

Περίληψη

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν μια σημαντική ομάδα περιβαλλοντικών ρύπων. Η ρύπανση των φυσικών πόρων από τα γεωργικά φάρμακα έχει αποδοθεί σε σημειακές και μη σημειακές πηγές. Η συμβολή των σημειακών πηγών στη ρύπανση του περιβάλλοντος είναι υψίστης σημασίας και μέτρα για τη μείωση των επιπτώσεων τους έχουν προταθεί. Μη ορθολογικές πρακτικές στις γεωργικές εκμεταλλεύσεις πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά τον ψεκασμό αποτελούν τις κύριες πηγές σημειακής ρύπανσης των φυσικών υδάτινων πόρων με γεωργικά φάρμακα. Οι βιοκλίνες έχουν πλέον καθιερωθεί ως οικονομικά, αποδοτικά και αποτελεσματικά συστήματα βιολογικής επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων που παράγονται από δραστηριότητες στη γεωργική εκμετάλλευση. Ωστόσο, η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων πέραν του αγρού και ύστερα από την συγκομιδή συμβάλλουν επίσης στη σημειακή ρύπανση των φυσικών πόρων. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι βιομηχανίες συσκευασίας φρούτων, όπου μυκητοκτόνα (thiabendazole (TBZ), imazalil (IMZ), *ortho*-phenyphenol (OPP)) και αντιοξειδωτικά (diphenylamine (DPA), ethoxyquin (EQ)) χρησιμοποιούνται για την προστασία των φρούτων από μυκητιακές προσβολές και φυσιολογική υποβάθμιση της ποιότητας τους κατά την αποθήκευση. Η πρακτική αυτή οδηγεί στην παραγωγή μεγάλου όγκου υγρών αποβλήτων επιβαρυσμένων με υψηλές ποσότητες τοξικών και υπολειμματικών γεωργικών φαρμάκων τα οποία χρήζουν άμεσης επεξεργασίας στο σημείο στο οποίο παράγονται. Ο περιβαλλοντικός κίνδυνος που σχετίζεται με τη μετασυλλεκτική χρήση των γεωργικών φαρμάκων επισημαίνεται στις εγκρίσεις όλων των γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων, όπου υπογραμμίζεται η ανάγκη για τη διαχείριση των αποβλήτων που παράγονται, πριν από την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον. Ωστόσο σήμερα δεν υπάρχουν αποτελεσματικές, φθηνές και βιώσιμες μέθοδοι διαχείρισης των συγκεκριμένων αποβλήτων στην Ευρώπη.

Εν τη απουσία αποτελεσματικών μεθόδων επεξεργασίας τα συγκεκριμένα υγρά απόβλητα διοχετεύονται είτε στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων είτε απορρίπτονται σε παρακείμενους αγρούς θέτοντας σε κίνδυνο την ποιότητα των υδατικών και εδαφικών πόρων. Τροποποιημένες βιοκλίνες που θα

είναι συμβατές με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων υγρών απόβλητων (υψηλοί όγκοι, εποχικότητα παραγωγής, υψηλά φορτία γεωργικών φαρμάκων, χαμηλό BOD / COD κλπ), θα μπορούσαν χρησιμοποιηθούν για τη διαχείρισή τους. Με βάση όλα τα παραπάνω, ο κύριος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η πλήρης αξιολόγηση των βιοκλινών ως μέθοδος επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων από τις βιομηχανίες συσκευασίας φρούτων. Για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου, ακολουθήθηκε μια πειραματική προσέγγιση που περιελάμβανε βαθμιαία αύξηση της πολυπλοκότητας (εργαστήριο/στήλες/πυλοτικά συστήματα), η οποία είχε ως κύριους στόχους (α) να προσδιορίσει, αρχικά σε εργαστηριακή κλίμακα, οργανικά βιομίγματα, με βάση το εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών (SMS), με υψηλή ικανότητα απομάκρυνσης και προσρόφησης των γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων (β) να αξιολογήσει περαιτέρω την ικανότητα των αποτελεσματικότερων οργανικών βιομιγμάτων (όπως αυτά προέκυψαν από την εργαστηριακή αξιολόγηση), να κατακρατούν τα γεωργικά φάρμακα υπό συνθήκες υψηλού υδραυλικού φορτίου προσομοιώνοντας έτσι ρεαλιστικές συνθήκες παραγωγής από συσκευαστήρια φρούτων και (γ) να προσδιορήσει την απόδοση των βιοκλινών σε πιλοτικό επίπεδο. Στο πλαίσιο αυτό αξιολογήθηκαν επίσης η προοπτική βελτιστοποίησης της απόδοσης των βιοκλινών έναντι κυρίως υπολειμματικών γεωργικών φαρμάκων μέσω βιοεπλουτισμού (bioaugmentation) με εξειδικευμένα μικροβιακά εμβόλια, η ανταπόκριση της μικροβιακής κοινότητας των βιοκλινών στην συνεχή εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων. Παράλληλα μελετήθηκαν και μέτρα προς την κατεύθυνση της πρακτικής εφαρμογής των βιοκλινών που ακόμη και σήμερα παρεμποδίζουν την πλήρη ανάπτυξη τους όπως (α) η ποιότητα και η μετέπειτα διαχείριση των επεξεργασμένων αποβλήτων που προκύπτουν από τις βιοκλίνες και (β) η απορρύπανση του εξαντλημένου βιομίγματος των βιοκλινών μετά το τέλος του κύκλου ζωής τους.

