



ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων Isoproturon, Chlorpyrifos και Tebuconazole στην λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας τριών εδαφών.

Study of the impact of the pesticides Isoproturon, Chlorpyrifos and Tebuconazole at the function of the microbial community of three soils

ΛΑΡΙΣΑ 2024

ΕΦΕΝΤΗ ΤΖΕΜΙΛΕ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπον καθηγητής)

- **ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας και Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας .

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας κ. Δημήτριο Καρπούζα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την καθοδήγηση του σε όλα τα στάδια της εκπόνησης της εργασίας.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ τον κ. Παναγιώτη Καρά για την συνεχή καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και τον άρτιο προγραμματισμό καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων.

Τέλος , δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υλική και ηθική υποστήριξη όλο το διάστημα της προπτυχιακής ακαδημαϊκής μου ζωής .

Ευχαριστώ πολύ όλους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- Περίληψη (σελίδα)
- 1.Αλληλεπιδράσεις γεωργικών φαρμάκων με μικροοργανισμούς στο έδαφος .
 - 1.1Βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων (σελίδα 6)
 - 1.2Μικροβιακή διάσπαση γεωργικών φαρμάκων (σελίδα 9)
 - 1.3. Μεταβολισμός Γεωργικών Φαρμάκων (σελίδα 12)
 - 1.4. Τα πλεονεκτήματα της βιοαποδόμησης (σελίδα 14)
 - 1.5. Τα μειονεκτήματα της βιοαποδόμησης (σελίδα 16)
 - 1.6. Ενζυμα που παράγουν οι μικροοργανισμοί στο έδαφος (σελίδα 17)
 - 1.7.Γλυκοσιδάσες (σελίδα 20)
 - 1.8. Γεωργικά φάρμακα και η επίδραση τους στο Περιβάλλον. (σελίδα 22)
 - 1.8.1. Chlorpyrifos (σελίδα 22)
 - 1.8.2. Isoproturon (σελίδα 29)
 - 1.8.3 Tebuconazole (σελίδα 31)
 - 1.9 Σκοπός της παρούσας μελέτης (σελίδα 33)
- 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ (σελίδα 34)
 - 2.2 Πειραματικός σχεδιασμός (σελίδα 35)
 - 2.3. Προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου β- γλυκοσιδάσης σε εδαφικά δείγματα. (σελίδα 37)
- 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (σελίδα 38)
- 4.Συμπεράσματα και συζήτηση (σελίδα 43)
- 5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (σελίδα 46)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων είναι η διαδικασία κατά την οποία οι μικροοργανισμοί διασπούν τα γεωργικά φάρμακα σε απλούστερες και λιγότερο τοξικές ουσίες και αποτελεί μια σημαντική διεργασία στην εξυγίανση επιβαρυσμένων περιβαλλόντων με γεωργικά φάρμακα. Οι μικροοργανισμοί διαθέτουν αρκετά ένζυμα εσω και έξω κυτταρικά με τα οποία έχουν την ικανότητα να διασπούν σύνθετες και έμμονες ενώσεις στο έδαφος. Οι γλυκοσιδάσες (α-γλυκοσιδάση και β-γλυκοσιδάση) είναι κάποια από τα ένζυμα που διαθέτουν οι μικροοργανισμοί και παίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα καθώς έχει δειχτεί ότι διασπούν οργανικά υπολείμματα παράγοντας γλυκόζη, που αποτελεί πηγή ενέργειας γι αυτούς.

Τα γεωργικά φάρμακα chloropyrifos (CHL), isoproturon (IPU) και tebuconazole (TBZ) είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα στην καλλιέργεια των σιτηρών με αρκετή υπολειμματική δράση. Τα παραπάνω φάρμακα χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μικροκόσμων για την μελέτη της επίδρασης τους στη δράση του ενζύμου β-γλυκοσιδάση. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά εδάφη (Σουηδία, Κροατία και Ελλάδα) για την μελέτη της επίδρασης της διαφορετικής μικροβιακής κοινότητας στην δράση του ενζύμου της β γλυκοσιδάσης στο, λόγω τις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η μελέτη έδειξε ότι την μεγαλύτερη αρνητική επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στη δράση της β γλυκοσιδάσης σε όλα τα εδάφη της μελέτης ήταν από το TBZ < CHL < IPU, ενώ κανένα από τα γεωργικά φάρμακα δεν προκάλεσε μόνιμη επίδραση (αρνητική ή θετική) στην δραστηριότητα του ενζύμου.

Abstract

Biodegradation of pesticides is the process by which microorganisms break down pesticides into more simple and less toxic substances and is an important process in the remediation of pesticide-laden environments.

Micro-organisms possess several intracellular and extracellular enzymes with which they have the ability to break down complex and persistent compounds in the soil (α -glucosidase and β -glucosidase) are some of the enzymes possessed by microorganisms and play an important role in the carbon cycle as they have been shown to break down organic residues producing glucose, which is a source of energy them.

The agriculture drugs chlorpyrifos (CHL), isoproturon (IPI) , and tebuconazole (TBZ) are widely used in the cultivation of cereals with enough residual action .

The above drugs were used in microcosm experiments to study their effect on the activity of the β -glucosidase enzyme.

Also, three different soils (Sweden, Croatia and Greece) were used to study the effect of the different microbial community of the β -glucosidase enzyme activity due to the different environmental conditions.

The study showed that the greatest negative effect of agricultural drugs on β -glucosidase activity in all soils of the study was from TBZ<CHL<IPI-I, while none of the agricultural drugs caused a permanent effect (negative or positive) on the activity of the enzyme.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Αλληλεπιδράσεις γεωργικών φαρμάκων με μικροοργανισμούς στο έδαφος .

1.1 Βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων

Η ποιότητα ζωής πάνω στη γη είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ποιότητα του περιβάλλοντος. Το πρόβλημα της προστασίας του περιβάλλοντος έχει παγκόσμια διάσταση και αποτελεί ένα από τα μεγάλα προβλήματα της εποχής μας. Συχνά οι ενέργειες του ανθρώπου έχουν είτε άμεσα είτε έμμεσα κάποιο αντίκτυπο στο φυσικό χώρο που τον περιβάλλει. Στις μέρες μας όμως η υποβάθμιση και καταστροφή του περιβάλλοντος αποτελούν σημαντικό πρόβλημα και αυτό διότι η φύση έχει τα όρια της. Οι συνεχείς παρεμβάσεις του ανθρώπου στο περιβάλλον η εντατική εξόρυξη και εκμετάλλευση του φυσικού πλούτου, η εντατική χρήση των γεωργικών φαρμάκων στη αγροτική παραγωγή, οδηγούν μεσοπρόθεσμα ή μακροπρόθεσμα σε μη αντιστρεπτές συνέπειες υποβάθμισης του περιβάλλοντος στο οποίο ζει, όπως για παράδειγμα το πόσιμο νερό, οι καλλιεργήσιμες εκτάσεις, τα ζώα και τα φυτά. Σημαντικό ρόλο επίσης διαδραματίζει και η κλιματική αλλαγή στον πρωτογενή τομέα παραγωγής και στην διατροφική αλυσίδα του ανθρώπου, με αποτέλεσμα να απειλείται και η υγεία του (WHO, 2020).

Η συνειδητοποίηση των παραπάνω κινδύνων συντελέστηκε με αργό ρυθμό και μόνο τις τελευταίες τρεις δεκαετίες προκαλεί σημαντικές ανησυχίες και καταβάλλονται σοβαρές προσπάθειες για τη βελτίωση και προστασία του περιβάλλοντος (Ortiz-Hernández et al., 2013). Λόγω των προβλημάτων που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι σημαντική η ανάπτυξη τεχνολογιών περιβαλλοντικής αποκατάστασης ή διαχείρισης των αποβλήτων που να μπορούν να εγγυούνται την εξάλειψή τους με ασφαλή, αποτελεσματικό και οικονομικό τρόπο. Οι φυσικοχημικές μέθοδοι για την απομάκρυνση των γεωργικών φαρμάκων από το έδαφος, όπως η χημική επεξεργασία, η εξάτμιση, η προσρόφηση, η αποτέφρωση κ.α. αποτελούν ακριβές και σε ορισμένες περιπτώσεις μη αποτελεσματικές

για την εξυγίανση του περιβάλλοντος από τα γεωργικά φάρμακα, λόγω των παραπροϊόντων που δημιουργούνται κατά την διαδικασία εφαρμογής τους (Nyakundi et al. 2011).

Μια μέθοδος πολλά υποσχόμενη για την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων είναι η βιοαποδόμηση. Με τον όρο βιοαποδόμηση ή μικροβιακή αποδόμηση (biodegradation ή biotransformation) όπως αναφέρθηκε ο όρος και παραπάνω, είναι η διάσπαση των οργανικών ουσιών σε μικρότερα μόρια μέσω της δράσης ενζύμων (in vitro ή in vivo) που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς. Η μετατροπή αυτή των ουσιών βασίζεται σε μεταβολικές ή ενζυματικές διαδικασίες. Κατά τη βιοαποδόμηση σύνθετα οργανικά μόρια μετατρέπονται σε πιο απλά ή τοξικές ουσίες σε λιγότερο ή μη-τοξικές. Η αποδόμηση της οργανικής ύλης λαμβάνει χώρα είτε υπό αερόβιες συνθήκες (παρουσίας οξυγόνου) ή αναερόβιες συνθήκες (απουσίας οξυγόνου) και απαντάται ως όρος τόσο στην οικολογία και τη διαχείριση αποβλήτων καθώς και την περιβαλλοντική αποκατάσταση (Cycosi & Piotrowska-Seget, 2016).

Η βιοαποδόμηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τους σκοπούς της αξιολόγησης της επικινδυνότητας μιας ουσίας, στις ακόλουθες κατηγορίες (Ortiz-Hernández et al., 2013):

1. Πρωτογενής. Μεταβολή της χημικής δομής μιας ουσίας με αποτέλεσμα την απώλεια μιας συγκεκριμένης ιδιότητας αυτής της ουσίας.

2. Περιβαλλοντικά αποδεκτό. Βιοαποδόμηση σε τέτοιο βαθμό ώστε να αφαιρεθούν οι ανεπιθύμητες ιδιότητες της ένωσης. Αυτή η αλλαγή συχνά αντιστοιχεί σε πρωτογενή βιοαποδόμηση, αλλά εξαρτάται από τις συνθήκες υπό τις οποίες τα προϊόντα απορρίπτονται στο περιβάλλον.

3. Απόλυτο. Πλήρης διάσπαση μιας ένωσης σε πλήρως οξειδωμένα απλά μόρια (όπως διοξείδιο του άνθρακα/μεθάνιο, νιτρικό/αμμώνιο και νερό). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα μεταβολισμού μιας ουσίας, μπορεί να είναι πιο επιβλαβή ή και πιο τοξικά, από την μητρική ουσία που αποδομείται.

Η μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον και ιδιαίτερα σε επιβαρυμμένες καλλιεργήσιμες εκτάσεις με αυτά, είναι μια σημαντική μέθοδος για την απομάκρυνση αυτών των ενώσεων. Η βιοαποδόμηση αυτών των ενώσεων είναι συχνά πολύπλοκη και περιλαμβάνει αρκετά βιοχημικά μονοπάτια και αντιδράσεις. Αν και πολλά ένζυμα που καταλύουν αποτελεσματικά τη διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων και παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοδιάσπαση, η πλήρης κατανόησή της διαδικασίας

απαιτεί νέες έρευνες. Αρκετές μελέτες βιοαποδόμησης έχουν δείξει μόνο το συνολικό ποσοστό διάσπασης των γεωργικών φαρμάκων, αλλά δεν έχουν ερευνήσει σε βάθος τα νέα μεταβολικά προϊόντα και την τύχη τους στο περιβάλλον. (Sun et al. 2010). Με γνώση των διαδικασιών της βιοαποδόμησης, είναι δυνατή η εφαρμογή της μεθόδου για τη βελτίωση της βιοαποκατάστασης περιοχών που έχουν μολυνθεί με γεωργικά φάρμακα. Η βιοαποκατάσταση επιτρέπει την καταστροφή πολλών οργανικών ρύπων με μειωμένο κόστος και τα τελευταία χρόνια, η τεχνολογία βιοαποδόμησης έχει προχωρήσει για την αποδόμηση ενός ευρέος φάσματος ρυπογόνων ενώσεων. (Ortiz-Hernández et al., 2013). Τις προηγούμενες δεκαετίες οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν το έδαφος σαν ένα εύκολο και κατάλληλο μέσο απόρριψης διαφόρων επικίνδυνων ουσιών και μόνο τα τελευταία χρόνια έγινε αντιληπτό ότι οι ουσίες αυτές εύκολα μπορούν να δημιουργήσουν σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα καθώς μπορούν να εκπλυθούν σε επιφανειακά και υπόγεια υδροφόρα συστήματα, στην ατμόσφαιρα και μέσω της τροφικής αλυσίδας, στον άνθρωπο. Τα πιο συχνά απαντώμενα τοξικά στο έδαφος είναι τα βαρέα μέταλλα, οργανικά χημικά, εκρηκτικά, πετρελαιοειδή και πίσσες, ραδιενεργά υλικά και τα υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων. Οι ουσίες αυτές προέρχονται είτε από σκόπιμη ρίψη τους στο έδαφος είτε από διαρροή τους από τα εργοστάσια παραγωγής τους λόγω λάθους ή κακής τους διαχείρισης από τον άνθρωπο (Silva et al., 2019). Η παρουσία γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος κυρίως οφείλεται στην απευθείας εφαρμογή τους σε αυτό (π.χ. ψεκασμοί εδάφους, ριζοπότισμα, εφαρμογή κοκκωδώνσκειυσμάτων, επενδυτικά σπόρων), αλλά και στην έμμεση απόθεση σημαντικού ποσοστού της αρχικής συγκέντρωσης κατά την διαδικασία πλυσίματος των ψεκαστικών μηχανημάτων ανάμεσα από τους ψεκασμούς.

1.2 Μικροβιακή διάσπαση γεωργικών φαρμάκων

Η μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων μπορεί να γίνει τόσο από μύκητες όσο και βακτήρια που παράγουν ένζυμα είτε έξω είτε ένδο κυτταρικά. Ενώ παράγοντες όπως το οξυγόνο, η θερμοκρασία, η υγρασία του εδάφους, το pH του εδάφους και η πορώδης δομή του εδάφους επηρεάζουν τη μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών

φαρμάκων αλλά και την δραστικότητα των ενζύμων που παράγουν. Για παράδειγμα, η εναντιοεκλεκτική αποδόμηση του benalaxyl επηρεάζεται κυρίως από το pH, με τη μεγαλύτερη διάσπαση να παρατηρείται σε εδάφη με υψηλότερες τιμές pH (Tudi et al., 2021).

Η βιοαποδόμηση είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει την πλήρη διάσπαση μιας οργανικής ένωσης στα ανόργανα συστατικά της. Ο μικροβιακός μετασχηματισμός μπορεί να οφείλεται σε ενεργειακές ανάγκες ή από την ανάγκη αποτοξίνωσης των ρύπων ή μπορεί να είναι τυχαίος στη φύση του (συν-μεταβολισμός) (Becker & Seagren, 2010). Η αναζήτηση μικροοργανισμών που αποδομούν τους ρύπους, η κατανόηση της γενετικής και βιοχημείας τους και η ανάπτυξη μεθόδων για την εφαρμογή τους στο πεδίο έχουν ανοίξει νέους δρόμους για την έρευνα προς αυτό το μέρος.

Η πανταχού παρούσα φύση των μικροοργανισμών σε όλα τα περιβάλλοντα, ο αριθμός τους και η μεγάλη βιομάζα τους σε σχέση με άλλους ζωντανούς οργανισμούς, οι διαφορετικοί καταλυτικοί μηχανισμοί τους και η ικανότητά τους να λειτουργούν ακόμη και απουσία οξυγόνου και άλλες ακραίες συνθήκες είναι μερικά από τα σημαντικά πλεονεκτήματα που έχουν για τη χρήση τους στην αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων (Megharaj et al., 2011).

