

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μονάδες μεταποίησης αγροτικών προϊόντων χρησιμοποιούν μεγάλες ποσότητες μυκητοκτόνων ούτως ώστε να διασφαλίσουν την διαθεσιμότητα των φρέσκων αγροτικών προϊόντων κατά την αποθήκευση και μεταφορά. Τέτοιες μονάδες αποτελούν σποροπαραγωγικές μονάδες που επικαλύπτουν σπόρους με μυκητοκτόνα όπως τα carboxin (CBX), metalaxyl-M (MET-M) και flucarboxad (FLX), βιομηχανίες διαχείρισης βολβών οι οποίες εμβαπτίζουν βολβούς σε πυκνά διαλύματα μυκητοκτόνων όπως chlorothalonil (CHT), thiabendazole (TBZ) και fludioxonil (FLD), και τα συσκευαστήρια φρούτων που χρησιμοποιούν μυκητοκτόνα όπως τα imazalil (IMZ) και fludioxonil (FLD) για τον έλεγχο μυκητολογικών προσβολών των φρούτων κατά την αποθήκευση. Αποτέλεσμα αυτών των εφαρμογών, είναι η παραγωγή μεγάλου όγκου υγρών αποβλήτων επιβαρυσμένων με γεωργικά φάρμακα τα οποία αποτελούν σημαντικό περιβαλλοντικό κίνδυνο λόγω της υπολειμματικότητας και της τοξικότητας των μυκητοκτόνων που περιέχονται σε αυτά. Παρά τους σχετικούς κανονισμούς, η έλλειψη αποτελεσματικών και οικονομικά εφαρμόσιμων μεθόδων για την διαχείριση των συγκεκριμένων αποβλήτων, έχει οδηγήσει τις αγροβιομηχανίες στην εφαρμογή ακατάλληλων και περιβαλλοντικά επιβλαβών πρακτικών απόρριψης των συγκεκριμένων υγρών αποβλήτων.

Διάφορες μέθοδοι απορρύπανσης έχουν μελετηθεί με τα χρόνια, αλλά η πλήρης εφαρμογή τους δεν έχει επιτευχθεί εξαιτίας χαμηλής αποτελεσματικότητας, δαπανηρής λειτουργίας και τον σχηματισμό τοξικών παραπροϊόντων κατά την διαχείριση των αποβλήτων. Τα βιολογικά συστήματα διαχείρισης των αποβλήτων, όπως οι βιοκλίνες, παρέχουν μια αποτελεσματική και αειφόρο λύση στην απορρύπανση αποβλήτων που περιέχουν γεωργικά φάρμακα. Η συντριπτική πλειοψηφία των διαθέσιμων μελετών αποδεικνύουν την αποτελεσματική απορρύπανση αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων, ενώ η χρήση βιοκλινών για την επεξεργασία αποβλήτων σποροπαραγωγικών μονάδων και μονάδων διαχείρισης βολβών δεν έχει διερευνηθεί. Η υψηλή ικανότητα των βιοκλινών να απομακρύνουν γεωργικά φάρμακα από υγρά απόβλητα αποδίδεται στο μικροβίωμα που αποικίζει το πληρωτικό υλικό των βιοκλινών. Παρόλα αυτά η σύνθεση και διαδοχή των μικροβιακών κοινοτήτων καθώς και η ποικιλότητα και η δυναμική μεταθετών στοιχείων που συμβάλλουν στην διασπορά γονιδίων καταβολισμού των γεωργικών φαρμάκων στην βακτηριακή κοινότητα κατά την λειτουργία της βιοκλίνης, δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Η απόδοση των συστημάτων βιοκλινών έναντι υπολειμματικών ή εξαιρετικά κινητικών γεωργικών φαρμάκων μπορεί να αυξηθεί ιδιαίτερα μέσω βιοενίσχυσης του πληρωτικού υλικού με μικροβιακά εμβόλια, εξειδικευμένα στην διάσπαση των ενώσεων-στόχων. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο (i) την αξιολόγηση της ικανότητας των συστημάτων βιοκλινών να απορρυπαίνουν απόβλητα επιβαρυσμένα με γεωργικά φάρμακα που παράγονται από σποροπαραγωγικές μονάδες, βιομηχανιών διαχείρισης βολβών και συσκευαστηρίων φρούτων, (ii) την διερεύνηση της σύστασης του μικροβιώματος των βιοκλινών και της ταυτοποίησης παραγόντων που επηρεάζουν την μικροβιακή διαδοχή κατά την λειτουργία της βιοκλίνης, (iii) την μελέτη της εμφάνισης και κατανομής των μεταθετών στοιχείων στα συστήματα βιοκλινών κατά την λειτουργία τους και (iv) την απομόνωση μικροοργανισμών με την ικανότητα να διασπά το

