



*ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ,
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ*

Πτυχιακή Εργασία

Η αποδόμηση βοτανικής προέλευσης γεωργικών
φαρμάκων ως δείκτης έκθεσης και απόκρισης
των μικροοργανισμών του εδάφους σε αυτά

The degradation of botanical pesticides as an
indicator of exposure and response of the soil
microorganisms towards them

Όνοματεπώνυμο: Κανελλόπουλος Αλέξανδρος του Γεωργίου

Υπεύθυνος Καθηγητής: Δρ. Καρούζας Δημήτριος

Τριμελής Επιτροπή:

Δρ. Καρούζας Δημήτριος

Δρ. Βασιλειάδης Σωτήριος

Δρ. Καράς Παναγιώτης

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κατά το διάστημα Μάρτιος 2022 – Αύγουστος 2022 στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Υπεύθυνος Καθηγητής: **Δρ. Καρπούζας Δημήτριος**, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

Δρ. Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Βασιλειάδης Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας και Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Καράς Παναγιώτης, Διδάσκων ΤΒΒ, ΠΘ ΠΔ407/80

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου κ. Καρπούζα Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Πτυχιακής μου εργασίας, αλλά και να αποτελέσω μέλος του, καθώς επίσης και για την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου παρείχε και τις συζητήσεις κατά τη διάρκεια της εκπόνησης. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους κ. Βασιλειάδη Σωτήριο και κ. Καρά Παναγιώτη για την ανταλλαγή απόψεων και τις γνώσεις που απέκτησα κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Alesandre Pedrinho, υποψήφιο διδάκτορα στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, για την άψογη συνεργασία μας, την συνεχή του καθοδήγηση τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό πειραματικό επίπεδο, και τις γνώσεις και δεξιότητες που απέκτησα καθ' όλη τη συνεργασία μας.

Τέλος, ευχαριστώ επίσης τις Anna Manukyan, υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο, και Emma Feray, μεταπτυχιακή φοιτήτρια, με τις οποίες συνεργάστηκα πειραματικά καθώς και όλα τα άλλα μέλη του εργαστηρίου για τις ωραίες συζητήσεις στις συναντήσεις του εργαστηρίου και την εύρυθμη συνεργασία μας.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	9
1.1. Συνθετικά γεωργικά φάρμακα.....	10
1.1.1. Συνθετικά γεωργικά φάρμακα – Το παράδειγμα του Chlorothalonil.....	11
1.2. Βιολογικά γεωργικά φάρμακα.....	13
1.2.1. Βιολογικά γεωργικά φάρμακα – Το παράδειγμα του Spinosad.....	14
1.3. Βοτανικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα.....	15
1.3.1. Βοτανικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα – Το παράδειγμα των πυρεθρινών.....	17
1.4. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.....	18
1.4.1. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους – Η δοκιμή OECD216.....	19
1.4.2. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους – Μέθοδοι βασισμένες στην PCR.....	19
1.4.3. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους – Μέθοδοι βασισμένες στην NGS και Μεταταξινομική.....	20
1.4.4. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους – Καμπύλες Κατανομής Ευαισθησίας Ειδών.....	21
1.5. Σκοπός της εργασίας.....	22

2. Μέθοδοι και Υλικά.....	23
2.1. Εδάφη.....	23
2.2. Γεωργικά φάρμακα.....	23
2.3. Προετοιμασία διαλυμάτων εργασίας.....	24
2.4. Πειραματικός σχεδιασμός.....	24
2.5. Ανάλυση επιπέδων γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος.....	25
2.5.1 Εκχύλιση γεωργικών φαρμάκων από το έδαφος.....	25
2.5.2 Ανάλυση των γεωργικών φαρμάκων σε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης – HPLC.....	27
2.6. Υπολογισμός DT50 και DT90 των γεωργικών φαρμάκων στα εδάφη.....	27
3. Αποτελέσματα.....	28
4. Συζήτηση.....	34
4.1. Αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων.....	34
4.2. Υποθέσεις και μελλοντικές κατευθύνσεις.....	39
4.3. Η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων ως δείκτης απόκρισης της μικροβιακής κοινότητας	41
5. Κατακλείδα.....	43
Βιβλιογραφία.....	44