Πολλές πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει τις δυσμενείς επιπτώσεις των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και στην αναπνοή του εδάφους. Γενικά, η μείωση της αναπνοής του εδάφους αντανακλά τη μείωση της μικροβιακής βιομάζας. Ορισμένες μικροβιακές ομάδες είναι σε θέση να χρησιμοποιούν τα γεωργικά φάρμακα ως πηγή ενέργειας και θρεπτικών συστατικών για τον πολλαπλασιασμό τους, ενώ τα εν λόγω φάρμακα μπορεί να είναι τοξικά για άλλους οργανισμούς. Ομοίως, μερικές φορές η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων μειώνει τη μικροβιακή ποικιλότητα αλλά αυξάνει τη λειτουργική ποικιλομορφία των μικροβιακών κοινοτήτων.

Η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων μπορεί επίσης να αναστείλει ή να σκοτώσει ορισμένες ομάδες μικροοργανισμών και να ξεπεράσει τον αριθμό άλλων ομάδων μειώνοντας τον ανταγωνισμό (Hussain et al., 2009). Μεταξύ των μικροβιακών κοινοτήτων, τα βακτήρια, οι μύκητες και οι ακτινομύκητες είναι οι κύριοι αποδομητές

των γεωργικών φαρμάκων (Briceño et al., 2007). Οι μύκητες έχουν την ικανότητα να βιοαποδομούν τα γεωργικά φάρμακα και σε άλλες ξενοβιοτικές ουσίες επιφέροντας, μέσω του μεγάλου ενζυμικού οπλοστασίου που διαθέτουν, μικρές ή δομικές αλλαγές στο μόριο των ουσιών, καθιστώντας τις εμείς ή λιγότερο τοξικές. Το νέο μεταβολικό προϊόν του αρχικού γεωργικού φαρμάκου απελευθερώνεται στη συνέχεια στο περιβάλλον, όπου είναι επιρρεπές σε περαιτέρω αποδόμηση από βακτήρια (Diez, 2010). Η μικροβιακή αποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών θεωρείται ως μια από τις σημαντικότερες οδούς απομάκρυνσης τους από το περιβάλλον. Τα είδη των ουσιών ποικίλει από υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Polychlorinateddiphenyls- PCBs), πολυαρωματικούς υδρογονθράκες (PolyaromaticHydrocarbons- PaHs), μέταλλα έως και φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Diaz, 2008).

Το φαινόμενο της αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων από μικροοργανισμούς του εδάφους έχει αναφερθεί από μεγάλο αριθμό ερευνητών (Karpouzas et al., 2005; Singh&Walker, 2006). Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν διάφορες ομάδες μικροοργανισμών όπως μύκητες, βακτήρια και φύκη, με την επίδραση των βακτηρίων στη μικροβιακή αποδόμηση να είναι κυρίαρχη. Διάφορα βακτηριακά στελέχη που ανήκουν μεταξύ άλλων στα γένη *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sphingomonas* έχουν βρεθεί ότι είναι ικανά να γεωργικά φάρμακα που εφαρμόζονται στο έδαφος (Cyscoń & Piotrowska-Seget, 2016).

Η μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος οφείλεται είτε στη δράση ενός μικροοργανισμού ή συχνότερα πραγματοποιείται από ομάδες μικροοργανισμών (consortia). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου, οι μικροοργανισμοί του εδάφους ή τα καταβολικά ένζυμα που παράγουν πρέπει να έρθουν σε επαφή με την ουσία και στη συνέχεια αυτή ή τα προϊόντα του μεταβολισμού της να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου (Wojcik et al., 2020). Η βιοαποδόμηση χαρακτηρίζεται ως μια πολύπλοκη αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων, η οποία συχνά διαφοροποιείται ανάλογα με τον μικροοργανισμό- αποδομητή. Το μονοπάτι βιοαποδόμησης κάθε ουσίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ενζυμικό

σύστημα το οποίο καταλύει τις συγκεκριμένες αντιδράσεις. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τις οργανικές ενώσεις ως υποστρώματα ανάπτυξής τους και κάποιες φορές παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τη θέση διάσπασης του μορίου της χημικής ένωσης, ενώ υπάρχουν και μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αποδομούν ενώσεις διαφόρων κατηγοριών.

Το φαινόμενο της μικροβιακής αποδόμησης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Οι σπουδαιότεροι παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών και, κατ' επέκταση, στη μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων είναι η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH, το οξυγόνο, και η περιεκτικότητα σε οργανική ουσία του εδάφους. Εκτός από τους εδαφικούς αυτούς παράγοντες, έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν την εμφάνιση και την ένταση του φαινομένου η χημική σύσταση και η συγκέντρωση της ουσίας που εφαρμόζεται, καθώς επίσης, και η συχνότητα των εφαρμογών (Chowdjury et al., 2008; Wołejko, et al., 2020).

Οι μύκητες και τα βακτήρια θεωρούνται ικανότατοι μικροοργανισμοί για την βιοαποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών στο έδαφος, λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα. Επιπλέον, η ικανότητα των μυκήτων να σχηματίζουν εκτεταμένα μυκηλιακά δίκτυα, η χαμηλή εξειδίκευση των καταβολικών ενζύμων τους και η ανεξαρτησία τους από οργανικές χημικές ουσίες ως υπόστρωμα ανάπτυξης καθιστούν τους μύκητες κατάλληλους για διαδικασίες βιοαποκατάστασης (Harms et al., 2012). Οι μύκητες παίζουν σημαντικό ρόλο στους βιογεωχημικούς κύκλους και είναι υπεύθυνοι για το μεγαλύτερο μέρος της υποβάθμισης των περιβαλλοντικών ξενοβιοτικών ουσιών στη βιόσφαιρα.

1.3. Μεταβολισμός Γεωργικών Φαρμάκων

Ο μεταβολισμός των γεωργικών φαρμάκων μπορεί να περιλαμβάνει μια διαδικασία τριών φάσεων. Στο μεταβολισμό της Φάσης Ι, οι αρχικές ιδιότητες μιας μητρικής ένωσης μετασχηματίζονται μέσω οξείδωσης, αναγωγής ή υδρόλυσης για να παραχθεί γενικά ένα πιο υδατοδιαλυτό και συνήθως λιγότερο τοξικό προϊόν από το μητρικό προϊόν. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει τη σύζευξη ενός γεωργικού φαρμάκου ή ενός μεταβολίτη

φαρμάκου με ένα σάκχαρο ή αμινοξύ, το οποίο αυξάνει τη διαλυτότητα στο νερό και μειώνει την τοξικότητα σε σύγκριση με το μητρικό γεωργικό φάρμακο. Η τρίτη φάση περιλαμβάνει είτε τη μετατροπή των μεταβολιτών της Φάσης II σε δευτερογενή συζυγή, τα οποία στις περισσότερες περιπτώσεις είναι επίσης μη τοξικά είτε στον πλήρη μεταβολισμό τους σε CO₂ και νερό. Οι μύκητες και τα βακτήρια εμπλέκονται σε αυτές τις διεργασίες και παράγουν ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά ένζυμα συμπεριλαμβανομένων υδρολυτικών ενζύμων, υπεροξειδασών, οξυγενασών κ.λπ. (Ortiz-Hernández et al. 2011).

Η ταχύτητα μικροβιακής αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος επηρεάζεται από πολυάριθμες και πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ μικροοργανισμών, γεωργικών φαρμάκων, εδαφικών και κλιματικών παραγόντων (Chowdjury et al., 2008). Παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH, και η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία επηρεάζουν άμεσα το ρυθμό της μικροβιακής αποδόμησης εξαιτίας της επίδρασης που ασκούν στη σύνθεση και τη δραστηριότητα του μικροβιακού πληθυσμού. Το έδαφος είναι αναμφίβολα ένα σύνθετο υπόστρωμα στο οποίο χαρακτηριστικά όπως το pH, η οργανική ουσία, η δομή και η θρεπτική κατάσταση αποτελούν σημαντικές μεταβλητές. Μεταβολή σε ένα από τα χαρακτηριστικά του εδάφους μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη διαδικασία της αποδόμησης. Από τα εδαφικά χαρακτηριστικά, το pH και η περιεκτικότητα σε οργανική ουσία αποτελούν τους πιο καθοριστικούς παράγοντες της μικροβιακής αποδόμησης. Διάφοροι ερευνητές έχουν αναφερθεί στην επίδραση του εδαφικού pH στην μικροβιακή αποδόμηση. Το pH του εδάφους μπορεί να καθορίσει τα είδη των μικροοργανισμών που θα αναπτυχθούν και τη σχετική αφθονία των πληθυσμών τους. Γενικά, έχει διαπιστωθεί ότι τα περισσότερα είδη μυκήτων εδάφους αναπτύσσονται καλύτερα σε ελαφρώς όξινα έως ουδέτερα εδάφη, ενώ τα βακτήρια ευνοούνται και επικρατούν σε ουδέτερα και αλκαλικά εδάφη. Επίσης, το pH μπορεί να επιδράσει στην προσρόφηση των γεωργικών φαρμάκων από τα κολλοειδή του εδάφους και στη χημική διάσπασή τους και συνεπώς, έμμεσα, να επηρεάσει τη βιοδιαθεσιμότητά τους (Gianfreda & Rao, 2010; Verma et al., 2014).

Ο ρόλος της οργανικής ουσίας του εδάφους στη μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων είναι διττός. Το μέγεθος και η δραστηριότητα της μικροχλωρίδας του εδάφους είναι συχνά υψηλότερα σε εδάφη με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε οργανική ουσία. Γενικά, εδάφη με υψηλή περιεκτικότητα οργανικής ουσίας χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη μικροβιακή δραστηριότητα και υψηλότερη ταχύτητα μικροβιακής αποδόμησης κυρίως λόγω συμμεταβολισμού. Η αυξημένη, όμως, περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία συνεπάγεται και με την αύξηση της προσρόφησης των περισσότερων γεωργικών φαρμάκων από το έδαφος, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαθεσιμότητάς τους για αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς του εδάφους (Ortiz-Hernández et al., 2013).

Τα τελευταία χρόνια, η εντατική αναζήτηση νέων βιώσιμων τρόπων απορρύπανσης περιβαλλόντων επιβαρυνμένων από φυτοπροστατευτικά προϊόντα έχει εντείνει την έρευνα για τη βιοαποδόμηση. Αυτή η μοναδική ικανότητα των μικροοργανισμών να αποδομούν ρύπους έχει μελετηθεί εντατικά σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο, παρέχοντας εξαιρετικά λεπτομερείς και σημαντικές πληροφορίες για τις οδούς βιοαποικοδόμησης κάθε ουσίας και την ικανότητα των μικροοργανισμών να προσαρμόζονται στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (Díaz, 2008; Silva et al., 2019). Για παράδειγμα στην μελέτη των Silva et al., (2019), η κατανομή 76 καταλοίπων φυτοφαρμάκων αξιολογήθηκε σε 317 δείγματα γεωργικών προϊόντων από ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Ένωση. Τα εδάφη συλλέχθηκαν το 2015 και προέρχονταν από 11 κράτη μέλη της ΕΕ και 6 κύρια συστήματα καλλιέργειας. Πάνω από το 80% των ελεγμένων εδαφών περιείχε υπολείμματα φυτοφαρμάκων (το 25% των δειγμάτων είχε 1 κατάλοιπο, το 58% των δειγμάτων είχε μείγματα δύο ή περισσότερων καταλοίπων), σε συνολικά 166 διαφορετικούς συνδυασμούς γεωργικών φαρμάκων.

1.4. Τα πλεονεκτήματα της βιοαποδόμησης

Οι μικροοργανισμοί είναι ευρέως κατανεμημένοι στη βιόσφαιρα επειδή η μεταβολική τους ικανότητα είναι ευρεία και μπορούν εύκολα να αναπτυχθούν σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Η διατροφική ευελιξία των μικροοργανισμών μπορεί επίσης να αξιοποιηθεί για τη βιοαποδόμηση των ρύπων, χρησιμοποιώντας έτσι την ικανότητα ορισμένων μικροοργανισμών να μετατρέπουν, να τροποποιούν και να χρησιμοποιούν τοξικούς ρύπους προκειμένου να λάβουν παραγωγή ενέργειας και βιομάζας στη διαδικασία (Tangetal., 2007). Αντί απλώς να συλλέγει τον ρύπο και να τον αποθηκεύει, η βιοαποδόμηση είναι μια μικροβιολογική μέθοδος καλά μελετημένη που εφαρμόζεται για τη διάσπαση ή τη μετατροπή των ρύπων σε λιγότερο τοξικές ή μη τοξικές και σύνθετες μορφές. Οι βιοαποδόμηση είναι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο αυτή προκειμένου να καθαριστούν επιβαρυμένα περιβάλλοντα με οργανικές ουσίες. Μερικά από τα πλεονεκτήματα της βιοαποδόμησης είναι ότι είναι μια φυσική διαδικασία, απαιτεί λίγο χρόνο και αποτελεί μια αποδεκτή διαδικασία επεξεργασίας απορριμμάτων για υλικά που έχουν μολυνθεί όπως το έδαφος. Τα μικρόβια είναι ικανά να υποβαθμίσουν τη ρύπανση και να αυξάνονται σε αριθμό όταν υπάρχει η ρύπανση. Όταν ο ρύπος αποδομείται, ο βιοαποδομήσιμος πληθυσμός συνήθως μειώνεται. Τα υπολείμματα από την επεξεργασία των ξενοβιοτικών ουσιών κατά την βιοαποδόμηση, είναι συνήθως ακίνδυνα προϊόντα, συμπεριλαμβανομένου του διοξειδίου του άνθρακα και της κυτταρικής βιομάζας. Απαιτεί πολύ λιγότερη προσπάθεια και μπορεί συχνά να πραγματοποιηθεί επιτόπου, χωρίς να προκαλείται σημαντική διακοπή των κανονικών δραστηριοτήτων. Αυτό εξαλείφει επίσης την ανάγκη μεταφοράς ποσοτήτων απορριμμάτων εκτός του επιβαρυμένου σημείου και τις πιθανές απειλές για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον που μπορεί να προκύψουν κατά τη μεταφορά τους. Εφαρμόζεται σε μια οικονομικά αποδοτική διαδικασία καθώς έχει λιγότερες απώλειες από τις άλλες συμβατικές μεθόδους (τεχνολογίες) που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των επικίνδυνων αποβλήτων (Montagnollietal., 2015). Με τον όρο λιγότερες απώλειες εννοούμε ότι η συγκεκριμένη μέθοδος με τους μικροοργανισμούς είναι πιο αποτελεσματική και αποφεύγει τα προβλήματα και τα

παραπροϊόντα που θα προέκυπταν από άλλες τεχνολογίες . Δηλαδή όχι μόνο από οικονομικής άποψης αλλά η αποδοτικότητα μπορεί να έχει και έμμεσο όφελος και στο κόστος. Τέλος, η βιοαποδόμηση μπορεί να βοηθήσει επίσης στην πλήρη απομάκρυνση των ρύπων και πολλές από τις επικίνδυνες ενώσεις μπορούν να μετατραπούν σε λιγότερο τοξικά προϊόντα, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα μελλοντικής ευθύνης ρύπανσης του περιβάλλοντος από μια εταιρεία, που σχετίζεται με την επεξεργασία και την απόρριψη μολυσματικού υλικού. Επιπλέον, στη μέθοδο της βιοαποδόμησης δεν χρησιμοποιούνται επικίνδυνα χημικά αλλά θρεπτικά συστατικά, όπως για παράδειγμα ειδικά λιπάσματα που προστίθενται για να κάνουν ενεργή και γρήγορη την μικροβιακή ανάπτυξη.

Είναι φιλική διαδικασία προς το περιβάλλον και βιώσιμη (Dell'Annoetal., 2012) και οι ρύποι μεταβολίζονται πλήρως, δεν μεταφέρονται απλώς σε διαφορετικά περιβαλλοντικά μέσα και παρέχει σχετική ευκολία υλοποίησης (Kumaretal., 2011).