Στο Κεφάλαιο 2 μελετήσαμε την διάσπαση των TBZ, IMZ, OPP, DPA και EQ, που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων, από λυματολάσπη που έχει υποστεί αναερόβια χώνευση καθώς και από αερόβια υγρή λυματολάσπη ώστε να εκτιμηθεί αρχικά η ικανότητα των μονάδων επεξεργασίας αστικών λυμάτων να

απομακρύνουν τα συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα. Σε δεύτερο στάδιο, ελέγξαμε την προσρόφηση και αποδόμηση των παραπάνω γεωργικών φαρμάκων (και το μεταβολισμό του EQ) σε διάφορα οργανικά βιομίγματα που αποτελούνταν από έδαφος, άχυρο και εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών (SMS) σε διάφορες ογκομετρικές αναλογίες, για να προσδιορίσουμε έτσι το υλικό πλήρωσης των βιοκλινών με την καλύτερη απόδοση για μεταγενέστερη χρήση του σε συστήματα βιοκλινών πλήρους κλίμακας. Το TBZ και το IMZ έδειξαν την υψηλότερη υπολειμματικότητα ιδιαίτερα στην λυματολάσπη που είχε υποστεί αναερόβια χώνευση ($DT_{50} = 32,3$ έως $257,6$ ημέρες), σε αντίθεση με τα OPP και DPA που αποδομήθηκαν ταχύτατα κυρίως στην αερόβια υγρή λυματολάσπη ($DT_{50} = 1.3-9.3$ ημέρες). Το EQ οξειδώθηκε άμεσα προς quinone imine (QI), το οποίο όμως διασπάστηκε περαιτέρω χωρίς να εμφανίζει μεγάλη υπολειμματικότητα, και σε μικρές ποσότητες dimethyl ethoxyquinoline (EQNL) που εμφάνισε υψηλή υπολειμματικότητα σε όλα τα βιομίγματα. Αποστείρωση της αερόβιας υγρής λυματολάσπης ανέστειλε τη διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων αποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο των μικροοργανισμών στην διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων. Οργανικά υποστρώματα πλούσια σε SMS παρουσίασαν την υψηλότερη ικανότητα αποδόμησης των TBZ και IMZ εμφανίζοντας τιμές DT_{50s} περίπου 28 ημερών, σε σύγκριση με τα άλλα βιομίγματα που εμφάνισαν τιμές $DT_{50s} > 50$ ημερών. Τα TBZ και IMZ έδειξαν την υψηλότερη τάση προσρόφησης, ενώ τα OPP και DPA προσροφήθηκαν ασθενώς. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων δεν μπορούν να εγγυηθούν αποτελεσματική απομάκρυνση των υπολειμματικών μυκητοκτόνων IMZ και TBZ, ενώ οργανικά βιομίγματα πλούσια σε SMS έδειξαν υψηλή ικανότητα απομάκρυνσης των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων, καθώς και των λιγότερο υπολειμματικών OPP, DPA και EQ.

