



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ ΠΟΥ  
ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΕ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΤΗΡΙΩΝ ΦΡΟΥΤΩΝ  
ΣΤΗΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ  
ΕΛΑΦΟΥΣ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΤΣΑΧΙΔΟΥ ΜΠΕΛΛΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

## ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

### **Καρπούζας Δημήτριος**

Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **Ουρανία Μενκίσσογλου - Σπυρούδη**

Καθηγήτρια Γεωργικών Φαρμάκων, Σχολή Γεωπονίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

### **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργικών Φαρμάκων του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες πρωτίστως στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Καρπούζα Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του αναθέτοντάς μου αυτή την εργασία, καθώς επίσης και για την καθοδήγηση, την επίβλεψη και την βοήθεια που μου πρόσφερε κατά την διάρκεια της διεξαγωγής της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Γεωργικών Φαρμάκων της Σχολής Γεωπονίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Ουρανία Μενκίσσογλου – Σπυρούδη που με δέχτηκε στο Εργαστήριο Γεωργικών Φαρμάκων, αλλά και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Παπαδοπούλου Καλλιόπη που με ευχαρίστηση δέχτηκε να συμμετάσχει στην τριμελή επιτροπή για την παρούσα μελέτη.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στην υποψήφια διδάκτορα Παπαδοπούλου Ευαγγελία για την άριστη συνεργασία αλλά και για την συνεχή βοήθεια που μου πρόσφερε κατά την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για την αμέριστη και άοκνη υποστήριξη που μου προσέφερε σε όλα τα επίπεδα κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	7

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. Γεωργικά φάρμακα .....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Imazalil .....	11
1.2.2. Ortho-phenyl-phenol.....	12
1.2.3. Ethoxyquin.....	14
1.2.4. Thiabendazole .....	15
1.2.5. Diphenylamine.....	16
<b>1.3. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους και ο ρόλος τους .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4. Βιοχημικές λειτουργίες των μικροοργανισμών του εδάφους .....</b>	<b>18</b>
1.4.1. Όξινες και αλκαλικές φωσφατάσες.....	19
1.4.2. Νιτροποίηση .....	20
1.4.3. β-Γλυκοσιδάσες .....	21
1.4.4. Δισοξική φλουοροσεΐνη (Flouorescein diacetate, FDA) .....	22
1.4.5. Μικροβιακή αναπνοή .....	23
<b>1.5. Τοξική επίδραση γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους .....</b>	<b>24</b>
<b>1.6. Ερευνητικοί σκοποί .....</b>	<b>26</b>

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Συλλογή και επεξεργασία του εδάφους .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2. Εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων .....</b>	<b>29</b>

<b>2.3. Σκευάσματα γεωργικών φαρμάκων .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4. Εκτίμηση υγρασίας και υδατοχωρητικότητας του εδάφους .....</b>	<b>30</b>
2.4.1. Προσδιορισμός υγρασίας του εδάφους .....	30
2.4.2. Προσδιορισμός υδατοχωρητικότητας του εδάφους .....	31
<b>2.5. Μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας και μικροβιακής λειτουργίας.....</b>	<b>31</b>
2.5.1. Μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας όξινων και αλκαλικών φωσφατασών στο έδαφος..	32
2.5.1.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα .....	32
2.5.1.2. Αντιδραστήρια .....	33
2.5.1.3. Πειραματική διαδικασία .....	34
2.5.1.4. Αρχή μεθόδου .....	35
2.5.2. Μέθοδος προσδιορισμού της δραστηριότητας του ενζύμου β-γλυκοσιδάση στο έδαφος.....	35
2.5.2.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα .....	36
2.5.2.2. Αντιδραστήρια .....	37
2.5.2.3. Πειραματική διαδικασία .....	37
2.5.2.4. Αρχή της μεθόδου .....	38
2.5.3. Μέθοδος προσδιορισμού της δυνητικής νιτροποίησης (potential nitrification).....	38
2.5.3.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα .....	39
2.5.3.2. Αντιδραστήρια .....	39
2.5.3.3. Πειραματική διαδικασία .....	40
2.5.3.4. Αρχή της μεθόδου .....	41
2.5.4. Προσδιορισμός της γενικής υδρολυτικής ενζυμικής δραστηριότητας στο έδαφος με την μέθοδο της δισοξικής φλουοροσεΐνης (FDA).....	41
2.5.4.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα .....	42
2.5.4.2. Αντιδραστήρια .....	43
2.5.4.3. Πειραματική διαδικασία .....	43
2.5.4.4. Αρχή της μεθόδου.....	44
2.5.5. Μέθοδος μέτρησης της μικροβιακής αναπνοής .....	45
2.5.5.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα .....	45
2.5.5.2. Αντιδραστήρια .....	46
2.5.5.3. Πειραματική διαδικασία .....	46
2.5.5.4. Αρχή της μεθόδου .....	47
2.5.5.5. Υπολογισμός του CO <sub>2</sub> .....	49
<b>2.6. Στατιστική ανάλυση .....</b>	<b>49</b>

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ**

<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. Γενικά .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2. Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην δραστικότητα των φωσφατασών .....</b>	<b>50</b>
<b>3.3. Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην δραστικότητα της β-γλυκοσιδάσης.....</b>	<b>53</b>
<b>3.4. Επίδραση γεωργικών φαρμάκων στην δυνητική νιτροποίηση .....</b>	<b>55</b>
<b>3.5. Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην υδρολυτική δραστικότητα των     μικροοργανισμών του εδάφους (μέθοδος FDA ).....</b>	<b>57</b>
<b>3.6. Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή αναπνοή.....</b>	<b>59</b>

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ**

<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>62</b>
--	-----------

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>67</b>
--------------------------	-----------

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα thiabendazole (TBZ), imazalil (IMZ), ethoxyquin (EQ), diphenylamine (DPA) και *ortho*-phenylphenol (OPP) είναι γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων για τον έλεγχο των μυκητολογικών και φυσιολογικών ασθενειών που εκδηλώνονται στα φρούτα μετασυλλεκτικά. Το αποτέλεσμα της εφαρμογής τους είναι η παραγωγή μεγάλων όγκων υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις αυτών των γεωργικών φαρμάκων (100-600 mg/l). Στις χώρες-μέλη της ΕΕ η χρήση των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιείται υπό την αυστηρή προϋπόθεση να υπάρχει σε τοπικό επίπεδο σύστημα επεξεργασίας και αποτοξικοποίησης των υγρών αποβλήτων που παράγονται. Παρόλα αυτά μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία αξιολογημένη και προσιτή οικονομικά μέθοδος επεξεργασίας των συγκεκριμένων αποβλήτων. Λαμβάνοντας υπόψη τον πρωταρχικό ρόλο που παίζουν οι μικροοργανισμοί στους γεωχημικούς κύκλους μελετήσαμε την επίδραση των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων στην λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους όπου και απορρίπτονται συνήθως τα συγκεκριμένα απόβλητα. Έτσι μελετήθηκαν οι επιδράσεις των παραπάνω γεωργικών φαρμάκων σε ρεαλιστικές συγκεντρώσεις (50 µg/g) στην δραστηριότητα ενζύμων όπως β-γλυκοσιδάση (κύκλος C), φωσφατάση (κύκλος P), υδρολάσες (μέθοδος FDA) αλλά και σε άλλες βασικές μικροβιακές λειτουργίες όπως η νιτροποίηση και η μικροβιακή αναπνοή. Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων δεν επηρέασε την μικροβιακή αναπνοή, σε αντίθεση με την δυνητική νιτροποίηση που επηρεάστηκε αρνητικά κατά την διάρκεια του πειράματος (90 ημέρες) από την εφαρμογή του EQ και δευτερευόντως του OPP. Το EQ εκτός της δυνητικής νιτροποίησης προκάλεσε αρνητικές επιδράσεις και στην δραστηριότητα διαφόρων ενζύμων όπως η αλκαλική φωσφατάση και η β-γλυκοσιδάση. Αντίθετα, το OPP προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης στο έδαφος. Το DPA προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της δυνητικής νιτροποίησης κατά τις πρώτες 10 ημέρες μετά την εφαρμογή, την οποία ακολούθησε σημαντική μείωση σε σχέση με τον μάρτυρα από τις 30 ημέρες και μετά. Γενικότερα, η δυνητική νιτροποίηση αποτέλεσε τον πιο ευαίσθητο δείκτη μεταβολών αναφορικά με τα γεωργικά φάρμακα που δοκιμάστηκαν. Τα αποτελέσματα που παρέχει η παρούσα μελέτη, αποτελούν ένδειξη των ανεπιθύμητων επιδράσεων των γεωργικών φαρμάκων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα των συσκευαστηρίων φρούτων σε βασικές λειτουργίες του εδαφικού οικοσυστήματος και καταδεικνύει την ανάγκη για άμεση και αποτελεσματική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1. ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΡΟΥΤΩΝ.

Μετά την συγκομιδή τα φρούτα, κυρίως εσπεριδοειδή και γιγαρτόκαρπα, μεταφέρονται σε συσκευαστήρια όπου υφίστανται επεξεργασίες για να περιορίσουν όσο το δυνατόν τις προσβολές από φυτοπαθογόνα (μύκητες και βακτήρια) και να αποτρέψουν την υποβάθμιση της ποιότητας τους (Εικόνες 1 & 2). Οι μυκητιακές προσβολές των φρούτων μπορούν να περιοριστούν σε σημαντικό βαθμό με διάφορες τεχνικές όπως: 1) η θερμική επεξεργασία που περιλαμβάνει την εμβάπτιση φρούτων, όπως τα μάνγκο σε νερό θερμοκρασίας 50°C για 5 min, 2) η εφαρμογή μυκητοκτόνων όπως imazalil (IMZ), thiabendazole (TBZ) και *ortho*-phenylphenol (OPP) σε εσπεριδοειδή, μήλα, αχλάδια για την προστασία από προσβολές από μύκητες του γένους *Penicillium* (Εικόνα 3), *Colletotrichum* (Εικόνα 4), 3) η χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών όπως τα diphenylamine (DPA) και ethoxyquin (EQ) για το περιορισμό της εμφάνισης του επιφανειακού καφετιάσματος (apple scald), φυσιολογικής υποβάθμισης της ποιότητας των μήλων από την παρατεταμένη αποθήκευση (Εικόνα 5).



Εικόνα 1: Πλύσιμο μήλων σε εγκαταστάσεις συσκευαστηρίων φρούτων.



Εικόνα 2: Εφαρμογή μυκητοκτόνων με τη μέθοδο ψεκασμού.





Εικόνα 3: Προσβολή πορτοκαλιού από το μύκητα *Penicillium digitatum* και λεμονιών από *Penicillium italicum*.



Εικόνα 4: Προσβολή μήλων από το μύκητα *Colletotrichum gleosporioides*.



Εικόνα 5: Μήλο με εμφάνιση της φυσιολογικής ασθένειας του επιφανειακού καφετιάσματος.

Οι διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την μετασυλλεκτική επεξεργασία των φρούτων στα συσκευαστήρια, παρουσιάζουν μεγάλες απαιτήσεις για νερό. Η εφαρμογή μυκητοκτόνων και αντιοξειδωτικών ουσιών οδηγεί στην παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων (100-600 mg/L) τα οποία χρῆζουν επεξεργασίας και αποτοξικοποίησης πριν την οριστική απόρριψη τους στο περιβάλλον. Η ανάγκη επεξεργασίας των συγκεκριμένων αποβλήτων έχει επισημανθεί από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα. Έτσι η ΕΕ το 2011 ανανέωσε την έγκριση χρήσης του μυκητοκτόνου IMZ (ως το έτος 2021) υπό την αυστηρή προϋπόθεση να ληφθούν μέτρα από τα κράτη-μέλη ώστε να γίνεται επεξεργασία των υγρών αποβλήτων που παράγονται από την χρήση του (EC, 2011). Ανάλογες προϋποθέσεις έχουν τεθεί για την χρήση και των μυκητοκτόνων TBZ (EC, 2010) και OPP (EC, 2010) μέχρι 2015 και 2019 αντίστοιχα. Παρόμοιοι προβληματισμοί έχουν εκφραστεί και για τις αντιοξειδωτικές ουσίες DPA (EFSA 2008) και EQ (EFSA 2010) για τις οποίες ακόμη δεν έχει ανανεωθεί η έγκριση χρήσης τους στην ΕΕ. Κατά την επανεκτίμηση των ουσιών αυτών, η ΕΕ αποφάσισε να αποκλείσει το DPA από το Παράρτημα I της κοινοτικής οδηγίας 91/414 καθώς, δεν παρέχεται αξιόπιστη εκτίμηση των επιδράσεων του στους καταναλωτές αλλά και της τοξικότητας των μεταβολιτών του, ενώ στις 3.3.2011 εξέδωσε την απόφαση 2008/941/EC αποκλείοντας και το EQ από το Παράρτημα I λόγω μη επαρκών δεδομένων για την οικοτοξικότητα και την επίδραση του σε οργανισμούς μη-στόχους.

Παρόλο που οι εγκρίσεις για αυτά τα γεωργικά φάρμακα από την ΕΕ συνοδεύονται από την απαίτηση της αποτελεσματικής διαχείρισης των αποβλήτων τους, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κανένα καθιερωμένο σύστημα διαχείρισης. Ωστόσο, υπάρχουν μερικά συστήματα κατοχυρωμένα με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (Technidex), όπως αυτό για την διαχείριση υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις TBZ. Η λειτουργία του συγκεκριμένου συστήματος βασίζεται στην προσρόφηση των γεωργικών φαρμάκων στην επιφάνεια κόκκων ενεργού άνθρακα (*Garcia Portillo et al. 2004*). Παρόλο που το σύστημα αυτό είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό και μειώνει κατά 7000 φορές την συγκέντρωση του TBZ δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω λόγω του ιδιαίτερα υψηλού κόστους εγκατάστασης και λειτουργίας (EU 2000). Άλλη μια μέθοδος προτάθηκε από τους Flaim και Toller (1989), η οποία βασιζόταν σε ένα σύστημα φίλτρου αποτελούμενο από μείγμα τύρφης, κοπριάς, αργίλου και άμμου δολομίτη. Η αποτελεσματικότητά της στην απομάκρυνση υπολειμμάτων TBZ και DPA από υγρά απόβλητα άγγιζε το 98%. Όμως, το σύστημα αυτό αδυνατεί να διαχειριστεί μεγάλους όγκους αποβλήτων και για τον λόγο αυτό εγκαταλείφθηκε.

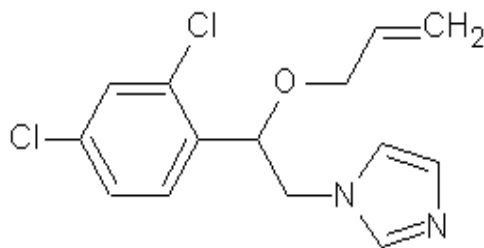
Σήμερα, η απόρριψη των υγρών αποβλήτων των συσκευαστηρίων φρούτων πραγματοποιείται είτε

σε υδάτινους φορείς που γειτνιάζουν τα συσκευαστήρια είτε σε παρακείμενους εγκαταλειμμένους αγρούς είτε στους βόθρους ή στις μονάδες επεξεργασίας αστικών αποβλήτων (βιολογικούς καθαρισμούς). Η άμεση απόρριψη αυτών των υγρών αποβλήτων σε φυσικούς υδάτινους πόρους, χωρίς πρώτα να υποστούν επεξεργασία, έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί σημαντική πηγή ρύπανσης (Flaim and Toller 1989). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ρύπανση ποταμού στην Κόστα Ρίκα στα νερά του οποίου ανιχνεύθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων TBZ και IMZ που χρησιμοποιούνται σε παρακείμενα συσκευαστήρια μπανάνας (Castilo et al. 2000). Πρόσφατες μετρήσεις σε δείγματα εδάφους από αγρούς όπου απορρίπτονταν απόβλητα από συσκευαστήρια φρούτων στην περιοχή της Λάρισας που πραγματοποιήθηκαν από την Ερευνητική Ομάδα Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έδειξαν συγκεντρώσεις IMZ που ξεπερνούσαν τα 500 mg/kg ξηρού βάρους εδάφους.

## 1.2. ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΡΟΥΤΩΝ

### 1.2.1 Imazalil (IMZ)

Το IMZ (*1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxy)ethyl]-1H-imidazole*) με μοριακό βάρος 297.2 g/mol είναι μυκητοκτόνο με διασυστημική δράση, που χρησιμοποιείται ευρέως κυρίως στην μετασυλλεκτική προστασία των φρούτων. Ανήκει στην ομάδα των ιμιδαζολινών τα οποία αναστέλλουν την βιοσύνθεση της εργοστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες των μυκήτων. Στα σκευάσματα που κυκλοφορούν στην αγορά περιέχεται ως ρακεμικό μίγμα των δύο εναντιομερών του. Έχει σχετικά χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (182 mg/L) και γι αυτό αναμειγνύεται με υγρό κεριά και το μίγμα μπορεί να εφαρμοστεί μέσω ψεκασμού, διαβροχής και άλλων τεχνικών σε φρούτα κατά την μετασυλλεκτική τους μεταχείριση. Δρα ενάντια στους μύκητες *Penicillium digitatum* και *Penicillium italicum*, *Botrytis* spp, *Diplodia* spp, *Alternaria citri*, *Phomopsis* sp και *Diaporthe citri*, οι οποίοι αναπτύσσονται στα φρούτα και ιδίως στα εσπεριδοειδή κατά την αποθήκευσή τους.



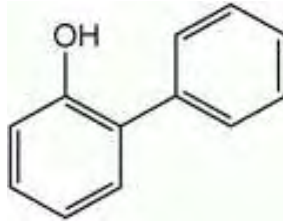
Χημική δομή του Imazalil

Οι πρώτες εργαστηριακές δοκιμές του IMZ *in vivo* και *in vitro* ξεκίνησαν το 1974 από τη Decco-Tiltbelt Division of Pennwalt Corporation. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι το imazalil σε συγκέντρωση 500 ppm παρέχει προστασία κατά της σήψης σε ποσοστό 80-95% και ελέγχει την σποριογενέση (κατά 85-100%) των μυκήτων *Penicillium digitatum* και *Penicillium italicum* (Kaplan and Dave, 1979). Έτσι, το 1979 εγκρίθηκε η χρήση του σε ένδεκα χώρες (Kaplan and Dave, 1980). Το IMZ μεταξύ άλλων, επηρεάζει την δράση του κυτοχρώματος P450, παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα και ανασταλτική δράση κατά της αρωματάσης CYP19, η οποία μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα (Kodama et al., 2003). Το IMZ παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα στα υδρόβιους οργανισμούς όπως ψάρια, ασπόνδυλα, υδροχαρή φυτά. (EFSA 2010). Ο κύριος μεταβολίτης του IMZ είναι το imazalil-ethanol [1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazole-1-yl)-1-ethanol] και απαντάται συχνά μαζί με την μητρική ένωση στα φρούτα που εφαρμόζεται. Στο έδαφος το IMZ εμφανίζει μέτρια ως μεγάλη υπολειμματικότητα με χρόνους ημιζωής που κυμαίνονται σε εργαστηριακές μελέτες από 41 – 135 ημέρες. Και στο έδαφος, το κύριο προϊόν μεταβολισμού του είναι το imazalil ethanol το οποίο είναι λιγότερο υπολειμματικό αλλά εμφανίζει να αναστέλλει σε ποσοστό >25% την νιτροποίηση (EFSA 2010).

### 1.2.2 . Ortho-phenyl-phenol (OPP)

Το OPP με μοριακό βάρος 170.2 g/mol είναι ένα μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος. Εφαρμόζεται μετασυλλεκτικά σε φρούτα και λαχανικά, αλλά κυρίως σε εσπεριδοειδή με την τεχνική του κερώματος.

Άλλες μέθοδοι εφαρμογής είναι η εμβάπτιση σε αφρό ή σε διάλυμα και ο ψεκασμός με γαλάκτωμα νερού-κεριού (Dezman *et al.*, 1986; Papadopoulou-Mourkidou, 1991). Το OPP αλλά και οι μεταβολίτες του παρουσιάζουν ποικίλη τοξικότητα.

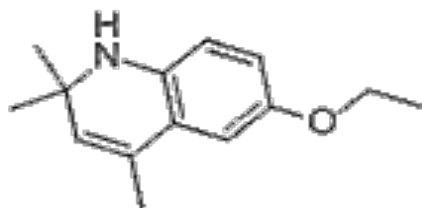


*Χημική δομή του Orthophenyl phenol*

*In vitro* μελέτες έδειξαν ότι το OPP και οι μεταβολίτες του, όπως το phenylhydroquinone (PHQ), μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις γονιδίων σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς επίσης μείωση της γονιμότητας και διαταραχές της ανάπτυξης (Kolbe *et al.*, 2006). Η μετασυλλεκτική χρήση του είναι πιθανό να οδηγήσει στην συσσώρευση του σε υψηλές συγκεντρώσεις στα υδατικά διαλύματα που εφαρμόζονται στα συσκευαστήρια, των οποίων η απόρριψη στο περιβάλλον μπορεί να οδηγήσει στην σημαντική σημειακή ρύπανση των φυσικών πόρων, εδαφικών και υδάτινων. Μία από τις σημαντικές οδούς αποδόμησης του OPP στην ατμόσφαιρα, είναι η φωτόλυση, αν και είναι μια αργή διαδικασία, καθώς το OPP μπορεί να αξιοποιήσει μόνο ένα στενό εύρος μήκους κύματος του φωτός για την αντίδραση (Gore *et al.*, 1971, Sarakha *et al.*, 1993). Οι βασικές οδοί αποδόμησης του στο νερό είναι η φωτόλυση, η υδρόλυση και η βιοδιάσπαση. Ο χρόνος ημιζωής του OPP σε πλήρως οξυγονωμένο νερό και κάτω από τον ήλιο, βρέθηκε να είναι 44.3 ώρες (Wick and Gschwend, 1998). Όσον αφορά το χρόνο ημιζωής του OPP στο έδαφος, αυτή εκτιμήθηκε ότι κυμαίνεται μεταξύ 24-168 ωρών (Howard *et al.* 1991). Το OPP θεωρείται γενικά τοξικό σε υδρόβιους οργανισμούς (EFSA 2008) και θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα για τον περιορισμό της έκθεσης των επιφανειακών υδροφόρων συστημάτων στο συγκεκριμένο μυκητοκτόνο. Ο μηχανισμός δράσης του OPP κατά των μυκήτων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, αλλά πιστεύεται πως προκαλεί βλάβες στις μιτοχονδριακές και πυρηνικές μεμβράνες (Ζιώγας, 2007).

### 1.2.3 Ethoxyquin (EQ)

Το EQ με μοριακό βάρος 217.3 g/mol ανήκει στην ομάδα των κινολινών. Παρουσιάζει μέτρια διαλυτότητα στο νερό (60-110 mg/L). Χρησιμοποιείται ως συντηρητικό σε τροφές (κυρίως ζωοτροφές) και ως αντιοξειδωτικό σε μπαχαρικά και αγλάδια. Εφαρμόζεται μετασυλλεκτικά με διαβροχή/ψεκασμό ή μέσω τυλίγματος σε εμποτισμένο χαρτί. Δεν είναι άμεσα βιοαποδομήσιμο και παρουσιάζει μέτρια πτητικότητα, ενώ ο χρόνος ημιζωής του στην ατμόσφαιρα είναι 2 ημέρες. Παρουσιάζει χαμηλή προς μέτρια τοξικότητα αν προσληφθεί από το στόμα, το αναπνευστικό και μέσω του δέρματος. Μελέτη σε πειραματόζωα έδειξε πως δεν είναι τερατογόνο (EPA, 2004). Υπάρχουν ορισμένες ενδείξεις που συσχετίζουν το EQ με την συσσώρευση της πρωτοπορφυρίνης IX στο συκώτι, καθώς και με την αύξηση του επιπέδου των σχετιζόμενων με το συκώτι ενζύμων. Όσον αφορά τις επιπτώσεις στο περιβάλλον, παρόλο που το EQ χρησιμοποιείται μόνο σε εσωτερικούς χώρους και τα υγρά απόβλητα από την εφαρμογή του συνήθως ανακυκλώνονται, η παρουσία του στα επιφανειακά και στα υπόγεια ύδατα, καθώς και στο έδαφος δεν μπορεί να αποκλειστεί.