1.5. Τα μειονεκτήματα της βιοαποδόμησης

Ός ένα από τα βασικότερα μειονεκτήματα της βιοαποδόμησης είναι ότι περιορίζεται η εφαρμογή της μόνο σε εκείνες τις ενώσεις που είναι βιοαποδομήσιμες και αυτό διότι δεν είναι όλες οι ενώσεις ευαίσθητες σε ταχεία και πλήρη αποδόμηση.Υπάρχουν ορισμένες περιπτώσεις που έχει δειχτεί ότι τα προϊόντα βιοαποδόμησης μπορεί να είναι πιο ανθεκτικά ή τοξικά από τη μητρική ένωση και οι βιολογικές διεργασίες είναι συχνά πολύ συγκεκριμένες για να επιτευχθεί ο πλήρης μεταβολισμός μια ένωσης.

Για την επιτυχία μιας διαδικασίας καθαρισμού ή αποδόμησης ρύπων με τη χρήση μικροοργανισμών, είναι απαραίτητοι τρεις βασικοί παράγοντες:

1. Η παρουσία μικροοργανισμών που είναι ικανοί να διασπούν τις ουσίες.
2. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες που υποστηρίζουν την ανάπτυξή τους.
3. Τα κατάλληλα επίπεδα θρεπτικών ουσιών και ρύπων για να λειτουργήσει σωστά η διαδικασία.

Αυτοί οι παράγοντες καθορίζουν την επιτυχία της μεθόδου σε διαφορετικές τοποθεσίες.

Απαιτείται έρευνα για την ανάπτυξη μεθόδων βιοαπορρύπανσης που να είναι κατάλληλες για περιβάλλοντα με πολύπλοκα μείγματα ρύπων που δεν είναι ομοιόμορφα διασκορπισμένα στο περιβάλλον.. Συχνά η βιοαποδόμηση μπορεί να χρειαστεί περισσότερος χρόνος για την επεξεργασία των ρυπασμένων σημείων, ιδιαίτερα εάν υπάρχουν έμμονες χημικές ενώσεις, από άλλες μεθόδους επεξεργασίας, με αποτέλεσμα να χρειαστεί η εκσκαφή και η απομάκρυνση μέρος του επιβαρυμένου εδάφους ή η και η αποτέφρωση του. Παραμένει επίσης, ένα καθοριστικό μειονέκτημα η αβεβαιότητα σχετικά με τα αποδεκτά κριτήρια απόδοσης για την αποδόμηση των ξενοβιοτικών ουσιών αλλά και η αξιολόγηση της απόδοσης της είναι δύσκολη.

Ένα από τα βασικότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι τα βαρέα μέταλλα δεν μπορούν να διασπαστούν βιολογικά αλλά μόνο μετασχηματίζονται από μια κατάσταση οξείδωσης ή οργανικό σύμπλεγμα σε μια άλλη. Επιπλέον, τα βακτήρια είναι επίσης αποτελεσματικά στη βιοαπορρύπανση των βαρέων μετάλλων. Οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει τις δυνατότητες να προστατεύονται από την τοξικότητα των βαρέων μετάλλων με διάφορους μηχανισμούς, όπως η προσρόφηση, η πρόσληψη, η μεθυλίωση, η οξείδωση και η αναγωγή. Η πρόσληψη βαρέων μετάλλων από τους μικροοργανισμούς επιτυγχάνεται είτε ενεργά (βιοσυσσώρευση) ή/και παθητικά (προσρόφηση), ενώ η μικροβιακή μεθυλίωση παίζει σημαντικό ρόλο στη βιοαποδόμηση των βαρέων μετάλλων, επειδή οι μεθυλιωμένες ενώσεις είναι συχνά πτητικές. Για παράδειγμα, ο υδράργυρος, το Hg (II) μπορεί να μεθυλιωθεί από διάφορα βακτηριακά είδη όπως για παράδειγμα τα *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp., *P. Aeruginosa* και *Brevibacterium iodinium*, σε αέριο μεθυλιδράργυρο (Abatenhetal.,2017).

1.6 Ενζυμα που παράγουν οι μικροοργανισμοί στο έδαφος

Η ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος πραγματοποιείται μέσω σειράς βιοχημικών αντιδράσεων, οι οποίες πραγματοποιούνται από μικροοργανισμούς και εδαφικά ζώα. Όλες αυτές οι βιοχημικές αντιδράσεις καταλύονται από ένζυμα, δηλαδή πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να διαδραματίζουν ρόλο καταλύτη σ' αυτές τις

διαδικασίες. Η πρώτη αναφορά για την ύπαρξη οξειδωτικού ενζύμου στο έδαφος(υπεροξειδάση) έγινε πριν από 100 χρόνια. Ωστόσο, έως το 1950 η πρόοδος της ενζυμολογίας υπήρξε πολύ περιορισμένη, αλλά η εξέλιξη που πραγματοποιήθηκε στα επόμενα 60 χρόνια ήταν εκθετική, κυρίως διότι υπήρξε ιδιαίτερο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα για τα ένζυμα που συμμετέχουν σε διαδικασίες κομποστοποίησης (Rautetal., 2008), αποδόμησης της λυματολάσπης (Whiteley&Lee, 2006), μετατροπής του φυτικού υλικού σε σάκχαρα που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή βιοαερίου (Wilson, 2009) και τα ένζυμα που δρουν στη διάσπαση οργανικών ρυπαντών, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες.

Η επιτυχής διαχείριση των ενζύμων αποτελεί εργαλείο για την απορρύπανση επιβαρυσμένων εδαφών και ιζημάτων (Moreno-Marotoetal., 2021), καθόσον τα ένζυμα απενεργοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες και σε ακραίες τιμές pH και η δράση τους ελέγχεται από τις παραπάνω περιβαλλοντικές παραμέτρους (Acosta-Martinez&Tabatabai, 2000), καθώς και από την ύπαρξη ουσιών που παρεμποδίζουν ή ενισχύουν τη δράση τους, ενώ, ως πρωτεΐνες, αποδομούνται και από τη δράση των πρωτεασών. Η ενζυμική δραστηριότητα στο έδαφος προέρχεται από τα συσσωρευμένα ένζυμα και απ' αυτά που παράγονται από τους μικροοργανισμούς σε φάση πολλαπλασιασμού. Κύρια πηγή των ενζύμων στο έδαφος είναι η μικροβιακή βιομάζα και δευτερευόντως τα φυτά και τα ζώα. Τα ένζυμα συναντώνται στο έδαφος υπό διάφορες μορφές. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους οι μικροοργανισμοί παράγουν ένζυμα που είτε απελευθερώνονται στο έδαφος, οπότε έχουμε να κάνουμε με τα ελεύθερα ένζυμα ή εξωένζυμα, είτε παραμένουν στο εσωτερικό των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων και ονομάζονται ενδοένζυμα. Τα τελευταία απελευθερώνονται από τα κύτταρα κατά τη φάση της αποσύνθεσής τους. Τέλος, στο έδαφος συναντώνται και τα ένζυμα εκείνα τα οποία βρίσκονται συνδεδεμένα με κυτταρικά συστατικά ή υπολείμματα. Χαρακτηριστικό των ελεύθερων ενζύμων είναι η απορρόφηση και η ακινητοποίησή τους στα οργανικά και ανόργανα συστατικά του εδάφους ή στα πολύπλοκα χουμικά υποστρώματα με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή τους (Das&Varma, 2010). Αυτά που κυρίως συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του

οργανικού υλικού είναι τα εξωένζυμα, και ο ρυθμός παραγωγή τους σχετίζεται άμεσα με τη ροή παροχής θρεπτικών στοιχείων και ενέργειας στο έδαφος, που εξασφαλίζει την παραγωγή τους στα μικροβιακά κύτταρα και καλύπτει τις απαιτήσεις αυτών των κυττάρων. Υπάρχει σχέση κόστους-ωφέλειας ανάμεσα στο κόστος, δηλαδή στον άνθρακα και τα θρεπτικά στοιχεία που θα πρέπει να επενδυθούν από το μικροβιακό κύτταρο στην παραγωγή ενέργειας (ATP), στη σύνθεση και έκκριση ενζύμων (πρωτεΐνες) από τη μία πλευρά, και στο κέρδος από την αυξημένη διαθεσιμότητα των αφομοιώσιμων θρεπτικών στοιχείων, των ενεργειακών πηγών και των οργανικών υλικών χαμηλού μοριακού βάρους από την άλλη πλευρά (Burns et al., 2013).

Σύμφωνα με τους Smith και Charman (2010) για ένα ορισμένο στέλεχος *Escherichia coli*, το κόστος σε ATP για την παραγωγή πρωτεϊνών (συμπεριλαμβανομένων και των ενζύμων) ανά μονάδα βάρους της πρωτεΐνης είναι μικρότερο για την πρωτεΐνη που απελευθερώνεται στο περιβάλλον, συγκρινόμενο μ' αυτό της πρωτεΐνης που θα παραμείνει στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι Schimel και Weintraub (2003) αναφέρουν ότι τα μικρόβια πρέπει να επενδύουν το 2% του αφομοιώσιμου C στην παραγωγή ενζύμων, ώστε να διατηρήσουν τη βιομάζα τους.

Η σύνδεση των ένζυμων με το οργανικό υλικό αλλά και τα σωματίδια της ιλύος έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκων που είναι ανθεκτικά στη βιολογική αποσύνθεση (Das&Varma, 2011). Η παραγωγή αυτών των συμπλόκων οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη ομοιοπολικών δεσμών, καθώς και δεσμών υδρογόνου, μεταξύ ιόντων και λιγότερο στη μηχανική ακινητοποίηση των ενζύμων από τα εδαφικά κολλοειδή. Η σύνδεση μεταξύ οργανικού υλικού και ενζύμου παράγει ποικιλία αντιδράσεων. Για παράδειγμα, οι τανίνες εξασθενούν τη δράση σειράς ένζυμων, γεγονός το οποίο δεν είναι γνωστό αν οφείλεται στη σύνδεσή του με τανίνη ή της τανίνης με το υπόστρωμα. Παρόμοια επίδραση έχουν και τα χουμικά οξέα, τα οποία αποτελούν τα κύρια συστατικά του οργανικού υλικού που αποικοδομείται δυσκολότερα. Μάλιστα, τα χουμικά έχουν πιο έντονη επίδραση στα ένζυμα απ' ό,τι τα φουλβικά οξέα, εξαιτίας του μοριακού τους βάρους και του αρωματικού τους χαρακτήρα. Από την άλλη πλευρά, η παρουσία λιπών έχει τη δική της σημασία, διότι τα λίπη, τα οποία αποτελούν σημαντικό συστατικό των

μεμβρανών και συμμετέχουν σε ποσοστό 5% στο οργανικό υλικό, επηρεάζουν τον προσανατολισμό του ενζύμου έναντι του υποστρώματος, την ίδια στιγμή που το προστατεύουν βλαβερών διαλυτών (Das&Varma, 2010).

Γενικά, η δραστηριότητα των δεσμευμένων ενζύμων μειώνεται και σε ορισμένες περιπτώσεις, αναστέλλεται, με κέρδος την ανθεκτικότητά τους έναντι περιβαλλοντικών καταπονήσεων, όπως, για παράδειγμα, αυτές που προκαλούν οι ακραίες θερμοκρασιακές συνθήκες, για παράδειγμα η δράση των πρωτεασών κλπ. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι, ως απάντηση στην προσθήκη υποστρώματος στο έδαφος, τα ακινητοποιημένα ένζυμα αναλαμβάνουν συνήθως άμεσα τον ρόλο τους ως καταλύτες. Απ' αυτήν την άποψη, τα ακινητοποιημένα, στα εδαφικά οργανικά υπολείμματα ένζυμα υπερέχουν έναντι των εξωενζύμων που εκκρίνουν τα ζωντανά κύτταρα, αφού, για να αναλάβουν δράση τα τελευταία (τα κύτταρα), χρειάζονται χρόνο που διαρκεί από κάποια λεπτά έως μερικές ώρες. Από την οικολογική, σκοπιά, θεωρείται ότι τα ακινητοποιημένα ένζυμα λειτουργούν ως ένα είδος «ενζυμικού περιβλήματος», που περιβάλλει τα μικρόβια. Έχοντας τη δυνατότητα ταχείας απόκρισης στη διαθεσιμότητα του υποστρώματος, αυτά συμβάλλουν άμεσα στον μετασχηματισμό του και τη συνακόλουθη απορρόφησή του από τους οργανισμούς. Επιπρόσθετα, διατυπώνεται και η υπόθεση των πολλαπλασιαστών, που σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, τα ακινητοποιημένα ένζυμα επιτυγχάνουν να αποσπάσουν από τα πολυμερή του εδάφους μοριακά θραύσματα, γνωστά ως επαγωγικά μόρια. Στη συνέχεια, τα επαγωγικά μόρια εισέρχονται σε γειτονικά κύτταρα, όπου και επάγουν τη σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων εξωενζύμων που θα πάρουν μέρος στον μαζικό μετασχηματισμό του διαθέσιμου υποστρώματος (Das&Varma, 2010).

Τα ένζυμα που παράγουν οι μικροοργανισμοί στο έδαφος και έχουν καθοριστικό ρόλο στους γεωχημικούς κύκλους του Άνθρακα (C), του αζώτου (N), του φωσφόρου (P) και του θείου (S) είναι για παράδειγμα η β-γλυκοσιδάση, οι αμινοπεπτιδάσεις Λευκίνης και Αλανίνης, οι Φωσφατάσες και η αρυλσουφατάση, αντίστοιχα.

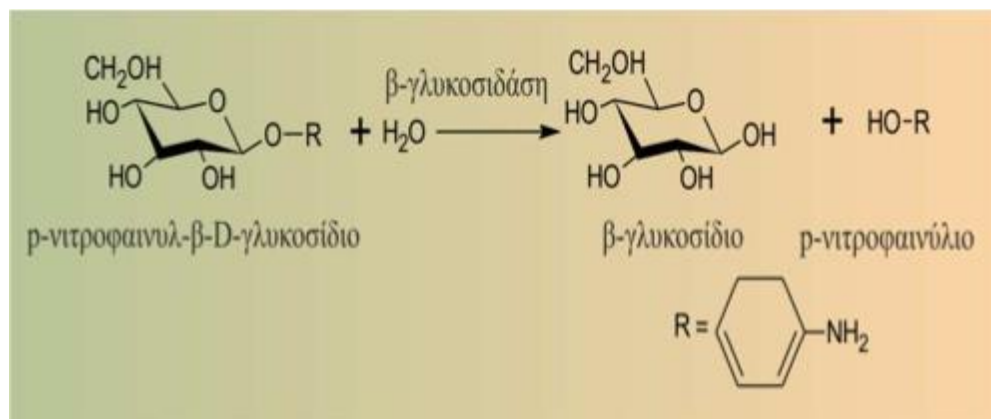
1.7.Γλυκοσιδάσες

Μια μεγάλη κατηγορία εξωκυτταρικών ενζύμων που παράγονται από τους μικροοργανισμούς στο έδαφος, ευθύνονται για την διάσπαση αρκετών οργανικών ενώσεων και παίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα, είναι οι γλυκοσιδάσες. Οι γλυκοσιδάσες αποτελούν σημαντική κατηγορία ενζύμων που ονοματίζονται ανάλογα με το υπόστρωμα που υδρολύουν. Διασπούν οργανικά υπολείμματα παράγοντας γλυκόζη, που αποτελεί πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς. Οι εξωκυτταρικές γλυκοσιδάσες στο έδαφος, που παράγονται από μικροοργανισμούς, δρουν ως κύριοι παράγοντες για την αποσύνθεση του ασταθούς οργανικού άνθρακα του εδάφους (π.χ.κυτταρίνη). Οι εξωκυτταρικές γλυκοσιδάσες του εδάφους επηρεάζονται σημαντικά από τη λίπανση με άζωτο (N).

Οι γλυκοσιδάσες διαχωρίζονται ανάλογα με το είδος που διασπούν έτσι οι α-γλυκοσιδάσες καταλύουν την υδρόλυση α-D-γλυκοκυρανισιδίων ενώ οι β-γλυκοσιδάσες καταλύουν την υδρόλυση β-D-γλυκοκυρανισιδίων και εμπλέκονται στην υδρόλυση της μαλτόζης και κελλοβιόζης αντίστοιχα. Άλλες σημαντικές γλυκοσιδάσες είναι οι α-γαλακτοσιδάσες και β-γαλακτοσιδάσες που καταλύουν την υδρόλυση της μελιβιόζης και λακτόζης αντίστοιχα.