IMZ, ένα ιδιαίτερα υπολειμματικό μυκητοκτόνο το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως από τα συσκευαστήρια φρούτων, στοχεύοντας στην πιθανή χρήση του σε συστήματα διαχείρισης υγρών αποβλήτων όπως βιοκλίνες και βιοαντιδραστήρες.

Στο Κεφάλαιο 2 μελετήσαμε την αποδόμηση και προσρόφηση, δύο κύριες διεργασίες που ελέγχουν την περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων, σε πληρωτικό υλικό βιοκλινών που αποτελείται από 25% έδαφος, 25% άχυρο και 50% εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών, και σε έδαφος χωρίς πρότερη έκθεση σε γεωργικά φάρμακα. Η αποδόμηση των CBX, MET-M, FLX, FLD, TBZ και CHT μελετήθηκε μετά από εφαρμογή μεμονωμένα και σε μίγματα σύμφωνα με την χρήση τους από τις εκάστοτε αγρο-βιομηχανίες, ούτως ώστε να προσομοιωθούν ρεαλιστικές συνθήκες εφαρμογής, ενώ το FLD μελετήθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις (10, 20, και 150 mg/kg) αναπαριστώντας τις δόσεις που χρησιμοποιούνται από την κάθε αγρο-βιομηχανία. Η πλειοψηφία των μυκητοκτόνων, ανεξαρτήτου τρόπου εφαρμογής, αποδομήθηκαν ταχύτερα στο πληρωτικό υλικό των βιοκλινών ( $DT_{50} = 2.34 - 142.9$  ημέρες) σε σύγκριση με το έδαφος ( $DT_{50} = 6.67 - 784.1$  ημέρες). Στις περισσότερες περιπτώσεις η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων σε μίγματα καθυστέρησε την αποδόμηση των μυκητοκτόνων, με το CHT να έχει την πιο αισθητή ανασταλτική επίδραση στην αποδόμηση των TBZ και FLD. Η αποδόμηση του FLD έδειξε ένα δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο με τον χρόνο ημιζωής του να αυξάνεται από τις 42.4 ημέρες, όταν εφαρμόστηκε σε 10 mg/kg, σε 107.6 ημέρες όταν εφαρμόστηκε σε 150 mg/Kg. Επιπροσθέτως, όλα τα γεωργικά φάρμακα έδειξαν υψηλότερη προσρόφηση στο βιομίγμα ( $K_f = 3.23 - 123.3$  g mL<sup>-1</sup>) σε σύγκριση με το έδαφος ( $K_f = 1.15-31.2$  g mL<sup>-1</sup>). Τα ευρήματα του Κεφαλαίου 2 παρέχουν πρώτα στοιχεία για την δυνατότητα των βιοκλινών να απομακρύνουν μυκητοκτόνα που βρίσκονται στα απόβλητα σποροπαραγωγικών μονάδων, βιομηχανιών διαχείρισης βολβών και συσκευαστηρίων φρούτων, κάτι που μας επιτρέπει να προχωρήσουμε με τη περαιτέρω αξιολόγηση των συστημάτων βιοκλινών σε πιο ρεαλιστικά συστήματα φόρτισης.

