	35,013	3,845	99,27	88,11	9,68
			Sample B	3,666	32,994			83,03		
			Sample C	3,622	32,598			82,03		
3/12/2021	T10	50 mg/L	Cntrl A	4,005	36,045	33,5565	3,519	91,26	84,96	8,91
			Cntrl B	3,452	31,068			78,66		
			Sample A	4,371	39,339	34,845	3,918	99,00	87,69	9,86
			Sample B	3,672	33,048			83,16		
			Sample C	3,572	32,148			80,90		
7/12/2021	T14	50 mg/L	Cntrl A	3,585	32,265	31,671	0,840	81,69	80,19	2,13
			Cntrl B	3,453	31,077			78,68		
			Sample A	4,184	37,656	34,137	3,556	94,76	85,91	8,95
			Sample B	3,801	34,209			86,09		

Date	Time	Tested Concentration	Treatment 0% glucose	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	Initial concentration	AV	STDEV
			Sample C	3,394	30,546			76,87		
10/12/2021	T17	50	Cntrl A	3,438	30,942	30,546	0,560	78,34	77,34	1,42
		mg/L	Cntrl B	3,35	30,15			76,34		
			Sample A	3,937	35,433	32,232	3,562	89,17	81,11	8,96
			Sample B	3,652	32,868			82,71		
			Sample C	3,155	28,395			71,46		
14/12/2021	T21	50	Cntrl A	3,494	31,446	30,114	1,884	79,62	76,24	4,77
		mg/L	Cntrl B	3,198	28,782			72,87		
			Sample A	4,492	40,428	37,314	2,727	101,74	93,90	6,86
			Sample B	3,928	35,352			88,96		
			Sample C	4,018	36,162			91,00		
22/12/2021	T29	50	Cntrl A	2,923	26,307	25,6905	0,872	66,61	65,05	2,21
		mg/L	Cntrl B	2,786	25,074			63,48		
			Sample A	4,27	38,43	33,837	4,303	96,71	85,15	10,83
			Sample B	3,687	33,183			83,50		
			Sample C	3,322	29,898			75,24		

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.3.2 : Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων συγκέντρωσης 3^{ου} πειράματος, 2^η μεταχείριση.

Date	Time	Tested Concentration	Treatment 0,5% glucose	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	Initial concentration	AV	STDEV
23/11/2021	T0	50	Cntrl A	4,63	41,67	42,507	1,184	98,03	100,00	2,78
		mg/L	Cntrl B	4,816	43,344			101,97		
			Sample A	4,186	37,674	37,707	0,142	99,91	100,00	0,38
			Sample B	4,207	37,863			100,41		
			Sample C	4,176	37,584			99,67		
24/11/2021	T1	50	Cntrl A	4,116	37,044	37,593	0,776	87,15	88,44	1,83
		mg/L	Cntrl B	4,238	38,142			89,73		
			Sample A	3,971	35,739	36,573	0,723	94,78	96,99	1,92
			Sample B	4,107	36,963			98,03		
			Sample C	4,113	37,017			98,17		
25/11/2021	T2	50	Cntrl A	3,852	34,668	35,1225	0,643	81,56	82,63	1,51
		mg/L	Cntrl B	3,953	35,577			83,70		
			Sample A	3,836	34,524	34,89	2,156	91,56	92,53	5,72
			Sample B	4,134	37,206			98,67		
			Sample C	3,66	32,94			87,36		
26/11/2021	T3	50	Cntrl A	4,616	41,544	39,915	2,304	97,73	93,90	5,42
		mg/L	Cntrl B	4,254	38,286			90,07		
			Sample A	4,029	36,261	35,481	1,335	96,17	94,10	3,54