Ανάμεσα στις γλυκοσιδάσες που μπορούν να παράγουν οι μικροοργανισμοί του εδάφους, οι β-γλυκοσιδάσες αποτελούν κύρια ομάδα στο έδαφος (**Εικόνα 1**).

Οι β-γλυκοσιδάσες έχουν συσχετιστεί με ετερότροφους μικροοργανισμούς και κυρίως με μύκητες και ζύμες (Hayano and Tubaki 1985). Παλαιότερες μελέτες έχουν καταδείξει την θετική σημαντική συσχέτιση με τον συνολικό οργανικό και μικροβιακό C του εδάφους (Turner et al.2002). Οι β- γλυκοσιδάσες καταλύουν την υδρόλυση των β-D-γλυκοσιδίων και είναι υπεύθυνες για το τελευταίο και ρυθμοκαθοριστικό βήμα κατάλυσης της κυτταρίνης στο έδαφος. Τα προϊόντα της υδρόλυσης των β-γλυκοσιδίων αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Για όλους τους λόγους παραπάνω η δραστηριότητα τη β-γλυκοσιδάσης έχει προταθεί και ως μέτρο εκτίμησης της βιολογικής ποιότητας του εδάφους (Bandick&Dick, 1999; Yuanetal., 2020).



Εικόνα 1. Η αντίδραση που καταλύει η β-γλυκοσιδάση

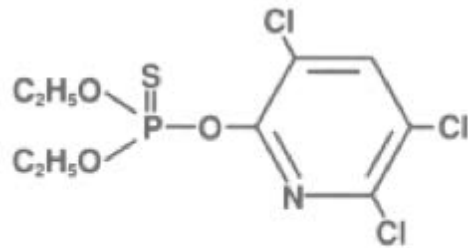
1.8. Γεωργικά φάρμακα και η επίδραση τους στο Περιβάλλον.

1.8.1. Chlorpyrifos

Τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα είναι μια γενική κατηγορία οργανικών ενώσεων εστρίνης που περιέχουν άτομα φωσφόρου με περισσότερους από 150 χημικούς τύπους σε αυτά. Λόγω της ισχυρής εντομοκτόνου δράσης τους και του ευρέος φάσματος εφαρμογής τους, χρησιμοποιούνται ευρέως σε όλο τον κόσμο ως γεωργικά φάρμακα για τον έλεγχο ασθενειών και παρασιτικών εντόμων, με κάποια δραστικές όπως το dichlorvos και το chlorpyrifos να είναι οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενες. Τα γενικά χαρακτηριστικά των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων είναι η υψηλή εντομοκτόνος και ακαρεοκτόνος δράση, το ευρύ φάσμα δράσης, ο σχετικά μεγάλος υπολειμματικός χρόνος και η σχετικά αργή αποδόμηση των μεταβολιτών τους.

Πολλά από αυτά παρουσιάζουν συστηματικές ιδιότητες και έχουν την ικανότητα να εισέρχονται και να κυκλοφορούν στους φυτικούς ιστούς. Η χημική δομή των οργανοφωσφορικών ενώσεων είναι προϊόντα του πεντασθενούς τετραεδρικού φωσφόρου από τις οποίες εκείνες που συνήθως χρησιμοποιούνται στη γεωργία είναι οι εστέρες του φωσφορικού, του φωσφονικού (φωσφορώδους), του θειοφωσφορικού, του θειονοφωσφορικού και του πυροφωσφορικού οξέος. Οι οργανοφωσφορικοί εστέρες με

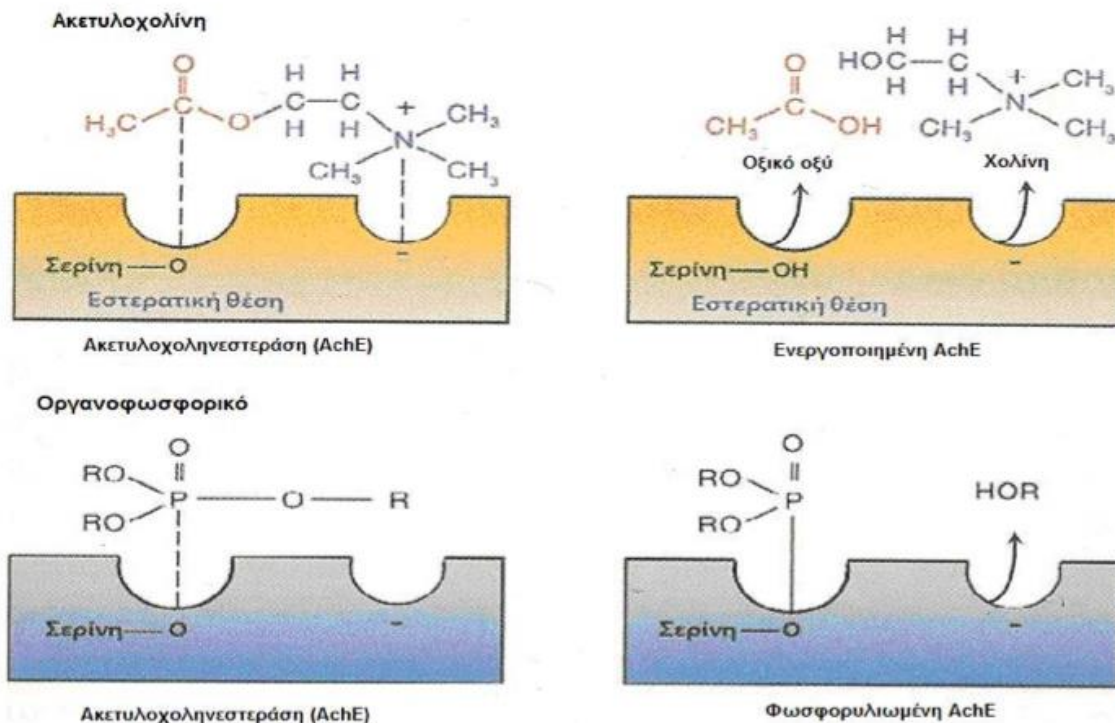
βάση τη χημική δομή ταξινομούνται σε τρεις κύριες υποομάδες τα αλειφατικά παράγωγα, τα αρωματικά και τα ετεροκυκλικά παράγωγα (Huangetal., 2020).



Chlorpyrifos

Εικόνα 2. Χημικής δομή του *Chlorpyrifos*

Το chlorpyrifos, όπως και τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα δρα στο νευρικό σύστημα των εντόμων, αναστέλλοντας τη λειτουργία του, ιδιαίτερα της χολινεργικές συνάψεις, τον νευροδιαβιβαστή της ακετυλοχολίνης. Συγκεκριμένα, ο βιοχημικός μηχανισμός τους στα αρθρόποδα καθώς και στα θηλαστικά είναι η μη αναστρέψιμη η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE, ένας αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης). Για την δράση αυτή, είναι απαραίτητο να υπάρχει ένας δεσμός P=O στο μόριο της ένωσης, ενώ για τα οργανοφωσφορικά φάρμακα όπως το chlorpyrifos και το diazinon, υπάρχει ο δεσμός P=S. Η συγκέντρωση της λειτουργικής ακετυλοχολίνης ελέγχεται άμεσα από την ακετυλοχολινεστεράση, η οποία μετά τη μεταβίβαση του νευρικού σήματος, υδρολύει την ακετυλοχολίνη σε οξικό οξύ και χολίνη που είναι φυσιολογικά αδρανή και έτσι η σύναψη αποφορτίζεται. Όταν όμως εισέλθει στον οργανισμό του εντόμου κάποιος οργανοφωσφορικός εστέρας τότε γίνεται φωσφορυλίωση της χολινεστεράσης, η φωσφορική ομάδα παραμένει προσκολλημένη στο ένζυμο παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του για πολλές ημέρες, με αποτέλεσμα την υπέρμετρη συσσώρευση της ακετυλοχολίνης (Εικόνα 3) (Pateletal, 2019).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης από την ακετυλοχολινεστεράση και του μηχανισμού δράσης των οργανοφωσφορικών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Ο χρόνος ημιζωής του chlorpyrifos στο έδαφος εξαρτάται από τον τύπο του εδάφους καθώς και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις εδαφικές συνθήκες. και κυμαίνεται από 10 έως 120 ημέρες (Singh et al. 2003) και ελάχιστα στα υπόγεια ύδατα. Η αποδόμησή του συμβαίνει μέσω χημικής υδρόλυσης και διεργασιών μικροβιακής αποσύνθεσης, ανάλογα με περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και η περιεκτικότητα σε υγρασία του εδάφους. Ο κύριος μεταβολίτης του, η 3,5,6-τριχλωρο-2-πυριδινόλη (TCP) το οποίο δεν απορροφάται έντονα και παρουσιάζει χημική σταθερότητα και μέτρια κινητικότητα στο έδαφος (Briceño et al., 2012).

Εχει παρατηρηθεί ότι η ρύπανση με chlorpyrifos σε ποτάμια και λίμνες μπορεί να φτάσει και να ξεπεράσει τη συγκέντρωση των 4,3 pg/L, όταν το chlorpyrifos εφαρμόζεται απευθείας σε υδάτινους όγκους για την αντιμετώπιση κουνουπιών ή όταν σημειώνεται απορροή από παρακείμενους αγρούς.

Ωστόσο ακόμα και οι χαμηλές συγκεντρώσεις chlorpyrifos στο υδάτινο περιβάλλον οδηγούν σε ορισμένες τοξικές επιδράσεις στα ψύκια, τα ψάρια, τα μαλακόστρακα και τα οστρακοειδή (Huang et al., 2020). Η συγκέντρωση και η σταθερότητα του chlorpyrifos στα νερά εξαρτάται από τον τύπο του σκευάσματος. Η εξάτμιση είναι η κύρια οδός μείωσης της συγκέντρωσης της ουσίας στο νερό, ενώ η υδρόλυσή της είναι σταθερή σε νερά με όξινο έως ουδέτερο pH και αυξάνεται όταν το pH γίνεται αλκαλικό.

Το chlorpyrifos είναι μέτρια τοξικό στον άνθρωπο. Επηρεάζει το κεντρικό νευρικό σύστημα, το καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό σύστημα. Επιπλέον, ερεθίζει το δέρμα και τα μάτια. Η απορρόφηση μέσω του δέρματος είναι περιορισμένη, ενώ τα συμπτώματα που προκαλούνται στον ανθρώπινο οργανισμό από ουσίες που παρεμποδίζουν την χολινεστεράση είναι μούδιασμα, αίσθημα φασματίας, απροσανατολισμός, πονοκέφαλος, ζάλη, ρίγος, ναυτία, στομαχικοί σπασμοί, εφίδρωση, περιορισμένη όραση, δύσπνοια και βραδυκαρδία.

Το chlorpyrifos και οι κύριοι μεταβολίτες του αποδομούνται με γρήγορους ρυθμούς στο ανθρώπινο σώμα και ο μεταβολισμός γίνεται μέσω των νεφρών (Ubaidur Rahman et al., 2021).

Το chlorpyrifos είναι μέτρια έως πολύ τοξικό στα πτηνά και μέτρια έως πολύ τοξικό στα ψάρια του γλυκού νερού, στα υδρόβια σπόνδυλα και στους θαλάσιους οργανισμούς.

Από μελέτες σχετικές με την ανάλυση επικινδυνότητας (risk assessment), προκύπτει ότι ο κίνδυνος για τα ασπόνδυλα και κυρίως τα οστρακοειδή, είναι εξαιρετικά μεγάλος (Deb & Das, 2013; Huang et al., 2020). Η υπολειμματικότητά του chlorpyrifos σε ορισμένα εδάφη, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τοξικότητας σε οργανισμούς-μη στόχους, όπως θηλαστικά (Zhao et al., 2006) και μικροοργανισμούς (Ubaidur Rahman et al., 2021). Επίσης, φαινόμενα οξείας τοξικότητας παρουσιάζονται και σε μέλισσες, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι το chlorpyrifos βιοσυσσωρεύεται διαμέσου της τροφικής αλυσίδας (Dai et al., 2019).

Η LC₅₀ του chlorpyrifos για τη *D. magna* και για το *Selenastrum capricornutum* (*P. Subcapitata*) είναι 1,05pg/L και 1,00pg/L (72h), αντίστοιχα

(PAN pesticide database: www.pesticideinfo.org/EN). Οι Lu et al. (2013), ανέφεραν ένα

βακτηριακό στέλεχος, το *Cupriavidus sp.* του DT-1, ικανό να αποικοδομεί το chlorpyrifos και την 3,5,6-τριχλωρο-2-πυριδινόλη (TCP) και να χρησιμοποιεί αυτές τις ενώσεις ως μοναδική πηγή άνθρακα, το οποίο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε. Η διερεύνηση του μονοπατιού της διάσπασης έδειξε ότι το chlorpyrifos αρχικά υδρολύθηκε σε TCP, διαδοχικά αποχλωριώθηκε σε 2-πυριδινόλη και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε διάσπαση του δακτυλίου πυριδίνης και περαιτέρω αποικοδόμηση. Το γονίδιο *mpd*, που κωδικοποιεί το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση του chlorpyrifos σε TCP, κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε σε *Escherichia coli* BL21. Η εφαρμογή σε επιβαρυμένο με chlorpyrifos εδάφους με το στέλεχος DT-1 είχε ως αποτέλεσμα ποσοστό αποδόμησης του chlorpyrifos και του TCP κατά 100 % και 94,3 % αντίστοιχα, σε σύγκριση με ένα ποσοστό 28,2 % και 19,9 % σε μη ενοφθαλμισμένο έδαφος. Οι Mallick et al. (1999) ανέφεραν την ταχεία αποδόμηση του chlorpyrifos από τα βακτήρια *Flavobacterium sp.* ATCC 27551 και *Arthrobactersp.*, όταν το δρων συστατικό χορηγούνταν σε αυτά ως η μόνη πηγή άνθρακα σε θρεπτικό διάλυμα αλάτων. Το *Flavobacterium sp.* ATCC 27551 είχε απομονωθεί από ορυζώνες στους οποίους είχε εφαρμοστεί diazinon (Sethunathan & Yoshida, 1973) ενώ το *Arthrobactersp.* είχε απομονωθεί από πλημμυρισμένο έδαφος το οποίο είχε δεχθεί επέμβαση με parathion methyl (Mishra et al., 1992). Επιπλέον, στελέχη των *Aspergillus flavus* και *Aspergillus niger*, τα οποία απομονώθηκαν από έδαφος στο οποίο είχε προηγουμένως εφαρμοστεί chlorpyrifos, παρουσίασαν ικανότητα βιοαποδόμησης του σε υγρές καλλιέργειες (Swati & Singh, 2002). Οι Singh et al., (2003) μελέτησαν την επίδραση του pH του εδάφους στην αποδόμηση του chlorpyrifos σε δύο είδη εδαφών, ένα από το Ηνωμένο Βασίλειο και ένα από την Αυστραλία. Στο πρώτο έδαφος παρατηρήθηκε πως σε εύρος pH 4,7 έως 8,4 τα επίπεδα του chlorpyrifos μειώθηκαν από το συμμεταβολισμό μικροοργανισμών του εδάφους. Στο αυστραλιανό έδαφος απομονώθηκε πληθυσμός βακτηρίων, με πολύ έντονη ικανότητα αποδόμησης του chlorpyrifos ως μόνη πηγή άνθρακα και η ικανότητά τους αυτή μεταφέρθηκε επιτυχώς και σε έδαφος από το Ηνωμένο Βασίλειο. Η ικανότητα βιοαποδόμησης διατηρήθηκε για πάνω από 90 ημέρες στα εδάφη που είχαν pH $\geq 6,7$. Ένα χρόνο αργότερα (2004) ο Singh και οι συνεργάτες

του κατέγραψαν την αποδόμηση του chlorpyrifos από το βακτήριο *Enterobacters trainB*- 14. Το εν λόγω στέλεχος χρησιμοποίησε το chlorpyrifos ως μόνη πηγή άνθρακα και φωσφόρου και προκάλεσε την υδρόλυση του σε diethylthiophosphoric acid (DETP) αρχικά και 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) στη συνέχεια. Από περαιτέρω μελέτες προέκυψε πως στη δράση του στελέχους B14 στην αποδόμηση του chlorpyrifos παρουσιάζεται το καινοτόμο ενζυμικό μονοπάτι της φωσφοτριεστεράσης.