Περίληψη

Η συνεχόμενη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού έχει καταστήσει την αύξηση της αγροτικής παραγωγής σημαντική πρόκληση, κάτι το οποίο εντείνει την ανάγκη χρήσης γεωργικών φαρμάκων ως μέσο αύξησης απόδοσης. Ωστόσο, τα συνθετικά γεωργικά φάρμακα που κυριαρχούν στην αγροτική πρακτική εμφανίζουν σημαντική τοξικότητα σε μικροοργανισμούς του εδάφους, παρεμποδίζοντας την ορθή λειτουργία σημαντικών οικολογικών ρόλων της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, όπως η ρύθμιση των βιογεωχημικών κύκλων διάφορων στοιχείων και η διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους, υποστηρίζοντας ανώτερους οργανισμούς όπως φυτά, ζώα αλλά και τον άνθρωπο. Υπό αυτό το πρίσμα, έχει ξεκινήσει μία προσπάθεια για χρήση βιολογικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων, τα οποία παράγονται φυσικά από οργανισμούς και παρουσιάζουν ένα περισσότερο επιθυμητό περιβαλλοντικό προφίλ, με ελάχιστη υπολειμματικότητα και τοξικότητα. Μία υποκατηγορία βιολογικών γεωργικών φαρμάκων, βοτανικής προέλευσης, προέρχονται από φυτά και παρουσιάζουν σημαντική φυτοπροστατευτική ικανότητα. Εντούτοις, η περιβαλλοντική τους κατάληξη και η επίδρασή τους στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, χρίζουν μελέτης, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η υπόθεση ότι είναι απολύτως φιλικά προς το περιβάλλον και, παράλληλα, κατάλληλα για γεωργική χρήση. Στην παρούσα εργασία, σε ένα πείραμα μικροκόσμων, μελετήθηκε η αποδόμηση τριών βοτανικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων (προϊόντα MIF) σε 2 τύπους εδαφών, ως ένας δείκτης της έκθεσης των μικροοργανισμών του εδάφους, και συγκρίθηκε με την αποδόμηση ενός άλλου βοτανικής προέλευσης γεωργικού φαρμάκου (εκχύλισμα pyrethrum), ενός βιολογικού σκευάσματος βακτηριακής προέλευσης (Spinosad) και ενός συνθετικού (Chlorothalonil). Η αποδόμηση των προϊόντων MIF στο έδαφος ήταν γρήγορη, παρουσιάζοντας τιμές DT_{50} 1,25 – 2,94 ημέρες, σε αντίθεση με το εκχύλισμα pyrethrum και το Spinosad, που εμφάνισαν πιο αργή αποδόμηση, ενώ ενδιαφέρον ήταν ότι, στα δύο εδάφη που μελετήθηκαν, το Chlorothalonil παρουσίασε γρηγορότερη αποδόμηση από το εκχύλισμα pyrethrum και το Spinosad. Η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων συγκρίνεται με αναφορές στη βιβλιογραφία, ενώ καταγράφονται επίσης υποθέσεις για την περιβαλλοντική κατάληξη των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων, της απόκρισης της μικροβιακής κοινότητας κάθε φορά, επισημαίνονται αναμενόμενα αποτελέσματα από

μετέπειτα Μεταταξινομική ανάλυση και καμπύλες κατανομής ευαισθησίας ειδών, και ενδιαφέρουσες μελλοντικές κατευθύνσεις. Τέλος, αξιολογείται η αποδόμηση των βοτανικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων ως δείκτης της έκθεσης της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.