Date	Time	Tested Concentration	Treatment 0,5% glucose	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	Initial concentration	AV	STDEV
			Sample B	4,027	36,243			96,12		
			Sample C	3,771	33,939			90,01		
29/11/2021	T6	50	Cntrl A	4,024	36,216	36,657	0,624	85,20	86,24	1,47
		mg/L	Cntrl B	4,122	37,098			87,28		
			Sample A	3,988	35,892	34,515	1,195	95,19	91,53	3,17
			Sample B	3,767	33,903			89,91		
			Sample C	3,75	33,75			89,51		
3/12/2021	T10	50	Cntrl A	3,801	34,209	34,3305	0,172	80,48	80,76	0,40
		mg/L	Cntrl B	3,828	34,452			81,05		
			Sample A	3,713	33,417	32,958	1,206	88,62	87,41	3,20
			Sample B	3,763	33,867			89,82		
			Sample C	3,51	31,59			83,78		
7/12/2021	T14	50	Cntrl A	3,581	32,229	32,2695	0,057	75,82	75,92	0,13
		mg/L	Cntrl B	3,59	32,31			76,01		
			Sample A	3,879	34,911	32,643	2,200	92,58	86,57	5,83
			Sample B	3,611	32,499			86,19		
			Sample C	3,391	30,519			80,94		
10/12/2021	T17	50	Cntrl A	3,361	30,249	30,6495	0,566	71,16	72,10	1,33
		mg/L	Cntrl B	3,45	31,05			73,05		
			Sample A	3,16	28,44	30,426	1,945	75,42	80,69	5,16
			Sample B	3,592	32,328			85,73		
			Sample C	3,39	30,51			80,91		
14/12/2021	T21	50	Cntrl A	3,405	30,645	27,585	4,327	77,59	69,84	10,96
		mg/L	Cntrl B	2,725	24,525			62,09		
			Sample A	3,468	31,212	33,75	2,704	78,54	84,93	6,80
			Sample B	4,066	36,594			92,09		
			Sample C	3,716	33,444			84,16		
22/12/2021	T29	50	Cntrl A	2,401	21,609	21,1005	0,719	54,71	53,42	1,82
		mg/L	Cntrl B	2,288	20,592			52,14		
			Sample A	3,212	28,908	31,065	1,962	72,75	78,17	4,94
			Sample B	3,638	32,742			82,39		
			Sample C	3,505	31,545			79,38		

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.3.3 : Συγκενρωτικός πίνακας μετρήσεων συγκέντρωσης 3^{ου} πειράματος, 3^η μεταχείριση.

Date	Time	Tested Concentration	Treatment 1% glucose	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	Initial concentration	AV	STDEV
23/11/2021	T0	50 mg/L	Cntrl A	4,207	37,863	40,3515	3,519	93,83	100,00	8,72
			Cntrl B	4,76	42,84			106,17		
			Sample A	4,306	38,754	39,666	0,876	97,70	100,00	2,21
			Sample B	4,416	39,744			100,20		
			Sample C	4,5	40,5			102,10		
24/11/2021	T1	50 mg/L	Cntrl A	4,032	36,288	37,8225	2,170	89,93	93,73	5,38
			Cntrl B	4,373	39,357			97,54		
			Sample A	4,054	36,486	35,823	0,767	91,98	90,31	1,93
			Sample B	3,887	34,983			88,19		
			Sample C	4	36			90,76		
25/11/2021	T2	50 mg/L	Cntrl A	3,712	33,408	35,0145	2,272	82,79	86,77	5,63
			Cntrl B	4,069	36,621			90,75		
			Sample A	3,773	33,957	33,615	0,303	85,61	84,75	0,76
			Sample B	3,723	33,507			84,47		
			Sample C	3,709	33,381			84,16		
26/11/2021	T3	50 mg/L	Cntrl A	4,457	40,113	39,5325	0,821	99,41	97,97	2,03
			Cntrl B	4,328	38,952			96,53		
			Sample A	3,831	34,479	34,497	1,926	86,92	86,97	4,86
			Sample B	3,62	32,58			82,14		
			Sample C	4,048	36,432			91,85		
29/11/2021	T6	50 mg/L	Cntrl A	4,322	38,898	36,9225	2,794	96,40	91,50	6,92
			Cntrl B	3,883	34,947			86,61		
			Sample A	3,691	33,219	31,401	3,514	83,75	79,16	8,86
			Sample B	3,039	27,351			68,95		
			Sample C	3,737	33,633			84,79		
3/12/2021	T10	50 mg/L	Cntrl A	3,88	34,92	34,2405	0,961	82,15	80,55	2,26
			Cntrl B	3,729	33,561			78,95		
			Sample A	3,609	32,481	30,342	3,073	86,14	80,47	8,15
			Sample B	2,98	26,82			71,13		
			Sample C	3,525	31,725			84,14		
7/12/2021	T14	50 mg/L	Cntrl A	3,522	31,698	30,591	1,566	74,57	71,97	3,68
			Cntrl B	3,276	29,484			69,36		
			Sample A	3,582	32,238	27,333	5,935	85,50	72,49	15,74
			Sample B	2,304	20,736			54,99		
			Sample C	3,225	29,025			76,98		
10/12/2021	T17	50 mg/L	Cntrl A	3,391	30,519	29,5875	1,317	71,80	69,61	3,10
			Cntrl B	3,184	28,656			67,41		
			Sample A	3,545	31,905	26,106	7,011	84,61	69,23	18,59

