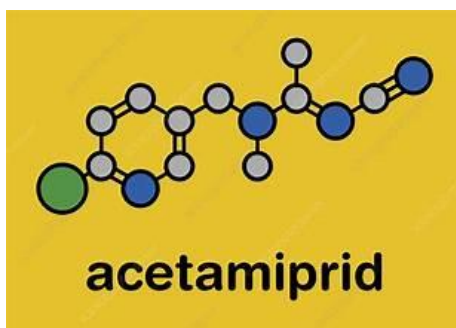




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ –
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



**Μελέτη της αποδόμησης του γεωργικού φαρμάκου
acetamiprid στο έδαφος**

Γαρυφαλλιά Βογιατζάκη

ΛΑΡΙΣΑ 2024

Μελέτη της αποδόμησης του γεωργικού φαρμάκου *acetamiprid* στο
έδαφος

Studying the degradation of pesticide *acetamiprid* in soil

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

- Δημήτριος Καρπούζας, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας
- Σωτήριος Βασιλειάδης, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας - Γονιδιωματικής
- Δανιέλα Τσίκου, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	Error! Bookmark not defined.
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	Error! Bookmark not defined.
1.Γενικά.....	9
1.1 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	10
1.2 ΑΒΙΟΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ.....	11
1.2.1 ΟΞΕΙΔΩΣΗ.....	11
1.2.2. ΦΩΤΟΛΥΣΗ	13
1.2.3. ΥΔΡΟΛΥΣΗ.....	14
1.3 ΒΙΟΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ	15
1.4. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ	16
1.5. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ	16
1.6. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ	19
1.7 ΑΠΟΡΡΟΗ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ 21	
1.8. ΕΚΠΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	22
1.9. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ	24
1.10. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΔΟΕΙΔΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ	25
1.11. ΤΟ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟ <i>ACETAMIPRID</i>	26
1.12. Η ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ <i>ACETAMIPRID</i> ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ.....	28
1.13. Σκοπός της μελέτης.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	31
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
2.1. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC).....	32
2.2. Δείγματα επιφορτισμένα με acetamiprid.....	33
2.3. Παρασκευή πρότυπης καμπύλης Acetamiprid.....	34
2.4. Ανάλυση του γεωργικού φαρμάκου acetamiprid σε σύστημα HPLC.....	34
2.5. Μέθοδος εκχύλισης του acetamiprid από το έδαφος.....	35
2.6. Επικύρωση της μεθόδου εκχύλισης του acetamiprid από το έδαφος	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	36
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
3.1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς.....	37
3.2. Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου εκχύλισης	38
3.3. Ανάλυση δειγμάτων εδάφους επιβαρυμένα με acetamiprid.....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	41

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
4.1. Συμπεράσματα και συζήτηση	42
4.2. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.....	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43
ΕΙΚΟΝΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Acetamiprid* είναι ένα καινοτόμο εντομοκτόνο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των νεονικοτινοειδών. Παρόλο που ανήκει σε αυτή την κατηγορία, διαθέτει διαφορετικά χαρακτηριστικά και δυνατότητες από τις άλλες ουσίες της ίδιας κατηγορίας. Παρουσιάζει αυξημένη αποτελεσματικότητα εναντίον των Ημίπτερων, των Θυσανόπτερων και των Λεπιδόπτερων και μπορεί να εφαρμοσθεί πληθώρα καλλιεργειών.

Πλήθος ερευνών έχει υποδείξει ότι το *Acetamiprid*, όπως και τα περισσότερα φυτοχημικά, παρουσιάζει ένα ποσοστό υπολειμματικότητας μετά την εφαρμογή του και μπορεί να αποβεί βλαβερό για οργανισμούς μη στόχους συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η παράθεση και η ανάλυση ερευνών οι οποίες σχετίζονται με την κατανόηση και την αποδόμηση των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων, στο οικοσύστημα.

Για το καλό της ανθρώπινης υγείας και ευημερίας, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε κάτω από ποιες συνθήκες αποδομούνται τα γεωργικά φάρμακα, στο περιβάλλον, καθώς και ποιοι είναι οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη διαδικασία της αποδόμησης.

Στην παρούσα εργασία περιγράφονται τα είδη των παραγόντων που επηρεάζουν την πορεία και την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων στον υδροφόρο ορίζοντα αλλά και στο έδαφος. Ακόμη, αναλύεται η πειραματική εκχύλιση διαφόρων συγκεντρώσεων του εντομοκτόνου *Acetamiprid*, από δείγματα εδάφους, και η μελέτη τους με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Το μέγιστο ποσοστό εκχύλισης του *Acetamiprid* ήταν της τάξεως του 106,9%.

ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ: acetamiprid, φυτοχημικό, αποδόμηση, εντομοκτόνο, φυσικό περιβάλλον, έδαφος

ABSTRACT

Acetamiprid is a novel neonicotinoid insecticide that possesses characteristic insecticidal properties different from others in the same category of chemical structure. It shows excellent activities against Hemiptera, Thysanoptera and Lepidoptera and its applicable for controlling pests in vegetables and fruit trees.

A number of surveys has indicated that Acetamiprid and its residues, in the natural environment make up a threat for the non-target organisms as well as humans. The purpose of this paper, is to put forward and analyze the researches that are related to the understanding of the degradation process of the pesticide residues in the ecosystem.

For the sake of human health and prosperity, it is important for us to know under what conditions a pesticide gets degraded and what are the factors that affect this procedure.

This paper describes all kinds of factors that affect the fate and disintegration of the chemicals in soil and in ground waters. Furthermore, it analyzes the reflux of various concentrations of the insecticide acetamiprid, contained in soil samples, and their disquisition through HPLC. The maximum removal rate for acetamiprid was 106,9%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Γενικά

Μετά την Πράσινη Επανάσταση, η οποία έλαβε χώρα την δεκαετία του 1960, σημειώθηκε σημαντική αύξηση στην παραγωγικότητα των καλλιεργειών. Η αύξηση αυτή, ήταν αποτέλεσμα της καινοτόμου χρήσης των συνθετικών λιπασμάτων και των γεωργικών φαρμάκων στην γεωργία (Serres et. Al. 2019).

Σήμερα, είναι ευρέως γνωστό ότι τα συνθετικά γεωργικά φάρμακα παίζουν σημαντικό ρόλο στην μείωση των ζιζανίων, των εχθρών και των ασθενειών των φυτών, διατηρώντας σε υψηλά επίπεδα την αποδοτικότητα των καλλιεργειών και την ποιότητα των καρπών (Briceno et. al. 2024).

Παρ' όλα αυτά, έχει παρατηρηθεί πως η επαναλαμβανόμενη και άσκοπη χρήση τους έχει αρνητικό αντίκτυπο στο φυσικό περιβάλλον, το οποίο περιλαμβάνει τους υδάτινους πόρους, την ατμόσφαιρα καθώς και έδαφος το οποίο δεν σχετίζεται με την καλλιέργεια, αλλά επηρεάζεται από την γειτονική χρήση κατά την πιθανή και άσκοπη εναπόθεση των γεωργικών φαρμάκων σε αυτά (Briceno et. al. 2024).

Το σημαντικότερο βέβαια, είναι το αρνητικό αντίκτυπο που επιφέρουν στην ανθρώπινη υγεία, γι' αυτό και είναι απαραίτητη η καλύτερη κατανόηση του χρόνου παραμονής τους τόσο στο έδαφος όσο και στους υδάτινους όγκους καθώς και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες αποδομούνται (Estevez et. al. 2008) .

1.1 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

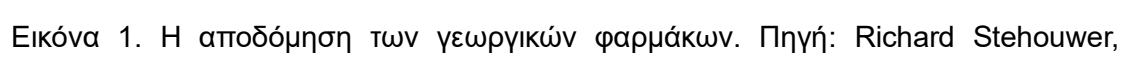
Οποιαδήποτε ουσία ή μείγμα ουσιών τα οποία προορίζονται για πρόληψη, καταστροφή ή αναστολή ανάπτυξης ενός εντόμου, μικροοργανισμού ή ζιζανίου, ονομάζονται παρασιτοκτόνα και ορίζονται ως προϊόντα φυτοπροστασίας τα οποία χρησιμοποιούνται, κυρίως, για να διατηρούν τις καλλιέργειες υγιείς και να προλαμβάνουν την μόλυνσή τους από ασθένειες. Περιλαμβάνουν ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, ακαρεοκτόνα, ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών, καθώς και εντομοαπωθητικά (EFSA 2024). Κατατάσσονται ανάλογα με τον οργανισμό που στοχεύουν, τον τρόπο και τον χρόνο δράσης τους και την δραστική τους ουσία (Lopez-Perez et. al. 2006).

Η αύξηση των καλλιεργητικών εκτάσεων, που παρατηρείται τις τελευταίες δεκαετίες έχει ως αποτέλεσμα την χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων γεωργικών φαρμάκων, η οποία εντείνει την ανησυχία για το αντίκτυπο που θα έχουν στους οργανισμούς μη-στόχους, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων καθώς και στο φυσικό περιβάλλον γενικότερα (Estevez et. al. 2008).

Μετά την εφαρμογή ενός γεωργικού φαρμάκου σε μία καλλιέργεια, ορισμένη ποσότητα μεταφέρεται στο ίδιο το φυτό και η υπόλοιπη μεταφέρεται στο έδαφος ή εξατμίζεται και οδηγείται στην ατμόσφαιρα. Ακόμη, η ποσότητα που παραμένει στο έδαφος είναι δυνατό να εκπλυθεί μέσω της βροχής και να οδηγηθεί στον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα, με συνέπεια να τον ρυπαίνει (Meng et. al. 2022).

Η παραμονή των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον εκφράζεται ως χρόνος ημιζωής, ο οποίος αντιπροσωπεύει τον χρόνο που απαιτείται για να διασπαστεί η μισή ποσότητα του φαρμάκου. Τα γεωργικά φάρμακα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον χρόνο αποδόμησής τους, αυτά που έχουν μικρή παραμονή στο έδαφος δηλαδή λιγότερο από 30 ημέρες, αυτά που έχουν βραχεία παραμονή δηλαδή 30-100 ημέρες και αυτά που έχουν μακρά παραμονή δηλαδή μεγαλύτερη από 100 ημέρες (Βασιλάκογλου 2022).

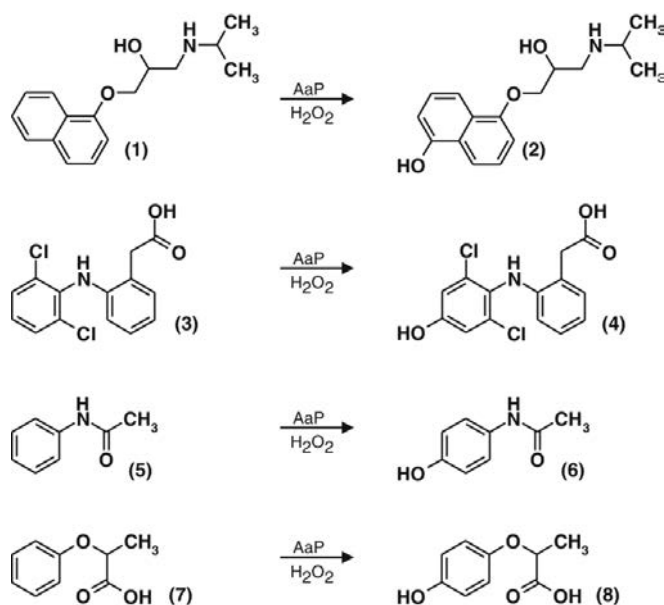
Ο χρόνος ημιζωής ενός γεωργικού φαρμάκου είναι μεταβλητός, το οποίο πρακτικά σημαίνει πως η αποδόμησή του εξαρτάται από βιοτικούς και



Η οξείδωση των δραστικών ουσιών των γεωργικών φαρμάκων, βασίζεται στην παρουσία ελεύθερων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες αποτελούν το κυριότερο αντιδραστήριο για την οξείδωση ενός οργανικού υποστρώματος. Για την ακρίβεια, προκαλούν ισχυρή αντίδραση με τις περισσότερες οργανικές ενώσεις, με την απομάκρυνση ενός κατιόντος υδρογόνου ή την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στους διπλούς δεσμούς (Chiron et. al. 2000).

