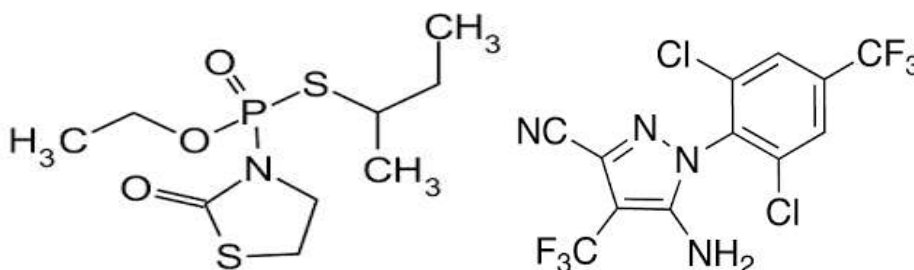


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πτυχιακή Διατριβή

*«Μελέτη της αποικοδόμησης των εντομοκτόνων
εδάφους Fosthiazate και Fipronil σε εδάφη από
περιοχές καλλιέργειας πατάτας στην Ελλάδα»*



ΛΑΓΟΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ

Λάρισα 2015

*«Μελέτη της αποικοδόμησης των εντομοκτόνων
εδάφους Fosthiazate και Fipronil σε εδάφη από
περιοχές καλλιέργειας πατάτας στην Ελλάδα»*

*«Study of the dissipation of soil insecticides Fosthiazate
and Fipronil in soils from potato cultivation areas in
Greece»*

Υπεύθυνος Καθηγητής

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

Τριμελής Επιτροπή :

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την πολύτιμη καθοδήγηση και πολύ σημαντική βοήθεια που μου πρόσφερε στην οργάνωση των πειραμάτων, στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων, στη συγγραφή και στη διόρθωση του κειμένου της πτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην μεταδιδάκτορα Δρ Ε. Παπαδοπούλου και στον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Καρα για την ανυπολόγιστη βοήθεια και συμβολή τους σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας. Ακόμη, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία κατά τη διάρκεια της παραμονής μου σ' αυτό.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την συνεχή υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο προπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Γεωργικά φάρμακα – Περιβαλλοντική Τύχη και Συμπεριφορά	9
1.2 Μικροβιακή αποδόμηση	14
1.3 Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση	17
1.3.1 Σταθερότητα επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης.....	20
1.3.2 Διασταυρωτή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση	21
1.4 Fosthiazate.....	21
1.4.1 Περιβαλλοντική τύχη και αποδόμηση του Fosthiazate.....	23
1.5 Fipronil	24
1.5.1 Περιβαλλοντική τύχη και αποικοδόμηση του Fipronil.....	26
1.6 Σκοπός του πειράματος.....	29
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
2.1 Δείγματα εδαφών.....	30
2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εδαφών.	34
2.2.1 Προσδιορισμός της υγρασίας των εδαφών.....	34
2.2.2 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών.....	35
2.2.3 Προσδιορισμός pH, περιεκτικότητας σε οργανικό C και μηχανικής σύστασης	36
2.2.4 Αποτελέσματα των εδαφολογικών αναλύσεων.....	36
2.3 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και γεωργικά φάρμακα.....	38
2.4 Περιγραφή του πειράματος αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων... 38	
2.4.1 Περιγραφή του πειράματος αποδόμησης του Fosthiazate σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη	39
2.5 Μέθοδοι αποστείρωσης εδάφους.....	40
2.6 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος.....	41
2.6.1 Εκχύλιση Fosthiazate από το έδαφος	41
2.6.2 Εκχύλιση Fipronil από το έδαφος.....	42
2.7 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) 42	
2.7.1 Αρχή και οργανολογία της μεθόδου.....	42
2.7.2 Μέθοδος ανάλυσης HPLC στο σύστημα HPLC Marathon III.....	43
2.1 Επεξεργασία αποτελεσμάτων και υπολογισμός DT50.....	44
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46

3.1	Αποδόμηση Fipronil.....	46
3.1.1	Προσδιορισμός των παραμέτρων κινητικής για την αποδόμηση του Fipronil στα εδάφη που μελετήθηκαν.....	49
3.1.2	Συσχέτιση DT ₅₀ του Fipronil με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν.....	50
3.2	Αποδόμηση Fosthiazate	51
3.2.1	Προσδιορισμός των παραμέτρων κινητικής για την αποδόμηση του Fosthiazate στα εδάφη που μελετήθηκαν	53
3.2.2	Συσχέτιση DT ₅₀ του Fosthiazate με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν	55
3.3	Αποδόμηση Fosthiazate σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη	56
3.3.1	Προσδιορισμός του DT ₅₀ του fosthiazate στα εδάφη που μελετήθηκαν	58
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	59
4.1	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
4.1.1	Fipronil	59
4.1.2	Fosthiazate.....	60
4.1.3	Αποδόμηση του Fosthiazate σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη	61
4.2	Συμπεράσματα-Επίλογος	62
	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος καθορίζεται από φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες. Η βιολογική αποδόμηση αποτελεί την βασικότερη διεργασία απομάκρυνσης των περισσότερων γεωργικών φαρμάκων από το περιβάλλον. Στην ακραία της μορφή η μικροβιακή αποδόμηση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αποτελεσματικότητας των γεωργικών φαρμάκων. Αυτό οφείλεται στη ταχύτατη αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου από τους μικροοργανισμούς του εδάφους που ανέπτυξαν ενζυμικά συστήματα κατάλληλα για την αποδόμηση και την χρήση τους ως πηγές ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση** και εμφανίζεται σε εδάφη ύστερα από την επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του ίδιου γεωργικού φαρμάκου στον ίδιο αγρό επί σειρά ετών.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η **υπολειμματικότητα** του **οργανοφωσφορικού** γεωργικού φαρμάκου **Fosthiazate** και , του πρόσφατα εισαγόμενου στις πατατοκαλλιέργειες ,**φαινυλπυραζολικού** εντομοκτόνου **Fipronil** σε εδάφη από περιοχές καλλιέργειας πατάτας με ή χωρίς ιστορικό χρήσης ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι εκτεταμένο ή όχι το φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης για τα συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα. Συνολικά 17 δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από τις περιοχές Θήβας, Νευροκοπίου και Αρχαγγέλου με διαφορετικό ιστορικό χρήσης για τα εν λόγω γεωργικά φάρμακα και μελετήθηκε η υπολειμματικότητα τους στο εργαστήριο. Εκτός του ιστορικού χρήσης, μελετήθηκε και η επίδραση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών (pH, οργανική ουσία κτλ) στην υπολειμματικότητα των γεωργικών φαρμάκων. Για την εκτίμηση της υπολειμματικότητας προσδιορίστηκε ο χρόνος ημιζωής για τα δύο γεωργικά φάρμακα στα διάφορα εδάφη με την εφαρμογή κατάλληλων μοντέλων κινητικής. Τα **Fipronil** και **Fosthiazate** παρουσίασαν τιμές DT_{50} που κυμάνθηκαν **24,5-116,5** και **1,7-30,8** ημέρες αντίστοιχα. Όσον αφορά το Fipronil τα αποτελέσματα έδειξαν ύπαρξη μικροβιακής αποικοδόμησης του φαρμάκου . Ωστόσο, η πρόσφατη εισαγωγή του Fipronil στην καλλιέργεια της πατάτας δεν επέτρεψε την λήψη εδάφους από περιοχές με ιστορικό μακράς χρήσης . Μελλοντικές μελέτες έπειτα

από συστηματική χρήση του Fipronil στην καλλιέργεια πατάτας θα μας επιτρέψουν να επαναξιολογήσουμε την ευπάθεια του ή μη στην επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση. Επιπλέον η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε κάποια συσχέτιση των των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εδάφους με την υπολειμματικότητα του γεωργικού φαρμάκου . Συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε ούτε όσον αφορά και στην αποδόμηση του Fosthiazate .Η αποδόμηση του Fosthiazate χαρακτηριστικέ σχετικά γρήγορη στα εδάφη που μελετήθηκαν. Ωστόσο το πιο ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι σε δύο δείγματα εδάφους από το Νευροκόπι (N3,N4) παρατηρήθηκε εξαιρετικά γρήγορη αποδόμηση του φαρμάκου με τιμή DT₅₀ μόλις **1,7 ημέρες** , δίνοντας ενδείξεις ύπαρξης επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης. Για αυτό και στη συνέχεια μελετήσαμε την αποδόμηση του Fosthiazate σε αποστειρωμένα (με αποστείρωση στο αυτόκαυστο και καπνισμό με χλωροφόρμιο) και μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από τα N3 και N4 . Τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος επιβεβαίωσαν τη μικροβιακή φύση της αποδόμησης στα συγκεκριμένα εδάφη, ενισχύοντας την υπόθεση **εμφάνισης επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης του Fosthiazate.**

ABSTRACT

The environmental fate of pesticides in soils is determined by physical, chemical and biological processes. Biological degradation is the most important removal process of most pesticides from the environment. In its extreme form the microbial degradation can lead to reduced effectiveness of pesticides. This is due to rapid degradation of the pesticides by soil microorganisms which developed enzymatic systems suitable for degradation of these pesticides and their use as energy sources for growth and development. This phenomenon is called enhanced microbial degradation and appears in soils after repeated application of the same pesticide in the same field for many years. In the present study we examined the persistence of the organophosphate pesticide Fosthiazate and the phenylpyrazole insecticide Fipronil, which is recently introduced in potato cultivation, in soils from areas of potato cultivation with or without a history of use in order to determine whether it is extended or not the phenomenon of enhanced microbial

degradation of these pesticides. A total of 17 soil samples were collected from the areas: Thiva, Nevrokopi and Archangelos with different usage history for these pesticides and their persistence was studied in the laboratory. Besides the history of use, we studied the influence of the physicochemical characteristics of the soil (pH, organic matter, etc.) in the persistence of pesticides. To estimate the persistence in soils the half-life for both pesticides determined in soils by applying appropriate kinetic models. Fipronil and Fosthiazate presented DT_{50} values which ranged 24.5-116.5 and 1.7-30.8 days, respectively. Fipronil results showed existence of microbial degradation of the pesticide. However, the recent introduction of Fipronil in potato cultivation meant that soils from potato cultivated areas with a long history of exposure could not be obtained. Future studies, once Fipronil use in potato cropping has been established, will allow us to reassess its susceptibility to enhanced biodegradation. Furthermore, the statistical analysis showed no correlation between the physicochemical characteristics of soil and the persistence of the pesticide. Correlation was not observed neither in the degradation of Fosthiazate. Degradation of Fosthiazate characterized relatively fast in soils we studied. However the most interesting finding was that in two soil samples from Neurokopi (N3, N4) was noted extremely rapid degradation of the pesticide with a DT_{50} value of 1.7 days, giving indications of existence of enhanced microbial degradation. So then we studied the degradation of Fosthiazate in sterilized (autoclaved and fumigated) and non-sterile soil samples from the N3 and N4 sites. The results of this second experiment confirmed the microbial nature of degradation in these soils, which further supporting our initial hypothesis concerning the development of enhanced biodegradation of Fosthiazate.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γεωργικά φάρμακα – Περιβαλλοντική Τύχη και Συμπεριφορά

Η συνεχόμενη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού που συνεπάγεται την ανάλογη ζήτηση σε τρόφιμα έχει καταστήσει επιτακτική τη χρήση κάθε δυνατού μέσου για την αύξηση παραγωγής των καλλιεργειών γεωργικών προϊόντων. Αυτά τα μέσα συμβάλλουν κυρίως στη βελτίωση μεθόδων καλλιέργειας, στην αύξηση της γονιμότητας των εδαφών, και στην βελτίωση της φυτοπροστασίας.

Η γεωργική παραγωγή υφίσταται σημαντικές απώλειες από ένα πλήθος εχθρών (έντομα, μικροοργανισμοί και ζιζάνια). Για την προστασία της γεωργικής παραγωγής λαμβάνονται μια σειρά μέτρων ελέγχου και καταπολέμησης των εχθρών και ασθενειών τα οποία διακρίνονται σε καλλιεργητικά και χημικά. Κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση ή τη μείωση κάθε παρασίτου ή ζιζανίου καλείται γεωργικό φάρμακο ή φυτοφάρμακο ή αλλιώς φυτοπροστατευτικό.

Τα γεωργικά φάρμακα όταν χρησιμοποιούνται σύμφωνα με την ετικέτα, συμβάλλουν στη αύξηση της αγροτικής παραγωγής και στη βελτίωση της ποιότητας των αγροτικών προϊόντων, αφού καταστρέφουν τους βλαβερούς οργανισμούς που εμποδίζουν την ανάπτυξη των φυτών ή τους μικροοργανισμούς που μολύνουν τα προϊόντα και καταστρέφουν πολλές φορές ολόκληρη την παραγωγή (Μπέλου 2008). Τα πλεονεκτήματα των γεωργικών φαρμάκων έναντι άλλων φυτοπροστατευτικών μεθόδων είναι ότι παρουσιάζουν ευκολία στην εφαρμογή, έχουν ευρύ φάσμα εφαρμογών, σύντομο χρόνο δράσης και σχετικά χαμηλό κόστος. Στόχος της φυτοπροστασίας είναι η χρήση χημικών ενώσεων όσο το δυνατόν πιο φιλικών προς το περιβάλλον σε συνδυασμό με την μέγιστη δυνατή δράση και αποτελεσματικότητα (Λύκας, 2009).

Ο ρόλος των γεωργικών φαρμάκων επιγραμματικά είναι να:

- προστατέψουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδος επιβλαβείς οργανισμούς ή να προλάβουν τη δράση τους

- διατηρούν τα φυτικά προϊόντα
- καταστρέφουν τα ανεπιθύμητα φυτά
- καταστρέφουν μέρη των φυτών, να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξή τους.

Τα γεωργικά φάρμακα διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το είδος του εχθρού που καταπολεμούν, τον τρόπο δράσης τους, την τοξικότητα τους, τη χημική δομή τους και τον τρόπο παρασκευής-σύνθεσης τους. Ανάλογα με το είδος του εχθρού ταξινομούνται σε ακαρεοκτόνα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και νηματωδοκτόνα. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους (ικανότητα κίνησης μέσα στα φυτά) διακρίνονται σε επαφής (παραμένουν στην επιφάνεια του φυτού) ή διασυστημικά (εισέρχονται και κυκλοφορούν μέσα στους φυτικούς ιστούς) (Τσοχατζής 2012). Επίσης τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να είναι συνθετικές χημικές ενώσεις (ανόργανες και οργανικές) δηλαδή προϊόντα χημικής σύνθεσης στο εργαστήριο ή φυσικής προέλευσης (βιολογικά γεωργικά φάρμακα-biopesticides) δηλαδή προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού φυτών, μικροοργανισμών και εντόμων (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007). Με βάση την χημική τους δομή τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να διαχωριστούν στις παρακάτω βασικές ομάδες:

1. Οργανοχλωριωμένα
2. Οργανοφωσφορικά
3. Πυρεθρινοειδή
4. Καρβαμιδικά
5. Νεονικοτινοειδή
6. Διθειοκαρβαμιδικά
7. Αζόλες
8. Παράγωγα ουρίας
9. Φαινυλαμίδια
10. Τριαζίνες
11. Ανιλινοπυριμιδίνες
12. Ανιλιδοπυριμιδίνες

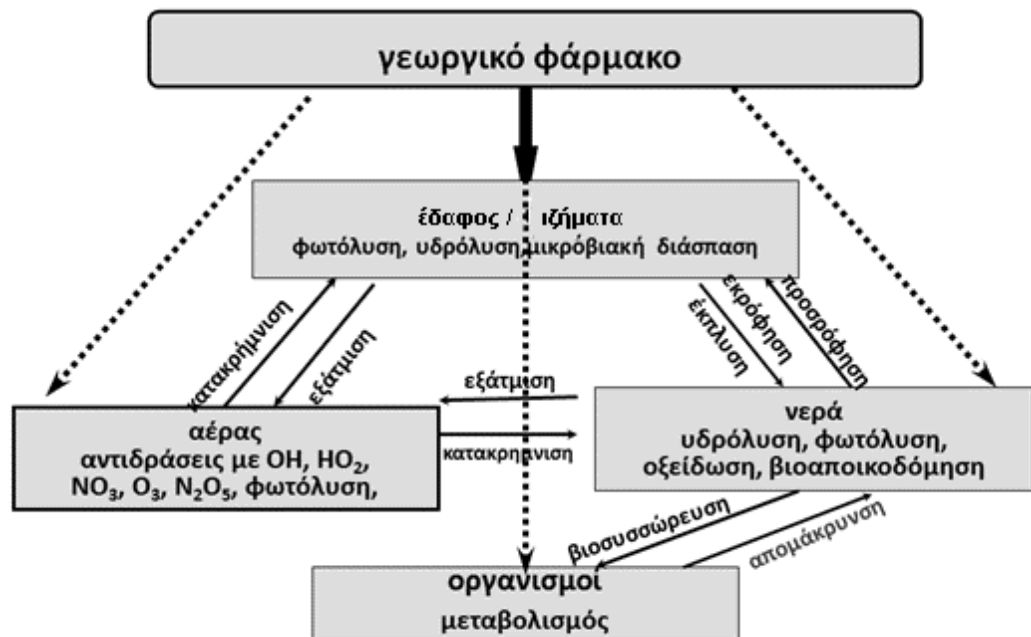
Τα τελευταία χρόνια, η χρήση γεωργικών φαρμάκων έχει αυξήσει σημαντικά την ποσότητα και έχει βελτιώσει την ποιότητα της τροφής για τον αυξανόμενο παγκόσμιο πληθυσμό, παράλληλα όμως, έχει σημειώσει αύξηση των δυσμενών επιπτώσεων σε οργανισμούς μη – στόχους, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Επίσης η εκτεταμένη και μη ορθή χρήση των γεωργικών φαρμάκων έχει αποδειχθεί

ότι δημιουργεί κινδύνους ρύπανσης και υποβάθμισης του περιβάλλοντος. Με βάση μελέτη του O.H.E., εκτιμάται ότι από τη συνολική ποσότητα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται για αγροτικούς σκοπούς μόνο το 1% φτάνει τελικά, στο καλλιεργούμενο φυτό, ενώ το υπόλοιπο καταλήγει και ρυπαίνει το περιβάλλον, δηλαδή το έδαφος, τον αέρα και κυρίως το νερό (Malato et al., 2001). Στην Εικόνα 1 φαίνονται επιγραμματικά οι διεργασίες αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον.

Υπάρχουν δύο κύριες οδοί μέσω των οποίων τα γεωργικά φάρμακα εισέρχονται στο έδαφος: μετακίνηση του ψεκαστικού νέφους στο έδαφος ύστερα από διαφυλλική εφαρμογή (Rial-Otero et al, 2003) και απευθείας εφαρμογή στο έδαφος για καταπολέμηση οργανισμών φυτικών εχθρών που διαβιούν στο έδαφος (Lopez- Perez et al, 2006).

Μετά την εισροή των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος είναι απαραίτητη η εκτίμηση της υπολειμματικότητας τους (Arias-Estevéz et al, 2005 α, β, Lopez-Blanco et al, 2005) που καθορίζεται από βασικές διεργασίες όπως είναι η προσρόφηση – εκρόφηση στα εδαφικά κolloειδή και η βιολογική ή αβιοτική αποδόμηση τους. Κατά τη μελέτη των ζητημάτων αυτών, ιδιαίτερα σε πειράματα στον αγρό, είναι απαραίτητη η χρήση κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών που επιτρέπουν την χωρίς παρεμβολές και ακριβής ποσοτικοποίηση τους (Rial-Otero et al, 2004).