Abstract

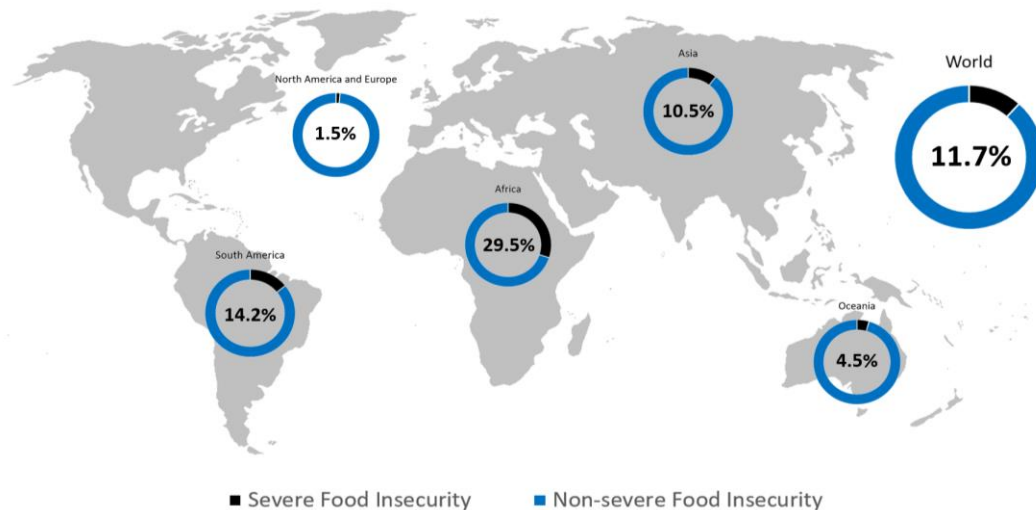
The constant increase of the global population has identified the increase of agricultural production as an important challenge, thus raising the need for pesticide use, as a mean of performance enhancement. However, synthetic pesticides, which dominate the market, have showed increased toxicity towards soil microorganisms, which control key ecological roles of the soil microbiota, such as regulation of biogeological cycles and the preservation of soil health and fertility and, thus, the support of higher organisms like plants, animals and humans. Under this scope, an effort has begun for the gradual introduction and use of pesticides of biological origin, which are produced naturally by organisms and present a more favourable environmental profile, considered as low risk pesticides. A subgroup of biological pesticides with botanical origin present increased plant-protective potency. Despite this fact, their environmental fate and their effect on the soil microbial communities need more studying, in order to confirm the speculation that they are entirely friendly towards the environment and, in parallel, appropriate for use in agriculture. In this study, in a microcosm setup, we studied the dissipation of three botanical pesticides (MIF products) in 2 soil types, as an indicator of the exposure of the soil microorganisms, and it was compared with the dissipation of another botanical pesticide (pyrethrum extract), a biological pesticide of bacterial origin (Spinosad) and one synthetic pesticide (Chlorothalonil). The dissipation of the MIF products in soil was fast, with DT_{50} values of 1.25 – 2.94 days, in contrast with the pyrethrum extract and Spinosad, which presented slower dissipation, while it was interesting that the synthetic pesticide Chlorothalonil showed a more rapid dissipation than pyrethrum and Spinosad. The findings of pesticide dissipation from our study are compared with existing literature, while speculations for the environmental fate of the different pesticides and the response of the microbial community each time are recorded, and expected results from future Metataxonomic study and Species Sensitivity Distribution curves, as well as interesting

future perspectives, are highlighted. Finally, the dissipation of the botanical pesticides is evaluated as an indicator of the exposure of the soil microbial community.

1. Εισαγωγή

Η σημαντική προβλεπόμενη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού (άνοδος κατά τουλάχιστον 1 δισεκατομμύριο τα επόμενα 20 χρόνια σύμφωνα με τον FAO) (FAOSTAT, 2020), καθιστά την θρέψη του παγκόσμιου πληθυσμού μία ιδιαίτερη σύγχρονη πρόκληση. Μάλιστα, η σημαντικότερη μερίδα της αύξησης αναμένεται σε αναπτυσσόμενες χώρες στην Αφρική και την Ασία (United Nations, Department of Economic and Social Affairs, 2015). Τα τελευταία τρία χρόνια, εκτιμάται ότι περίπου το 11,7% του γενικού πληθυσμού αντιμετωπίζει σοβαρό πρόβλημα επισιτιστικής ανασφάλειας (Food Insecurity), ενώ το συγκεκριμένο ποσοστό στην Αφρική αγγίζει και το 30% (FAOSTAT, 2020) [Εικόνα 1]. Υπό αυτό το πλαίσιο, η επισιτιστική ασφάλεια, η θρέψη και η βιώσιμη γεωργία αποτελούν πλέον κεντρικούς πυλώνες της παγκόσμιας πολιτικής, όπως αντικατοπτρίζεται και στον 2^ο Στόχο Βιώσιμης Ανάπτυξης του ΟΗΕ (United Nations).

Ιστορικά, η βασικότερη προσέγγιση των αναπτυγμένων αλλά και των αναπτυσσόμενων οικονομιών για την αύξηση της αγροτικής παραγωγής ήταν η χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών ως γεωργικά φάρμακα, τα οποία καταπολεμούν διάφορους



Εικόνα 1. Εκτιμήσεις της σοβαρής επισιτιστικής ανασφάλειας σε παγκόσμια κλίμακα. Στην εικόνα απεικονίζεται το εκτιμώμενο ποσοστό σοβαρής επισιτιστικής ανασφάλειας (Severe Food Insecurity) στις διάφορες επικράτειες του κόσμου, καθώς και ο γενικός μέσος όρος. Η τιμή στο κέντρο των δακτυλίων είναι το συγκεκριμένο ποσοστό επισιτιστικής ανασφάλειας της επικράτειας και ταυτίζεται με την μαύρη περιοχή στο δακτύλιο. (Στατιστικά από FAOSTAT, 2020).