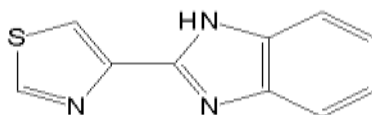


Χημική δομή του Ethoxyquin.

Το EQ εκτιμάται ότι παρουσιάζει υψηλή οξεία τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς όπως, τα ψάρια, τα άλγη και τα ασπόνδυλα, ενώ ο κίνδυνος για τους ζωντανούς οργανισμούς του εδάφους έχει κριθεί ως χαμηλός. Έρευνες πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη των υπολειμμάτων του EQ στα αγλάδια. Τα αποτελέσματα έδειξαν την σταδιακή εισχώρηση του γεωργικού φαρμάκου από την επιφάνεια των αγλαδιών προς το εσωτερικό τους, κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους για διάστημα 33 εβδομάδων. Τα υπολείμματα μετά το διάστημα των 8 εβδομάδων αποτελούνταν ως επί το πλείστον από το διμερές μεταβολικό προϊόν του EQ και σε ελάχιστο βαθμό από την ίδια την μητρική ένωση (EFSA 2010). Στο έδαφος και γενικότερα στο περιβάλλον μεταβολίζεται στα EQ-imine, EQ-quinoline και στο διμερές EQ (EFSA 2010).

#### 1.2.4. Thiabendazole (TBZ)

Το TBZ (2-(4-thiazolyl)-1H-benz-imidazole) με μοριακό βάρος 201.3 g/mol, είναι ένα διασυστημικό βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται προσυλλεκτικά αλλά και μετασυλλεκτικά για να ελέγξει μυκητολογικές προσβολές (*Botrytis cinerea*, *Cercospora sp*, *Nectria galligena*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Verticillium sp.*) των φρούτων και των λαχανικών κατά την αποθήκευσή τους. Συχνά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα μυκητοκτόνα, όπως το IMZ. Παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μυκήτων παρεμβαίνοντας στην διαδικασία της μίτωσης



και της κυτταροδιαίρεσης (Danaher et al., 2007).

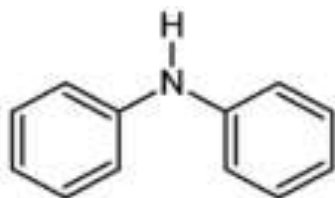
*Χημική δομή του Thiabendazole.*

Το TBZ χαρακτηρίζεται ως ελαφρώς τοξικό με τιμές LD<sub>50oral</sub> για ποντικούς της τάξης 1395-3810 mg/kg (μη τοξικό). Ανάλογα της δόσης που χορηγείται μπορούν να παρουσιαστούν αναπαραγωγικά προβλήματα, τοξικότητα σε διάφορα όργανα, τερατογένεση και καρκινογένεση σε οργανισμούς. Ο κύριος μεταβολίτης του TBZ στους ζωικούς οργανισμούς είναι το 5- hydroxythiabendazole (Cannavan et al., 1998). Όσον αφορά την τύχη του TBZ στο εδαφικό περιβάλλον, το TBZ είναι ιδιαίτερα υπολειμματικό στο έδαφος με χρόνους ημιζωής > 1 έτος σε πειράματα εργαστηρίου και >2 έτη σε πειράματα αγρού. Απορροφάται εύκολα από τις ρίζες των φυτών και διανέμεται σε όλα τα τμήματα τους, αλλά δεν παρουσιάζει τοξικότητα σε αυτά όταν η χρήση του γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες.

#### 1.2.5 Diphenylamine (DPA)

Το DPA με μοριακό βάρος 169.2 g/mol είναι άχρωμο στερεό, ισχυρά βασικό και διαβρωτικό. Το ίδιο αλλά και πολλά παράγωγα του χρησιμοποιούνται κυρίως ως ενδιάμεσα χημικά στην σύνθεση και

βιομηχανική παραγωγή άλλων ουσιών όπως βαφές, φαρμακευτικά προϊόντα και αντιοξειδωτικά. Στην γεωργία βρίσκει εφαρμογή κατά την μετασυλλεκτική επεξεργασία των φρούτων και κυρίως των μήλων και αχλαδιών, προστατεύοντάς τα από την εμφάνιση του επιφανειακού καφετιάσματος (Olek, 1988; Gutenmann et al., 1990; Ingle et al., 1990; Johnson et al., 1997; Kim-Kang et al., 1998; Mir and Beaudry, 1999). Η εφαρμογή του γίνεται με εμβάπτιση και ψεκασμό ή διαβροχή των καρπών. Το DPA έχει αναφερθεί και ως φυσικό συστατικό στα κρεμμύδια (Karawya et al., 1984), στα φύλλα του μαύρου και πράσινου τσαγιού (Nose et al., 1971; Karawya et al., 1984; Wang et al., 2001) και στις φλούδες των εσπεριδοειδών (Piorr and Toth, 1967). Η παγκόσμια παραγωγή του DPA το 1980 ανερχόταν στους 40,000 τόνους ετησίως, από τα οποία 4.000 παράγονται στη Γερμανία (BUA, 1993; Rippen, 1997).



Χημική δομή του Diphenylamine

Το DPA είναι αρωματική αμίνη, είναι εξαιρετικά δραστική ένωση και σχηματίζει πλήθος παραγώγων. Το ίδιο αλλά και τα παράγωγά της θεωρούνται από τους σοβαρότερους ρύπους του περιβάλλοντος και έχουν εντοπιστεί στο έδαφος, στα υπόγεια και επιφανειακά νερά, όμως οι έρευνες για τις επιπτώσεις τους στο υδάτινο οικοσύστημα, στα βακτήρια και τα ζώα είναι ανεπαρκείς. Μελέτες, χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές έχουν πραγματοποιηθεί για τον εντοπισμό υπολειμμάτων του DPA και των παραγώγων του σε μήλα, κυρίως στις φλούδες τους αλλά και στην σάρκα των αποθηκευμένων μήλων. Μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε μήλα στα οποία είχε γίνει εφαρμογή DPA και ακολούθως αποθηκεύτηκαν για 0, 35, 63, 90 και 118 ημέρες απέδειξαν πως τα κατάλοιπα του DPA μειώνονται όσο το διάστημα της αποθήκευσης μεγαλώνει (Allen and Kathleen, 1980). Δοκιμές σε πειραματόζωα καταδεικνύουν καρκινογόνο και μεταλλαξιγόνο δράση του DPA σε διάφορους οργανισμούς (Dieter, 1994; Greim et al., 1998; Lachance et al., 1999). Επίσης, σε μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα, η χορήγηση DPA προκάλεσε αύξηση του βάρους των οργάνων τους, καθώς και βλάβες στα νεφρά, στο συκώτι και στη σπλήνα (Alexander et al., 1965; Thomas et al., 1967a,b; Crocker et al., 1972; Sorrentino et al., 1978; Kronevi and Holmberg, 1979; Powell et al., 1983, 1984;



*Alvarez et al., 1987; GDCh, 1988; Mallon et al., 1988, Lenz and Carlton, 1990; Das et al., 1992; Rohrbach et al., 1993; Lenz et al., 1995; Masubuchi et al., 2000*). Επιλέον, ο Goodwin (1980) ανέφερε την αναστολή της φωτοσύνθεσης από φωτότροφα βακτήρια ύστερα από έκθεση σε DPA. Πειραματικές δοκιμές που έγιναν σε δείγματα εδάφους, ιλύος, ιζημάτων, λάσπης, επιφανειακών νερών και λυμάτων καθώς και στον αέρα, για τον εντοπισμό αλειφατικών και αρωματικών αμινών που αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού του DPA, έδειξαν ότι η παρουσία DPA και των παραγώγων του ήταν εξαιρετικά σπάνια, αλλά και όταν εντοπίζονταν, η συγκέντρωσή τους βρισκόταν στο όριο ανίχνευσης (*Results from the Swedish National Screening Programme, 2007*).

### 1.3 ΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ.

Οι μικροοργανισμοί αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα στην λειτουργία των φυσικών οικοσυστημάτων και ιδιαίτερα των εδαφικών οικοσυστημάτων καθώς είναι υπεύθυνοι για βασικά βήματα των βιογεωχημικών κύκλων του άνθρακα, αζώτου, φωσφόρου και θείου (*Falkowski et al., 2008*).

- *Κύκλος του άνθρακα:* Η επιστροφή της ζωντανής ύλης στο έδαφος μέσω της αποσύνθεσης ονομάζεται κύκλος του άνθρακα. Οι υπεύθυνοι για την αποδόμηση μικροοργανισμοί (αποδομητές) διασπών την νεκρή οργανική ύλη και απελευθερώνουν στην ατμόσφαιρα μέσω της αναπνοής τους το παραγόμενο διοξείδιο του άνθρακα. Το στοιχείο του άνθρακα είναι το σημαντικότερο για την θρέψη των μικροοργανισμών όπως και των υπόλοιπων οργανισμών, αφού αποτελεί βασικό συστατικό των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των υδατανθράκων. Για παράδειγμα, τα μεθανότροφα βακτήρια χρησιμοποιούν ως πηγή C το μεθάνιο και την μεθανόλη, ενώ τα ακτινοβακτήρια αποδομούν μεταξύ άλλων άμυλο, γλυκόζη ακόμα και ελαστικά. Σημαντικοί αποδομητές τις οργανικής ύλης είναι και οι μύκητες (*Karpouzas et al., 2009*).
- *Κύκλος του αζώτου:* Το άζωτο είναι ένα από τα σημαντικότερα θρεπτικά στοιχεία, διότι είναι το κύριο συστατικό δομικών βιομορίων όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Τα βήματα του κύκλου του αζώτου είναι η αζωτοδέσμευση, η αμμωνιοποίηση, η νιτροποίηση και η απονιτροποίηση. Σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα προκαρυωτικά είναι ικανά να δεσμεύουν το αέριο άζωτο με μία διαδικασία που ονομάζεται αζωτοδέσμευση. Βακτήρια που

έχουν αζωτοδεσμευτική ικανότητα ανήκουν σε διάφορα γένη όπως *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum sp.*. Οι οργανικές μορφές N που ελευθερώνονται στο έδαφος μέσω της αποσύνθεσης της οργανικής ύλης διασπώνται περαιτέρω σε  $\text{NH}_4$  μέσω της διαδικασίας της αμμωνιοποίησης ή ανοργανοποίησης. Στην συγκεκριμένη διεργασία συμμετέχουν μικροοργανισμοί που παράγουν ένζυμα όπως ουρεάση, πρωτεάσες κτλ. Οι αμμωνιακές μορφές N που ελευθερώνονται μετατρέπονται σε νιτρικά ( $\text{NO}_3$ ) μέσω της νιτροποίησης που πραγματοποιείται σε δύο στάδια α) οξείδωση  $\text{NH}_4$  προς  $\text{NO}_2$  που πραγματοποιείται από χημειοαυτότροφα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* των β-πρωτεοβακτηρίων και αρχαία που ανήκουν στο φύλο *Thaumarcheota* (Prosser and Nicol, 2008; Zhang et al., 2010), β) οξείδωση  $\text{NO}_2^-$  σε  $\text{NO}_3^-$  με την δράση νιτρικοποιητικών βακτηρίων. Τέλος τα  $\text{NO}_3^-$  που παράγονται μετατρέπονται, με την βοήθεια των μικροοργανισμών και κάτω από ανοξικές συνθήκες, σε οξειδία του N ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$ ) μέσω της απονιτροποίησης με τελικό προϊόν αέριο  $\text{N}_2$ .

- *Ο κύκλος του φωσφόρου:* Ο φώσφορος είναι από τα πιο απαραίτητα στοιχεία, καθώς αποτελεί συστατικό του ATP, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Ο φώσφορος βρίσκεται στη φύση με τη μορφή φωσφορικών ιόντων, αδιάλυτων φωσφορικών ανόργανων ή οργανικών αλάτων και φωσφορούχων πετρωμάτων. Οι μικροοργανισμοί μέσω της διαδικασίας της αποδόμησης, απελευθερώνουν το μεγαλύτερο μέρος του φωσφόρου, αποδίδοντας το στο έδαφος υπό την μορφή φωσφορικών ιόντων ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), τα οποία και είναι επαναπροσλήψιμα από τα φυτά και κατ' επέκταση από τους ανώτερους οργανισμούς.

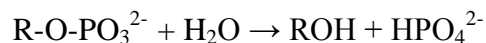
#### 1.4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ.

Όλες οι βιοχημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στο έδαφος καταλύονται από ένζυμα, τα οποία είναι ειδικά για το κάθε είδος της αντίδρασης στην οποία συμμετέχουν. Παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, και η παρουσία ή η απουσία κάποιου ενεργοποιητή ή αναστολέα μπορούν να επηρεάσουν την δραστηριότητά τους. Η ενζυμική δραστηριότητα που εντοπίζεται στο έδαφος, προέρχεται είτε από ενεργά ένζυμα που βρίσκονται ελεύθερα στο έδαφος είτε από ένζυμα που βρίσκονται σε ζωντανούς μικροοργανισμούς (Kiss et al., 1975). Σύμφωνα με τους Speir and Ross, (1978), οι μικροοργανισμοί αποτελούν την σημαντικότερη πηγή ενζύμων στο έδαφος, κάτι που οφείλεται στην μεγάλη βιομάζα τους, την υψηλή μεταβολική τους δραστηριότητα και τη μικρή διάρκεια ζωής τους. Οι ενζυμικές λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα στο εδαφικό οικοσύστημα

αποτελούν δείκτες της ποιότητας του εδάφους καθώς: α) αποτελούν μέτρο της μικροβιακής λειτουργίας, β) ανταποκρίνονται ταχέως σε αλλαγές που προκαλούνται από την φύση, αλλά και από την ανθρώπινη παρέμβαση και γ) μετρώνται με σχετική ευκολία (*Gianfreda and Bollag, 1996; Drijber et al., 2000; Calderon et al., 2000; Colombo et al., 2002; Nannipieri et al., 2002*). Για τη μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας στο έδαφος έχουν αναπτυχθεί κατάλληλες μέθοδοι.

#### 1.4.1. Όξιμες και αλκαλικές φωσφατάσες

Η γενική ονομασία *φωσφατάσες*, αναφέρεται σε μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση των εστέρων και των ανυδριτών του  $H_3PO_4$ . Τα ένζυμα αυτά έχουν καταταχθεί σε πέντε κατηγορίες, με τις φωσφομονοεστεράσες να αποτελούν την περισσότερη μελετημένη κατηγορία, λόγω της μεγάλης τους σημασίας στην μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανο και της παροχής των υδατοδιαλυτών φωσφορικών ιόντων στους φυτικούς οργανισμούς (*Speir & Ross, 1978*). Οι φωσφομονοεστεράσες διαχωρίζονται στις όξιμες και αλκαλικές φωσφατάσες λόγω της βέλτιστης δραστηριότητας που παρουσιάζουν σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον, αντίστοιχα. Παρουσιάζουν εξειδίκευση για ένα πλήθος φωσφομονοεστέρων και η γενική αντίδραση που καταλύουν είναι η ακόλουθη:



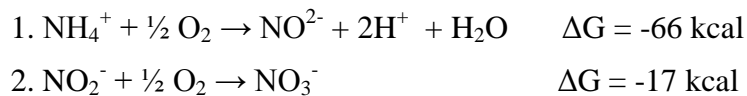
Αυξημένη δράση των φωσφατασών μπορεί να παρατηρηθεί κατά την διέγερση της μικροβιακής βιομάζας μέσω προσθήκης οργανικής ύλης (*George et al., 2002*), αλλά και σε περιπτώσεις έλλειψης P στην ριζόσφαιρα (*Tabatabai, 1982, Tadano et al., 1993*). Η δράση των φωσφατασών στο έδαφος συσχετίζεται τόσο με τον ολικό όσο και με το διαθέσιμο φώσφορο για τα φυτά (*Yu et al., 2006*). Μελέτες των *Eivazi & Tabatabai (1977)* και *Juma & Tabatabai (1977, 1978)* έδειξαν πως οι όξιμες φωσφατάσες κυριαρχούν σε εδάφη με όξινο χαρακτήρα, ενώ οι αλκαλικές φωσφατάσες βρίσκονται ως επί το πλείστον σε αλκαλικά εδάφη. Οι *Tarafdar και Marschner (1994)*, παρατήρησαν πως οι όξιμες φωσφατάσες παράγονται άμεσα από την ρίζα των φυτών (ίσως και μυκορριζικών), ενώ οι *George et al. (2002)*, υποστήριξαν ότι η παραγωγή τους μπορεί να οφείλεται σε ένα έμμεσο μηχανισμό μέσω της διέγερσης της μικροβιακής μάζας από τις ρίζες. Οι αλκαλικές φωσφατάσες προέρχονται αποκλειστικά από βακτήρια, μύκητες και γεοσκώληκες (*Hebrien and Neal, 1990*).

Παράγοντες που έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν την δραστηριότητα των φωσφατασών του εδάφους είναι η θερμοκρασία, η υγρασία του εδάφους, το pH, το βάθος του εδάφους (*Kiss et al., 1974*), οι

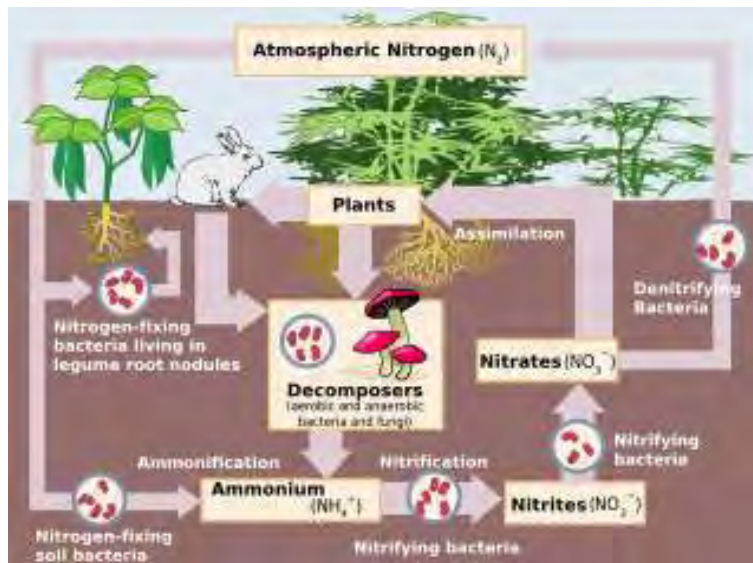
καλλιεργητικές πρακτικές και η χρήση γεωργικών φαρμάκων.

### 1.4.2. Νιτροποίηση

Ο κύκλος του αζώτου περιλαμβάνει τέσσερα βασικά βήματα: αμμωνιοποίηση (μετατροπή του οργανικού αζώτου σε αμμωνία), η νιτροποίηση (μετατροπή της αμμωνίας και των ιόντων αμμωνίου σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα), η απονιτροποίηση (μετατροπή νιτρικών ιόντων υπό ανοξικές συνθήκες σε μοριακό άζωτο) και η αζωτοδέσμευση (Εικόνα 6). Το σημαντικότερο όμως βήμα στο κύκλο του N σε εδαφικά και υδάτινα οικοσυστήματα είναι η νιτροποίηση. Ως νιτροποίηση ορίζεται η οξείδωση της αμμωνίας ή των ιόντων αμμωνίου, αρχικά σε νιτρώδη και στη συνέχεια σε νιτρικά ιόντα και πραγματοποιείται από χημειοαυτότροφα βακτήρια και αρχαία. Τα χημειοαυτότροφα βακτήρια που τις εκτελούν, χρησιμοποιούν την ενέργεια αυτή για να αφομοιώσουν το CO<sub>2</sub>. Οι δύο πορείες πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις.



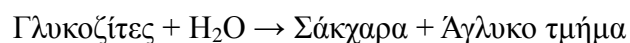
Η σημαντικότητα της λειτουργίας της νιτροποίησης είναι προφανής. Η πλειοψηφία των φυτών προσλαμβάνει το απαιτούμενο άζωτο υπό τη μορφή των νιτρικών, τα οποία στη συνέχεια τα ανάγει σε αμμωνία και συνθέτει τα αμινοξέα και τα υπόλοιπα βιομόρια που χρειάζεται. Τα φυτά αποτελούν πηγή αζώτου για τους υπόλοιπους οργανισμούς. Η περιβαλλοντική καταπόνηση, όπως αυτή που προκαλείται από τα βιομηχανικά απόβλητα και τις γεωργικές πρακτικές μπορεί να επηρεάσει πολυπλεύρως την πορεία της νιτροποίησης.



Εικόνα 6: Βιογεωχημικός κύκλος του αζώτου και οι βασικές πορείες του.

### 1.4.3. β-Γλυκοσιδάσες

Η γενική ονομασία γλυκοσιδάσες περιγράφει μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση διαφόρων γλυκοζιτών. Απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς, μικροοργανισμούς, φυτά και ζώα, και είναι υπεύθυνες για τον αποπολυμερισμό πολυσακχαριτικών αλυσίδων που περιέχονται σε φυσικά πολυμερή όπως η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη. Η αποδόμησή τους έχει ιδιαίτερη σημασία για τα εδαφικά οικοσυστήματα καθώς μέσω αυτής της διαδικασίας παρέχεται άνθρακας για τους οργανισμούς. Οι γλυκοσιδάσες έχουν διαχωριστεί σε 39 ομάδες (Florkin & Stotz, 1964), όπου η κάθε μία έχει ονομαστεί σύμφωνα με τον τύπο του δεσμού που υδρολύει. Η γενική αντίδραση που καταλύουν περιγράφεται παρακάτω:



Ορισμένες από τις γλυκοσιδάσες που εντοπίζονται στο έδαφος είναι οι α-γλυκοσιδάσες που καταλύουν την υδρόλυση των α-D-γλυκοπυρανοζιτών, οι β-γλυκοσιδάσες που καταλύουν την υδρόλυση των β-D-γλυκοπυρανοζιτών, καθώς και οι α- και β-γαλακτοσιδάσες. Οι β-γλυκοσιδάσες

κυριαρχούν στο έδαφος (Eivazi & Tabatabai, 1988, 1990) και παράγονται από μύκητες (Jermyn, 1958), ζύμες (Barnett et al., 1956) και φυτά (Veibel, 1950).

Οι β-γλυκοσιδάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση β-γλυκοζιτικών δεσμών γλυκοζιτών που περιέχουν β-D-γλυκόζη. Τα προϊόντα της υδρόλυσης των β-γλυκοσιδασών αποτελούν σημαντικές πηγές ενέργειας (άνθρακα) για τους μικροοργανισμούς του εδάφους. β-γλυκοσιδάσες έχουν απομονωθεί από διάφορους μικροοργανισμούς, κυρίως κυτταρινολυτικούς, όπως βακτήρια του γένους *Clostridium*, αλλά και από μύκητες (Ait, et al., 1979; Bronnenmeier and Staudenbauer, 1988). Η β-γλυκοσιδάση των κυτταρινολυτικών μικροοργανισμών αποτελεί τμήμα του ενζυμικού συστήματος της κυτταρινάσης. Συγκεκριμένα, η β-γλυκοσιδάση ή β-1,4-γλυκοζιτο-γλυκουδρολάση, υδρολύει την κελλοβιόζη και άλλα μικρά κυτταρινο-ολιγοσακχαρίδια σε γλυκόζη. Η β-γλυκοσιδάση εξασφαλίζει την πλήρη υδρόλυση της κυτταρίνης σε γλυκόζη (μέσω της απομάκρυνσης της κελλοβιόζης που είναι ισχυρός αναστολέας της ενδο- και της εξω-γλυκανάσης), ενώ πολλές φορές αναστέλλεται από το προϊόν της δράσης της, την γλυκόζη (Σίμος, 1990). Οι βακτηριακές β-γλυκοσιδάσες βρίσκονται είτε στο εσωτερικό των κυττάρων (Takase and Horikoshi, 1988), είτε στον περιπλασματικό χώρο ανάμεσα στο κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη (Ait et al., 1979). Οι β-γλυκοσιδάσες των ζυμομυκήτων είναι επίσης ενδοκυττάρια ένζυμα (Woodward and Wiseman, 1982), ενώ αυτά των μυκήτων του γένους *Aspergillus*, όπως και των περισσότερων μυκήτων είναι εξωκυττάρια. Οι β-γλυκοσιδάσες σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζουν και δράση β-γαλακτοσιδασών υδρολύοντας και λακτόζη.