Η περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος διέπεται από μια ποικιλία πολύπλοκων δυναμικών φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών, που ελέγχουν άμεσα τη μεταφορά των γεωργικών φαρμάκων εντός του εδάφους και τη μεταφορά τους από το έδαφος στο νερό ή στο φαγητό. Αυτές είναι η βιολογική και χημική αποδόμηση, η προσρόφηση-εκρόφηση, η επιφανειακή απορροή, η έκπλυση και η πρόσληψη από τα φυτά. Η σχετική σημασία αυτών των διαδικασιών ποικίλλει ανάλογα με τη χημική φύση των γεωργικών φαρμάκων και τις ιδιότητες του εδάφους, αλλά δύο διεργασίες είναι αυτές που έχουν καθοριστικό ρόλο: η αποδόμηση και η προσρόφηση (Linn et al, 1993).



Εικόνα 1 Σχηματική αναπαράσταση των διεργασιών αποδόμησης γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον

Βιολογική αποδόμηση: Είναι θεμελιώδους σημασίας για την μείωση των επιπέδων των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος (Guo et al, 2000). Κατά τη βιολογική αποδόμηση προκαλείται διάσπαση, αποσύνθεση και αδρανοποίηση του γεωργικού φαρμάκου από μικροοργανισμούς που αποτελούν τους κύριους αποδομητές των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον. Σημαντικές βιοχημικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη βιολογική αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων είναι οι απαλκυλίωση, απαλογόνωση, οξείδωση ή αναγωγή, υδρόλυση και υδροξυλίωση (Λύκας 2009).

Χημική αποδόμηση: Είναι η διάσπαση ενός γεωργικού φαρμάκου αποκλειστικά με χημικές αντιδράσεις παρουσία (αερόβιες συνθήκες) ή απουσία (αναερόβιες συνθήκες) οξυγόνου. Τέτοιες αντιδράσεις είναι υδρόλυση και οξειδοαναγωγή. Καθοριστικός παράγοντας είναι το pH και η διαθεσιμότητα του γεωργικού φαρμάκου στο περιβάλλον (νερό, έδαφος, υπέδαφος)(Δ.Θ. Λύκας, 2009).

Φωτοαποδόμηση – Φωτόλυση: Είναι η έμμεση ή άμεση διάσπαση ενός γεωργικού φαρμάκου στην ατμόσφαιρα (έδαφος, νερό ή στα φυτά) από τη δράση του φωτός, εξαιτίας απορρόφησης ηλιακής ενέργειας, μήκους κύματος (λ) από 290 έως 400 nm (Δ.Θ. Λύκας, 2009).

Προσρόφηση: Είναι η προσέλκυση και η συγκράτηση των μορίων του γεωργικού φαρμάκου από την επιφάνεια των κολλοειδών του εδάφους (ανόργανων ή οργανικών) ή άλλων συστατικών. Παίζει θεμελιώδη ρόλο στη δυναμική μεταφορά, την εμμόνη, τη μετατροπή και τη βιοσυσσώρευση των γεωργικών φαρμάκων (De Jonge et al, 1996). Η προσρόφηση εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε οργανική ύλη του εδάφους (Spark and Swift, 2002, Coquet, 2003). Η μοριακή φύση της οργανικής ύλης του εδάφους έχει αποδειχθεί ότι είναι το κλειδί για τον προσδιορισμό προσρόφησης μη ιοντικών γεωργικών φαρμάκων (Ahmad et al, 2006). Άλλοι Παράγοντες που επηρεάζουν την προσρόφηση των γεωργικών φαρμάκων είναι το είδος των ανόργανων κολλοειδών, το pH του εδάφους, η υγρασία και η θερμοκρασία του εδάφους (Δ.Θ. Λύκας, 2009). Η πιο σημαντική ιδιότητα ενός γεωργικού φαρμάκου που επηρεάζει τη μετακίνησή του και καθορίζει κατά κάποιον τρόπο την τύχη του στο περιβάλλον είναι η υδατοδιαλυτότητα του. Όταν ένα γεωργικό φάρμακο βρεθεί στο έδαφος ένα μέρος αυτού θα προσροφηθεί στα κολλοειδή σωματίδια του εδάφους μέσω της προσρόφησης (absorption) και ένα μέρος θα διαλυθεί στο εδαφικό διάλυμα του εδάφους. Καθώς όλο και περισσότερο νερό εισέρχεται στο έδαφος μέσω της βροχής ή της άρδευσης, το προσροφημένο στα κολλοειδή του εδάφους γεωργικό φάρμακο ελευθερώνεται από την επιφάνεια των εδαφικών κολλοειδών και επαναδιαλύεται στο εδαφικό διάλυμα με μια διαδικασία που ονομάζεται εκρόφηση (desorption). Η διαλυτότητα ενός γεωργικού φαρμάκου και η προσρόφηση του στο έδαφος σχετίζονται αντιστρόφως, δηλαδή υψηλή υδατοδιαλυτότητα οδηγεί σε χαμηλότερη προσρόφηση (Rao and Hornsby, 2001).

Έκπλυση (Leaching): Η έκπλυση είναι η διεργασία εκείνη κατά την οποία ένα γεωργικό φάρμακο, το οποίο βρίσκεται διαλυτοποιημένο στο εδαφικό διάλυμα, μπορεί να μετακινηθεί με το νερό προς τα βαθύτερα στρώματα και να καταλήξει στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα. Παράγοντες που επηρεάζουν την έκπλυση σχετίζονται κυρίως με το έδαφος (π.χ. φυσικοχημική σύσταση εδάφους, φυσικοχημικές ιδιότητες εδάφους) αλλά και μη εδαφικούς παράγοντες (π.χ. κλιματολογικές συνθήκες, τρόπος εφαρμογής, καλλιεργητικές πρακτικές, φυσικοχημικές ιδιότητες γεωργικού φαρμάκου)

Επιφανειακή απορροή (Run-off): Τα γεωργικά φάρμακα, που εφαρμόζονται στα φυτά ή στο έδαφος, μπορούν να μετακινηθούν επιφανειακά με το νερό της άρδευσης ή της βροχής και η διαδικασία αυτή ονομάζεται επιφανειακή απορροή. Σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την πιθανότητα επιφανειακής απορροής είναι η δυνατότητα προσρόφησης των γεωργικών φαρμάκων στα εδαφικά κολλοειδή. Παράγοντες που επηρεάζουν την επιφανειακή απορροή είναι: η υδατοδιαλυτότητα του γεωργικού φαρμάκου και η μορφή του σκευάσματος με το οποίο εφαρμόζεται, η υπολειμματικότητα του γεωργικού φαρμάκου η προσρόφηση, η πρόσληψη από τα φυτά, η κλίση του εδάφους και οι καιρικές συνθήκες (Δ.Θ. Λύκας, 2009). Για παράδειγμα ισχυρές βροχοπτώσεις με ύψος που ξεπερνά την απορροφητική ικανότητα του εδάφους οδηγούν σε επιφανειακή απορροή του νερού και έτσι ευνοούν και την επιφανειακή απορροή υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων που βρίσκονται στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους.

1.2 Μικροβιακή αποδόμηση

Μικροβιακή αποδόμηση ή βιοαποδόμηση (biodegradation ή biotransformation) ονομάζεται η διάσπαση οργανικών ουσιών σε μικρότερα μόρια μέσω της δράσης ενζύμων που παράγονται από μικροοργανισμούς. Στην διάρκεια της μικροβιακής αποδόμησης σύνθετα οργανικά μόρια μετατρέπονται σε πιο απλά ή τοξικές ουσίες σε λιγότερο ή μη-τοξικές, είτε υπό αερόβιες συνθήκες (παρουσίας οξυγόνου) είτε υπό αναερόβιες συνθήκες (απουσίας οξυγόνου). Οι πιο πολλοί μικροοργανισμοί, που κατοικούν στο έδαφος, όπου το οξυγόνο είναι άφθονο αποδομούν τα γεωργικά φάρμακα μέσω του αερόβιου μεταβολισμού τους. Όταν ένα γεωργικό φάρμακο υφίσταται πλήρη αερόβιο μεταβολισμό, ανοργανοποιείται και μετατρέπεται πλήρως σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Υπό αναερόβιες συνθήκες, η αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή άλλων τελικών προϊόντων όπως το μεθάνιο.

Η διάσπαση των οργανικών ουσιών που πραγματοποιείται από τους μικροοργανισμούς έχει ως σκοπό την επιβίωση και την αύξηση τους. Σε ένα μικροβιακό κύτταρο λαμβάνουν χώρα δύο βασικές κατηγορίες μεταβολικών αντιδράσεων, ο αναβολισμός και ο καταβολισμός. Οι διεργασίες του αναβολισμού

οδηγούν στην παραγωγή βιομάζας, δηλαδή ανάπτυξη του μικροοργανισμού, και απαιτούν την ύπαρξη πηγής άνθρακα. Από την άλλη μεριά οι καταβολικές αντιδράσεις οδηγούν στην παραγωγή ενέργειας που είναι απαραίτητη για τη διατήρηση και ανάπτυξη των οργανισμών, απαιτούν δηλαδή μια πηγή ενέργειας.

Τα γεωργικά φάρμακα χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς σαν πηγή άνθρακα και ενέργειας ταυτόχρονα. Η εξασφάλιση ενέργειας γίνεται μέσω οξείδωσης των γεωργικών φαρμάκων διαμέσου μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, στην οποία ο ρύπος είναι το αναγωγικό σώμα το δε ρόλο του οξειδωτικού έχουν διάφορες ενώσεις, ανάλογα με τον τύπο της διαδικασίας του μεταβολισμού:

Αερόβια αναπνοή είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει το μεταβολισμό ενώσεων όταν δέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο (O₂). Πολυάριθμοι μικροοργανισμοί ακολουθούν αυτό το είδος μεταβολισμού και οι περισσότερες μέθοδοι βιοαποκατάστασης αξιοποιούν αυτή τη συγκεκριμένη κατηγορία μεταβολισμού.

Υπάρχει εντούτοις μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών που επιβιώνουν και αναπτύσσονται κάτω από αναερόβιες συνθήκες χρησιμοποιώντας σαν δέκτη ηλεκτρονίων διάφορες άλλες ανόργανες ή οργανικές ενώσεις διαφορετικές από το οξυγόνο. Αυτός ο τύπος μεταβολισμού χαρακτηρίζεται σαν αναερόβια αναπνοή. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι δέκτες ηλεκτρονίων κάτω από αναερόβιες συνθήκες είναι τα νιτρικά και τα θειικά ιόντα, διαλυτά συστατικά στα υπόγεια νερά, καθώς και ο τρισθενής σίδηρος, και το τετραθενές μαγγάνιο, που αποτελούν συστατικά των στερεών σωματιδίων του εδάφους συνήθως στη μορφή οξειδίων.

Ένας άλλος τύπος μεταβολισμού που μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο σε ισχυρά αναερόβιες συνθήκες είναι η ζύμωση. Κατά τη ζύμωση δεν απαιτείται εξωτερική προσθήκη ενός δέκτη ηλεκτρονίων, διότι το γεωργικό φάρμακο χρησιμοποιείται ταυτόχρονα σαν δότης και σαν δέκτης ηλεκτρονίων. Η βιοαποδόμηση λαμβάνει χώρα κυρίως με αερόβιους μικροοργανισμούς. Όταν το οξυγόνο εξαντλείται αλλά το οξειδοαναγωγικό δυναμικό παραμένει σχετικά υψηλό, η βιοδιάσπαση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της μεταβολικής δραστηριότητας νιτροαναγωγικών βακτηρίων. Τα οξείδια του σιδήρου του εδάφους μπορούν να δράσουν σαν δέκτες ηλεκτρονίων σε μια ευρεία κλίμακα τιμών οξειδοαναγωγικού

δυναμικού, αλλά έχουν σχετικά περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα ανάλογα με την κρυσταλλικότητά τους. Τέλος τα θειοαναγωγικά και τα μεθανογόνα βακτήρια είναι δραστικά μόνον κάτω από έντονα αναγωγικές συνθήκες (Κυο, 1999).

Η ύπαρξη και η ένταση του φαινομένου της μικροβιακής αποδόμησης επηρεάζονται τόσο από το μέσο στο οποίο γίνεται η αποδόμηση (έδαφος) όσο και από τους μικροοργανισμούς-αποδομητές και σε πολλές περιπτώσεις οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν (Simon et al., 1992). Στο έδαφος η μικροβιακή διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων γίνεται από διάφορες ομάδες μικροοργανισμών όπως μύκητες, βακτήρια, ακτινοβακτήρια και άλγη (Levanon, 1993). Η αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου μπορεί να πραγματοποιηθεί με την δράση ενός μικροοργανισμού ή συχνότερα ομάδας (consortia) μικροοργανισμών (Aislabie and Lloyd-Jones, 1995).

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί του εδάφους αναπτύσσονται σε λεπτά στρώματα που περιβάλλουν τα κολλοειδή του εδάφους και χαρακτηρίζονται ως βιοστρώματα. Ταχύτερη μικροβιακή αποδόμηση παρατηρείται σε περιοχές στις οποίες επικρατούν συνθήκες υψηλής υγρασίας και θερμοκρασίας (Torpp et al., 1995). Υψηλότεροι μικροβιακοί πληθυσμοί και επομένως υψηλότερη μικροβιακή δραστηριότητα παρατηρείται στα επιφανειακά εδαφικά στρώματα με αποτέλεσμα ταχύτερη αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων να πραγματοποιείται στο επιφανειακό έδαφος (Accineli et al 2001). Αντίθετα οι ολιγοτροφικές συνθήκες που επικρατούν στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα έχουν ως αποτέλεσμα να υπάρχουν μικρότεροι μικροβιακοί πληθυσμοί με χαμηλότερη δραστηριότητα και επομένως να παρατηρούνται βραδύτεροι ρυθμοί αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων. Όπως όλοι οι κανόνες έχουν τις εξαιρέσεις τους, έτσι και σε αυτήν την περίπτωση έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περιπτώσεις όπου ο ρυθμός αποδόμησης συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα είναι ο ίδιος ή και υψηλότερος σε σύγκριση με το αντίστοιχο επιφανειακό έδαφος (Di et al., 1998).

Για να πραγματοποιηθεί η αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου, οι μικροοργανισμοί του εδάφους ή τα καταβολικά ένζυμα που παράγουν πρέπει να έρθουν σε επαφή με την ουσία και στη συνέχεια αυτή ή τα προϊόντα του μεταβολισμού της να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου (Aislabie and Lloyd-

Jones, 1995). Η πλήρης αποδόμηση ενός οργανικού μορίου είναι συνήθως προϊόν μικροβιακής αποδόμησης. Μέσω της διαδικασίας αυτής οι μικροοργανισμοί αυξάνουν τη βιομάζα τους χρησιμοποιώντας τον άνθρακα των οργανικών ενώσεων ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Με τον τρόπο αυτό αυξάνουν τους πληθυσμούς τους σε αριθμό και μέγεθος. Η μελέτη και απομόνωση μικροοργανισμών υπεύθυνων για την αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούν αυτά ως πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους έδειξε ότι αυτά συνήθως είναι βακτήρια, μύκητες και ακτινοβακτήρια (Suett et al., 1996). Η μικροβιακή διάσπαση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε άμεσα διαμέσου μεταβολικών διεργασιών, όπως ανοργανοποίηση, συμματαβολισμός, πολυμερισμός, συμπλοκοποίηση και συσσώρευση, είτε έμμεσα μέσα από επιδράσεις της μικροβιακής δραστηριότητας που μεταβάλουν το pH και ενεργοποιούν νέες οξειδοαναγωγικές διεργασίες (Bollag & Liu 1990, Kookana et al., 1998).

1.3 Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση

Πριν από την αποδόμηση πολλών οργανικών ενώσεων, υπάρχει μια χρονική περίοδος κατά τη διάρκεια της οποίας, παρατηρείται μηδαμινή απομάκρυνση της χημικής ουσίας. Αυτή η φάση, που αναφέρεται και ως φάση υστέρησης (lag phase) υποδεικνύει μια περίοδο εγκλιματισμού ή προσαρμογής των μικροοργανισμών στην χημική δομή της ουσίας στην οποία εκτέθηκαν.

Η διάρκεια της φάσης υστέρησης ή προσαρμογής ποικίλλει και κυμαίνεται από μια ώρα ως και μήνες και να διαφοροποιείται μεταξύ των χημικών ουσιών και του περιβάλλοντος. Επιπλέον, επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η θερμοκρασία ασκεί σημαντική επίδραση στη διάρκεια της περιόδου προσαρμογής πριν από την ενεργό φάση. Επίσης, το pH και ο αερισμός ενός περιβάλλοντος παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάρκεια της φάσης προσαρμογής. Η συγκέντρωση του N, του P ή και τα δύο μαζί είναι σημαντική καθώς σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να περιορίσουν τη μικροβιακή αύξηση. Είναι δυνατόν οι μικροοργανισμοί να χρησιμοποιούν το ανόργανο φωσφορικό άλας ή το N, από το περιβάλλον αντί αυτών που προέρχονται από το γεωργικό φάρμακο. (Alexander, 1999).

Με την πάροδο του χρόνου έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα γεωργικά φάρμακα χάνουν την αποτελεσματικότητά τους. Η μείωση αυτή της αποτελεσματικότητας έχει αποδοθεί είτε στην επικράτηση ανθεκτικών στελεχών εντόμων, μυκήτων ή βιοτύπων φυτών ή (ειδικότερα για τα γεωργικά φάρμακα που εφαρμόζονται στο έδαφος) στη ταχύτατη αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου από τους μικροοργανισμούς του εδάφους που ανέπτυξαν κατά την διάρκεια της φάσης προσαρμογής ενζυμικά συστήματα κατάλληλα για την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση και προκύπτει για ορισμένες ομάδες γεωργικών φαρμάκων ύστερα από την επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου γεωργικού φαρμάκου στον ίδιο αγρό επί σειρά ετών (Alexander, 1999).

Η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση μπορεί να εμφανιστεί μετά από μια μόνο εφαρμογή ή μετά από πολυετής εφαρμογές και είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ γεωργικών φαρμάκων και μικροοργανισμών (Racke & Coats, 1988). Επίσης μπορεί να συμβεί από την συνεργιστική δράση δύο ή περισσότερων μικροοργανισμών (Read, 1986a). Η εμφάνιση της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων προϋποθέτει την ύπαρξη ενός μικροβιακού πληθυσμού ικανού να χρησιμοποιήσει το γεωργικό φάρμακο σαν πηγή θρεπτικών συστατικών με σκοπό την αύξηση και ανάπτυξή του. (Felsot and Shelton, 1993)

Η μικροβιακή κοινότητα για να αποδομήσει μια συγκεκριμένη χημική ουσία στο έδαφος θα πρέπει να εμφανίσει α) μια αύξηση στη δραστηριότητα αποδόμησης ενός περιορισμένου αριθμού μικροοργανισμών λόγω, της εκλεκτικής έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν καταβολικά ένζυμα, β) μια αύξηση στον αριθμό των βιοαποδομητών λόγω, της μικροβιακής αύξησης γ) τη μετακίνηση άλλων ικανών μικροοργανισμών εξαιτίας της αποδόμησης στην περιοχή της εφαρμογής και δ) τη εξελικτική εμφάνιση νέων καταβολικών ενζύμων για τη χρήση της χημικής ουσίας ως πηγή ενέργειας. Έχει αποδειχθεί ότι τα βακτήρια είναι οι κυρίαρχοι παράγοντες της επιταχυνόμενης αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων ενώ, οι μύκητες έχουν περιορισμένο ρόλο στο φαινόμενο αυτό.