Στο Κεφάλαιο 3, επικεντρωθήκαμε στα συσκευαστήρια φρούτων εσπεριδοειδών που παράγουν υψηλές ποσότητες υγρών αποβλήτων που περιέχουν τα μυκητοκτόνα OPP και IMZ, δυο μυκητοκτόνα με διαφορετική υπολειμματικότητα στο περιβάλλον (το OPP είναι μη υπολειμματικό αντίθετα με το IMZ που είναι ιδιαίτερα υπολειμματικό). Έτσι στο πλαίσιο της βαθμιαίας αύξησης της

πολυπολοκότητας του πειραματισμούς μας μελετήσαμε σε συστήματα στηλών έκπλυσης την δυνατότητα του SMS του μύκητα *Pleurotus ostreatus*, είτε μόνο του είτε σε μείγμα με άχυρο και έδαφος καθώς και ένα μείγμα από άχυρο / έδαφος, να κατακρατούν και να απομακρύνουν από τα υγρά απόβλητα τα OPP και IMZ. Ο ρόλος του μύκητα *P. ostreatus* στη απομάκρυνση των μυκητοκτόνων διερευνήθηκε περαιτέρω διαμέσου μέτρησης της απόδοσης φρέσκου υποστρώματος μανιταριών του *P. ostreatus* (FMS) και μέτρηση της λιγνολυτικής ενζυματικής δραστηριότητας στα συλλεγόμενα υγρά έκπλυσης. Το σενάριο εφαρμογής των υγρών αποβλήτων στις στήλες που ακολουθήθηκε προσομοιώνει υπό συνθήκες worst-case την παραγωγή αποβλήτων από μια μονάδα συσκευασίας εσπεριδοειδών. Όλα τα υποστρώματα βρέθηκε ότι περιορίζουν σημαντικά την έκπλυση των OPP (0,014-1.1% τη ποσότητας που εφαρμόστηκε στις στήλες) και IMZ, (0,120-0,420%). Ανάλυση ισοζυγίου μάζας έδειξε ότι τα FMS και SMS / Άχυρο / Έδαφο (50/25/25 κατά όγκο) οδήγησαν στην αποτελεσματικότερη απομάκρυνση των OPP και IMZ από τα υγρά απόβλητα αντίστοιχα. Ανεξάρτητα από το υπόστρωμα, τα υπολείμματα του OPP εντοπίστηκαν κυρίως στα 0-20 εκ. των στηλών και ήταν διαθέσιμα (εκχύλιση με νερό), σε σύγκριση με τα υπολείμματα του IMZ που ήταν λιγότερο βιοδιαθέσιμα (εκχύλιση με ακετονιτρίλιο), αλλά εντοπίστηκαν και σε βαθύτερα στρώματα των στηλών (20-50, 50-80 cm) που πακεταρίστηκαν με SMS και Άχυρο/Έδαφος. Η ζωντανή μικροβιακή κοινότητα εντός των στηλών, ποσοτικά και ποιοτικά, προσδιορίστηκε μέσω ανάλυσης των φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων (Phospholipids Fatty Acids, PLFAs). Η αφθονία των μυκήτων ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα ανώτερα στρώματα των στηλών έκπλυσης, από όπου ανακτήθηκαν και τα υψηλότερα ποσοστά των γεωργικών φαρμάκων, υποδηλώνοντας έτσι μια ανασταλτική δράση των μυκητοκτόνων στους μύκητες στα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η χρήση των βιοκλινών και η πλήρωσή τους με υποστρώματα πλούσια σε SMS, θα μπορούσαν να εξασφαλίσουν την αποτελεσματική απομάκρυνση των IMZ και OPP από τα υγρά απόβλητα των συσκευαστηρίων εσπεριδοειδών, ιδιαίτερα ακόμη και υπό υψηλά φορτία όγκου υγρών αποβλήτων και γεωργικών φαρμάκων.