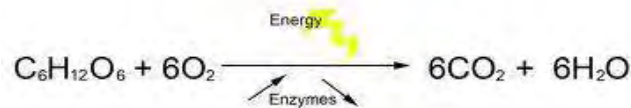
#### 1.4.4. Δισοξική φλουοροσεΐνη (Fluorescein diacetate, FDA)

Η υδρόλυση της δισοξικής φλουοροσεΐνης (3',6'-diacetylfluorescein, FDA) είναι μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της μικροβιακής δραστηριότητας και ιδιαίτερα της γενικότερης υδρολυτικής ενζυμικής δραστηριότητας σε δείγματα εδάφους (Schnurer and Rosswall, 1982). Το FDA υδρολύεται από έναν αριθμό διαφορετικών υδρολυτικών ενζύμων, όπως πρωτεάσες, λιπάσες και εστεράσες (Guilbault, and Kramer., 1964; Rotman and Papermaster., 1966), τα οποία μπορεί να είναι είτε ελεύθερα (εξωένζυμα), είτε συνδεδεμένα με τις μεμβράνες των μικροοργανισμών (Stubberfield and Shaw, 1990). Το FDA κατόπιν ενζυμικής μετατροπής μετατρέπεται σε φλουοροσεΐνη που είναι το φθορίζων προϊόν της αντίδρασης. Η συγκέντρωση της φλουοροσεΐνης μπορεί να προσδιοριστεί μέσω μικροσκοπίας φθορισμού, φασματοφωτομετρίας (απορροφά στα 490nm) και άλλων τεχνικών.

Σε πείραμα χρώσης 50 ειδών μυκήτων με τη μέθοδο FDA, παρατηρήθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην ένταση του φθορισμού και του ρυθμού ανάπτυξης των μυκήτων (Soderstrom, 1976). Επίσης, συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στην υδρόλυση της FDA και την μικροβιακή αναπνοή σε εδαφικά δείγματα από διαφορετικά βάθη (Schnurer and Rosswall, 1982). Από το 1982 η μέθοδος FDA χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μικροβιακής δραστηριότητας σε διάφορα δείγματα όπως σε ξύλα, οικοδομικά υλικά (Bjurman, 1993), φυτικά υπολείμματα (Zablotowicz et al., 1998) κ.α.

#### 1.4.5. Μικροβιακή αναπνοή

Η βιολογική οξείδωση του οργανικού άνθρακα στα εδαφικά οικοσυστήματα έχει πρωταρχικό ρόλο στον κύκλο του C, αποδίδοντας το παραγόμενο διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) στην ατμόσφαιρα. Η ανοργανοποίηση είναι ένας όρος που προτάθηκε από τους Alexander (1977), Paul και Clark (1989), ο οποίος αν χρησιμοποιηθεί για τον C, ερμηνεύεται ως η παραγωγή CO<sub>2</sub> από μεταβολικά ενεργούς οργανισμούς. Η διαδικασία της αναπνοής περιγράφεται από την παρακάτω αντίδραση:



Ως εδαφική αναπνοή ορίζεται η πρόσληψη οξυγόνου ή η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα από μεταβολικά ενεργούς μικροοργανισμούς του εδάφους (Anderson, 1982). Η αναπνοή των μικροοργανισμών στο έδαφος αυξάνει την συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> στις εδαφικές κοιλότητες. Με την μέτρηση της εδαφικής αναπνοής μπορεί να εκτιμηθεί η μικροβιακή δραστηριότητα των μικροοργανισμών του εδάφους, η οποία μπορεί να έχει μεταβληθεί ή να έχει επηρεαστεί από παράγοντες όπως η ρύπανση που προκαλείται από τη χρήση λιπασμάτων και γεωργικών φαρμάκων. Η μικροβιακή αναπνοή αποτελεί βιοδείκτη που σχετίζεται είτε άμεσα είτε έμμεσα με την μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους και την λειτουργικότητα των μικροβιακών εδαφικών κοινοτήτων (Ομήρου, 2009).

## 1.5. ΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ.

Η τοξική επίδραση των βιομηχανικών αποβλήτων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους αποτελεί στόχο μελέτης της οικοτοξικολογίας. Εκτός από τις γενικότερες λειτουργίες που εκτελούν τα διάφορα ενζυμικά συστήματα των μικροοργανισμών, όπως για παράδειγμα η αποσύνθεση οργανικών ουσιών και η νιτροποίηση, οι μικροοργανισμοί καλούνται επίσης να μετασχηματίσουν και να ακινητοποιήσουν βαρέα μέταλλα, να αποδομήσουν γεωργικά φάρμακα αλλά και άλλες ουσίες που αποτίθενται στο φυσικό τους περιβάλλον λόγω ανθρώπινης δραστηριότητας. Οι μικροοργανισμοί και πιο συγκεκριμένα, τα ενζυμικά τους συστήματα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ρύπανσης του περιβάλλοντος (βιοδείκτες). Ένα παράδειγμα είναι η δοκιμασία *Microtox*<sup>®</sup> που στηρίζεται στη παραγωγή φωτός από τα φθορίζοντα βακτήρια *Vibrio fischeri* ως παραπροϊόν της κυτταρικής τους αναπνοής. Η έκθεση των βακτηρίων σε τοξικές χημικές ουσίες προκαλεί την αναστολή της αναπνοής με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση του φθορισμού (Βλαχογιάννη και Βαλαβανίδης, 2010).

Παρόλο που τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν χρήσιμο εργαλείο στην γεωργία και την βιομηχανία, παράλληλα αποτελούν κίνδυνο για οργανισμούς μη στόχους, όπως είναι οι χρήσιμοι μικροοργανισμοί του εδάφους (βακτήρια, μύκητες, κ.α.). Η είσοδος των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος μπορεί να προέλθει από την απευθείας εφαρμογή τους στο έδαφος, από απόβλητα (στερεά και υγρά) που περιέχουν διάφορα γεωργικά φάρμακα αλλά και από τον αέρα όπου βρίσκονται προσροφημένα στα αιωρούμενα σωματίδια. Αλληλεπίδραση των τοξικών χημικών με τους μικροοργανισμούς του εδάφους μπορεί να βλάψει τις λειτουργίες τους. Η μετατροπή του  $\text{NH}_4\text{-N}$  σε  $\text{NO}_3\text{-N}$  που είναι η κύρια πηγή πρόσληψης αζώτου από τα φυτά και κατ' επέκταση από τους ανώτερους οργανισμούς, η αποσύνθεση της οργανικής ουσίας του εδάφους, η αποδόμηση οργανικών ρύπων όπως τα γεωργικά φάρμακα και απομάκρυνσή τους από τα εδαφικά και τα υδατικά οικοσυστήματα, η προσφορά θρεπτικών συστατικών σε φυτά από συμβιωτικούς μικροοργανισμούς, είναι λειτουργίες πρωταρχικής σημασίας που μπορεί να ζημιωθούν από την εφαρμογή υψηλών συγκεντρώσεων γεωργικών φαρμάκων. Οι λειτουργίες αυτές των μικροοργανισμών εξασφαλίζουν την ποιότητα και λειτουργικότητα του εδάφους, έτσι οποιεσδήποτε αρνητικές επιδράσεις σε αυτούς, μπορούν να έχουν άμεσο αντίκτυπο στην βιωσιμότητα του εδαφικού οικοσυστήματος και συνεπώς, δυσμενείς επιπτώσεις στις ανώτερες μορφές ζωής.

Πολλές εργαστηριακές έρευνες έχουν διεξαχθεί όσον αφορά την επίδραση των γεωργικών



φαρμάκων στους μικροοργανισμούς και στις λειτουργίες τους (Iqbal et al, 2001). Γενικότερα, τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών που έχουν εξετάσει την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα είναι αντικρουόμενα (Gianfreda and Rao, 2011). Σε μελέτες των Bollen και Tu (1971), χαμηλές και ενδιάμεσες δόσεις των εντομοκτόνων monocrotophos και methidathion δεν προκαλούν δυσμενείς επιπτώσεις στην νιτροποίηση στο έδαφος, η εφαρμογή υψηλών δόσεων αυτών των εντομοκτόνων προκάλεσε σημαντική μείωση της συγκεκριμένης διεργασίας. Αναστολή της νιτροποίησης προκλήθηκε και από τα εντομοκτόνα parathion και malathion (Sahrawat et al. 1987). - Αρνητικές επιδράσεις στην νιτροποίηση προκάλεσε η εφαρμογή εντομοκτόνων σε υψηλές δόσεις, (Bremner και Keeney 1965), ενώ εφαρμογή των DDT, aldrin, endrin και diazinon στις συνιστώμενες δόσεις δεν προκάλεσαν καμία αρνητική επίδραση στους νιτροποιητές. Σε εδαφικά δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε το νηματοδοκτόνο fenamiphos, παρατηρήθηκε μείωση της δυνητικής νιτροποίησης σε δόσεις εφαρμογής 10 mg/kg (Cáceres et al. 2009).

Σε πειραματικές μελέτες των Eisenhauer et al. (2009) που αφορούσαν την επίδραση των εντομοκτόνων dimethoate, chlorpyrifos και fosthiazate στην μικροβιακή αναπνοή και την βιομάζα, το fosthiazate προκάλεσε σημαντική αύξηση της μικροβιακής αναπνοής, που αποδόθηκε στην χρήση του συγκεκριμένου εντομοκτόνου ως πηγή ενέργειας από τους μικροοργανισμούς (Eisenhauer et al., 2009; Giannakou et al., 2005). Η εφαρμογή του εντομοκτόνου chlorpyrifos δεν είχε καμία επίδραση στην μικροβιακή αναπνοή, σε αντίθεση με το επίσης εντομοκτόνο dimethoate το οποίο μείωσε αισθητά την μικροβιακή αναπνοή. Αρνητικές επιδράσεις του dimethoate σε μικροβιακές λειτουργίες έχουν αναφερθεί και από τους Martikainen et al. (1998) και Vig et al., (2008). Πιο πρόσφατες μελέτες από τους Nare et al. (2010) έδειξαν ότι η μικροβιακή αναπνοή σε καλλιεργούμενο έδαφος επηρεάστηκε λιγότερο από την εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων σε σχέση με έδαφος που βρισκόταν σε αγρανάπαυση. Το endosulfan βρέθηκε να μειώνει σημαντικά την μικροβιακή αναπνοή, ενώ τα deltamethrin και profenophos να την αυξάνουν.

Πειράματα από τους Omar και Abdel-Sater (2001) έδειξαν αύξηση της δραστηριότητας των φωσφατασών, κατόπιν εφαρμογής του ζιζανιοκτόνου brominal και του εντομοκτόνου selecron στις συνιστώμενες δόσεις, όμως σε υψηλότερες δόσεις παρατηρήθηκε αναστολή των φωσφατασών. Διαφορετική συμπεριφορά παρουσίασε η αλκαλική φωσφατάση, η δραστηριότητα της οποίας ενισχύθηκε ακόμη και μετά την εφαρμογή υψηλών συγκεντρώσεων των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων. Κατά την μελέτη της επίδρασης του εντομοκτόνου acetamiprid σε μια σειρά διαφορετικών ενζύμων παρατηρήθηκε ισχυρή αρνητική επίδραση στην δραστηριότητα των φωσφατασών σε κανονικές και υψηλές δόσεις (0.5, 5 και 50 mg kg<sup>-1</sup> ξηρού εδάφους) (Yao et al. 2006). Σε πρόσφατη μελέτη που διεξάχθηκε από τους Niemi et al. (2009), μελετήθηκε η επίδραση των ζιζανιοκτόνων

metribuzin και linuron αλλά και του μυκητοκτόνου fluazinam σε δέκα διαφορετικά ενζυμικά συστήματα, μεταξύ των οποίων φωσφομονοεστεράσες και β-γλυκοσιδάσες. Δοκιμές με φθορίζοντα βακτήρια έδειξαν βιοδιαθεσιμότητα και έντονη τοξική επίδραση του μυκητοκτόνου fluazinam. Ορισμένες ενζυμικές δραστηριότητες επηρεάστηκαν αρνητικά μόνο μετά την συνδυασμένη χρήση των γεωργικών φαρμάκων. Μελέτες στις οποίες έγινε εφαρμογή των εντομοκτόνων diazinon, imidacloprid και lindane σε καλλιέργεια *Arachis hypogaea* L., έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα προκάλεσαν καμία μεταβολή, αύξηση ή μείωση αντίστοιχα, της δραστηριότητας των αλκαλικών φωσφατάσων (Singh and Singh, 2005). Υπολείμματα οργανοφωσφορικών και οργανοχλωριωμένων γεωργικών φαρμάκων (chlorpyrifos, ethion, α-endosulfan κ.α.) που βρέθηκαν σε δασικές εκτάσεις και σε καλλιέργειες τσαγιού στην Ινδία, φανέρωσαν την έντονη αρνητική τους επίδραση στην δραστηριότητα των β-γλυκοσιδάσων καθώς και άλλων ενζύμων (Bishnu et al. 2008). Υπό εργαστηριακές συνθήκες εξετάστηκαν οι επιπτώσεις των γεωργικών φαρμάκων rimsulfuron και imidazolinone σε συνδυασμό μεταξύ τους, σε διάφορα ενζυμικά συστήματα όπως οι όξινες και αλκαλικές φωσφατάσες. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας (Perucci et al. 1999, 2000). Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί για την εξακρίβωση της επίδρασης του ζιζανιοκτόνου glyphosate στην μικροχλωρίδα του εδάφους και τις μικροβιακές λειτουργίες. Οι Weaver et al. (2007) παρατήρησαν στις μελέτες τους μικρή αλλά σημαντική μείωση της δραστηριότητας των υδρολυτικών ενζύμων (λιπάσες, εστεράσες και πρωτεάσες) ύστερα από την εφαρμογή του glyphosate, αποτέλεσμα που βρίσκεται σε αντίθεση με άλλες έρευνες, όπως των Araujo et al. (2003) που έδειξε την αύξηση της δραστηριότητας των ίδιων υδρολυτικών ενζύμων, αλλά και της μικροβιακής αναπνοής. Επίσης, οι Haney et al. (2000 & 2002), παρατήρησαν μια αύξηση στην μικροβιακή αναπνοή και στην ανοργανοποίηση C και N ύστερα από την εφαρμογή glyphosate.

Το γενικότερο συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από την παραπάνω αναδρομή στην διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία είναι ότι η απόκριση ενός ενζύμου στην εφαρμογή ενός γεωργικού φαρμάκου δεν μπορεί να προβλεφθεί με ευκολία (Schaffer, 1993). Εκτός από την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στις διάφορες λειτουργίες των μικροοργανισμών του εδάφους, καταστάσεις όπως η αποψίλωση των δασών, η μείωση ή εξαφάνιση της βλάστησης, οι δασικές φωτιές, αλλά και οι κλιματικές αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν τους μικροοργανισμούς του εδάφους και τις βιοχημικές διεργασίες που επιτελούν (Karaca et al., 2011).

## 1.6. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΚΟΠΟΙ

Η παρούσα πειραματική εργασία έχει ως κύριο στόχο την μελέτη της επίδρασης γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων και περιέχονται στα απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων και μάλιστα σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στην λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Ο βαθμός της επίδρασης εκτιμήθηκε με την χρήση μιας σειράς ενζυμικών τεχνικών που καταγράφουν την δραστικότητα βασικών ενζύμων που παράγονται από μικροοργανισμούς και εμπλέκονται σε συγκεκριμένα βήματα των κυριότερων γεωχημικών κύκλων όπως C, N, P. Παράλληλα μελετήθηκε και η επίδραση των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων σε ευρύτερους και ειδικότερους δείκτες μικροβιακής δραστηριότητας όπως η μικροβιακή αναπνοή, η υδρολυτική ικανότητα (FDA) και η δυναμική νιτροποίηση. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα για την επίδραση των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, ένα σενάριο ρύπανσης ιδιαίτερα ρεαλιστικό εάν λάβουμε υπόψη τις σημερινές πρακτικές απόρριψης των υγρών αποβλήτων σε εδαφικά φυσικά οικοσυστήματα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

### 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ.

Συλλέχθηκαν 15 kg εδάφους από το αγρόκτημα του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Το σύνολο της ποσότητας αφέθηκε να αεροξηρανθεί μερικώς για διάστημα 48 ωρών. Ακολούθησε κοσκίνισμα του εδάφους με κόσκινο διαμετρήματος πόρων 3 mm.

#### 2.2 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Αρχικά, η συνολική ποσότητα του εδάφους διαχωρίστηκε σε 6 υποδείγματα των 2,5 kg. Σε καθένα από τα υπο-δείγματα έγινε εφαρμογή ενός εκ των γεωργικών φαρμάκων EQ, DPA, TBZ, IMZ, OPP με την μορφή 50 ml υδατικού διαλύματος τους που παρασκευάστηκε από τα αντίστοιχα εμπορικά σκευάσματα ώστε να επιτύχουμε συγκέντρωση στο έδαφος περίπου 50 mg/kg ξηρού βάρους εδάφους. Ακολούθησε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού ώστε να προσαρμοστεί η υγρασία του εδάφους σε όλα τα δείγματα στο 40% της υδατοχωρητικότητας. Το τελευταίο δείγμα εδάφους έλαβε την ίδια ποσότητα νερού (68.57ml) χωρίς γεωργικό φάρμακο και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Τα δείγματα εδάφους στην συνέχεια αναμίχθηκαν επιμελώς με τα χέρια ώστε να πετύχουμε την ομοιόμορφη κατανομή των ουσιών. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη ημέρα τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε 15 υποδείγματα (5 χρόνοι X 3 επαναλήψεις) των 100 g τα οποία αφού τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες με αεροστεγές κλείσιμο επωάστηκαν στους 27°C.

Για την μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στις διάφορες μικροβιακές λειτουργίες και δραστηριότητες των ενζύμων στο έδαφος, τρία δείγματα από κάθε μεταχείριση απομακρύνονταν από την επώαση 3, 10, 30, 60 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή και αποθηκεύονταν στους 4°C μέχρι να αναλυθούν. Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι αναλύσεις FDA, όξινης και αλκαλικής φωσφατάσης, β-γλυκοσιδάσης και δυνητικής νιτροποίησης πραγματοποιούνταν εντός 2 ημερών ώστε να περιοριστεί

στο ελάχιστο δυνατό ο χρόνος αποθήκευσης.

Δείγματα εδάφους από κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση της μικροβιακής αναπνοής σε χρόνους 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 18, 21, 28, 35 ημέρες μετά την εφαρμογή όπως περιγράφεται παρακάτω.

### 2.3. ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Τα παρακάτω σκευάσματα των γεωργικών φαρμάκων χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των υδατικών διαλυμάτων που εφαρμόστηκαν στο έδαφος:

1. Imazalil (FUNGAZIL 20%)
2. *Ortho*-phenylphenol (FOAMER 20%)
3. Thiabendazole (HYKEEP 30%)
4. Diphenylamine (NO SCALD 31.8%)
5. Ethoxyquin (XEDAQUINE 72%)

### 2.4. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ

Για να μπορέσουμε να ρυθμίσουμε την υγρασία του εδαφικού μας δείγματος πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της υγρασίας του εδάφους.

#### 2.4.1 Προσδιορισμός υγρασίας του εδάφους

Σύμφωνα με τους Karrouzas et al. (2004), για να υπολογίσουμε την υγρασία του εδάφους που μελετάμε, κατ'αρχήν ζυγίζουμε κάποια ποσότητα εδάφους και την τοποθετούμε σε προζυγισμένο αλουμινένιο δοχείο. Τοποθετούμε το δοχείο με το έδαφος στον φούρνο στους 105°C και το αφήνουμε για όλη τη νύχτα. Το δείγμα στη συνέχεια απομακρύνεται από το φούρνο, παραμένει σε ξηραντήρα για να κρύνει και επαναζυγίζεται. Η υγρασία του εδάφους προσδιορίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$MC = [(W1-W2) \times 100\%]/(W1-W_{cont})$$

MC: υγρασία του εδάφους

W1: βάρος δοχείου με το έδαφος πριν την ξήρανση

W2: βάρος δοχείου με το έδαφος μετά την ξήρανση

W<sub>cont</sub>: βάρος του δοχείου

#### 2.4.2. Προσδιορισμός υδατοχωρητικότητας του εδάφους

Για τον προσδιορισμό της υδατοχωρητικότητας του εδαφικού δείγματος που μελετάμε, αρχικά ζυγίζεται ορισμένη ποσότητα εδάφους και τοποθετείται σε χωνί με διηθητικό χαρτί του οποίου το βάρος έχει καταγραφεί. Στη συνέχεια, το έδαφος διαβρέχεται με απεσταγμένο νερό μέχρι να εξασφαλισθεί ο κορεσμός του και καλύπτεται η επιφάνεια της κωνικής για αποφυγή τυχόν απώλειας νερού από την εξάτμιση. Το έδαφος παραμένει για να στραγγίσει η περίσσεια ύδατος για περίπου 12 ώρες και κατόπιν επαναζυγίζεται το έδαφος με το χωνί και το διηθητικό χαρτί. Η υδατοχωρητικότητα του δείγματος υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο:

$$WHC = [(B-X)+(W2-W1)/X] \times 100\%$$

WHC: υδατοχωρητικότητα του εδάφους

B: το βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

X: το ξηρό βάρος του εδάφους

W1: το βάρος του χωνιού με το έδαφος και το διηθητικό χαρτί πριν εμποτιστεί με νερό

W2: το βάρος του χωνιού με το έδαφος και το διηθητικό χαρτί μετά τον εμποτισμό και την στράγγιση

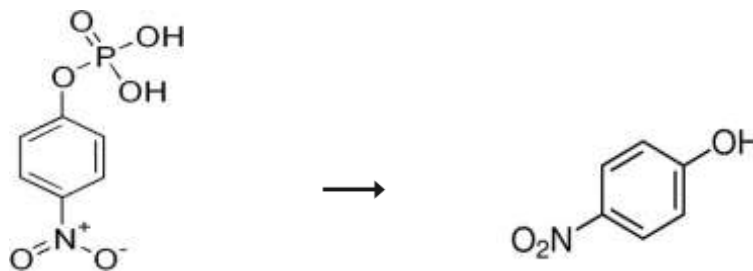
#### 2.5. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Οι ενζυμικές μέθοδοι και οι μέθοδοι εκτίμησης γενικότερων μικροβιακών λειτουργιών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη, αποσκοπούν στην εκτίμηση της επίδρασης ορισμένων

γεωργικών φαρμάκων σε διάφορες λειτουργίες των μικροοργανισμών του εδάφους. Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν δίνουν πληροφορίες για τα παρακάτω ένζυμα: 1) όξινες και αλκαλικές φωσφατάσες που συμμετέχουν στον κύκλο του φωσφόρου, 2) β-γλυκοσιδάσες που συμμετέχουν στον κύκλο του άνθρακα, 3) γενική υδρολυτική ενζυμική δραστηριότητα μέσω της δοκιμής FDA. Πλέον των παραπάνω εκτιμήθηκε η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων σε δείκτες λειτουργίας της μικροβιακής κοινότητας όπως είναι: 1) η δυνητική νιτροποίηση που αποτελεί σημαντικό βήμα στον κύκλο του N και 2) η μικροβιακή αναπνοή του εδάφους που αποτελεί έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη μικροβιακής δραστηριότητας.

### 2.5.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΞΙΝΩΝ ΚΑΙ ΑΛΚΑΛΙΚΩΝ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Η ομάδα των φωσφατασών που μελετήθηκε ήταν οι φωσφομονοεστεράσες. Η δοκιμή περιλαμβάνει την ενσωμάτωση στο έδαφος κατάλληλου υποστρώματος για τις φωσφατάσες (*p*-nitrophenyl phosphate) που με την υδρόλυση του φωσφοεστερικού δεσμού οδηγεί στην ελευθέρωση *para*-nitrophenol η οποία μπορεί να προσδιοριστεί με φωτομετρικές μεθόδους.