Το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης είναι αποτέλεσμα της σταδιακής μικροβιακής προσαρμογής στο εφαρμοζόμενο γεωργικό φάρμακο και

στην ακραία του μορφή οδηγεί συνήθως σε σημαντική μείωση στην αποτελεσματικότητα του (Karpouzas & Walker, 2000b). Αποτέλεσμα της επιταχυνόμενης αποδόμησης είναι η αποτυχία του γεωργικού φαρμάκου να περιορίσει αποτελεσματικά τους εχθρούς-στόχους λόγω της μεγάλης μείωσης της παραμονής της στο έδαφος. Η επιταχυνόμενη αποδόμηση είχε αρχικά θεωρηθεί ως ευεργετική διεργασία που οδηγεί στην ταχύτατη μείωση των ανεπιθύμητων υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων που εφαρμόζονται στο έδαφος και συνεπώς μείωνε την πιθανότητα μετακίνησής τους στα υπόγεια και επιφανειακά νερά (Felsot, 1989) . Παρόλα αυτά τα φαινόμενο αυτό μπορεί να επιφέρει οικονομικές απώλειες στους καλλιεργητές, αφού μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητας ορισμένων γεωργικών φαρμάκων λόγω της ταχύτατης μείωσης της συγκέντρωσής τους σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που απαιτούνται για τον έλεγχο των οργανισμών- στόχων (Torpp et al., 1995).

Το ποσοστό αποδόμησης και η έκταση της μικροβιακής αύξησης κατά τη διάρκεια της αποδόμησης επηρεάζονται από τη δομή του γεωργικού φαρμάκου. Συνήθως, γεωργικά φάρμακα με απλές χημικές δομές που χαρακτηρίζονται από υψηλή διαλυτότητα και χαμηλή ικανότητα προσρόφησης μπορούν εύκολα να υποστηρίξουν τη μικροβιακή αύξηση και εμφανίζουν πιο γρήγορα προβλήματα επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης. Γεωργικά φάρμακα που χαρακτηρίζονται από χημικές δομές που εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με φυσικές ουσίες που απαντούν οι μικροοργανισμοί στο φυσικό τους περιβάλλον όπως το έδαφος αποδομούνται ευκολότερα από τις περισσότερες μικροβιακές κοινότητες αμέσως μετά από την εισαγωγή τους στο περιβάλλον. Αντίθετα, τα γεωργικά φάρμακα με δομή διαφορετική από τις περισσότερες φυσικές ουσίες (ξενοβιοτικές ενώσεις) αποδομούνται αργά λόγω του γεγονότος ότι, οι μικροοργανισμοί δεν κατέχουν εξαρχής ενζυμικά συστήματα για την αποδόμηση των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων. Τέτοια γεωργικά φάρμακα εμφανίζουν γενικότερα ανθεκτικότητα στην μικροβιακή αποδόμηση και συνήθως δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στην επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση (Arbeli & Fuentes, 2007).

Τα χαρακτηριστικά του εδάφους όπως δομή, θρεπτική κατάσταση, οργανική ουσία και pH αποτελούν παραμέτρους, με σημαντικές επιδράσεις στον ρυθμό αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων. Μεταβολή σε ένα από τα χαρακτηριστικά του εδάφους μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη διαθεσιμότητα ή την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων συχνά με εντελώς διαφορετικό τρόπο (Walker & Roberts, 1993). Από τους εδαφικούς παράγοντες το pH και η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία επηρεάζουν κυρίως την εμφάνιση και ανάπτυξη της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης.

Ακόμη και μικρές αλλαγές στο pH επιφέρουν σημαντικές μεταβολές στη σύνθεση και δραστηριότητα της μικροβιακής κοινότητας. Στα αλκαλικά εδάφη ευνοείται η εμφάνιση του φαινομένου, είτε άμεσα με επίδραση στη χημική σταθερότητα της φυτοπροστατευτικής ουσίας είτε έμμεσα με επίδραση στη σύνθεση και δραστηριότητα της μικροβιακής κοινότητας (Suett et al., 1996).

Αύξηση της περιεκτικότητας του εδάφους σε οργανική ουσία συνεπάγεται αύξηση της προσρόφησης των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος με αποτέλεσμα τη μείωση της διαθεσιμότητάς τους για αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς του εδάφους.

1.3.1 Σταθερότητα επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης

Η σταθερότητα ή εμμονή του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης από την στιγμή που θα παρατηρηθεί σε ένα έδαφος μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών εδαφών και μεταξύ διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων. Η χρονική στιγμή, στην οποία ένα έδαφος που εμφανίζει πρόβλημα επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης μπορεί ξανά να δεχθεί με ασφάλεια εφαρμογή με το ίδιο γεωργικό φάρμακο εξαρτάται από τη δόση και συχνότητα εφαρμογής, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας και την ικανότητα των μικροοργανισμών να χρησιμοποιούν την ουσία σαν πηγή ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών (Anderson et al., 1998). Σημαντικές διαφορές στην εμμονή του φαινομένου έχουν καταγραφεί μεταξύ οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών νηματωδοκτόνων (Chapman & Harris, 1990)

1.3.2 Διασταυρωτή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση

Διασταυρωτή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ένα γεωργικό φάρμακο αποδομείται ταχύτατα σε έδαφος στο οποίο δεν έχει καταγραφεί προηγούμενη χρήση του, αλλά το έδαφος έχει εκτεθεί σε κάποιο άλλο γεωργικό φάρμακο με παρόμοια χημική δομή. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει καταγραφεί ότι η αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου μπορεί να γίνεται ευκολότερα μετά από εφαρμογή στο έδαφος διαφορετικού, αλλά της ίδιας χημικής ομάδας, γεωργικού φαρμάκου, παρά ύστερα από εφαρμογή του ίδιου του γεωργικού φαρμάκου που μελετούμε (Arbeli and Fuentes, 2007).

1.4 Fosthiazate

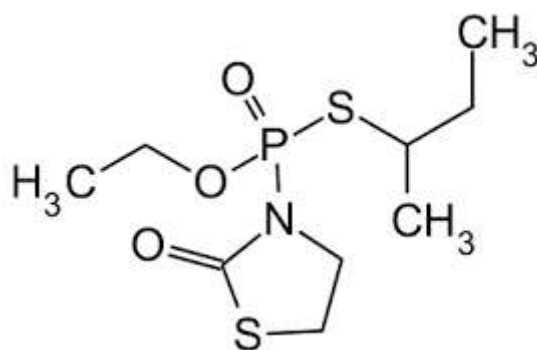
Το Fosthiazate (3-[butan-2-ylsulfanyl(ethoxy)phosphoryl]-1,3-thiazolidin-2-one) είναι ένα οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο. Ανήκει στην φωσφοροθειοϊκή (ονομάζεται επίσης και θειοφωσφορικό) ομάδα, που περιλαμβάνει οργανοφωσφορικές ενώσεις που περιέχουν την δομή P=S. Ο χημικός τύπος του Fosthiazate δίνεται στην Εικόνα 2. Η εφαρμογή του στο έδαφος γίνεται μέσω παρασκευασμάτων, τόσο με μορφή κόκκων όσο και υγρών γαλακτωμάτων, όπως το Nemathorin®. Η δράση του σε οργανισμούς-στόχους δηλαδή έντομα και νηματώδεις προκαλεί παρόμοιες επιδράσεις με τα άλλα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα δρώντας στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων αναστέλλοντας την λειτουργία της ακετυλοχολίνεστεράσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της ακετυλοχολίνης στις συνάψεις, υπερδιέγερση του κεντρικού νευρικού συστήματος του εντόμου (Manahan, 1992). Αυτή η αναστολή προκαλεί σπασμούς, παράλυση και τελικά θάνατο για τα έντομα και θηλαστικά (Ragnarsdottir, 2000). Το Fosthiazate κατηγοριοποιείται ως χημική ένωση μέτριας τοξικότητας για τα θηλαστικά. Δεν θεωρείται επιβλαβές για τον άνθρωπο εφόσον χρησιμοποιείται σύμφωνα με την εγκεκριμένη γεωργική πρακτική (τοξικότητα παρατηρείται κυρίως μετά από δερματική επαφή). Επίσης δεν έχει σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον, ωστόσο παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα για τα πουλιά αλλά και κατά την απελευθέρωση του σε υδάτινα οικοσυστήματα κυρίως σε ασπόνδυλα του γλυκού

νερού (United states environment agency EPA , European Commision Health & Consumer Protection Directorate-General) .

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση το Fosthiazate έχει εγκριθεί για χρήση ως νηματωδοκτόνο από το 2004 ενώ από το 2011 έχει εγκριθεί η χρήση του ως εντομοκτόνο . Στην Ελλάδα και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες χρησιμοποιείται κυρίως στην καταπολέμηση των νηματωδών της ρίζας (*Meloidogyne spp.*) σε καλλιέργειες θερμοκηπίου , όπως επίσης και των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας (*Globodera rostochiensis* και *Globodera pallida*) σε πατατοκαλλιέργειες . επίσης στα πλαίσια των εντομοκτόνων ιδιοτήτων του , το Fosthiazate ελαττώνει την προσβολή των βολβών της πατάτας από σιδηροσκώληκες (*Agriotes spp.*) .

Πέρα από τις πατατοκαλλιέργειες , το Fosthiazate είναι αρκετά αποτελεσματικό στην καταπολέμηση των νηματοδοκτώνων και σε άλλες καλλιέργειες (ντομάτα , καπνός , αγγούρι) .

Όσον αφορά τις φυσικοχημικές του ιδιότητες , το Fosthiazate σε κανονικές συνθήκες (25°C , 1 atm) βρίσκεται σε υγρή κατάσταση έχοντας ένα ελαφρύ κίτρινο χρώμα και σημείο βρασμού τους **198°C** . Η σχετική του πυκνότητα είναι **1.234 kg/m³** . Η διαλυτότητα του στο νερό είναι **9.85 g/L** και **15,14 g/L** σε n-εξάνιο . Είναι επίσης διαλυτό σε μέθυλο-2-πυρολιδινόνη (NMP), ισοπροπυλική αλκοόλη και ξυλένιο. Τέλος έχει μεγάλη υδρολυτική σταθερότητα (DT₅₀) σε pH 5 (163-191 days) και 7 (102-107 days) ενώ υδρολύεται ταχύτατα σε pH 9 (3.2 - 3.3 days) .



Εικόνα 2 Ο χημικός τύπος του Fosthiazate

1.4.1 Περιβαλλοντική τύχη και αποδόμηση του Fosthiazate

Παρά το γεγονός ότι πολλές πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την αποτελεσματικότητα του Fosthiazate, λίγες μόνο μελέτες μέχρι τώρα έχουν εξετάσει την αποικοδόμηση και την απορρόφηση του στο έδαφος. Το Fosthiazate είναι ένα μετρίως υπολειμματικό νηματωδοκτόνο με τις εργαστηριακές τιμές του χρόνου ημιζωής του στο έδαφος να κυμαίνονται από 18-60 ημέρες (. Qin et al, 2004, Pantelalis et al., 2006). Περαιτέρω μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι το pH του εδάφους επηρεάζει σημαντικά την αποδόμηση του Fosthiazate με μεγαλύτερη υπολειμματικότητα να παρατηρείται σε όξινα εδάφη (pH <6) (Pantelalis et al., 2006). Η αυξημένη αποδόμηση του fosthiazate σε αλκαλικά εδάφη είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των οργανοφωσφορικών νηματωδοκτόνων που εφαρμόζονται στο έδαφος. Αυτό οφείλεται τόσο στην αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα σε αλκαλικά εδάφη (Burns, 1976) όσο και στην αυξημένη ευπάθεια του φωσφοεστερικού δεσμού σε αλκαλικό περιβάλλον (Karpouzas & Singh, 2006).

Το Fosthiazate παρουσιάζει γενικά χαμηλή προσρόφηση στο έδαφος όπως υποδεικνύεται από τις χαμηλές τιμές των συντελεστών προσρόφησης Freundlich (KF), 0,45 έως 1,18 ml/g, σε μετρήσεις εδαφών με διαφορετικές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες (Qin et al., 2004). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (Pantelalis et al., 2006), όπου επιπλέον υποδεικνύεται ότι η προσρόφηση του Fosthiazate ελέγχεται κυρίως από το οργανικό φορτίο του εδάφους, με την υπολειμματικότητα του γεωργικού φαρμάκου να αυξάνεται με την αύξηση του οργανικού φορτίου. Η μειωμένη προσρόφηση του Fosthiazate στο έδαφος σε συνδυασμό με την αυξημένη υπολειμματικότητα του σε εδάφη με χαμηλό (όξινο) pH (Qin et al., 2004) υποδηλώνει αυξημένη πιθανότητα έκπλυσης του φαρμάκου στα βαθύτερα στρώματα του εδάφους και μόλυνσης των υπόγειων υδάτων, σε εδάφη «ευάλωτα» στην έκπλυση. Σε αυτό συνηγορούν μελέτες που εξετάζουν την πιθανότητα έκπλυσης του Fosthiazate στα εδάφη και μόλυνσης των υπόγειων υδάτων με τη χρήση τόσο των μαθηματικών μοντέλων FOCUS GW (ground water) από τους Pandelidis et al. (2006) όσο και των πινάκων GUS από τους Qin et al. (2004). Αυτές οι προσομοιώσεις επιβεβαιώνονται σε μεγάλο βαθμό και από τους Karpouzas et al.

(2007) σε πειράματα στήλης για την εξέταση της έκπλυσης ή μη του Fosthiazate σε εδάφη με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες . Επομένως η χρήση του Fosthiazate σε εδάφη που χαρακτηρίζονται από χαμηλό pH και χαμηλό οργανικό φορτίο πρέπει να είναι πολύ προσεκτική λόγω του υψηλού κινδύνου έκπλυσης και μόλυνσης του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα .

Όσον αφορά την μικροβιακή αποδόμηση του Fosthiazate λίγα στοιχεία είναι διαθέσιμα σε αντίθεση με τα περισσότερα γνωστά οργανοφωσφορικά που χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα και νηματωδοκτόνα και σε μεγάλο βαθμό έχει αναλυθεί ο μηχανισμός μικροβιακής αποδόμησης τους καθώς και έχουν ταυτοποιηθεί οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί (Singh et al. , 2006) . Επίσης δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής καταγεγραμμένες αναφορές που να υποδηλώνουν επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του στο έδαφος . Μάλιστα στη μοναδική μελέτη που έχει εξετασθεί η ευπάθεια του Fosthiazate στην επιταχυνόμενη μικροβιακή διάσπαση σε εδάφη από καλλιέργειες πατάτας στο Ηνωμένο Βασίλειο , τα αποτελέσματα δεν δείχνουν την ύπαρξη τέτοιου φαινομένου (Osborn et al. , 2008). Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγγραφείς αναφέρουν ότι τα αποτελέσματα ενδεχομένως να σχετίζονται με την σχετικά πρόσφατη εισαγωγή του νηματωδοκτόνου στο Η.Β. και επομένως την έλλειψη εδαφών με μεγάλο ιστορικό χρήσης .

1.5 Fipronil

Το Fipronil $\{5\text{-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-}[(\text{trifluoromethyl})\text{sulfinyl}]\text{-1H-pyrazole-3-carbonitrile}\}$ είναι ένα εντομοκτόνο που ανήκει στην ομάδα των φαινυλπυραζολών , μια σχετικά νέα χημική ομάδα , και συντέθηκε πρώτη φορά από την Rhône-Poulenc Ag Company (πλέον Bayer CropScience) το 1987 . Τα δικαιώματα του πλέον έχει η BASF . Εισήχθηκε για χρήση το 1993 , ενώ στην Ε.Ε. η χρήση του εγκρίθηκε πολύ πρόσφατα , το 2007 . Ο χημικός τύπος του Fipronil παρουσιάζεται στην Εικόνα 3. Το Fipronil υπάρχει στην αγορά είτε σε στερεή μορφή (π.χ. «δολώματα εντόμων») , είτε ως υγρό σπρέι , είτε με τη μορφή κόκκων. Μάλιστα σε κοκκίωδη μορφή έχει παρατηρηθεί από τους Ngim et al.

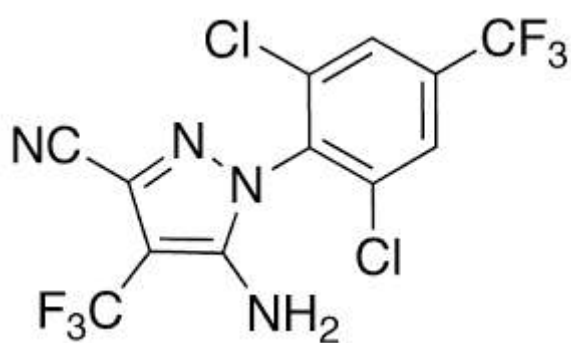
(2001) ότι παρουσιάζει τη μεγαλύτερη υπολειμματικότητα . Κάποια από τα προϊόντα στα οποία αποτελεί το ενεργό συστατικό είναι τα Icon®, Frontline®, Termidor®, and Top Spot®. Το Fipronil κατατάσσεται στα χειρόμορφα φυτοφάρμακα και στα παρασκευάσματα του βρίσκεται ως ρακεμικό μίγμα . Το Fipronil είναι αποτελεσματικό για ένα ευρύ φάσμα εντόμων όπως κατσαρίδες , ακρίδες , κουνούπια , σκαθάρια , τερμίτες κ.α. τόσο στο στάδιο της προνύμφης όσο και σε ενήλικο στάδιο . Μάλιστα είναι αποτελεσματικό ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις απέναντι σε έντομα τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε άλλα εντομοκτόνα όπως πυρεθροειδή , οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά . Επίσης φαίνεται πως είναι αρκετά αποτελεσματικό απέναντι στους σιδηροσκώληκες (*Agriotes spp.*) και χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό για αυτό το σκοπό στις Η.Π.Α. .

Όσον αφορά τον τρόπο δράσης του , το Fipronil ανήκει στα εντομοκτόνα «νέας γενιάς» . Τα «κλασικά» εντομοκτόνα όπως τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά δρουν ως αναστολείς της ακετυλοχολίνεστεράσης και τα πυρεθροειδή συνήθως διεγείρουν κανάλια Na . Πολλά έντομα πλέον έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στη δράση τους . Αντίθετα το Fipronil , και γενικά οι φαινυλπυραζόλες , στοχεύει του τους γ-GABA υποδοχείς του κεντρικού νευρικού συστήματος. Το Fipronil δεσμεύεται στους υποδοχείς εμποδίζοντας την πρόσδεση του γ-GABA(γ-αμινοβουτηρικό οξύ) και έτσι την ενεργοποίηση του υποδοχέα . Ως αποτέλεσμα , σε επαρκή δόση , είναι η υπερβολική και εκτεταμένη διέγερση των νευρώνων (δεδομένου ότι οι υποδοχείς GABA έχουν ανασταλτική δράση) που οδηγεί σε παράλυση και τελικά σε θάνατο .