Date	Time	Tested Concentration	Treatment 1% glucose	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	Initial concentration	AV	STDEV
			Sample B	2,035	18,315			48,57		
			Sample C	3,122	28,098			74,52		
14/12/2021	T21	50	Cntrl A	3,096	27,864	27,513	0,496	70,55	69,66	1,26
		mg/L	Cntrl B	3,018	27,162			68,77		
			Sample A	4,096	36,864	29,988	7,778	92,77	75,46	19,57
			Sample B	2,394	21,546			54,22		
			Sample C	3,506	31,554			79,41		
22/12/2021	T29	50	Cntrl A	3,429	30,861	27,8685	4,232	78,14	70,56	10,71
		mg/L	Cntrl B	2,764	24,876			62,98		
			Sample A	3,85	34,65	22,767	10,636	87,20	57,29	26,76
			Sample B	2,168	19,512			49,10		
			Sample C	1,571	14,139			35,58		

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.3.4 : Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων συγκέντρωσης 3^{ου} πειράματος, 4^η μεταχείριση.

Date	Time	Tested Concentration	Treatment 2,5% glucose	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	Initial concentration	AV	STDEV
23/11/2021	T0	50	Cntrl A	4,59	41,31	41,346	0,051	99,91	100,00	0,12
		mg/L	Cntrl B	4,598	41,382			100,09		
			Sample A	4,486	40,374	37,953	2,097	106,38	100,00	5,53
			Sample B	4,088	36,792			96,94		
			Sample C	4,077	36,693			96,68		
24/11/2021	T1	50	Cntrl A	4,267	38,403	38,6505	0,350	92,88	93,48	0,85
		mg/L	Cntrl B	4,322	38,898			94,08		
			Sample A	4,076	36,684	35,172	1,642	96,66	92,67	4,33
			Sample B	3,934	35,406			93,29		
			Sample C	3,714	33,426			88,07		
25/11/2021	T2	50	Cntrl A	3,893	35,037	35,1135	0,108	84,74	84,93	0,26
		mg/L	Cntrl B	3,91	35,19			85,11		
			Sample A	3,234	29,106	30,189	2,534	76,69	79,54	6,68
			Sample B	3,153	28,377			74,77		
			Sample C	3,676	33,084			87,17		
26/11/2021	T3	50	Cntrl A	4,208	37,872	38,43	0,789	91,60	92,95	1,91
		mg/L	Cntrl B	4,332	38,988			94,30		
			Sample A	3,738	33,642	31,398	2,643	88,64	82,73	6,96
			Sample B	3,165	28,485			75,05		
			Sample C	3,563	32,067			84,49		
29/11/2021	T9	50	Cntrl A	4,048	36,432	36,7695	0,477	88,11	88,93	1,15
		mg/L	Cntrl B	4,123	37,107			89,75		

Date	Time	Tested Concentration	Treatment 2,5% glucose	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	Initial concentration	AV	STDEV
			Sample A	3,557	32,013	29,586	2,782	84,35	77,95	7,33
			Sample B	2,95	26,55			69,95		
			Sample C	3,355	30,195			79,56		
3/12/2021	T10	50	Cntrl A	3,59	32,31	23,301	12,741	76,01	54,82	29,97
		mg/L	Cntrl B	1,588	14,292			33,62		
			Sample A	3,481	31,329	28,566	3,485	83,09	75,76	9,24
			Sample B	2,739	24,651			65,38		
			Sample C	3,302	29,718			78,81		
7/12/2021	T14	50	Cntrl A	3,337	30,033	21,3345	12,302	70,65	50,19	28,94
		mg/L	Cntrl B	1,404	12,636			29,73		
			Sample A	3,358	30,222	28,275	1,808	80,15	74,99	4,79
			Sample B	2,961	26,649			70,67		
			Sample C	3,106	27,954			74,13		
10/12/2021	T17	50	Cntrl A	3,059	27,531	20,4975	9,947	64,77	48,22	23,40
		mg/L	Cntrl B	1,496	13,464			31,67		
			Sample A	3,231	29,079	26,523	3,176	77,12	70,34	8,42
			Sample B	2,552	22,968			60,91		
			Sample C	3,058	27,522			72,99		
14/12/2021	T21	50	Cntrl A	3,063	27,567	21,9015	8,012	69,80	55,45	20,29
		mg/L	Cntrl B	1,804	16,236			41,11		
			Sample A	4,241	38,169	32,673	5,155	96,05	82,22	12,97
			Sample B	3,105	27,945			70,32		
			Sample C	3,545	31,905			80,29		
22/12/2021	T29	50	Cntrl A	2,632	23,688	19,1385	6,434	59,97	48,46	16,29
		mg/L	Cntrl B	1,621	14,589			36,94		
			Sample A	3,683	33,147	29,643	4,592	83,41	74,60	11,56
			Sample B	2,716	24,444			61,51		
			Sample C	3,482	31,338			78,86		

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.3.5 : Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων συγκέντρωσης 3^{ου} πειράματος, 5^η μεταχείριση.

