



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή διατριβή

**« Μελέτη της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης του  
εντομοκτόνου/νηματοδοκτόνου εδάφους fosthiazate σε εδάφη από  
πατατοκαλλιέργειες »**

ΒΙΔΙΑΔΑΚΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

Λαρισα 2015

**« Μελέτη της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης του εντομοκτόνου/νηματοδωκτόνου εδάφους fosthiazate σε εδάφη από πατατοκαλλιέργειες»**

**« Study of the enhanced biodegradation of the soil insecticide/nematicide fosthiazate in soils from potato monoculture areas»**

### **Υπεύθυνος Καθηγητής**

Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **Τριμελής Επιτροπή:**

- Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Μόσιαλος Δημήτριος , Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Τσιρόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής (Χημεία, Ανάλυση και προσδιορισμός οργανικών ουσιών), Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

# Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Δημήτριο Καρπούζα για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του και κάτω από τις οδηγίες του. Σημαντικό ρόλο στην επίτευξη του πειράματος αυτού έπαιξε ο συνάδελφος και καλός μου φίλος Στάθης Λαγός, και γι' αυτό τον ευχαριστώ από καρδιάς. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ευαγγελία Παπαδοπούλου και τον Παναγιώτη Καρα για την βοήθεια τους στο εργαστήριο καθώς και στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

# Περίληψη

Τα γεωργικά φάρμακα που εφαρμόζονται στην καλλιέργεια της πατάτας για την καταπολέμηση εντόμων εδάφους και νηματωδών ανήκουν σε δύο βασικές χημικές ομάδες: τα οργανοφωσφορικά (fosthiazate, ethoprophos) και καρβαμιδικά (oxamyl). Ο περιορισμένος αριθμός νηματωδοκτόνων που είναι διαθέσιμα προς χρήση στην πατατοκαλλιέργεια σε συνδυασμό με την ευαισθησία των περισσότερων νηματωδοκτόνων στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης έχει δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα στην καταπολέμηση των κυστωδών νηματωδών. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας μελετήσαμε την επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση του νηματωδοκτόνου fosthiazate για το οποίο δεν υπάρχει μέχρι σήμερα καμία αναφορά για επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση του. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος ευρύτερης μελέτης που αξιολόγησε την εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης για νηματωδοκτόνα/εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται στην πατάτα. Προηγούμενα πειράματα είχαν δείξει την ταχύτατη αποδόμηση του fosthiazate σε δύο εδάφη από την περιοχή Νευροκοπίου με ιστορικό χρήσης του εν λόγω νηματωδοκτόνου και αναφορές από τον παραγωγό για περιορισμένη βιολογική δράση έναντι των κυστωδών νηματωδών. Έτσι στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας μελετήθηκε στα δύο αυτά εδάφη (3 και 4) καθώς και σε ένα έδαφος από την ίδια περιοχή (έδαφος 2) με ανάλογο ιστορικό χρήσης αλλά χωρίς γρήγορη αποδόμηση του fosthiazate, εάν η επαναλαμβανόμενη εργαστηριακή εφαρμογή δόσεων fosthiazate οδηγούν σε περαιτέρω επιτάχυνση της αποδόμησης. Έτσι η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή fosthiazate στα εδάφη 3 και 4 οδήγησε σε σταδιακή μείωση του  $DT_{50}$  του νηματωδοκτόνου από 6.4 σε 0.8 ημέρες στο έδαφος 3 και από 11.8 σε 6.4 ημέρες στο έδαφος 4. Αντίθετα στο έδαφος 2 παρατηρήθηκε βραδύτατη αποδόμηση του fosthiazate ( $DT_{50} > 60$  ημέρες) παρά το εκτεταμένο ιστορικό χρήσης fosthiazate στο συγκεκριμένο έδαφος. Αυτό αποδόθηκε στο όξινο pH του συγκεκριμένου εδάφους (5.4) που αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης. Συνολικά η παρούσα εργασία αποτελεί μια ακόμη απόδειξη για την πρώτη εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης του fosthiazate σε αγροτικά εδάφη. Περαιτέρω μελέτες θα στοχεύσουν στην μελέτη μεθόδων για την αντιμετώπιση του φαινομένου και την απομόνωση των μικροοργανισμών που διασπούν το συγκεκριμένο νηματωδοκτόνο.

# Abstract

The insecticides and nematicides that are used in potato monoculture systems for the control of pests are divided into 2 main groups depending on their chemical characteristics: the organophosphates (fosthiazate, ethoprophos) and the carbamates (oxamyl). The limited number of insecticides/nematicides available for use in potato crops, coupled with the reported susceptibility of most of them to enhanced biodegradation has caused serious problems in the control of cyst nematodes. During this thesis we studied the enhanced biodegradation of the nematicide fosthiazate for which there is no report for the development of enhanced biodegradation. This current study is part of a larger one that assessed the development of enhanced biodegradation for insecticides/nematicides used for the control of pests in potato crops. Previous experiments have shown rapid dissipation of fosthiazate in 2 soils from the Neurokopi region which had a history of previous exposure to this nematicide and reports of the grower for reduced control of cyst nematodes. So, during this current study, these two soils (3, 4) along with a soil from the same region (2) with the same history of previous exposure to fosthiazate but no report of rapid dissipation, were subjected to repeated fosthiazate treatments in the lab in order to observe if these treatments lead to further acceleration of the fosthiazate dissipation. Repeated fosthiazate applications in soils 3 and 4 led to the reduction of the  $DT_{50}$  fosthiazate values from 6.4 to 0.8 days in soil 3 and from 11.8 to 6.4 days in soil 4. On the contrary, in soil 2 we observed a very slow dissipation rate of fosthiazate ( $DT_{50} > 60$  days) in spite of the history of the nematicide's extensive use in this particular soil. The reason for that is the acidic pH of soil 2 (5.4) which constitutes a limiting factor for the development of enhanced biodegradation. Overall, this current study provides another evidence for the first report of development of enhanced biodegradation of fosthiazate in field sites. Further studies will focus on the development of methods to overcome the problem of this phenomenon and on the isolation of microorganisms responsible for the dissipation of this nematicide.

# Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή.....	8
1.1	Περιβαλλοντική Τύχη Γεωργικών Φαρμάκων.....	9
1.2	Μικροβιακή Αποδόμηση Γεωργικών Φαρμάκων.....	10
1.3	Επιταχυνόμενη Μικροβιακή Αποδόμηση Γεωργικών Φαρμάκων. ....	12
1.4	Επιταχυνόμενη Μικροβιακή Αποδόμηση Νηματωδοκτόνων.....	13
1.5	Fosthiazate και Καλλιέργειες Πατάτας.....	14
1.6	Σκοπός του Πειράματος.....	15
2	Μέθοδοι και Υλικά.....	16
2.1	Εδάφη.....	16
2.2	Προσδιορισμός Υγρασίας εδάφους.....	18
2.3	Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών.....	18
2.4	Περιγραφή πειράματος.....	19
2.5	Αναλυτική μέθοδος.....	20
2.5.1	Εκχύλιση υπολειμμάτων fosthiazate από το έδαφος.....	20
2.5.2	Ανάλυση HPLC.....	21
2.6	Υπολογισμός DT <sub>50</sub> fosthiazate.....	21
3	Αποτελέσματα.....	22
3.1	Αποδόμηση fosthiazate.....	22
3.1.1	Αποδόμηση στο έδαφος 2.....	22
3.1.2	Αποδόμηση στα εδάφη 3 και 4.....	22
4	Συζήτηση.....	29
5	Βιβλιογραφία.....	30

# 1 Εισαγωγή

Η γεωργία εκ αρχαιοτάτων χρόνων αποτελούσε την βασική πηγή για την λήψη τροφής από διαφόρους πληθυσμούς της Γής. Κατά την εξέλιξη της ανα τους χρόνους, ήταν φυσικό να εξερευνηθούν και να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τρόποι βελτίωσης της παραγωγής γεωργικών προϊόντων. Στο γεγονός αυτό συνέβαλε η συνεχιζόμενη αύξηση του ανθρωπίνου πληθυσμού και η ανάγκη για μεγαλύτερες ποσότητες τροφής.

Η μεγαλύτερη ανακάλυψη η οποία αύξησε δραματικά την ποιότητα και ποσότητα των γεωργικών προϊόντων ήταν τα γεωργικά φάρμακα. Ιδιαίτερα όσον αφορά την μοντέρνα γεωργία, αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της. Τα γεωργικά φάρμακα είναι χημικές ουσίες οι οποίες στοχεύουν διαφόρων ειδών οργανισμούς που είναι επικίνδυνοι για τα γεωργικά προϊόντα. Οι στόχοι τους έχουν ένα μεγάλο εύρος, το οποίο περιλαμβάνει αγριόχορτα, έντομα, θηλαστικά, παθογόνους μικροοργανισμούς, πουλιά, ψάρια και νηματοειδή (σκουλήκια). Για να κατανοήσουμε την σημασία τους, είναι άξιο αναφοράς ότι κάθε χρόνο χρησιμοποιούνται 4 εκατομμύρια τόνοι γεωργικά φάρμακα στις παγκόσμιες καλλιέργειες. Μέσω της χρήσης τους, παρουσιάζεται αυξημένη παραγωγή τροφίμων, μειωμένο κόστος φρούτων και λαχανικών στην αγορά, καθώς και πιο υγιεινά προϊόντα προς κατανάλωση. Τι συμβαίνει όμως μετά την εφαρμογή των ουσιών αυτών στα εδάφη?