εχθρούς των καλλιεργειών. Τεράστια οφέλη έχουν παρατηρηθεί τόσο στην αγρική πρακτική, όσο και σε τομείς όπως η δασονομία και η ανθρώπινη υγεία, από την αρχή της εκτεταμένης χρήσης τους το 1952 (Aktar et al. 2009). Η δημοφιλέστερη μέθοδος διάκρισης των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων είναι η φύση του εχθρού-στόχου, με βάση την οποία διακρίνονται σε βακτηριοκτόνα, μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα κλπ. (Rajmohan et al. 2020).

1.1. Συνθετικά γεωργικά φάρμακα

Τα πρώτα δημοφιλή γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν μέσω χημικής σύνθεσης, με στόχο να αντικαταστήσουν κάποια εξαιρετικά επικίνδυνα σκευάσματα που χρησιμοποιούταν μεμονωμένα από τον 18^ο αιώνα, όπως θειώδη και ενώσεις του αρσενικού (National Research Council (US), 1993). Τα περισσότερα διαδεδομένα συνθετικά γεωργικά φάρμακα που αναπτύχθηκαν ήταν οργανοχλωριομένοι υδρογονάνθρακες, όπως το μυκητοκτόνο DDT, και το αυξημένο οικοτοξικολογικό τους αποτύπωμα (πχ. αυξημένη βιοσυσσώρευση, οξεία τοξικότητα κλπ.) φάνηκε σχετικά νωρίς (National Research Council (US), 1993), με αποτέλεσμα η χρήση του DDT να απαγορευτεί πριν από σχεδόν 40 χρόνια (Kabasenche & Skinner 2014). Η πλειοψηφία των συνθετικών γεωργικών φαρμάκων θεωρείται πλέον ότι παρουσιάζουν αυξημένη οικοτοξική δράση, καθώς ασκούν τοξικές επιδράσεις σε ανώτερους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, αλλά και σε μικροοργανισμούς του εδάφους, επηρεάζοντας σημαντικές περιβαλλοντικές διεργασίες. Το μεγαλύτερο μέρος του γεωργικού φαρμάκου που εφαρμόζεται δεν καταλήγει στο φυτό αλλά στο έδαφος (Gallego et al. 2018), και έχει δειχθεί επανειλημμένα ότι, ιδιαίτερα η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή ή η εφαρμογή υψηλής δόσης συνθετικών γεωργικών φαρμάκων, αλλάζουν την σύσταση και την λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (Medo et al. 2021). Επιπλέον, ενώ δεν είναι στο επίκεντρο της έρευνας, διάφορα προϊόντα μετασχηματισμού (transformation products, TPs) συνθετικών γεωργικών φαρμάκων παρουσιάζουν μεγαλύτερη τοξικότητα και κινητικότητα από τις ίδιες τις μητρικές τους ενώσεις (Mercurio et al. 2018). Για παράδειγμα, ο κυριότερος μεταβολίτης του Chlorothalonil, το 4-hydroxy chlorothalonil, διακρίνεται από υψηλότερη τοξικότητα, υπολειμματικότητα και κινητικότητα στο έδαφος, και συσσωρεύεται ιδιαίτερα ύστερα

από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του Chlorothalonil [Εικόνα 2B] (Wu et al. 2014). Η μεγαλύτερη τοξικότητα του μεταβολίτη ισχύει για αρκετά άλλα προϊόντα μετασχηματισμού, όπως για παράδειγμα για την 3,5 DCA (3,5-διχλωροανιλίνη) προϊόν μετασχηματισμού του iprodione (Vasileiadis et al. 2018), καθώς και διάφορα προϊόντα μετασχηματισμού των diuron και atrazine (Mercurio et al. 2018).

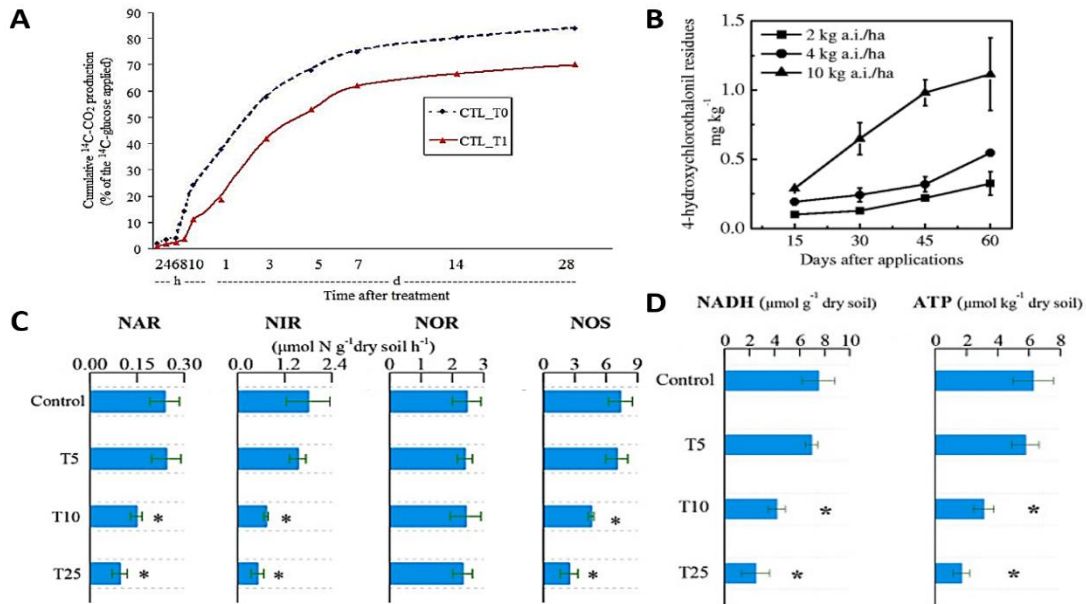
1.1.1. Συνθετικά γεωργικά φάρμακα – Το παράδειγμα του Chlorothalonil