Επιπλέον, οι ρίζες υδροξυλίου, διασπούν αρωματικούς δακτυλίους σε θέσεις στις οποίες υπάρχει και ένα αλογόνο, οδηγώντας στη δημιουργία μίας φαινόλης. Ακόμη, είναι δυνατό να αντιδράσουν με το μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας ως παράγωγο μια ρίζα υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η αντίδραση αυτή, πυροδοτεί μια σειρά από αντιδράσεις οξειδωτικής αποδόμησης οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε πλήρη μετατροπή της οργανικής ουσίας, σε ανόργανη. Στην εικόνα 2 απεικονίζονται κάποιες αντιδράσεις υδροξυλίωσης. Η υδροξυλίωση αποτελεί το πρώτο βήμα στην οξειδωτική διάσπαση οργανικών ενώσεων, στον αέρα (Chiron et. al. 2000).

Παρόλο που οι ελεύθερες ρίζες, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι ρίζες υδροξυλίου, είναι από τα ισχυρότερα αντιδραστήρια, έχει παρατηρηθεί πως αντιδρούν με αργό ρυθμό με οργανικές ενώσεις όπως τα αλκάνια. (Haag and Yao 1992).



Εικόνα 2. Υδροξυλίωση ορισμένων οργανικών ενώσεων γεωργικών φαρμάκων. Πηγή: Hofrichter and Ulrich, 2010

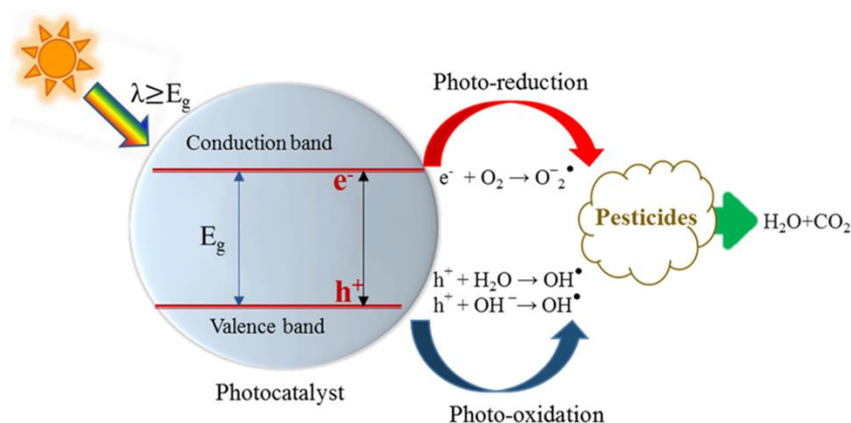
1.2.2. ΦΩΤΟΛΥΣΗ

Η φωτόλυση ενός γεωργικού φαρμάκου, είναι δυνατή μέσω διαφορετικών φωτοχημικών διαδικασιών οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν μία τεχνητή πηγή φωτός ή το φως του ήλιου (Wan et. al. 1994).

Όσον αφορά τις τεχνητές μεθόδους φωτόλυσης, απαιτούν μεγάλες περιόδους εφαρμογών οι οποίες περιλαμβάνουν την χρήση φωτονίων υψηλής ενέργειας και σπανίως πετυχαίνουν την πλήρη αποδόμηση του ρύπου. Η πιο κοινή αντίδραση που παρατηρείται όταν ένας οργανικός ρύπος έρθει σε επαφή με υπεριώδη ακτινοβολία, είναι η υποκατάσταση ενός ατόμου χλωρίου με μία ρίζα υδροξυλίου, η οποία οδηγεί στη δημιουργία ελευθέρων ριζών (Zafiriou et. al. 1994).

Η ηλιακή υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να απορροφηθεί από τα γεωργικά φάρμακα με δύο τρόπους, είτε άμεσα όπου η ηλιακή ακτινοβολία απορροφάται απευθείας από την χημική ένωση, είτε έμμεσα όπου η ακτινοβολία έχει απορροφηθεί νωρίτερα από άλλες ενώσεις, όπως αποτυπώνεται στην εικόνα 3 (Kochany και Maguire 1994).

Η απορρόφηση της ακτινοβολίας με έμμεσο τρόπο διαφέρει ανάλογα με το στοιχείο που απορροφά αρχικά το φως. Αυτό, σχετίζεται με το βάθος του εδάφους στο οποίο βρίσκεται η ξενοβιοτική ένωση, τον αερισμό του εδάφους, την περίοδο έκθεσής της στην ακτινοβολία και τις φυσικοχημικές της ιδιότητες. Η άμεση ακτινοβολία μπορεί να είναι αποτελεσματική σε βάθος έως 0.3mm στο έδαφος, ενώ η έμμεση σε βάθος έως 0.7mm (Kochany και Maguire 1994).



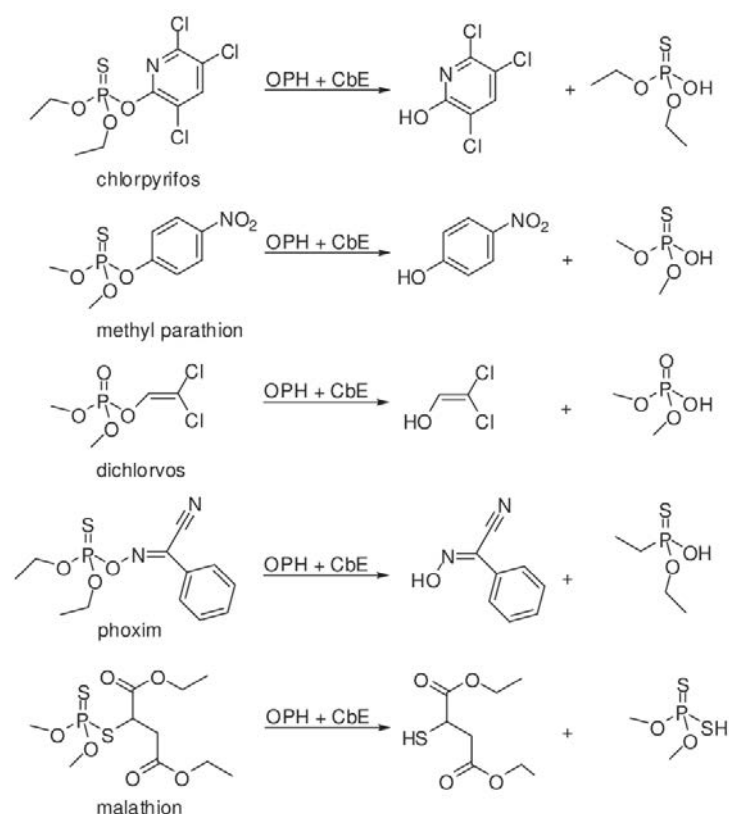
Εικόνα 3. Η συμβολή της υπεριώδους ακτινοβολίας στην αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων. Πηγή: EL-Saeid et. al. 2022

1.2.3.ΥΔΡΟΛΥΣΗ

Η υδρόλυση είναι μία διεργασία μεγάλης σημασίας καθώς μέσω αυτής αποδομούνται αρκετά είδη γεωργικών φαρμάκων. Περιλαμβάνει την αντίδραση που δημιουργείται όταν η δραστική ουσία έρθει σε επαφή με το νερό. Λόγω της διαδικασίας της προσρόφησης, η υδρόλυση συμβαίνει με ταχύτερο ρυθμό σε συστήματα που περιέχουν έδαφος, σε σχέση με συστήματα που δεν περιέχουν έδαφος (Meng et. al. 2022).

Κατά την αντίδραση της χημικής ένωσης με το νερό, ένα μέρος της αντικαθίσταται από μια ρίζα υδροξυλίου. Οι ενώσεις που είναι πιο επιρρεπείς στην διαδικασία της υδρόλυσης είναι τα καρβαμικά και οι εστέρες. Ενδεικτικά μερικές από τις αντιδράσεις υδρόλυσης αναφέρονται στην παρακάτω εικόνα 4. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί πως η παρουσία οξειδίων του αλουμινίου και του σιδήρου σε πηλώδη εδάφη, επιταχύνουν την διαδικασία της υδρόλυσης (Pehkonen et. al. 2010).

Παρόλο που η υδρόλυση αποτελεί ακόμη ένα σημαντικό παράγοντα αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον, δεν έχουν κατανοηθεί ακόμη πλήρως οι συνθήκες κάτω από τις οποίες καταλύονται οι δραστικές ουσίες, μέσω αυτής (Meng et. al. 2022).



Εικόνα 4. Υδρόλυση ορισμένων οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων. Πηγή: Da Silva et. al. 2013.

1.3 ΒΙΟΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ

Η βιοαποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου έχει κάποια πολύ σημαντικά προτερήματα σε σχέση με την αβιοτική διάσπαση αυτών, όπως η ακρίβεια, η πληθώρα των μικροοργανισμών οι οποίοι πραγματοποιούν την αποδόμηση και η έλλειψη δευτερευουσών συνεπειών για το φυσικό περιβάλλον (Nawaz et. al. 2011).

Οι κυριότερες αντιδράσεις που συμπεριλαμβάνονται στην μικροβιακή αποδόμηση είναι η οξειδωση και η αλκυλίωση οι οποίες διεξάγονται μέσω της παραγωγής ορισμένων ενζύμων, από τους μικροοργανισμούς, που έχουν την ιδιότητα να καταλύουν τους χημικούς δεσμούς. Έτσι, δύσκολες χημικές ενώσεις με τη βοήθεια των μικροοργανισμών, μπορούν να διασπαστούν πλήρως ή μερικώς, καθιστώντας τις ενώσεις είτε ανενεργές είτε διαθέσιμες για την περαιτέρω διάσπασή τους από τους παραπάνω παράγοντες που αναφέρθηκαν (Meng et. al. 2022).

Επιπλέον, η βιοαποδόμηση, δεν καθορίζεται μόνο από την παρουσία των ενζύμων αλλά και από άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και η σύσταση του εδάφους, η περιεκτικότητά του σε νερό, η θερμοκρασία του και το pH του (Aislabie et. al. 1995).

Το οξυγόνο, αποτελεί ακόμη ένα σημαντικό παράγοντα, όμως ο ρόλος του στην μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων είναι περίπλοκος. Αν η ποσότητα του οξυγόνου είναι επαρκής τότε τα τελικά προϊόντα της αποδόμησης θα είναι διοξείδιο του άνθρακα, νερό, θείο, άζωτο, φώσφορος και ιόντα χλωρίου (Sims et. al. 2019).

Αντίθετα, αν η ποσότητα του οξυγόνου δεν είναι επαρκής τότε η αποδόμηση πραγματοποιείται κάτω από ανοξικές ή αναερόβιες συνθήκες οι οποίες μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη αναερόβιων μικροοργανισμών οι οποίοι είναι δυνατό να επηρεάσουν την αποικοδόμηση των γεωργικών φαρμάκων (Sims et. al. 2019).

1.4. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ

Η πλήρης βιοαποικοδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου, περιλαμβάνει την οξείδωση της δραστικής ουσίας έτσι ώστε να σχηματιστεί νερό και διοξείδιο του άνθρακα. Η διαδικασία αυτή παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των μικροβίων. Κάθε βήμα της διαδικασίας, καταλύεται από ένα συγκεκριμένο ένζυμο το οποίο είτε παράγεται από τον μικροοργανισμό εξωκυτταρικά είτε εσωτερικά. Η βιοαποικοδόμηση του γεωργικού φαρμάκου μπορεί να σταματήσει σε οποιοδήποτε βήμα της διαδικασίας αν το απαραίτητο ένζυμο δεν βρίσκεται σε επαρκείς ποσότητες. (Nawaz et. al. 2010).

1.5. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ

Προκειμένου να επιτευχθεί η μικροβιακή αποδόμηση, είναι απαραίτητη η ύπαρξη συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών οι οποίοι είναι ικανοί για την

κατάλυση της αντίστοιχης οργανικής ουσίας. Όταν διαπιστώνεται απουσία ή χαμηλή αφθονία αυτών των μικροοργανισμών, στο έδαφος, τότε παρατηρείται και παραμονή των γεωργικών φαρμάκων σε αυτό, για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Αν ένας μικροοργανισμός είναι απών ή ο πληθυσμός του είναι πολύ μικρός και δεν μπορεί να επιτευχθεί η αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου, τότε απομονώνεται και προστίθεται στο έδαφος προκειμένου να προάγει τον πολλαπλασιασμό του πληθυσμού του (Singh, 2008).

Η χρήση βακτηρίων για τη μείωση της παρουσίας χημικών ρύπων, οι οποίοι οφείλονται στα γεωργικά φάρμακα, είναι ένας αποτελεσματικός και οικολογικός τρόπος για την βιοαποκατάσταση επιβαρυμένων περιοχών (Mervat 2009). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως η χρήση βιολογικών συστημάτων, τα οποία ονομάζονται βιοκλίνες, χρησιμοποιούνται στην διαχείριση υγρών αποβλήτων. Τα απόβλητα αυτά προέρχονται από τις εφαρμογές γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων (Papazlatani et. al. 2022).