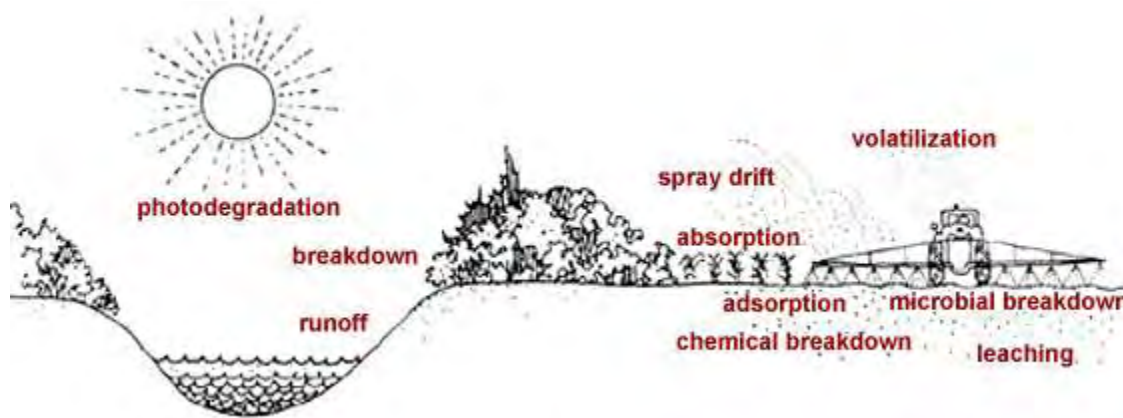




## 1.1 Περιβαλλοντική Τύχη Γεωργικών Φαρμάκων.

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν κυρίως συνθετικές ουσίες κάποιες εκ των οποίων παρουσίαζαν υψηλή τοξικότητα σε οργανισμούς μη-στόχους όπως θηλαστικά, αλλά και μεγάλη υπολειμματικότητα στο περιβάλλον με κίνδυνο διασποράς τους πέραν του σημείου εφαρμογής τους. Η συμπεριφορά τους στο περιβάλλον εξαρτάται κυρίως από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Η χρήση γεωργικών φαρμάκων πρωτοαναφέρθηκε το 1000 π.Χ. στην Κίνα, αλλά άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρέως τον 20<sup>ο</sup> αιώνα, και κυρίως μετά τον 2<sup>ο</sup> Παγκόσμιο Πόλεμο, με σκοπό την προστασία της δημόσιας υγείας από ασθένειες όπως ο τύφος και η μαλάρια. Τα γεωργικά φάρμακα ήταν κατά βάση συνθετικές οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Βάσει ερευνών όμως, μόλις το 1% των εφαρμοσμένων γεωργικών φαρμάκων φτάνει στον στόχο του, καθώς μέσω διαφόρων διαδικασιών η αποτελεσματικότητά τους μειώνεται δραματικά (Maria Gavrilescu 2005).



Εικόνα 2. Περιβαλλοντική τύχη Γεωργικών Φαρμάκων.

Η μείωση της αποτελεσματικότητάς τους οφείλεται στις διαδικασίες που παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.

- **Προσροφηση:** Τα γεωργικά φάρμακα προσδένονται στην επιφάνεια των κολλοειδών του εδάφους όπως αργιλικά σωματίδια και την οργανική ουσία του εδάφους. Η πρόσδεση γίνεται με διάφορους μηχανισμούς που εξαρτώνται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του κάθε γεωργικού φαρμάκου (Vauchopre et al, 2002).
- **Πτητικοποίηση:** Μετατροπή των γεωργικών φαρμάκων από στερεές και υγρές μορφές σε αέρια μορφή που μπορεί να οδηγήσει στην μεταφορά τους σε μεγάλες

αποστάσεις μέσω του αέρα. Αποτελεί σημαντική διεργασία για γεωργικά φάρμακα με υψηλή τάση ατμών.

- **Μετακίνηση του ψεκαστικού νέφους:** Ανάλογα με το μέγεθος των σταγονών και την δύναμη του αέρα, οι ψεκαστικές σταγόνες μπορούν να μετακινηθούν από την περιοχή εφαρμογής. Η μετακίνηση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε ζημιά κοντινών καλλιεργειών, σε έκθεση ανθρώπων, ζώων και εντομων, καθώς και σε ρύπανση των υδάτων.
- **Επιφανειακή Απορροή:** Μπορεί να προκύψει ύστερα από έντονη βροχόπτωση και οδηγεί σε επιφανειακή απορροή των γεωργικών φαρμάκων που παραμένουν στην επιφάνεια του εδάφους. Με την διεργασία αυτή μπορούν να καταλήξουν στα επιφανειακά νερά και γεωργικά φάρμακα που παραμένουν ισχυρά προσροφημένα στην επιφάνεια των εδαφικών κολλοειδών.
- **Έκπλυση:** Η κάθετη μετακίνηση των γεωργικών φαρμάκων προς τα βαθύτερα εδαφικά στρώματα και οδηγεί σε ρύπανση των υπογείων νερών.
- **Απορρόφηση από φυτά:** Τα γεωργικά φάρμακα που εφαρμόζονται στο έδαφος μπορεί να παραληφθούν από τα φυτά μέσω του ριζικού συστήματος και να μεταφερθούν στο υπέργειο τμήμα με το ρεύμα της διαπνοής.
- **Χημική αποδόμηση:** Η διαδικασία που οδηγεί σε διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων και πραγματοποιείται χωρίς την συμμετοχή μικροοργανισμών. Τέτοια διεργασία είναι η χημική υδρόλυση που ανάλογα με την χημική δομή του εδάφους μπορεί να ευνοείται σε αλκαλικά ή σε όξινα pH.
- **Φωτοαποδόμηση:** Η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων ύστερα από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία.
- **Μικροβιακή αποδόμηση:** Ο μεταβολισμός των γεωργικών φαρμάκων από τους μικροοργανισμούς του εδάφους, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε ταχύτατη διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων προς παραγωγή μεταβολικών προϊόντων με χαμηλότερη τοξικότητα ή ακόμη και σε πλήρη ανοργανοποίηση.

## 1.2 Μικροβιακή Αποδόμηση Γεωργικών Φαρμάκων.

Παρατηρώντας την **Εικόνα 2**, γίνεται σαφές ότι μετά την εφαρμογή τους, η τύχη και υπολειμματικότητα των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος εξαρτάται από την δράση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Η διεργασία διάσπασης των γεωργικών φαρμάκων από τους μικροοργανισμούς ή τα ένζυμα τους λέγεται βιοαποδόμηση, και ο ρυθμός της για κάθε γεωργικό φάρμακο διαφέρει. Κάποια, όπως το DDT, αποδομούνται σε υπερβολικά αργούς ρυθμούς, με συνέπεια να εμφανίζουν μεγάλη υπολειμματικότητα στο περιβάλλον και να συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα (Brajesh K. Singh, Allan Walker, 2006). Από την άλλη μεριά, γεωργικά φάρμακα όπως το

carbofuran υπό συγκεκριμένες συνθήκες και προϋποθέσεις (π.χ. επαναλαμβανόμενη χρήση τους στο ίδιο αγρό επί σειρά ετών) αποδομούνται με τέτοια ταχύτητα που δεν επιτρέπει τον έλεγχο των στόχων τους (Kargrouzas et al, 1999a).

Υψηλές συγκεντρώσεις των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος μπορεί να αποτελέσουν κίνδυνο για την χλωρίδα και την πανίδα του εδαφικού οικοσυστήματος και αυτό οφείλεται κυρίως σε δύο λόγους:

i) Είτε γιατί υπάρχει μικρός πληθυσμός μικροοργανισμών που μπορούν να αποδομήσουν τα γεωργικά φάρμακα είτε γιατί η δράση των μικροοργανισμών περιορίζεται λόγω της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων ή επικράτηση άλλων ανασταλτικών παραγόντων.

ii) Είτε γιατί ως χημικές ενώσεις και λόγω χημικής δομής παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην μικροβιακή αποδόμηση (Kenneth David Racke, 1987).

Οι μικροοργανισμοί διασπών τα γεωργικά φάρμακα στο περιβάλλον με 2 τρόπους :

1. Συμμεταβολισμός: που αποτελεί βραδεία διεργασία και δεν παρουσιάζει σημαντικό ενεργειακό όφελος για τον εκάστοτε μικροοργανισμό
2. Καταβολισμός: που οδηγεί στην ταχύτερη αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων και χρήση τους ως πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξή τους (Robertson, Alexander 1994)

Η in situ βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος καθορίζεται από πλήθος παραγόντων όπως η παρουσία και ο πληθυσμός εξειδικευμένων μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα γεωργικά φάρμακα. Συνήθως η αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος δεν πραγματοποιείται από ένα μόνο μικροοργανισμό αλλά από συμπράξεις μικροοργανισμών. Παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή δραστηριότητα όπως θερμοκρασία, υγρασία, pH και διαθεσιμότητα οξυγόνου καθορίζουν και τους ρυθμούς με τους οποίους πραγματοποιείται η μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων (H.J. Hugo et al, 2014).

Οι περισσότερες έρευνες ως σήμερα έχουν επικεντρωθεί στην αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος ενώ ελάχιστες έχουν μελετήσει την βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων στην ριζόσφαιρα ή σε βαθύτερα εδαφικά στρώματα όπου και αναμένεται να υπάρχουν λιγότεροι μικροοργανισμοί. Παράγοντες όπως η χημική δομή του γεωργικού φαρμάκου και η διαλυτότητα του καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό και την ευαισθησία του ή όχι στην μικροβιακή αποδόμηση.

Σήμερα έχουν απομονωθεί από το έδαφος μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών, κυρίως βακτηρίων, που έχουν την δυνατότητα να αποδομούν ταχύτερα γεωργικά φάρμακα. Έτσι οι Feng et al. (1997) απομόνωσαν ένα βακτήριο του γένους *Sphingomonas* που είχε την ικανότητα να διασπά το carbofuran. Οι Mallick et al. (1999)

απομόνωσαν ένα βακτήριο του γένους *Flavobacterium* που είχε την ικανότητα να διασπά το chlorpyrifos και διάφορα άλλα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Οι Sorensen et al. (2001) απομόνωσαν ένα βακτήριο του γένους *Sphingomonas* που είχε την ικανότητα να διασπά ταχύτατα το ζιζανιοκτόνο isoproturon. Οι Neumann et al. (2004) ανέφεραν την απομόνωση ενός *Pseudomonas* sp. που είχε την δυνατότητα να διασπά ταχύτατα το ζιζανιοκτόνο atrazine.