Χαρακτηρίζεται ως καινοτόμο για τον λόγο ότι το γονίδιο έκφρασης του ενζύμου αυτού παρουσιάζει διαφορετική αλληλουχία από εκείνη του γονιδίου *ord*, το οποίο είναι ευρέως μελετημένο ως υπεύθυνο για την αποδόμηση των οργανοφωσφορικών. Ο Yang και οι συνεργάτες του (2005) απομόνωσαν το *Alcaligenes faecalis* DSP3, το οποίο παρουσιάζει ικανότητα αποδόμησης τόσο του μητρικού μορίου του chlorpyrifos όσο και του μεταβολίτη του TCP. Το 2006 οι ίδιοι ερευνητές κλωνοποίησαν με επιτυχία το γονίδιο *mpd* από ένα βακτήριο ικανό να το chlorpyrifos και χρησιμοποίησαν το βακτήριο αυτό στην βιοαπορρύπανση επιβαρυσμένου εδάφους. Απομόνωσαν 6 βακτήρια με ικανότητα αποδόμησης του chlorpyrifos και παρατήρησαν πως από τα έξι, το *Stenotrophomonas strainYC*-1 ήταν εκείνο που παρουσίασε την ταχύτερη αποδόμηση όπου σε 24 ώρες διασπάστηκαν 100mg/L chlorpyrifos σε DETP και TCP. Το DETP χρησιμοποιήθηκε από το βακτήριο ως πηγή άνθρακα και φωσφόρου και αποδομήθηκε, γεγονός το οποίο δεν επαναλήφθηκε και στο TCP. Το *mpd* γονίδιο του *Stenotrophomonas strainYC*-1 ήταν κατά 99% σε επίπεδο νουκλεοτιδίου όμοιο με τα αντίστοιχα *mpd* γονίδια των *Plesimonas sp.* M6 (GenBank accession no. AF338729), *Pseudomonas putida* (GenBank accession no. AY029773) και *Ochrobactrum sp.* MP-4 (GenBank accession no. AY627036).

Οι Li, He και Li (2007) μελέτησαν την αποδόμηση του chlorpyrifos από το βακτήριο *Sphingomonas sp.* strain Dsp-2, το οποίο απομονώθηκε από μολυσμένα νερά σε περιοχή της Κίνας όπου για πάνω από δέκα χρόνια υπήρχε βιομηχανία παρασκευής chlorpyrifos. Αποδομήθηκαν 100μg/mL chlorpyrifos σε 12 ώρες. Παρατηρήθηκε παραγωγή του μεταβολίτη TCP και στη συνέχεια αποδόμησης του. Αργότερα (2008), ο Xu και οι συνεργάτες του ερεύνησαν την αποδόμηση του από το βακτήριο *Paracoccus* sp. σε TRP.

Σε μια διαφορετική προσέγγιση του θέματος ο Fang και οι συνεργάτες του (2008) μελέτησαν την αποδόμηση του chlorpyrifos από το μύκητα *Verticillium* sp. DSP σε καθαρές καλλιέργειες του μικροοργανισμού, στο έδαφος και σε φυτά κινέζικου λάχανου (*Brassicachinensis* L.), συγκρίνοντας την ένταση του φαινομένου κάτω από διαφορετικές πειραματικές παραμέτρους. Αποδόμηση του δρώντος συστατικού στο έδαφος παρατηρήθηκε επίσης από τη δράση πέντε βακτηρίων, των *Pseudomonas fluorescence*, *Brucellamelitensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella* sp., *Serratiamarcescens* και *Pseudomonas aeruginosa* (Lakshmi et al., 2008).

Οι Anwar et al. (2009) παρατήρησαν αποδόμηση τόσο του chlorpyrifos όσο και του μεταβολίτη του TCP από το βακτήριο *Bacillus pumilus* strain C2A1, το οποίο είχε απομονωθεί από το έδαφος. Διαπιστώθηκε ικανότητα του βακτηρίου να υδρολύει το chlorpyrifos απουσία και παρουσία γλυκόζης, ενώ ήταν πολύ δραστήριο και στην αποδόμηση του TCP, δεδομένου ότι αποδόμησε το 90% της αρχικής ποσότητας (300 mg/L) σε 8 ημέρες επώασης.

Επιπλέον στη μελέτη των Briceño et al. (2012) τέσσερα στελέχη επιλέχθηκαν ως αποτέλεσμα της ανοχής τους στα 50 mg L⁻¹ CP σε πλάκα άγαρ και αναγνωρίστηκαν ως *Streptomyces* sp. με βάση το 16S rDNA. Σύμφωνα με τη σχέση των μελετών αποδόμησης του chlorpyrifos και μικροβιακής ανάπτυξης, επιλέχθηκαν δύο απομονωθέντα στελέχη και ονομάστηκαν *Streptomyces* sp. στέλεχος AC5 και *Streptomyces* sp. στέλεχος AC7. Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε υγρό μέσο με chlorpyrifos σε συγκεντρώσεις 25 mg L⁻¹ και 50 mg L⁻¹ για 72 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα δύο στελέχη ήταν σε θέση να υποβαθμίσουν γρήγορα το chlorpyrifos με περίπου 90% αποδόμηση μετά από 24 ώρες επώασης. Ένα διαφορετικό μοτίβο αποδόμησης του chlorpyrifos παρατηρήθηκε όταν ο κύριος μεταβολίτης του, 3, 5, 6- τριχλωρο- 2- πυριντινόλη (TCP) παρακολουθήθηκε.

Μέγιστη συγκέντρωση 0,46 mg L⁻¹ του TCP παρήχθη από *Streptomyces* sp. στέλεχος AC5 και η συγκέντρωσή του μειώθηκε ως συνάρτηση του χρόνου. Αντίθετα, η παραγωγή TCP

από *Streptomyces sp.* AC7 αυξήθηκε με την πάροδο του χρόνου από 1,31 mg L⁻¹ σε 4,32 mg L⁻¹. Η αποδόμηση του chlorpyrifos συσχετίστηκε με μικροβιακή ανάπτυξη των στελεχών, τροποποίηση του pH, κατανάλωση γλυκόζης και απέκκριση οργανικών οξέων στο υγρό μέσο. Δεδομένης της υψηλής αποδόμησης του chlorpyrifos που παρατηρείται εδώ, τα στελέχη *Streptomyces* παρουσιάζουν σημαντική δυνατότητα ως ακτινοβακτήρια που αποδομούν το chlorpyrifos.

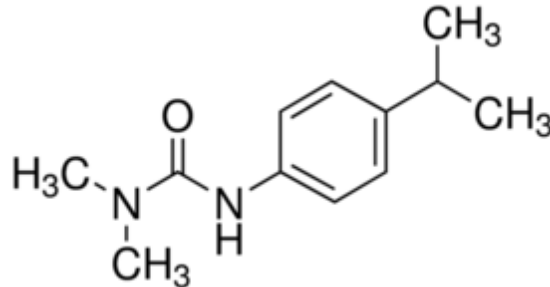
1.8.2. Isoproturon

Το isoproturon (IPU), ένα υποκατάστατο ζιζανιοκτόνο φαινυλουρέας, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ετήσιων ζιζανίων πριν και μετά την εμφάνιση και των πλατύφυλλων ζιζανίων στις καλλιέργειες σιταριού, κριθαριών και χειμερινής σίκαλης. Το isoproturon ανήκει στα παράγωγα ουρίας, η οποία είναι ένα αζωτούχο λίπασμα, αλλά όταν το υδρογόνο της αντικατασταθεί με διάφορες χημικές ομάδες, παράγει φυτοτοξικές ενώσεις. Τα περισσότερα ζιζανιοκτόνα φαινυλουρίας, έτσι και το isoproturon, εφαρμόζονται στο έδαφος, από όπου απορροφώνται γρήγορα από τις ρίζες των ζιζανίων και μετακινούνται αποπλαστικά στα εναέρια μέρη του φυτού.

Μερικά, με την προσθήκη κατάλληλων επιφανειοδραστικών ουσιών, απορροφώνται από τα φύλλα του ζιζανίου και στη συνέχεια μετακινούνται επίσης αποπλαστικά στο υπόλοιπο φυτό. Επίσης, τα περισσότερα ζιζανιοκτόνα των παραγωγών ουρίας είναι αποτελεσματικά εναντίον ετήσιων πλατύφυλλων και ετήσιων αγρωστωδών ζιζανίων. Το πρώτο γενικό σύμπτωμα της δράσης αυτών των ζιζανιοκτόνων είναι η περιφερική νέκρωση των φύλλων σε ευαίσθητα φυτά, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στις τριαζίνες, ξεκινώντας συνήθως από τα παλαιότερα φύλλα. Ακολουθεί σταδιακή χλώρωση, αναστολή της ανάπτυξης και τελική ξήρανση του φυτού και τέλος παρατηρείται αναστολή ανάπτυξης των ριζών των φυτών (Hussain et al., 2013).

Το isoproturon (Εικόνα 4) είναι ένα διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο που εφαρμόζεται προ- και μεταφυτρωτικά για τον έλεγχο ετήσιων αγρωστωδών (*Alopecurus myosuroides*, *Aperaspica-venti*, *Avena fatua* και *Poa annua*) και πολλών ετήσιων πλατύφυλλων ζιζανίων σε καλλιέργειες μαλακού σιταριού, κριθαριού, σίκαλης και

τριτικάλε. Η χρήση του θα πρέπει να αποφεύγεται σε αμμώδη εδάφη αλλά και σε βαριά οργανικά εδάφη, λόγω μειωμένης αποτελεσματικότητας.



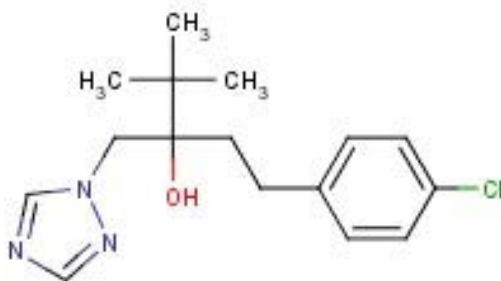
Εικόνα 4. Χημική δομή του *Isoproturon*

Ο κυριότερος μηχανισμός αποτοξικοποίησης των παραγώγων ουρίας από ανθεκτικά φυτά σε αυτά, θεωρείται η αποβολή αλκυλίων ή ο σχηματισμός συμπλόκων με κυτταρικά συστατικά. Ο βαθμός και ο ρυθμός απαλκυλίωσης διαφέρει μεταξύ των φυτών και θεωρείται ως ένας από τους κύριους μηχανισμούς εκλεκτικότητας των ζιζανιοκτόνων μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών φυτών. Η υδροξυλίωση και ο σχηματισμός συμπλόκων με γλυκόζη, πρωτεΐνες ή πολυπεπίδια έχουν επίσης αναφερθεί ως μηχανισμός αποτοξικοποίησης τους από τα φυτά. Η σπουδαιότερη διεργασία που επηρεάζει την υπολλειματική τους διάρκεια στο έδαφος και το περιβάλλον είναι η μικροβιακή αποδόμηση από εδαφογενείς μικροοργανισμούς όπως τα βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus* καθώς και μύκητες του γένους *Penicillium* και *Aspergillus*. χει επίσης δειχθεί ότι Έ η υπολλειματική διάρκεια των ζιζανιοκτόνων της ομάδας αυτής να είναι μικρότερη σε θερμά και υγρά εδάφη , καθώς και σε εδάφη πλούσια σε οργανική ύλη , λόγω έντονης μικροβιακής δραστηριότητας (Parteetal., 2017). Στο έδαφος τα ζιζανιοκτόνα της ομάδας αυτής παρουσιάζουν υπολλειματική διάρκεια από 1 μήνα μέχρι και 3 χρόνια, ενώ ο βαθμός έκπλυσής τους κυμαίνεται από 1-3.

1.8.3 Tebuconazole

Το tebuconazole (Εικόνα 5) ανήκει στους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών (SBIs) και ειδικότερα στην πολυπληθέστερη ομάδα αυτών των μυκητοκτόνων τα Τριαζολικά. Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών, αποτελούν μια μεγάλη και πολύ σημαντική ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων, που έκαναν την εμφάνισή τους περί τα τέλη της δεκατίας του '60. Η ανακάλυψη του μηχανισμού δράσης του triamimol έφερε την αρχή της δημιουργίας ενός πλήθους χημικών ενώσεων, μεγάλης σπουδαιότητας για τη γεωργική και όχι μόνο πρακτική. Από τότε μέχρι σήμερα τα μυκητοκτόνα αυτά έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών. Οι τριαζόλες είναι μυκητοκτόνα χρήσιμα τόσο στη γεωργική πράξη για την καταπολέμηση σημαντικών μυκητολογικών ασθενειών των φυτών, όσο και στην ιατρική και κτηνιατρική για τον έλεγχο σοβαρών δερματομυκητιάσεων στον άνθρωπο και τα ζώα.

Στη γεωργική πράξη χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την καταπολέμηση των ωιδίων και των σκωριάσεων σε πολλές καλλιέργειες, όπως στα σιτηρά, μηλοειδή, κολοκυνθοειδή, ψυχανθή και καλλωπιστικά. Πολλά δε από αυτά είναι αποτελεσματικά και στην αντιμετώπιση αρκετών άλλων ασθενειών που προκαλούνται από είδη των γενών *Monilinia*, *Septoria*, *Venturia*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia* κ.ά. οι SBIs που χρησιμοποιούνται στη γεωργική πράξη χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός αζωτο-ετεροκυκλικού δακτυλίου στο μόριό τους που μπορεί να είναι ακόρεστος ή κορεσμένος (Bošković et al., 2020).



Εικόνα 5. Χημική δομή του Tebuconazole

Τα τριαζολικά και κατ' επέκταση και το tebuconazole ως προς το μηχανισμό δράσης τους κατηγοριοποιούνται στους αναστολείς της C14 απομεθυλάσης (SBIsI). Οι SBIsI παρεμποδίζουν την απομεθυλίωση του C14 στο μόριο της λανοστερόλης (πρόδρομης ουσίας της εργοστερόλης) (Καρπούζας, 2003). Η παρεμπόδιση της σύνθεσης της εργοστερόλης η οποία (όπως όλες οι στερόλες) έχει βασικό ρόλο στη δομική σταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών των μυκήτων, έχει ως αποτέλεσμα την αντιμετώπιση των μυκητολογικών ασθενειών, καθώς, όχι μόνο επηρεάζεται η φυσική σταθερότητα και ρευστότητα των μεμβρανών αλλά και η λειτουργικότητα των διαφόρων ενζυμικών συστημάτων που συνδέονται με τις κυτταρικές μεμβράνες. Το tebuconazole, είναι ένα διασυτηματικό μυκητοκτόνο με προληπτική και θεραπευτική δράση που εμφανίστηκε στη γεωργική πράξη το 1988 με τα εμπορικά ονόματα Folicur, Horizon και Raxil, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την επικάλυψη των σπόρων σιτηρών για τον έλεγχο των ειδών των γενών *Tilletia*, *Ustilago*, *Urocystis* κ.ά., και σε ψεκασμούς φυλλώματος για την καταπολέμηση πολλών φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως *Pucciniaspp.*, *Erysiphegraminis*, *Rhynchosporiumsecalis*, *Septoriaspp.*, *Pyrenophoraspp.*, *Cochliobolussativus*, *Fuasriumspp.*, *Alternariasolani*, κ.ά. (Bošković et al., 2020).

Οι Wallace και Dickinson (2006) απέδειξαν ότι το tebuconazole, αποτοξικοποιείται όταν εκτίθεται στα RAS-Tolia βακτήρια ενώ οι Obandaetal (2008) έδειξαν ότι η διάσπαση του δακτυλίου της τριαζόλης είναι η κύρια οδός που χρησιμοποιείται από το *T. harzianum* για το μεταβολισμό του tebuconazole. Μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν με διαφορετικές μεθόδους δειγματοληψίας εδάφους και ο έλεγχος της αποδομητικής ικανότητας των βακτηρίων που πραγματοποιήθηκε με καλλιέργειες αυτών σε βιοαντιδραστήρες, έδειξαν ότι μερικές απομονώσεις έδειξαν την ικανότητα να αποδομούν έως και 42,8 mg/L του tebuconazole (51% της αρχικής συγκέντρωσης) (Sehnem,2009).