*p*-nitrophenyl phosphate

*p*-nitrophenol

#### 2.5.1.1 Εργαστηριακά σκεύη και όργανα

Για την μέτρηση της δραστηριότητας των όξινων και αλκαλικών φωσφομονοεστερασών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω εργαστηριακά σκεύη:

- Κωνικές φιάλες των 50 ml

- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Σιφόνια των 1 και 5ml
- Πιπέτες Pasteur
- Ποτήρια ζέσεως
- Χωνιά διήθησης

Τα όργανα που απαιτήθηκαν είναι:

- Ζυγαριά
- Vortex
- Θάλαμος επώασης με ανάδευση
- Φυγόκεντρος
- Φωτόμετρο

### 2.5.1.2. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους αναγράφονται παρακάτω:

A. MUB (Modified Universal Buffer): 12.1 g THAM (tris (hydroxymethyl) aminomethane), 11.6 g μαλαϊκό οξύ, 14 g κιτρικό οξύ και 6.3 g βορικό οξύ ( $H_3BO_3$ ) διαλύονται σε 448 ml 1N NaOH και απεσταγμένο  $H_2O$  μέχρι το 1L. Αποθηκεύεται στο ψυγείο.

B. MUB, pH=6.5: Σε 200 ml MUB προστίθεται HCl 0.1 M μέχρι pH=6.5 και προσαρμογή του όγκου.

Γ. MUB, pH=11: Σε 200ml MUB προστίθεται 0.1 M NaOH για προσαρμογή του pH στο 11.

Δ. p-nitrophenyl phosphate solution (PNP) 0.05 M: 0.840g disodium p-nitrophenyl phosphate tetrahydrate σε 40 ml MUB pH 6.5 για τις όξινες φωσφατάσες ή 40 ml MUB για τις αλκαλικές φωσφατάσες και προσθήκη αντίστοιχου pH MUB ως τα 50 ml. Αποθηκεύεται στο ψυγείο.

E.  $CaCl_2$  0,5M: 5gr  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  σε 700 ml απεσταγμένου νερού και συμπλήρωση με απεσταγμένο ως το 1L.



ΣΤ. NaOH 0.5M: 20 g NaOH σε 700 ml απεσταγμένου νερού και συμπλήρωση με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O ως το 1 L.

Z. Διάλυμα αναφοράς *p*-nitrophenol: 1 g *p*-nitrophenol διαλύεται σε 700ml απεσταγμένο νερό και αραιώνεται με H<sub>2</sub>O μέχρι το 1L. Αποθηκεύεται στο ψυγείο.

### 2.5.1.3. Πειραματική διαδικασία

Σε κωνικές φιάλες των 500 ml τοποθετήθηκε 1 g εδάφους από κάθε δείγμα. Στη συνέχεια προστέθηκε από 0.2 ml τολουένιο και 4 ml MUB (με pH 6.5 για τις όξινες και με pH 11 για τις αλκαλικές φωσφατάσες). Ακολούθησε προσθήκη 1 ml διαλύματος *p*-nitrophenyl phosphate (PNP). Οι κωνικές φιάλες αναδεύτηκαν για λίγα δευτερόλεπτα σε vortex και σφραγίστηκαν με parafilm. Τοποθετήθηκαν για 1 ώρα στους 37°C σε θάλαμο επώασης, όπου πραγματοποιείται παράλληλα και ανάδευση. Τελικά, έχουμε από τρεις κωνικές φιάλες να αντιστοιχούν σε κάθε γεωργικό φάρμακο και τρεις που περιέχουν το μάρτυρα. Η μόνη διαφορά ως αυτό το σημείο ήταν το διαφορετικό pH του MUB για τις όξινες και αλκαλικές φωσφατάσες. Στη συνέχεια του πειράματος δεν παρατηρείται καμία διαφορά και η διαδικασία είναι ίδια και για τα δύο είδη φωσφατασών. Μετά το πέρας της μίας ώρας, ακολουθεί προσθήκη 1 ml CaCl<sub>2</sub> 0.5M και 4 ml NaOH 0.5M. Αναδεύουμε ελαφρά και πραγματοποιούμε διήθηση του εδαφικού διαλύματος (Εικόνα 1). Οι κωνικές φιάλες μέσα στις οποίες πραγματοποιείται η διήθηση, τοποθετούνται σε δοχείο με πάγο, ώστε να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν ο σχηματισμός CaPO<sub>4</sub><sup>-1</sup> που θολώνει το διήθημα. Παράλληλα έχουν παρασκευαστεί και 6 δείγματα (3 για το κάθε είδος φωσφατάσης) τα οποία και χρησιμοποιούμε ως 'τυφλά' δείγματα (Blank). Η διαφορά των δειγμάτων blank είναι ότι το 1ml PNP διαλύματος προστίθεται σε αυτά μετά την προσθήκη του CaCl<sub>2</sub> 0.5M και NaOH 0.5M (δηλαδή ακριβώς πριν τη διήθηση) σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δείγματα. Στο τελευταίο βήμα πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης του εκχυλίσματος που προκύπτει, στα 420 nm, αφού μηδενίσουμε το φωτόμετρο πριν από κάθε μέτρηση με ένα από τα δείγματα blank (Εικόνα 2) (Tabatabai, 1994).



Εικόνα 1: Διήθηση των εδαφικών διαλυμάτων σε παγό.



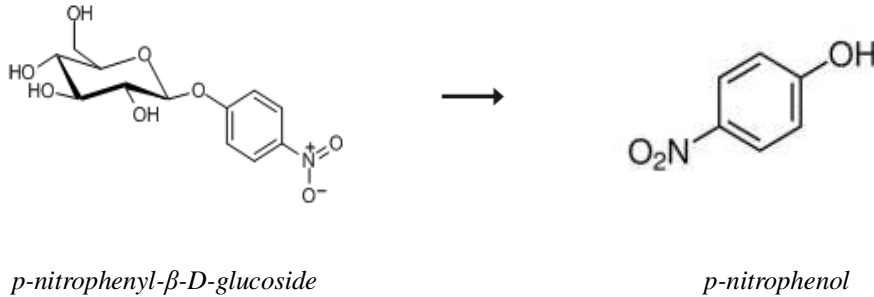
Εικόνα 2: Τελικά διηθήματα προς φωτομέτρηση.

#### 2.5.1.4. Αρχή της μεθόδου

Αρχικά, προστίθεται στο εδαφικό δείγμα τολουένιο, το οποίο έχει πλασμολυτική και απολυμαντική δράση, ενώ δεν παρουσιάζει σημαντική επίδραση στις όξινες και αλκαλικές φωσφατάσες. Η χρήση MUB (Modified Universal Buffer) με ρυθμισμένο το pH στο 6.5 και στο 11 για τις όξινες και τις αλκαλικές φωσφατάσες αντίστοιχα, παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για την βέλτιστη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών. Το ρυθμισμένο σε κατάλληλο pH διάλυμα sodium p-nitrophenyl phosphate (PNP) είναι το υπόστρωμα το οποίο μετά την επώασή του με το εδαφικό δείγμα και τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, αποδίδει το χρωματομετρικά ανιχνεύσιμο προϊόν της αντίδρασης δηλαδή την p-nitrophenol. Η ανάδευση των κωνικών κατά τη επώαση πιστεύεται πως επηρεάζει τις τιμές της  $K_m$  (σταθερά Michaelis) και την ομοιογένειά τους μεταξύ των δειγμάτων (Tabatabai & Bremner, 1971; Eivazi & Tabatabai, 1977). Η προσθήκη  $CaCl_2-NaOH$  μετά την επώαση εξυπηρετεί: i) την αναστολή της δράσης των φωσφομονοεστερασών, ii) την ανάπτυξη του κίτρινου χρώματος που χαρακτηρίζει την παραγόμενη νιτροφαινόλη και iii) την ανάκτηση της p-nitrophenol από τα εδαφικά δείγματα.

## 2.5.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ Β-ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΗ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Οι β-γλυκοσιδάσες καταλύουν την υδρόλυση των β-D-γλυκοσιδίων. Τα προϊόντα της υδρόλυσης των β-γλυκοσιδίων αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η μέθοδος αυτή είναι βασισμένη στον χρωματομετρικό προσδιορισμό της *p*-nitrophenol που απελευθερώνεται από τη δράση της β-γλυκοσιδάσης, όταν τα δείγματα εδάφους επωάζονται με το υπόστρωμα *p*-nitrophenyl-β-D-glucoside.



### 2.5.2.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα

Τα εργαστηριακά σκεύη που απαιτήθηκαν είναι:

- Κωνικές φιάλες των 50ml
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Πιπέτες των 1 και 5 ml
- Χωνιά διήθησης
- Πιπέτα Pasteur
- Ποτήρια ζέσεως

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Ζυγαριά
- Θάλαμος επώασης

- Φωτόμετρο
- Vortex

### 2.5.2.2. Αντιδραστήρια

A. Διάλυμα p-nitrophenyl-β-D-glucoside (PNG) 0.05M: Διαλύουμε 0.654 g PNG σε 40 ml MUB pH 6.0 και προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι τα 50ml. Αποθηκεύουμε στο ψυγείο.

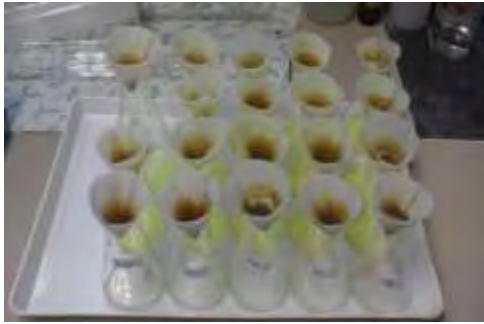
B. Ρυθμιστικό διάλυμα THAM 0.1M, pH 12: Διαλύουμε 12.2 g THAM σε 800 ml νερού και ρυθμίζουμε το pH στην τιμή 12 με NaOH 0.5M. Αραιώνουμε σε τελικό όγκο 1L με απεσταγμένο νερό.

Γ. Ρυθμιστικό διάλυμα MUB pH = 6.0: Μεταφέρουμε 200 ml από το προϋπάρχον MUB σε κωνική φιάλη των 500 ml, τοποθετούμε μέσα μαγνητάκι και αναδεύουμε. Προσθέτουμε HCl 0.1M μέχρι να ρυθμίσουμε το pH στο 6 και προσαρμόζουμε τον όγκο στο 1L.

Δ. CaCl<sub>2</sub> 0.5M: Διαλύουμε 73.5 g CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O σε 700 ml απεσταγμένο νερό και προσθέτουμε H<sub>2</sub>O ως το 1L.

### 2.5.2.3. Πειραματική διαδικασία

Ποσότητα 1 g εδάφους από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 50 ml. Ακολούθως προστέθηκαν στις κωνικές φιάλες 0.25 ml τολουένιο, 4 ml MUB pH 6.0 και 1 ml PNG. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναδεύτηκαν σε vortex και αφού σφραγίστηκαν με parafilm τοποθετήθηκαν στην επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Ακολούθως στα δείγματα προστέθηκαν 1ml CaCl<sub>2</sub> 0.5M και 4ml THAM buffer 0.1M pH 12 και αφού αναδεύτηκαν ελαφρά ακολούθησε διήθηση. Για την προετοιμασία των 'τυφλών' δειγμάτων (Blank), εκτελούμε ακριβώς τα ίδια βήματα, μόνο που το PNG προστίθεται ακριβώς πριν από την διήθηση. Τα blank χρησιμοποιούνται για να μηδενίζουμε το φωτόμετρο και προχωράμε στην μέτρηση της απορρόφησης των διηθημάτων στα 420nm (Eivazi & Tabatabai, 1988).



Εικόνα 4: Διήθηση των εδαφικών διαλυμάτων.



Εικόνα 5: Διηθήματα προς φωτομέτρηση.

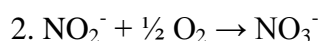
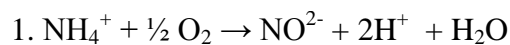
#### 2.5.2.4. Αρχή της μεθόδου

Το τολουένιο που προστίθεται αρχικά στα εδαφικά δείγματα, έχει πλασμολυτική και απολυμαντική δράση. Η επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος αλλά και του pH του, γίνεται με βάση τα ευρήματα των Eivazi and Tabatabai (1988), τα οποία καταδεικνύουν την βέλτιστη δραστηριότητα των β-γλυκοσιδασών σε pH 6. Το PNG αποτελεί το υπόστρωμα των β-γλυκοσιδασών, οι οποίες κατά την επώαση των δειγμάτων, υδρολύουν το PNG απελευθερώνοντας το χρωματομετρικά προσδιορίσιμο προϊόν της αντίδρασης, την p-nitrophenol. Η p-nitrophenol που ελευθερώνεται εκχυλίζεται από το έδαφος με την προσθήκη CaCl<sub>2</sub> και THAM. Συγκεκριμένα, η μεταχείριση με CaCl<sub>2</sub>- THAM εξυπηρετεί: i) την αναστολή της δράσης των β-γλυκοσιδασών, ii) την ανάπτυξη του κίτρινου χρώματος που χαρακτηρίζει την παραγόμενη φαινόλη και iii) την ανάκτηση της p-nitrophenol από τα εδαφικά δείγματα.

#### 2.5.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ (POTENTIAL NITRIFICATION).

Η μέτρηση της δυνητικής νιτροποίησης πραγματοποιήθηκε ώστε να συμπεράνουμε (έμμεσα) κατά πόσο τα γεωργικά φάρμακα που μελετάμε έχουν επηρεάσει την ικανότητα νιτροποίησης των μικροοργανισμών του εδάφους. Η διαδικασία της νιτροποίησης συμβαίνει σε δύο στάδια. Οι δύο αντιδράσεις που την απαρτίζουν διεξάγονται αερόβια από διαφορετικούς μικροβιακούς πληθυσμούς. Η αμμωνία ή τα ιόντα αμμωνίου οξειδώνονται σε πρώτη φάση σε νιτρώδη και στη συνέχεια σε νιτρικά

ιόντα.



### 2.5.3.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα

Τα εργαστηριακά σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Κωνικές φιάλες των 250ml
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Πιπέτες των 5 και 10ml
- Πιπέτες Pasteur
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Χωνιά διήθησης
- Ποτήρια ζέσεως

Τα όργανα που απαιτήθηκαν είναι:

- Ζυγαριά
- Θάλαμος επώασης με περιστρεφόμενο αναδευτήρα
- Κατάψηξη
- Φωτόμετρο

### 2.5.3.2. Αντιδραστήρια

Παρακάτω αναφέρονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η σύστασή τους:

A. Διάλυμα  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1mM: Διαλύουμε 0.13214 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  σε 1L απεσταγμένου νερού.

B. Διάλυμα  $\text{NaClO}_3$  1.5M: Διαλύουμε 15.97 g  $\text{NaClO}_3$  σε 1L απεσταγμένου νερού.

Γ. Διάλυμα KCl 2M: Διαλύουμε 149.1 g KCl σε 1000 ml απεσταγμένου νερού.

Δ. Ρυθμιστικό διάλυμα NH<sub>4</sub>Cl 0.19M, pH = 8.5: Διαλύουμε 10.163 g NH<sub>4</sub>Cl σε 1L απεσταγμένου νερού και ρυθμίζουμε το pH στο 8.5.

Ε. Χρωματικός δείκτης: 2 g sulphaniamide και 0.1 g N-(1-naphyl)-ethylene diamine hydrochloride διαλυμένα σε 150 ml απεσταγμένου νερού και 20 ml φωσφορικού οξέος.

### 2.5.3.3. Πειραματική διαδικασία

Ζυγίστηκαν 5 g εδάφους και τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 ml. Έχουμε 15 κωνικές που περιέχουν 5 g εδάφους που έχει λάβει εφαρμογή μυκητοκτόνων και αντιοξειδωτικών και 3 κωνικές που περιέχουν έδαφος μάρτυρα. Επίσης, σε άλλες 6 κωνικές φιάλες, που η κάθε μία αντιστοιχεί σε μία τριάδα από τις προηγούμενες 18, τοποθετήθηκαν 5 g εδάφους. Σε όλες τις κωνικές προστέθηκαν 20 ml διαλύματος (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 0.1ml NaClO<sub>3</sub> και αναδεύτηκαν ελαφρά. Η πρώτη ομάδα των 18 δειγμάτων τοποθετήθηκε για επώαση στους 20°C για 6 ώρες, ενώ η δεύτερη ομάδα των 6 δειγμάτων αποθηκεύτηκε στους -20°C για 6 ώρες. Μετά το πέρας των 6 ωρών, αφέθηκαν και οι δύο ομάδες να φτάσουν την θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 ml KCl σε όλες τις κωνικές, οι οποίες αναδεύτηκαν, πραγματοποιήθηκε διήθηση του περιεχομένου τους και συλλέχθηκε το διήθημα σε δοκιμαστικούς σωλήνες (Εικόνα 3).

Για να πραγματοποιηθεί η φωτομετρική ανάλυση, αναμείχθηκαν 5 ml από το εκχύλισμα που έχουμε παραλάβει, με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH<sub>4</sub>Cl) και με 2 ml χρωματικού δείκτη. Αναδεύτηκαν καλά για να πετύχουμε ομογενοποίηση του διαλύματος και αφέθηκαν για 15 λεπτά στον πάγκο εργασίας σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, παρασκευάστηκαν τα τυφλά δείγματα (blank) αναμιγνύοντας 5 ml απεσταγμένο νερό με 3 ml NH<sub>4</sub>Cl και 2 ml χρωματικού δείκτη. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 520nm (Kandeler, 1995).



Εικόνα 3: Διηθήματα έτοιμα για φωτομέτρηση.

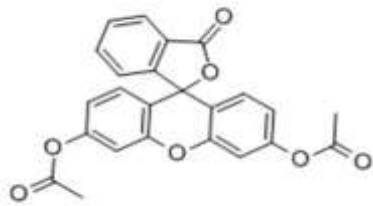
#### 2.5.3.4. Αρχή της μεθόδου

Το διάλυμα  $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$  που προστίθεται αρχικά στις κωνικές που περιέχουν τα εδαφικά δείγματα, αποτελεί το υπόστρωμα για τα νιτροδοποιητικά βακτήρια. Το διάλυμα  $\text{NaClO}_3$  που προστίθεται αργότερα δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας της περαιτέρω οξειδωσης των νιτροδών προς νιτρικά ιόντα. Δηλαδή, έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό και συσσώρευση νιτροδών ( $\text{NO}_2^-$ ) παρά νιτρικών ( $\text{NO}_3^-$ ) (Belser & Mays, 1980). Στα δείγματα που τοποθετήθηκαν για επώαση, πραγματοποιήθηκαν οι νιτροδοποιητικές αντιδράσεις, ενώ σε αυτά που μπήκαν στην κατάψυξη, τα ένζυμα απενεργοποιήθηκαν και συνεπώς δεν έλαβε χώρα νιτροδοποίηση. Το  $\text{KCl}$  που προστίθεται μετά την επώαση και κατάψυξη των δειγμάτων, αφού έχουν πάρει την θερμοκρασία δωματίου, δεσμεύει  $\text{NH}_4^+$  και  $\text{NO}_3^-$ . Ο χρωματικός δείκτης αντιδρά με τα  $\text{NO}_2^-$  που έχουν παραχθεί και με τη μέθοδο της φωτομέτρησης καταδεικνύει την συγκέντρωσή τους στα διαλύματα.

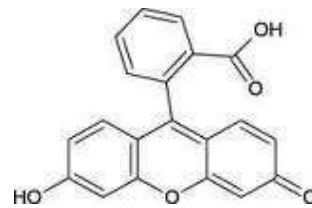
#### 2.5.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΔΙΣΟΞΙΚΗΣ ΦΛΟΥΟΡΟΣΕΪΝΗΣ (FDA).

Η μέθοδος FDA χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ολικής υδρολυτικής δραστηρότητας των μικροοργανισμών του εδάφους. Ειδικότερα, το FDA (3',6'- diacetylfluorescein) υδρολύεται από έναν αριθμό υδρολυτικών ενζύμων όπως πρωτεάσες, εστεράσες και λιπάσες. Το προϊόν αυτής της ενζυμικής μετατροπής είναι η φλουοροσεΐνη που φθορίζει (Swisher and Carroll, 1980).





*FDA (3',6'- diacetylfluorescein)*



*Fluorescein*

#### 2.5.4.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα

Τα εργαστηριακά σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Κωνικές φιάλες των 50ml
- Πιπέτες των 15ml
- Πιπέτα Pasteur
- Ποτήρια ζέσεως
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Χωνί Buchner
- Φιάλη κενού

Τα όργανα που απαιτήθηκαν είναι:

- Ζυγός
- Αναδευτήρας
- Αντλία κενού
- Φυγόκεντρος
- Φωτόμετρο

#### 2.5.4.2. Αντιδραστήρια

A. Ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού καλίου, 60mM: Διαλύουμε 8.7 g  $K_2HPO_4$  και  $KH_2PO_4$  σε 1L  $H_2O$ .

B. Διάλυμα δισοξικής φλουροσεΐνης (FDA), 1000μg/ml: Διαλύουμε 0.1 g FDA σε 80 ml ακετόνης και στη συνέχεια συμπληρώνουμε με ακετόνη ως τα 100ml.

Γ. Διάλυμα χλωροφόρμιο/μεθανόλη (αναλογία κατά όγκο 2:1): Ζυγίζουμε και τοποθετούμε σε ογκομετρική φιάλη 666.6 ml χλωροφόρμιο και προσθέτουμε μεθανόλη μέχρι το 1L.

#### 2.5.4.3. Πειραματική διαδικασία

Ποσότητα 2 g εδάφους από κάθε δείγμα ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 50 ml. Ακολούθως προστέθηκαν 15 ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 60 mM pH 7.6 . Ακολούθησε προσθήκη 0.2ml διαλύματος αναφοράς FDA (1000μg/ml). Τα στόμια των κωνικών σφραγίσθηκαν και ακολούθησε έντονη ανακίνηση με το χέρι και στην συνέχεια ανάδευση στον αναδευτήρα για 20 λεπτά στους 30°C. Μετά το τέλος του χρόνου, έγινε προσθήκη 15ml διαλύματος χλωροφορμίου:μεθανόλης. Τα δείγματα διηθήθηκαν σε φιάλη κενού Buchner, με τη βοήθεια αντλίας κενού (Εικόνα 6). Το κάθε διήθημα μεταφέρθηκε σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολούθησε ο διαχωρισμός των δύο φάσεων που σχηματίστηκαν (Εικόνα 7). Η άνω φάση με το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, συλλέχθηκε με πιπέτα Pasteur και φυλάχθηκε για την μέτρηση της απορρόφησης. Το τυφλό δείγμα (Blank) που χρησιμοποιήθηκε είναι το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (A). Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 420 nm (*Adam and Duncan, 2001*).



Εικόνα 6: Διήθηση με φιάλη κενού Buchner.



Εικόνα 7: Διήθημα δύο φάσεων πριν τον διαχωρισμό.