### 1.3 Επιταχυνόμενη Μικροβιακή Αποδόμηση Γεωργικών Φαρμάκων.

Η μικροβιακή αποδόμηση στην ακραία της μορφή, δηλαδή η ταχύτατη μικροβιακή αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της βιολογικής τους δράσης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται επιταχυνόμενη μικροβιακή αποικοδόμηση και προκύπτει από την συνεχή εφαρμογή του ίδιου γεωργικού φαρμάκου στο ίδιο έδαφος επί σειρά ετών οδηγώντας σε επιλογή μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να αποδομούν το γεωργικό φάρμακο ταχύτατα (Ziv Arbeli et al, 2007).

Η επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση πρωτοπαρατηρήθηκε το 1949, σε καλλιέργειες στις οποίες εφαρμοζόταν επαναλαμβανόμενα το ζιζανιοκτόνο 2,4-D (Audus et al. 1951). Μετά την παρατήρηση αυτή ακολούθησαν πολλές έρευνες, οι οποίες έδειξαν ότι και άλλες ομάδες γεωργικών φαρμάκων εμφάνιζαν ευαισθησία στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης. Ως τέτοιες αναγνωρίστηκαν οι ομάδες των οργανοφωσφορικών (Kargouzas and Singh 2006) και καρβαμιδικών εντομοκτόνων (Suett 1986), τα τριαζινικά ζιζανιοκτόνα (Krutz et al. 2010) καθώς και οι φαινυλουρίες (Cox et al 1996). Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζονται διαφόρων ειδών γεωργικά φάρμακα τα οποία εμφανίζουν ευαισθησία στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης.

Γεωργικά Φάρμακα	Χημική ομάδα	Στόχοι
Ethoprophos	Οργανοφωσφορικό	Νηματωδοκτόνο/Εντομοκτόνο
Oxamyl	Καρβαμιδικό	Εντομοκτόνο
Fenamiphos	Οργανοφωσφορικό	Νηματωδοκτόνο/Εντομοκτόνο
Cadusafos	Οργανοφωσφορικό	Νηματωδοκτόνο
Aldicarb	Καρβαμιδικό	Εντομοκτόνο
Carbofuran	Καρβαμιδικό	Εντομοκτόνο
Isofenphos	Οργανοφωσφορικό	Εντομοκτόνο
EPTC	Θειοκαρβαμικό	Ζιζανιοκτόνο

**Πίνακας 1.** Γεωργικά Φάρμακα που παρουσιάζουν επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση.

## 1.4 Επιταχυνόμενη Νηματωδοκτόνων

## Μικροβιακή

## Αποδόμηση

Τα νηματωδοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο μεγάλης ποικιλίας φυτο-παρασιτικών νηματωδών. Τα περισσότερα νηματωδοκτόνα ανήκουν στις ομάδες των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων. Ο περιορισμένος αριθμός νηματωδοκτόνων που έχουν έγκριση χρήσης στην Ευρώπη δεν επιτρέπει την ασφαλή εναλλαγή τους και οδηγεί τους παραγωγούς στην συνεχή εφαρμογή των ίδιων δραστικών ουσιών στον ίδιο αγρό επί σειρά ετών με αποτέλεσμα την εμφάνιση προβλημάτων μειωμένης αποτελεσματικότητας λόγω της εμφάνισης του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης.

Οι νηματώδεις αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για τις καλλιέργειες. Για παράδειγμα, στους αμπελώνες της Νότιας Αφρικής οι νηματώδεις αποτελούν την μεγαλύτερη απειλή. Επίσης, οι καλλιέργειες μπανάνας μπορούν να παρουσιάσουν 20-80% απώλεια παραγωγής λόγω της δράσης νηματωδών. Σε τέτοια εδάφη καλλιέργειες μπανάνας πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι για τυχόν επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση νηματωδοκτόνων (Thomas Moens, 2004). Συγκεκριμένα, τα γεωργικά φάρμακα terbufos, carbofuran, ethoprofos, fenamiphos, cadusafos και oxamyl εφαρμόστηκαν 5 φορές ανά διαστήματα 4 μηνών και παρατηρήθηκε ότι τα νηματωδοκτόνα carbofuran, fenamiphos και ethoprofos παρουσίαζαν μειωμένη αποτελεσματικότητα και αυτό αποδόθηκε στην ταχύτατη αποδόμηση τους από τους μικροοργανισμούς του εδάφους.

Έρευνα για επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση νηματωδοκτόνων πραγματοποιήθηκε σε καλλιέργειες ντομάτας για τα φάρμακα carbosulfan, cadusafos και triazophos (Hari C. Meher, 2010). Στην έρευνα αυτή εξετάστηκε η ανάπτυξη επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης σε εδάφη που είχαν δεχτεί επανειλημμένη εφαρμογή με τα παραπάνω νηματωδοκτόνα, καθώς και σε εδάφη από παρακείμενους αγρούς που δεν είχαν δεχτεί ποτέ εφαρμογή. Τα γεωργικά φάρμακα εφαρμόστηκαν 7 φορές και από την 5η εφαρμογή και μετά παρατηρήθηκε για όλα επιτάχυνση της αποδόμησης τους και περιορισμένη βιολογική δραστηριότητα έναντι των φυτοπαθογόνων νηματωδών στο έδαφος. Σε άλλες έρευνες παρατηρήθηκε ότι το νηματωδοκτόνο Fenamiphos βιοαποδομοούνταν επιταχυνόμενα σε καλλιέργειες μπανάνας (A.B. Pattison, 2012). Επίσης, σε έρευνα εδαφών καλλιέργειας μπανάνας, πατάτας και καφέ τα γεωργικά φάρμακα Carbofuran και Ethoprofos παρουσίασαν επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση (Chin-Pampillo J.S., 2015).

Το κύριο μέτρο για τον περιορισμό εμφάνισης του φαινομένου αλλά και για την αντιμετώπιση προβλημάτων επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης που έχουν ήδη προκύψει είναι η εναλλαγή γεωργικών φαρμάκων από διαφορετικές χημικές ομάδες. Έτσι οι Giannakou και Karrouzas (2002) πρότειναν την εναλλαγή καρβαμιδικών και

οργανοφωφορικών νηματωδοκτόνων ως λύση για τον περιορισμό εμφάνισης του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης. Εναλλακτικά σε κηπευτικές καλλιέργειες είχε προταθεί η χρήση καπνιστικών εδάφους ως λύση για τον περιορισμό της εμφάνισης του φαινομένου για τα νηματωδοκτόνα fenamiphos και cadusafos. Ο περιορισμένος αριθμός νηματωδοκτόνων που είναι σήμερα διαθέσιμα στους παραγωγούς αποτελεί πρόβλημα προς την κατεύθυνση εφαρμογής της παραπάνω πρακτικής εναλλαγής νηματωδοκτόνων.

## 1.5 Fosthiazate και Καλλιέργειες Πατάτας

Η πατάτα αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες στην Ευρώπη και φυτεύεται σε συστήματα μονοκαλλιέργειας κυρίως σε ορεινές περιοχές. Τα πιο συνηθισμένα προβλήματα στην καλλιέργεια της πατάτας είναι ο δορυφόρος της πατάτας (*Leptinotarsa desemlineata*), το σιδηροσκούληκο (*Agriotes* sp) και οι κυστώδεις νηματώδεις (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*). Οι κυστώδεις νηματώδεις αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για την καλλιέργεια πατάτας στο Ηνωμένο Βασίλειο, και προκαλούν ετησίως 9% μείωση της παραγωγής. Η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων αποτελεί την κύρια στρατηγική για την προστασία της καλλιέργειας, αλλά τα εντομοκτόνα/νηματωδοκτόνα που έχουν έγκριση χρήσης στην Ευρώπη είναι ελάχιστα και περιλαμβάνουν τα fosthiazate, ethoprophos, chlorpyrifos και oxamyl. Αυτό το γεγονός σε συνδυασμό με τον μονοκαλλιεργητικό χαρακτήρα της πατάτας δεν επιτρέπει την συνεχή αλλαγή γεωργικών φαρμάκων και αυξάνει το ρίσκο εμφάνισης του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης.

Για τα γεωργικά φάρμακα ethoprophos και oxamyl υπάρχουν εκτεταμένα παραδείγματα από την διεθνή βιβλιογραφία για την ευαισθησία τους στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης (Karpouzas et al. 1999b; Smelt et al. 1987). Επίσης αντίστοιχες μελέτες για τα επίσης νηματωδοκτόνα fenamiphos (Ou, 1991, Davis et al. 1993), cadusafos (Karpouzas et al. 2004) και aldicarb (Suett and Jukes 1988) τα οποία δεν χρησιμοποιούνται πλέον στην καλλιέργεια της πατάτας, έχουν δείξει την ευαισθησία τους στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης (Robertson et al. 1998). Τέλος το chlorpyrifos παρουσιάζει την υψηλότερη ανθεκτικότητα στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης αν και υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να εμφανίσει και αυτό το εντομοκτόνο ευαισθησία στο συγκεκριμένο φαινόμενο.