Το Chlorothalonil [Εικόνα 4] είναι ένα ευρέους φάσματος οργανοχλωριομένο μυκητοκτόνο, και το πιο χρησιμοποιούμενο από τα γνωστά συνθετικά μυκητοκτόνα, με εφαρμογές στην προστασία των φυτών από προσβολές του ωομύκητα *Phytophthora infestans* (Baćmaga et al. 2018). Στις Ηνωμένες Πολιτείες χρησιμοποιείται κυρίως για την προστασία καλλιεργειών φιστικιού και ντομάτας, καθώς και γρασιδιού (Zhang et al. 2016). Στις αρχές της δεκαετίας του 2010, η ετήσια χρήση του στις ΗΠΑ ήταν περί τα 5.000.000 κιλά, ενώ στην Κίνα παράγονταν ετησίως περί τα 8.000.000 κιλά (Zhang et al. 2016). Είναι αδιάλυτο στο νερό (<10mg/L) και προσροφάται σε υψηλό βαθμό από το έδαφος (κανονικοποιημένος συντελεστής προσρόφησης σε οργανικό άνθρακα K_{oc} 5,000), αλλά χωρίς ιδιαίτερη ικανότητα κινητικότητας προς τα βαθύτερα εδαφικά στρώματα, όπως φαίνεται από τη παραμονή του κυρίως στα πρώτα 20cm του εδάφους, ενώ εμφανίζει ασημαντη πτητικότητα (Van Scoy and Tjeerdema 2014). Στο έδαφος, παρά το σχετικά μικρό χρόνο ημιζωής (19-30 μέρες), μπορεί να συσσωρευθεί λόγω επαναλαμβανόμενων εφαρμογών και να παραμείνει από 100 μέρες ως και 1 χρόνο, ενώ κατάλοιπά του εντοπίζονται και σε καρπούς (Baćmaga et al. 2018). Η αβιοτική αποδόμηση του είναι δυνατή μέσω φωτόλυσης και υδρόλυσης (Zhang et al. 2017).

Το Chlorothalonil είναι τοξικό ως προς υδρόβιους οργανισμούς, όπως ιχθύες και ασπόνδυλα (Baćmaga et al. 2018), και οργανισμούς οικονομικού ενδιαφέροντος, όπως καβούρια, γαρίδες και μαλάκια, όπου διαταράσσει τη λειτουργία των ιστών στα βράγχια (Hague et al. 2019). Η ικανότητα του να δεσμεύεται στη γλουταθειόνη προκαλεί διαταραχές στην διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής (McMahon et al. 2011). Για τους ιχθύες, η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται επίδραση (Lowest Observable Effect Concentration, LOEC) είναι 1μg/L (McMahon et al. 2011). Επίσης εκφράζει τοξικότητα ως προς ανώτερα ζώα και τον άνθρωπο, στον οποίο προκαλεί φλεγμονή στο

δέρμα και τον οφθαλμό, διαταραχές στο γαστρεντερικό σύστημα (Baćmaga et al. 2018) και κατηγορείται για καρκινογένεση (US EPA 1999). Για τον άνθρωπο βρίσκεται στην Κατηγορία οξείας τοξικότητας IV (η χαμηλότερη τοξικότητα από τις 4 κατηγορίες) (US EPA 1999). Ο κυριότερος μεταβολίτης του, το 4-hydroxy chlorothalonil [Εικόνα 4], έχει δομή παρόμοια με την πενταχλωροφαινόλη, η οποία είναι γνωστό ότι προκαλεί διαταραχή του ενδοκρινικού συστήματος (Zhang et al. 2016). Τέλος, έχει αναφερθεί και εμφάνιση αυξημένης τοξικότητας σε φυτά φάβας, όπου το Chlorothalonil προκάλεσε αύξηση στην εμφάνιση μικροπυρήνων, κατά τον έλεγχο μικροπυρήνων για πρόκληση τοξικότητας σε κύτταρα της ρίζας (Zhang et al. 2017).