#### 2.5.4.4. Αρχή της μεθόδου

Το ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού καλίου που προστίθεται αρχικά στα εδαφικά δείγματα, εξασφαλίζει την βέλτιστη δραστηριότητα των ενζύμων που υδρολύουν το FDA, όταν το pH του είναι ρυθμισμένο στο 7.6 (Swisher and Carroll, 1980). Το διάλυμα αναφοράς του FDA που προστίθεται στη συνέχεια, αποτελεί το υπόστρωμα των διάφορων μικροβιακών ενζύμων που το μετατρέπουν στη φθορίζουσα χρωματομετρικά ανιχνεύσιμη, φλουοροσεΐνη. Κατά την επώαση των δειγμάτων στους 30°C (Breeuwer et al. 1995) πραγματοποιείται παράλληλα και ανάδευση, η οποία αποσκοπεί στην ομογενοποίηση των δειγμάτων, ώστε να δράσουν και οι μικροοργανισμοί που μπορεί να είναι ενσωματωμένοι σε κόκκους του εδάφους, έτσι ώστε να δοθεί πιο αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα (Soderstrom, 1976). Μετά το πέρας της επώασης, προστίθεται μίγμα διαλύματος χλωροφορμίου : μεθανόλης (2:1 v/v), το οποίο τερματίζει την αντίδραση στα 50 λεπτά από την στιγμή της προσθήκης. Χρησιμοποιώντας το μίγμα μεθανόλης:χλωροφορμίου (Adam and Duncan, 2001), αντί αιθανόλης (Schnurer and Rosswall, 1982) αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για εδάφη με χαμηλή υδρολυτική δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, το χλωροφόρμιο βοηθάει στην εξαγωγή της φλουοροσεΐνης από τις κυτταρικές μεμβράνες, καθώς η μη πολική φύση του FDA εξασφαλίζει την είσοδο του στα κύτταρα αλλά το πολικό προϊόν (fluorescein) που σχηματίζεται,

απεκκρίνεται μόνο όταν το όριο της χωρητικότητας των κυττάρων έχει ξεπεραστεί (*Rotman and Papermaster, 1966*). Η μεθανόλη βοηθάει το χλωροφόρμιο να αλληλεπιδράσει με το έδαφος και να τερματίσει την αντίδραση. Τελικά, η φλουοροσεΐνη που παράγεται κινείται προς την πιο πολική φάση του διαλύματος που είναι το μείγμα όξινου φωσφορικού καλίου και μεθανόλης, το οποίο και συλλέγεται για την φωτομέτρηση.

#### 2.5.5. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΝΟΗΣ

Η μέτρηση της μικροβιακής αναπνοής αποτελεί μια από τις συνηθέστερες μεθόδους εκτίμησης της γενικότερης μικροβιακής δραστηριότητας στο έδαφος. Μεταβολικά ενεργοί μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο έδαφος μετατρέπουν τον οργανικό άνθρακα C, σε ανόργανο, υπό τη μορφή του διοξειδίου του άνθρακα, CO<sub>2</sub> (*Alexander, 1977; Paul and Clark, 1989*). Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου στην παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό να εντοπίσει την επίδραση των πέντε γεωργικών φαρμάκων (IMZ, OPP, TBZ, DPA, EQ) στην γενικότερη δραστηριότητα της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.

##### 2.5.5.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα

Τα εργαστηριακά σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Γυάλινα δοχεία που σφραγίζουν αεροστεγώς (βάζα)
- Ποτήρια ζέσεως
- Κωνικές φιάλες
- Σιφόνια
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Προχοΐδα

Τα όργανα που χρειάστηκαν είναι:

- Ζυγός
- Θάλαμος επώασης

### 2.5.5.2. Αντιδραστήρια

A. NaOH, 0.5M: Διαλύουμε 12 g NaOH σε ποσότητα απεσταγμένου νερού (<1L) και στη συνέχεια συμπληρώνουμε μέχρι το 1L.

B. HCl, 0.25M: Από πυκνό διάλυμα 12M, παρασκευάζουμε με αραίωση διάλυμα 0.25M.

Γ. BaCl<sub>2</sub>, 2M: Διαλύουμε 122 g BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O σε 250 ml απεσταγμένου νερού

Δ. Δείκτης φαινολοφθαλεΐνης: Διαλύουμε 1 g φαινολοφθαλεΐνης σε 100 ml αιθανόλης.

### 2.5.5.3. Πειραματική διαδικασία

Μέσα σε 18 γυάλινα δοχεία με αεροστεγώς εφαρμοζόμενο καπάκι (βάζα), ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν 50 g εδάφους (Εικόνα 10). Η υγρασία του εδαφικού δείγματος έχει αρχικά προσαρμοστεί στο 40% της υδατοχωρητικότητας (WHC). Σε κάθε βάζο τοποθετούμε ‘παγίδα NaOH’, υπό την μορφή ενός ποτηριού ζέσεως που περιέχει 10 ή 15 ml NaOH με τον υψηλότερο όγκο να χρησιμοποιείται κατά τις πρώτες τρεις δειγματοληψίες (1, 2 και 5 ημέρες) λόγω της αναμενόμενης υψηλότερης παραγωγής CO<sub>2</sub> κατά τα πρώτα στάδια του πειράματος. Ο όγκος του NaOH ανανεώνονταν σε κάθε δειγματοληψία. Τα βάζα καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο για να αποτρέψουμε την πρόσβαση του φωτός στο εσωτερικό τους και τοποθετήθηκαν στην επώαση στους 27°C για τις επόμενες 35 ημέρες. Σε κάθε δειγματοληψία, τα βάζα απομακρύνονταν από την επώαση και αφού ανοίγονταν, αφαιρούνταν η ποσότητα NaOH από το ποτήρι ζέσεως και αντικαθίσταται με ίση ποσότητα φρέσκου διαλύματος NaOH. Τα βάζα στην συνέχεια μεταφέρονταν πάλι στην επώαση. Σε την διάρκεια της επώασης η υγρασία του εδάφους διατηρούνταν στα αρχικά επίπεδα που είχε προσαρμοστεί με προσθήκη νερού σε κάθε δειγματοληψία.

Το NaOH που συλλέγεται μεταφέρεται σε κωνική των 250ml και το ποτήρι ζέσεως της ‘παγίδας’ ξεπλένεται με 10ml απεσταγμένο νερό, που προστίθεται επίσης στην κωνική φιάλη. Ακολουθεί προσθήκη 10ml απεσταγμένου νερού και 5ml BaCl<sub>2</sub> 2M. Τέλος, προστίθενται 6 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης, ο οποίος προσδίδει στο διάλυμα έντονο φουξ χρώμα. Ακολουθεί τιτλοδότηση του διαλύματος με HCl 0.25M (Εικόνα 11), ως ότου αλλάξει το χρώμα και το διάλυμα γίνει άχρωμο

(Εικόνα 12). Ανακατεύουμε συνεχώς και φροντίζουμε η ροή του οξέος να είναι χαμηλή για να έχουμε όσο το δυνατόν ακριβέστερη τιτλοδότηση. Ο όγκος του HCl που καταναλώθηκε για την πλήρη αντίδραση (αλλαγή χρώματος του διαλύματος από φουξ σε άχρωμο) καταγράφεται. Ως τυφλά δείγματα blank σε αυτή την μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα βάζα τα οποία δεν περιείχαν δείγμα εδάφους, παρά μόνο την παγίδα NaOH.



Εικόνα 10: Γυάλινο δοχείο με αεροστεγώς εφαρμζόμενο καπάκι (βάζο), που περιέχει το εδαφικό δείγμα και την παγίδα με το NaOH.



Εικόνα 10: Τιτλοδότηση NaOH με HCl.



Εικόνα 11: Δεξιά, το διάλυμα πριν την τιτλομέτρηση. Αριστερά, το διάλυμα μετά την εξουδετέρωση.

#### 2.5.5.4. Αρχή της μεθόδου

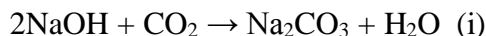
Για τον προσδιορισμό του παραγόμενου CO<sub>2</sub> εφαρμζουμε μία από τις γνωστότερες μεθόδους που βασίζεται στην απορρόφηση βάσης, ακολουθούμενη από ογκομετρία. Η παγίδευση της βάσης στηρίζεται στον ασθενή όξινο χαρακτήρα του CO<sub>2</sub>. Η αντίδραση της παγίδευσης είναι μία

εξουδετέρωση οξέως-βάσης, από την οποία παράγεται  $\text{CO}_3^{2-}$ . Η βάση-παγίδα που χρησιμοποιείται είναι το  $\text{NaOH}$  και η αντίδραση που πραγματοποιείται περιγράφεται από την εξής ισορροπία:

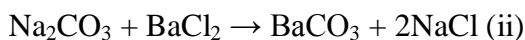


Η ισορροπία τείνει προς τα δεξιά όσο υπάρχει περίσσεια  $\text{OH}^-$  στο διάλυμα απορρόφησης και ο C διατηρείται στο διάλυμα με μορφή  $\text{CO}_3^{2-}$ . Το παγιδευμένο  $\text{CO}_2$  προσδιορίζεται έμμεσα με τιτλοδότηση της εναπομείνουσας ποσότητας  $\text{OH}^-$  με πρότυπο διάλυμα οξέος ( $\text{HCl}$ ).

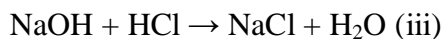
Το διάλυμα  $\text{NaOH}$  της παγίδας, αντιδρά με το  $\text{CO}_2$  που θεωρούμε πως παράγεται από τους μεταβολικά ενεργούς μικροοργανισμούς του εδάφους. Από αυτήν την αντίδραση σχηματίζεται ανθρακικό νάτριο στο διάλυμα, σύμφωνα με την εξίσωση:



Μέρος του διοξειδίου του άνθρακα που αντιδρά με το  $\text{NaOH}$  προέρχεται από τον αέρα που εγκλωβίζεται μέσα στο βάζο. Το μεικτό διάλυμα που προκύπτει και περιέχει  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και  $\text{NaOH}$ , δεν μπορεί να τιτλοδοτηθεί με  $\text{HCl}$ , καθώς και τα δύο συστατικά αντιδρούν με αυτό. Για τον λόγο αυτό προστίθεται κορεσμένο διάλυμα  $\text{BaCl}_2$  που θα κατακρημνίσει το  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , σύμφωνα με την αντίδραση:



Επειδή το διάλυμα στην κωνική φιάλη παραμένει αλκαλικό μέχρι το τέλος, το  $\text{BaCO}_3$  δεν αντιδρά με το οξύ. Έτσι το  $\text{HCl}$  αντιδρά μόνο με το υπόλοιπο  $\text{NaOH}$ :



Έτσι, ο όγκος  $\text{HCl}$  που καταναλώνεται κατά την τιτλοδότηση, αντιπροσωπεύει την ποσότητα του  $\text{NaOH}$  που δεν αντέδρασε με το  $\text{CO}_2$  που προέρχεται από την μικροβιακή αναπνοή αλλά και από τον αέρα του βάζου. Στα βάζα που αντιστοιχούν στους μάρτυρες (Blank), το  $\text{NaOH}$  αντιδρά με το διοξείδιο του άνθρακα που προέρχεται εξ'ολοκλήρου από τον αέρα που είναι εγκλωβισμένος μέσα στη φιάλη. Η τιτλοδότηση των blank απαιτεί περισσότερο  $\text{HCl}$  γιατί έχουμε μειωμένη κατανάλωση  $\text{NaOH}$ .

### 2.5.5.5. Υπολογισμός του CO<sub>2</sub>

Για να εκτιμήσουμε την μικροβιακή αναπνοή του εδάφους με βάση τον όγκο της τιτλοδότησης εφαρμόζουμε την παρακάτω εξίσωση:

$0.25 \text{ mol} \times \text{lt}^{-1} \times \text{ml HCl}$  (που χρησιμοποιήθηκαν στην τιτλοδότηση) =  $\psi \times 10^{-3} \text{ moles}$  (ο αριθμός των moles NaOH που έχει αντιδράσει με το οξύ = αριθμός των moles NaOH που παραμένει στα φιαλίδια στο τέλος του πειράματος, που δεν έχει δεσμευθεί από CO<sub>2</sub> και μετατραπεί σε Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).



Ανάλογα υπολογίζουμε για το τυφλό. Η διαφορά τους, Z, είναι το ποσό του NaOH που έχει αντιδράσει με το εκκλύμενο από το έδαφος CO<sub>2</sub>. Σύμφωνα με την εξίσωση (i), 2 mol NaOH αντιδρούν με 1 mol CO<sub>2</sub> (44gr/mol). Συνεπώς, τα g CO<sub>2</sub> που αντέδρασαν με το NaOH στις φιάλες =  $(Z/2 \times 10^{-3} \text{ moles}) \times 44 \text{ gr/mol}$ . Τέλος, εκφράζουμε την αναπνευστική δραστηριότητα ως g CO<sub>2</sub> x g<sup>-1</sup> ξηρού εδάφους x sec<sup>-1</sup> ή ως g CO<sub>2</sub> x g<sup>-1</sup> ξηρού εδάφους x ημέρα<sup>-1</sup>.

## 2.6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα των πειραμάτων αναλύθηκαν με ανάλυση διακύμανσης δυο παραγόντων (Two-Way-Analysis of Variance, ANOVA). Οι δύο παράγοντες που αξιολογήθηκαν για την επίδραση τους στις διάφορες μικροβιακές λειτουργίες που μελετήθηκαν ήταν ο χρόνος (ημέρες μετά την εφαρμογή) και το είδος του γεωργικού φαρμάκου που εφαρμόστηκε στα εδαφικά δείγματα (μεταχειρίσεις). Σε περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων μελετήθηκαν περαιτέρω διαφορές μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων στο ίδιο χρόνο αλλά και μεταξύ της ίδιας μεταχείρισης στους διαφορετικούς χρόνους με την μέθοδο του LSD σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05%.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

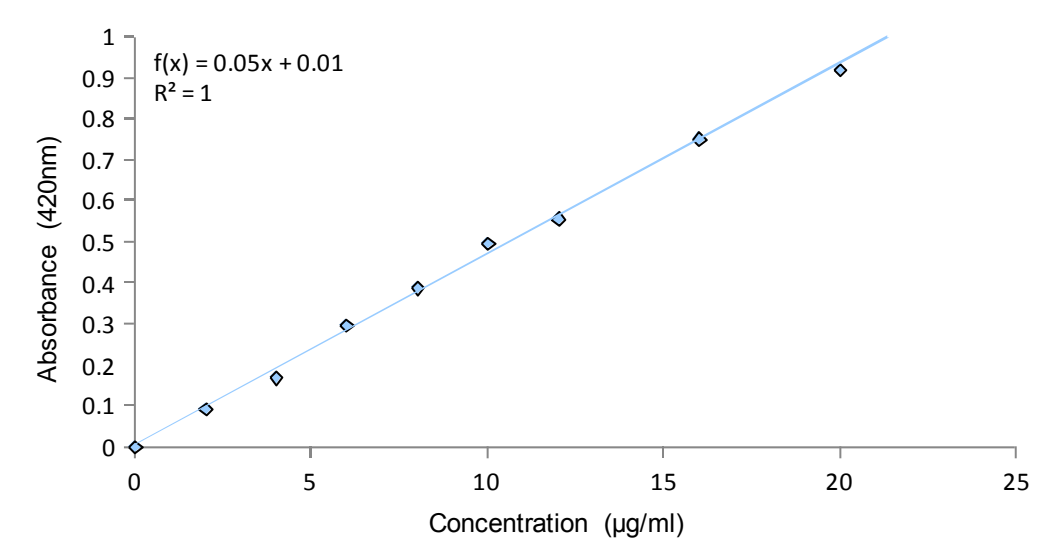
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Γενικά

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις της ενζυμικής δραστηρότητας, μικροβιακής αναπνοής και δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος που μελετήσαμε. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών καταδεικνύουν την επίδραση των πέντε γεωργικών φαρμάκων (IMZ, OPP, TBZ, DPA και EQ) στην λειτουργικότητα των όξινων και αλκαλικών φωσφατασών, των β-γλυκοσιδασών, στην ικανότητα νιτροποίησης των μικροοργανισμών, στην υδρολυτική ικανότητα των μικροοργανισμών και στην μικροβιακή αναπνοή.

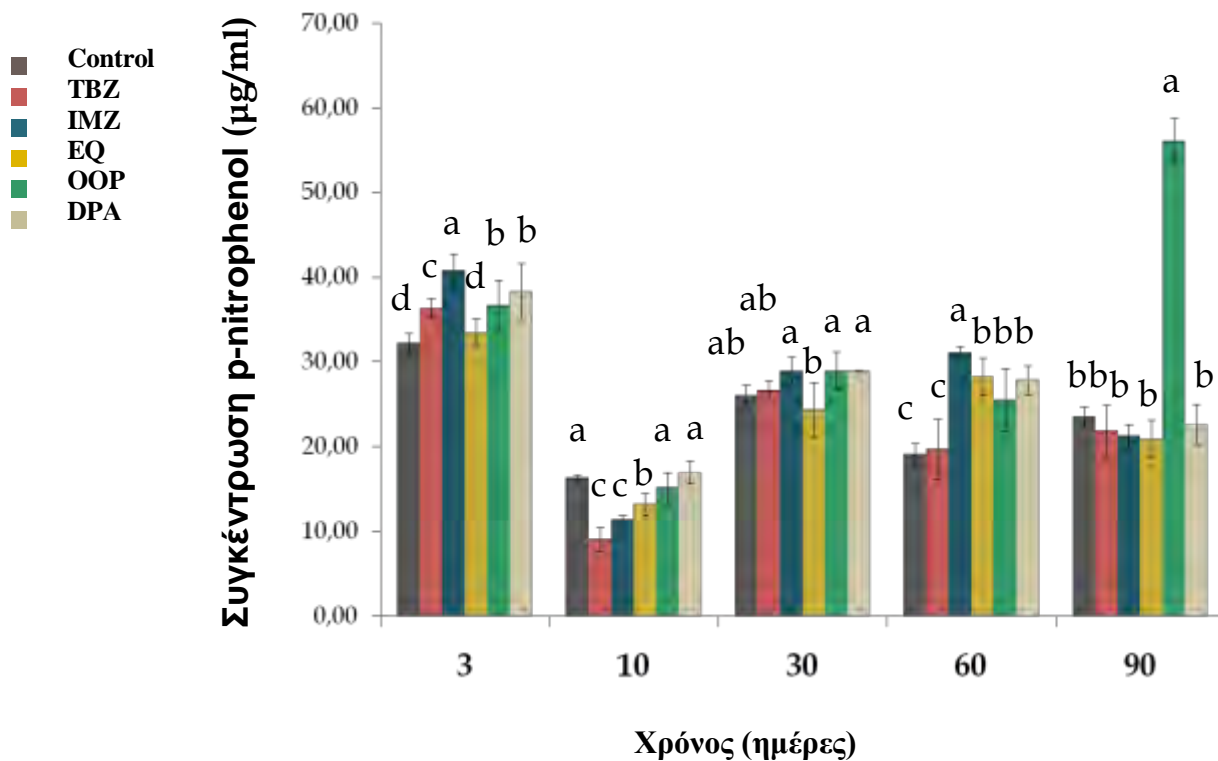
#### 3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Στο Διάγραμμα 3.1 παρουσιάζεται η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης του p-nitrophenol, με βάση την οποία πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της δραστηρότητας των όξινων και αλκαλικών φωσφατασών στο έδαφος. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης του p-nitrophenol, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 10, 20, 30, 40 και 50  $\mu\text{g/ml}$  p-nitrophenol. Διαλύουμε 1ml από το πρότυπο διάλυμα p-nitrophenol συγκέντρωσης 0,05 M σε 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  και αναδεύουμε. Έπειτα, 0, 1, 2, 3, 4, και 5ml από το αραιωμένο πρότυπο διάλυμα p-nitrophenol μεταφέρονται σε κωνικές φιάλες των 50ml και προστίθεται νερό 5, 4, 3, 2, 1 και 0 ml αντίστοιχα, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 5ml. Στη συνέχεια προστίθεται 1ml  $\text{CaCl}_2$  0.5M και 4ml NaOH 0.5M και ακολουθεί διήθηση και φωτομετρική μέτρηση στα 420nm.



*Διάγραμμα 3.1:* Καμπύλη αναφοράς p-nitrophenol για την εκτίμηση της δραστηριότητας των όξινων και αλκαλικών φωσφατασών στο έδαφος.

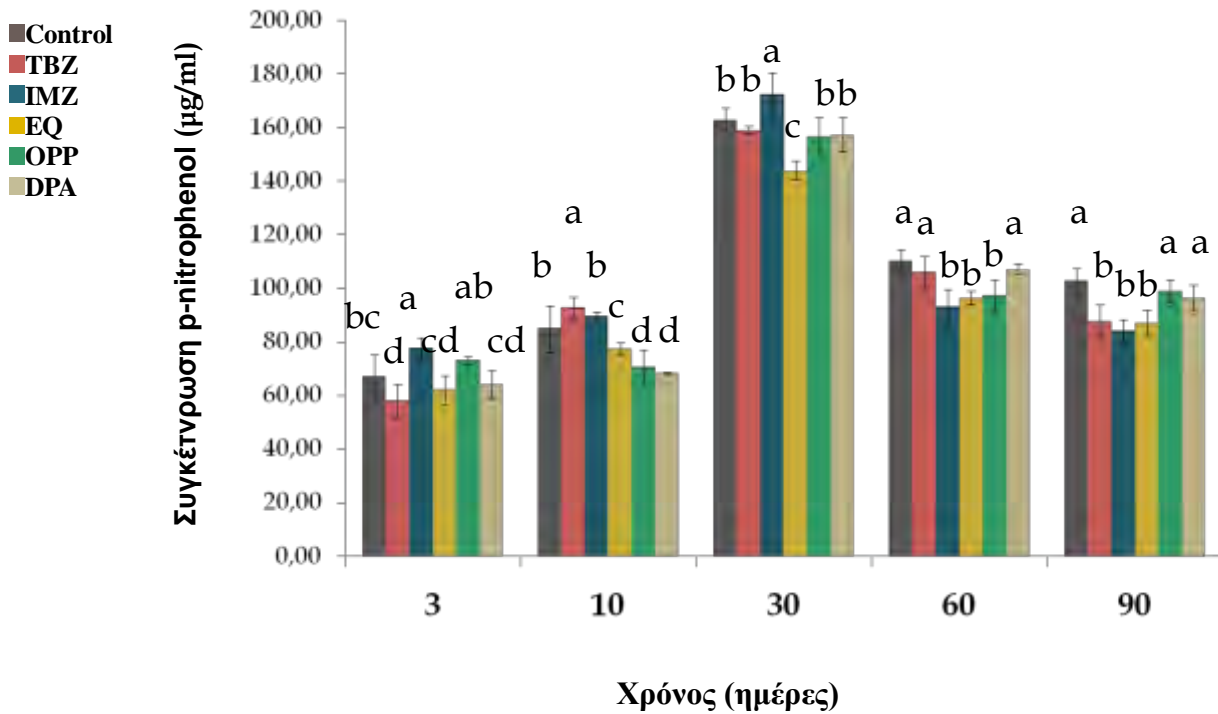
**α) Όξιμες φωσφατάσες:** Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τόσο τα γεωργικά φάρμακα όσο και ο χρόνος δειγματοληψίας, ως κύριοι παράγοντες, φαίνεται ότι προκαλούν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ( $p < 0.001$ ) στην δραστηριότητα των όξινων φωσφατασών στο έδαφος. Έτσι, η εφαρμογή κυρίως του OPP και δευτερευόντως των IMZ και DPA προκάλεσε σημαντικές αυξήσεις στην δραστηριότητα των όξινων φωσφατασών σε αντίθεση με τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα που προκάλεσαν μη σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τον μάρτυρα. Αναφορικά με την επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση των τιμών ενζυμικής δραστηριότητας σε όλες τις μεταχειρίσεις στις 10 ημέρες μετά την εφαρμογή. Ακολούθως η ενζυμική δραστηριότητα αυξήθηκε σημαντικά στους χρόνους που ακολουθούν, χωρίς όμως αυτή η αύξηση να οδηγεί σε τιμές που να είναι υψηλότερες από τις τιμές που πάρθηκαν κατά την πρώτη μέτρηση 3 ημέρες μετά την εφαρμογή. Η σημαντική αύξηση της τιμής της ενζυμικής δραστηριότητας στα δείγματα του OPP στις 90 ημέρες δεν μπορεί να αποδοθεί σε κάποια προφανή αιτία και ίσως να αποδίδεται σε σφάλμα κατά την διεξαγωγή του πειράματος. Εκτός των κύριων επιδράσεων και οι αλληλεπιδράσεις των δύο κύριων παραγόντων (γεωργικό φάρμακο x χρόνος) φαίνεται ότι προκαλούν σημαντικές ( $p < 0.001$ ) μεταβολές στην δραστηριότητα των όξινων φωσφατασών. Παρόλα αυτά οι επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στις όξιμες φωσφατάσες δεν παρουσιάζουν συγκεκριμένο πρότυπο και ποικίλουν μεταξύ των χρόνων μέτρησης.