Το Fipronil ωστόσο πέρα από τα έντομα στόχους μπορεί να αποδειχθεί εξαιρετικά τοξικό και για επωφελή έντομα όπως οι μέλισσες . Μάλιστα λόγω της υψηλής του τοξικότητας για τις μέλισσες η Ε.Ε. το 2013 επέβαλλε ισχυρούς περιορισμούς στη χρήση του και απαγόρευσε τη χρήση του σε μορφή σπρέι στις καλλιέργειες καλαμποκιού και των ηλιοτροπιών . Το Fipronil εφόσον απελευθερωθεί σε υδρόβια οικοσυστήματα είναι εξαιρετικά τοξικό για αρκετούς υδρόβιους μικροοργανισμούς ενώ σε ορισμένους παρουσιάζει βιοσυσσώρευση. Όσον αφορά τα θηλαστικά πειράματα σε ποντίκια και κουνέλια έδειξαν ότι το Fipronil παρουσιάζει κάποια τοξικότητα . Σε ανθρώπους (7 περιπτώσεις) που έχουν δηλητηριαστεί από το Fipronil παρατηρήθηκαν συμπτώματα όπως εμετός , ταραχή

και σπασμοί . Παρόλα αυτά σε καμία απ αυτές τις περιπτώσεις η δηλητηρίαση δεν οδήγησε σε θάνατο .

Όσον αφορά τις φυσικοχημικές του ιδιότητες , το Fipronil σε κανονικές συνθήκες (25°C , 1 atm) βρίσκεται σε στερεή κατάσταση με τη μορφή λευκής σκόνης και σημείο τήξης τους 200-201°C . Παρουσιάζει μικρή διαλυτότητα στο νερό (1.9 mg/L σε pH 5 , 2.4 mg/L σε pH 9) . Αντίθετα σε λιπόφιλους (οργανικούς) διαλύτες παρουσιάζει αρκετά μεγαλύτερη διαλυτότητα , όπως για παράδειγμα στο εξάνιο (28.0 mg/L) και στο τουλουόλιο (3000 mg/L) . Το Fipronil είναι πιο πυκνό απ το νερό (σχετική πυκνότητα 1.477-1.626) , δεν είναι ιδιαίτερα πτητικό , είναι φωτοδιασπώμενο και ευαίσθητο σε υδρόλυση κάτω από αλκαλικές συνθήκες .



Εικόνα 3 Ο χημικός τύπος του Fipronil

1.5.1 Περιβαλλοντική τύχη και αποικοδόμηση του Fipronil

Το Fipronil παρουσιάζει μέτρια περιβαλλοντική υπολειμματικότητα η οποία εξαρτάται κυρίως από τις διαδικασίες της φωτόλυσης , της υδρόλυσης , της προσρόφησης και της μικροβιακής διάσπασης . Πέντε κύρια προϊόντα αποδόμησης του Fipronil έχουν παρατηρηθεί : Το fipronil-sulfide , η fipronil-amide , το fipronil-dysulfinyl και η fipronil-sulfone . Το fipronil-sulfide είναι προϊόν που προκύπτει λόγω αναγωγής ή μικροβιακής διάσπασης στο έδαφος είτε λόγω φωτόλυσης στο φύλλωμα των φυτών (σε περιπτώσεις που έχουμε εφαρμογή του σε μορφή σπρέι) . Η fipronil-amide σχηματίζεται τόσο μέσω μικροβιακής διάσπασης στο έδαφος όσο και μέσω υδρόλυσης στο νερό .Από την άλλη η fipronil-sulfone και το fipronil-

dysulfinyl παράγονται μέσω φωτόλυσης τόσο στο έδαφος όσο και στα φυλλώματα . Επιπλέον η fipronil-sulfone μπορεί να είναι προϊόν οξειδωτικής ή μικροβιακής διάσπασης του Fipronil στο έδαφος .

Όσον αφορά τη συμπεριφορά του Fipronil στο έδαφος , μελέτες ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾ σε αυστραλιανά εδάφη όπως και σε εδάφη από τη Βρετανία και τη Γαλλία δείχνουν μια χαμηλή έως μέτρια προσρόφηση με τιμές του συντελεστή K_{oc} (ουσιαστικά μια έκφραση του συντελεστή προσρόφησης Freundlich με κανονικοποίηση ως προς την συνολική περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα) 542-1176 και 427-1248 αντίστοιχα . Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η προσρόφηση του Fipronil στο έδαφος αυξάνεται με την αύξηση του οργανικού φορτίου . Μάλιστα οι A. Aajoud et al. (2003) έδειξαν αύξηση της προσρόφησης του Fipronil από 0.1-6.5% με την αύξηση του οργανικού φορτίου . Όσον αφορά τους μεταβολίτες του Fipronil , τα fipronil-sulfide , fipronil-desulfinyl και fipronil-sulfone παρουσιάζουν μεγαλύτερη προσροφητική συγγένεια με μεγαλύτερες τιμές K_{oc} , ενώ η fipronil-amide παρουσιάζει μικρότερη προσρόφηση από τη μητρική ένωση ⁽⁴⁸⁾ ⁽⁴¹⁾ . Επομένως το Fipronil παρουσιάζει μια σχετική κινητικότητα σε εδάφη , η οποία επιβεβαιώνεται και από μελέτες έκπλυσης ⁽¹⁸⁾ που δείχνουν μια γρήγορη μεταφορά του Fipronil στα βαθύτερα στρώματα του εδάφους (6-12 cm) σε επίπεδα 31-37% . Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζουν και οι Shuai et al. (2011) σε πειράματα με εδάφη από τη Χαβάη , όπου κάτω από συνθήκες προσομοίωσης βροχόπτωσης , η απομάκρυνση του Fipronil από το επιφανειακό στρώμα του εδάφους άγγιζε το 29% (σε 24h) . Στην ίδια μελέτη εξετάστηκε και το φαινόμενο της επιφανειακής απορροής το οποίο όμως ήταν αμελητέο .

Όσον αφορά το χρόνο ημιζωής στο έδαφος ($t_{1/2s}$) του Fipronil , αυτός κυμαίνεται από 9-210 ημέρες ενώ των προϊόντων αποικοδόμησης του φτάνει έως τις 350 ημέρες ⁽⁴⁴⁾⁽³¹⁾⁽⁴⁸⁾ , ανάλογα με τις συνθήκες του εδάφους . Μάλιστα οι Mandal et al. (2012) σε πειράματα που εξέταζαν την υπολειμματικότητα του Fipronil και των μεταβολιτών του σε αμμοπηλώδη και αργιλωπηλώδη εδάφη (αποστειρωμένα) , παρατήρησαν μεγαλύτερη υπολειμματικότητα στα δεύτερα .

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω μια απ τις κύριες διαδικασίες αποδόμησης του Fipronil είναι η φωτόλυση . Σε καλλιέργειες μπιζελιών , καλαμποκιού και αχλαδιών το fipronil-desulfinyl έχει παρατηρηθεί ως το κύριο προϊόν αποδόμησης μέσω

φωτόλυσης⁽²³⁾. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι η συγκεκριμένη διαδικασία είναι αντιστρόφως ανάλογη της προσρόφησης στο έδαφος ⁽¹²⁾ και σχετίζεται άμεσα με τον συντελεστή προσρόφησης Freundlich (KF).

Επομένως η φωτοαποδόμηση του Fipronil εξαρτάται και από τη φύση και τις ιδιότητες του εδάφους . Επιπλέον τα αποτελέσματα μελετών δείχνουν ότι η φωτόλυση του Fipronil στο έδαφος είναι περισσότερο αργή σε σχέση με το νερό λόγω του φαινομένου της «φωτοπροστασίας»⁽³⁵⁾ .

Στα υδατικά συστήματα πέρα από την φωτόλυση το Fipronil αποδομείται και μέσω υδρόλυσης με κύριο προϊόν την fipronil-amide , όπως αναφέρεται και παραπάνω. Ωστόσο σε μελέτες για την αποικοδόμηση του Fipronil στο νερό απουσία φωτός σε διάφορα pH⁽¹³⁾ δείχνουν τα εξής . Σε όξινες και ουδέτερες συνθήκες το εντομοκτόνο παραμένει αρκετά σταθερό . Σε pH 9 η αποικοδόμηση αυξάνεται (παρουσιάζοντας κινητική «ψευδό»-πρώτης τάξης) , ενώ σε pH 12 ο ρυθμός αποικοδόμησης ήταν έως και 300 φορές μεγαλύτερος από ότι σε pH 9. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η υδρόλυση πιθανότατα δεν αποτελεί βασική οδό αποικοδόμησης του Fipronil στη φύση , δεδομένου ότι στα περισσότερα υδάτινα οικοσυστήματα παρατηρούνται τιμές pH κοντά στο 7 .

Όσον αφορά τη μικροβιακή αποικοδόμηση του Fipronil , αυτή έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό από τους Zhu et al. (2004) . Σε πειράματα με αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους (χρησιμοποιώντας αργιλοπηλώδη εδάφη) παρατήρησαν τρεις φορές (περίπου 30-33 ημέρες διαφορά) μεγαλύτερη αποικοδόμηση στα μη αποστειρωμένα εδάφη . Τα αποτελέσματα επίσης έδειξαν μια βαθμιαία αποδόμηση του Fipronil , ακολουθώντας κινητική πρώτης τάξης . Το κύριο προϊόν αποικοδόμησης που παρατηρήθηκε ήταν το fipronil-sulfide . Η αύξηση της θερμοκρασίας (από 25°C σε 35°C) παρατηρήθηκε επίσης πως επηρεάζει την αποικοδόμηση μειώνοντας τον t1/2 κατά μια μέρα. Σε άλλες μελέτες ⁽³⁴⁾ παρατηρήθηκε πως η αποικοδόμηση του Fipronil στο έδαφος κάτω από αναερόβιες συνθήκες ήταν συγκρίσιμη ή και ταχύτερη σε σχέση με τα αερόβια συστήματα που έχουν μελετηθεί . Και σε αυτή την περίπτωση το fipronil-sulfide ήταν το κυρίαρχο προϊόν . Επιπλέον, έχει μελετηθεί⁽⁴¹⁾ και η μικροβιακή αποδόμηση του κύριου προϊόντος φωτόλυσης του Fipronil στο έδαφος , του fipronil-desulfinyl. Τα αποτελέσματα δείχνουν μεγάλη υπολειμματικότητα του μεταβολίτη στο έδαφος.

Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει την μικροβιακή αποικοδόμηση του Fipronil στο έδαφος είναι το ποσοστό της υγρασίας σύμφωνα με τους Ying and Kookana (2002). Η αύξηση της υγρασίας του εδάφους από 15 σε 60% σε εδάφη που μελετήθηκαν οδήγησε σε μείωση του χρόνου αποδόμησης από 198 σε 68 ημέρες . Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η υγρασία του εδάφους καθορίζει το προϊόν αποικοδόμησης που θα σχηματιστεί . Για παράδειγμα σε περιπτώσεις υγρασίας εδάφους πάνω από 50% , παρατηρήθηκε κυρίως σχηματισμός του fipronil-sulfate ως αποτέλεσμα αναγωγικών διαδικασιών . Αντίθετα σε περιπτώσεις με ποσοστό υγρασίας κάτω από το 50% το κύριο προϊόν αποδόμησης ήταν η fipronil-sulfone , μέσω οξείδωσης .

Τέλος , σε πιο πρόσφατες μελέτες οι Kumar R et al. (2012) απομόνωσαν βακτήρια του γένους *Paracoccus* ως αποικοδομητές του Fipronil , ενώ οι Mandal K et al. (2013) απομόνωσαν βακτήρια του είδους *Bacillus Thuriensis* .

1.6 Σκοπός του πειράματος

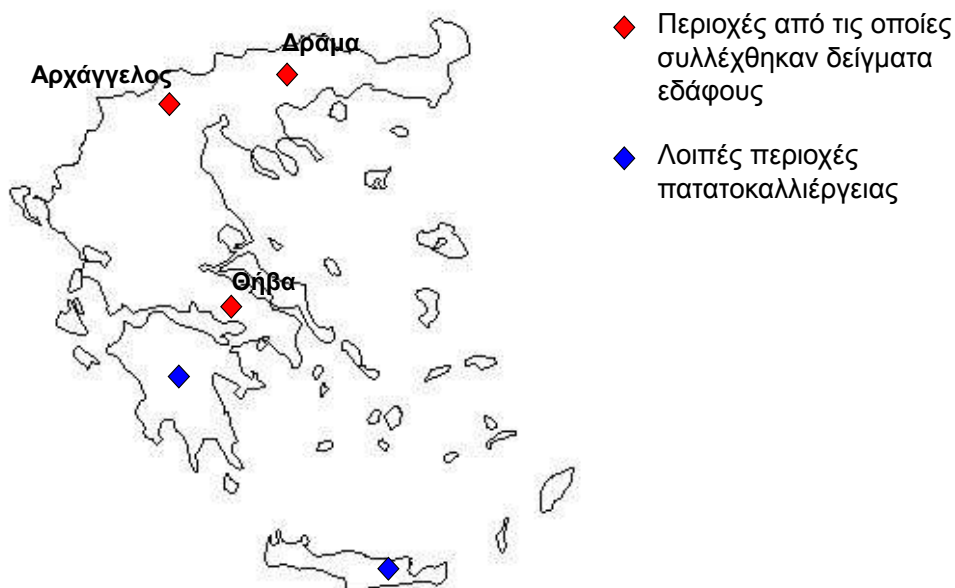
Ένας περιορισμένος αριθμός φυτοφαρμάκων εδάφους είναι διαθέσιμος για τον έλεγχο των παρασίτων εδάφους της πατάτας . Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η πατάτα καλλιεργείται ως μονοκαλλιέργεια δεν ευνοεί την εναλλαγή αγροχημικών σκευασμάτων στο έδαφος. Αυξάνεται έτσι ο κίνδυνος για τη μείωση της αποτελεσματικότητας των γεωργικών φαρμάκων λόγω μικροβιακής προσαρμογής .

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της υπολειμματικότητας του οργανοφωσφορικού νηματωδοκτόνου Fosthiazate και του φαινυλπυραζολικού εντομοκτόνου Fipronil σε εδάφη από περιοχές καλλιέργειας πατάτας με ή χωρίς ιστορικό χρήσης ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι εκτεταμένο ή όχι είναι το φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης των δύο αυτών γεωργικών φαρμάκων σε περιοχές μονοκαλλιέργειας πατάτας στον Ελλαδικό χώρο.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα εδαφών

Δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από τρεις περιοχές καλλιέργειας πατάτας, Οροπέδιο Νευροκοπίου Δράμας, Θήβα και Αρχάγγελος, με ιστορικό χρήσης των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων (Εικόνα 4).



Εικόνα 4 Οι κυριότερες περιοχές πατατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα και οι περιοχές από τις οποίες συλλέχθηκαν τα δείγματα

Από την περιοχή της Θήβας συλλέχθηκαν πέντε εδάφη με ιστορικό χρήσης γεωργικών φαρμάκων και ένα έδαφος-μάρτυρας χωρίς προηγούμενο ιστορικό

χρήσης. Γενικότερα στην περιοχή της Θήβας το κυριότερο πρόβλημα αποτελούν οι προσβολές από σιδηροσκώληκα, για το λόγο αυτό τα εδάφη που συλλέχθηκαν είχαν κυρίως ιστορικό χρήσης ethoprophos και chlorpyrifos , ενώ δεν παρουσίαζαν ιστορικό χρήσης fipronil και fosthiazate (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Ιστορικό χρήσης γεωργικών φαρμάκων στα εδάφη που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Θήβας.

Έδαφος	Ιστορικό γεωργικών φαρμάκων	Ιστορικό καλλιέργειας
Θήβα 1	Ethoprophos, chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2013 πατάτα
Θήβα 2	Ethoprophos, chlorpyrifos (3 εφαρμογές)	2013 πατάτα
	Ethoprophos (2 εφαρμογές)	2012 κρεμμύδι
	-	2011 σιτάρι
	-	2010 πατάτα
Θήβα 3	Ethoprophos, chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2013 πατάτα
	-	2012 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2011 κρεμμύδι
	-	2010 σιτάρι
Θήβα 4	Ethoprophos, chlorpyrifos (3 εφαρμογές)	2013 πατάτα
	-	2012 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2011 κρεμμύδι
	-	2010 σιτάρι
Θήβα 5	Ethoprophos, chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2013 πατάτα
	Chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2012 κρεμμύδι
	-	2011 σιτάρι
	-	2010 πατάτα
Μάρτυρας	-	Όχι πατατα

Από το οροπέδιο Νευροκοπίου Δράμας συλλέχθηκαν πέντε δείγματα με ιστορικό χρήσης των γεωργικών φαρμάκων και ένα έδαφος μάρτυρας χωρίς

ιστορικό χρήσης με υπό μελέτη γεωργικά φάρμακα. Στην περιοχή του Νευροκοπίου σημαντικό πρόβλημα αποτελούν τόσο οι νηματώδεις όσο και το σιδηροσκώληκα με αποτέλεσμα να βρεθούν αγροί με ιστορικό χρήσης ethoprophos και fosthiazate που χρησιμοποιούνται κυρίως για την καταπολέμηση των νηματωδών ενώ για την καταπολέμηση του σιδηροσκώληκα γίνεται εκτεταμένη χρήση του chlorpyrifos ως και δύο φορές ανά έτος. Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε δύο από τους αγρούς που συλλέχθηκε έδαφος (Νευροκόπι 3 & Νευροκόπι 4) παρατηρήθηκε (σύμφωνα με τον παραγωγό) μειωμένη αποτελεσματικότητα στην καταπολέμηση κυρίως των νηματωδών κατά την τελευταία καλλιεργητική περίοδο (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Ιστορικό χρήσης γεωργικών φαρμάκων στα εδάφη που συλλέχθηκαν από το οροπέδιο του Νευροκοπίου.

Έδαφος	Ιστορικό γεωργικών φαρμάκων	Ιστορικό καλλιέργειας
Μάρτυρας	-	2013 τριφύλλι
	-	2012 χέρσο
	-	2011 τριφύλλι
	-	Όχι πατάτα από 2008
Νευροκόπι 1	-	2013 χέρσο
	Ethoprophos 6 kg/στρ	2012 πατάτα
	-	2011 σιτάρι
	Ethoprophos	2010 πατάτα
	-	2009 σιτάρι
	Ethoprophos	2008 πατάτα
Νευροκόπι 2	Chlorpyrifos, fosthiazate	2013 πατάτα
	Chlorpyrifos, fosthiazate	2012 πατάτα
	-	2011 σιτάρι
	Chlorpyrifos, fosthiazate	2010 πατάτα
	-	2009 σιτάρι

	Carbofuran, chlorpyrifos, fosthiazate	2008 πατάτα
Νευροκόπι 3	Ethoprophos + fosthiazate από 4 kg/στρ (μειωμένη αποτελεσματικότητα)	2013 πατάτα
	Ethoprophos + fosthiazate από 4 kg/στρ	2012 πατάτα
	-	2011 σιτάρι
	Ethoprophos + fosthiazate από 4 kg/στρ	2012 πατάτα
	-	2011 σιτάρι
Νευροκόπι 4	Chlorpyrifos (2 φορές), fosthiazate + ethoprophos	2013 πατάτα
	-	2012 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 φορές), fosthiazate + ethoprophos	2011 πατάτα
	-	2010 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 φορές), Fosthiazate + ethoprophos	2009 πατάτα
Νευροκόπι 5	Chlorpyrifos (2 φορές), fosthiazate + ethoprophos	2013 πατάτα
	-	2012 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 φορές), fosthiazate + ethoprophos	2011 πατάτα
	-	2010 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 φορές), fosthiazate + ethoprophos	2009 πατάτα

Από την περιοχή πατατοκαλλιέργειας του **Αρχαγγέλου** συλλέχθηκαν τέσσερα εδάφη με ιστορικό χρήσης των γεωργικών φαρμάκων και ένα έδαφος-μάρτυρας χωρίς προηγούμενο ιστορικό χρήσης. Στα δείγματα που συλλέχθηκαν από την περιοχή του Αρχαγγέλου τα εδάφη παρουσίαζαν κυρίως ιστορικό χρήσης του chlorpyrifos και fipronil, ενώ παλαιότερα γινόταν και εφαρμογή του ethoprophos (πίνακας 3).