Το μοναδικό από τα εντομοκτόνα/νηματωδοκτόνα που χρησιμοποιείται σήμερα στην πατατοκαλλιέργεια και δεν έχει παρουσιάσει ευαισθησία στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης είναι το fosthiazate. Πρόσφατες μελέτες από το Ηνωμένο Βασίλειο έδειξαν ότι μεταξύ των aldicarb, oxamyl και fosthiazate το

τελευταίο αποτέλεσε το μοναδικό που δεν εμφάνισε επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση σε κανένα από τα 15 εδάφη με ιστορικό χρήσης. Αντίθετα για το aldicarb παρατηρήθηκε επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση σε 9 από τα 15 εδάφη που μελετήθηκαν και για το oxamyl σε 9 από τα 10 εδάφη (Osborn et al, 2010)

Το fosthiazate ανήκει στην ομάδα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων/νηματωδοκτόνων και πρωτοεισήχθη στην αγορά την δεκαετία του '90 από την ISK με την εμπορική ονομασία Nemathorin®. Χρησιμοποιείται σε πλήθος καλλιεργειών όπως η πατάτα αλλά και σε κηπευτικές καλλιέργειες για την καταπολέμηση των κυστωδών νηματωδών και των ριζόκομβων νηματωδών αντίστοιχα. Περιορισμένες μελέτες υπάρχουν για την αποδόμηση του στο έδαφος. Έτσι οι Qin et al. (2004) παρατήρησαν αυξημένη αποδόμηση του σε εδάφη με αλκαλικό pH και τιμές DT<sub>50</sub> που κυμαίνονταν από 17.6-46.8 ημέρες. Μεταγενέστερες μελέτες από τους Pantelelis et al. (2006) συμφώνησαν στο ότι το pH του εδάφους αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την υπολειμματικότητα του fosthiazate στο έδαφος. Έτσι παρατήρησαν ότι σε όξινα εδάφη οι τιμές DT<sub>50</sub> κυμαίνονταν από 53.3-57.7 ημέρες ενώ αντίθετα σε αλκαλικά εδάφη οι τιμές DT<sub>50</sub> ήταν εμφανώς χαμηλότερες (14.1-21.7 ημέρες). Αποστείρωση των εδαφών στην ίδια μελέτη οδήγησε σε περιορισμό της ταχύτητας αποδόμησης του fosthiazate καταδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών στην αποδόμηση του στο έδαφος. Παρόλα αυτά σε καμία από τις παραπάνω δύο μελέτες δεν εξετάστηκε τυχόν επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση του νηματωδοκτόνου.

## 1.6 Σκοπός του Πειράματος

Στην διπλωματική αυτή εργασία εξετάστηκε και επιβεβαιώθηκε η επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση του νηματωδοκτόνου fosthiazate σε τρία εδάφη μονοκαλλιεργείας πατάτας από το Νευροκόπι, στα οποία σε προηγούμενες μελέτες παρατηρήθηκε ότι εμφάνιζαν ταχεία αποδόμηση του fosthiazate, είχαν εκτεταμένο ιστορικό χρήσης του συγκεκριμένου νηματωδοκτόνου και σύμφωνα με τον παραγωγό εμφάνισαν και περιορισμένη ικανότητα ελέγχου των νηματωδών (Papadopoulou et al. 2015; Πτυχιακή διατριβή Στάθη Λαγού). Το πείραμα αυτό αποτελεί μέρος μίας μεγάλης έρευνας του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά την οποία εκτιμήθηκε η βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων chlorpyrifos, fosthiazate, ethoprophos και fipronil σε εδάφη από πατατοκαλλιέργειες στις οποίες είχαν εφαρμοστεί στο παρελθόν αυτά τα γεωργικά φάρμακα. Μέσω της έρευνας αυτής απεδείχθη για πρώτη φορά ότι το fosthiazate βιοαποδομείται με επιταχυνόμενους ρυθμούς, γεγονός που καταδεικνύει την ανάγκη για πραγματοποίηση περαιτέρω ερευνών πάνω στην ευαισθησία του φαρμάκου αυτού στην επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση.

## 2 Μέθοδοι και Υλικά

### 2.1 Εδάφη

Τα εδάφη που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας προέρχονται από αγρούς της περιοχής του Νευροκοπίου, στην βορειο-ανατολική Ελλάδα. Το Νευροκόπι είναι μία σημαντική περιοχή καλλιέργειας πατάτας, και η συλλογή των εδαφών πραγματοποιήθηκε τον Σεπτέμβριο του 2013, έναν χρόνο πριν την πραγματοποίηση της διπλωματικής εργασίας. Συνολικά συλλέχθηκαν εδάφη από τις περιοχές Νευροκοπίου, Θήβας και Αρχάγγελου. Από τα αποτελέσματα της παραπάνω αρχικής μελέτης προέκυψε ότι σε δύο δείγματα από την περιοχή του Νευροκοπίου όπου υπήρχε ιστορικό χρήσης του fosthiazate παρατηρήθηκε ταχύτατη αποδόμηση του νηματωδοκτόνου. Από την άλλη μεριά σε ανάλογο έδαφος από την περιοχή, με ιστορικό χρήσης fosthiazate αλλά όξινο pH (έδαφος 2) παρατηρήθηκε βραδεία αποδόμηση του νηματωδοκτόνου (Papadopolou et al. 2015). Το ιστορικό χρήσης γεωργικών φαρμάκων στους αγρούς που μελετήθηκαν παρουσιάζεται στο **Πίνακα 2**. Για την αποφυγή επιμόλυνσης μεταξύ δειγμάτων έγινε χειρισμός πρώτα του εδάφους 2 που παρουσίαζε χαμηλή αποδομητική ικανότητα και ακολούθως των άλλων δύο εδαφών (Εδάφη 3 και 4). Τα δείγματα εδαφους μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, αποξηράνθηκαν μερικώς και αφού κοσκινίστηκαν, λήφθηκαν δείγματα τους για τον προσδιορισμό βιολογικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (**Πίνακας 3**).

**Πίνακας 2.** Το ιστορικό καλλιέργειας και χρήσης γεωργικών φαρμάκων για τα εδάφη που μελετήθηκαν.

Εδάφη	Έτος	Γεωργικό Φάρμακο	Καλλιέργεια
Έδαφος 2	2013	Chlorpyrifos, Fosthiazate	Πατάτα
	2012	Chlorpyrifos, Fosthiazate	Πατάτα
	2011	-	Σιτάρι
	2010	Chlorpyrifos, Fosthiazate	Πατάτα
	2009	-	Σιτάρι
Έδαφος 3	2013	Ethoprophos, Fosthiazate	Πατάτα



	2012	Ethoprophos, Fosthiazate	Πατάτα
	2011	-	Σιτάρι
Έδαφος 4	2013	Chlorpyrifos (2 εφαρμογές), Fosthiazate, Ethoprophos	Πατάτα
	2012	-	Σιτάρι
	2011	Chlorpyrifos (2 apps), Fosthiazate, Ethoprophos	Πατάτα
	2010	-	Σιτάρι
	2009	Chlorpyrifos (2 apps), Fosthiazate, Ethoprophos	Πατάτα

**Πίνακας 3.** Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν.

Έδαφος	Άμμος (%)	Ίλος (%)	Αργίλος (%)	Μηχανική Σύσταση	Οργανικός C (%)	pH
2	64.4	24.0	11.6	Αμμοπηλώδες	0.42	5.23
3	68.4	22.0	9.6	Αμμοπηλώδες	0.61	6.80
4	66.4	20.0	13.6	Αμμοπηλώδες	0.85	6.60

## 2.2 Προσδιορισμός Υγρασίας εδάφους

Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας,  $5 \pm 0.01\text{g}$  εδάφους μεταφέρθηκαν σε προ-ζυγισμένο δοχείο από αλουμίνιο και το συνολικό βάρος καταγράφηκε. Για κάθε δείγμα εδάφους χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Αμέσως μετά, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε προθερμασμένο φούρνο (LabLine) στους  $105^\circ\text{C}$ , όπου και παρέμειναν για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα δείγματα επαναζυγίστηκαν και προσδιορίστηκε η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους σύμφωνα με τον τύπο:

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

MC: η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους

W1: το βάρος του δοχείου με το έδαφος πριν την ξήρανση

W2: το βάρος του δοχείου με το έδαφος μετά την ξήρανση

W<sub>cont</sub>: το βάρος του δοχείου.

## 2.3 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών

Ο προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας έγινε βαρομετρικά. Συγκεκριμένα, 20g εδάφους ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε χωνί εντός του οποίου είχε προηγουμένως τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί (WhatmanNo1). Στη συνέχεια το έδαφος διαβρέχτηκε επανειλημμένα με αποσταγμένο νερό προκειμένου να διασφαλιστεί ο κορεσμός του. Η ελεύθερη επιφάνεια του χωνιού καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή απώλειας νερού λόγω εξάτμισης. Το έδαφος αφήθηκε σε ηρεμία 12-14 ώρες ώστε να στραγγίσει η περίσσεια του νερού. Το βάρος του χωνιού, με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος καταγράφηκε πριν ( $W_1$ ) και μετά ( $W_2$ ) την κατάκλιση. Για κάθε δείγμα εδάφους χρησιμοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις. Ακολούθως, η υδατοχωρητικότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$WHC = (B - X) + (W_2 - W_1) / X * 100\%$$

WHC: η υδατοχωρητικότητα του εδάφους

B: το βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

X: το ξηρό βάρος εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

W<sub>1</sub>: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, πριν την κατάκλιση

W<sub>2</sub>: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, μετά την κατάκλιση.

## 2.4 Περιγραφή πειράματος

Για την πραγματοποίηση του συνολικού πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν 1080 g απο κάθε έδαφος. Αρχικά έπρεπε να γίνει η εφαρμογή του νηματωδοκτόνου ώστε η συγκέντρωσή του στο έδαφος να είναι 2 mg/kg. Χρησιμοποιώντας ποσότητα του εμπορικού σκεύασματος Nemathorin 15EC παρασκευάσαμε υδατικό διάλυμα fosthiazate συγκέντρωσης 108 mg/L. Ακολουθώντας 20 mL του παραπάνω διαλύματος εφαρμόστηκαν σε καθένα από τα τρία εδάφη. Τα εδάφη ακολούθως αναμίχθηκαν επιμελώς με το χέρι και προστέθηκε επιπλέον νερό ώστε να προσαρμοστεί η υγρασία τους στο 50% της υδατοχωρητικότητας του κάθε εδάφους.