**Διάγραμμα 3.2:** Εκτίμηση της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην δραστικότητα των όξινων φωσφατασών στο έδαφος. Παρουσία των ίδιων γραμμάτων επάνω από κάθε ράβδο καταδεικνύει μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

**β) Αλκαλικές φωσφατάσες:** Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τόσο τα γεωργικά φάρμακα όσο και ο χρόνος δειγματοληψίας, ως κύριοι παράγοντες, φαίνεται ότι προκαλούν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ( $p < 0.001$ ) στην δραστικότητα των αλκαλικών φωσφατασών στο έδαφος, όπως αυτή εκφράζεται από την συγκέντρωση της p-nitrophenol που παράγεται ως αποτέλεσμα της δράσης τους. Το EQ προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση ( $p < 0.001$ ) στην δραστικότητα των αλκαλικών φωσφατασών συγκριτικά με τον μάρτυρα. Αντίθετα τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα που αξιολογήθηκαν δεν προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τον μάρτυρα. Αναφορικά με την επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας, παρατηρήθηκε μια σταδιακή αλλά σημαντική αύξηση των τιμών της δραστικότητας των αλκαλικών φωσφατασών σε όλες τις μεταχειρίσεις ως τις 30 ημέρες μετά την εφαρμογή και ακολούθησε μια σημαντική μείωση που οδήγησε όμως σε τιμές για όλες τις μεταχειρίσεις που ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των 3 και 10 ημερών. Εκτός των κύριων επιδράσεων και οι αλληλεπιδράσεις των δύο κύριων παραγόντων (γεωργικό φάρμακο x χρόνος) φαίνεται ότι προκαλούν σημαντικές ( $p < 0.001$ ) μεταβολές στην δραστικότητα των

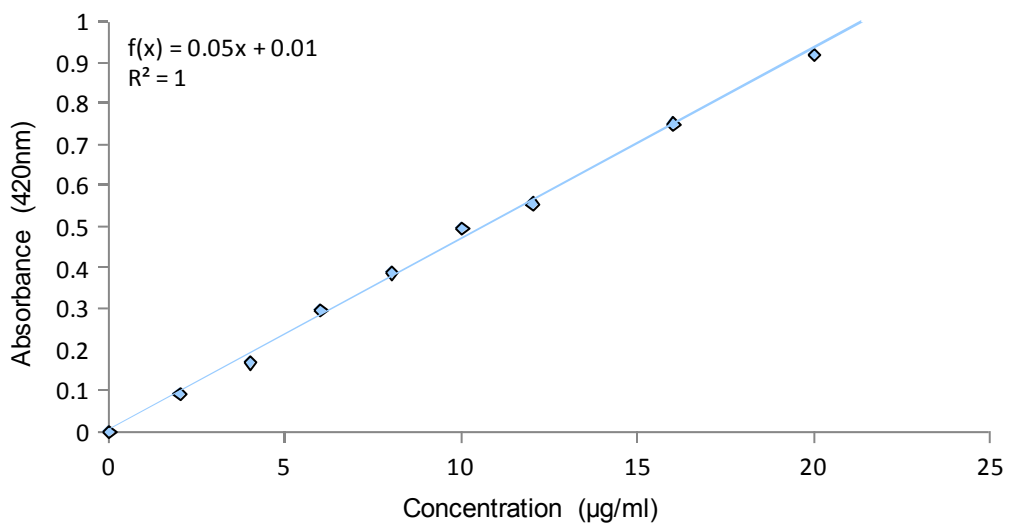
αλκαλικών φωσφατασών. Έτσι τα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή EQ παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη ενζυμική δραστικότητα σε σχέση με τον μάρτυρα στις 10, 30, 60 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή. Για τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα δεν παρατηρήθηκε συγκεκριμένο πρότυπο επίδρασης.



**Διάγραμμα 3.3:** Εκτίμηση της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην δραστικότητα των αλκαλικών φωσφατασών στο έδαφος. Παρουσία των ίδιων γραμμάτων επάνω από κάθε ράβδο καταδεικνύει μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

### 3.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ Β-ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΗΣ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

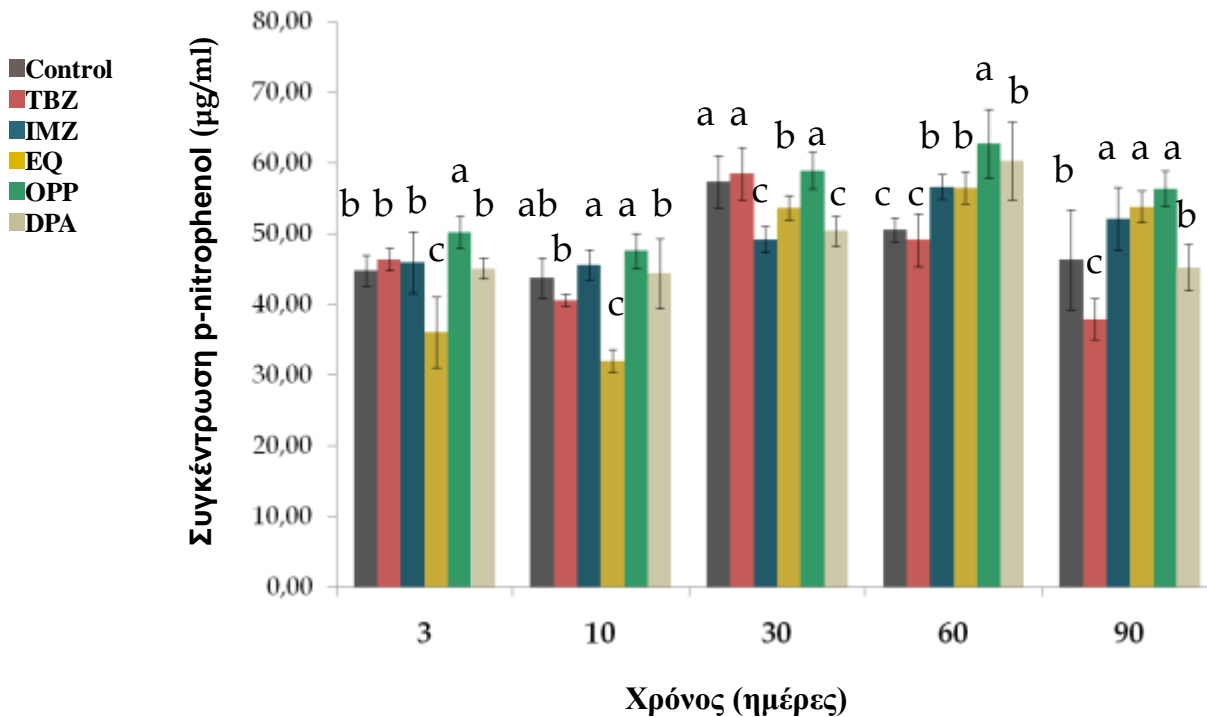
Στο Διάγραμμα 3.4 παρουσιάζεται η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της p-nitrophenol, με βάση την οποία προσδιορίστηκε η δραστικότητα των β-γλυκοσιδασών στο έδαφος. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης του p-nitrophenol, παρασκευάστηκαν διαλύματα αναφοράς συγκεντρώσεων 0, 10, 20, 30, 40 και 50 µg/ml p-nitrophenol όπως περιγράφεται παραπάνω για τις φωσφατάσες.



**Διάγραμμα 3.4:** Καμπύλη αναφοράς της p-nitrophenol που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης.

Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τόσο τα γεωργικά φάρμακα όσο και ο χρόνος δειγματοληψίας, ως κύριοι παράγοντες, φαίνεται ότι προκαλούν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ( $p < 0.001$ ) στην δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης στο έδαφος. Αναφορικά με την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων (ως κύριος παράγοντας) η εφαρμογή OPP οδήγησε σε σημαντική αύξηση ( $p < 0.05$ ) της δραστηριότητας των β-γλυκοσιδασών σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Αναφορικά με την επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας, ως κύριος παράγοντας, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας σε όλες τις μεταχειρίσεις ως τις 60 ημέρες ενώ στις 90 ημέρες οι τιμές ενζυμικής δραστηριότητας εμφανίστηκαν σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των 30 και 60 ημερών.

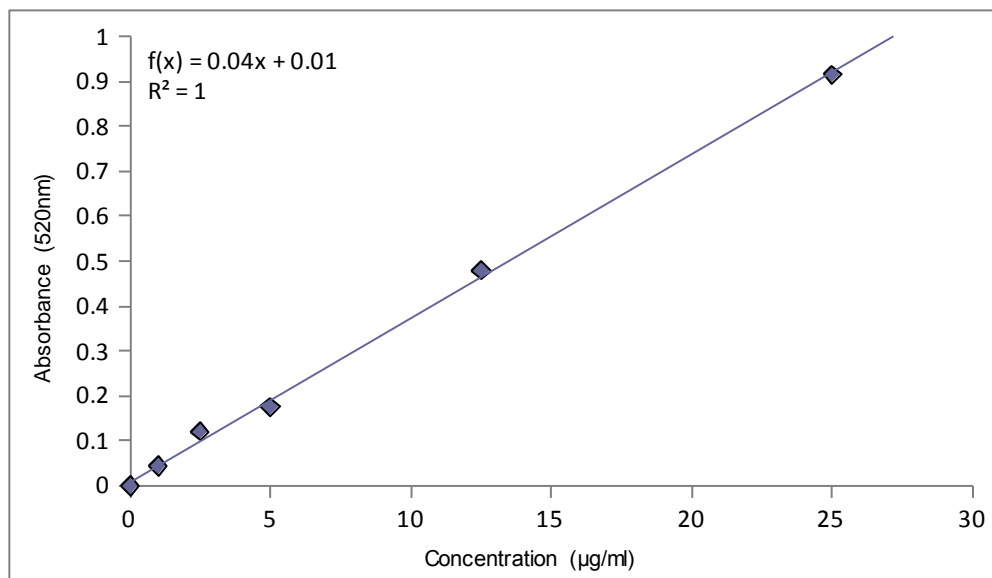
Εκτός των κύριων επιδράσεων και οι αλληλεπιδράσεις των δύο κύριων παραγόντων (γεωργικό φάρμακο x χρόνος) φαίνεται ότι προκαλούν σημαντικές ( $p < 0.001$ ) μεταβολές στην δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης. Έτσι όσα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με EQ παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα των β-γλυκοσιδασών ως τις 30 ημέρες σε σχέση με τις τιμές στο μάρτυρα. Αντίθετα για τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα δεν εμφανίζεται κάποιο πρότυπο επίδρασης στον χρόνο.



**Διάγραμμα 3.5:** Εκτίμηση της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης στο έδαφος. Παρουσία των ίδιων γραμμμάτων επάνω από κάθε ράβδο καταδεικνύει μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

#### 3.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΔΥΝΗΤΙΚΗ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ

Στο Διάγραμμα 3.6 παρουσιάζεται η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της δυνητικής νιτροποίησης, με βάση την οποία πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των νιτρωδών στα εδάφη. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν 1.5 ml διαλύματος  $\text{NaNO}_2$  διαφορετικών συγκεντρώσεων, 0.9 ml ρυθμιστικού και 0.6 ml δείκτη. Παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα  $\text{NaNO}_2$  4mM (0.0138 g  $\text{NaNO}_2$  σε 50 ml απεσταγμένο νερό) και από αυτό με διαδοχικές αραιώσεις προετοιμάστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 1, 2, 5, 10, 25 και 50  $\mu\text{M}$  όγκου 2ml (χρησιμοποιήθηκαν 0, 1, 2.5, 5, 12.5 και 25  $\mu\text{l}$   $\text{NaNO}_2$  4mM και αραιώθηκαν στα 2 ml με απεσταγμένο νερό).

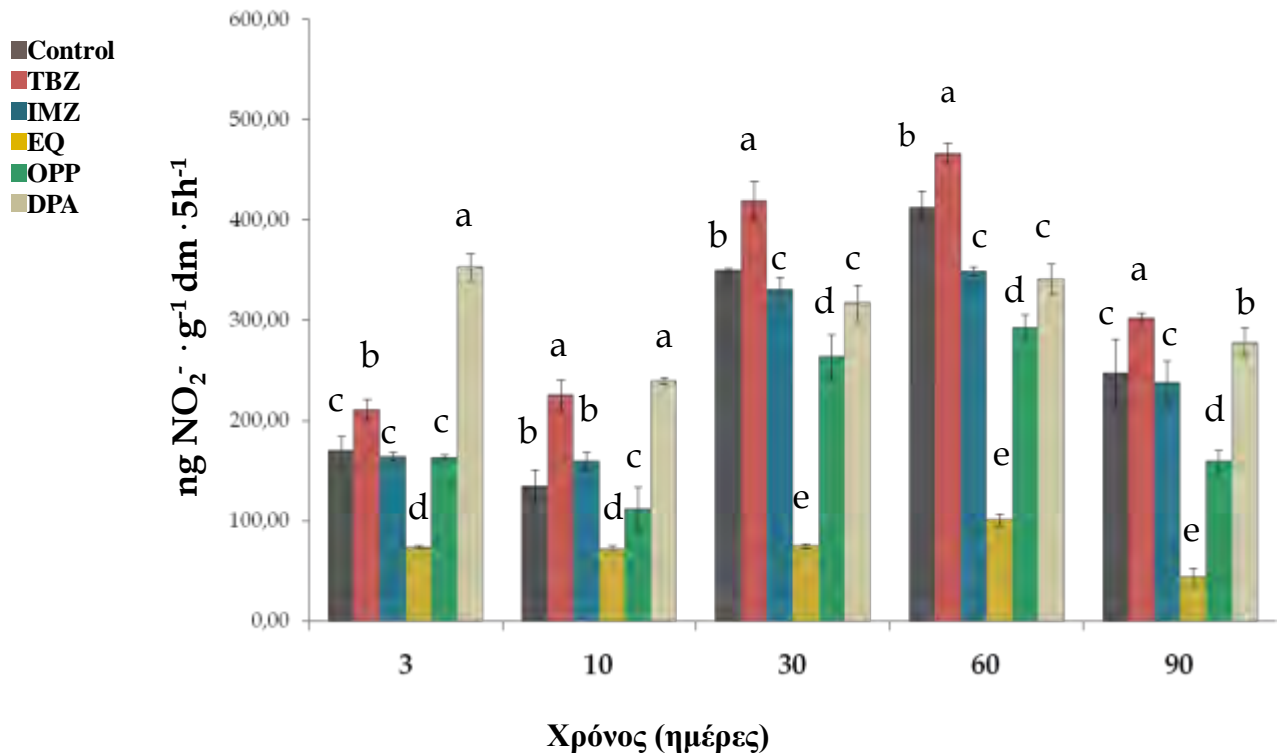


*Διάγραμμα 3.6: Πρότυπη καμπύλη νιτρωδών ( $\text{NO}_2^-$ ) που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των  $\text{NO}_2$  στο έδαφος κατά την διάρκεια του τεστ δυνητικής νιτροποίησης.*

Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τόσο τα γεωργικά φάρμακα όσο και ο χρόνος δειγματοληψίας, ως κύριοι παράγοντες, φαίνεται ότι προκαλούν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ( $p < 0.001$ ) στην δυνητική νιτροποίηση στο έδαφος, όπως αυτή εκφράζεται από την συγκέντρωση των  $\text{NO}_2$  που παράγονται στο έδαφος παρουσία περίσσειας  $\text{NH}_4^+$ . Αναφορικά με τα γεωργικά φάρμακα, η εφαρμογή των OPP και EQ προκάλεσε σημαντική μείωση της δυνητικής νιτροποίησης και ειδικότερα του δεύτερου που προκάλεσε μια σημαντική και μη αντιστρεπτή στο χρόνο αναστολή της δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος. Αντίθετα, η εφαρμογή των TBZ και DPA προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της δυνητικής νιτροποίησης σε σχέση με τον μάρτυρα. Αναφορικά με την επίδραση του χρόνου, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση της δυνητικής νιτροποίησης σε όλες τις μεταχειρίσεις στις 10 ημέρες που ακολουθήθηκε από μια σημαντική αύξηση στις 30 και 60 ημέρες όπου και παρατηρήθηκαν οι υψηλότερες τιμές δυνητικής νιτροποίησης σε όλες τις μεταχειρίσεις.

Εκτός των κύριων επιδράσεων και οι αλληλεπιδράσεις των δύο κύριων παραγόντων (γεωργικό φάρμακο x χρόνος) φαίνεται ότι προκαλούν σημαντικές ( $p < 0.001$ ) μεταβολές στην δυνητική νιτροποίηση. Έτσι η εφαρμογή TBZ οδήγησε σε μια σημαντική αύξηση της δυνητικής νιτροποίησης σε σχέση με τον μάρτυρα σε την διάρκεια του πειράματος. Αντίθετα, η εφαρμογή OPP οδήγησε σε

σημαντική μείωση της δυνητικής νιτροποίησης που έγινε εμφανής από τις 10 ημέρες και μετά. Τέλος, η εφαρμογή EQ οδήγησε σε ανάσχεση της δυνητικής νιτροποίησης που διατηρήθηκε σε όλη την διάρκεια του πειράματος.



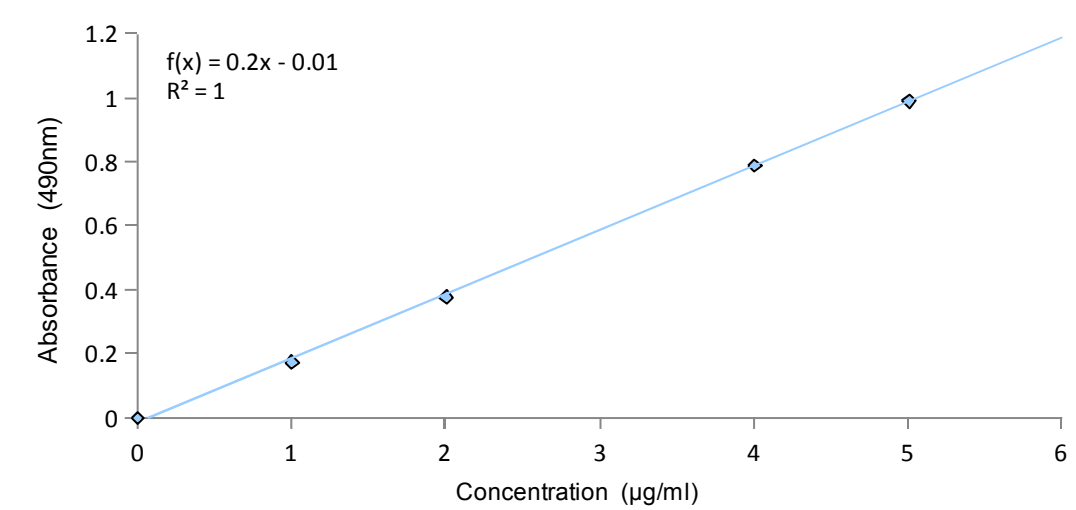
**Διάγραμμα 3.7:** Εκτίμηση της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην δυνητική νιτροποίηση, η οποία έχει εκφραστεί ως η ποσότητα NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (ng) που ελευθερώθηκε από 1 g εδάφους στη διάρκεια 5 ωρών. Παρουσία των ίδιων γραμμάτων επάνω από κάθε ράβδο καταδεικνύει μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

### 3.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ ΟΠΩΣ ΕΚΤΙΜΗΘΗΚΕ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ FDA

Στο Διάγραμμα 3.8 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη φλουοροσεΐνης με βάση την οποία εκτιμήθηκε η επίδραση των πέντε γεωργικών φαρμάκων στην γενικότερη υδρολυτική ικανότητα των μικροοργανισμών του εδάφους. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν διαλύματα φλουοροσεΐνης με συγκεντρώσεις από 0 ως 5 μg/l: Προετοιμάστηκε πυκνό διάλυμα φλουοροσεΐνης (2000 μg/ml) σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (0.2265 g Na άλας φλουοροσεΐνης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος). 1ml από το πυκνό διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη και αραιώθηκε στα 100ml με ρυθμιστικό διάλυμα (20μg/ml). Από το διάλυμα αυτό με διαδοχικές



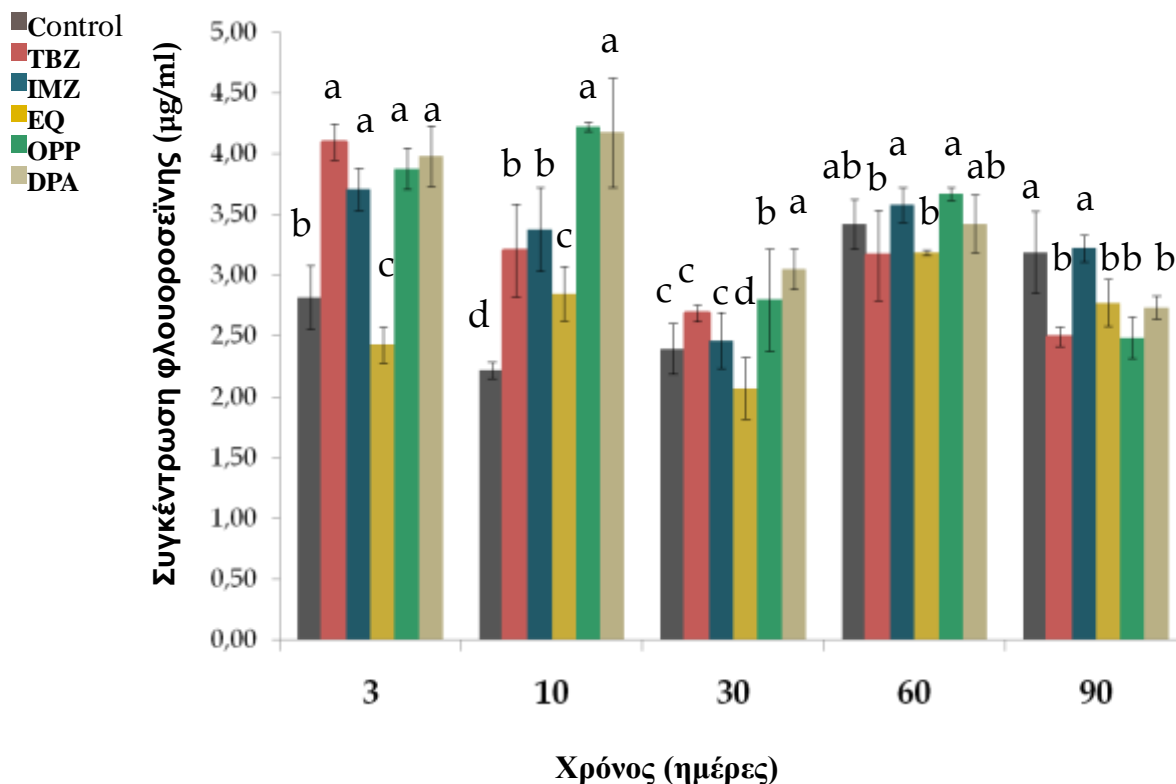
αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1, 2, 3, 4, 5  $\mu\text{g/l}$  φλουοροσεΐνης και η απορρόφηση τους προσδιορίστηκε στα 490nm.



**Διάγραμμα 3.8:** Καμπύλη αναφοράς της φλουοροσεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην ευρύτερη υδρολυτική ικανότητα των μικροοργανισμών του εδάφους όπως αυτή εκφράζεται από την ικανότητα υδρόλυσης του FDA.

Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τόσο τα γεωργικά φάρμακα όσο και ο χρόνος δειγματοληψίας, ως κύριοι παράγοντες, φαίνεται ότι προκαλούν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ( $p < 0.001$ ) στην υδρολυτική ενζυμική δραστηριότητα των μικροοργανισμών του εδάφους όπως αυτή εκφράζεται από την ικανότητα υδρόλυσης του υποστρώματος FDA.

Αναφορικά με τις κύριες επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων, η εφαρμογή του DPA οδήγησε σε σημαντική αύξηση της υδρολυτικής δραστηριότητας σε σχέση με τον μάρτυρα. Η εφαρμογή του EQ παρά το ότι προκάλεσε μια μείωση της υδρολυτικής δραστηριότητας του εδάφους, η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με τον μάρτυρα ( $p > 0.05$ ). Αναφορικά με την επίδραση του χρόνου ως κύριου παράγοντα παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση της υδρολυτικής δραστηριότητας στις 30 ημέρες μετά την εφαρμογή που ακολουθήθηκε από επαναφορά στις αρχικές τιμές στις 60 ημέρες και νέα σημαντική μείωση των τιμών σε όλες τις μεταχειρίσεις στις 90 ημέρες.