Πολύ σημαντική τοξικότητα παρουσιάζεται στους μικροοργανισμούς του εδάφους, καθώς η ασήμαντη πτητικότητα και μεγάλη προσρόφηση του Chlorothalonil στο έδαφος, διευκολύνει την συσσώρευση του και την επίδρασή του στη μικροβιακή κοινότητα. Η επίδρασή αυτή εντοπίζεται σε επίπεδο αναστολής της δραστηριότητας ενζύμων όπως αυτά της όξινης φωσφατάσης, της καταλάσης και της αφυδρογονάσης (Baćmaga et al. 2018). Επίσης, το Chlorothalonil παρεμβάλλεται στον κύκλο του αζώτου, ενώ μειώνει και την αναπνευστική δραστηριότητα (Respiration Activity) του εδάφους [Εικόνα 2A], μία παράμετρο ενδεικτική για την υγεία του εδάφους (Stefani et al. 2012; Su et al. 2019). Υπάρχουν αναφορές για αναστολή της ουρεάσης, ένα ένζυμο εξαιρετικά σημαντικό στην ανακύκλωση οργανικής ύλης και στον κύκλο του αζώτου (Zhang et al. 2017). Επιπλέον, το Chlorothalonil έχει δείχτει να αναστέλλει τη δραστηριότητα ενζύμων της απονιτροποίησης (αναγωγή των νιτρικών – NAR, αναγωγή των νιτρωδών – NIR και αναγωγή του υποξειδίου του αζώτου – NOS) [Εικόνα 2C], ενώ μειώνει την αποτελεσματικότητα της απονιτροποίησης και μέσω παρεμβολής στην αποτελεσματική παραγωγή, μεταφορά και κατανάλωση ηλεκτρονίων. Αυτό το επιτυγχάνει τόσο αναστέλλοντας την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) και άρα την παραγωγή NADPH και ATP [Εικόνα 2D], όσο και παρεμβαλλόμενο στην αναπνευστική αλυσίδα (Su et al. 2019). Τέλος, έχει βρεθεί ότι το Chlorothalonil μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αφθονίας ειδών *Nitrosomonas*, ενός σημαντικού γένους για τη διαδικασία της νιτροδοποίησης (Ding et al. 2019).



Εικόνα 2. Σύνοψη της τοξικότητας του Chlorothalonil απέναντι στους μικροοργανισμούς του εδάφους. (A) Απεικονίζεται η παραγωγή σημασμένου $^{14}\text{CO}_2$ από τη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, ύστερα από την προσθήκη σημασμένης ^{14}C -γλυκόζης, ως δείκτης της αναπνευστικής δραστηριότητας του εδάφους, ύστερα από εφαρμογή Chlorothalonil (κόκκινο) σε σχέση με το control (μπλε) (Stefani et al. 2012). (B) Απεικονίζεται η συσσώρευση του μεταβολίτη 4-hydroxy chlorothalonil ύστερα από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές Chlorothalonil σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (kg a.i./ha) (Wu et al. 2014). (C, D) Απεικονίζονται οι δραστηριότητες των 4 ενζύμων της νιτροδοποίησης σε εδαφικά δείγματα ύστερα από εφαρμογή Chlorothalonil, καθώς και η ικανότητα παραγωγής NADH και ATP, 5 10 και 25 μέρες μετά την εφαρμογή (Su et al. 2019).

1.2. Βιολογικά γεωργικά φάρμακα

Το ζήτημα της επικινδυνότητας των συνθετικών γεωργικών φαρμάκων έχει λάβει σημαντικές διαστάσεις σε χώρες όπως η Κίνα, οι ΗΠΑ, η Βραζιλία και η Τουρκία, αλλά και στην Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ η νομοθεσία σχετικά με τη χρήση τους γίνεται όλο και αυστηρότερη (Souto et al. 2021). Ως αποτέλεσμα, γίνονται εκτεταμένες προσπάθειες για την εισαγωγή στην αγροτική πρακτική βιολογικών γεωργικών φαρμάκων, ουσιών που παράγονται φυσικά και παρουσιάζουν φυτοπροστατευτική δράση (Kumar et al. 2021). Στα βιολογικά γεωργικά φάρμακα συμπεριλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, μικροβιακής προέλευσης (πχ. οι εντομοκτόνες δ-ενδοτοξίνες του *Bacillus thuringiensis*), απομιμήσεις από φερομόνες εντόμων με εντομοαπωθητική δράση, γενετικά τροποποιημένα φυτά (πχ.