Η αποτελεσματικότητα των βιοκλινών βασίζεται κυρίως στο υλικό από το οποίο αποτελούνται, το οποίο είναι ένα βιολογικά ενεργό υπόστρωμα με απορροφητική δράση. Το υπόστρωμα αυτό, απαρτίζεται συνήθως από χώμα, άχυρο και μία απορροφητική ουσία όπως η τύρφη. Ακόμη, περιέχουν και μία πηγή ενεργού μικροβιώματος το οποίο έχει την ιδιότητα να αποδομεί τα γεωργικά φάρμακα που βρίσκονται στα υγρά απόβλητα (Papazlatani et. al. 2022).

Οι μικροβιακές αποικίες οι οποίες εποικίζουν το σύστημα μιας βιοκλίνης, έχουν μελετηθεί σχετικά με τη συμβολή τους στην απομάκρυνση των γεωργικών φαρμάκων, με τη χρήση κάποιων μετρήσεων, όπως η πληθώρα των φυλογενετικών διαφορών μεταξύ των τάξεων των βακτηρίων ή των γονιδίων που συνέβαλλαν στην αποδόμηση αρωματικών στοιχείων. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση qPCR (Karas et. al. 2016b).

Επιπλέον μεταγονιδιωματικές αναλύσεις, των αποικιών αυτών, έχουν υποδείξει πως οι βιοκλίνες είναι εμπλουτισμένες με γονίδια τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στην αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων, όπως οι υπεροξειδάσες, οι μονοοξυγενάσες και οι υδροξυλάσες. Εκτός από την φυλογενετική σύσταση του μικροβιώματος των βιοκλινών, πρόσφατες έρευνες

έχουν αποδείξει πως, οι βιοκλίνες, αποτελούν ένα καινοτόμο μέσο μετατροπής των γεωργικών φαρμάκων. Η διαδικασία αυτή, γίνεται εφικτή με την βοήθεια του συνόλου των μεταθετών στοιχείων του γονιδιώματος ενός οργανισμού (mobilome). Ένα παράδειγμα μεταθετών γενετικών στοιχείων, είναι τα πλασμίδια (Papazlatani et. al. 2022). Τα πλασμίδια αυτά ονομάζονται και καταβολικά πλασμίδια, λόγω της ιδιότητας του μικροοργανισμού που τα περιέχει και να διασπούν συγκεκριμένες ξενοβιοτικές ουσίες. Αρκετά από αυτά τα καταβολικά πλασμίδια, έχουν ανιχνευθεί σε είδη των γενών *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Actinobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiela*, *Moraxella* και *Arthrobacter* (Sayler et. al. 1990, Papazlatani et al., 2022).

Επιπλέον, πολλά είδη του γένους *Actinomycetes* έχουν επισημανθεί ως κατάλληλα για να διασπάσουν ποικίλες οργανικές ενώσεις όπως οργανοχλωριωμένα, τριαζίνες, καρβαμιδικά, οργανοφωσφορικά, και ακετανιλίδια. Αρκετές φορές, έχει παρατηρηθεί και ένα είδος συνεργασίας κοινοπραξίας μεταξύ των βακτηρίων (consortia) των γενών αυτών, όσον αφορά τον μεταβολισμό των γεωργικών φαρμάκων. Παρόλα αυτά δεν είναι ακόμη απόλυτα κατανοητές οι λειτουργίες με τις οποίες η κοινοπραξία μεταξύ των βακτηρίων βιοαποδομεί ένα γεωργικό φάρμακο (Perruchon et al., 2017).

Η διαδικασία της βιοαποδόμησης είναι αρκετά περίπλοκη και περιλαμβάνει και βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Οι βιοτικοί παράγοντες αφορούν την πυκνότητα του πληθυσμού των βακτηρίων και οι αβιοτικοί παράγοντες αφορούν την θερμοκρασία, το pH καθώς και την συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου. Ιδανικά η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων με τη βοήθεια των βακτηρίων, οδηγεί στην πλήρη εξουδετέρωσή τους η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ουσιών οι οποίες είναι χρήσιμες για τον μεταβολισμό των βακτηρίων. Οι ουσίες αυτές συνήθως είναι η ακεταλδεΐδη και το πυροσταφυλικό οξύ (Perruchon et. al. 2017).

Ποικίλες βιοχημικές μέθοδοι έχουν αποδείξει πως και άλλα βακτήρια με παρόμοιες ιδιότητες μπορούν να εξουδετερώνουν το *aldicarb*, ένα καρβαμιδικό εντομοκτόνο το οποίο έχει διαπιστωθεί πως έχει δυσμενείς επιδράσεις στην

ανθρώπινη υγεία. Οι δυσμενείς αυτές επιδράσεις επέρχονται από την αναστολή της δράσης της ακετυλοχολίνης μεταξύ των νευρολογικών συνάψεων (Burgess et. al. 1994, Lifshitz et. al. 1997).

Το βακτήριο με την πιο αποτελεσματική δράση, όσον αφορά την αποδόμηση του *aldicarb*, είναι το *S. maltophilia*. Το βακτήριο αυτό, αποδομεί το καρβαμιδικό εντομοκτόνο με την βοήθεια ενός ενζύμου της εστεράσης, η οποία καταλύει την οργανική χημική ουσία μέσω υδρόλυσης. Το *aldicarb* μπορεί να εξουδετερωθεί και με τη βοήθεια του ενζύμου αμιδάση αλλά η εστεράση έχει αποδειχθεί πολύ πιο αποτελεσματική και έχει βρεθεί ότι προέρχεται από το κυτταρόπλασμα στελεχών του *S. maltophilia* (Turan et. al. 2008).

Παρόλα αυτά, τα βακτήρια, δεν διασπούν πάντα τις ξενοβιοτικές ενώσεις. Ορισμένες φορές η εξουδετέρωση μπορεί να είναι ατελής, κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα προϊόντα τα οποία είναι ακόμη πιο βλαβερά και από το αρχικό προϊόν. Έτσι είναι πολύ σημαντικό να μελετηθεί η διαδικασία της εξουδετέρωσης των γεωργικών φαρμάκων από βακτήρια, σε πιο εκτενή βαθμό (Perruchon et. al. 2017).

1.6. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Οι μύκητες θεωρούνται ένα σημαντικό φυσικό εργαλείο για την βιοαποδόμηση των τοξικών οργανικών χημικών ουσιών. Το γένος *Phanerochaete* και άλλα σχετικά είδη μυκήτων που αποικούν στους κορμούς των δέντρων, έχουν την ιδιότητα να μεταβολίζουν ρύπους. Ο μεταβολισμός αυτός πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενζύμων που παράγονται από τους ίδιους τους μύκητες (Alexander 1999).

Τα περισσότερα είδη σαπροφυτικών μυκήτων παράγουν πληθώρα ενζύμων τα οποία διασπούν τη λιγνίνη, ένα φυσικό πολυμερές το οποίο εντοπίζεται στους ιστούς των φυτών. Η παρουσία των ενζύμων αυτών, δίνει στους μύκητες την δυνατότητα να διασπούν τόσο φυσικά πολυμερή, όσο και τεχνητά πολυμερή.

Τέτοια τεχνητά πολυμερή δεν αποτελούν μόνο τα γεωργικά φάρμακα αλλά και διάφορες χρωστικές και βερνίκια τα οποία έρχονται σε επαφή με ξυλώδεις φυτικές επιφάνειες (Cameron et. al. 2000).

Ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα, το οποίο έχει την δυνατότητα να καταλύει μεγάλο αριθμό χημικών στοιχείων, είναι η υπεροξειδάση η οποία δρα με τη βοήθεια του υπεροξειδίου του υδρογόνου, που παράγεται από τους μύκητες. Ο πιο ευρέως μελετημένος από τους μύκητες αυτούς, είναι ο *Phanerochaete chrysosporium* ο οποίος μπορεί να διασπάσει πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες συμπεριλαμβανομένων των πυρενίων, των ανθρακενίων, του DDT και των βενζοϊκών οξέων, όπως αποτυπώνεται και στην παρακάτω εικόνα 5. (Karas et al., 2011).

Διάφορα στελέχη του *P. chrysosporium* έχουν την ικανότητα να βιοαποδομούν με ταχείς ρυθμούς τα γεωργικά φάρμακα *diuron* και *lindane*. Σε έρευνα η οποία πραγματοποιήθηκε το 2011 από την ομάδα του Karas et. al., μελετήθηκε η ικανότητα τριών μυκήτων λευκής σήψης, του *P. chrysosporium*, του *P. ostreatus* και του *T.versicolor* στη βιοαποδόμηση μυκητοκτόνων τα οποία περιέχονται στα υγρά απόβλητα των βιομηχανιών που συσκευάζουν φρούτα (Karas et. al., 2011),

Συγκεκριμένα οι μύκητες δοκιμάστηκαν σε καλλιέργειες εκχυλίσματος αχύρου που περιείχαν τα γεωργικά φάρμακα, τα οποία και αποδομήθηκαν με εξαιρετικά ταχύ ρυθμό από τους μικροοργανισμούς *T.versicolor* και *P. ostreatus*, μέσα σε δύο ώρες μετά τον εμβολιασμό του δείγματος. Το φάρμακο *diphenylamine* αποδομήθηκε πλήρως και πολύ γρήγορα από τον μύκητα *P. chrysosporium*, σε αντίθεση με το *ortho-phenylphenol* και το *thiophanate methyl* τα οποία αποδομήθηκαν με πιο αργούς ρυθμούς και παρουσίασαν ποσοστό αποδόμησης 70 και 95% αντίστοιχα (Karas et. al. 2011).

Pollutant	Enzyme	Source	Pollutant removal
Azo dyes	Laccase	<i>P. sanguineis</i>	Up to 60%
Biopolymers (kraft, lignin)	LiP, MnP	White rot fungi	Very significant
Bleach plant effluents	Laccase	<i>P. sanguineis</i>	85%
CCl ₄ , CHCl ₃	LiP, MnP, CDH	<i>P. chrysosporium</i>	Up to 50%
PAHs	LDs, Laccase	<i>P. chrysosporium</i> , <i>T. versicolor</i>	70–100%, high
PCBs (1–6 Cl substitutions)	LiP, MnP	<i>C. polyzona</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i>	Very significant
PCP	LDs	<i>P. chrysosporium</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>I. dryophilus</i>	99%–very high
TNT, RDX	LiP, MnP, CDH	White rot fungi	30–50%, high

Εικόνα 5. Αποδόμηση οργανικών ρύπων με τη χρήση μυκήτων. Πηγή: Rubilar et. al. 2008

1.7 ΑΠΟΡΡΟΗ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ

Τα επιφανειακά ύδατα περιλαμβάνουν ρυάκια, ποτάμια, λίμνες, τεχνητές λίμνες και ωκεανούς. Τα ρυάκια, τα ποτάμια και οι τεχνητές λίμνες τροφοδοτούν περίπου το 50% του πόσιμου νερού του πλανήτη. Τα ύδατα αυτά, ανεφοδιάζονται με νερό, μέσω της τήξης του χιονιού ή της εισροής του νερού της βροχής, που δεν μπορεί να απορροφηθεί από το έδαφος (Toth και Buhler 2009).

Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ποσότητα των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος στα πρώτα 2-3 εκ. είναι αρκετοί. Αυτοί περιλαμβάνουν τον τύπο εφαρμογής του φαρμάκου, τον τύπο του εδάφους, τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, καθώς και τον χρόνο ημιζωής του γεωργικού φαρμάκου (Toth και Buhler 2009).

Η απορροή ορίζεται ως η κίνηση του νερού σε επικλινές έδαφος, η οποία μπορεί να μεταφέρει τα γεωργικά φάρμακα, τα οποία είναι διαλυμένα στο νερό ή να

διαλυτοποιήσει τα γεωργικά φάρμακα που είναι προσκολλημένα σε τμήματα του εδάφους και να ρυπάνει περαιτέρω τους υδάτινους πόρους. Η ποσότητα των γεωργικών φαρμάκων που μεταφέρεται μέσω της απορροής εξαρτάται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους και το ποσοστό της υγρασίας που περιέχει, την συχνότητα των βροχοπτώσεων, και τον τύπο και τις φυσικές ιδιότητες του φαρμάκου. Στην υδατοδιαλυτή μορφή, τα γεωργικά φάρμακα, ακολουθούν την ροή του νερού ενώ όταν είναι προσκολλημένα σε τμήματα εδάφους, ακολουθούν τη ροή των εδαφικών σωματιδίων (Kerle et. al. 2007).