Ακολουθώντας κάθε έδαφος χωρίστηκε σε 9 δείγματα των ≈120 g τα οποία ονομάστηκαν ανα τρεις επαναλήψεις A, B και Γ. Όλα τα εδάφη τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια και τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα με θερμοκρασία 20 °C στο σκοτάδι. Αμέσως μετά την εφαρμογή και σε τακτά χρονικά διαστήματα 20 g από τα δείγματα A συλλέχθηκαν και αναλύονταν για υπολείμματα fosthiazate. Μετά την ολοκλήρωση της αποδόμησης του fosthiazate στα δείγματα της σειράς A, τα δείγματα των σειρών B και Γ απομακρύνθηκαν από τον επωαστήρα και δέχτηκαν δεύτερη εφαρμογή fosthiazate στοχεύοντας στην ίδια συγκέντρωση στο έδαφος. Ακολουθώντας τα δείγματα της σειράς B και Γ αναμίχθηκαν με το χέρι, προσαρμόστηκε η υγρασία στο 50% της υδατοχωρητικότητας και από τα δείγματα της σειράς B ελήφθησαν δείγματα εδάφους ως χρόνος 0. Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην επώαση όπως και προηγουμένως και ανά τακτά χρονικά διαστήματα συλλέγονταν δείγματα (20 g) από τα δείγματα της σειράς B και προσδιορίστηκε η αποδόμηση του fosthiazate. Με την ολοκλήρωση της διάσπασης στα δείγματα της σειράς B έγινε νέα εφαρμογή στα δείγματα της σειράς Γ όπως έχει ήδη περιγραφεί και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία παρακολούθησης της αποδόμησης του fosthiazate. Με την παραπάνω διαδικασία προέκυψαν τρεις σειρές δειγμάτων, A, B και Γ στις οποίες μελετήθηκε η αποδόμηση του fosthiazate ύστερα από μία, δύο και τρεις εφαρμογές. Η υπόθεση μας ήταν ότι η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή fosthiazate στα εδάφη 3, 4 θα επιταχύνει ακόμη περισσότερο την αποδόμηση του νηματωδοκτόνου ενώ θέλαμε να εξετάσουμε εάν η

επαναλαμβανόμενη εφαρμογή fosthiazate στο εργαστήριο θα οδηγούσε σε επιταχυνόμενη αποδόμηση και στο έδαφος 2 όπου αρχικά είχε καταγραφεί βραδεία αποδόμηση του fosthiazate (Πτυχιακή Στάθης Λαγός, Papadopolou et al. 2015)

## 2.5 Αναλυτική μέθοδος

### 2.5.1 Εκχύλιση υπολειμμάτων fosthiazate από το έδαφος

Τα υπολείμματα του fosthiazate από τα δείγματα εδάφους εκχυλίστηκαν με την μέθοδο QuEChERS (Asensio-Ramos et al. 2010). Η διαδικασία αποτελούνταν από τα εξής βήματα:

- i. Χρησιμοποίηση 10 g του εδάφους στο οποίο έγινε δειγματοληψία. Τα υπόλοιπα τοποθετήθηκαν στον καταψύκτη.
- ii. Η ποσότητα αυτή του εδάφους τοποθετήθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL όπου προστέθηκαν 20 mL ακετονιτρίλιο και ακολούθησε ανάμιξη για 1 λεπτό σε vortex.
- iii. Ακολούθως προστέθηκαν 4 g  $MgSO_4$ , 1 g NaCl και 1,5 g Sodium citrate tribasic dehydrate.
- iv. Το συνολικό μείγμα αναδεύτηκε για διάστημα 30 δευτερολέπτων και τοποθετήθηκε για 5 λεπτά σε σύστημα υπερήχων για καλύτερη ομογενοποίηση των συστατικών του.
- v. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 4.000 στροφές ανα λεπτό, για 8 λεπτά σε θερμοκρασία 20 °C.
- vi. Ακολούθως, από το υπερκείμενο λήφθηκαν 4 mL στα οποία προστέθηκαν 0,6 g  $MgSO_4$  και 0,1 g Primary-secondary amine (PSA).
- vii. Το συνολικό μείγμα αναδεύτηκε για διάστημα λίγων δευτερολέπτων και τοποθετήθηκε σε σύστημα υπερήχων για 1 λεπτό.
- viii. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 20 °C στις 4.400 στροφές ανα λεπτό
- ix. Τέλος το υπερκείμενο φιλτραρίστηκε και τοποθετήθηκε σε γυάλινα φιαλίδια στους -15 °C μέχρι να αναλυθεί σε σύστημα HPLC όπως περιγράφεται παρακάτω.

Δοκιμές ανάκτησης σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (0.1, 1 και 5 mg  $Kg^{-1}$ ) έδειξαν επίπεδα ανάκτησης για το fosthiazate 98.7% κατά μέσο όρο. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ήταν 0.05 mg/kg.

## 2.5.2 Ανάλυση HPLC

Για την ανάλυση των εκχυλισμένων δειγμάτων μας χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα HPLC Marathon III, εξοπλισμένο με έναν UV ανιχνευτή και μία στήλη RP C18 GraceSmart (4.6 mm x 150 mm, 5 μm). Η κινητή φάση μας αποτελούταν από ακετονιτρίλιο και νερό σε αναλογία κατά όγκο 50:50, και η ροή της κινητής φάσης της ήταν 1 ml/min. Η ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων του fosthiazate πραγματοποιήθηκε με την χρήση εξωτερικής πρότυπης καμπύλης που κατασκευάστηκε μέσω έγχυσης δειγμάτων πρότυπων διαλυμάτων του fosthiazate σε μεθανόλη συγκεντρώσεων από 0.05 mg/L - 10 mg/L.

## 2.6 Υπολογισμός DT<sub>50</sub> fosthiazate

Σε όλα τα πειράματα υπολογίστηκαν για την αποδόμηση του fosthiazate οι τιμές DT<sub>50</sub>, DT<sub>90</sub> και ο ρυθμός αποδόμησης k, χρησιμοποιώντας κατάλληλα μοντέλα κινητικής όπως αυτά προτείνονται από το Focus Degradation Kinetics Group (FOCUS 2006). Σε κάθε περίπτωση για κάθε καμπύλη διάσπαση χρησιμοποιήθηκαν 4 μοντέλα κινητικής: το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης Single First-Order (SFO) και τα διφασικά μοντέλα First Order Multi-Compartment (FOMC), το Hockey-Stick (HS) και το Double First Order in Parallel (DFOP). Για την αξιολόγηση της ακρίβειας με την οποία το κάθε μοντέλο περιγράφει την αποδόμηση του fosthiazate χρησιμοποιήθηκε το τεστ  $\chi^2$  (<15%), η οπτική αξιολόγηση και η κατανομή των υπολειμμάτων.

## 3 Αποτελέσματα

### 3.1 Αποδόμηση fosthiazate

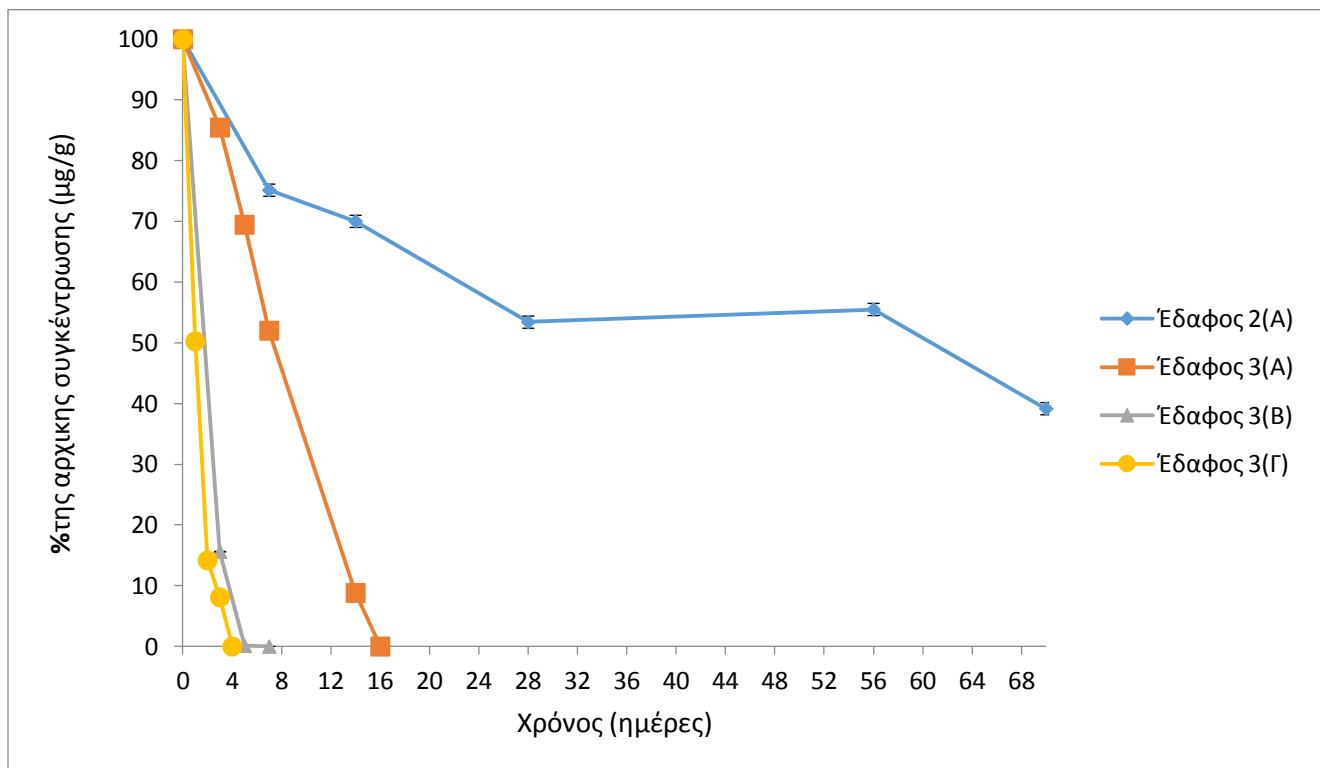
#### 3.1.1 Αποδόμηση στο έδαφος 2

Στο έδαφος 2 έγινε μόνο μία εφαρμογή fosthiazate, καθώς παρά την εκτεταμένη δειγματοληψία που κάναμε σε μεγάλο βάθος χρόνου, οι ρυθμοί αποδόμησης του γεωργικού φαρμάκου ήταν πολύ μικροί, γεγονός το οποίο ήταν αναμενόμενο. Τα αποτελέσματα της εφαρμογής αυτής θα παρουσιαστούν σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των εδαφών 3 και 4.