Έτσι στο Κεφάλαιο 3, πραγματοποιήσαμε πείραμα στηλών έκπλυσης, πιλοτικές βιοκλίνες, που πληρώθηκαν με το ίδιο πληρωτικό υλικό όπως στο Κεφάλαιο 2, ούτως ώστε να αξιολογήσουμε την απόδοση των συστημάτων βιοκλινών στην απορρύπανση αποβλήτων αγρο-βιομηχανιών που περιέχουν μίγματα μυκητοκτόνων, σε ρεαλιστικές συνθήκες φόρτισης. Παρατηρήσαμε ότι οι βιοκλίνες μπόρεσαν να κατακρατήσουν και να διασπάσουν τα μυκητοκτόνα που περιέχονταν στα απόβλητα σε ποσοστό 93.1 - 99.98 %. Λιπόφιλες ενώσεις όπως το FLX κυρίως κατακρατήθηκαν στο πληρωτικό υλικό, ενώ πιο πολικές ενώσεις κυρίως αποδομήθηκαν όπως το CBX ή εκπλύθηκαν όπως το MET-M. Η επίδραση της συνεχούς εφαρμογής αποβλήτου στο μικροβίωμα του πληρωτικού υλικού διερευνήθηκε στην ίδια πειραματική εγκατάσταση μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας προϊόντων ενίσχυσης DNA. Αντίθετα με την αρχική μας υπόθεση, οι βιοκλίνες υποστήριζαν ιδιαίτερα ανθεκτικές βακτηριακές και μυκητιακές κοινότητες, η σύσταση των οποίων δεν επηρεάστηκε από την εφαρμογή των μυκητοκτόνων, αλλά εμφάνισε ξεκάθαρα χρονικά μοτίβα μεταβολών στα διάφορα βάθη των στηλών έκπλυσης. Προαιρετικά ή υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια όπως τα *Chloroflexi/Anaerolineae*, *Acidibacter* and *Mycococcota* έδειξαν σημαντική αύξηση της αφθονίας τους ενισχύοντας την υπόθεση ότι οι χρονικές αυτές μεταβολές στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των βιοκλινών οφείλονταν στην επικράτηση μικροαερόφιλων συνθηκών εντός των βιοκλινών λόγω κορεσμού του πληρωτικού υλικού με το υγρό

απόβλητο. Τέλος, μελετήσαμε την αφθονία μεταθετών στοιχείων, όπως *Int1*, *IS1071*, *IncP-1* and *IncP-1ε*, στηριζόμενοι στην υπόθεση ότι η διαρκής έκθεση των βιοκλινών σε υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων θα ενισχύσει την αφθονία τους και δη την διασπορά γονιδίων αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων στην βακτηριακή κοινότητα. Παρόλα αυτά η υπόθεσή μας δεν επαληθεύτηκε καθώς η συνεχής εφαρμογή του αποβλήτου δεν επηρέασε την αφθονία των μεταθετών στοιχείων. Αντίθετα παρατηρήσαμε αύξηση της αφθονίας των περισσότερων υπό μελέτη μεταθετών στοιχείων με τον χρόνο, υποδηλώνοντας την επικράτηση βιοτικών ή αβιοτικών παραγόντων που ενισχύσουν την διασπορά μεταθετών στοιχείων και γενικότερα τις γενετικές ανταλλαγές μεταξύ μικροοργανισμών. Εν κατακλείδι, όλα τα ευρήματα του Κεφαλαίου 3, ενισχύουν την άποψη ότι οι βιοκλίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για την απορρύπανση αποβλήτων αγρο-βιομηχανιών και έδειξαν ότι τα πληρωτικό υλικό συντηρεί ένα ιδιαίτερα ανθετικό μικροβίωμα το οποίο δεν επηρεάζεται από την έκθεση σε γεωργικά φάρμακα αλλά φαίνεται να αποκρίνεται σε βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες που σταδιακά επικρατούν στη βιοκλίνη.