Πίνακας 3. Ιστορικό χρήσης γεωργικών φαρμάκων στα εδάφη που συλλέχθηκαν από την περιοχή του Αρχαγγέλου.

Έδαφος	Ιστορικό γεωργικών φαρμάκων	Ιστορικό καλλιέργειας
Αρχάγγελος 1 Βόρεια	Chlorpyrifos, fipronil	2013 πατάτα
	-	2012 χέρσο
	-	2012 χέρσο
	Ethoprophos, chlorpyrifos	2010 πατάτα
Αρχάγγελος 2 Βόρεια	chlorpyrifos	2013 πατάτα
	-	2012 φασόλι
	-	2011 σιτάρι
Μάρτυρας	-	Ακαλλιέργητο τα τελευταία χρόνια
Αρχάγγελος 4 Νότια	Fipronil	2013 πατάτα
	-	2012 καλαμπόκι
	-	2011 καλαμπόκι
Αρχάγγελος 5 Νότια	fipronil	2013 πατάτα
	-	2012 σιτάρι
	Chlorpyrifos	2011 πατάτα

2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εδαφών.

Τα εδάφη αφού μεταφέρθηκαν άμεσα στο εργαστήριο κοσκινίστηκαν και στην συνέχεια υποδείγματα των 50-200 g χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της υγρασίας και υδατοχωρητικότητας τους αλλά και των κυριοτέρων φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών όπως pH, περιεκτικότητα σε οργανικό C και μηχανική σύσταση όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.2.1 Προσδιορισμός της υγρασίας των εδαφών

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°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_{cont}: το βάρος του δοχείου.

2.2.2 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 (Whatman No1). 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 αφέθηκε 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 (W₁) και μετά (W₂) 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

W₁: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, πριν την κατάκλιση

W₂: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, μετά την κατάκλιση

2.2.3 Προσδιορισμός pH, περιεκτικότητας σε οργανικό C και μηχανικής σύστασης

Για τον προσδιορισμό του pH των εδαφών 10 g εδάφους (ξηρό βάρος) ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 50 ml. Στη συνέχεια προστέθηκαν 25 ml απεσταγμένου νερού (αναλογία 1:2.5 β/ο) και πραγματοποιήθηκε ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Ακολούθησε μέτρηση σε πεχάμετρο υψηλής ευκρίνειας (HANNA pH 211) με προσαρτημένο ηλεκτρόδιο (METTLER TOLEDO 412). Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα και της μηχανικής σύστασης των εδαφών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Εδαφολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης από την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ματσή. Πιο συγκεκριμένα ο προσδιορισμός του περιεχόμενου οργανικού άνθρακα έγινε σύμφωνα με τους Walkley and Black, (1934) και η μηχανική σύσταση προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bouyoucos (Sheldrick and Wang, 1993).

2.2.4 Αποτελέσματα των εδαφολογικών αναλύσεων

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 (Θήβα), 5 (Νευροκόπι) και 6 (Αρχάγγελος).

Πίνακας 4. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Θήβας.

Έδαφη	pH	Οργανικός άνθρακας (%)	Άργιλος (%)	Ίλος (%)	Άμμος (%)	Τύπος εδάφους
Μάρτυρας Θήβα	8,21	0,32	17,6	24	58,4	Αμμοπηλώδες
Θήβα 1	8,33	0,74	21,6	26	52,4	Αμμο-αργιλο-πυλώδες
Θήβα 2	8,01	0,93	23,6	32	44,4	Πηλώδες
Θήβα 3	8,01	0,62	23,6	32	44,4	Πηλώδες
Θήβα 4	7,85	1,17	29,6	28	42,4	Αργιλοπηλώδες
Θήβα 5	8,10	0,78	37,6	26	36,4	Αργιλοπηλώδες

Τα εδάφη από την Θήβα παρουσιάζουν όλα αλκαλικό pH και χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (<1% εκτός του Θήβα 4) και χαρακτηρίζονται ως αμμοπηλώδη - αργιλοπηλώδη.

Πίνακας 5. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που συλλέχθηκαν από το Οροπέδιο του Νευροκοπίου.

Εδάφη	pH	Οργανικός άνθρακας (%)	Άργιλος (%)	Ίλος (%)	Άμμος (%)	Τύπος εδάφους
Μάρτυρας Νευροκόπι	5,17	1,99	21,6	36	42,4	Πηλώδες
Νευροκόπι 1	6,01	0,98	37,6	24	38,4	Αργιλοπηλώδες
Νευροκόπι 2	5,23	0,42	11,6	24	64,4	Αμμοπηλώδες
Νευροκόπι 3	6,80	0,61	9,6	22	68,4	Αμμοπηλώδες
Νευροκόπι 4	6,60	0,85	13,6	20	66,4	Αμμοπηλώδες
Νευροκόπι 5	6,23	1,12	41,6	30	28,4	Αργιλώδες

Τα εδάφη από το οροπέδιο του Νευροκοπίου παρουσιάζουν όξινο ως ουδέτερο pH (5.2 – 6.8), χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό C (0.42 – 1.12%) με εξαίρεση το έδαφος Νευροκόπι μάρτυρας που εμφανίζει περιεκτικότητα σε οργανικό C 2%. Τα συγκεκριμένα είναι πηλώδη, αμμοπηλώδη, αργιλοπηλώδη με μοναδική εξαίρεση το έδαφος Νευροκόπι 5 που χαρακτηρίζεται ως αργιλώδες.

Πίνακας 6. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που συλλέχθηκαν από την περιοχή του Αρχαγγέλου.

Έδαφος	pH	Οργανικός άνθρακας (%)	Άργιλος (%)	Ίλος (%)	Άμμος (%)	Τύπος εδάφους
Μάρτυρας Αρχαγγέλου	7,11	1,21	25,6	30	44,4	Πηλώδες
Αρχάγγελος 1	6,22	1,91	21,6	34	44,4	Πηλώδες
Αρχάγγελος 2	4,96	1,80	23,6	42	34,4	Πηλώδες
Αρχάγγελος 4	7,90	0,87	11,6	50	38,4	Ιλυοπηλώδες/Πηλώδες
Αρχάγγελος 5	7,42	2,80	17,6	36	46,4	Πηλώδες

Τα εδάφη από την περιοχή του Αρχαγγέλου χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα όξινα (pH 4.96 Αρχάγγελος 2) ως αλκαλικά (pH 7.90, Αρχάγγελος 4), με υψηλότερη περιεκτικότητα σε οργανικό C σε σχέση με τα εδάφη από τις υπόλοιπες περιοχές (OC>1% εκτός Αρχαγγέλου 4). Τα συγκεκριμένα εδάφη παρουσιάζουν παρόμοια μηχανική σύσταση και χαρακτηρίζονται όλα ως πηλώδη.

2.3 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και γεωργικά φάρμακα

Για την εφαρμογή στο έδαφος προετοιμάστηκαν δύο υδατικά διαλύματα Fosthiazate συγκεντρώσεως **120 mg L⁻¹** (για εφαρμογή σε 600 g εδάφους) και **90 mg L⁻¹** (για εφαρμογή σε 450 g εδάφους) από το εμπορικό σκεύασμα *Nemathorin[®], 150EC* (15% v/v) . Όσον αφορά το Fipronil προετοιμάστηκε διάλυμα **60 mg L⁻¹** σε MeOH από πρότυπο διάλυμα Fipronil υψηλής καθαρότητας (99%) .

Για την εκχύλιση και τη χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο (ACN) και νερό HPLC grade , άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO₄ 98+%, CHEM-LAB), χλωριούχο νάτριο (NaCl AppliChem 99,5%), sodium citrate-tri basic (C₆H₅Na₃O₇ · 2 H₂O, AppliChem 99-100%) και PSA (Agilent Technologies).

2.4 Περιγραφή του πειράματος αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων

Με την παραλαβή τους στο εργαστήριο τα εδάφη αφέθηκαν ώστε να απολέσουν υγρασία και στην συνέχεια κοσκινίστηκαν ώστε να απομακρυνθούν πέτρες και φυτικά υπολείμματα. Καθένα από τα δείγματα εδάφους στα οποία είχε ήδη προσδιοριστεί η υγρασία και η υδατοχωρητικότητα τους διαχωρίστηκαν σε δύο υποδείγματα των 600 g. Το ένα δείγμα από το κάθε έδαφος δέχτηκε εφαρμογή υδατικού διαλύματος fosthiazate ώστε να έχει στο έδαφος συγκέντρωση **2 mg/kg**

ξηρού βάρους εδάφους που θα αναμένονταν στο έδαφος (0-10 cm) ύστερα από εφαρμογή των μέγιστων συνιστώμενων δόσεων για την καταπολέμηση εντόμων εδάφους στην πατάτα (GAP documents). Ενώ το άλλο υπό-δείγμα από κάθε έδαφος δέχτηκε εφαρμογή από πυκνό μεθανολικό διάλυμα fipronil ώστε να έχει τελική συγκέντρωση γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος ίση με **1 mg/kg** ξηρού βάρους εδάφους. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν οι εφαρμογές στα εδάφη-μάρτυρες από όλες τις περιοχές και στην συνέχεια ακολούθησαν οι εφαρμογές στα υπόλοιπα εδάφη ώστε να περιοριστεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης των εδαφών-μάρτυρες από εδάφη με ιστορικό χρήσης των γεωργικών φαρμάκων.

Αμέσως μετά την εφαρμογή των διαλυμάτων η υγρασία των δειγμάτων προσαρμόστηκε στο 40% της υδατοχωρητικότητας με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων νερού. Ακολούθως τα δείγματα αναμίχθηκαν με το χέρι ώστε να επιτύχουμε ομοιόμορφη κατανομή του γ.φ. σε όλο τον όγκο του εδάφους και διαχωρίστηκαν σε υποδείγματα των 30 g (18 δείγματα) τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες με αεροστεγές κλείσιμο και τοποθετήθηκαν σε ψυχόμενο επωαστικό θάλαμο στους 20°C στο σκοτάδι. Στις σακούλες δημιουργήθηκε οπή ώστε να διατηρηθούν οι αερόβιες συνθήκες. Αμέσως μετά την εφαρμογή (t0) και 7(t7), 14(t14), 21(t21), 42(t42) και 70(t70) ημέρες αργότερα τρία δείγματα από κάθε έδαφος και μεταχείριση απομακρύνονταν από την επώαση και τοποθετούνταν στους -20°C μέχρι να αναλυθούν και να προσδιοριστεί η υπολειπόμενη ποσότητα του fosthiazate και του fipronil στα εδάφη αυτά.

2.4.1 Περιγραφή του πειράματος αποδόμησης του Fosthiazate σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη

Στα δείγματα εδάφους Νευροκόπι 3 και Νευροκόπι 4 παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένος ρυθμός αποδόμησης του fosthiazate. Έτσι μελετήθηκε η αποδόμηση του γ.φ. σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα υπο-δείγματα εδάφους από τα εν λόγω εδάφη. Προκειμένου να γίνει αυτό δείγμα εδάφους από κάθε ένα εκ των δυο

εδαφών διαχωρίστηκε σε τρία υπο-δείγματα των 450 g . Τα δύο πρώτα υπο-δείγματα αποστειρώθηκαν , με διαφορετική μέθοδο αποστείρωσης το καθένα (αναφορά στο εδάφιο 2.5) , ενώ το τρίτο παρέμεινε ως έχει προκειμένου να παρατηρήσουμε την αποδόμηση του Fosthiazate υπό φυσιολογικές συνθήκες . Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν κατά την εφαρμογή του γ.φ. και έπειτα είναι οι ίδιες που περιγράφονται και στο εδάφιο 2.4 . Ωστόσο στην περίπτωση αυτή οι χρόνοι δειγματοληψίας ήταν διαφορετικοί . Έτσι εκτός από την δειγματοληψία κατά την εφαρμογή (t0) είχαμε δειγματοληψία μετά από 3(t3) , 7(t7) , 14(t14) , 28(t28) , 51(t51) και 70(t70) ημέρες . Επιπλέον να σημειωθεί ότι για να περιοριστεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης προηγήθηκαν οι εφαρμογές στα αποστειρωμένα δείγματα εδάφους και ακολούθησαν τα μη αποστειρωμένα .

2.5 Μέθοδοι αποστείρωσης εδάφους

Οι δύο μέθοδοι αποστείρωσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής :

- **Καπνισμός με χλωροφόρμιο** (χημική μέθοδος)
- **Αποστείρωση στο αυτόκαυστο** (θερμική μέθοδος)

Καπνισμός: Το έδαφος επώαστηκε με χλωροφόρμιο (CHCl₃) σε ξηραντήρα στους 37°C για 5 ημέρες. Στη συνέχεια το έδαφος απομακρύνθηκε από τον ξηραντήρα και επώασθηκε για 3 ημέρες στους 37°C απουσία CHCl₃ προκειμένου να επιτραπεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών που διέφυγαν το πρώτο καπνισμό του εδάφους. Ακολούθησε νέα επώαση του εδάφους με με CHCl₃ στοχεύοντας στην εξάλειψη των μικροοργανισμών που επιβίωσαν του πρώτου καπνισμού και αναπτύχθηκαν κατά την ενδιάμεση περίοδο επώασης.

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο: Το έδαφος τοποθετήθηκε σε κατάλληλες σακούλες και εκτέθηκε σε θέρμανση στο αυτόκαυστο στους 120°C για 30 min.

- ❖ Σε γενικές γραμμές η θερμική αποστείρωση είναι περισσότερο αποτελεσματική αλλά αλλοιώνει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους . Αντίθετα η αποστείρωση με χλωροφόρμιο δεν επηρεάζει τις

ιδιότητες του εδάφους ωστόσο είναι λιγότερο αποτελεσματική καθώς επιτρέπει την επιβίωση ορισμένων σποριογόνων οργανισμών του εδάφους. Χρησιμοποιώντας και τις δύο μεθόδους θέλαμε να βελτιστοποιήσουμε τις παραμέτρους του πειράματος και να αυξήσουμε την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων

2.6 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος

2.6.1 Εκχύλιση Fosthiazate από το έδαφος

Η εκχύλιση του fosthiazate από το έδαφος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο QUECHERS (Asensio-Ramos et al., 2010). Η μέθοδος QUECHERS περιλαμβάνει δύο επιμέρους στάδια: (1) το στάδιο της εκχύλισης και (2) το στάδιο του καθαρισμού. Κατά το στάδιο της εκχύλισης, 10 g εδάφους ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Teflon χωρητικότητας 50ml, με καπάκι, όπου προστέθηκαν 20ml διαλύτη ακετονιτρίλιου (ACN) και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε Vortex για 1 min. Στη συνέχεια, προστέθηκε μίγμα αλάτων αποτελούμενο από 4g άνυδρο $MgSO_4$, 1g $NaCl$ και 1,5g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$ και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε Vortex για 1 min, παραμονή για 5 min σε λουτρό υπερήχων και φυγοκέντρηση για 8 min σε 4000 rpm. Το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε και υποβλήθηκε σε καθαρισμό. Συγκεκριμένα, κλάσμα όγκου 4 ml από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε σωλήνα Teflon που περιείχε 600mg $MgSO_4$ and 100mg PSA και ακολούθησε ανάδευση σε Vortex για 30 sec, παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 1min και φυγοκέντρηση για 10 min σε 4400 rpm. Κατόπιν το υπερκείμενο διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας 0,45μm για να ακολουθήσει η χρωματογραφική ανάλυση του.

2.6.2 Εκχύλιση Fipronil από το έδαφος

Για την εκχύλιση του Fipronil από το έδαφος 5 g εδάφους μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 100 ml , όπου προστέθηκαν 10 ml μεθανόλης (MeOH) . Στη συνέχεια είχαμε ανάδευση των φιαλών σε οριζόντιο αναδευτήρα (orbital shaker) για 2 ώρες στις 190 rpm . Ακολούθησε μεταφορά του δείγματος σε σωλήνες Teflon και φυγοκέντριση στις 6,000 rpm για 5 min . Κατόπιν το υπερκείμενο διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας 0,45μm για να ακολουθήσει η χρωματογραφική ανάλυση του.

- ❖ Για τα γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκαν τεστ ανάκτησης σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (0,1, 1 και 5 mg/kg) σε ένα από τα εδάφη που μελετήθηκαν, για να δοκιμαστεί η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της κάθε μεθόδου. Σε όλα τα τεστ τα επίπεδα ανάκτησης ήταν άκρως ικανοποιητικά με τον μέσο όρο για το Fipronil να είναι 100,1% και για το Fosthiazate 98,9% .

2.7 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

2.7.1 Αρχή και οργανολογία της μεθόδου

Η χρωματογραφία υψηλής πίεσης ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Στην HPLC μπορούν να συμπεριληφθούν και να εφαρμοστούν όλα τα είδη που λαμβάνουν χώρα στους

χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με την κατάλληλη χρήση υλικού πληρώσεως της στήλης και του διαλύτη έκλουσης.

Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

Ένα σύστημα HPLC περιλαμβάνει:

- Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών
- Αντλία (σταθερής ροής ,σταθερής πίεσης)
- Μονάδα εισαγωγής δείγματος (βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, αυτόματος δειγματολήπτης)
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτή (ορατού-υπεριώδους, Φθορισμομετρικοί , Σκεδασμού φωτός κλπ)
- Καταγραφικό

Στην αναλυτική στήλη γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, ενώ η προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου της στήλης γίνεται με την αντλία. Η διεργασία του χρωματογραφικού διαχωρισμού αρχίζει με την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη.

2.7.2 Μέθοδος ανάλυσης HPLC στο σύστημα HPLC Marathon III

Ο προσδιορισμός των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση των εκχυλισμάτων σε σύστημα HPLC Marathon III, με UV ανιχνευτή και στήλη C18 GraceSmart (4.6 mm x 150mm, 5 μm). Σε κάθε περίπτωση, ο όγκος της έγχυσης ήταν 20μl. Για τη διασφάλιση της καθαρότητας των προς ανάλυση δειγμάτων, πριν την έγχυση στο χρωματογράφο, τα δείγματα της κάθε μεταχείρισης διηθούνταν από ειδικά φίλτρα σύριγγας 0.45μm (Syringe Filters, LabSolution). Η ροή της κινητής φάσης ήταν σε κάθε περίπτωση 1 ml min⁻¹. Η έκλουση και των δυο γ.φ. πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά (δηλαδή με σταθερή σύσταση του διαλύτη κατά την

έκλυση). Οι συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης για τα fosthiazate και το fipronil περιγράφονται συνοπτικά στον Πίνακα 8 .