φυτά που εκφράζουν δ-ενδοτοξίνη) και φυσικά εκχυλίσματα και έλαια φυτών, τα οποία ονομάζονται και βοτανικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα (Kumar et al. 2021). Λόγω του ότι συναντώνται φυσιολογικά στη φύση και είναι βιοαποδομήσιμα, τα βιολογικά γεωργικά φάρμακα θεωρούνται μία ασφαλέστερη και περισσότερο περιβαλλοντικά φιλική προσέγγιση σε σύγκριση με τα συνθετικά.

1.2.1. Βιολογικά γεωργικά φάρμακα – Το παράδειγμα του Spinosad

Το Spinosad είναι ένα συνθετικό ανάλογο και μείγμα 2 φυσικών μακροκυκλικών λακτονών (Spinosyn A και Spinosyn D) [Εικόνα 4] (Crouse et al. 2018) που παράγονται από ακτινομύκητες του είδους *Saccharopolyspora spinosa* (Mohiddin et al. 2015), και θεωρείται γεωργικό φάρμακο χαμηλού ρίσκου (Aditya and Rattan, 2018).

Χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο, με δράση τόσο νευροτοξική όσο και ως δηλητήριο του στομάχου (Telesiński et al. 2015), παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα απέναντι σε Δίπτερα και Λεπιδόπτερα (Wang et al. 2021), ενώ έχει άδεια χρήσης σε περίπου 80 χώρες και χρησιμοποιείται σε τουλάχιστον 200 τύπους καλλιεργειών (Martelli et al. 2022). Στο νευρικό σύστημα δρα ως ανάλογο της ακετυλοχολίνης, με θέση πρόσδεσης στον νικοτινικό υποδοχέα, υπερνικώντας την δράση της ακετυλοχολινεστεράσης και επιμηκύνοντας την χολινεργική δραστηριότητα (Leska et al, 2021). Η υπερδιέγερση οδηγεί σε μυϊκή κόπωση και, ως δευτερογενή συνέπεια, παράλυση του εντόμου (Aditya and Rattan, 2018). Είναι γενικά ακίνδυνο ως προς τον άνθρωπο, καθώς απορροφάται αργά από το δέρμα και μπορεί να οδηγήσει σε ενόχληση στον οφθαλμό και, μόνο μετά από διαρκή έκθεση, στο δέρμα, και δεν επιφέρει νευροτοξικότητα, καρκινογένεση ή τερατογένεση στα ζώα (Aditya and Rattan, 2018).

Το Spinosad έχει ένα επιθυμητό περιβαλλοντικό προφίλ, καθώς φαίνεται να μην εμφανίζει βιοσυσσώρευση, έκπλυση και πτητικότητα (Sharma et al, 2007), ενώ παρουσιάζει μικρή τοξικότητα προς οργανισμούς μη-στόχους (Wang et al. 2021). Το γεγονός ότι είναι αποδομήσιμο από τους μικροοργανισμούς του εδάφους το κατατάσσει στα φιλικά προς το περιβάλλον γεωργικά φάρμακα (Leska et al, 2021). Όπως αναμένεται, αναφέρεται ότι η αερόβια βιοαποδόμηση του συμβαίνει γρήγορα, αλλά ο ρυθμός διάσπασης είναι μικρότερος υπό αναερόβιες συνθήκες (Sharma et al, 2007). Ωστόσο υπάρχει αναφορά για διέγερση της δραστηριότητας ενζύμων του εδάφους που