Το Κεφάλαιο 4 εστίασε στην απομόνωση και χαρακτηρισμό μικροοργανισμών με την ικανότητα να αποδομούν το ευρέως χρησιμοποιούμενο και υπολειμματικό μυκητοκτόνο IMZ, και στην διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης του ως εμβόλιο σε βιολογικά συστήματα διαχείρισης αποβλήτων. Ένα στέλεχος του είδους *Cladosporium herbarum* με την ικανότητα να αποδομεί το IMZ απομονώθηκε μέσω καλλιεργειών εμπλουτισμού από έδαφος που δέχονταν απόβλητα συσκευαστηρίου φρούτων που περιείχαν IMZ. Το *C. herbarum* δεν έδειξε φυτοπαθογόνο δράση έναντι φρούτων που μεταχειρίζονται συχνά από συσκευαστήρια φρούτων, ένα αναγκαίο χαρακτηριστικό για την μετέπειτα χρήση του για την επεξεργασία αποβλήτων συσκευαστηρίων φρούτων. Το στέλεχος κατάφερε να αποδομήσει έως και 100 mg/L IMZ αλλά η αποδομητική του ικανότητα και η ανάπτυξή του μειώθηκαν με την αύξηση της συγκέντρωσης του IMZ με ένα δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο υποδεικνύοντας ότι η αποδόμηση του IMZ είναι ένας μηχανισμός αποτοξικοποίησης παρά συνδέεται με την παραγωγή ενέργειας. Το *C. herbarum* έδειξε αντοχή στην παρουσία και άλλων μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται ευρέως από τα συσκευαστήρια φρούτων και αναμένεται να συνυπάρχουν στα απόβλητα μαζί με το IMZ, και αποδόμησε μερικώς ή πλήρως τα FLD, TBZ και 3,5 dichloroaniline (3,5-DCA), ένα τοξικό προϊόν της αποδόμησης του μυκητοκτόνου iprodione (IPR). Αντίθετα το *ortho*-phenylphenol (OPP) ανέστειλε πλήρως την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και, κατά συνέπεια, την αποδομητική του ικανότητα. Η ικανότητα του *C. herbarum* να απορρυπαίνει απόβλητα που περιέχουν IMZ αξιολογήθηκε σε έναν βιοαντιδραστήρα εργαστηρίου στον οποίο παρέχονταν υγρά απόβλητα που περιείχαν 200 mg/L IMZ. Μεταταξινομική ανάλυση της κοινότητας των μυκήτων έδειξε ότι το στέλεχος *C. herbarum* κατάφερε να εδραιωθεί και να επικρατήσει της μυκητιακής κοινότητας του βιοαντιδραστήρα και να απομακρύνει επιτυχώς >96% του IMZ. Συνολικά, τα ευρήματα του Κεφαλαίου 4 επιδεικνύουν την δυνατότητα του *C. herbarum* να απομακρύνει το IMZ σε εργαστηριακές και βιομηχανικές συνθήκες.

Συγκεντρωτικά η παρούσα διατριβή απόδειξε την υψηλή προοπτική των βιοκλινών για την απορρύπανση αποβλήτων επιβαρυμένων με μυκητοκτόνα που παράγονται από διάφορες αγροτικές μεταποιητικές βιομηχανίες. Παράλληλα αποδείχτηκε ότι οι βιοκλίνες υποστηρίζουν ένα ιδιαίτερα ανθετικό μικροβίωμα, του οποίου η σύσταση και δομή φαίνεται ότι επηρεάζεται από την επικράτηση μικροαερόφιλων συνθηκών οι οποίες επικράτησαν

σταδιακά στο πληρωτικό υλικό. Τέλος, αναφέρουμε για πρώτη φορά την απομόνωση ενός μικροοργανισμού με την ικανότητα να αποδομεί το IMZ, που ταυτοποιήθηκε ως *C. herbarum* και διερευνήσαμε την δυνατότητα χρήσης του για την απορρύπανση αποβλήτων που περιέχουν IMZ.