Πίνακας 8. Συνθήκες ανάλυσης των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων σε σύστημα HPLC

Γεωργικά φάρμακα	Κινητή φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Μήκος κύματος (nm)
Fosthiazate	ACN:H ₂ O	50:50	230
Fipronil	ACN:H ₂ O	65:35	210

- ❖ Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα εδάφους ήταν απαραίτητη η κατασκευή και η χρήση πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα 1000 µg/ml σε μεθανόλη για το Fosthiazate και το fipronil. Ακολούθως, από τα αρχικά πρότυπα διαλύματα με κατάλληλες αραιώσεις προετοιμάστηκε σειρά διαλυμάτων συγκεντρώσεων από 0.01 ως 10 µg/ml σε μεθανόλη .Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το κάθε γεωργικό φάρμακο

2.1 Επεξεργασία αποτελεσμάτων και υπολογισμός DT50

Για τον υπολογισμό του χρόνου ημιζωής (DT50) των Fosthiazate και Fipronil χρησιμοποιήθηκαν τα μοντέλα κινητικής που έχουν προταθεί από το FOCUS working group (FOCUS 2006). Συγκεκριμένα για τον υπολογισμό των DT50 χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά μοντέλα κινητικής: το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Single first order, SFO) και δύο μη γραμμικά μοντέλα κινητικής (Hockey Stick, και Bi-exponential) (Πίνακας 10). Το στατιστικό πρόγραμμα R χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των παραμέτρων των εξισώσεων των μοντέλων κινητικής και το

σχεδιασμό των διαγραμμάτων. Γενικότερα, τα διφασικά μοντέλα κινητικής χρησιμοποιήθηκαν μόνο στις περιπτώσεις στις οποίες το μοντέλο SFO δεν περιέγραφε με ικανοποιητική ακρίβεια ($\chi^2 > 15\%$) την κινητική αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων.

Πίνακας 10: Οι μαθηματικές εξισώσεις των μοντέλων κινητικής για τη διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων και οι εξισώσεις υπολογισμού του χρόνου ημιζωής τους.

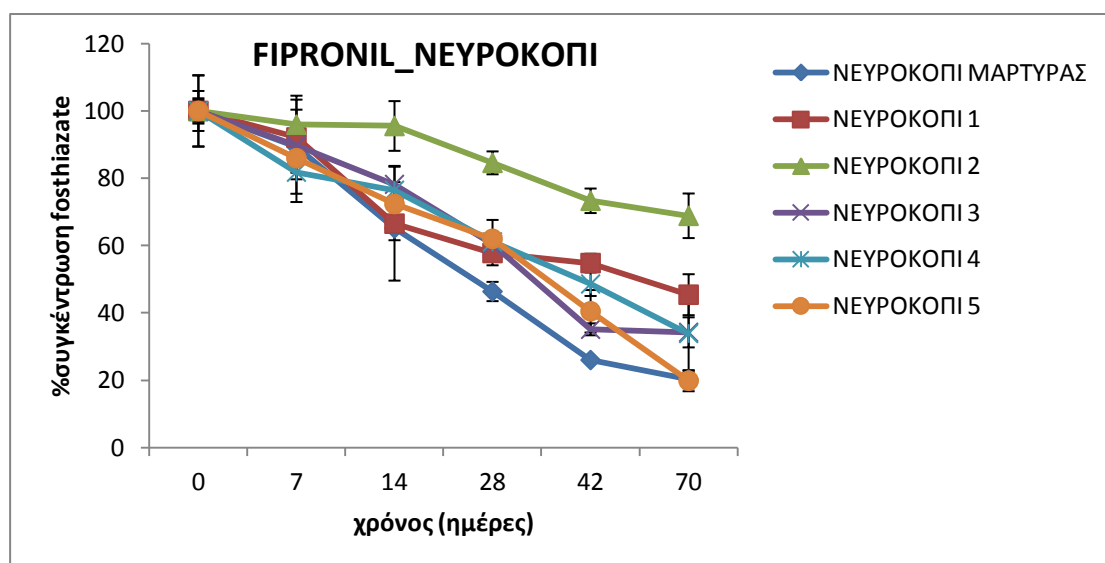
Μοντέλο	Μαθηματική εξίσωση	Υπολογισμός Ημιζωής
Single first order (linear) (SFO)	$C = C_0 e^{-kt}$	$t_{1/2} = \ln 2 / K$
Hockey Stick (HS)	$C = C_0 e^{-k_1 t}$ for $t \leq t_b$ $C = C_0 e^{-k_1 t_b} e^{-k_2 (t - t_b)}$ for $t > t_b$	$t_{1/2} = \ln 2 / K_1$ $t_{1/2} = t_b + (\ln 2 - k_1 t_b) / k_2$
Bi-exponential (DFOP)	$C = C_0 (g e^{-k_1 t} + (1-g) e^{-k_2 t})$	Iterative method

- ❖ Τα δεδομένα αποδόμησης (DT50) των γ.φ. που μελετήθηκαν συσχετίστηκαν με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών και την ύπαρξη ή όχι ιστορικού χρήσης του κάθε γ.φ. (Pearson's correlation test) ώστε να αξιολογηθεί ο ρόλος βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων στην αποδόμηση των γ.φ. που μελετήθηκαν στο έδαφος.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

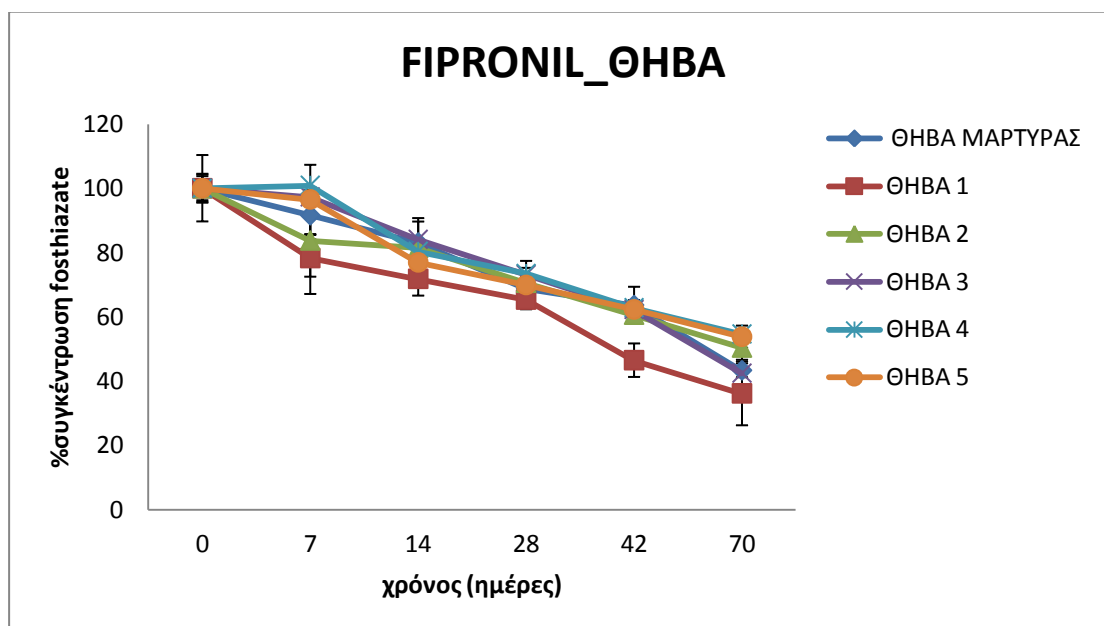
3.1 Αποδόμηση Fipronil

Η αποδόμηση του fipronil στα εδάφη από τις περιοχές Νευροκοπίου , Θήβας και Αρχαγγέλου παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στα Διαγράμματα 3.1.1, 3.1.2 και 3.1.3 αντίστοιχα.



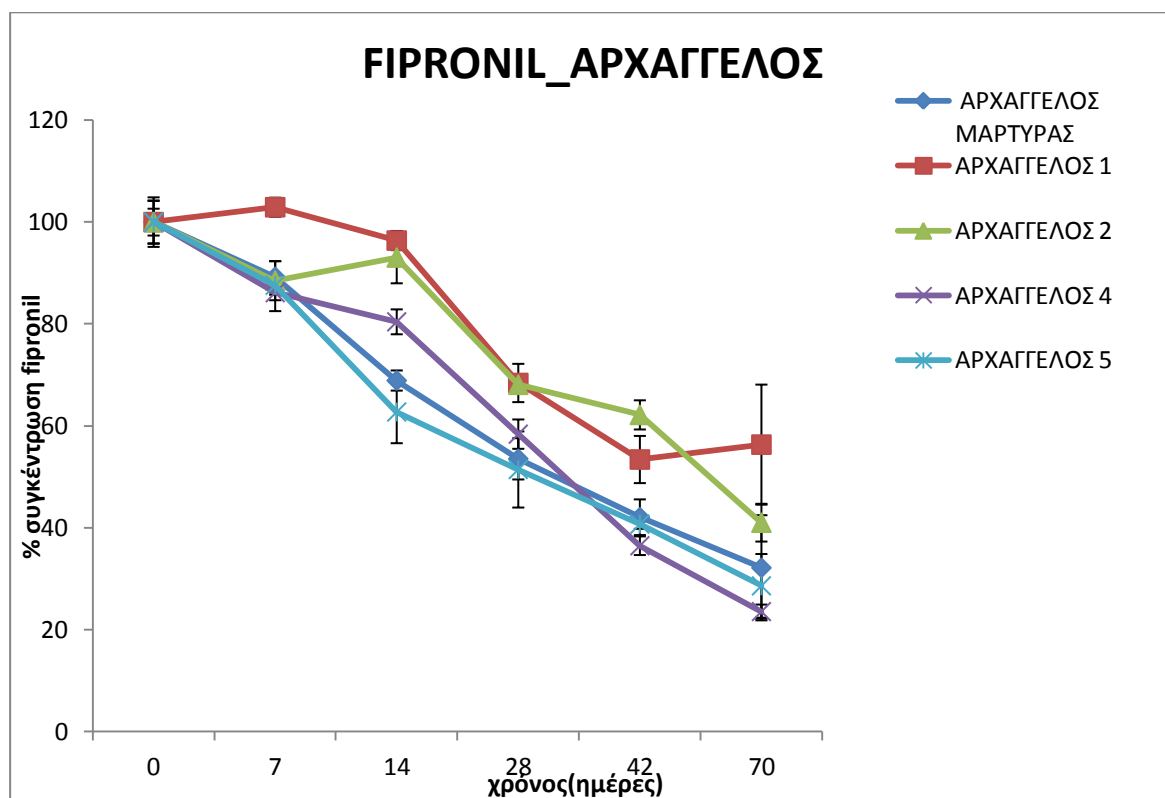
Διάγραμμα 3.1.1 Η αποδόμηση του Fipronil στα εδάφη από το οροπέδιο Νευροκοπίου. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Σε γενικές γραμμές στα εδάφη από το Νευροκόπι παρατηρείται σχετικά αργή αποδόμηση του Fipronil η οποία δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των εδαφών . Εξαιρέση αποτελεί το Νευροκόπι 2 που παρουσιάζει σαφώς πιο αργή αποδόμηση σε σχέση με τα υπόλοιπα εδάφη (με $DT_{50} > 70$ ημέρες). Κύριο χαρακτηριστικό αυτού του εδάφους είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό C (2%). Αντιθέτως ελαφρώς ταχύτερη αποδόμηση παρατηρήθηκε στο έδαφος Νευροκόπι Μάρτυρας αν και κανένα από τα εδάφη του οροπεδίου δεν είχε προηγούμενο ιστορικό έκθεσης σε fipronil



Διάγραμμα 3.1.2 Η αποδόμηση του Fipronil στα εδάφη από την περιοχή της Θήβας. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Στα εδάφη από τη Θήβα, που παρουσιάζουν και τη μεγαλύτερη ομοιογένεια σε σχέση με τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, παρατηρείται σχετικά αργή αποδόμηση του Fipronil. Όλα τα εδάφη παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο αποδόμησης. Όπως και στο Νευροκόπι, έτσι και εδώ δεν υπάρχει ιστορική χρήση για το Fipronil σε κανένα από τα εδάφη.



Διάγραμμα 3.1.3 Η αποδόμηση του Fipronil στα εδάφη από τον Αρχάγγελο. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Ο Αρχάγγελος είναι η μοναδική από τις τρεις περιοχές όπου μελετήθηκαν εδάφη με ιστορικό χρήσης Fipronil (τα A1, A4, A5). Σε δύο εξ αυτών (A4, A5) και στο έδαφος-μάρτυρα παρατηρήθηκε ταχύτερη αποδόμηση του fipronil σε σχέση με τα υπόλοιπα εδάφη της ίδιας περιοχής. Συνολικά στα εδάφη από τον Αρχάγγελο παρατηρήθηκε ταχύτερη αποδόμηση σε σχέση με τα εδάφη της Θήβας και του Νευροκοπίου.

3.1.1 Προσδιορισμός των παραμέτρων κινητικής για την αποδόμηση του Fipronil στα εδάφη που μελετήθηκαν

Η αποδόμηση του Fipronil σε όλα τα εδάφη περιγράφεται ικανοποιητικά από το κινητικό μοντέλο SFO (Single first order) με τιμές $\chi^2 < 15\%$. Στους Πίνακες 11, 12 και 13 παρουσιάζονται οι τιμές του DT50 και οι λοιπές παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του fipronil σε κάθε ένα από τα εδάφη που μελετήθηκαν.

Πίνακας 11. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του Fipronil στα εδάφη του Νευροκοπίου σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής SFO.

Έδαφος	k (day ⁻¹)	DT50 (days)	DT90 (days)	χ^2 (%)
Νευροκόπι 1	0,013±0,005	52,4±7,5	174,1±25,0	8,5
Νευροκόπι 2	0,006±0,003	116,2±12,6	385,9±41,8	2,4
Νευροκόπι 3	0,019±0,003	36,3±3,3	120,6±10,9	6,3
Νευροκόπι 4	0,016±0,003	43,6±17,8	144,9±39,0	3,0
Νευροκόπι 5	0,021±0,002	33,1±1,6	110,0±5,4	3,9
Μάρτυρας Νευροκόπι	0,028±0,005	24,5±2,5	81,3±8,5	5,9

Πίνακας 12. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του Fipronil στα εδάφη της Θήβας σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO).

Έδαφος	k (day ⁻¹)	DT50 (days)	DT90 (days)	χ^2 (%)
Θήβα 1	0,015±0,003	46,3±11,1	153,6±36,9	5,6
Θήβα 2	0,001±0,000	69,9±13,6	232,2±45,1	3,5
Θήβα 3	0,012±0,001	57,1±10,2	189,7±33,9	2,0
Θήβα 4	0,010±0,002	70,0±7,3	232,6±7,9	4,9
Θήβα 5	0,010±0,002	69,7±5,1	231,5±16,9	5,1
Θήβα μάρτυρας	0,012±0,002	59,3±7,9	197,1±26,5	1,8

Πίνακας 13. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του fipronil στα εδάφη του Αρχαγγέλου σύμφωνα με το μοντέλο SFO .

Έδαφος	k (day ⁻¹)	DT50 (days)	DT90 (days)	χ^2 (%)
Αρχάγγελος 1	0,015±0,002	74,4±4,4	157,4±14,7	5,9
Αρχάγγελος 2	0,012±0,002	56,3±3,8	187,1±12,7	4,3
Αρχάγγελος 4	0,021±0,002	32,6±0,8	108,3±2,6	3,9
Αρχάγγελος 5	0,021±0,004	33,1±2,4	110,0±8,1	6,7
Αρχάγγελος μάρτυρας	0,019±0,003	35,6±6,7	118,3±22,2	5,6

- ❖ Γενικά το Fipronil παρουσίασε και στις τρεις περιοχές (Θήβα , Νευροκόπι , Αρχάγγελος) μέτρια ως υψηλή υπολειμματικότητα. Η μικρότερη τιμή DT₅₀ παρατηρήθηκε στο Έδαφος Νευροκόπι μάρτυρας (24,5 ημέρες) και η υψηλότερη και πάλι στην περιοχή του Νευροκοπίου στο έδαφος Νευροκόπι 2 (116±12,6 ημέρες). Ο μ.ο. DT₅₀ στο σύνολο των εδαφών ήταν **53,6** ημέρες. Όσον αφορά την κάθε περιοχή ξεχωριστά οι μεγαλύτερες τιμές DT₅₀ παρατηρούνται στη Θήβα με μέσο όρο DT₅₀ **62,1** ημέρες. Ακολουθεί το Νευροκόπι με μ.ο DT₅₀ **51** ημέρες και ο Αρχάγγελος με μ.ο DT₅₀ **46,4** ημέρες .

3.1.2 Συσχέτιση DT₅₀ του Fipronil με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν

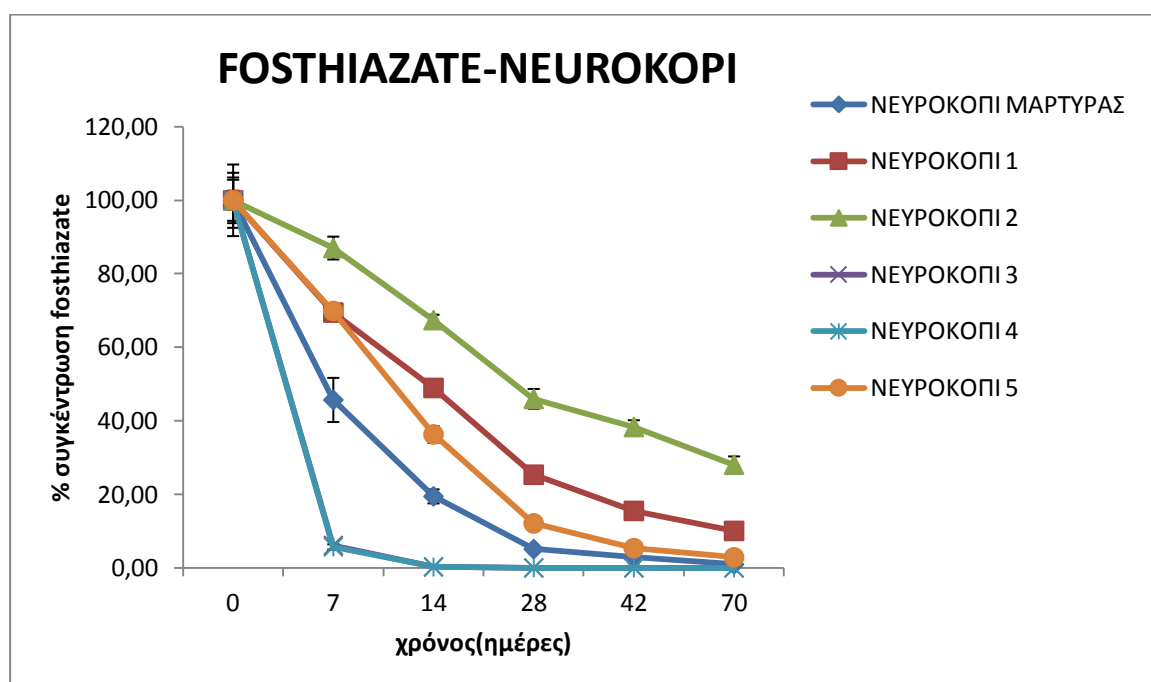
Η στατιστική ανάλυση (Pearson correlation test) ανάμεσα στην τιμή DT₅₀ και στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν δεν έδειξε κάποια σημαντική συσχέτιση (P > 0,05) (Πίνακας 14).