#### 3.1.2 Αποδόμηση στα εδάφη 3 και 4

Στο έδαφος 3 παρατηρήθηκε πλήρη αποδόμηση του fosthiazate ύστερα από 16, 6 και 4 ημέρες στα δείγματα των σειρών Α, Β και Γ που είχαν δεχτεί αντίστοιχα μία, δύο και τρεις διαδοχικές εφαρμογές fosthiazate (**Διάγραμμα 1**).

Στο έδαφος 4 παρατηρήθηκε βραδύτερη αποδόμηση του fosthiazate σε σχέση με το έδαφος 3. Έτσι η αποδόμηση του fosthiazate στα δείγματα των σειρών Α, Β και Γ ολοκληρώθηκε ύστερα από 40, 30 και 28 ημέρες αντίστοιχα (**Διάγραμμα 2**).

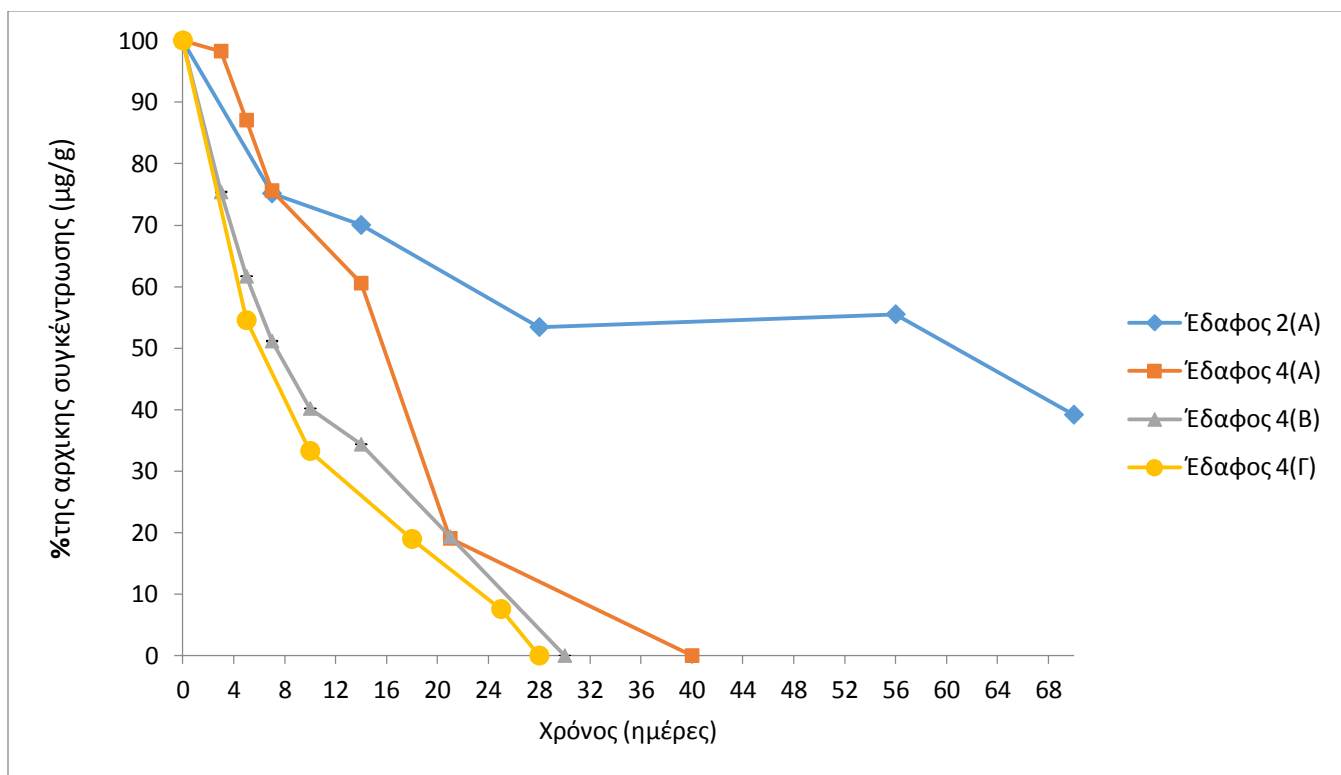


**Διάγραμμα 1.** Αποδόμηση του fosthiazate μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές στο έδαφος 3.

Μετά από έλεγχο της κινητικής αποδόμησης του fosthiazate στα διάφορα εδάφη με τα τέσσερα μοντέλα κινητικής που περιγράφηκαν παραπάνω προέκυψε ότι το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης περιέγραψε με ακρίβεια την αποδόμηση του fosthiazate και αυτό επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του  $DT_{50}$ . Οι τιμές  $DT_{50}$  του fosthiazate στα διάφορα εδάφη όπως υπολογίστηκαν με τα τέσσερα μοντέλα κινητικής παρουσιάζονται στους **Πίνακες 4** και **5**, ενώ οι καμπύλες αποδόμησης όπως περιγράφονται από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης παρουσιάζονται στα **Διαγράμματα 3** και **4**.

Στο έδαφος 3 η επιτάχυνση της αποδόμησης του fosthiazate με τις επαναλαμβανόμενες εφαρμογές επιβεβαιώνεται και από τις τιμές  $DT_{50}$  που ήταν 6.4 ημέρες στα εδάφη της σειράς A (μια εφαρμογή), 1.05 και 0.84 ημέρες στα εδάφη των σειρών B και Γ που είχαν δεχτεί δύο και τρεις εφαρμογές του fosthiazate αντίστοιχα. Ανάλογη εικόνα παρατηρήθηκε και στο έδαφος 4 όπου οι τιμές  $DT_{50}$  για την αποδόμηση της πρώτης, δεύτερης και τρίτης εφαρμογής του fosthiazate ήταν 11.8, 8.1 και 6.4

ημέρες αντίστοιχα επιβεβαιώνοντας της επιτάχυνση της αποδόμησης του νηματωδοκτόνου και στο συγκεκριμένο έδαφος. Από την άλλη μεριά παρατηρήθηκε βραδεία αποδόμηση του fosthiazate στο έδαφος 2 με τιμές  $DT_{50} = 61.9$  ημέρες.



**Διάγραμμα 2.** Αποδόμηση του fosthiazate μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές στο έδαφος 4.



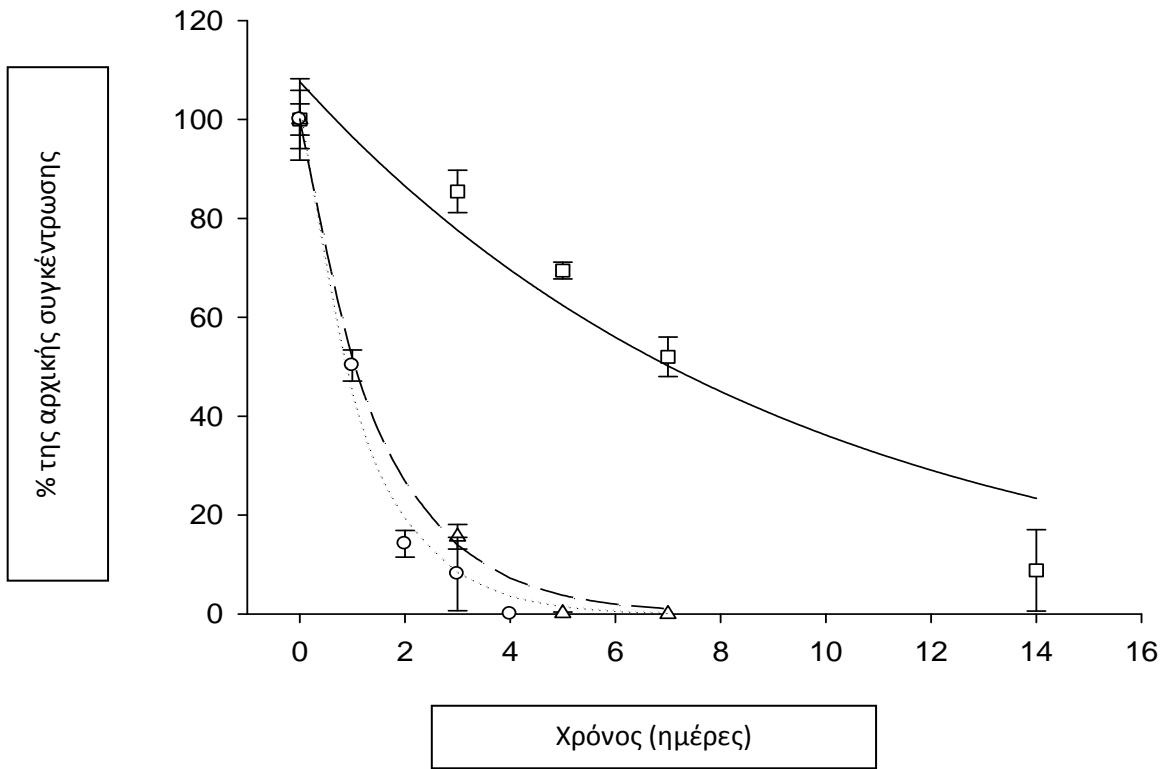
**Πίνακας 4:** Οι παράμετροι των μοντέλων κινητικής για το fosthiazate για το έδαφος 3, Α έως Γ από την περιοχή του Νευροκοπίου σε συσχέτιση με τον Μάρτυρα (Έδαφος 2). Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι τιμές για το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO) που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του DT<sub>50</sub> του fosthiazate.