Στο εργαστήριο μελέτης (TierI) η εφαρμογή των tebuconazole και chlorpyrifos προκάλεσαν μια σημαντική επίδραση στην αφθονία των 11 μικροβιακών ομάδων που αναλύθηκαν και η δομή της βακτηριακού κοινότητας, αν και αυτά τα αποτελέσματα δεν δείχνουν σαφή εξαρτώμενο από το χρόνο μοτίβο. Σε αντίθεση, η αμμωνιο-οξειδωτικών

μικροοργανισμών (ΑΟΑ και ΑΟΒ) ήταν πιο ευαίσθητοι στο tebuconazole και chlorpyrifos, αλλά δεν υπήρξαν σημαντικές επιπτώσεις στην αφθονία γονιδίων απονιτροποίησης. Σε μελέτη πεδίου (TierII) αναφέρθηκε επίσης, ότι η αφθονία των ΑΟΑ και ΑΟΒ μειώθηκε σε απάντηση σε όλα 3 φυτοφάρμακα που δοκιμάστηκαν (isoproturon ,tebuconazole,Chlorpyrifos).

Συμπερασματικά, η εφαρμογή των τριών παρασιτοκτόνων δεν φάνηκε να επάγει σαφή τοξική επίδραση στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Η μόνη εξαίρεση ήταν οι σημαντικές μειώσεις στην αφθονία μικροβιακών νιτροποιητών βακτηρίων η οποία φαίνεται να είναι η πιο ευαίσθητοι σε αυτό το είδος αβιοτικού στρες (Pertileetal., 2016).

1.9 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί η επίδραση των τριών γεωργικών φαρμάκων, του εντομοκτόνου chlorpyrifos, το ζιζανιοκτόνου isoproturon και του μυκητοκτόνου Tebuconazol στην δραστικότητα του ενζύμου β-γλυκοσιδάση, ενός ενζύμου που παίζει σημαντικό ρόλο στον γεωχημικό κύκλο του άνθρακα. Για την βαθύτερη κατανόηση της επίδρασης της μικροβιακής κοινότητας στην δράση του ενζύμου β – γλυκοσιδάση επιλέχθηκαν επίσης και τρία διαφορετικά εδάφη της Ευρώπης που συμβολίζουν τις τρεις κλιματικές ζώνες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Επιλογή εδαφών από την Ευρώπη

Στην παρούσα μελέτη για να γίνει η αξιολόγηση της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα των εδαφών, επιλέχθηκαν δείγματα εδάφους από τρεις χώρες της Ευρώπης που αντιπροσωπεύουν τρεις διαφορετικές περιβαλλοντικές ζώνες και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών ως προς την σύσταση τους.

Συγκεκριμένα δείγματα πάρθηκαν από την Ελλάδα (θερμή νότια Ευρωπαϊκή ζώνη), την Σλοβενία (μεσόφιλη κεντρική Ευρωπαϊκή ζώνη) και από την Σουηδία (ψυχρή βόρεια Ευρωπαϊκή ζώνη) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ευρωπαϊκός πολιτικός χάρτης σημασμένος με κόκκινους κύκλους των χωρών που πάρθηκαν τα δείγματα εδάφους της μελέτης.

2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Κατάλληλη ποσότητα από κάθε εδάφος της παρούσας μελέτης, αρχικά συλλέχθηκε, περάστηκε από κόσκινο 2mm και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους 4 οC μέχρι την περαιτέρω χρήση τους. Τρία επίπεδα δόσης - x1, x2 και x10 της συνιστώμενης δόσης (Πίνακας 1) - χρησιμοποιήθηκαν για καθένα από τα τρία γεωργικά φάρμακα isoproturon (IPU), chlorpyrifos (CHL) και tebuconazole (TBZ) . Για κάθε συνδυασμό γεωργικού φαρμάκου – επιπέδου δόσης (3 x 3), ένα μαζικό δείγμα (6 Kg) προετοιμάστηκε και επεξεργάστηκε με υδατικά διαλύματα των γεωργικών φαρμάκων. Όλα τα διαλύματα επιφόρτισης, προετοιμάστηκαν με εμπορικά σκευάσματα των γεωργικών φαρμάκων και οι συγκεντρώσεις τους ελέγχθηκαν σε σύστημα HPLC πριν από την τελική εφαρμογή στο έδαφος. Το QUINTIL® 500SC χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση του IPU, ενώ το FOLICUR® SE, 43.1g/L και το CARPOSAN® EC, 480 g/L χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση του TBZ και του chlorpyrifos, αντίστοιχα. Για κάθε μαζικό δείγμα εδάφους που χρησιμοποιήθηκε προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα φαρμάκου από το αρχικό υδατικό διάλυμα και προστέθηκε επιπλέον ποσότητα απιονισμένου νερού για να ρυθμιστεί η περιεκτικότητα σε υγρασία του εδάφους στο 40% της υδατο-ικανότητας του εδάφους . Ένα ακατέργαστο δείγμα από κάθε τύπου εδάφους έλαβε την ίδια ποσότητα απιονισμένου νερού για να χρησιμεύσει ως δείγματα ελέγχου. Μετά τη ρύθμιση της υγρασίας, τα δείγματα εδάφους αναμείχθηκαν καλά με το χέρι για να διασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή των γεωργικών φαρμάκων.

Πίνακας 1. Επίπεδα συνιστώμενων δόσεων των γεωργικών φαρμάκων (mg/Kg ξηρού βάρους εδάφους)

Γεωργικά Φαρμακα	Συνιστώμενη Δόση	Επίπεδα δόσεων (mg/kg ξηρού βάρους εδάφους)			
		x1	x2	X10	x100
Isoproturon	1 Kg·ha ⁻¹	1.6	3.2	16	160
Tebuconazole	2 x 250 g·ha ⁻¹	0.6	1.2	6	60
Chlorpyrifos	2.5 Kg·ha ⁻¹	2	4	20	200

Τα δείγματα εδάφους, μετά από πλήρη ανάμειξη χωρίστηκαν σε δείγματα των 150 g και τοποθετήθηκαν σε αεριζόμενες πλαστικές σακούλες, οι οποίες επωάστηκαν στο σκοτάδι στους 20°C. Το βάρος κάθε δείγματος εδάφους μαζί με την πλαστική σακούλα καταγράφηκε για να ρυθμιστεί η περιεκτικότητα σε υγρασία εάν χρειαστεί. Αμέσως μετά την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων (χρόνος 0 ημέρες) και 7, 21 και 56 ημέρες αργότερα αφαιρέθηκαν τρία δείγματα/επαναλήψεις από την επώαση και την ίδια μέρα έγινε ο προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης. Μία φορά την εβδομάδα, τα μικροκοσμοί του εδάφους ελέγχονταν για απώλειες υγρασίας και προστέθηκε επιπλέον νερό για να διατηρηθεί η περιεκτικότητα σε υγρασία του εδάφους στο 40% του WHC.

2.3. Προσδιορισμός της δράσης του ενζύμου β- γλυκοσιδάσης σε εδαφικά δείγματα.

Τα αντιδραστήρια και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των β-γλυκοσιδασών ήταν τα εξής:

- Τολουένιο
- THAM buffer 0.1M pH 12
- MUB pH 6.0
- Διάλυμα π-νιτροφαινόλης (PNS) 0.005M: pH 5.8
- CaCl₂ 0.5 M
- NaOH 0.5M
- Διάλυμα αναφοράς π- νιτροφαινόλης

Πρωτόκολλο της μεθόδου

Σε κωνικές φιάλες των 50ml τοποθετήθηκε 0.5 gr εδάφους από κάθε δείγμα και ακολούθως προστίθενται στις κωνικές φιάλες 0,25 ml τολουένιο , 4ml MUB pH 6.0 και 1ml PNG που αποτελεί υπόστρωμα υδρόλυσης της β – γλυκοσιδάσης για την

απελευθέρωση της π-νιτροφαινόλης . Το τολουένιο που προστίθεται έχει ως στόχο να παρεμποδίσει την σύνθεση νέων ενζύμων από τους μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου και να απελευθερώσει πιθανές ποσότητες ενδοκυτταρικών ενζύμων. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν σε, σφραγίστηκαν σε Parafilm και τοποθετήθηκαν για ανάδευση σε σκοτεινό θάλαμο επώασης με ανάδευση (200rpm) για μια ώρα στους 37 °C. Μετά το πέρας της μιας ώρας ακολούθησε η προσθήκη 1 ml CaCl_2 0.5M και 4 ml THAM buffer 0.1M p H 12. Τα δύο αυτά αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση της παρα-νιτροφαινόλης που έχει παραχθεί από την υδρόλυση του PNG υποστρώματος της β- γλυκοσιδάσης και ακολούθησε διήθηση των εδαφικών διαλυμάτων με χρήση ηθμών Whatman σε πάγο. Η απορρόφηση των δειγμάτων προσδιορίστηκαν φωτομετρικά στα 420 nm .

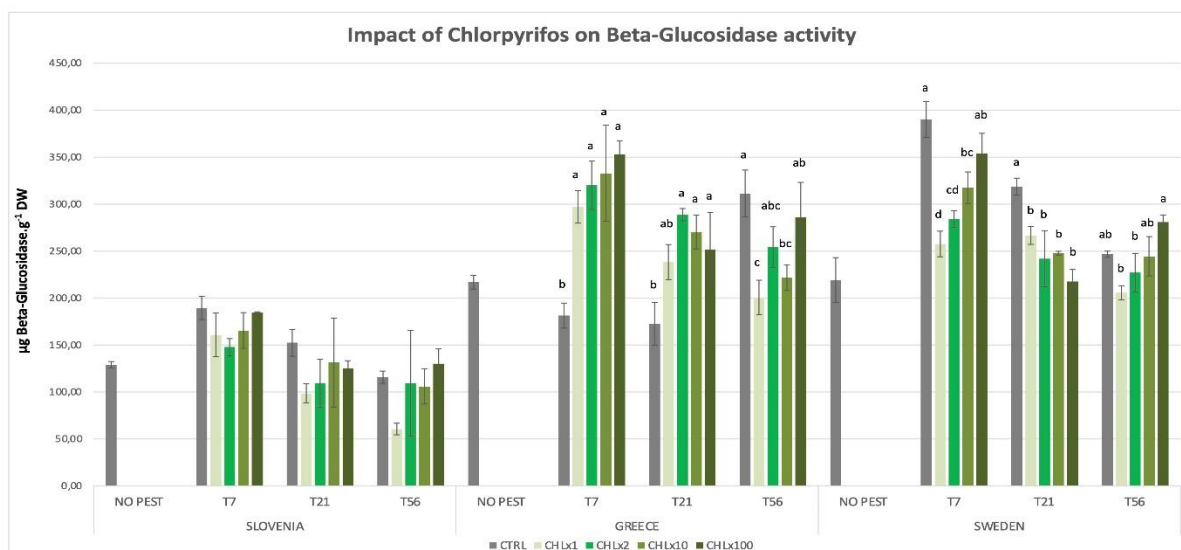
Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,1,2,4 και 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ πάρα-νιτροφαινόλης. Για το σκοπό αυτό 1 ml από το πρότυπο διάλυμα παρα-νιτροφαινόλης συγκέντρωσης 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ διαλύθηκε σε 100 ml νερό και ακολούθησε ανάδευση. Έπειτα 0,1,2,4 και 5 ml από το αραιωμένο πρότυπο διάλυμα μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες όπου προστέθηκε νερό 5,4,2,1 και 0 ml αντίστοιχα ώστε ο τελικός όγκος να είναι 5 ml . Έτσι τα τελικά δυαλίματα που προκύπτουν έχουν αντίστοιχα συγκεντρώσεις παρα-νιτροφαινόλης 0, 1, 2, 4, και 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Τέλος προστέθηκαν 1 ml CaCl_2 0.5M και 4ml NaOH 0.5M και ακολούθησε διήθηση και φωτομέτρηση στα 420 nm.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση του chlorpyrifos στην δραστικότητα του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης

Μετά την εφαρμογή του φαρμάκου chlorpyrifos στα εδάφη της παρούσας μελέτης, αυτό που παρατηρήθηκε αρχικά ήταν ότι στην περίπτωση του εδάφους από την Σλοβενία δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αύξηση ή μείωση στην δράση του ενζύμου β-γλυκοσιδάση καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, μετά την εφαρμογή του φαρμάκου σε όλες τις συνιστώμενες δόσεις εφαρμογής του, συγκριτικά με τον μάρτυρα. Αντίθετα, στην περίπτωση του εδάφους από την Ελλάδα παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της δράσης του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης στο χρόνο 7 και 21 μέρες μετά την εφαρμογή του Chlorpyrifos, μεταξύ του μάρτυρα και των μεταχειρίσεων x1, x2, x10 και x100 της συνιστώμενης δόσης του γεωργικού φαρμάκου. Ενώ σε όλες τις μεταχειρίσεις στο ίδιο έδαφος, παρατηρήθηκε μείωση της δραστικότητας της β-γλυκοσιδάσης στο χρόνο 56 ημέρες μετά την εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου, συγκριτικά με τον μάρτυρα, αλλά ήταν στατιστικώς σημαντική η μείωση μόνο για τις δόσεις x1 και x10. .

Τέλος, στο έδαφος της Σουηδίας είναι εμφανές ότι έχουμε στατιστικώς μειωμένη δράση του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης στο χρόνο 21 ημερών σε όλες τις συνιστώμενες δόσεις του φαρμάκου σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα. Η ίδια μειωμένη δράση παρατηρήθηκε και για το χρόνο 7 ημερών, αλλά ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο για τις δόσεις εφαρμογής x1, x2 και x10, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στο χρόνο 56 ημέρες του πειράματος (Διάγραμμα 1).



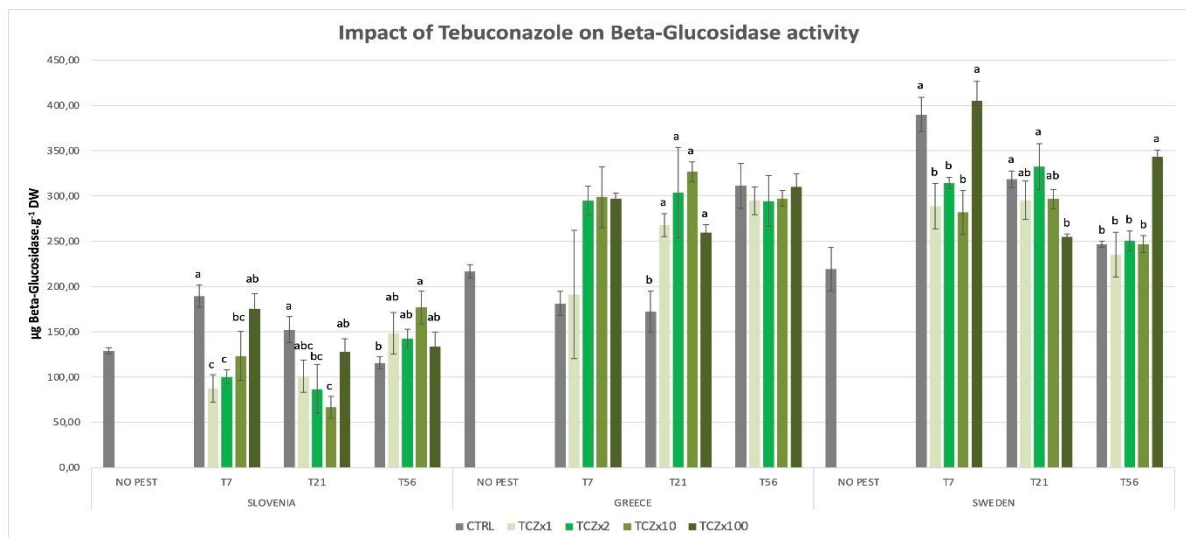
Διάγραμμα 1 Επίδραση του Chlorpyrifos στην δραστικότητα του ενζύμου ενζύμου β-γλυκοσιδάσης στα εδάφη της Σλοβενίας, Ελλάδας και Σουηδίας. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + τυπική απόκλιση. Οι μεταχειρίσεις που έχουν σημειωθεί με μικρά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των δόσεων του chlorpyrifos στον ίδιο χρόνο.