Με τη βοήθεια της απορροής, τα γεωργικά φάρμακα απομακρύνονται από την επιφάνεια του εδάφους αλλά καταλήγουν στα υπόγεια ύδατα, τα οποία και τα ρυπαίνουν. Τουλάχιστον 143 είδη γεωργικών φαρμάκων και τα υποπροϊόντα τους, έχουν ανιχνευθεί στα υπόγεια ύδατα (Tiryaki et. al. 2010).

Μερικά από τα πιο συνηθισμένα είναι οι τριαζίνες και τα ακετανιλίδια τα οποία χρησιμοποιούνται στο καλαμπόκι και τη σόγια και το καρβαμιδικό εντομοκτόνο *aldicarb*. Από την μόλυνση των υπογείων υδάτων μπορεί να προκληθεί τόσο φυτοτοξικότητα σε καλλιέργειες όσο και προβλήματα σε ανθρώπους και ζώα, που χρησιμοποιούν μέρος των υδάτων αυτών ως πόσιμο (Tiryaki et. al. 2010).

1.8. ΕΚΠΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

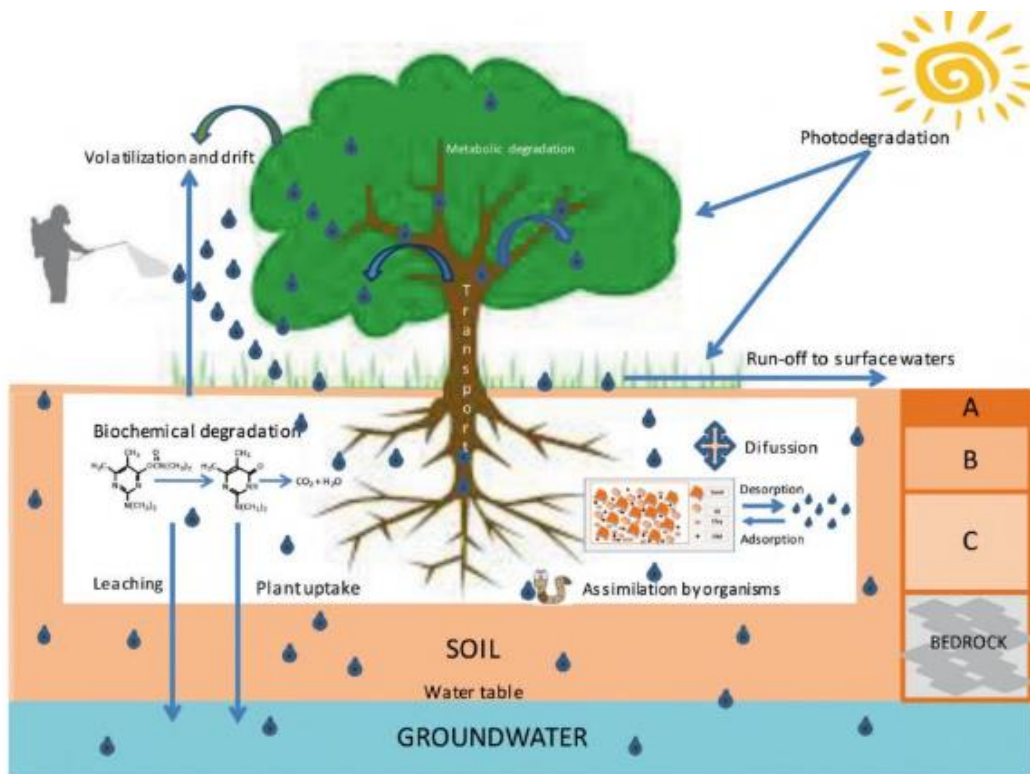
Έκπλυση ορίζεται ως η κίνηση των γεωργικών φαρμάκων δια μέσω του εδάφους, με αποτέλεσμα τη ρύπανση και επιβάρυνση των υπόγειων υδάτων με αυτά. Υπάρχουν δύο τύποι ροής που σχετίζονται με την έκπλυση. Ο ένας τύπος αποτελεί την γρήγορη ροή, στην οποία η δραστική ουσία μετακινείται γρήγορα στα έδαφος μέσω της ροής του νερού που ρέει στα μικρά κανάλια που σχηματίζονται από τις ρίζες των φυτών ή από τις στοές των γεωσκωλήκων (Larramendy et. al. 2019). Στην περίπτωση αυτή, ανάλογα και με το ποσοστό προσρόφησης των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος, οι δραστικές ουσίες

παραμένουν μικρότερο διάστημα στο έδαφος με αποτέλεσμα την μειωμένη πιθανότητα βιοαποδόμησης τους στο έδαφος.

Ο δεύτερος τύπος αποτελεί μία πιο αργή ροή, στην οποία η δραστική ουσία μετακινείται μέσα από μικρούς πόρους του εδάφους με αποτέλεσμα να συγκρατείται από τα εδαφικά σωματίδια (Larramendy et. al. 2019).

Οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ταχύτητα ροής ενός γεωργικού φαρμάκου, ποικίλουν και περιλαμβάνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου, την διαλυτότητά του καθώς και τον χρόνο παραμονής του στο εδαφικό διάλυμα. Όσον αφορά τους εξωγενείς παράγοντες, η κλιματική αλλαγή παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παραμονή ενός γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος καθώς και στον ρυθμό αποδόμησης του. Συγκεκριμένα, η έκπλυση ενός γεωργικού φαρμάκου, μπορεί να επηρεαστεί από την κλιματική αλλαγή είτε άμεσα με απότομες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και τις εκτεταμένες βροχοπτώσεις είτε έμμεσα από την εναλλαγή των γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται κατά την αγροτική πρακτική σε μία καλλιέργεια, προκειμένου να αντιμετωπιστούν νέα είδη εχθρών και ασθενειών (Ahmad et. al. 1995).

Επιπλέον, η συνεχόμενη αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να επιταχύνει την αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος, συνεπώς να μειώνεται η πιθανότητα έκπλυσής του και η μεταφορά του στον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα. Παρόλα αυτά, οι υψηλές θερμοκρασίες είναι δυνατό να απελευθερώσουν πιθανές τοξικές ενώσεις από τα εδαφικά σωματίδια μέσω της ενεργοποίησης ενδόθερμων αντιδράσεων κατά τον μεταβολισμό των πρόδρομων ουσιών. Έτσι μέσω πιθανής έντονης βροχόπτωσης οι ενώσεις αυτές τελικά θα εκπλυθούν αυξάνοντας τον κίνδυνο κατάληξής τους στα υπόγεια ύδατα. Στην παρακάτω εικόνα 6 αποτυπώνεται η πορεία των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος και η επιρροή που ασκούν σε αυτά οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (Ahmad et. al. 1995).



Εικόνα 6. Η περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος. Πηγή: Larramendy and Solonenski, 2019

1.9. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ

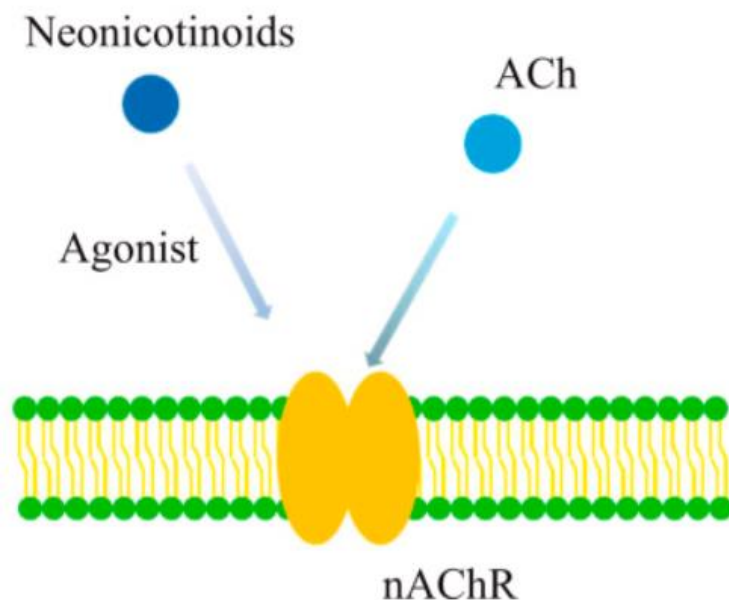
Όπως είναι γνωστό και στην γενικότερη περίπτωση των γεωργικών φαρμάκων, έτσι και στην περίπτωση των μυκητοκτόνων, χρησιμοποιούνται διάφορες βιολογικές μέθοδοι αποδόμησης τους, οι οποίες υπερτερούν των φυσικοχημικών μεθόδων. Στις βιολογικές μεθόδους περιλαμβάνονται και τα ένζυμα τα οποία παράγονται από μύκητες και βακτήρια, με τα πιο συνήθη ένζυμα που χρησιμοποιούνται, να είναι αυτά που πραγματοποιούν αντιδράσεις οξειδωσης όπως για παράδειγμα οι οξυγενάσες, οι μονοοξυγενάσες, οι λακάσες, οι διοξυγενάσες και οι υπεροξειδάσες (Al-Maqdi et. al. 2017).

1.10. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ

ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΔΟΕΙΔΩΝ

Τα νεονικοτινοειδή αποτελούν μερικά από τα πιο σημαντικά εμπορικά εντομοκτόνα παγκοσμίως. Είναι συστημικά εντομοκτόνα, ευρέως φάσματος, και έχουν καινοτόμο τρόπο δράσης καθώς παρεμποδίζουν την λειτουργία του νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης, όπως φαίνεται στην εικόνα 7, οδηγώντας το έντομο σε παράλυση και θάνατο (Matsuda et. al. 2009).

Αυτές οι χημικές ενώσεις είναι αποτελεσματικές ενάντια σε πολυάριθμα μασητικά και μυζητικά έντομα, στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι αφίδες, οι θρίπες και τα κολεόπτερα (Nauen et. al. 2003). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νεονικοτινοειδών, επιτρέπουν την εφαρμογή τους με ποικίλους τρόπους. Δηλαδή μπορούν να εφαρμοστούν είτε στον μίσχο, είτε διαφυλλικά, είτε στους σπόρους ή ακόμη και με υδρονέφωση (Nauen et. al. 2003).



Εικόνα 7. Η δράση των νεονικοτινοειδών στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα των εντόμων.
Πηγή: Wang et. al. 2013

Αρκετοί ερευνητές έχουν δείξει πως τα νεονικοτινοειδή έχουν επιβλαβείς επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους όπως οι μέλισσες, τα υδρόβια ζώα, τα

πουλιά και τα θηλαστικά. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα, να απασχολήσει έντονα την επιστημονική κοινότητα στην εξυγίανση οικοσυστημάτων τα οποία ήταν ρυπασμένα με τον συγκεκριμένο τύπο χημικών (Zhang et. al. 2023).

Η εφεύρεση μιας βιώσιμης και στοχευμένης τεχνικής αποδόμησης των νεονικοτινοειδών, άρχισε να αποτελεί προτεραιότητα για τους ερευνητές. Είναι γνωστό πως η οξειδωση μέσω της αντίδρασης Fenton, προκαλεί φωτοχημική αποδόμηση των χημικών αυτών. Η αντίδραση Fenton αποσυνθέτει το υπεροξείδιο του υδρογόνου, με τη δράση ιόντων σιδήρου, παράγοντας πολύ δραστικές ρίζες υδροξυλίου (Zhang et. al. 2023).

Όμως, οι τεχνικές χημικής αποδόμησης είναι κοστοβόρες και μπορεί να οδηγήσουν σε περαιτέρω ρύπανση, μέσω του σχηματισμού προϊόντων μεταβολισμού τοξικότερα της αρχικής ουσίας. Μία πιο οικολογική, οικονομική και πιο αποτελεσματική μέθοδος είναι η χρήση ορισμένων μικροοργανισμών, οι οποίοι είναι γνωστοί για την ιδιότητα τους να αποδομούν τα νεονικοτινοειδή. Μερικοί από αυτούς είναι οι *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus thuringiensis*, *Ensifer meliloti*, *Pseudomonas stutzeri*, *Hymenobacter latericoloratus*, *Variovorax boronicumulans*, *Phanerochaete sordida*, *Streptomyces canus*, και *Fusarium* sp., οι οποίοι έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί (Pang et. al. 2020, Zhang et. al. 2022, Gautam et. al. 2022).