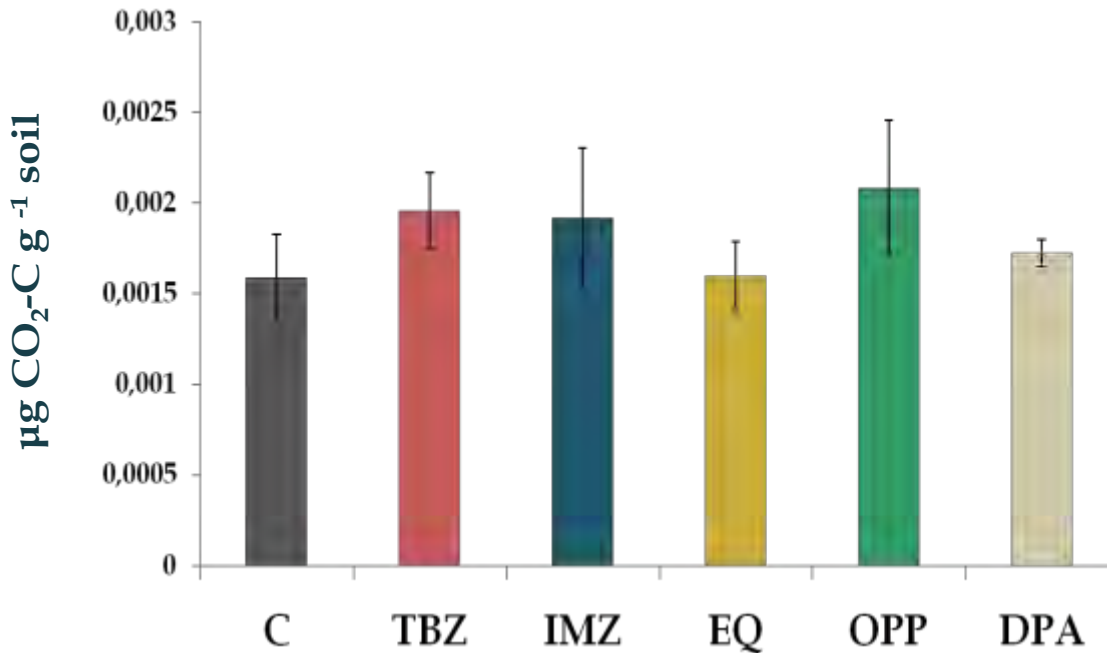
**Διάγραμμα 3.9:** Εκτίμηση της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην ενζυμική υδρολυτική ικανότητα των μικροοργανισμών του εδάφους όπως αυτή εκφράζεται από την συγκέντρωση της φλουροοσεΐνης που παράγεται στο έδαφος από την υδρόλυση του υποστρώματος FDA. Παρουσία των ίδιων γραμμάτων επάνω από κάθε ράβδο καταδεικνύει μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Εκτός των κύριων επιδράσεων και οι αλληλεπιδράσεις των δύο κύριων παραγόντων (γεωργικό φάρμακο x χρόνος) φαίνεται ότι προκαλούν σημαντικές ( $p < 0.001$ ) μεταβολές στην δυνητική νιτροποίηση. Ειδικότερα η προσθήκη DPA στο έδαφος οδήγησε σε σημαντική αύξηση της υδρολυτικής δραστηριότητας σε σχέση με τον μάρτυρα κατά τις πρώτες 30 ημέρες μετά την εφαρμογή. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν ανάλογα ξεκάθαρα πρότυπα επίδρασης των υπολοίπων γεωργικών φαρμάκων στην υδρολυτική δραστηριότητα.

### 3.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΑΠΝΟΗ

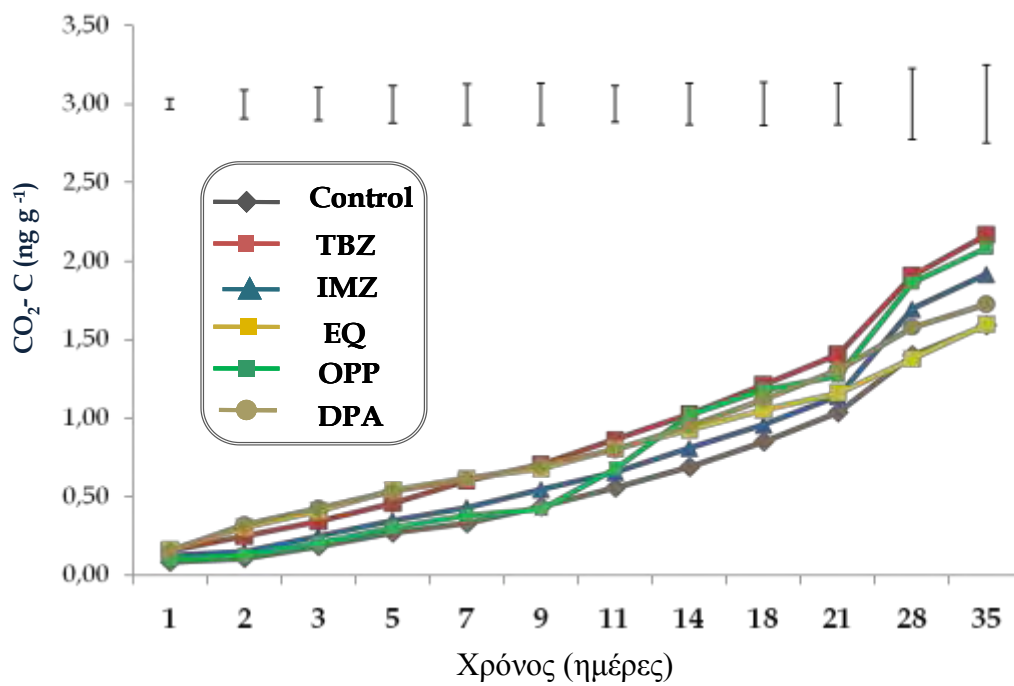
Στο Διάγραμμα 3.10 παρουσιάζεται η συνολική ποσότητα  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{g}$ ) που ελευθερώθηκε / g

εδάφους από τις διάφορες μεταχειρίσεις στο διάστημα των 35 ημερών. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δείχνουν πως η μικροβιακή αναπνοή δεν έχει επηρεαστεί από τα γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν ( $p > 0.05$ ).



**Διάγραμμα 3.10:** Η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή αναπνοή του εδάφους, με βάση τη συνολική ποσότητα του CO<sub>2</sub> (μg) που ελευθερώθηκε ανά g εδάφους στο διάστημα των 35 ημερών.

Στο Διάγραμμα 3.11 παρουσιάζεται σωρευτικά η ελευθέρωση CO<sub>2</sub> στις διάφορες μεταχειρίσεις. Και εδώ παρατηρείται μια περιορισμένη διαφοροποίηση μεταξύ των μεταχειρίσεων καταδεικνύοντας την περιορισμένη επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή αναπνοή του εδάφους.



*Διάγραμμα 3.11:* Η σωρευτική ποσότητα του CO<sub>2</sub> που ελευθερώθηκε ανά g εδάφους στο χρόνο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέχρι σήμερα αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αξιολόγηση των επιδράσεων των διαφόρων γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους χρησιμοποιώντας εύρος βιοχημικών και μοριακών τεχνικών (Saeki and Toyota, 2004; Ross et al., 2006; Spyrou et al., 2009; Omirou et al., 2011). Η αλληλεπίδραση των γεωργικών φαρμάκων με τους μικροοργανισμούς του εδάφους, δεν είναι εύκολα προβλέψιμη. Το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ γεωργικών φαρμάκων και μικροοργανισμών του εδάφους εξαρτάται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία (Getzin, 1981), το pH του εδάφους (Muller et al., 2006), η υγρασία του εδάφους, τα είδη των μικροοργανισμών και η χημική δομή των γεωργικών φαρμάκων (Bollag and Liu, 1990). Μερικές ομάδες μικροοργανισμών είναι ικανές να χρησιμοποιούν τα γεωργικά φάρμακα ως πηγή ενέργειας και θρεπτικών, ενώ οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι τοξικές για άλλους μικροοργανισμούς (Johnsen et al., 2001). Κάποιες φορές, η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων μπορεί να μειώσει την μικροβιακή ποικιλότητα αλλά να αυξήσει την λειτουργική ποικιλότητα των μικροβιακών κοινοτήτων (Wang et al., 2006) ή μπορεί να προκαλέσει αντιστρέψιμες διεγερτικές ή ανασταλτικές επιδράσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Pampulha and Oliveira, 2006). Επίσης, η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων μπορεί να αναστείλει ή να σκοτώσει συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών και να ενισχύσει άλλες αριθμητικά με την απελευθέρωσή τους από τον ανταγωνισμό.

Η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων αλλά και γενικότερα άλλων μορφών καταπόνησης στην λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας αξιολογείται με την χρήση τεχνικών όπου προσδιορίζεται η δραστικότητα ενζύμων που κατέχουν οι μικροοργανισμοί του εδάφους και τα οποία εμπλέκονται σε βασικά βήματα των διαφόρων γεωχημικών κύκλων (Shaffer 1993; Sanino and Gianfreda 2001). Η δραστικότητα ενζύμων όπως η β-γλυκοσιδάση, ινβερτάση, αρυλσουλφατάση, φωσφατάση, ουρεάση κ.α. έχει συσχετιστεί με την 'ποιότητα' και 'υγεία' των εδαφικών οικοσυστημάτων (Karaca et al., 2011). Η γρήγορη απόκριση και η στενή σχέση των ενζυμικών συστημάτων με το έδαφος, καθώς και οι εύκολα εφαρμοζόμενες μέθοδοι μέτρησης, καθιστούν τα ένζυμα κατάλληλους δείκτες της κατάστασης του εδάφους (Roberto Garcia-Ruiz et al., 2008; Gianfreda and Rao 2011).

Τα υγρά απόβλητα που παράγονται από τα συσκευαστήρια φρούτων κατά την μετασυλλεκτική μεταχείριση των φρούτων, περιέχουν υψηλό φορτίο μυκητοκτόνων και αντιοξειδωτικών ουσιών καθώς

και προϊόντων μεταβολισμού των παραπάνω. Η απευθείας απόρριψη των τοξικών αυτών ουσιών στα υδροφόρα συστήματα και σε εδαφικές εκτάσεις χωρίς πρώτα να έχουν υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία αποτελεί κοινή πρακτική για τα περισσότερα συσκευαστήρια στην νότια Ευρώπη. Η πρακτική αυτή είναι πιθανό να προκαλεί βλαβερές επιδράσεις σε ένα πλήθος οργανισμών, μεταξύ των οποίων και οι μικροοργανισμοί, τόσο σε επίπεδο ποικιλότητας αλλά και σε επίπεδο λειτουργίας. Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων και περιέχονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα απόβλητα των συσκευαστηρίων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και ιδιαίτερα στις βασικές μικροβιακές λειτουργίες που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι για την ομαλή λειτουργία του οικοσυστήματος. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην γενικότερη θεώρηση ότι λόγω της εφαρμογής τους σε κλειστό χώρο (συσκευαστήρια) υπάρχει περιορισμένη πιθανότητα έκθεσης του εδάφους σε αυτά. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων που περιέχονται στα απόβλητα των συσκευαστηρίων φρούτων σε βασικές μικροβιακές λειτουργίες όπως η νιτροποίηση, η αναπνοή αλλά και σε ενζυμικά συστήματα που συμμετέχουν στου κύκλους C (β-γλυκοσιδάση), P (όξινη και αλκαλική φωσφατάση) και γενικότερη υδρολυτική δραστηριότητα (FDA). Η αξιολόγηση των επιδράσεων έγινε σε επίπεδα συγκεντρώσεων που αναμένονται στο έδαφος, εάν τα απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων απορρίπτονται στο έδαφος χωρίς προηγούμενη επεξεργασία.

Από την μέτρηση της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα που παράχθηκε κατά την μικροβιακή αναπνοή στο διάστημα των 35 ημερών, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή αναπνοή.

Όσον αφορά τις φωσφομονοεστεράσες, η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων δεν προκάλεσε κάποιες ξεκάθαρες μεταβολές στην ενζυμική δραστηριότητα της όξινης φωσφατάσης στο έδαφος. Αντίθετα η εφαρμογή EQ προκάλεσε μια σημαντική μείωση της δραστηριότητας των αλκαλικών φωσφατασών στο έδαφος και η οποία ήταν εμφανής σε σχέση με τα αντίστοιχα εδάφη μάρτυρες από τις 10 ημέρες και μετά μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος.

Η δραστηριότητα των β-γλυκοσιδασών επηρεάστηκε αρνητικά από την εφαρμογή του EQ του οποίου η εφαρμογή στο έδαφος οδήγησε σε σημαντική μείωση της δραστηριότητας των β-γλυκοσιδασών κατά τις πρώτες 30 ημέρες μετά την εφαρμογή ενώ στην συνέχεια παρατηρήθηκε μια ανάκαμψη της δραστηριότητας του ενζύμου στο έδαφος σε επίπεδα ανάλογα με τον μάρτυρα. Σε αντίθεση το OPP προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των β-γλυκοσιδασών στο έδαφος χωρίς όμως αυτή η θετική επίδραση να εμφανίζει κάποιο ξεκάθαρο χρονικό πρότυπο.

Η δυσνητική νιτροποίηση αποτέλεσε την διεργασία που εμφάνισε την μεγαλύτερη ευαισθησία στην εφαρμογή των διαφόρων γεωργικών φαρμάκων με το IMZ να αποτελεί το μοναδικό γεωργικό φάρμακο

που δεν φαίνεται να επηρεάζει, θετικά ή αρνητικά την δυνητική νιτροποίηση. Έτσι, η εφαρμογή του EQ οδήγησε ουσιαστικά σε ανάσχεση της δυνητικής νιτροποίησης η οποία παρέμεινε εμφανής σε όλη την διάρκεια του πειράματος. Παρομοίως, το OPP προκάλεσε μια λιγότερο εμφανή αλλά σημαντική μείωση της δυνητικής νιτροποίησης η οποία εμφανίστηκε στις 10 ημέρες και παρέμεινε εμφανής μέχρι την ολοκλήρωση πειράματος. Αντίθετα, η εφαρμογή του TBZ προκάλεσε μια σταθερή αύξηση της δυνητικής νιτροποίησης σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ αντίστοιχα η εφαρμογή DPA προκάλεσε μια προσωρινή αύξηση της δυνητικής νιτροποίησης που διατηρήθηκε κατά τις 10 πρώτες ημέρες και την οποία ακολούθησε μια σημαντική μείωση σε σχέση με τον μάρτυρα από τις 30 ημέρες και ως το τέλος του πειράματος.

Η ευρύτερη υδρολυτική ενζυμική δραστηριότητα στο έδαφος, όπως αυτή αξιολογήθηκε με την υδρόλυση του FDA, επηρεάστηκε από την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων. Ειδικότερα, το EQ προκάλεσε μια σημαντική μείωση της υδρολυτικής ενζυμικής δραστηριότητας στο έδαφος χωρίς όμως ξεκάθαρο χρονικό πρότυπο. Αντίθετα, η εφαρμογή των υπολοίπων γεωργικών φαρμάκων προκάλεσε μια ενεργοποίηση της υδρολυτικής ενζυμικής δραστηριότητας στο έδαφος μετά την εφαρμογή (3 και 10 ημέρες) με το DPA να προκαλεί την πιο σημαντική και σταθερή αύξηση.

Συνολικά, από τα γεωργικά φάρμακα που αξιολογήθηκαν το EQ παρουσίασε μια σταθερά αρνητική επίδραση στην δραστηριότητα αρκετών ενζυμικών συστημάτων (β-γλυκοσιδάση, υδρολάσες FDA, αλκαλικές φωσφατάσες) αλλά και σημαντικών μικροβιακών διεργασιών όπως η νιτροποίηση. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν προηγούμενες μελέτες για την επίδραση του EQ στους μικροοργανισμούς του εδάφους και στις μικροβιακές λειτουργίες (EFSA 2010). Αντίθετα, το OPP φαίνεται ότι από την μία ευνοεί την δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης στο έδαφος αλλά από την άλλη προκάλεσε μια σταθερή μείωση στην δυνητική νιτροποίηση. Προηγούμενες μελέτες για την επίδραση του OPP στους μικροοργανισμούς του εδάφους δεν υπάρχουν στην διεθνή βιβλιογραφία αλλά ούτε και στα στοιχεία του φακέλου έγκρισης του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου. Προκαταρκτικές μελέτες έδειξαν ότι το OPP παρουσιάζει  $EC_{50} = 56 \text{ mg/L}$  για τους μικροοργανισμούς σε συστήματα ενεργοποιημένης ίλλυος που επεξεργάζονται υγρά αστικά απόβλητα (EFSA, 2008). Το TBZ, σε αντίθεση με τα OPP και EQ, προκάλεσε αύξηση της δυνητικής νιτροποίησης. Για το TBZ δεν υπάρχουν προηγούμενα δεδομένα για την επίδραση του στην λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Δεδομένα από τον φάκελο έγκρισης του μυκητοκτόνου fuberidazole, χημικά ανάλογο μορίου με το TBZ, έδειξαν περιορισμένη ανασταλτική δράση του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου στην ανοργανοποίηση C και N. Για το DPA έρευνες έχουν δείξει την ανασταλτική επίδραση του στην φωτοσυνθετική δραστηριότητα φωτότροφων βακτηρίων. Ο Goodwin (1980) ανέφερε την αναστολή της σύνθεσης καροτενοειδών από ορισμένα φωτοσυνθετικά βακτήρια. Επίσης, οι Sharp et al. (1999a,b) βρήκαν πως το DPA αναστέλλει

το κυττόχρωμα bcl του βακτηρίου *Rhodobacter capsulatus*. Το DPA φαίνεται ότι αποδομείται από τους μικροοργανισμούς σε έδαφος αλλά και σε συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων προς ανιλίνη και κατεχόλη (*Christodoulatos et al., 1997, Shin and Spain 2009*), με την ανιλίνη να είναι γνωστό ότι προκαλεί σημαντικές αρνητικές επιδράσεις σε νιτροδοποιητικά βακτήρια του γένους *Nitrosomonas*. Αντίθετα, στην δική μας μελέτη το DPA προκάλεσε μια σημαντική αύξηση στην δυνητική νιτροποίηση κατά τις πρώτες 10 ημέρες μετά την εφαρμογή του. Είναι πιθανό η γρήγορη αποδόμηση του DPA, όπως αναφέρεται σε άλλες μελέτες (*Christodoulatos et al., 1997; Drzyga 2003*), να οδήγησε στην παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων ανιλίνης που οδήγησαν ακολούθως σε σημαντική μείωση της δυνητικής νιτροποίησης από τις 30 ημέρες και μετά.

Το IMZ αποτέλεσε το μοναδικό γεωργικό φάρμακο που δεν φαίνεται να προκαλεί καμία σημαντική επίδραση στις μικροβιακές λειτουργίες που μελετήθηκαν. Δεδομένα σχετικά με την επίδραση του IMZ στους μικροοργανισμούς του εδάφους δεν έχουν αναφερθεί ως σήμερα. Τα μόνα δεδομένα προέρχονται από τον φάκελο έγκρισης χρήσης του IMZ στην ΕΕ όπου αναφέρεται ότι η εφαρμογή του σκευάσματος με δραστική ουσία το IMZ (FUNGAZIL®) σε συγκέντρωση 0.133 μg/g ξ.β. εδάφους προκάλεσε 16% και 4.3% μείωση στην ικανότητα ανοργανοποίησης του N και του C αντίστοιχα στο έδαφος σε σχέση με τον μάρτυρα (EFSA 2010). Ανάλογη δοκιμή με τον κύριο μεταβολίτη του IMZ στο έδαφος, το IMZ – ethanol, οδήγησε σε δραστική μείωση της ανοργανοποίησης του N στο έδαφος (ως και 270% μείωση σε σχέση με τον μάρτυρα) σε συγκεντρώσεις από 0.4 ως και 2 μg/g ξ.β. εδάφους. Το IMZ και ο μεταβολίτης του δεν φαίνεται να έχουν σημαντική αρνητική επίδραση στην μικροβιακή αναπνοή στο έδαφος, όπως παρατηρήθηκε και στην δικιά μας μελέτη. Επίσης, σύμφωνα με τον FAO (2001), το IMZ, δεν φαίνεται να επιδρά στην ανοργανοποίηση του άνθρακα αλλά ούτε και του αζώτου, όταν εφαρμόζεται σε συγκέντρωση 1mg/kg εδάφους. Οι συγκεντρώσεις του IMZ που εφαρμόστηκαν στο έδαφος στην παρούσα μελέτη είναι κατά πολύ υψηλότερες σε σχέση με τις παραπάνω τιμές καταδεικνύοντας ότι ακόμη και σε αυτές τις δόσεις δεν προκαλεί σημαντικές επιδράσεις σε βασικές και σημαντικές λειτουργίες της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.

Τα παραπάνω ευρήματα καταδεικνύουν το εύρος των αρνητικών επιδράσεων που μπορεί να προκαλέσει η απόρριψη των υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων, και ειδικότερα αυτών που περιέχουν EQ (μήλα και αχλάδια) και OPP (εσπεριδοειδή) σε σημαντικές λειτουργίες της μικροβιακής κοινότητας όπως η νιτροποίηση που αποτελεί ρυθμιστή του κύκλου του N. Περαιτέρω μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη ήδη στο εργαστήριο μας στοχεύουν:

- Στον προσδιορισμό της υπολειμματικότητας/διάσπασης των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων στο συγκεκριμένο έδαφος ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του



επιπέδου των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος και ανάσχεσης της ενζυμικής δραστηριότητας ή άλλης μικροβιακής διεργασίας. Ειδικότερα θα επικεντρωθούμε στην μελέτη του μεταβολισμού γεωργικών φαρμάκων όπως το EQ ή το OPP που παρουσίασαν σημαντικές αρνητικές επιδράσεις στην μικροβιακή λειτουργία ώστε να διαπιστωθεί εάν τα ίδια τα μητρικά μόρια ή πιθανά προϊόντα μεταβολισμού που παράγονται μέσω της διάσπασης των μητρικών μορίων είναι υπεύθυνα για τις αρνητικές επιδράσεις που παρατηρήσαμε

- Στην περαιτέρω μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην σύσταση της κοινότητας σημαντικών μικροβιακών ομάδων όπως είναι οι βασιδιομύκητες, τα αρχαία αλλά και λειτουργικές ομάδες όπως είναι τα νιτροδοποιητικά βακτήρια και αρχαία που εμπλέκονται στην λειτουργία της νιτροποίησης την οποία βρέθηκε να επηρεάζουν αρνητικά τα EQ και OPP με την χρήση μοριακών τεχνικών (PCR-DGGE, βιβλιοθήκες κλώνων, qPCR, rt-qPCR).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adam, G., Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 943-951.

Ait. N., Creuzet, N., Cattaneo, J. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 537.

Alexander, W.E., Ryan, A.J., Wright, S.E., 1965. Metabolism of diphenylamine in rat, rabbit, and man. *Food Cosmet. Toxicol.* 3, 571–579.

Alexander, M. 1977. *Introduction to soil microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons, New York.

Alvarez, F., Diaz-Alferez, F.J., Perez-Munoz, P.J., Arteaga-Serrano, F., Martin-Rodriguez, A., 1987. Cystic kidney disease induced by diphenylamine in rats. *Actas Urol. Esp.* 11, 656–659.

Anderson, J.P.E. 1982. Soil respiration. p. 831-871. In A.L. Page et al. (ed.) *Methods of soil analysis*. Part 2. 2<sup>nd</sup> ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.

Araujo ASF, Monteiro RTR and Abarkeli RB, Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52:799–804 (2003)

Ayten Karaca, Sema Camci Cetin, Oguz Can Turgay, and Ridvan Kizilkaya (2011) Soil enzymes as indication of soil quality. *Soil Enzymology, Soil Biology* 22, DOI 10.1007/978-3-642-14225-3\_16, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.