Πίνακας 14. Συσχετίσεις (Pearsons Correlation Test) μεταξύ DT50 του Fipronil και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών που μελετήθηκαν

		pH	Οργανικός C	Άργιλος	Ίλος	Άμμος
DT50	Συντελεστής Συσχέτισης (r)	-0,086	-0,347	-0,040	-0,287	0,224
	Πιθανότητες (P)	0,743	0,172	0,879	0,264	0,388

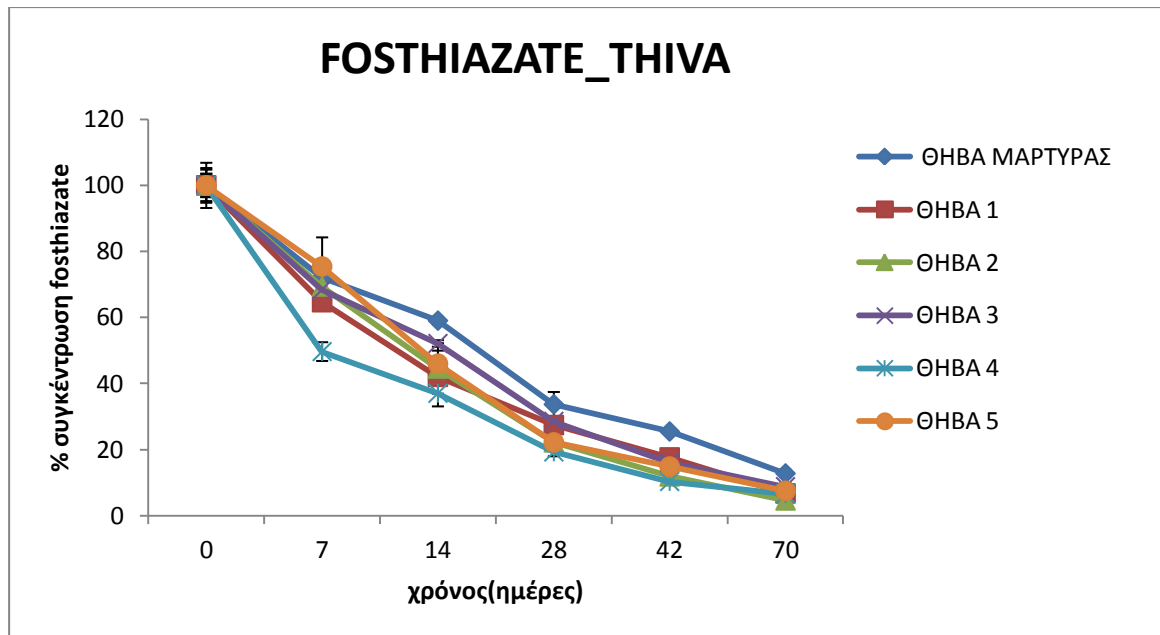
3.2 Αποδόμηση Fosthiazate

Η αποδόμηση του fosthiazate στα εδάφη από τις περιοχές Νευροκοπίου , Θήβας και Αρχαγγέλου παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στα Διαγράμματα 3.2.1, 3.2.2 και 3.2.3 αντίστοιχα.



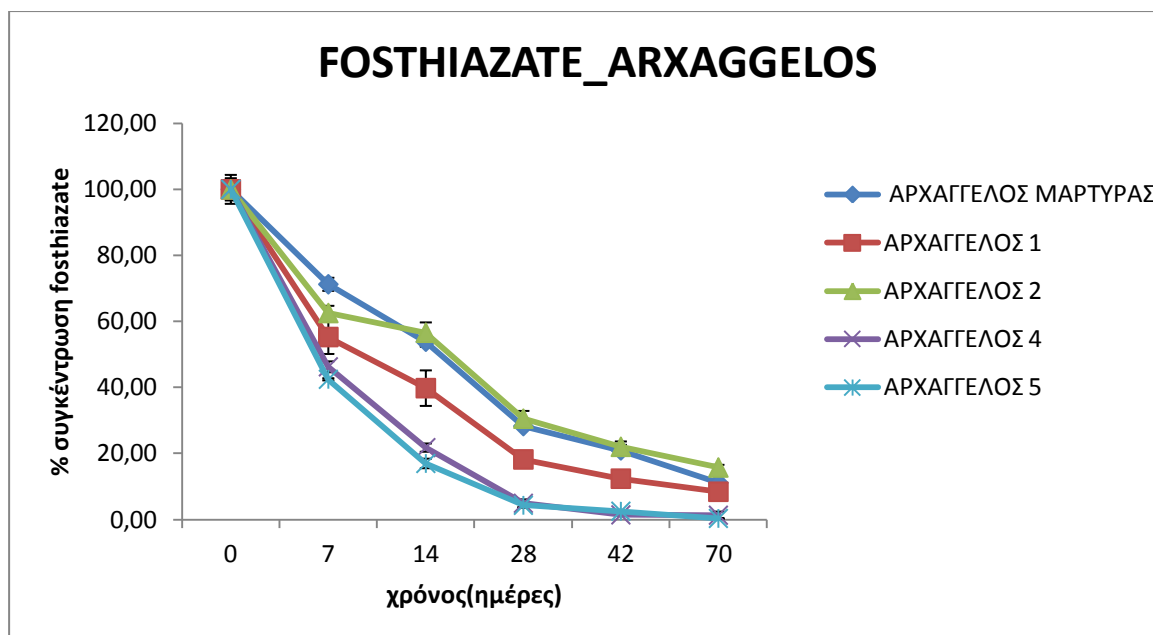
Διάγραμμα 3.2.1 Η αποδόμηση του Fosthiazate στα εδάφη από το οροπέδιο Νευροκοπίου. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Το πιο ενδιαφέρον στοιχείο όσον αφορά την αποδόμηση του Fosthiazate στα εδάφη από το οροπέδιο του Νευροκοπίου είναι η ταχύτερη αποδόμηση του νηματωδοκτόνου στα εδάφη N3 και N4. Σε αυτά τα εδάφη (που παρουσιάζουν ιστορικό χρήσης του Fosthiazate) παρατηρείται σχεδόν πλήρης αποδόμηση ήδη στις πρώτες 7 ημέρες (t7) . Από εκεί και πέρα ενδιαφέρον εύρημα επίσης είναι και η σχετικά ταχεία αποδόμηση που παρατηρείται στο έδαφος Νευροκόπι-μάρτυρα. Από την άλλη αρκετά πιο αργή σε σχέση με τα υπόλοιπα εδάφη είναι η αποδόμηση στο έδαφος Νευροκόπι 2. Να σημειωθεί ότι εκτός από το ΝΕΥΡΟΚΟΠΙ 1 (και το μάρτυρα) σε όλα τα υπόλοιπα εδάφη έχουμε ιστορικό χρήσης του Fosthiazate.



Διάγραμμα 3.2.2 Η αποδόμηση του Fosthiazate στα εδάφη από την περιοχή της Θήβας. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Στα εδάφη της Θήβας παρατηρούμε ένα κοινό πρότυπο βαθμιαίας αποδόμησης του Fosthiazate χωρίς ιδιαίτερες αποκλείσεις . Στις 70 ημέρες (t70) παρατηρούμε σχεδόν πλήρη αποδόμηση του στα εδάφη . Κανένα από τα εδάφη της Θήβας δεν έχει ιστορικό χρήσης Fosthiazate .



Διάγραμμα 3.2.3 Η αποδόμηση του Fosthiazate στα εδάφη από τον Αρχάγγελο. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Στον Αρχάγγελο παρατηρούμε μια πιο γρήγορη αποδόμηση του Fosthiazate στα εδάφη Αρχάγγελος 4 και 5 σε σχέση με τα υπόλοιπα εδάφη κατ'αντιστοιχία με την ταχύτερη αποδόμηση του fipronil στα ίδια εδάφη. Στα εδάφη αυτά το γ.φ. έχει σχεδόν αποδομηθεί πλήρως ήδη στις 28 ημέρες (t28). Το αντίθετο μοτίβο παρουσιάζουν τα εδάφη Αρχάγγελος 2 (με όξινο pH) και αρχάγγελος μάρτυρας τα οποία παρουσιάζουν μια αρκετά πιο βραδεία αποδόμηση του Fosthiazate.

3.2.1 Προσδιορισμός των παραμέτρων κινητικής για την αποδόμηση του Fosthiazate στα εδάφη που μελετήθηκαν

Η αποδόμηση του Fosthiazate σε όλα τα εδάφη περιγράφεται επίσης ικανοποιητικά από το κινητικό μοντέλο SFO (Single first order). Επομένως αυτό το μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των τιμών DT_{50} και DT_{90} του συνόλου των εδαφών. Στους Πίνακες 15, 16 και 17 παρουσιάζονται οι τιμές του DT_{50} και οι λοιπές παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του fosthiazate σε κάθε ένα από τα εδάφη που μελετήθηκαν.

Πίνακας 15. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του fosthiazate στα εδάφη του Νευροκοπίου σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής SFO .

Έδαφος	k (day ⁻¹)	DT50 (days)	DT90 (days)	χ^2 (%)
Νευροκόπι 1	0,047±0,005	14,7±0,8	48,9±2,6	5,3
Νευροκόπι 2	0,023±0,003	30,8±2,4	102,3±7,9	6,1
Νευροκόπι 3	0,399±0,022	1,7±0,1	5,8±0,2	0,2
Νευροκόπι 4	0,409±0,068	1,7±0,1	5,6±0,3	0,2
Νευροκόπι 5	0,068±0,007	10,1±0,2	33,6±0,6	7,2
Μάρτυρας Νευροκόπι	0,113±0,055	10,5±0,6	30,3±1,8	2,9

Πίνακας 16. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του fosthiazate στα εδάφη της Θήβας σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής SFO .

Έδαφος	k (day ⁻¹)	DT50 (days)	DT90 (days)	χ^2 (%)
Θήβα 1	0,049±0,006	14,1±1,0	46,7±3,5	8,2
Θήβα 2	0,054±0,005	12,9±1,1	42,7±3,7	2,9
Θήβα 3	0,044±0,004	15,7±0,2	52,1±0,8	4,3
Θήβα 4	0,069±0,012	10,1±0,9	33,4±3,0	12,2
Θήβα 5	0,050±0,004	13,8±0,3	45,8±0,9	6,1
Θήβα μάρτυρας	0,035±0,003	19,9±1,5	66,3±4,9	5,0

Πίνακας 17. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του fosthiazate στα εδάφη του Αρχάγγελου σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής SFO .

Έδαφος	k (day ⁻¹)	DT50 (days)	DT90 (days)	χ^2 (%)
Αρχάγγελος 1	0,063±0,010	11,0±1,3	36,5±4,3	10,0
Αρχάγγελος 2	0,037±0,006	18,6±1,1	61,8±3,7	10,1
Αρχάγγελος 4	0,109±0,004	6,3±0,1	21,1±0,1	1,5
Αρχάγγελος 5	0,123±0,006	5,6±0,2	18,7±0,5	2,8
Αρχάγγελος μάρτυρας	0,041±0,004	17,0±0,5	56,5±1,7	5,4

❖ Γενικά το Fosthiazate παρουσίασε στα εδάφη και των τριών περιοχών σχετικά γρήγορη αποδόμηση με τις τιμές DT₅₀ να κυμαίνονται από **1,7** ημέρες (Νευροκόπι 3 και 4) έως **30,8** ημέρες (Νευροκόπι 2) . Ο μ.ο. DT₅₀ στο σύνολο των εδαφών ήταν **12,4** ημέρες . Όσον αφορά την κάθε περιοχή ξεχωριστά οι υψηλότερες τιμές DT50 καταγράφηκαν στα εδάφη από τη Θήβα (μέση τιμή DT₅₀ = 14,4 ημέρες) και ακολουθούν τα εδάφη από τον Αρχάγγελο (DT50 = 11,7 ημέρες) και το Νευροκόπι (DT50 = 11,9 ημέρες) .

3.2.2 Συσχέτιση DT₅₀ του Fosthiazate με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν

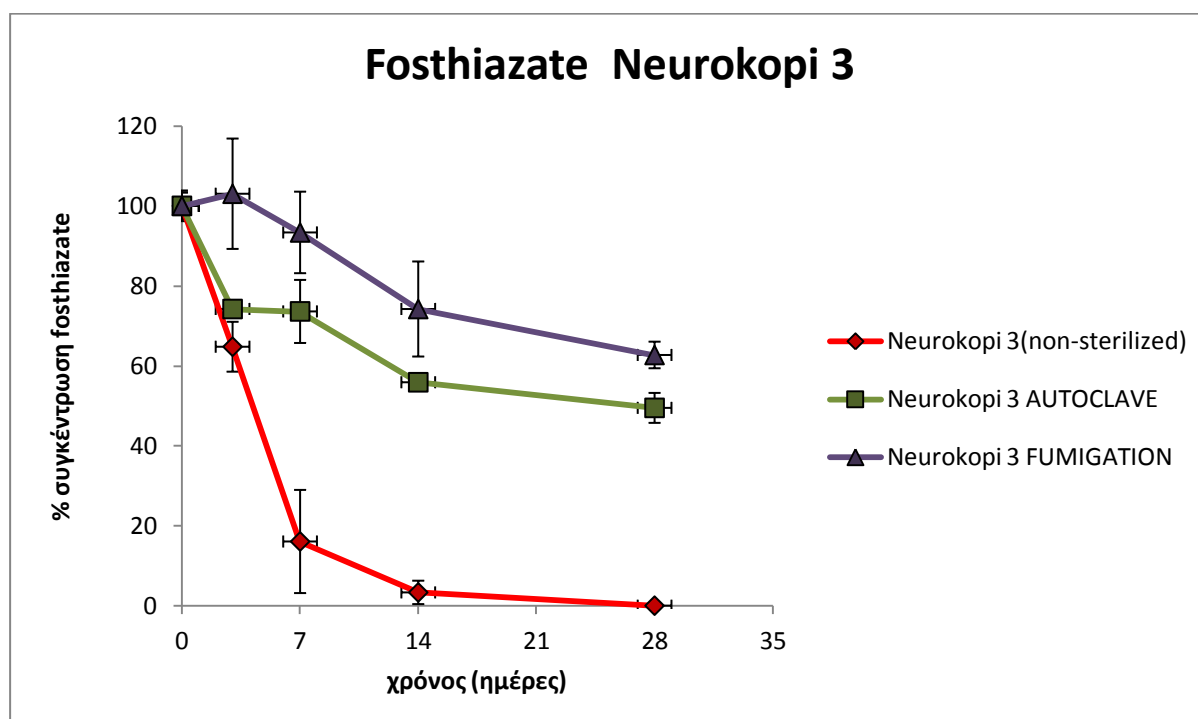
Όπως και με το Fipronil , καμία σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στις τιμές DT₅₀ του Fosthiazate και στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης (Pearson correlation test) παρουσιάζονται στον πίνακα 18 .

Πίνακας 18. Συσχετίσεις (Pearsons Correlation Test) μεταξύ DT50 του Fosthiazate και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών που μελετήθηκαν

		pH	Οργανικός C	Άργιλος	Ίλος	Άμμος
DT50	Συντελεστής Συσχέτισης (r)	-0,148	-0,341	0,112	-0,122	-0,010
	Πιθανότητες (P)	0,570	0,181	0,668	0,642	0,968

3.3 Αποδόμηση Fosthiazate σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη

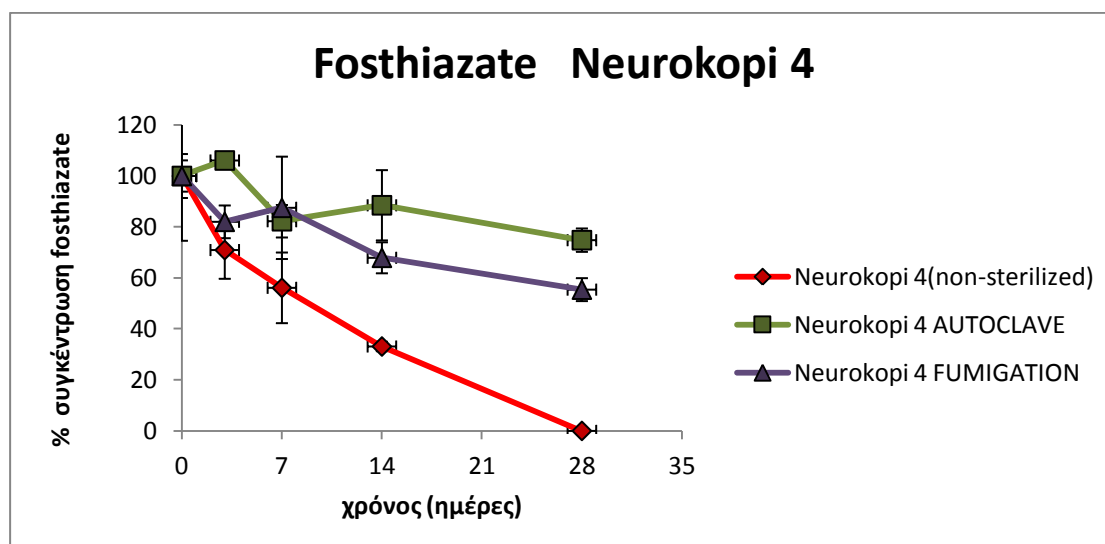
Η αποδόμηση του fosthiazate σε αποστειρωμένα (με καπνισμό και αποστείρωση στον κλίβανο) και σε μη αποστειρωμένα δείγματα από τα εδάφη Νευροκόπι 3 και Νευροκόπι 4 που αρχικά εμφάνισαν ταχύτερη αποδόμηση του fosthiazate παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στα Διαγράμματα 3.3.1 και 3.3.2 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3.2.1 Η αποδόμηση του Fosthiazate στο έδαφος Νευροκόπι 3 (αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Παρατηρούμε μια ξεκάθαρη διαφορά στην ταχύτητα αποδόμησης του Fosthiazate στο μη αποστειρωμένο έδαφος Νευροκόπι 3 σε σχέση με τα δύο αποστειρωμένα δείγματα. Στο πρώτο στις 14 ημέρες το fosthiazate έχει ήδη σχεδόν αποδομηθεί πλήρως ενώ στα δύο αποστειρωμένα εδάφη ακόμα και μετά από 28 ημέρες παρατηρούμε μειωμένη αποδόμηση και σημαντική συγκέντρωση του φαρμάκου στο έδαφος. Μεταξύ των δύο μεθόδων αποστείρωσης, η αποστείρωση με καπνισμό

(fumigation) περιόρισε πιο αποτελεσματικά την αποδόμηση του fosthiazate σε σχέση με τα δείγματα εδάφους που αποστειρώθηκαν στον κλίβανο (autoclave).



Διάγραμμα 3.2.2 Η αποδόμηση του Fosthiazate στο έδαφος Νευροκόπι 4 (αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Όπως και στο Νευροκόπι 3, έτσι και στο Νευροκόπι 4 παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη αποδόμηση στο μη αποστειρωμένο δείγμα εδάφους σε σχέση με τα αποστειρωμένα δείγματα. Σε αντίθεση με το Νευροκόπι 3 εδώ παρατηρείται πιο αργή αποδόμηση στο θερμικά αποστειρωμένο έδαφος (autoclave) σε σχέση με έδαφος που αποστειρώθηκε με καπνισμό (fumigated).

3.3.1 Προσδιορισμός του DT_{50} του fosthiazate στα εδάφη που μελετήθηκαν

Χρησιμοποιώντας το κινητικό μοντέλο SFO (Single first order) υπολογίστηκαν οι τιμές DT_{50} του fosthiazate στα εδάφη Νευροκόπι 3 και 4 , οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 18 .

Πίνακας 18. Οι τιμές DT_{50} του fosthiazate για τα εδάφη Νευροκόπι 3 και Νευροκόπι 4 όπως προσδιορίστηκαν σύμφωνα με το σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής SFO.

Εδάφη	ΝΕΥΡΟΚΟΠΙ 3			ΝΕΥΡΟΚΟΠΙ 4		
	Non-sterilized	AUTOCLAVE	FUMIGATION	Non-sterilized	AUTOCLAVE	FUMIGATION
DT_{50}	3,4	26,7	36,5	7,8	62,5	33,6

- ❖ Συνολικά η ταχύτητα αποδόμησης στα μη αποστειρωμένα εδάφη Νευροκόπι 3 και 4 παρουσιάζεται και πάλι υψηλή με τιμές DT_{50} 3,4 και 7,8 ημέρες σε σύγκριση με τα αποστειρωμένα εδάφη όπου στα δύο εδάφη οι τιμές DT_{50} κυμάνθηκαν από 26,7 ως 62,5 ημέρες .