Με βάση τα αποτελέσματα των Κεφαλαίων 2 και 3 κατασκευάσαμε πιλοτικά συστήματα βιοκλινών και εξετάσαμε την αποτελεσματικότητά τους στην απορρύπανση υγρών αποβλήτων που παράγονται υπό πραγματικές συνθήκες από συσκευαστήρια μηλοειδών και εσπεριδοειδών. Άλλες πτυχές που εξετάστηκαν ήταν (α) η βελτιστοποίηση της απόδοσης των πιλοτικών βιοκλινών μέσω βιοεμπλουτισμού τους με εξειδικευμένα βακτηριακά εμβόλια και (β) η σύσταση και λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας των βιοκλινών με την χρήση μοριακών προσεγγίσεων (q-PCR). Επίσης, αξιολογήθηκαν πιθανές λύσεις σε πρακτικά ζητήματα που ακόμη παρεμποδίζουν την πλήρη εφαρμογή των βιοκλινών όπως (i) η εκτίμηση του κινδύνου για το περιβάλλον από την άμεση εναπόθεση των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων και (ii) μεθόδων απορρύπανσης του εξαντλημένου υλικού πλήρωσης των βιοκλινών. Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκαν τρεις πιλοτικές βιοκλίνες του 1 m³ (δεν βιοεμπλουτίστηκαν) και δυο πιλοτικές βιοκλίνες των 0,24 m³ (βιοεμπλουτίστηκαν) και αξιολογήθηκε η απόδοση τους ύστερα από εφαρμογή για διάστημα 160 ημέρων υγρών αποβλήτων που περιείχαν διαφορετικούς συνδυασμούς γεωργικών φαρμάκων προσομοιάζοντας πραγματικά σενάρια συσκευαστηριών μηλοειδών και εσπεριδοειδών. Οι πιλοτικές βιοκλίνες έδειξαν υψηλή ικανότητα απομάκρυνσης τόσο των λιγότερο υπολειμματικών OPP, DPA (> 99,9%) όσο και των πιο υπολειμματικών IMZ και TBZ (> 99,5%). Ο βιοεμπλουτισμός μεγιστοποίησε την απόδοση των βιοκλινών ενάντι του υπολειμματικού μυκητοκτόνου TBZ, το οποίο απομακρύνθηκε πλήρως. Παράλληλα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της αφθονίας των βακτηρίων, των μυκήτων και των καταβολικών γονιδίων *catA* και *pcaH* που εμπλέκονται στην αποδόμηση αρωματικών οργανικών ενώσεων. Ο βιοεμπλουτισμός αποτέλεσε την πιο αποτελεσματική μέθοδο για την απορρύπανση του εξαντλημένου υλικού πλήρωσης των βιοκλινών. Πέραν αυτού η κομποστοποίηση με φρέσκια οργανική ουσία αλλά ακόμα και η απλή αποθήκευση του υλικού σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αποτελούν αποτελεσματικές εναλλακτικές λύσεις απουσία μικροβιακών εμβολίων για την εφαρμογή βιοεμπλουτισμού. Αξιολόγηση του περιβαλλοντικού κινδύνου που ενέχει η απευθείας απόρριψη των επεξεργασμένων αποβλήτων (με βάση σενάρια πρακτικής εφαρμογής των γεωργικών φαρμάκων, την απόδοση των πιλοτικών βιοκλινών και τις σχετικές Κοινοτικές Οδηγίες) έδειξαν ότι η απόρριψη

των επεξεργασμένων αποβλήτων σε επιφάνεια αγρού 0,1 ha, δεν ενέχει μη αποδεκτό κίνδυνο για τα υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα, με εξαίρεση τα απόβλητα που περιέχουν TBZ και παράγονται από συσκευαστήρια μηλοειδών, όπου ο κίνδυνος ήταν αποδεκτός μόνο όταν τα απόβλητα απορρίπτονται σε μεγαλύτερη επιφάνεια (0,2 ha) ή εφαρμόστηκε βιοεμπλουτισμός στις βιοκλίνες που δέχτηκαν TBZ.

Συνολικά η παρούσα διδακτορική διατριβή παρέχει μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση των βιοκλινών ως μέθοδοι επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων που παράγονται από συσκευαστήρια φρούτων. Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής αποδεικνύουν ότι τα συγκεκριμένα συστήματα θα μπορούσαν να είναι μια βιώσιμη λύση για την επεξεργασία των συγκεκριμένων αγρο-βιομηχανικών υγρών αποβλήτων. Περαιτέρω μελέτες θα διερευνήσουν την εφαρμογή των βιοκλινών για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων επιβαρυσμένων με γεωργικά φάρμακα που παράγονται και από άλλες αγροτικές βιομηχανίες (π.χ. απολύμανσης βολβών, επικάλυψης σπόρων).