Barnett, J.A., M. Ingram, and T. Swain. 1956. The use of  $\beta$ -glucosidase in classifying yeast. *J. Gen. Microbiol.* 15:529-555.

Belser, L.W., and E.L. Mays. 1980. Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in

assessing nitrification in soils and sediments. *Appl. Environ. Microb.* 39:505-510.

Bhattacharya P, Tripathy S, Chakrabarti K, Chakraborti A, Banik P (2008) Fractionation and bioavailability of metals and their impacts on microbial properties in sewage irrigated soil. *Chemosphere* 72:543-550

Bishnu A, Saha T, Mazumdar D, Chakrabarti K, Chakraborti A (2008) Assessment of the impact of pesticide residues on microbiological and biochemical parameters of tea garden soils in India. *J Environ Sci Health Part B: Pestic, Food Contam Agric Wastes* 43:723-731

Bjurman, J., 1993. Determination of microbial activity in moulded wood by the use of fluorescein diacetate. *Material und Organismen* 28, 1-16.

Bollen, W.B. and C.M. Tu, 1971. Influence of endrin on soil microbial populations and their activity. U.S. Dept. Agr. Forest Serv. Paper PNW-144:4.

Breeuwer, P., Drocourt, J.L., Bunschoten, N., Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., Abee, T., 1995. Characterisation of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescein product. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1614-1619.

Bremner, J.M. and K.R. Keeney, 1965. Steam distillation method for the determination of ammonium, nitrite and nitrate. *Anal Chem Acta*, 32:485-495.

Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W.L. (1988) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 380.

BUA (Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker), 1993. BUA-Stoffbericht 114(Ergänzungsberichte I.), Diphenylamin (Nr. 15). S. Hirzel Verlag, Stuttgart, Germany.

Cáceres TP, He W, Megharaj M, Naidu R (2009) Effect of insecticide fenamiphos on soil microbial activities in Australian and Ecuadorean soils. *J Environ Sci Health B* 44:13-17

Calderon JF, Jackson LE, Scow KM, Rolston DE. Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soils. *Soil Biol Biochem* 2000;32:1547 – 59.

Cannavan A., Haggan A.S. and Kennedy D.G. (1998). Simultaneous determination of thiabendazole and its major metabolite, 5-hydroxythiabendazole, in bovine tissues using gradient liquid chromatography with thermospray and atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 718, 103–113.

Castillo LE, Reupert C, Solis F (2000) Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the North Atlantic Zone of Costa Rica. *Environ Toxicol Chem* 19:1942-1950

Chandra, P., 1987. Effect of two chlorinated insecticides on soil microflora and nitrification process as influenced by different soil temperatures and textures. In *Progress in soil biology*, O. Graff and J.E. Satchell 320. Braunschweig: Friedr. Vieweg und Sohn GmbH.

Christodoulatos C, Koutsospyros AD, Brodman BW, Korfiatis GP. (1997) Biodegradation of diphenylamine by selected microbial cultures. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 32:15-30

Colombo C, Palumbo G, Sannino F, Gianfreda L. Chemical and biochemical indicators of managed agricultural soils. 17th World Congress of Soil Science, Bangkok, Thailand, vol. 1740; 2002. p. 1 – 9.

Crocker, J.F.S., Brown, D.M., Borch, R.F., Vernier, R.L., 1972. Renal cystic disease induced in newborn rats by diphenylamine derivatives. *Am. J. Pathol.* 66, 343–350.

Danaher M., De Ruyckb H., Crooks S.R.H., Dowling G. and O’Keeffe M. (2007). Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, 845, 1–37.

Das, B.R., Deardorff, M.B., Roberts, W.C., 1992. Health advisory for diphenylamine (DPA). US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.

Dezman, D. J., Nagy, S., and Brown, G. B. (1986). Postharvest fungal decay control chemicals:

Treatments and residues in citrus fruits. *Residue Reviews* 97, 38-92.

Dieter, H.H., 1994. Kriterien und Konzentrationsvorschläge zur gesundheitlichen Bewertung von 35 Sprengstoff-typischen Verbindungen und Abbauprodukten in Boden und Trinkwasser. *Wasser-Boden-Luft Hefte*, vol. 7.

Dijk V. van, 1987. Ammonification and nitrification: Laboratory versus Field. In "Pesticide Effects on Soil Microflora" Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Taylor & Francis Ltd, 4 John St, London.

Drijber RA, Doran JW, Parkhurst AM, Lyon DJ. Changes in soil microbial community structure with tillage under long-term wheat–fallow management. *Soil Biol Biochem* 2000;32; 1419 – 30.

Drzyzga O (2003) Diphenylamine and derivatives in the environment: a review. *Chemosphere* 53: 809-818.

Eisenhauer N., Klier M., Partsch S., Sabais A.C.W., Scherber C., Weisser W.W., Scheu S., 2009. No interactive effects of pesticides and plant diversity on soil microbial biomass and respiration. *Applied Soil Ecology* 42 (2009) 31–36.

European Union (2000) Opinion of the scientific committee on plants regarding the evaluation of thiabendazole in the context of council directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market-The Scientific Committee on Plants, SCP/THIABEN/002-Final, p 7

Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1977. Phosphatase in soils. *Soil Biol. Biochem.* 9, 167-172.

Eivazi F, Tabatabai MA (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 20: 601-606.

Eivazi F., Tabatabai M.A. (1990): Factors affecting glucosidase and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22: 891–897.

Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF (2008) The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science* 320: 1034-1039.

Flaim GM, Toller G (1989) Treatment of postharvest pesticide residues. *Agric Ecos Environ* 27:505-511.

Florkin M. and Stotz E. H., Eds., "Report of the Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry," rev. ed. Elsevier, Amsterdam, 1964.

Garcia Portillo M, Avino ES, Vicente JO, De Andres RL, Jimenez MdlAS, Blanco JPL (2004) Purification system for wastewater coming from fruit and vegetable processing plants and phytosanitary treatments in the field. United States Patent, US 6,709,585 B1, p 9

GDCh (Gesellschaft Deutscher Chemiker), 1988. Diphenylamin. Band 15, VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.

George, T.S., Gregory, P.J., Wood, M., Read, D., Buresh, R.J., 2002. Phosphatase activity and organic acids in the rhizosphere of potential agroforestry species and maize. *Soil Biol. Biocem.* 34, 1487-1494

Gianfreda L, Bollag JM., 1996. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. In: Stotzky G, Bollag JM, editors. *Soil Biochemistry*, vol. 9. New York7 Marcel Dekker; p. 123 – 94.

Gianfreda L., Rao MA (2011) The influence of pesticides on soil enzymes. *Soil Enzymology, Soil Biology* 22, DOI 10.1007/978-3-642-14225-3\_16, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011

Giannakou, I.O., Karpouzas, D.G., Anastasiades, I., Tsiropoulos, N.G., Georgiadou, A., 2005. Factors affecting the efficacy of non-fumigant nematicides for controlling root-knot nematodes. *Pest Manag. Sci.* 61, 961–972

Goodwin, T.W., 1980. *The Biochemistry of Carotenoids*, vol. 1. Chapman and Hall, London, New York.

Gore, R. C., Hannah, R. W., Pattacini, S. C., and Porro, T. J. (1971). Infrared and ultraviolet spectra of seventy-six pesticides. *Journal of the AOAC* 54, 1040-1082.

Greim, H., Bury, D., Klimisch, H.-J., Oeben-Negele, M., Ziegler-Skylakakis, K., 1998. Toxicity of aliphatic amines: structure–activity relationship. *Chemosphere* 36, 271–295.

Guilbault, G. G., and D. N. Kramer. 1964. Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha- and gamma-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. *Anal. Chem.* 36:409-412.

Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., Blanpied, G.D., 1990. Diphenylamine residues in apples and apple cider. *J. Food Saf.* 10, 277–279

Haney RL, Senseman SA, Hons FM and Zuberer DA, Effect of glyphosate on microbial activity and biomass. *Weed Sci* 48:89–93 (2000).

Haney RL, Senseman SA, Krutz LJ and Hons FM, Soil carbon and nitrogen mineralization as affected by atrazine and glyphosate. *Biol Fert Soils* 35:35–40 (2002).

Herbien, S.A. and Neal, J.L., 1990. Soil pH and phosphatase activity. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 21:5,6: 439-456.

Hinojosa MB, Garcia-Ruiz R, Vinegla B, Carreira JA (2004) Microbiological rates and enzyme activities as indicators of functionality in soils affected by the Aznalcollar toxic spill. *Soil Biol Biochem* 36:1637-1644

Howard, P. H., Boethling, R. S., Jarvis, W. F., Meylan, W. M., and Michalenko, E. M. (1991). *Handbook of environmental degradation rates*. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan.

Ingle, M., Morris, J.C., D'Souza, M.C., 1990. Soil contamination inconsistently affects performance of diphenylamine as a superficial scald inhibitor. *Hortscience* 25, 1414–1415.

Jermyn, M. A. (1958). *Aust. J. Biol. Sci.* 11: 114.

Johnsen, K., Jacobsen, C. S., and Torsvik, V. (2001) Pesticides effects on bacterial diversity in

agricultural soils—A review. *Biol. Fertil. Soils* 33, 443–453.

Johnson, G.D., Geronimo, J., Hughes, D.L., 1997. Diphenylamine residues in apples (*Malus domestica* Borkh.), cider, and pomace following commercial controlled atmosphere storage. *J. Agr. Food Chem.* 45, 976–979.

John G. Allen and Kathleen J. Hall (1980) Methods for the Determination of Diphenylamine Residues in Apples. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 28, No. 2, 1980.

Juma, N.G. and Tabatabai, M.A., 1978. Distribution of phosphomonoesterases in soils. *Soil Sci.* 126: 101-108.

Kandeler, E., 1995. Potential nitrification. In: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.), *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag, Heidelberg, p 426.

Kaplan, H. J. and B.A. Dave 1979. The current status of imazalil : A postharvest fungicide for citrus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 92:37-43

Karawya, M.S., Abdel Wahab, S.M., El-Olemy, M.M., Farrag, N.M., 1984. Diphenylamine, an antihyperglycemic agent from onion and tea. *J. Nat. Prod.* 47, 775–780.

Karpouzas, D.G., Karanasios, E., Menkissoglou-Spiroudi, U., 2004. Enhanced microbial degradation of cadusafos in soils from potato monoculture: Demonstration and characterization. *Chemosphere* 56, 549–559.

Karpouzas D.G., Rousidou C., Papadopoulou K.K, Bekris F, Zervakis G, Singh B.K., Ehaliotis C., (2009). Effect of continuous olive mill wastewater applications, in the presence and absence of N fertilization, on the structure of rhizosphere soil fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology* 70(3): 56-69.

Kim-Kang, H., Robinson, R.A., Wu, J., 1998. Fate of [<sup>14</sup>C]diphenylamine in stored apples. *J. Agr. Food Chem.* 46, 707–717.



Kiss, S., Stefanic, G. and Dragan-Bularda, M., 1974. Soil enzymology in Romania (part I). *Contrib. Bot. Cluj*: 207-219.

Kiss, S., M. Dragan-Bularda, and D. Radulescu. 1975. Biological significance of enzymes accumulated in soil. *Adv. Agron.* 27:25-87

Kodama S., Yamamoto A., Ohura T., Matsunaga A. and Kanbe T. (2003) Enantioseparation of Imazalil residue in orange by Capillary Electrophoresis with 2-hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin as a chiral selector. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **51**, 6128-6131.

Kolbe N. and Andersson J.T. (2006). Simple and Sensitive Determination of o-Phenylphenol in Citrus Fruits Using Gas Chromatography with Atomic Emission or Mass Spectrometric Detection. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **54**, 5736-5741.

Kronevi, T., Holmberg, B., 1979. Acute and subchronic kidney injuries in mice induced by diphenylamine (DPA). *Exp. Pathol. (Jena)* 17, 77–81.

Lachance, B., Robidoux, P.Y., Hawari, J., Ampleman, G., Thiboutot, S., Sunahara, G.I., 1999. Cytotoxic and genotoxic effects of energetic compounds on bacterial and mammalian cells in vitro. *Mutat. Res.* 444, 25–39.

Lenz, S.D., Carlton, W.W., 1990. Diphenylamine-induced renal papillary necrosis and necrosis of the pars recta in laboratory rodents. *Vet. Pathol.* 27, 171–178.

Lenz, S.D., Turek, J.J., Carlton, W.W., 1995. Early ultrastructural lesions of diphenylamine-induced renal papillary necrosis in Syrian hamsters. *Exp. Toxicol. Pathol.* 47, 447–452.

Mallon, B., Layton, D., Fish, R., Hsieh, P., Hall, L., Perry, L., Snyder, G., 1988. Conventional weapons demilitarization: a health and environmental data base assessment. Propellants and their co-contaminants. US Army Biomedical Research and Development Laboratory, Frederick, MD, USA, UCRL-21110.

Martikainen, E., Haimi, J., Ahtiainen, J., 1998. Effects of dimethoate and benomyl on soil organisms and soil processes—a microcosm study. *Appl. Soil Ecol.* 9, 381–387

Masubuchi, Y., Yamada, S., Horie, T., 2000. Possible mechanism of hepatocyte injury induced by diphenylamine and its structurally related nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 982–987.

Mir, N.A., Beaudry, R., 1999. Effect of superficial scald suppression by diphenylamine application on volatile evolution by stored Cortland apple fruit. *J. Agr. Food Chem.* 47, 7–11.

Nannipieri P, Kandeler E, Ruggiero P. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns RP, Dick RP, editors. *Enzymes in the Environment Activity, Ecology and Applications*. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 1 – 33.

Nare R.W.A., Savadogo P.W., Gnankambary Z. and Sedogo M.P., 2010. Effect of Endosulfan, Deltamethrin and Profenophos on Soil Microbial Respiration Characteristics in Two Land Uses Systems in Burkina Faso. *Research Journal of Environmental Sciences*, 4: 261-270.

Niemi RM, Heiskanen I, Athiainen JH, Rahkonen A, Mantykoski K, Welling L, Laitinen P, Ruuttunen P (2009) Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. *Appl Soil Ecol* 41:293-304. doi:10.1016/j.apsoil.2008.12.002

Nose, M., Nakatani, Y., Yamanishi, T., 1971. Studies on the flavor of green tea. Part IX. Identification and composition of intermediate and high boiling constituents in green tea flavor. *Agr. Biol. Chem.* 35, 261–271.

Olek, M., 1988. Determination of diphenylamine residues in apples, and 4-aminobiphenyl residues in diphenylamine, by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 447, 421–425.

Omar SA, Abdel-Sater MA (2001) Microbial populations and enzyme activities in soil treated with pesticides. *Water Air Soil Pollut* 127:49-63

M. Omirou, C. Rousidou, F. Bekris, K.K. Papadopoulou, C. Ehaliotis, U. Menkissoglu-Spiroudi, D.G. Karpouzas. (2011) The impact of biofumigation and chemical fumigation methods on the structure and

function of the soil microbial community. *Microbial Ecology* 61: 201-213.

Papadopoulou-Mourkidou, E. (1991). Postharvest-applied agrochemicals and their residues in fresh fruits and vegetables. *J Assoc Off Anal Chem* 74, 745-765.

Paul, E.A., and F.E. Clark. 1989. *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, San Diego.

Perucci P, Vischetti C, Battistoni F (1999) Rimsulfuron in a silty clay loam soil: effects upon microbiological and biochemical properties under varying microcosm conditions. *Soil Biol Biochem* 31:195-220

Perucci P, Dumontet S, Bufo SA, Mazzatura A, Casucci C (2000) Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. *Biol Fertil Soils* 32:17-23

Pierr, W., Toth, L., 1967. Nachweis und bestimmung von biphenyl, o-hydroxbiphenyl und diphenylamin mittels dunnschichtchromatographie, gaschromatographie und spektrofluorimetrie. *Z. Lebensm. Forsch.* 135, 260–269.

Powell, C.J., Adams, T., Hall, D.E., Bach, P.H., Bridges, J.W., 1984. The subacute nephrotoxicity of diphenylamine and N-phenanthranilic acid. *Hum. Toxicol.* 3, 452.

Powell, C.J., Bach, P.H., Bridges, J.W., 1983. Subacute toxicity of diphenylamine and N-phenanthranilic acid. *Hum. Toxicol.* 2, 565–566.

Prosser, JI. & Nicol, GW. (2008). 'Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment'. *Environmental Microbiology*, vol 10, no. 11, pp. 2931-2941.

Qian H, Hu B, Wang Z, Xu X (2007) Effects of validamycin on some enzymatic activities in soil. *Environ Monit Assess* 125:1-8

Rippen, G., 1997. Handbuch Umweltchemikalien: Diphenylamin. In: *Ergänzungslieferung (12/97)*, vol. 41. Ecomed Verlag, Landsberg, Germany. pp. 1–8.

Rohrbach, D.H., Robinson, L.K., Murrah, V.A., 1993. Loss of the basement membrane matrix molecule, bamin, in diphenylamine-treated mice. *Matrix* 13, 341–350.

Ros M, Goberna M, Moreno JL, Hernandez T, Garcia C, Insam H, Pascual JA (2006) Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. *Appl Soil Ecol* 34:93–102

Rotman B. and Papermaster B.W. (1966) Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 55. 134-141.

Saeki M, Toyota K (2004) Effect of bensulfuron-methyl on the soil bacterial community of a paddy soil microcosm. *Biol Fertil Soils* 40:110–118

Sahrawat K. L., D. R. Keeney and S.S. Adams, 1987. Ability of nitrapyrin, dicyandiamide and acetylene to retard nitrification in a mineral and an organic soil. *Plant and Soil*, 101: 179-182.

Sarakha, M., Boule, P., and Lenoir, D. (1993). Phototransformation of 2-phenylphenol induced in aqueous solution by excitation of nitrate ions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 75, 61-65.

Schaffer, A., 1993. Pesticide effects on enzyme activities in the soil ecosystem. In: Bollag J-M, Stotzky G (eds) *Soil biochemistry*, vol 8. Marcel Dekker, New York, pp 273-340.

Schnürer, J., Rosswall, T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and environmental microbiology*. Vol.43, No 6, p.1256-1261.

Schuster E. and D. Schroder, 1990. Side effects of sequentially applied pesticides on non-target soil microorganisms: Lab. experiments. *Soil Biol. Biochem.*, 22: 375-383.

Shi KA, Spain JC (2009) Pathway and evolutionary implications of diphenylamine biodegradation by *Bulkholderia* sp. strain JS667. *Applied and Environmental Microbiology* 75:2694-2704.

Singh J, Singh DK (2005) Dehydrogenase and phosphomonoesterase activities in groundnut (*Arachis*

*hypogaea* L.) field after diazinon, imidacloprid and lindane treatments. *Chemosphere* 60:32-42

Söderström, B.E. 1976. Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biol. Biochem.* Vol.9. pp.59-63.

Sorrentino, F., Fella, A., Pota, A., 1978. Diphenylamineinduced renal lesions in the chicken. *Urol. Res.* 6, 71–75

Speir, T. W. & D. J. Ross, 1978. Soil phosphatases and sulphatases. In: R. G. Burns (ed.), *Soil Enzymes*: Academic Press, New York: 197-249.

Spyrou I.M., Karpouzas D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U., (2009). Do botanical pesticides alter the structure of the soil microbial community. *Microbial Ecology* 58(4): 715-727

Stubberfield, L.C.F., Shaw, P.J.A., 1990. A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measurements of microbial activity. *Journal of Microbiological Methods* 12, 151-162.

Swisher, R., Carroll, G.C., 1980. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microbial Ecology* 6, 217-226.

Tabatabai, M.A., 1982. Soil enzymes. In: Page, A.L., Millar, E.M., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis*. ASA and SSSA, Madison, WI, pp.775-833.

Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S. (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Microbiological and Biochemical Properties*. Part 2. SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI, pp. 775–833.

Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. 1971. Michaelis constant of soil enzymes. *Soil Biology Biochemistry*. 3, 317 – 323.

Tadano, T., Ozawa, K., Sakai, H., Osaki, M. and Matsui, H., 1993. Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of enzyme secreted by lupin roots. *Plant Soil* 155/156: 95-98.

Takase, M., Horikoshi, K. (1988) *Appl. Microb. Biotechnol.* 29, 55.

Tarafdar, J.C., Marschner, H., 1994. Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Biol. Biocem.* 26, 387-395

Thomas, J.O., Ribelin, W.E., Wilson, R.H., Keppler, D.C., Deeds, F., 1967a. Chronic toxicity of diphenylamine to rats. *Toxicol. Appl. Pharm.* 10, 362-374.

Thomas, J.O., Ribelin, W.E., Woodward, J.R., Deeds, F., 1967b. The chronic toxicity of diphenylamine for dogs. *Toxicol. Appl. Pharm.* 11, 184-194.

Veibel, S. (1950).  $\beta$ -Glucosidases. In *The Enzymes, Part I*. Ed. by J. B. Sumner & K. Myrback, vol. 1, p. 583. New York: Academic Press, Inc.

Vig, K., Singh, D.K., Agarwal, H.C., Dhawan, A.K., Dureja, P., 2008. Soil microorganisms in cotton fields sequentially treated with insecticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 263-276.

Wang, L.Q., Qin, G.W., Chen, S.N., Li, C.J., 2001. Three diterpene glucosides and a diphenylamine derivative from *Pieris formosa*. *Fitoterapia* 72, 779-787.

Weaver M.A., Krutz L.J., Zablotowicz R.M., and Reddy K.N., 2007. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. *Pest Manag Sci* 63:388-393.

Wick, L. Y., and Gschwend, P. M. (1998). Source and chemodynamic behavior of diphenyl sulfone and ortho- and para-hydroxybiphenyl in a small lake receiving discharges from an adjacent superfund site. *Environmental Science & Technology* 32, 1319-1328

Woodward, J., Wiseman, A. (1982) *Enzyme Microb. Technol.* 4, 73.

Yao X, Min H, Lu Z, Yuan H (2006) Influence of acetamiprid on soil enzymatic activities and respiration. *Eur J Soil Biol* 42:120-126

Yu, S., He, Z.L., Stoffella, P.J., Calvert, D.V., Yang, X.E., Banks, D.J., Baligar, V.C., 2006. Surface runoff phosphorus (P) loss in relation to phosphatase activity and soil P fractions in Florida sandy soils under citrus production. *Soil Biol. Biochem.* 38, 619-628.

Yun LY, Shan M, Fang H, Wang X, Xiao QC (2006) Responses of soil microorganisms and enzymes to repeated applications of chlorothalonil. *J Agric Food Chem* 54:10070-10075

Zablotowicz, R.M., Locke, M.A., Smeda, R.J., 1998. Degradation of 2,4-D and fluometuron in cover crop residues. *Chemosphere* 37, 87-101.

Zafar Iqbal, Altaf Hussain, Muhammad R. Asi and Jamil A. Chaudhry, 2001. Impact of pesticide applications in cotton agroecosystem and soil bioactivity. Studies II: Nitrification Dynamics. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4 (5): 588-592.

Zhang, L., Offre, P.R., He, J., Verhamme, D.T., Nicol, G.W. & Prosser, J.I. (2010). 'Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea'. *PNAS*, vol 107, no. 40, pp. 17240-5.

Βλαχογιάννη Θ., Βαλαβανίδης Α. 2010. Δοκιμασίες τοξικότητας και οικοτοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς.

Γεώργιος Σίμος, 1990. Καθαρισμός και μελέτη ιδιοτήτων μιας β-γλυκοσιδάσης και μιας β-γαλακτοσιδάσης απο σπέρματα κριθαριού. Εφαρμογή των ενζύμων στην υδρόλυση της λακτόζης του γάλακτος και των προ'όντων του.

Ομήρου Μιχάλης Δ., 2009. Επίδραση αζωτούχου και θειικής λίπανσης στην παραγωγή γλυκοσινολικών στους ιστούς της ρόκας (*Eruca sativa*) και του μπρόκολου (*Brassica oleracea var. italica*) και επιπτώσεις της ενσωμάτωσης των υπολειμμάτων του μπρόκολου και των γλυκοσινολικών στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους.

Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α. (2007). Γεωργική φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί δράσης και χρήσεις των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, Αθήνα.