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η αποδόμηση του νηματωδοκτόνου Fosthiazate και του εντομοκτόνου Fipronil σε εδάφη από περιοχές καλλιέργειας πατάτας στην Ελλάδα (Θήβα , Οροπέδιο Νευροκοπίου και Αρχάγγελος) όπου τα συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ή πρόκειται να εισαχθεί η χρήση τους. Σκοπός της έρευνας ήταν να εξετάσει την υπολειμματικότητα των fosthiazate , fipronil σε αυτά τα εδάφη, όπως και την ύπαρξη επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης . Στο δεύτερο μέρος αυτής της μελέτης εστίασαμε ακριβώς εκεί, στη διερεύνηση ύπαρξης επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης για το fosthiazate σε δύο συγκεκριμένα εδάφη (Νευροκόπι 3 , Νευροκόπι 4) στα οποία παρατηρήθηκε στο αρχικό πείραμα ταχύτατη αποδόμηση του fosthiazate.

4.1.1 Fipronil

Όσον αφορά το fipronil , η ανάλυση των εδαφών και από στις τρεις περιοχές έδειξε σχετικά αργούς ρυθμούς αποδόμησης. Η χαμηλότερη τιμή DT_{50} ήταν 24,5 ημέρες στο έδαφος Νευροκόπι μάρτυρας και η μεγαλύτερη 116 ημέρες και πάλι στην περιοχή του Νευροκοπίου , στο έδαφος Νευροκόπι 2 . Ενώ η μέση τιμή DT_{50} στο σύνολο των εδαφών ήταν 53,6 ημέρες . Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες ^{(11) (12) (13)} στις οποίες το εύρος των τιμών DT_{50} κυμαίνεται από 9-210 ημέρες . Όσον αφορά την κάθε περιοχή ξεχωριστά , η μεγαλύτερη μέση τιμή DT_{50} παρατηρείται στη Θήβα (62,1 ημέρες) και ακολουθούν το Νευροκόπι (51 ημέρες) και ο Αρχάγγελος (46,4 ημέρες) . Βλέπουμε ότι δεν υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις ανάμεσα στα εδάφη της Θήβας και του Νευροκοπίου που δεν είχαν ιστορικό χρήσης του fipronil και στον Αρχάγγελο στον οποίο είχαμε χρήση του φαρμάκου σε τρία από τα δείγματα εδάφους . Επιπλέον τα εδάφη με ιστορικό χρήσης στον Αρχάγγελο (A1,A4,A5) δεν επέδειξαν κάποιο ιδιαίτερο πρότυπο αυξημένης αποδόμησης του γεωργικού φαρμάκου σε σχέση με τον μάρτυρα και το έδαφος A2 (χωρίς ιστορικό χρήσης) . Γενικά λοιπόν με βάση τα παραπάνω μπορούμε να πούμε ότι και στις τρεις περιοχές το fipronil παρουσίασε μέση

υπολειμματικότητα ενώ δεν παρατηρήθηκε πουθενά κάποια ένδειξη επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης . Παρόλα αυτά η σχετικά πρόσφατη εισαγωγή του fipronil στην καλλιέργεια πατάτας δεν επέτρεψε την ύπαρξη εδαφών με μεγάλο ιστορικό χρήσης (αφού και στα εδάφη του Αρχάγγελου η χρήση του γεωργικού φαρμάκου έγινε πρόσφατα) προκειμένου να έχουμε πιο ασφαλή συμπεράσματα για τη συμπεριφορά του φαρμάκου .

Στατιστική ανάλυση για την διακρίβωση πιθανών συσχετίσεων ανάμεσα στις τιμές DT_{50} και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εδάφους δεν έδειξε κάποια ουσιαστική συσχέτιση παρά το γεγονός ότι προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της υπολειμματικότητας του fipronil και της περιεκτικότητας των εδαφών σε οργανικό άνθρακα (Ajajoud et al. , 2003) και με την μηχανική σύσταση του εδάφους (Mandal et al. ,2012) .

4.1.2 Fosthiazate

Η ανάλυση των δειγμάτων και από τις τρεις περιοχές έδειξε μια σχετικά γρήγορη αποδόμηση του Fosthiazate τόσο στην περιοχή του Νευροκοπίου όπου είχαμε εδάφη με ιστορικό χρήσης, όσο και στον Αρχάγγελο και τη Θήβα όπου δεν έχουμε χρήση του fosthiazate, έχοντας όμως ιστορικό χρήσης άλλων οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων όπως τα chlorpyrifos και ethoprophos . Η μεγαλύτερη τιμή DT_{50} παρατηρήθηκε στο Νευροκόπι 2 (30,8 ημέρες) ενώ η μικρότερη στα εδάφη Νευροκόπι 3 και 4 (1,7 ημέρες). Η μέση τιμή DT_{50} στο σύνολο των εδαφών ήταν 12,4 ημέρες. Τα αποτελέσματα αυτά οριακά συμφωνούν με τις τιμές προηγούμενων μελετών. Για παράδειγμα οι Pantelelis et al. (2006) αναφέρουν τιμές DT_{50} που κυμαίνονται από 14-57 ημέρες , ενώ παρόμοιες τιμές DT_{50} αναφέρονται και από τους Qin et al. (2004) .

Όσον αφορά πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της υπολειμματικότητας του fosthiazate (DT_{50}) με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών η στατιστική ανάλυση (Pearson correlation test) δεν έδειξε κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα. Αυτό έρχεται σε αντιδιαστολή με μελέτες που δείχνουν ότι η υπολειμματικότητα του

fosthiazate αυξάνεται με την αύξηση του οργανικού φορτίου (Pantelidis et al. ,2006) και μειώνεται σε αλκαλικά εδάφη (Qin et al. ,2004) .

Αναμφίβολα από τα εδάφη που αναλύθηκαν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα δείγματα από τους αγρούς Νευροκόπι 3 και 4 στα οποία παρατηρήθηκε ταχύτερη αποδόμηση του fosthiazate με τιμή DT₅₀ μόλις 1,7 ημέρες . Αξίζει να σημειωθεί ότι και τα δύο αυτά εδάφη είχαν ιστορικό χρήσης του fosthiazate και μάλιστα ο παραγωγός παρατήρησε μειωμένη αποτελεσματικότητα κατά τη πιο πρόσφατη χρήση του συγκεκριμένου γεωργικού φαρμάκου. Όλα τα παραπάνω ,σε συνδυασμό με την απουσία συσχέτισης ανάμεσα στην τιμή DT₅₀ και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους, μας οδήγησαν στην υπόθεση της επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης, την οποία και εξετάσαμε στη συνέχεια της μελέτης . Μάλιστα εδώ να σημειωθεί ότι, όπως αναφέρεται και εισαγωγικά, μέχρι την παρούσα μελέτη δεν έχει αναφερθεί ευαισθησία του Fosthiazate σε επιταχυνόμενη μικροβιακή διάσπαση .

4.1.3 Αποδόμηση του Fosthiazate σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη

Προκειμένου να ενισχύσουμε την υπόθεση ότι η ταχεία αποδόμηση του Fosthiazate στα εδάφη Νευροκόπι 3 και 4 οφείλεται σε επιταχυνόμενη μικροβιακή διάσπαση και όχι σε αβιοτικούς παράγοντες μελετήσαμε την αποδόμηση του σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα δείγματα από τα εδάφη αυτά. Τα αποτελέσματα έδειξαν τόσο η θερμική αποστείρωση (αυτόκαυστο) όσο η αποστείρωση των εδαφών με καπνισμό με χλωροφόρμιο οδήγησε σε σημαντική επιβράδυνση της αποδόμησης του fosthiazate και στα δύο εδάφη επιβεβαιώνοντας σε μεγάλο βαθμό την αρχική μας υπόθεση για την εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης για πρώτη φορά για το fosthiazate.

4.2 Συμπεράσματα-Επίλογος

Συμπερασματικά για την παρούσα μελέτη θα μπορούσαμε να αναφέρουμε τα εξής:

- Όσον αφορά το fipronil, φαίνεται ότι παρουσιάζει μέτρια υπολειμματικότητα στα εδάφη των περιοχών που μελετήθηκαν και η αποδόμηση του δεν επηρεάζεται από το προηγούμενο ιστορικό χρήσης των εδαφών . Ωστόσο λόγω της πρόσφατης εισαγωγής του Fipronil στην καλλιέργεια της πατάτας στην Ελλάδα , περαιτέρω μελέτες εφόσον και όταν καθιερωθεί η χρήση του θα οδηγήσουν σε πιο ασφαλή συμπεράσματα
- Το fosthiazate από την άλλη παρουσίασε γενικά μέτρια έως χαμηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη , τόσο σε αυτά που είχαν ιστορικό χρήσης όσο και σε όσα δεν είχαν ιστορικό χρήσης .Το σημαντικότερο , χωρίς αμφιβολία εύρημα ήταν η ταχύτατη αποδόμηση του fosthiazate σε δύο εδάφη (N3,N4) από την περιοχή του Νευροκοπίου με ιστορικό χρήσης του συγκεκριμένου νηματωδοκτόνου και αναφορές μειωμένης αποτελεσματικότητας από τον παραγωγό
- Η επιβεβαίωση της μικροβιακής φύσης της ταχύτατης αποδόμησης του Fosthiazate στα εδάφη N3 και N4 , μετά από μελέτη της αποδόμησης του σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη ενίσχυσε σημαντικά την αρχική υπόθεση για την ύπαρξη επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης. Μετέπειτα μελέτη στο εργαστήριο (ΒΑΓΓΕΛΗΣ ΒΙΔΙΑΔΑΚΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ) με επαναλαμβανόμενες εφαρμογές σε δείγματα εδαφους από τα N3 και N4 έδειξαν αύξηση της ταχύτητας αποδόμησης μετά από κάθε εφαρμογή. Αυτά τα αποτελέσματα σε συνδυασμό με τα παραπάνω μας δίνουν την πρώτη αποδεδειγμένη περίπτωση επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης του fosthiazate . Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την απομόνωση μικροοργανισμών υπεύθυνων για την αποδόμηση του νηματωδοκτόνου .

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **A. Aajoud, P. Ravanel and M. Tissut:** Fipronil Metabolism and Dissipation in a Simplified Aquatic Ecosystem J. Agric. Food Chem. 51, 1347–1352 (2003).
2. **Accineli C., Dinelli G., Vicari A., Catizone P.,** (2001). Atrazine and metabolachlor degradation in subsoil. Biology and Fertility of Soils 33: 495 500.
3. **Ahmad, R., Nelson, P.N., Kookana, R.S.,** 2006. The molecular composition of soil organic matter as determined by ¹³C NMR and elemental analyses and correlation with pesticide sorption. Eur. J. Soil Sci. 57,883–893.

4. **Aislabie J., and Lioyd-Jones G.**, (1995). A Review of Bacterial Degradation of Pesticides. *Australian Journal of Soil Research*. 33, 925-942.
5. **Alexander M.** (1999), "Biodegradation and Bioremediation", Second Edition, Ithaca, New York: Academic Press, ISBN 0-12-049861-8.
6. **Anderson J.P.E., Nevermann K. and Haidt H.**, (1998.) Accelerated microbial degradation of nematicides in soils: Problem and its management. In: *Proceedings of the XII Acorbat Meeting*. Guayaquil, Ecuador, pp 568-57.
7. **Arbeli Z., Fuentes C.L.** (2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions: and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*, 26: 1733-1746.
8. **Arias-Estevez, M., Soto-Gonzalez, B., Lopez-Periago, E., Cancho-Grande, B., Simal-Gandara, J.**, 2005a. Atrazine sorption dynamics in organic matter rich-soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 264–271.
9. **Arias-Estevez, M., Torrente, A.C., Lopez-Periago, E., Soto-Gonzalez, B., Simal-Gandara, J.**, 2005b. Adsorption–desorption dynamics of cyprodinil and fludioxonil in vineyard soils. *J. Agric. Food Chem.* 53 (14), 5675–5681.
10. **Bollag J.M. and Liu S.Y.**, (1990). Biological transformation processes of pesticides, in *Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling*. Soil Science Society of America. 169-261.
11. **Burns, R. G.** Microbial control of pesticide persistence in soil. In *The Persistence of Insecticides and Herbicides*; Beynon, K., Ed.; British Crop Protection Council Publications: London, U.K., 1976; pp 229-239.
12. **A. Bobe, C. M. Coste and J.-F. Cooper**: Factors Influencing the Adsorption of Fipronil on Soils. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4861–4865 (1997).
13. **A. Bobe, P. Meallier, J.-F. Cooper and C. M. Coste**: Kinetics and Mechanisms of Abiotic Degradation of Fipronil. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2834–2839 (1998).
14. **Chapman, R.A., Harris, C.R.** (1990) Enhanced degradation of insecticides in soils. In: *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*, American Chemical Society, Washington, DC, pp 82-96.
15. **Coquet, Y.**, 2003. Sorption of pesticide atrazine, isoproturon, and metolachlor in the Vadose Zone. *Vadose Zone J.* 2, 40–51.
16. **De Jonge, R.J., Breure, A.M., van Andel, J.G.**, 1996. Reversibility of adsorption of aromatic compounds onto powdered activated carbon (PAC). *Water Res.* 30 (4), 883–892.
17. **Di H.J., Aylmore L.A.G. and Kookana R.S.** (1998). Degradation rates of eight pesticides in surface and subsurface soils under laboratory and field conditions. *Soil Science* 163: 404-411.
18. **Felsot A.S.** (1989). Enhanced biodegradation of insecticides in soil: implications for agroecosystems. *Annual Review of Entomology* 34: 453-476.
19. **Felsot A.S., Shelton D.R.** (1993). Enhanced biodegradation of soil pesticides: Interactions between physicochemical process and microbial ecology. *SSSA Special Publication* 32: 227-251.
20. **FOCUS** (2006). Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration, Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version, 2.0, 2006, 434 pp.

21. United states environment agency EPA- Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Conditional Registration of the pesticide fosthiazate
22. European Commision Health & Consumer Protection Directorate-General. Conditional Registration of the pesticide fipronil
23. **D. Hainzl and J. E. Casida:** Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 12764–12767 (1996).
24. **Karpouzas, D.G., Singh, B.K.,** 2006. Phosphorus containing xenobiotics: microbial degradation, metabolic pathways and molecular basis. *Adv. Microb. Physiol.* 51, 119–186.
25. **Dimitrios G. Karpouzas, Ioannis Pantelelis, Urania Menkissoglu-Spiroudi, Evangelia Golia, Nikolas G. Tsiropoulos** (2007) . Leaching of the organophosphorus nematicide Fosthiazate. *Chemosphere* 68 (2007) 1359–1364
26. **Kumar R, Singh B, Gupta VK.** (2012) . Biodegradation of fipronil by *Paracoccus* sp. in different types of soil. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2012 May;88(5):781-7.
27. **Kookana R. S., Baskaran S., and Naidu R.,** (1998). Pesticide fate and behaviour in Australian soils in relation to contamination and management of soil and water: a review, *Australian Journal of Soil Research.* 36, 715-764.
28. **Kuo, J.** (1999). *Practical Design Calculations for Groundwater and Soil remediation.* Lewis Publishers, USA.
29. **Levanon D.,** (1993). Roles of Fungi and Bacteria in the mineralization of pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biology & Biochemistry.* 25, 1097-1105.
30. **Linn, D.M., Carski, T.H., Brusseau, M.L., Chang, F.H. (Eds.),** 1993. Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil. *Soil Science Society of America, Madison, WI,* p. 260.
31. **Mandal K and Singh B,** Persistence of fipronil and its metabolites in sandy loam and clay loam soils under laboratory conditions. *Chemosphere* 91:1596–1603 (2013).
32. **Mandal K¹, Singh B, Jariyal M, Gupta VK.** (2013) . Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicol Environ Safety.* 2013 July 93:87-92.
33. **Malato S., Caceres J., Agüera A., Mezcua M., Hernando D., Vial J., Fernandez-Alba A.R.,** (2001). Degradation of imidacloprid in water by photo-Fenton and TiO₂ photocatalysis at a solar pilot plant: A comparative study, *Environmental Science and Technology,* 35, 4359-4366.
34. **K. K. Ngim and D. G. Crosby:** Abiotic processes influencing fipronil and desthiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 972–977 (2001).
35. **G. J. Oliver, E. G. Cosgrove and J. H. Carey:** Effect of suspended sediments on the *photolysis* of organics in water. *Environ. Sci. Tech- nol.* 13, 1075–1077 (1979).
36. **Osborn RK, Edwards SG, Wilcox A and Haydock PPJ ,** Potential enchacement of degradation of the nematicides aldicarb , oxamyl and fosthniazate in UK agricultural soils through repeated applications . *Pest Manag Sci* 66: 253–261 (2010).
37. **Qin S, Gan J, Liu W and Becker JO,** Degradation and adsorption of fosthiazate in soil. *J Agric Food Chem* 52:6239–6242 (2004).
38. **Ragnarsdottir KV** (2000) Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *J Geological Soc* 157: 859–876.
39. **Rao PSC and Hornsby AG,** 2001. Behavior of pesticides in Soil and Water. Institute of food and Agricultural Science, University of Florida. Florida. U.S.A
40. **Rial-Otero, R., Gonza´lez-Rodri´guez, R., Cancho-Grande, B., Simal-Ga´ndara, J.,** 2004. Parameters affecting extraction of selected fungicides from vineyard soils. *J. Agric. Food Chem.* 52 (24), 7227–7234

41. **Rhône-Poulenc:** “Active Ingredient: Fipronil, Application for Registration,” Vol. 1. ID No. RRC-169043. DPR Document No. 52062-071. Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA, 1998
42. **Pantelelis, I., Karpouzas, D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U., Tsiropoulos N.,** 2006. Influence of soil physicochemical and biological properties on the degradation and adsorption of the nematicide fosthiazate. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6783–6789.
43. **Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Ravelo-Pérez LM and Rodríguez-Delgado MA,** Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. *Anal Bioanal Chem* 396:2307–2319 (2010).
44. **Shuai X, Chen J and Ray C,** Adsorption, transport and degradation of fipronil termiticide in three Hawaii soils. *PestManag Sci* 68:731–739 (2012).
45. **Singh BK, Kuhad RC, Singh A, Lal R & Triapthi KK** (1999) Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. *Crit Rev Biotechnol* 19: 197–225.
46. **Smelt JH, Van de Peppel - Groen AE, Van de Pas LJT and Dijksterhuis A,** (1996) Development and duration of accelerated degradation of nematicides in different soils. *Soil Biol Biochem* 28:1757-1765.
47. **Walker A. and Roberts S.J.** (1993). Degradation, biodegradation and enhanced biodegradation. In: *Proceedings IX Symposium Pesticide Chemistry, Piacenza, Italy*, pp: 357-370.
48. **Ying GG and Kookana RS,** Sorption of fipronil and its metabolites on soils from South Australia. *J Environ Sci Hlth B* 36:545–558 (2001).
49. **Zhu G, Wu H, Guo J and Kimaro FME,** Microbial degradation of Fipronil in clay loam soil. *Water Air Soil Pollut* 153:35–44 (2004).
50. **B. Ζιώγας και Γ.Α. Μάρκογλου,** Φαρμακολογία, ΑΘΗΝΑ, 2007.
51. **Φ.Σπέτζα ,** Πτυχιακή διατριβή , Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (2014)
52. **Β.Βιδιαδάκης ,** Πτυχιακή διατριβή , Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (2015)
53. **Δ.Θ. Λύκας,** Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (2009)
54. **Εμμανουήλ Δ. Τσοχατζής ,** Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών , Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (2012)