Οι μικροοργανισμοί αυτοί παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα βιοαποδόμησης μέσα από διαφορετικούς μηχανισμούς και μεταβολικά μονοπάτια. Παρόλα αυτά, τα ένζυμα που απαιτούνται για την αποδόμηση των νεονικοτινοειδών και τα γονίδια που τα κωδικοποιούν, δεν έχουν μελετηθεί αρκετά. Επιπλέον, υπάρχει περιορισμένος αριθμός εργασιών που αναφέρεται στο ποσοστό τοξικότητας των φυτοχημικών αυτών σε μολυσμένα περιβάλλοντα (Zhang et. al. 2023).

1.11. TO ENTOMOKTONO ACETAMIPRID

Το *Acetamiprid*, ανήκει στα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα 8, ανήκει στις οργανικές ενώσεις. Το μοριακό του βάρος είναι 222,7 g/mol, το σημείο τήξεώς του έχει βρεθεί ότι είναι 98,9 βαθμοί Κελσίου και η διαλυτότητά του στο νερό είναι 2950mg/L. Η ισχύς του είναι μεγαλύτερη

από τα συμβατικά εντομοκτόνα, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του, και θεωρείται σημαντικό υποκατάστατο των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, έχουν προκαλέσει σημαντική μόλυνση στο περιβάλλον και ανθεκτικότητα σε πλήθος βλαβερών εντόμων, με αποτέλεσμα να έχει ελαττωθεί η χρήση τους στις περισσότερες χώρες (Wang et. al. 2013).

Λόγω της ευρείας χρήσης του είναι πιθανό να προκαλεί τοξικότητα και στους ανθρώπους, γι' αυτό τα υπολείμματα του *acetamiprid* στο περιβάλλον και η βιοαποδόμησή τους, ερευνώνται με ιδιαίτερο ζήλο (Li et. al. 2012). Για την καλύτερη κατανόηση του χρόνου παραμονής ενός γεωργικού φαρμάκου στο φυσικό περιβάλλον, και συγκεκριμένα στο έδαφος, είναι απαραίτητος ο υπολογισμός μιας τιμής η οποία ονομάζεται χρόνος ημιζωής (DT₅₀). Ο χρόνος ημιζωής ορίζεται ως ο χρόνος (σε ημέρες) που απαιτείται η συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου να φτάσει στο 50% της αρχικής του συγκέντρωσης. Ο χρόνος ημιζωής του *acetamiprid* έχει εκτιμηθεί ότι είναι 5,5-17,4 ημέρες (Pietrzak et. al. 2020).

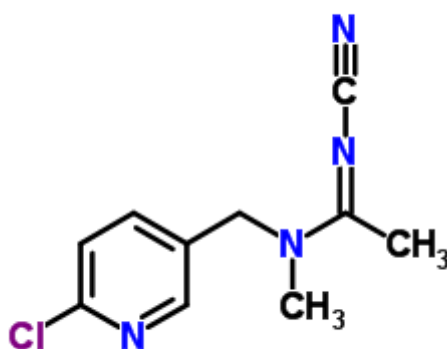
Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Χημικών Προϊόντων (ECHA), τα όρια ανίχνευσης (MRLs) του *acetamiprid* σε φρούτα, φρέσκα ή κατεψυγμένα, είναι 0,01mg/kg. Σε φυλλώδη λαχανικά, βότανα και εδώδιμα άνθη είναι 0,4 mg/kg, ενώ σε προϊόντα ζωϊκής προελεύσεως τα όρια ανίχνευσης είναι 0,5mg/kg. Επιπλέον, στους μύκητες, τα βρύα και τις λειχήνες το όριο ανίχνευσης είναι 0,01mg/kg ενώ στα μούρα και τους μικρούς εδώδιμους καρπούς, είναι 0,5mg/kg (ECHA 2024).

Για την καλύτερη κατανόηση των συνεπειών που μπορεί να προκληθούν από την κατανάλωση υπολειμμάτων του γεωργικού φαρμάκου στους ανθρώπους και άλλα θηλαστικά, έχει πραγματοποιηθεί πληθώρα ερευνών. Τοξικολογικά δεδομένα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (F.A.O), έδειξαν η μέση θανατηφόρος δόση του φαρμάκου (LD₅₀) σε ποντίκια, βρίσκεται στο εύρος 140-417mg/kg σωματικού βάρους. Με την χορήγηση της δοσολογίας αυτής από το στόμα, παρατηρήθηκαν συμπτώματα όπως τρέμουλο, σπασμοί και διαστολή της κόρης των ματιών (F.A.O, 2005).

Η LD₅₀ που παρατηρήθηκε μετά από δερματική έκθεση, στα ποντίκια, ήταν μεγαλύτερη από 2000mg/kg σωματικού βάρους. Όταν το *acetamiprid*

χορηγήθηκε με εισπνοή τότε η μέση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC₅₀), παρατηρήθηκε ότι ήταν μεγαλύτερη από 1.15mg/L αέρα. Η διαστολή της κόρης των ματιών παρατηρήθηκε σε αρκετά ποντίκια ενώ το τρέμουλο και οι σπασμοί σε λιγότερα. Παρόμοιες έρευνες πραγματοποιήθηκαν και σε σκύλους. Οι αποκρίσεις των ζώων στην τοξικότητα του γεωργικού φαρμάκου περιλάμβαναν, εκτός από τις παραπάνω συμπεριφορές, και μειωμένη κατανάλωση φαγητού καθώς και απώλεια σωματικού βάρους (F.A.O 2005).

Επιπλέον, σε μία έρευνα η οποία διήρκησε 13 εβδομάδες, το επίπεδο μη παρατηρούμενου ανεπιθύμητου αποτελέσματος (NOAEL) στα ποντίκια, βρέθηκε ότι ήταν ίσο με 400 ppm το οποίο ισούται με 53.3mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα. Στη συγκέντρωση των 800 ppm, το οποίο ισούται με 106,1mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της χοληστερόλης στο αίμα, στα θηλυκά ποντίκια. Σε ακόμη υψηλότερες δόσεις, παρατηρήθηκε απώλεια σωματικού βάρους, μείωση του pH των ούρων, μειωμένη συγκέντρωση αιμογλοβίνης στο αίμα και τρέμουλο (F.A.O 2005).

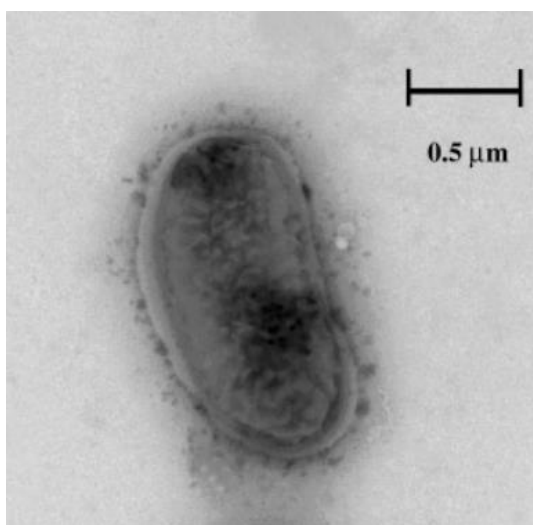


Εικόνα 8. Ο χημικός τύπος του γεωργικού φαρμάκου *acetamiprid*. Πηγή: Patil et. al. 2021

1.12. Η ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ACETAMIPRID ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Ένας αριθμός μικροοργανισμών έχει τη δυνατότητα να αποικοδομεί το *acetamiprid*. Ένας από αυτούς είναι ο μύκητας *Rhodotorula mucilaginosa* ο οποίος έχει την ικανότητα να το υδρολύει, και το στέλεχος CGMCC 1.1788 του βακτηρίου *Stenotrophomonas maltophilia* το οποίο αφαιρεί μία ρίζα μεθυλίου, από το *acetamiprid*, και παράγει τον μεταβολίτη IM2-1. Επιπλέον, έχει απομονωθεί και το στέλεχος AAP-1 του είδους βακτηρίων *Pigmetophaga sp.* (Dai et. al. 2010, Chen et. al. 2008).

Στελέχη του *Stenotrophomonas sp.* και του *Pigmetophaga sp.* (Εικόνα 9) παρατηρήθηκε ότι μπορούν να αποδομήσουν έως και το 58.9% ή 570mg/L *acetamiprid* σε οχτώ ημέρες και 50mg/L μετά από 72 ώρες. Η αποδόμηση αυτή μπορεί να πραγματοποιήθηκε σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα διότι η καλλιέργεια των βακτηρίων, η οποία συνέβαλλε στην αποικοδόμηση, αποτελούνταν από περισσότερα από ένα είδη βακτηρίων (Copley 2009).



Εικόνα 9. Βακτήριο του είδους *Pigmetophaga sp.* Πηγή: (Wang et. al. 2013).

Ένας από τους λόγους για τους οποίους μία καλλιέργεια βακτηρίων, που αποτελείται από ένα μόνο είδος, δεν μπορεί να αποδομήσει ένα φυτοχημικό όπως το *acetamiprid* τόσο αποτελεσματικά, είναι λόγω των ενδιάμεσων τοξικών μεταβολιτών που προκύπτουν από την διαδικασία. Επιπλέον, περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το pH και η υγρασία, είναι δυνατό να επηρεάσουν αρνητικά τη διαδικασία της αποδόμησης (Copley et. al. 2009).

Στο εξωτερικό περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένου και του εδάφους, το 99% των μικροβίων ζουν σε κοινοπραξίες. Σε σύγκριση με τις αποικίες που αποτελούνται από ένα μόνο μικροοργανισμό, οι κοινοπραξίες διαθέτουν προσαρμοστική ικανότητα και μπορούν να αντιμετωπίσουν πιο περίπλοκες περιβαλλοντικές διαταραχές. Ακόμη, λόγω του συνδυασμού των αλληλεπιδράσεων διαφορετικών ειδών μπορούν να προκαλέσουν και ενζυματικές καταλύσεις, όπως για παράδειγμα ο καθαρισμός του νερού (Xu et. al. 2020).

Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί αρκετές έρευνες σχετικά με την αποδόμηση των νεονικοτιδοειδών εντομοκτόνων, από βακτήρια, και πιο συγκεκριμένα από κοινοπραξίες βακτηρίων, κάτω από ποικίλες συνθήκες pH και θερμοκρασιών. Πιο συγκεκριμένα, δύο δείγματα εδάφους τα οποία περιείχαν *acetamiprid* και αποικίες μικροβίων του είδους *Enterobacter sp.* υπέδειξαν πλήρη εξουδετέρωση του νεονικοτινοειδούς χωρίς την παραγωγή δευτερευόντων τοξικών ρύπων, αποδεικνύοντας την ισχύ της συνεργιστικής δράσης διαφορετικών στελεχών βακτηρίων (Xu et. al. 2020).

Τα βακτήρια χρησιμοποίησαν το *acetamiprid* ως την κύρια πηγή άνθρακα και η βιοαποικοδόμησή του ταυτοποιήθηκε από την ανίχνευση των ενδιάμεσων προϊόντων, που προέκυψαν από τη διαδικασία. Η τεχνική αυτή χαρακτηρίστηκε βιώσιμη και πολύ αποτελεσματική (Xu et. al. 2020).

1.13. Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν αρχικά να μελετηθεί η περιβαλλοντική τύχη του εντομοκτόνου *acetamiprid* σε δείγματα εδάφους. Για το λόγο αυτό επιμέρους χρειάστηκε να δημιουργηθεί μια μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του *acetamiprid* σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης και η δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Στη συνέχεια, σκοπός της μελέτης αποτέλεσε και η ανάγκη εύρεσης κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης του γεωργικού φαρμάκου από το έδαφος και τέλος την ανάλυση δειγμάτων εδάφους που ήταν επιβαρυμένα με το εντομοκτόνο *acetamiprid*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC)

Η χρωματογραφική ανάλυση περιλαμβάνει μια σειρά μεθόδων διαχωρισμού μειγμάτων ανόργανων ή οργανικών ουσιών. Στην περίπτωση των γεωργικών φαρμάκων, πρόκειται για οργανικές ουσίες. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω μιας στατικής και μιας κινητής φάσης, οι οποίες βρίσκονται στην χρωματογραφική στήλη.

Η κινητή φάση, η οποία μπορεί να αποτελείται είτε από υγρά συστατικά είτε από αέρια, ονομάζεται υγρό έκλουσης και το διάλυμα που εξέρχεται από την στήλη έκλουσμα. Στο τέλος της στήλης τοποθετείται ανιχνευτής που παρακολουθεί μια αναλυτική ιδιότητα και παράγει σήμα κάθε φορά που εκλούεται ένα συστατικό. Το διάγραμμα του σήματος, συναρτήσει του όγκου ή του χρόνου ονομάζεται χρωματογράφημα και παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του δείγματος.