3.2 Επίδραση του tebuconazole στην δραστικότητα του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης

Περνώντας στα αποτελέσματα της επίδρασης του tebuconazole στην δραστικότητα του ενζύμου β-γλυκοσιδάση στην περίπτωση του εδάφους από την Σλοβενία παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της δράσης του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης στο χρόνο 7 και 21 μέρες μετά την εφαρμογή του tebuconazole, μεταξύ του μάρτυρα και των μεταχειρίσεων x1, x2, x10 της συνιστώμενης δόσης του γεωργικού φαρμάκου. Εναντιθέση, στο χρόνο 56 ημέρες μετά την εφαρμογή του TBZ, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητας της β-γλυκοσιδάσης μόνο στα δείγματα της δόσης x10 σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα.

Στην περίπτωση του εδάφους από την Ελλάδα παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της δράσης του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης μόνο στο χρόνο 21 μέρες μεταξύ

όλων των δόσεων εφαρμογής του TBZ και τα δείγματα του μάρτυρα, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση στους υπόλοιπους χρόνους του πειράματος. Στα εδάφη της Σουηδίας παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της δράσης του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης στο χρόνο 7 μέρες μετά την εφαρμογή του tebuconazole, μεταξύ του μάρτυρα και των μεταχειρίσεων x1, x2, x10 της συνιστώμενης δόσης του γεωργικού φαρμάκου. Εναντιθέση, στις ίδιες δόσεις – μεταχειρίσεις δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφοροποίηση της δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης στο χρόνο 21 και 56 ημέρων μετά την εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου, συγκριτικά με τον μάρτυρα. Μόνο για την περίπτωση της δόσης εφαρμογής x100 του TBZ φάνηκε αρχικά μια στατιστικώς σημαντική μείωση στο χρόνο 21 ημέρες και στη συνέχεια μια αύξηση στο τέλος του πειράματος (56 ημέρες), σε σχέση πάντα με τα δείγματα του μάρτυρα (Διάγραμμα 2).

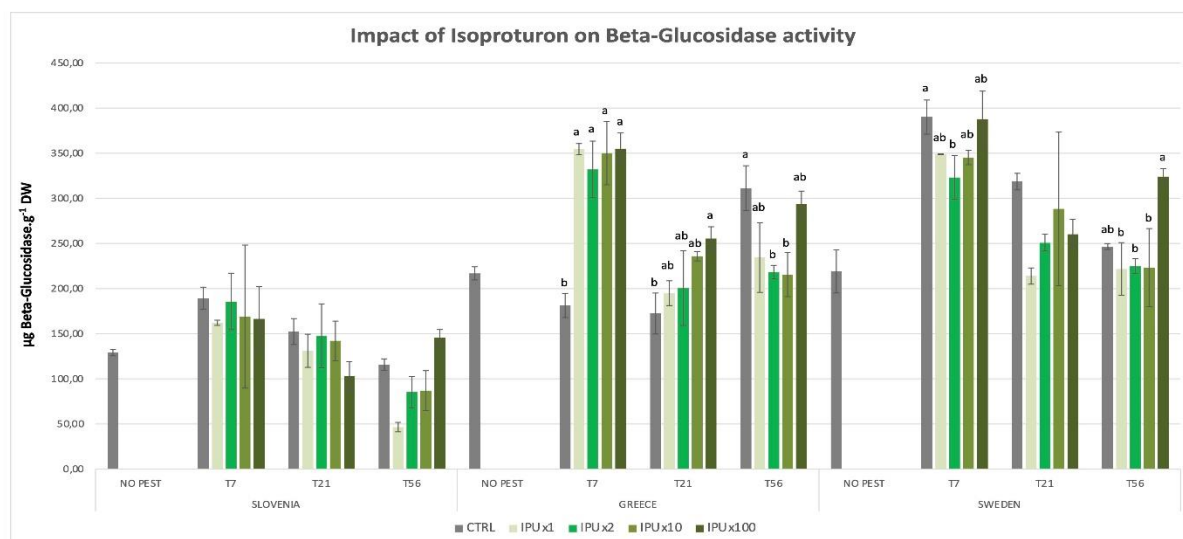


Διάγραμμα 2. Επίδραση του tebuconazole στην δραστηριότητα του ενζύμου ενζύμου β-γλυκοσιδάσης στα εδάφη της Σλοβενίας, Ελλάδας και Σουηδίας. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + τυπική απόκλιση. Οι μεταχειρίσεις που έχουν σημειωθεί με μικρά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των δόσεων του chloropyrifos στον ίδιο χρόνο.

3.3 Επίδραση του isoproturon στην δραστικότητα του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης

Περνώντας στα αποτελέσματα της επίδρασης της εφαρμογής του isoproturon στη δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης στα εδάφη της μελέτης, παρατηρήθηκε ότι στα εδάφη Σλοβενίας δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική αλλαγή στην δράση του ενζύμου καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος σε όλες τις συνιστώμενες δόσεις εφαρμογής του φαρμάκου.

Στα δείγματα του εδάφους από την Ελλάδα παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της δράσης του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης στο χρόνο 7 μέρες μετά την εφαρμογή του isoproturon, μεταξύ του μάρτυρα και όλων των συνιστώμενων δόσεων του IPU. Εν αντιθέση, στο χρόνο 21 ημέρες παρατηρήθηκε αύξηση στην δράση του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης μόνο μεταξύ των δειγμάτων του μάρτυρα και της συνιστώμενης δόσης x100, ενώ το χρόνο 56 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της δράσης του ενζύμου μόνο στα δείγματα των δόσεων x2 και x10. Τέλος, στο έδαφος της Σουηδίας παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μόνο στο χρόνο 7 και 56 ημέρες μετά την εφαρμογή του IPU και μόνο για τα δείγματα του μάρτυρα σε σχέση με αυτά των συνιστώμενων δόσεων x2 και x100, αντίστοιχα (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3. Επίδραση του isoproturon στην δραστικότητα του ενζύμου ενζύμου β-γλυκοσιδάσης στα εδάφη της Σλοβενίας, Ελλάδας και Σουηδίας. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + τυπική απόκλιση. Οι μεταχειρίσεις που έχουν σημειωθεί με μικρά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των δόσεων του chlorpyrifos στον ίδιο χρόνο.

4. Συμπεράσματα και συζήτηση

4.1. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη εστίασε στην επίδραση που έχουν συστηματικά γεωργικά φάρμακα της αγροτικής πρακτικής καθ' όλη την διάρκεια της καλλιέργειας των σιτηρών, τόσο εντομοκτόνα (chlorpyrifos) όσο και μυκητοκτόνα (tebuconazole) και ζιζανιοκτόνα (isoproturon), στην επίδραση που έχουν στην μικροβιακή κοινότητα των εδαφών. Η

επίδραση αυτή καταγράφηκε μέσω της μέτρησης της δραστηριότητας του εξωκυττάριου ενζύμου που παράγουν κυρίως μικροοργανισμού του εδάφους, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα και είναι υπεύθυνες για το τελευταίο και ρυθμοκαθοριστικό βήμα κατάλυσης της κυτταρίνης στο έδαφος. Ενός ακόμη παράγοντα για την διερεύνηση αυτής της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους ήταν τόσο η επιλογή μεγαλύτερων δόσεων και συγκεντρώσεων (πέραν της συνιστώμενης) των γεωργικών φαρμάκων, όπως x2 και x10 αλλά και ακραίων δόσεων x100 της αρχικής συνιστώμενης, που μπορεί να εφαρμοστούν στο έδαφος μετά από τυχών λανθασμένους υπολογισμούς εφαρμογής των φαρμάκων από τους αγρότες ή και από ατυχήματα.

Επίσης, μια ακόμη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η εφαρμογή όλων των γεωργικών φαρμάκων της μελέτης και όλων των δόσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω και η επίδραση στη δράση του ενζύμου β-γλυκοσιδάση, σε τρία διαφορετικά εδάφη που διαφέρουν τόσο στα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά και την μικροβιακή τους κοινότητα όσο και στην κλιματική ζώνη όπου ανήκουν. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν εδάφη από την Σουηδία (ψυχρό κλίμα), την Κροατία (μέτριο κλίμα) και την Ελλάδα (θερμό κλίμα) για την επίλυση των ερωτημάτων της μελέτης.

Μετά την διεξαγωγή όλων των αναλύσεων της μελέτης τα συμπεράσματα της μελέτης είναι τα εξής:

- Παρατηρώντας την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στη δράση του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης, με βάση όλα τα εδάφη της μελέτης, από την μεγαλύτερη στην μικρότερη, ήταν από το TBZ < CHL < IPU για όλες τις συνιστώμενες δόσεις που εφαρμόστηκαν
- Το έδαφος από την Σλοβενία δέχτηκε τις λιγότερες επιδράσεις στη δράση του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης και μόνο η εφαρμογή του TBZ επέφερε στατιστικώς σημαντικές μειώσεις στην δράση του ενζύμου
- Τις περισσότερες θετικές επιπτώσεις στην δράση του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης μετά την εφαρμογή όλων των γεωργικών φαρμάκων, όλων των

δόσεων, παρατηρήθηκαν στο έδαφος από την Ελλάδα και αφορούσαν κυρίως στις πρώτες 7 και 21 ημέρες των πειραμάτων.

- Κανένα από τα γεωργικά φάρμακα της μελέτης δεν προκάλεσε μόνιμη επίδραση (αρνητική ή θετική) στην δραστικότητα του ενζύμου β-γλυκοσιδάση καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

4.2. Συζήτηση

Η επίδραση της εφαρμογής των γεωργικών φαρμάκων στην δράση των ενζύμων του εδάφους που προέρχονται από μικροοργανισμούς, σε εδάφη καλλιεργήσιμων εκτάσεων έχει μελετηθεί από πολλές επιστημονικές ομάδες. Για παράδειγμα μια ομάδα επιστημόνων πραγματοποίησε πειράματα γλαστρών, με έδαφος από την Ινδία, με το φυτό *Pelargonium graveolens* L. το οποίο υποβοηθήθηκε με λίπανση από biochar και δέχτηκε τη συνιστώμενη δόση εφαρμογής του chlorpyrifos. Στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε ότι σε όλες της μεταχειρίσεις στο τέλος των πειραμάτων υπήρξε στατιστικώς σημαντική αύξηση της δράσης του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης μεταξύ των μεταχειρίσεων του πειράματος και των δειγμάτων του μάρτυρα. Αυτό μπορεί να οφείλεται όχι μόνο στην εφαρμογή του chlorpyrifos αλλά και στην εφαρμογή του οργανικού λιπάσματος biochar και μπορεί να δικαιολογήσει τη διαφορετικότητα των αποτελεσμάτων με την παρούσα μελέτη ότι στο τέλος των πειραμάτων δεν παρατηρήθηκαν μόνιμη επίδραση στη δράση της β-γλυκοσιδάσης (Yadav et al., 2023). Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Cheng et al., 2023, δοκιμάστηκε το chlorpyrifos σε συγκεντρώσεις x1 και x2 της συνιστώμενης δόσης εφαρμογής του, σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις σιταριού και καλαμποκιού στην Κίνα, στην επίδραση του γεωργικού φαρμάκου στη δράση του ενζύμου β – γλυκοσιδάση αλλά και άλλων ενζύμων του εδάφους. Αυτό που βρέθηκε είναι ότι η εφαρμογή του chlorpyrifos ανεξαρτήτου δόσης στα φυτά του σιταριού, προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση στην δραστικότητα του ενζύμου β- γλυκοσιδάσης ενώ προκάλεσε ακριβώς το αντίθετό στα φυτά του καλαμποκιού, στο τέλος των πειραμάτων (48 και 73 ημέρες), αντίστοιχα.

Παρόμοια αποτελέσματα μείωσης της δράσης του ενζύμου β- γλυκοσιδάσης μέχρι το τέλος των πειραμάτων, παρατηρήθηκαν και στην παρούσα μελέτη αλλά μόνο στο έδαφος που προέρχονταν από την Ελλάδα και μόνο για τις συνιστώμενες δόσεις x1 και x10.

Σε παλαιότερη μελέτη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, έγινε εφαρμογή των ίδιων γεωργικών φαρμάκων με την παρούσα μελέτη, τόσο σε πειράματα μικροκόσμων όσο και σε πειράματα αγρού σε δόσεις εφαρμογής των φαρμάκων x1, x2 x10 της συνιστώμενης, σε έδαφος και αγρό της βόρειας περιοχής της Πιατσέντζας της Ιταλίας και δεν παρατηρήθηκε καμία μόνιμη στατιστικώς σημαντική αλλαγή (θετική ή αρνητική) στην δράση του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν απόλυτα με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης (Karas et al., 2018).

Επίσης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μια ομάδα ερευνητών μελέτησε την επίδραση της συμπίεσης ή μη του εδάφους από τη Γαλλία, στην αποικοδόμηση του ζιζανιοκτόνου isoproturon αλλά και την επίδραση του φαρμάκου στην ενζυμική δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης που εμπλέκεται στον κύκλο του εδάφους C. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συμπίεση του εδάφους δεν παρουσίασε κάποια στατιστική σημαντική διαφορά στην αποδόμηση του isoproturon αλλά ούτε και στη δράση του ενζύμου β- γλυκοσιδάσης (Mamy et al., 2010). Το isoproturon δεν επέφερε στατιστικώς σημαντικές αλλαγές σε κάποιο από τα τρία εδάφη που δοκιμάστηκαν στη παρούσα μελέτη, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα ευρήματα των Mamy et. al.

Τέλος στην περίπτωση του tebuconazole οι Bacmaga et al., 2022 έκαναν εφαρμογή του φαρμάκου σε πειράματα μικροκόσμων με έδαφος της Πολωνίας, σε διάφορες συγκεντρώσεις και μόνο οι δυο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (0,5 και 1.0 mg/Kg) παρουσίασαν αύξηση στην δράση του ενζύμου β-γλυκοσιδάση σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα, στο τέλος των πειραμάτων στις 30 ημέρες. Τα αποτελέσματα αυτά συμπίπτουν με αυτά που παρατηρήθηκαν και στην παρούσα μελέτη, αλλά μόνο για την περίπτωση του εδάφους από την Σουηδία και για την δόση των x100 της συνιστώμενης στις 56 ημέρες μετά την εφαρμογή του.

4.3. Μελλοντική εργασία

- Μελέτη και άλλων ενζύμων του εδάφους όπως (φωσφατάσες, αρυλσουλφατάσες, ουρεάσες κτλ) για εύρεση ευαίσθητων βιοδεικτών υγείας του εδάφους
- Μελέτη της διάσπασης των εν λόγω φαρμάκων στα εδάφη για τη συσχέτιση της επίδρασής τους στα ένζυμα του εδάφους
- Μελέτη της μικροβιακής κοινότητας με αλληλούχιση νέας γενιάς για την εύρεση μικροοργανισμών που επηρεάζονται από την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αγροτύπος Α.Ε.

<http://www.agrotypos.gr/Pharmacy/PharmSearch.asp?TypeID=2>.

Ζιώγας, Β. και Μαρκόγλου, Α. (2007). Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί δράσης και Χρήσεις Φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Γατίδου 2005, Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων, μελέτη της τοξικότητάς τους και ανίχνευσή τους στο περιβάλλον

Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 396/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23ης Φεβρουαρίου 2005. Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκής Ένωσης, 16.03.2005, L70/ 1-16.

Κλώνης Ιωάννης (2007). Ενζυμολογία. Εκδ. Έμβρυο και Ιωάννης Κλώνης.

Στεργίου Γ. Αναστασία (2002). Εφαρμογές Βιολογικής Καταπολέμησης του Μύκητα *Botrytis cinerea* με Επιφυτικές Ζύμες του Γένους *Rhodotorula* στο Εργαστήριο και το Θερμοκήπιο.

Μεταπτυχιακή μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Μπεμπέλου Ελευθερία (2010), ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΕΠΙΦΥΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ , ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ.

Βρύζας, Ζ. (2005). Συμπεριφορά των ζιζανιοκτόνων atrazine και metolachlor και των μεταβολιτών τους στο έδαφος. Διδακτορική διατριβή. Θεσσαλονίκη.

Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, Ε. (2008). Γεωργικά Φάρμακα. Χημεία, Φαρμακολογία (Φαρμακοκινητική / Μεταβολισμός / Τρόπος δράσης), Τοξικολογία, Οικοτοξικολογία και Συμπεριφορά και Τύχη στο Περιβάλλον. Θεσσαλονίκη. ΕκδόσειςΜέθεξις.

Παυλάτου-Βε, Α., Μπαρμπαγιάννης, Ν., Κιοσέ-Καμπασακάλη, Ε., Κωστοπούλου, Σ. (2001). Εργαστηριακές Ασκήσεις Εδαφολογίας.

Τζελέπης, Γ. (2008). Μελέτη της αλληλεπίδρασης βιολογικών παραγόντων στην αντιμετώπιση του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* στην τομάτα. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Θεσσαλονίκη.

Διεθνής δημοσιεύσεις σε περιοδικά με κριτές

Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., &Wassie, M. (2017). The role of microorganisms in bioremediation-A review. *Open Journal of Environmental Biology*, 2(1), 038-046.

Acosta-Martínez, V. & Tabatabai, M.A. (2000). Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*, 31,85-91.

Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28-39.

Agarry, S., & Latinwo, G. K. (2015). Biodegradation of diesel oil in soil and its enhancement by application of bioventing and amendment with brewery waste effluents as

biostimulation-bioaugmentation agents. *Journal of Ecological Engineering*, 16(2).

Anuradha, B., Rekhapadmini, A., & Rangaswamy, V. (2016). Influence of tebuconazole and copper hydroxide on phosphatase and urease activities in red sandy loam and black clay soils. *3 Biotech*, 6(1), 78.

Anwar S., Liaquat, F., Khan, Q.M., Khalid, Z.M. and Iqbal, S. (2009). Biodegradation of Chlorpyrifos and its Hydrolysis Product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*, 168 (1) p. 400-405.

Bailey, D.G., Dresser, G.K. (2004). Interactions Between Grapefruit Juice and Cardiovascular Drugs. *Am J Cardiovasc Drug*, 4 (5), p. 281- 297. Bairoch, A. (2000). The Enzyme Database in 2000. *Nucleic Acids Research*, 2000, Vol. 28, No. 1, p. 304-305.

Bandick, A.K. & Dick, R.P. (1999). Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry*, 31, 1471-1479.

Bass, C., & Field, L. M. (2011). Gene amplification and insecticide resistance. *Pest management science*, 67(8), 886-890.

Bavcon, M. Trebse, P. and Zupancic- Kralj, (2003). Investigations of the Determination of Transformations of Diazinon and Malathion under Environmental Conditions Using Gas Chromatography Coupled with a Flame Ionization Detector. *Chemosphere*, Volume 50, Issue 5, pp. 595- 601.

Becker, J. G., & Seagren, E. A. (2010). Bioremediation of hazardous organics. *Environmental microbiology*, 177-212. Ανακτήθηκε 25 Ιανουαρίου 2022 από:
https://tga.blv.ifmt.edu.br/media/filer_public/af/bc/afbcdbde-0a3b-4ab6-970d-8e090e113366/mitchel_-_enviromental_microbiology_-_2ed_-_2010.pdf#page=190

Bernal, M. P., Alburquerque, J. A., & Moral, R. (2009). Composting of animal manures and

chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource technology*, 100(22), 5444-5453.

Bian, B., Hu, X., Zhang, S., Lv, C., Yang, Z., Yang, W., & Zhang, L. (2019). Pilot-scale composting of typical multiple agricultural wastes: Parameter optimization and mechanisms. *Bioresource technology*, 287, 121482.

Bošković, N., Brandstätter-Scherr, K., Sedláček, P., Bílková, Z., Bielská, L., & Hofman, J. (2020). Adsorption of epoxiconazole and tebuconazole in twenty different agricultural soils in relation to their properties. *Chemosphere*, 261, 127637.

Briceño, G., Fuentes, M. S., Palma, G., Jorquera, M. A., Amoroso, M. J., & Diez, M. C. (2012). Chlorpyrifos biodegradation and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol production by actinobacteria isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 73, 1-7.

Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N. & Zoppini, A. (2013). Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology & Biochemistry*, 58, 216-234.

Chan, M. T., Selvam, A., & Wong, J. W. (2016). Reducing nitrogen loss and salinity during 'struvite' food waste composting by zeolite amendment. *Bioresource technology*, 200, 838-844.

Coche, A., Babey, T., Rapaport, A., Vieublé-Gonod, L., Garnier, P., & de Dreuzy, J. R. (2018, June). Interaction of porosity structures and microbial uptake dynamics in the degradation of pesticides at μm and mm scales. In *Computational Methods in Water Resources XXII (CMWR)* (pp. 2-p).

Couto, N., Fritt-Rasmussen, J., Jensen, P. E., Højrup, M., Rodrigo, A. P., & Ribeiro, A. B. (2014). Suitability of oil bioremediation in an Arctic soil using surplus heating from an incineration facility. *Environmental science and pollution research*, 21(9), 6221-6227.

Cupta, R.C. (2005). *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Pesticides*. Academic Press, Inc., NY, USA.

Cycoń, M., & Piotrowska-Seget, Z. (2016). Pyrethroid-degrading microorganisms and their potential for the bioremediation of contaminated soils: a review. *Frontiers in microbiology*, 7, 1463.

Cycon, M., Wojcik, M. and Piotrowska-Seget Z. (2009). Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. And *Pseudomonas* sp. And their Use in Bioremediation of Contaminated Soil. *Chemosphere*, 76 (4), p. 494-501.

Dai, P., Jack, C. J., Mortensen, A. N., Bustamante, T. A., Bloomquist, J. R., & Ellis, J. D. (2019). Chronic toxicity of clothianidin, imidacloprid, chlorpyrifos, and dimethoate to *Apis mellifera* L. larvae reared in vitro. *Pest management science*, 75(1), 29-36.

Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.

Das, S.K. & Varma, A. (2011). Role of enzymes in maintaining soil health. In G. Shukla & A. Varma (Eds.), *Soil Enzymology, Soil Biology* 22 (pp. 25-42). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Deb, N., & Das, S. (2013). Chlorpyrifos toxicity in fish: a review. *Current World Environment*, 8(1), 77.

Dell'Anno, A., Beolchini, F., Rocchetti, L., Luna, G. M., & Danovaro, R. (2012). High bacterial biodiversity increases degradation performance of hydrocarbons during bioremediation of contaminated harbor marine sediments. *Environmental pollution*, 167, 85-92.

Demnerová, K., Mackova, M., Speváková, V., Beranova, K., Kochánková, L., Lovecká, P., ...& Macek, T. (2005). Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics—characterization of microbial populations. *International Microbiology*, 8(3), 205-211.

Diaz, E. (editor). (2008). *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology*.

Diez, M. C. (2010). Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 244-267.

Du, J., Zhang, Y., Qu, M., Yin, Y., Fan, K., Hu, B., ...& Ma, C. (2019). Effects of biochar on the microbial activity and community structure during sewage sludge composting. *Bioresource technology*, 272, 171-179.

Dunaway- Mariano, D. (2008). Enzyme Function Discovery. *Structure*, 16 (11), p. 1599- 1600.
Efthimiadou, E., Papatheodorou, E.M., Monokrousos, N. & Stamou, G.P. (2010). Changes of soil chemical, microbiological and enzymatic variables in relation to management regime and the duration of organic farming in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Biological Research – Thessaloniki*, 14,151-159.

Gao, M., Li, B., Yu, A., Liang, F., Yang, L., & Sun, Y. (2010a). The effect of aeration rate on forced-aeration composting of chicken manure and sawdust. *Bioresource Technology*, 101(6), 1899-1903.

Gao, M., Liang, F., Yu, A., Li, B., & Yang, L. (2010b). Evaluation of stability and maturity during forced-aeration composting of chicken manure and sawdust at different C/N ratios. *Chemosphere*, 78(5), 614-619.

Hussain, S., Devers-Lamrani, M., Spor, A., Rouard, N., Porcherot, M., Beguet, J., & Martin-Laurent, F. (2013). Mapping field spatial distribution patterns of isoproturon-mineralizing activity over a three-year winter wheat/rape seed/barley rotation. *Chemosphere*, 90(10), 2499–2511. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.080>

Jaeger, K.E., Eggert, T. (2004). Enantioselective biocatalysis optimised by directed
Jain, P. K., & Bajpai, V. (2012). Biotechnology of bioremediation -a review. *Int J Environ Sci*, 3(1), 535-549.

Khay, S., Choi, J.H., Abd El-Aty, A.M., Mamum, M.I.R., Parl, B.J., Goudah, A., Shin, H.C. & Shim, J.H. (2008). Dissipation Behavior of Lufenuron, Benzoylphenylurea Insecticide, in/on Chinese Cabbage Applied by Foliar Spraying Under Greenhouse Conditions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81, p. 369-372.

Koch, H.M. and Angerer, J. (2001). Analysis of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in Urine Samples Sfrom the General Population Using Gas Chromatography- Mass Spectrometry after Steam Distillation and Solid Phase Extraction. *Journal of Chromatography B*, 759, 43- 49.

Kong, Z., Wang, X., Liu, Q., Li, T., Chen, X., Chai, L., ...& Shen, Q. (2018). Evolution of various fractions during the windrow composting of chicken manure with rice chaff. *Journal of environmental management*, 207, 366-377.

Kulshreshtha, S. H. W. E. T. A. (2013). Genetically engineered microorganisms: a problem solving approach for bioremediation. *J Bioremed Biodegr*, 4(4), 1-2.

Li, C. H., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2010). Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with amendment of iron (III) in mangrove sediment slurry. *Bioresource technology*, 101(21), 8083-8092.

Li, X., He, J. and Li, S. (2007). Isolation of a Chlorpyrifos-degrading Bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2 and Cloning of the mpd Gene. *Research in Microbiology*, 158, p. 143-149.

Lilley, D. (2005). Structure, Folding and Mechanisms of Rizobymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 15 (3):313- 323.

Macaulay, B. M. (2015). Understanding the behaviour of oil-degrading micro-organisms to enhance the microbial remediation of spilled petroleum. *Applied Ecology and Environmental Research*, 13(1), 247-262.

Malik, Z., & Ahmed, S. (2012). Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. *African Journal of Biotechnology*, 11(3), 650-658.

Martinez- Galera M., Lopez- Lopez T., Gil-Garcia M.D., Martinez-Vidal J.L. and Parrilla Varquez P. (2001). Determination of Benzoylureas in Tomato by High -Performance Liquid Chromatography Using Continuous On-line Post-elution Photoirradiation with Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography A*, 918, p. 79-85

Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environment international*, 37(8), 1362-1375.

Moraru, S. S., Ene, A., & Badila, A. (2020). Physical and Hydro-Physical Characteristics of Soil in the Context of Climate Change. A Case Study in Danube River Basin, SE Romania. *Sustainability*, 12(21), 9174.

Moreno-Maroto, J. M., Alonso-Azcárate, J., & O'Kelly, B. C. (2021). Review and critical examination of fine-grained soil classification systems based on plasticity. *Applied Clay Science*, 200, 105955.

Nakhshiniev, B., Biddinika, M. K., Gonzales, H. B., Sumida, H., & Yoshikawa, K. (2014). Evaluation of hydrothermal treatment in enhancing rice straw compost stability and maturity. *Bioresource technology*, 151, 306-313.

Neely, Neilson, A.H. and Allrd, A.S. (2008). *Environmental Degradation and Transformation of Organic Chemicals*. CRC Press, Taylor and Francis Group.

Ortiz-Hernández, M. L., Sánchez-Salinas, E., Dantán-González, E., & Castrejón-Godínez, M. L. (2013). Pesticide biodegradation: mechanisms, genetics and strategies to enhance the process. *Biodegradation-life of Science*, 251-287.

Ortiz-Hernández, M. L., Sánchez-Salinas, E., Olvera-Velona, A., & Folch-Mallol, J. L. (2011). Pesticides in the environment: impacts and their biodegradation as a strategy for residues treatment (pp. 551-574).

Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M., & Vandebulcke, F. (2014). Pesticides and earthworms. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(1), 199-228.

Pertile, G., Karas, P. A., Papadopoulou, E. S., Nikolaki, S., Storck, V., Ferrari, F., ...& Karpouzas, D. G. (2016, September). Assessment of the impact of isoproturon, tebuconazole and chlorpyrifos on soil microbial abundance and functions using a lab-to-field tiered approach. In *11. International Conference on Agrophysics (ICA)* (p. np).

Rich, N., Bharti, A., & Kumar, S. (2018). Effect of bulking agents and cow dung as inoculant on vegetable waste compost quality. *Bioresource technology*, 252, 83-90.

Robertson, P. K. (2016). Cone penetration test (CPT)-based soil behaviour type (SBT) classification system—an update. *Canadian Geotechnical Journal*, 53(12), 1910-1927.

Roditakis, E., Grispou, M., Morou, E., Kristoffersen, J.B., Roditakis, N., Nauen, R., Vontas, J. and Tsagkarakou, A. (2009). Current status of insecticide resistance in Q biotype *Bemisia tabaci* populations from Crete. *Pest Management Science*, 65(3), p. 313-22.

Romero, M.C., Salvioli, M.L., Cazau and Arambarri, A.M. (2002). Pyrene Degradation by Yeasts and Filamentous Fungi. *Environmental Pollution*, 117, p. 159-163.

Sánchez, Ó. J., Ospina, D. A., & Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*, 69, 136-153.

Singh, B.K., Walker, A. and Wright, D.J. (2006). Bioremediation Potential of Fenamiphos, Chlorpyrifos, Degrading Isolates: Influence of Different Environmental Conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, p. 2682- 2693.

Singh, B.K., Walker, A., Morgan, J.A.W. and Wright, D.J. (2003). Effects of Soil pH on the Biodegradation of Chlorpyrifos and Isolation of a Chlorpyrifos-degrading Bacterium. *Applied Environmental Microbiology*, 69(9), 5198-5206.

Sun, W., Chen, Y., Liu, L., Tang, J., Chen, J., & Liu, P. (2010). Conidia immobilization of T-DNA inserted *Trichoderma atroviride* mutant AMT-28 with dichlorvos degradation ability and exploration of biodegradation mechanism. *Bioresource technology*, 101(23), 9197-9203.

Tang, C. Y., Fu, Q. S., Criddle, C. S., & Leckie, J. O. (2007). Effect of flux (transmembrane pressure) and membrane properties on fouling and rejection of reverse osmosis and nanofiltration membranes treating perfluorooctane sulfonate containing wastewater. *Environmental science & technology*, 41(6), 2008-2014.

UNECE. (2021). About the GHS | Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Unece.org. <https://unece.org/about-ghs>

ur Rahman, H. U., Asghar, W., Nazir, W., Sandhu, M. A., Ahmed, A., & Khalid, N. (2021). A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Science of The Total Environment*, 755, 142649.

Wirsching, J., Pagel, H., Ditterich, F., Uksa, M., Werneburg, M., Zwiener, C., ...& Poll, C. (2020). Biodegradation of Pesticides at the Limit: Kinetics and Microbial Substrate Use at Low Concentrations. *Frontiers in microbiology*, 11, 2107.

Wojcik, E., Jabłońska-Trypuć, A., Wydro, U., Butarewicz, A., & Łozowicka, B. (2020). Soil biological activity as an indicator of soil pollution with pesticides—a review. *Applied Soil Ecology*, 147, 103356.

World Health Organization. (2020). The WHO recommended classification of pesticides by

hazard and guidelines to classification 2019. World Health Organization. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2019

Wu, J., Zhang, A., Li, G., Wei, Y., He, S., Lin, Z., ...& Wang, Q. (2019). Effect of different components of single superphosphate on organic matter degradation and maturity during pig manure composting. *Science of The Total Environment*, 646, 587-594.

Yasouri, F.N. (2006). Plasmid Mediated Degradation of Diazinon by Three Bacterial Strains *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. and *Agrobacterium* sp. *Asian Journal of Chemistry*, 18 (4), p. 2437-2444.

Yasouri, F.N. (2006). Plasmid Mediated Degradation of Diazinon by Three Bacterial Strains *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. and *Agrobacterium* sp. *Asian Journal of Chemistry*, 18 (4), p. 2437-2444.

Μαρκά, Σ. (2019). Αξιολόγηση της επίδρασης της ωχρατοξίνης Α σε ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα και μελέτη παρεμπόδισης της κυτταροτοξικής της δράσης.