Μοντέλο	Έδαφος	Παράμετροι									
		K	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	t <sub>b</sub>	alpha	beta	g	DT <sub>50</sub>	DT <sub>90</sub>	χ <sup>2</sup>
<b>SFO</b>	<b>2</b>	<b>0.011</b>							<b>61.9</b>	<b>205.6</b>	<b>12.26</b>
	<b>3(A)</b>	<b>0.109</b>							<b>6.4</b>	<b>21.09</b>	<b>11.11</b>
	<b>3(B)</b>	<b>0.659</b>							<b>1.05</b>	<b>3.494</b>	<b>5.79</b>
	<b>3(Γ)</b>	<b>0.829</b>							<b>0.84</b>	<b>2.779</b>	<b>9.14</b>
<b>HS</b>	2		0.151	0.005	2.355				63.89	358.5	9.26
	3(A)		0.069	0.253	6.008				7.11	13.47	3.27
	3(B)		0.862	Δ.Π.*	Δ.Π.*				Δ.Π.*	Δ.Π.*	Δ.Π.*
	3(Γ)		0.829	0.01	1.609				0.837	2.779	13.04
<b>FOMC</b>	2					0.161	1.078		78.24	1715298	6.99
	3(A)					14.36 x 10 <sup>4</sup>	13.15 x 10 <sup>5</sup>		6.35	21.09	12.69
	3(B)					13.81 x 10 <sup>4</sup>	20.96 x 10 <sup>4</sup>		1.052	3.49	7.23
	3(Γ)					56.74 x 10 <sup>4</sup>	68.85 x 10 <sup>4</sup>		0.837	2.779	10.44
<b>DFOP</b>	2		0.117	1.12 x 10 <sup>-10</sup>				0.449	Δ.Π.*	Δ.Π.*	6.38
	3(A)		0.109	0.109				0.983	Δ.Π.*	Δ.Π.*	15.85
	3(B)		Δ.Π.*	Δ.Π.*				Δ.Π.*	Δ.Π.*	Δ.Π.*	Δ.Π.*
	3(Γ)		Δ.Π.*	Δ.Π.*				Δ.Π.*	Δ.Π.*	Δ.Π.*	Δ.Π.*

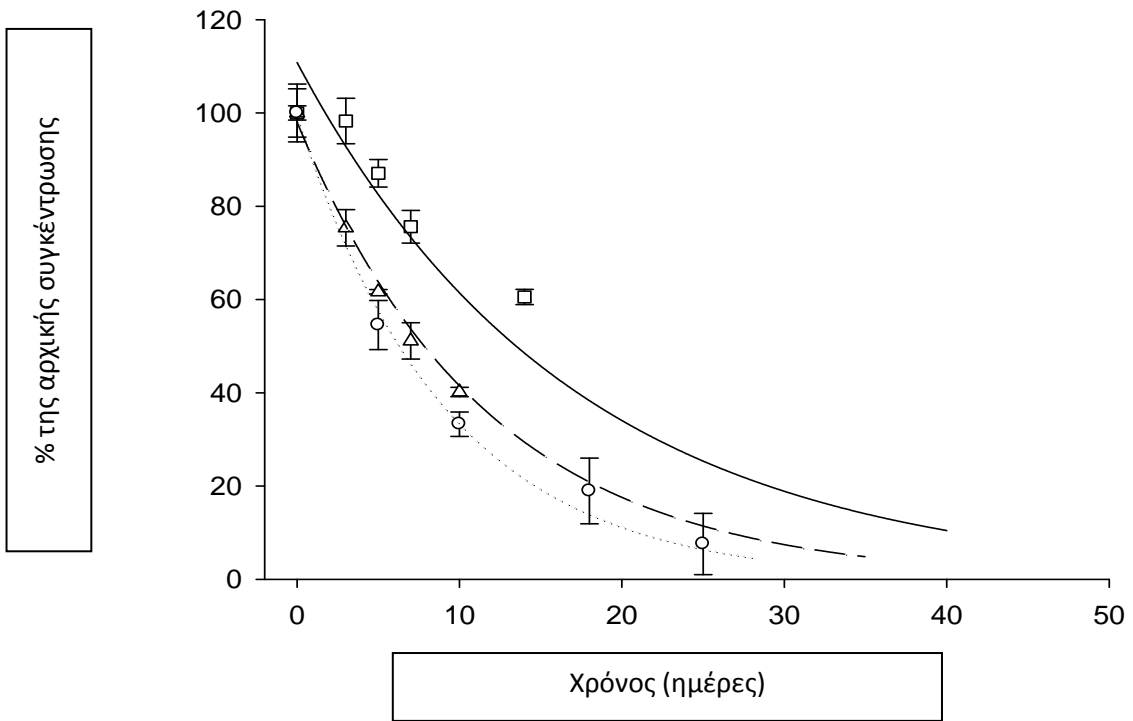
\*Δ.Π. = Δεν προσδιορίστηκε

**Πίνακας 5:** Οι παράμετροι των μοντέλων κινητικής για το fosthiazate για το έδαφος 4, Α έως Γ από την περιοχή του Νευροκοπίου σε συσχέτιση με τον Μάρτυρα (Έδαφος 2). Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι τιμές για το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO) που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του DT<sub>50</sub> του fosthiazate.

Μοντέλο	Έδαφος	Παράμετροι											
		K	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	C <sub>0</sub>	t <sub>b</sub>	alpha	beta	g	DT <sub>50</sub>	DT <sub>90</sub>	x <sup>2</sup>	
<b>SFO</b>	2	<b>0.011</b>			<b>85.24</b>						<b>61.89</b>	<b>205.6</b>	<b>12.26</b>
	4(A)	<b>0.059</b>			<b>110.8</b>						<b>11.81</b>	<b>39.23</b>	<b>12.03</b>
	4(B)	<b>0.086</b>			<b>98.08</b>						<b>8.06</b>	<b>26.78</b>	<b>5.11</b>
	4(Γ)	<b>0.109</b>			<b>98.9</b>						<b>6.36</b>	<b>21.14</b>	<b>6.9</b>
<b>HS</b>	2		0.151	0.005	100	2.355					63.89	358.5	9.26
	4(A)		0.069	100	100.1	3.767					13.42	36.55	10.51
	4(B)		0.096	0.077	100.1	5.92					7.54	28.53	5.14
	4(Γ)		0.121	0.099	100	1.571					5.94	22.17	7.78
<b>FOMC</b>	2				100.2		0.1612	1.078			78.24	1715298	6.99
	4(A)				110.8		4 x 10 <sup>6</sup>	6.82 x 10 <sup>7</sup>			11.81	39.23	12.83
	4(B)				98.67		16.44	183.5			7.91	27.6	7.91
	4(Γ)				99.4		14.23	123.6			6.17	21.7	7.45
<b>DFOP</b>	2		0.117	1.12 x 10 <sup>-10</sup>	100.4				0.449		Δ.Π.*	Δ.Π.*	6.38
	4(A)		0.059	0.059	110.8				0.597		11.81	39.23	13.86
	4(B)		0.449	0.078	100.2				0.094		7.67	28.15	5.29
	4(Γ)		0.099	507.2	100				0.901		5.94	22.17	7.78



**Διάγραμμα 3.** Αποδόμηση του fosfiazate στο έδαφος 3.



**Διάγραμμα 4.** Αποδόμηση του fosthiazate στο έδαφος 4.

## 4 Συζήτηση

Το fosthiazate αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά νηματωδοκτόνα για την καλλιέργεια της πατάτας ενώ εμφανίζει και δράση εναντίον του σιδηροσκούληκου. Τα υπόλοιπα νηματωδοκτόνα / εντομοκτόνα που είναι διαθέσιμα για τους παραγωγούς πατάτας όπως το oxamyl (Smelt et al. 1987) και το ethoprophos (Karpouzas et al. 1999β) έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν ευαισθησία στην επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση και θα πρέπει να αποφεύγεται η συνεχής και επαναλαμβανόμενη χρήση τους. Έτσι το fosthiazate για το οποίο μέχρι σήμερα δεν είχε αναφερθεί να παρουσιάζει ευαισθησία στην επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση (Osborn et al. 2010) αποτελούσε σημαντική λύση εναλλαγής με τα oxamyl και ethoprophos.

Στην παρούσα διατριβή η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή στο εργαστήριο στα δύο εδάφη 3 και 4 του νηματωδοκτόνου fosthiazate οδήγησε σε επιτάχυνση της αποδόμησης του φτάνοντας σε τιμές  $DT_{50} < 1$  ημέρα στο έδαφος 3 και στις 6.4 ημέρες στο έδαφος 4. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα διάσπασης του fosthiazate στα ίδια εδάφη περιγράφονται από τους Papadopoulos et al. (2015) και στην υπό συγγραφή πτυχιακή διατριβή του Σ. Λαγού και επιβεβαιώνουν την εμφάνιση επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης του fosthiazate. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα εδάφη 3 και 4 παρουσίαζαν ιστορικό χρήσης fosthiazate, ουδέτερο pH και ο παραγωγός είχε παραπονεθεί για περιορισμένη νηματωδοκτόνο δράση. Η ταχύτατη αποδόμηση του fosthiazate οφείλεται στην ανάπτυξη του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης, γεγονός το οποίο συνιστά την πρώτη παγκόσμια αναφορά εμφάνισης του συγκεκριμένου φαινομένου για το νηματωδοκτόνο fosthiazate.

Συγκριτικά με την αρχική αποδόμηση του fosthiazate στα δείγματα από τα εδάφη 3 και 4 όπως παρουσιάζονται από τους Papadopoulos et al (2015) παρατηρήθηκε μια αρχική επιβράδυνση της αποδόμησης ( $DT_{50}$  1.7 ημέρες ενώ 6.4 και 11.8 ημέρες αντίστοιχα στα εδάφη 3 και 4 στην παρούσα εργασία). Η αρχική αυτή επιβράδυνση οφείλεται πιθανότατα στο διάστημα αποθήκευσης του εδάφους που μεσολάβησε μεταξύ των δύο πειραμάτων (8 - 10 μήνες) που αποτελεί συνήθως περιοριστικό παράγοντα για την διατήρηση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.

Από την άλλη μεριά στο έδαφος 2 που παρουσίαζε ανάλογο ιστορικό χρήσης fosthiazate και παρόμοια μηχανική σύσταση και περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα με τα εδάφη 3 και 4 αλλά όξινο pH δεν παρατηρήθηκε επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση του fosthiazate. Αυτό δεν είναι πρωτόγνωρο καθώς υπάρχουν ανάλογα παραδείγματα στην βιβλιογραφία για άλλα οργανοφωσφορικά νηματωδοκτόνα όπου έχει παρατηρηθεί ξεκάθαρη θετική συσχέτιση μεταξύ αλκαλικού pH και εμφάνισης του

φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης. Έτσι σε προηγούμενες μελέτες οι Karpouzas et al. (1999a) παρατήρησαν ότι σε έδαφος με όξινο pH και ιστορικό χρήσης ethoprophos δεν παρατηρήθηκε επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση για το συγκεκριμένο νηματωδοκτόνο. Παρόμοιες παρατηρήσεις για άλλα εντομοκτόνα εδάφους όπως το carbofuran (Suett et al. 1996), isazofos (Somasundaram et al. 1993), cadusafos (Karpouzas et al. 2004) και τα δικαρβοξυμιδικά μυκητοκτόνα (Walker and Welsh 1990). Αυτό οφείλεται στο ότι τα βακτήρια που αποτελούν και τους κύριους υπεύθυνους για την εμφάνιση της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης δεν ευνοούνται σε όξινα εδάφη (Burns 1976).