Date	Time	Tested Concentration	Treatment 5% glucose	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	Initial concentration	AV	STDEV
23/11/2021	T0	50	Cntrl A	4,327	38,943	40,4415	2,119	96,29	100,00	5,24
		mg/L	Cntrl B	4,66	41,94			103,71		
			Sample A	4,78	43,02	41,136	1,658	104,58	100,00	4,03
			Sample B	4,433	39,897			96,99		
			Sample C	4,499	40,491			98,43		
24/11/2021	T1	50	Cntrl A	4,171	37,539	37,7505	0,299	92,82	93,35	0,74

Date	Time	Tested Concentration	Treatment 5% glucose	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	Initial concentration	AV	STDEV
		mg/L	Cntrl B	4,218	37,962			93,87		
			Sample A	3,864	34,776	34,434	0,569	84,54	83,71	1,38
			Sample B	3,861	34,749			84,47		
			Sample C	3,753	33,777			82,11		
25/11/2021	T2	50	Cntrl A	3,996	35,964	36,9945	1,457	88,93	91,48	3,60
		mg/L	Cntrl B	4,225	38,025			94,02		
			Sample A	3,857	34,713	31,23	3,018	84,39	75,92	7,34
			Sample B	3,286	29,574			71,89		
			Sample C	3,267	29,403			71,48		
26/11/2021	T3	50	Cntrl A	4,269	38,421	38,502	0,115	95,00	95,20	0,28
		mg/L	Cntrl B	4,287	38,583			95,40		
			Sample A	3,381	30,429	30,339	0,697	73,97	73,75	1,70
			Sample B	3,443	30,987			75,33		
			Sample C	3,289	29,601			71,96		
29/11/2021	T6	50	Cntrl A	3,964	35,676	36	0,458	88,22	89,02	1,13
		mg/L	Cntrl B	4,036	36,324			89,82		
			Sample A	3,089	27,801	28,362	0,895	67,58	68,95	2,18
			Sample B	3,266	29,394			71,46		
			Sample C	3,099	27,891			67,80		
3/12/2021	T10	50	Cntrl A	3,584	32,256	32,652	0,560	75,88	76,82	1,32
		mg/L	Cntrl B	3,672	33,048			77,75		
			Sample A	3,41	30,69	28,83	1,613	81,39	76,46	4,28
			Sample B	3,109	27,981			74,21		
			Sample C	3,091	27,819			73,78		
7/12/2021	T14	50	Cntrl A	3,392	30,528	30,0105	0,732	71,82	70,60	1,72
		mg/L	Cntrl B	3,277	29,493			69,38		
			Sample A	3,321	29,889	29,622	0,925	79,27	78,56	2,45
			Sample B	3,177	28,593			75,83		
			Sample C	3,376	30,384			80,58		
10/12/2021	T17	50	Cntrl A	3,104	27,936	28,2465	0,439	65,72	66,45	1,03
		mg/L	Cntrl B	3,173	28,557			67,18		
			Sample A	2,963	26,667	27,249	0,564	70,72	72,27	1,49
			Sample B	3,088	27,792			73,71		
			Sample C	3,032	27,288			72,37		
14/12/2021	T21	50	Cntrl A	3,047	27,423	27,3015	0,172	69,43	69,12	0,44
		mg/L	Cntrl B	3,02	27,18			68,82		
			Sample A	4,091	36,819	34,578	1,949	92,65	87,01	4,90
			Sample B	3,737	33,633			84,64		
			Sample C	3,698	33,282			83,75		
22/12/2021	T29	50	Cntrl A	2,54	22,86	22,446	0,585	57,88	56,83	1,48

Date	Time	Tested Concentration	Treatment 5% glucose	3.5DCA HPLC (mg/L)	Concentration (mg/L)	AV	STDEV	Initial concentration	AV	STDEV
		mg/L	Cntrl B	2,448	22,032			55,78		
			Sample A	3,524	31,716	31,308	0,851	79,81	78,79	2,14
			Sample B	3,542	31,878			80,22		
			Sample C	3,37	30,33			76,32		