Για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός, τα συστατικά πρέπει να μετακινούνται ταχύτερα από ότι διευρύνονται. Η διεύρυνση είναι ανεπιθύμητη διότι δεν επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός. Επιπλέον, οι διευρυμένες κορυφές είναι ακατάλληλες για ποσοτική ανάλυση.

Το εύρος ροής στην υγρή χρωματογραφία είναι από 0,5 έως 5ml/min και επιτυγχάνεται με αντλίες που λειτουργούν σε υψηλές πιέσεις (300-7500 PSI). Οι συνηθισμένες στήλες αποτελούνται με υλικό πλήρωσης το διοξείδιο του πυριτίου (silica) μεγέθους 5μm, το οποίο είναι ένα ανόργανο υλικό, δεν αντιδρά με τις ενώσεις προς ανάλυση και έχουν καλή ικανότητα διαχωρισμού των ενώσεων. Η έκλουση γίνεται είτε ισοκρατικά, όπου η σύσταση της κινητής φάσης δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, είτε βαθμιδωτά όπου η ισχύς της κινητής φάσης μεταβάλλεται επιτυγχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό.

Οι ανιχνευτές που περιέχονται σε ένα μηχάνημα υγρής χρωματογραφίας, είναι δύο. Ο πρώτος είναι ο ανιχνευτής δείκτη διαθλάσεως, ο οποίος είναι γενικής χρήσεως και βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς του δείκτη διάθλασης μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Ο ανιχνευτής αυτός έχει μεγάλη ευαισθησία στην θερμοκρασία και θερμοστατείται. Ο δεύτερος είναι ο ανιχνευτής UV-VIS ο

οποίος είναι ευαίσθητος για αρκετές ενώσεις και είναι είτε σταθερού είτε μεταβαλλόμενου μήκους κύματος.



Εικόνα 10. Συσκευή HPLC. Πηγή: Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

2.2. Δείγματα επιφορτισμένα με acetamiprid

Στο πανεπιστήμιο UFZ της Λειψίας στη Γερμανία, στο τμήμα Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας έγιναν πειράματα μικροκόσμων, όπου κατάλληλη ποσότητα acetamiprid εφαρμόστηκε σε τέσσερα διαφορετικά εδάφη της περιοχής ώστε η τελική συγκέντρωση του φαρμάκου να φτάσει στο 0,125 mg/Kg εδάφους. Στη συνέχεια, από τα επιφορτισμένα εδάφη κατάλληλη ποσότητα πάρθηκε στις 0, 7 και 21 ημέρες μετά την εφαρμογή του acetamiprid σε τρεις επαναλήψεις και τα δείγματα καταψύχθηκαν και στάλθηκαν στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών

και Περιβάλλοντος, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την περαιτέρω ανάλυσή τους.

2.3. Παρασκευή πρότυπης καμπύλης Acetamiprid

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του γεωργικού φαρμάκου της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε με την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκε αρχικά διάλυμα του acetamiprid συγκέντρωσης 1000 mg/L σε μεθανόλη (Merck GmbH, Germany), ζυγίζοντας κατάλληλη ποσότητα αναλυτικού πρότυπου acetamiprid καθαρότητας 99%, από την εταιρεία HPC-standards από τη Γερμανία. Στη συνέχεια, ποσότητα από το αρχικό διάλυμα του acetamiprid πάρθηκε και τοποθετήθηκε σε γυάλινη ογκομετρική φιάλη των 10 ml για την παρασκευή διαλύματος acetamiprid 100 mg/L και συμπληρώθηκε ποσότητα μεθανόλης μέχρι τη χαραγή της φιάλης. Το παραπάνω διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία με διαδοχικές αραιώσεις, πρότυπα διαλύματα σε μεθανόλη συγκέντρωσης 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1 και 0.05 mg/L. Τα εν λόγω διαλύματα στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς σε σύστημα HPLC.

2.4. Ανάλυση του γεωργικού φαρμάκου acetamiprid σε σύστημα HPLC

Το acetamiprid αναλύθηκε σε σύστημα HPLC (ECOM HPLC system 2000) αποτελούμενο από ανιχνευτή πολλαπλών διοδίων (diode array detector) (Εικόνα 10) και στήλη C18 reverse phase διαστάσεων 4.6 x 150 mm (Athena, CNW, Shanghai). Η έκλουση του φαρμάκου έγινε με κινητή φάση αποτελούμενη από ακετονιτρίλιο και υδατικού διαλύματος ορθοφωσφορικού οξέως 0.1% σε αναλογία 30:70 αντίστοιχα και με ροή 1 ml/min. Η ανίχνευση του acetamiprid έγινε στα 245 nm και ο χρόνος κατακράτησης ήταν στα 4.97 min.

2.5. Μέθοδος εκχύλισης του acetamiprid από το έδαφος

Για την εκχύλιση του γεωργικού φαρμάκου acetamiprid από το έδαφος πραγματοποιήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία: Αρχικά ζυγίζονται 5g εδάφους σε γυάλινες κωνικές φιάλες των 100ml και στη συνέχεια προστίθενται 10 ml ακετονιτριλίου. Οι κωνικές στη συνέχεια τοποθετούνται σε επιτραπέζιο αναδευτήρα και αναδεύονται στα 300rpm για 1 ώρα. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο διάλυμα από τις κωνικές φιάλες τοποθετείται σε πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon και στη συνέχεια οι οποίες φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στα 7000rpm και στους 24 °C. Το υπερκείμενο διάλυμα φιλτράρεται σε γυάλινα φιαλίδια με πώμα, με τη βοήθεια φίλτρων σύριγγας μεγέθους πόρων 0,45μm και διαμέτρου 25mm (PTFE μεμβράνης) και τοποθετούνται σε μικρά γυάλινα μπουκαλάκια, στους -20 βαθμούς Κελσίου, μέχρι την ανάλυση.

2.6. Επικύρωση της μεθόδου εκχύλισης του acetamiprid από το έδαφος

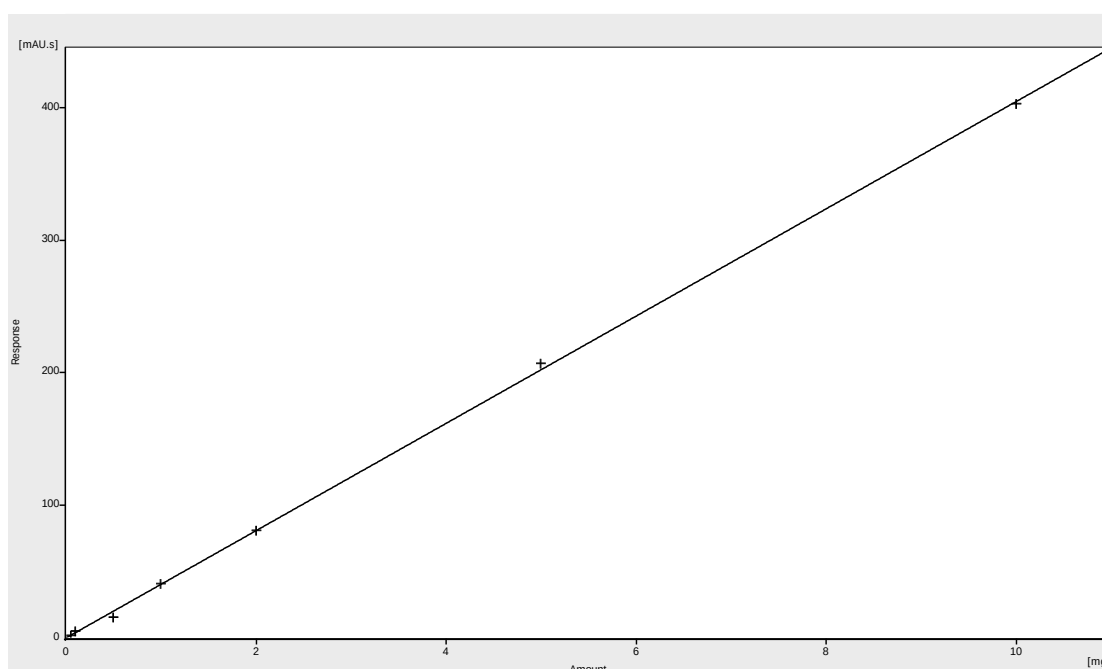
Στη συνέχεια των πειραμάτων και την επικυροποίηση της μεθόδου χρειάστηκε να γίνει εφαρμογή του acetamiprid σε έδαφος χωρίς ιστορικό εφαρμογής με το εν λόγω γεωργικό φάρμακο και να δοκιμαστεί η μέθοδος εκχύλισης. Για το λόγο αυτό σε τρία ξεχωριστά δείγματα εδάφους των 100 γρ εφαρμόστηκε κατάλληλη ποσότητα acetamiprid από το αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 100 mg/L για τη δημιουργία τριών επιπέδων φόρτισης των εδαφών 1 mg/Kg, 0,5 mg/Kg και 0,1 mg/Kg. Τέλος ζυγίστηκαν 5 γρ δείγματος από κάθε επίπεδο φόρτισης των εδαφών με acetamiprid, σε τρεις επαναλήψεις ανά συγκέντρωση, τοποθετήθηκαν σε γυάλινες κωνικές φιάλες των 100 ml και συνεχίστηκε η διαδικασία εκχύλισης του γεωργικού φαρμάκου όπως αναφέρεται παραπάνω.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

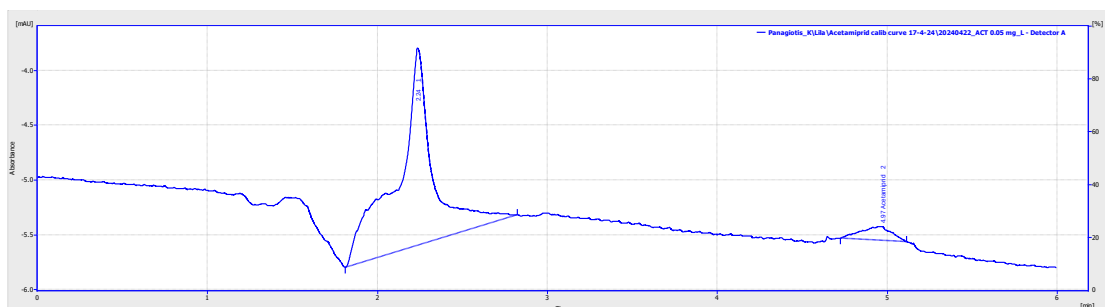
Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς για την ποσοτικοποίηση του γεωργικού φαρμάκου acetamiprid χρησιμοποιήθηκαν 7 πρότυπα διαλύματα τα οποία και εγχυθήκανε στο σύστημα HPLC που αναφέρθηκε παραπάνω. Με τη βοήθεια του προγράμματος Clarity κατασκευάστηκε η γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 1. Η εξίσωση υπολογισμού της συγκέντρωσης του acetamiprid με βάση την γραφική παράσταση ήταν $y = 40.4528 \cdot x$ και τον συντελεστή συσχέτισης (r) να είναι 0.9998, αποδεικνύοντας έτσι μια ικανή γραμμική συσχέτιση της μεθόδου και έγινε αποδεκτή για την συνέχιση των πειραμάτων της παρούσας μελέτης.



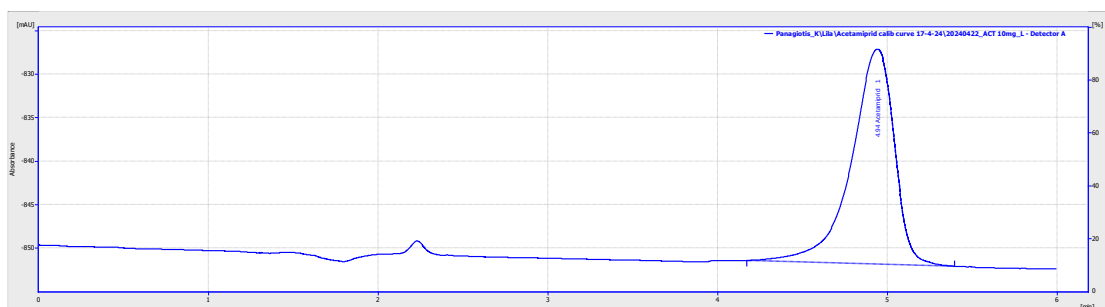
Διάγραμμα 1. Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς για το acetamiprid

Η μικρότερη συγκέντρωση που εγχύθηκε στο σύστημα του HPLC και μπόρεσε να ποσοτικοποιηθεί με βάση και τον θόρυβο του μηχανήματος ήταν αυτή του 0.05 mg/L acetamiprid σε μεθανόλη (διάγραμμα 2). Η συγκέντρωση αυτή αποτέλεσε και το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) για την εν λόγω ένωση. Μικρότερες συγκεντρώσεις του LOD δοκιμάστηκαν να ανιχνευτούν αλλά δεν κατέστη δυνατόν να ξεχωρίσουν από τον θόρυβο του μηχανήματος.