Συνολικά τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν την πρώτη απόδειξη για ανάπτυξη επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης του νηματοδωκτόνου fosthiazate σε εδάφη τα οποία είχαν ιστορία εφαρμογών του συγκεκριμένου γεωργικού φαρμάκου. Οι έρευνες που θα ακολουθήσουν θα επικεντρωθούν στην ανάπτυξη μεθόδων για την αντιμετώπιση του προβλήματος της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης του fosthiazate, καθώς και στην ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι για την επιταχυνόμενη αποδόμηση του στα προαναφερθέντα εδάφη.

## 5 Βιβλιογραφία

1. Enhanced biodegradation of nematicides after repetitive applications and its effect on root and yield parameters in commercial banana plantations. Thomas Moens, Mario Araya, Rony Swennen, Dirk De Waele 2004-05-01
2. Accelerated Microbial Degradation of Nematicides in Vineyard and Orchard Soils H.J. Hugo<sup>1</sup>, C. Mouton<sup>2</sup>, A.P. Malan<sup>3</sup>, March 2014
3. Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension Ziv Arbeli Cilia L. Fuentes 16 March 2007
4. Nematicidal efficacy, enhanced degradation and cross adaptation of carbosulfan, cadusafos and triazophos under tropical conditions Authors: Hari C. Meher Vijay T. Gajbhiye Ghanendra Singh Anju Kamra and Gautam Chawla Year : 2010

5. Degradation and Adsorption of Fosthiazate in Soil. Sujie Qin , Jianying Gan , Weiping Liu ,and J. Ole Becker J. Agric. Food Chem., 2004
6. Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: specificity of enhanced microbial degradation. Kenneth D. Racke , Joel R. Coats J. Agric. Food Chem., 1988
7. Enhanced microbial degradation of insecticides in soil. Kenneth David Racke, 1987
8. Microbial degradation of organophosphorus compounds. Brajesh K. Singh , Allan Walker 1 May 2006
9. Pesticides and their behavior in soil and water P.S.C. Rao, R.S. Mansell, L.B. Baldwin, and M.F. Laurent  
Florida Cooperative Extension Service  
Institute of Food and Agricultural Sciences  
University of Florida
10. Potential enhancement of degradation of the nematicides aldicarb, oxamyl and fosthiazate in UK agricultural soils through repeated applications. Osborn RK, Edwards SG, Wilcox A, Haydock PP. Pest Manag Sci. 2010 Mar
11. Influence of soil physicochemical and biological properties on the degradation and adsorption of the nematicide fosthiazate. Pantelelis I, Karpouzas DG, Menkissoglu-Spiroudi U, Tsiropoulos N. J Agric Food Chem. 2006 Sep
12. Mode of action of fosthiazate used for the control of the potato cyst nematode *Globodera pallida* S. R. WOODS\*, P. P. J. HAYDOCK and C. EDMUNDS Article first published online: 28 JUN 2008
13. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation ARTICLE in ENGINEERING IN LIFE SCIENCES · DECEMBER 2005 Maria Gavrilescu
14. [http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/c\\_2.htm#1](http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/c_2.htm#1)
15. [http://www.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/registration/fs\\_PC-129022\\_01-Jan-04.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-129022_01-Jan-04.pdf)
16. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fosthiazate#section=Top>
17. Bioassay for enhanced biodegradation of nematicides in soil A. B. Pattison J. M. Stanton J. A. Cobon 2000-03-01
18. <https://www.iskweb.co.jp/eng/products/pdf/fosthiazate.pdf>
19. Accelerated biodegradation of selected nematicides in tropical crop soils from Costa Rica. Chin-Pampillo JS, Carazo-Rojas E, Pérez-Rojas G, Castro-Gutiérrez V, Rodríguez-Rodríguez CE. Environ Sci Pollut Res Int. 2015 Jan;22
20. Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. Wauchope RD, Yeh S, Linders JB, Kloskowski R, Tanaka K, Rubin B, Katayama A, Kördel W, Gerstl Z, Lane M, Unsworth JB. Pest Manag Sci. 2002 May;58(5):419-45.
21. Evidence for the enhanced biodegradation of ethoprophos and carbofuran in soils from Greece and the UK. Dimitrios G Karpouzas1,\* , Allan Walker1, Robert J Froud-Williams2 and Donald SH Drennan2 Article first published online: 27 AUG 1999

22. Growth-linked and cometabolic biodegradation: Possible reason for occurrence or absence of accelerated pesticide biodegradation. Boakai K. Robertson and Martin Alexander. August 1994
23. Plasmid-Mediated Mineralization of Carbofuran by *Sphingomonas* sp. Strain CF06 XIUHONG FENG,1 LI-TSE OU,2 AND ANDREW OGRAM1 6 January 1997
24. Bacterial Degradation of Chlorpyrifos in Pure Cultures and in Soil K. Mallick, K. Bharati, A. Banerji, N. A. Shakil, N. Sethunathan January 1999
25. Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon. Sørensen SR, Ronen Z, Aamand J. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Dec
26. Simultaneous Degradation of Atrazine and Phenol by *Pseudomonas* sp. Strain ADP: Effects of Toxicity and Adaptation Grit Neumann, Riho Teras, Liis Monson, Maia Kivisaar, Frieder Schauer, and Hermann J. Heipieper, *Appl Environ Microbiol.* 2004 Apr
27. Audus LJ 1951. The biological detoxification of 2,4-D in soil. *Plant Soil* 2: 31-36
28. Microbial Degradation of Organophosphorus Xenobiotics: Metabolic Pathways and Molecular Basis Dimitrios G. Karpouzas, Brajesh K. Singh 2006
29. Accelerated degradation of carbofuran in previously treated field soils in the United Kingdom D.L. Suett 14 October 1985
30. Agronomic and environmental implications of enhanced s-triazine degradation. Jason Krutz L, Shaner DL, Weaver MA, Webb RM, Zablotowicz RM, Reddy KN, Huang Y, Thomson SJ. *Pest Manag Sci.* 2010 May;66(5):461-81. doi: 10.1002/ps.1909.
31. Evidence for the accelerated biodegradation of isoproturon in soils. Cox L., Welsh S., Walker A (1996) *Pesticide Science* 48:253-260
32. Biodegradation and Enhanced Biodegradation: A Reason for Reduced Biological Efficacy of Nematicides. Karpouzas, D.G., and Giannakou, I.O. (2002). *Russian Journal of Nematology* 10: 59-78
33. Reduction in biological efficacy of ethoprophos in a soil from Greece due to enhanced biodegradation: comparing bioassay with laboratory incubation data. Karpouzas, D.G., Giannakou, I.O., Walker, A., and Gowen, S.R. (1999). *Pesticide Science* 55: 1089-1094
34. Interactions of microorganisms and soil during fenamiphos degradation. Ou LT, *Soil Sci Am J* 55:716-722(1991)
35. Enhanced microbial degradation of cadusafos in soils from potato monoculture: Demonstration and characterization. Karpouzas DG, Karanasios E and Menkissoglou-Spiroudi U, *Chemosphere*56: 549-559 (2004)
36. Enhanced biodegradation of aldicarb and its oxidation products in previous treated soils. Suett DL. Jukes A (1988) *Crop Protection* 7:147-152



37. Enhanced microbial degradation implicated in rapid loss of chlorpyrifos from the controlled-release formulation suSCons Blue in soil. Robertson LN, Chandler KJ, Stickley BDA, Cocco RF and Ahmetagic M, *Crop Prot* 17: 29–33(1998)
38. Degradation and adsorption of fosthiazate in soil. Qin S, Gan J, Liu W and Becker JO, *J Agric Food Chem* 52: 6239-6242 (2004)
39. Accelerated transformation of aldicarb, oxamyl and ethoprophos after repeated soil treatments. Smelt, J.H., Crum, S.J.H., Teunissen, W., Leistra, M., 1987. *Crop Protect.* 6, 295–303
40. Reduction in biological efficacy of ethoprophos in a soil from Greece due to enhanced biodegradation: comparing bioassay with laboratory incubation data. Karpouzas, D.G., Giannakou, I.O., Walker, A., Gowen, S.R., 1999b *Pestic. Sci.* 55, 1089–1094
41. Enhanced biodegradation of dicarboxamide fungicides in soil. Walker, A., Welsh, S.J. 1990, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 426, 53–67
42. Non specific influence of pH on microbial adaptation and insecticide persistence in previously treated field soils. Suett, D.L., Jukes, A.A., Parekh, N.R., 1996 *Soil Biol. Biochem.* 28, 1783–1790
43. Degradation of isazofos in the soil environment. Somasundaram, L., Jayachandran, K., Kruger, E.L., Racke, K.D., Moorman, T.B., Dvorak, T., Coats, J.R., 1993. *J. Agric. Food Chem.* 41, 313–318
44. Microbial control of pesticide persistence in soil. Burns, R.G., 1976. In: Beynon, K. (Ed.), *The Persistence of Insecticides and Herbicides*. BCPC Publications, London, pp. 229–239
45. The dissipation of fipronil, chlorpyrifos, fosthiazate and ethoprophos in soils from potato monoculture areas: first evidence for the enhanced biodegradation of fosthiazate. Evangelia S Papadopoulou, Stathis Lagos, Flora Spentza, Evangelos Vidiadakis, Panagiotis A Karas, Tassos Klitsinaris, Dimitrios G Karpouzas, 2015
46. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Ravelo-Pérez LM, Rodríguez-Delgado MA. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Mar