Ενδεικτικά, παραθέτετε παρακάτω το διάγραμμα ενός χρωματογράφηματος συγκέντρωσης 1 mg/L σε μεθανόλη για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς (διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 2. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος acetamiprid συγκέντρωσης 0.05 mg/L σε μεθανόλη, που αποτελεί και το LOD της μεθόδου ανίχνευσης.



Διάγραμμα 3. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος acetamiprid συγκέντρωσης 1 mg/L σε μεθανόλη

3.2. Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου εκχύλισης

Μετά την εφαρμογή του εντομοκτόνου acetamiprid σε έδαφος χωρίς ιστορικό προηγούμενης εφαρμογής του σε αυτό και σε τρία επίπεδα φόρτισης 1, 0.5 και 0.1 mg/Kg, χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος εκχύλισης του γεωργικού φαρμάκου που θα χρησιμοποιούνταν και στα δείγματα της μελέτης. Η διαδικασία αυτή έδειξε ότι τα ποσοστά ανάκτησης του acetamiprid από το έδαφος και για τα τρία επίπεδα φόρτισης κυμάνθηκε από 98.1 έως 106.7%, τα οποία ποσοστά είναι άκρως ικανοποιητικά και αποδεκτά για μια μέθοδο εκχύλισης γεωργικών φαρμάκων (πίνακας 1).

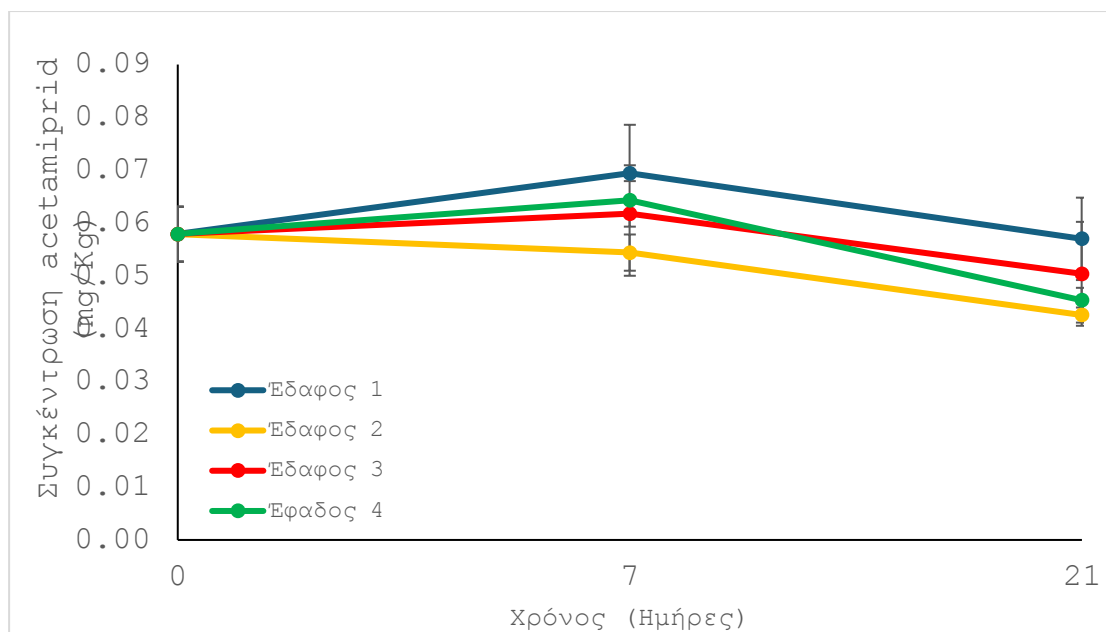
Όσο αφορά την επαναληψιμότητα της μεθόδου υπολογίστηκε η ποσοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (RSD) των δειγμάτων κάθε επιπέδου φόρτισης, η οποίες τιμές ήταν 3.8, 3.7 και 2.9 για τα επίπεδα φόρτισης 1, 0.5 και 0.1 mg/Kg acetamiprid στο έδαφος, αντίστοιχα (πίνακας 1).

Πίνακας 1. Αποτελέσματα ποσοστών από την ανάκτηση του acetamiprid στα διάφορα επίπεδα εφαρμογής του, σε έδαφος χωρίς ιστορικό εφαρμογής του.

Επίπεδο συγκέντρωσης	HPLC	Μέσος Όρος	Τυπική Απόκλιση	Ποσοστό Ανάκτησης (%)	Σχετική τυπική Απόκλιση RSD (%)
1mg/Kg A	1,006	0,987	0.038	98,7	3,81
1mg/Kg B	0,944				
1mg/Kg C	1,012				
0.5mg/Kg A	0,504	0,491	0.018	98,1	3,70
0.5mg/Kg B	0,47				
0.5mg/Kg C	0,498				
0.1mg/Kg A	0,11	0,107	0,003	106,7	2,86
0.1mg/Kg B	0,106				
0.1mg/Kg C	0,104				

3.3. Ανάλυση δειγμάτων εδάφους επιβαρυμένα με acetamiprid

Μετά την επικαιροποίηση της μεθόδου εκχύλισης σε δείγματα εδάφους όπου δεν υπήρχε ιστορικό χρήσης του γεωργικού φαρμάκου acetamiprid, έγινε ανάλυση των δειγμάτων εδάφους που στάλθηκαν από το εργαστήριο του Πανεπιστημίου UFZ της Λειψίας. Το acetamiprid εφαρμόστηκε από το εν λόγω εργαστήριο, σε συγκέντρωση 0.125 mg/Kg σε όλα τα εδάφη και παρατηρήθηκε ότι η γρηγορότερη διάσπαση του acetamiprid ήταν στο έδαφος 2 με ποσοστό 26% ενώ στο έδαφος 1 ήταν η μικρότερη διάσπαση που παρατηρήθηκε με το ποσοστό να φτάνει στο 5% στο τέλος του πειράματος. Τα ποσοστά διάσπασης του acetamiprid που παρατηρήθηκε για τα εδάφη 3 και 4 έφτασε στο 13 και 22%, αντίστοιχα (διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4. Διάσπαση του acetamiprid στα 4 εδάφη της μελέτης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Συμπεράσματα και συζήτηση

Η παρούσα έρευνα αφορούσε την δημιουργία κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης του γεωργικού φαρμάκου *acetamiprid* από δείγματα εδάφους, με την βοήθεια υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς που προέκυψε από την έγχυση των 7 πρότυπων διαλυμάτων *acetamiprid*, είχε χαμηλό όριο ανίχνευσης, τα 0,05mg/L *acetamiprid* σε μεθανόλη, αποτέλεσμα το οποίο είναι πολύ ικανοποιητικό. Επιπλέον, από την διαδικασία της εκχύλισης του γεωργικού φαρμάκου από το έδαφος, και για τα τρία επίπεδα φόρτισης, προέκυψαν επαρκή και αποδεκτά ποσοστά ανάκτησης, τα οποία κυμάνθηκαν από 98.1% έως και 106,7%. Σε όλα τα εδάφη που εφαρμόστηκε το *acetamiprid* σε συγκέντρωση 0,125mg/kg, παρατηρήθηκαν μικρά ποσοστά διάσπασης, με το μικρότερο από αυτά να φτάνει μόλις το 5% στο τέλος του πειράματος και το μεγαλύτερο στο 26%.

Σε μία παρόμοια έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2011 στην Κίνα, μελετήθηκε η τύχη τεσσάρων νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων μετά από εφαρμογές σε δείγματα εδάφους. Στα εντομοκτόνα αυτά περιλαμβάνονταν και το *acetamiprid*, του οποίου το ποσοστό διάσπασης άγγιξε το 21,4% μέσα στο χρονικό διάστημα των 25 ημερών (Liu et. al. 2011). Επιπλέον, το 2012 στην Ινδία, χρησιμοποιήθηκαν παρόμοιες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου *acetamiprid*, οι οποίες πάρθηκαν από δείγματα εδάφους σε 0, 3, 7, 15, 20, 30, 45, 60 ημέρες μετά την εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου. Οι συγκεντρώσεις αυτές αναμείχθηκαν με ακετονιτρίλιο και αναλύθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Το ποσοστό ανάκτησης που προέκυψε κυμαίνονταν από 90% έως και 91,5%. Τέλος το όριο ανίχνευσης του γεωργικού φαρμάκου βρέθηκε εξίσου χαμηλό, δηλαδή 0,06mg/L (Pitam et. al. 2012).

4.2. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Η παρούσα έρευνα αφορούσε την εφαρμογή του *acetamiprid* σε τρία διαφορετικά εδάφη της περιοχής του πανεπιστημίου UFZ της Λειψίας στην Γερμανία. Στη συνέχεια, από τα επιφορτισμένα εδάφη πάρθηκε κατάλληλη ποσότητα έπειτα από συγκεκριμένο αριθμό ημερών ο οποίος όμως αριθμός

ημερών ήταν λιγότερος από πέντε, που είναι ο απαιτούμενος για να γίνουν οι υπολογισμοί του χρόνου ημιζωής του γεωργικού φαρμάκου σύμφωνα με τα μοντέλα κινητικής που προτείνει ο οδηγός του Focus Degradation Group 2006.

Επίσης, ενδιαφέρον είναι να γίνει ανάλυση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών ώστε να γίνει συσχέτιση τους με τα ποσοστά διάσπασης του φαρμάκου. Η εφαρμογή του Acetamiprid σε άλλα εδάφη με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και περιβαλλοντικές συνθήκες, θα ήταν χρήσιμη ώστε να δοκιμαστεί η μέθοδος εκχύλισης αλλά και ο ρυθμός διάσπασης του φαρμάκου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Gabriela Briceno, Maria Christina Diez, Graciela Palma, Milko Jorquera, Heidi Schalcli, Juliana Maria Saez, Claudia Susana Benimeli,

Neonicotinoid Effects on Soil Microorganisms: Responses and Mitigation Strategies, Sustainability, Sustainable Agriculture, 2024

<https://www.mdpi.com/2071-1050/16/9/3769>

- Julia Bailey-Serres, Jane E. Parker, Elizabeth A. Ainsworth, Giles E. D. Oldroyd, Julian I. Schroeder, Genetic strategies for improving crop yields, Nature Volume 575, pages 109-118, 2019
<https://www.nature.com/articles/s41586-019-1679-0>
- Manuel Arias-Estevez, Eugenio Lopez-Periago, Elena Martinez-Carballo, Jesus Sima-Gandara, Juan Carlos Mejuto, Luis Garcia-Rio, The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources, Elsevier, Agriculture, Ecosystems and the Environment, Volume 123, pages 247-260, 2008
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880907001934>
- Gonzalo C. Lopez-Perez, Manuel Arias-Estevez, Eugenio Lopez-Periago, Benedicto Soto-Gonzales, Beatriz Cancho-Grande, Jesus Sima-Gandara, Dynamics of Pesticides in Potato Crops, Journal of Agriculture and Food Chemistry, Volume 54, pages 1797-1803
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0525737>
- Serge Chiron, Amadeo Fernandez -Alba, Antonio Rodriguez, Eloy Garcia-Calvo, Pesticide chemical oxidation: state-of-the-art, Elsevier, Water research, Volume 34, pages 366-377
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135499001736#BIB24>
- Haag Werner H., David Yao C.C., Rate Constants for Reaction of Hydroxyl Radicals with Several Drinking Water Contaminants, Environmental Science and Technology, Volume 26, pages 1005-1013, 1992 <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0026645047&origin=inward&txGid=14feb65dd2f4d6a90aebabf6ad67c510>
- Robert M. Moore, Oliver C. Zafiriou, Photochemical production of methyl iodide in seawater Journal of Geophysical Research: Atmospheres, Volume 99 pages 16415-16420
<https://agupubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1029/94JD00786>

- Jan Kochany, James Maguire, Sunlight Photodegradation of Metolachlor in Water, Journal of Agriculture and Food Chemistry Volume 42, pages 406-412, 1994
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00038a032>
- Xingang Meng, Yuanjun Guo, Yihui Wang, Shijun Fan, Kaiqi Wang, Wenhua Han, A Systematic Review of Photolysis and Hydrolysis Degradation Modes, Degradation Mechanisms, and Identification Methods of Pesticides, Journal of Chemistry, 2022
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2022/9552466>
- Simo O. Pehkonen, Qi Zhang, The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: A Critical Review, Environmental Science and Technology, Volume 32, pages 17-72, 2002
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643380290813444>
- Khalid Nawaz , Khalid Hussain , Nazia Choudary , Abdul Majeed , Umbrin Ilyas , Abdul Ghani , Feng Lin, Kazim Ali , Shahid Afghan , Ghulam Raza , Muhammad Ismail Lashari, Eco-friendly role of biodegradation against agricultural pesticides hazards, African Journal of Microbiology Research, Volume 5, pages 177-183, 2011
https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/103753524/3BF711713607-libre.pdf?1687750484=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DDOI_10_5897_AJMR10_375_ISSN_1996_0808_20.pdf&Expires=1718738718&Signature=fE81jD4hBxZkVXz-~Zui3MfdipwlSLmfafVfhNOsCv6TwsVzSFN6UHiBvJQcnKgAGIZ4znLBUN5IHdTNU4XA3pNd7lQQclw9VWhdFyWJkxfPMEMu~qfNnWWYXYaXqgRsx6OmXrpmw-raTUWppHagekZ5XX7DpsqagYchZe0mpLtKSv5gBowb3tNTlml6zjC9AJrTL2JcEmkFfCkweOfHXwVjpxlTUHvrgteMFS-9Fnfft3LppjjNyHap9BnkAhUrcwWCKs5xvOQcolJSCpRw2Ei8owl1h94z0d5~J68uZsWv7qQmqWBQfGAfj8BIG2935YTdU11-fHXYqM~0qAwFQ_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

- J. Aislabie and G. Lloyd-Jones, A review of bacterial-degradation of pesticides, Australian Journal of Soil Research, Volume 33, pages 925-942 <https://www.publish.csiro.au/sr/SR9950925>
- Gerald K. Sims, Ramdas Gopinath Kanissery, Anaerobic Biodegradation of Pesticides, Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds, Volume 10, pages 33-54, 2019 https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-7462-3_2
- Singh DK . Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. Indian J. Microbiol., 48: 35-40, 2008
- Mervat SM. Degradation of methomyl by the novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* M1. Elect. J. Biotech., 12(4): 1-6, 2009
- Panagiotis A. Karas, Chiara Perruchon, Evangelos Karanasios, Evangelia S. Papadopoulou, Elena Manthou, Stefania Sitra, Constantinos Ehaliotis, Dimitrios G. Karpouzas (2016). Integrated biodepuration, of pesticide-contaminated wastewaters from fruit-packaging industry using biobeds: Bioaugmentation, risk assessment and optimized management. Journal of Hazardous Materials, 320: 635-644.
- Christina V. Papazlatani, Panagiotis A. Karas, Eleni Lampronikou, Dimitrios G. Karpouzas (2022). Using biobeds for the treatment of fungicide-contaminated effluents from various agro-food processing industries: Microbiome responses and mobile genetic element dynamics. Science of the Total Environment, 823
- Zhonghua Liu, Yijun Dai, Guodong Huang, Yugu Gu, Jueping Ni, Hua Wei, Sheng Yuan (2011). Soil microbial degradation of neonicotinoid insecticides imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid and imidaclothiz and its effect on the persistence of bioefficacy against horsebean aphid *Aphis craccivora* Koch after soil application, 67(10):1245-1252.
- Sarika Pitam, Irani Mukherjee, Aman Kumar (2013). Evaluation of environmental fate of acetamiprid in the laboratory, Environ Monit Asses, 185:2807-2816.

- Burgess JL, Bernstein JN, Hurlbut, K (1994). Aldicarb poisoning. A case report with prolonged cholinesterase inhibition and improvement after pralidoxime therapy. *Arch. Internal Med.*, 154(2): 221-224.
- Turan K, Levent K, Muhittin S, Songul K (2008). "Bacterial Biodegradation of Aldicarb and Determination of Bacterium Which Has The most biodegradative effect" *Turk. J. Biochem.*, 33: 209-214.
- Alexander M (1999). *Biodegradation and bioremediation*. San Diego, USA; Academic Press,. 453 p. ISBN 978-0-12-049861-1
- Panagiotis A. Karas, Chiara Perruchon, Katerina Exarhou, Constantinos Ehaliotis, Dimitrios G. Karpouzas (2011). Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads pf pesticides by selected fungi. *Biodegradation* 22:215-228.
- Cameron MD, Timofeevski S, Aust SD (2000). Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with Respect to the Degradation of Recalcitrant Compounds and Xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 751-758.
- Cobbet CS (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *J. Plant Physiol.*, 123: 825-832.
- Anderson TA, Guthrie EA, Walton BT (1993). Bioremediation. *Environ. Sci. Technol.*, 27: 2630-2636.
- Shimp JF, Tracy JC, Davis LC, Lee E, Huang W, Erickson LE, Schnoor JL (1993). Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 23: 77
- Karthikeyan R, Lawrence CD, Erickson LE, Al-Khatib K, Kulakow PA, Barnes PL, Hutchinson SL, Nurzhanova AA (2004). Potential for Plant-Based Remediation of Pesticide-Contaminated Soil and Water using Nontarget Plants such as Trees, Shrubs, and Grasses. *Critical Rev. Plant Sci.*, 23: 91-101
- Hall JC, Hoagland RE, Zablotowicz RM (2001). *Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms* ACS, Washington, DC — Similarities and Divergences. *ACS Symposium*, p. 777
<https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/103753524/3BF711713607->

[libre.pdf?1687750484=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DDOI_10_5897_AJMR10_375_ISSN_1996_0808_20.pdf&Expires=1717145631&Signature=EcMQcOELo5BlwDgmH7P~syns5msBFzvXmRTaiSwD-1ZFThBdOgbsBOD0wmtBuZcK5x7jWsCVhIhmwblr5OOCvw-tSTGTV8TSyY7fuRvYWvpeYHI~B5TZW5tEvVSfsTxIWAObBibC2n77SFoKS2i8IOTbyr9b~klWJbOgyvOAvhKwifclX8i-UIN1cevs5qGrihOZUw48n5mGmZuViMuGTmLZzRSP5An3wnQ97T8aO-3ulNNkeYv~3Uu35np0A4xmnfn3O94L2cQzfj4u1CNgXtvOj4Od1Fw3DdzZ2HpwamOS1WpEaMcHZ9t3YeJFKsJ411sd5VFwugZX6wHX~JGQ1Q_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://www.researchgate.net/publication/316877504/figure/fig/1/figure-pdf?1687750484=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DDOI_10_5897_AJMR10_375_ISSN_1996_0808_20.pdf&Expires=1717145631&Signature=EcMQcOELo5BlwDgmH7P~syns5msBFzvXmRTaiSwD-1ZFThBdOgbsBOD0wmtBuZcK5x7jWsCVhIhmwblr5OOCvw-tSTGTV8TSyY7fuRvYWvpeYHI~B5TZW5tEvVSfsTxIWAObBibC2n77SFoKS2i8IOTbyr9b~klWJbOgyvOAvhKwifclX8i-UIN1cevs5qGrihOZUw48n5mGmZuViMuGTmLZzRSP5An3wnQ97T8aO-3ulNNkeYv~3Uu35np0A4xmnfn3O94L2cQzfj4u1CNgXtvOj4Od1Fw3DdzZ2HpwamOS1WpEaMcHZ9t3YeJFKsJ411sd5VFwugZX6wHX~JGQ1Q_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

- Kerle EA, Jenkins JJ and Vogue PA (2007). Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection. Oregon State Univ Extension Service, EM8561-E
- Toth SJ and Buhler WG (2009). Environmental effects of pesticides, Department of Entomology and Horticultural Science, North Carolina State University
- Tiryaki O. and Aysal P (1999). Bound pesticide residues in soil and plant and their determination. The Turkish Journal of Nuclear Sciences, 26(2): 43-60 <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/497788>
- Marcelo Larramendy, Sonia Soloneski, Pesticides: Use and Misuse and Their Impact in the Environment, 2019
https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=7oj-DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR11&dq=pesticides+use+and+misuse+and+their+impact+in+the+environment&ots=81CZjoZaSf&sig=1gTbwwV7RSLqrOkVqlcagTbDyVs&redir_esc=y#v=onepage&q=pesticides%20use%20and%20misuse%20and%20their%20impact%20in%20the%20environment&f=false
- Sami Ahmad, Oxidative Stress from Environmental Pollutants, Insect Biochemistry and Physiology, Volume 29, Issue 2, 1995
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/arch.940290205>

- Guangli Wang, Wenlong Yue, Yuan Liu, Feng Li, Minhua Xiong, Hui Zhang, Biodegradation of the neonicotinoid insecticide Acetamiprid by bacterium *Pygmetiphaga* sp. strain AAP-1 isolated from soil, Elsevier, Bioresource Technology, Volume 138, pages 359-368, 2013
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241300597X#b0085>
- Kazuhiko Matsuda, Sotoshi Kanaoka, Miki Akamatsu, David B. Sattelle, Diverse Actions and Target-Site Selectivity of Neonicotinoids: Structural Insights, Molecular Pharmacology, Volume 76, 2009
<https://molpharm.aspetjournals.org/content/76/1/1.short>
- Ralf Nauen, Ulrich Ebbinghaus-Kintcher, Vincent L. Salgado, Martin Kausmann, Thiamethoxam in a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants, Elsevier, Pesticide Biochemistry and Physiology, Volume 76, pages 55-69, 2003
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357503000658>
- Xidong Zhang, Yaohua Huang, Wen-Juan Chen, Siyi Wu, Qiqi Lei, Zhe Zhou, Wemping Zhang, Sandhya Mihra, Pnkaj Bhatt, Shaohua Chen, Environmental Occurrence, Toxicity Concerns, and biodegradation of neonicotinoid insecticides, Elsevier, Environmental Research, Volume 218, 2023
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935122022800>
- Bin Xu, Rui Xue, Jie Zhou, Xin Wen, Zhoukoun Shi, Minjiao Chen, Fengxue Xin, Wenming Zhang, Weiliang Dong, Min Jiang, Characterization of Acetamiprid Biodegradation by the Microbial Consortium ACE-3 Enriched From Contaminated Soil, Frontiers of Microbiology, Volume 11 2020
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.01429/full>
- Bradley O. Clarke, Stephen R. Smith, Review of 'emerging' organic contaminants, in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids, Elsevier, Environment International, Volume 37, pages 226-247
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412010001224>

- https://echa.europa.eu/pesticides-mrls-ann-dir-396-2005?p_p_id=eucleflegislationlist_WAR_euclefportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&eucleflegislationlist_WAR_euclefportlet_orderByCol=rmlName&eucleflegislationlist_WAR_euclefportlet_substance_identifier_field_key=&eucleflegislationlist_WAR_euclefportlet_delta=50&eucleflegislationlist_WAR_euclefportlet_orderByType=asc&eucleflegislationlist_WAR_euclefportlet_doSearch=&eucleflegislationlist_WAR_euclefportlet_deltaParamValue=50&eucleflegislationlist_WAR_euclefportlet_resetCur=false&eucleflegislationlist_WAR_euclefportlet_cur=3
- https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report11/Acetamiprid.pdf
- <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/pesticides>
- Damian Pietrzak, Jarostaw Kania, Ewa Kmiecik, Grzegorz Malina, Katarzyna Wator, Fate of selected neonicotinoid insecticides in soil-water systems: Current state of the art and knowledge gaps, Chemosphere, Volume 255, 2020
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653520311747>
- Ιωάννης Βασιλάκογλου, Καθηγητής Ζιζανιολογίας και Γεωργικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Αγροτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 10^ο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, 2022

ΕΙΚΟΝΟΓΡΑΦΙΑ

- <https://www.slideshare.net/slideshow/07-soil-microbiology/14818900>
- https://www.researchgate.net/figure/Hydroxylation-of-drug-and-pesticide-precursors-by-the-aromatic-peroxygenase-of-Agrocybe_fig1_226837670
- <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/3/634>

- https://www.researchgate.net/figure/Degradation-of-Pollutants-by-Fungi-and-Their-Extra-Cellular-Oxidases_tbl1_263407458
- https://www.researchgate.net/publication/362518116_Ultraviolet_light_UV_based_Advanced_Oxidation_Processes_for_Degradation_of_Acetamidiprid
- https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=7oj-DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR11&dq=pesticides+use+and+misuse+and+their+impact+in+the+environment&ots=81CZjoZaSf&sig=1gTbwwV7RSLqrOkVqlcagTbDyVs&redir_esc=y#v=onepage&q=pesticides%20use%20and%20misuse%20and%20their%20impact%20in%20the%20environment&f=false
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241300597X#b0085>