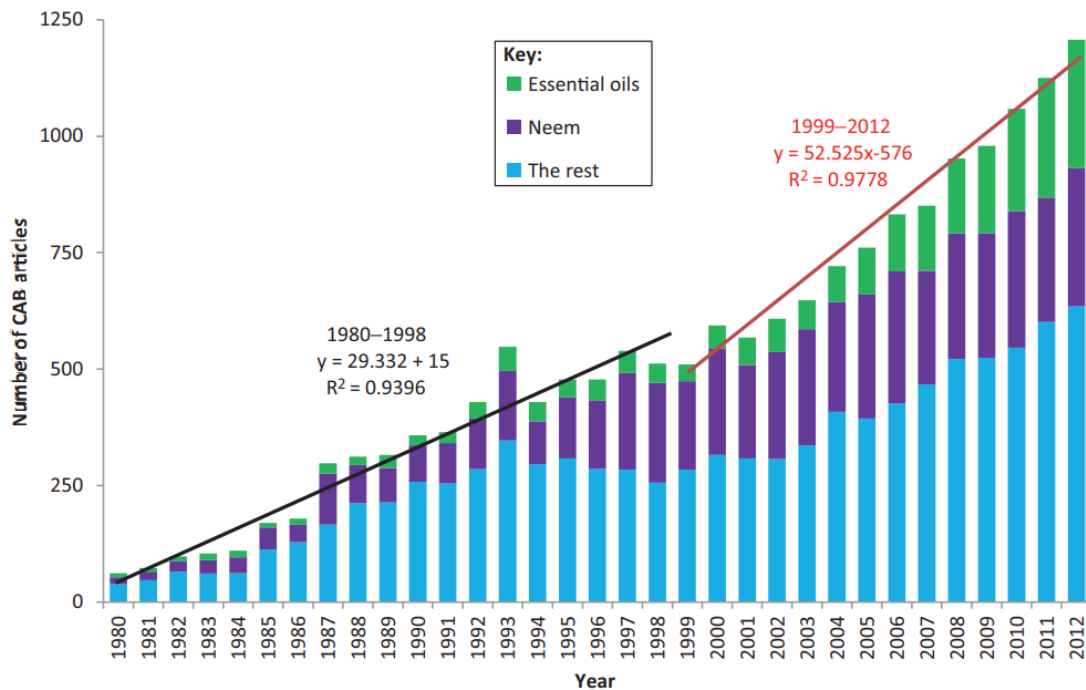
συμμετέχουν στην αποδόμηση πολύπλοκων υδατανθρακικών πολυμερών (κυτταρινάση, ινβεράση, αμυλάση) και, συνεπώς, στην ανακύκλωση του άνθρακα στο έδαφος, χωρίς όμως ξεκάθαρη ένδειξη για αρνητική ή θετική επίδραση του Spinosad στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (Mohiddin et al. 2015). Σε διαφορετική μελέτη (Telesiński et al. 2015) καταγράφηκε μείωση της δραστηριότητας ενζύμων σημαντικών για την ανακύκλωση στοιχείων στο έδαφος, όπως της δραστηριότητας της αφυδρογονάσης (με αρκετά μεγάλη ευαισθησία), η οποία έχει ρόλο στην οξείδωση οργανικής ύλης (Kaczyńska et al. 2015), αλλά και της δραστηριότητας της όξινης φωσφατάσης (με μικρότερη ευαισθησία), η οποία συμμετέχει στην ανοργανοποίηση του φωσφόρου, ενώ παρατηρήθηκαν και μεταβολές στους συνολικούς πληθυσμούς βακτηρίων, ακτινομυκήτων και μυκήτων του εδάφους. Μεγάλη μερίδα της βιβλιογραφίας εστιάζει επίσης σε πιθανές τοξικές επιδράσεις του Spinosad σε έντομα μη-στόχους που παρουσιάζουν οικολογικό και οικονομικό ενδιαφέρον, όπως επικονιαστές (πχ. *Apis mellifera*) (Leska et al, 2021) και έντομα-μοντέλα (*Drosophila melanogaster*).

1.3. Βοτανικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα

Τα βοτανικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα αποτελούν μία ομάδα βιολογικών γεωργικών φαρμάκων που προέρχονται από φυτά (Souto et al. 2021). Στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική χρησιμοποιούνται, μη-εκτεταμένα, εδώ και 150 χρόνια (Acheuk et al. 2022), ενώ μεταξύ 1945 και 2019 είχαν δημοσιευθεί περίπου 2500 μελέτες σχετικά με τα βοτανικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα, με το ενδιαφέρον να εντείνεται τα τελευταία 30 χρόνια (Turchen et al. 2020). Η έρευνα φαίνεται να εστιάζει σε προϊόντα του εκχυλίσματος του φυτού *Azadirachta indica* (neem plant), αιθέρια έλαια (essential oils) (Isman and Grieneisen) και εκχυλίσματα από άνθη χρυσάνθεμου [Εικόνα 3]. Βασικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται στην γεωργική πράξη είναι αντίστοιχα το Azadirachtin και τα πυρεθροειδή.

Η μεγαλύτερη μερίδα τους δρα ως εντομοκτόνα, προσβάλλοντας διάφορα συστήματα του εντόμου, όπως το νευρικό, το ενδοκρινικό, το αναπνευστικό, καθώς και το ισοζύγιο νερού (Souto et al. 2021), ενώ ερευνώνται και για πιθανές μυκητοκτόνες δράσεις.

Παγκοσμίως, έχουν αναγνωριστεί πάνω από 200 φυτικά είδη που παράγουν προϊόντα



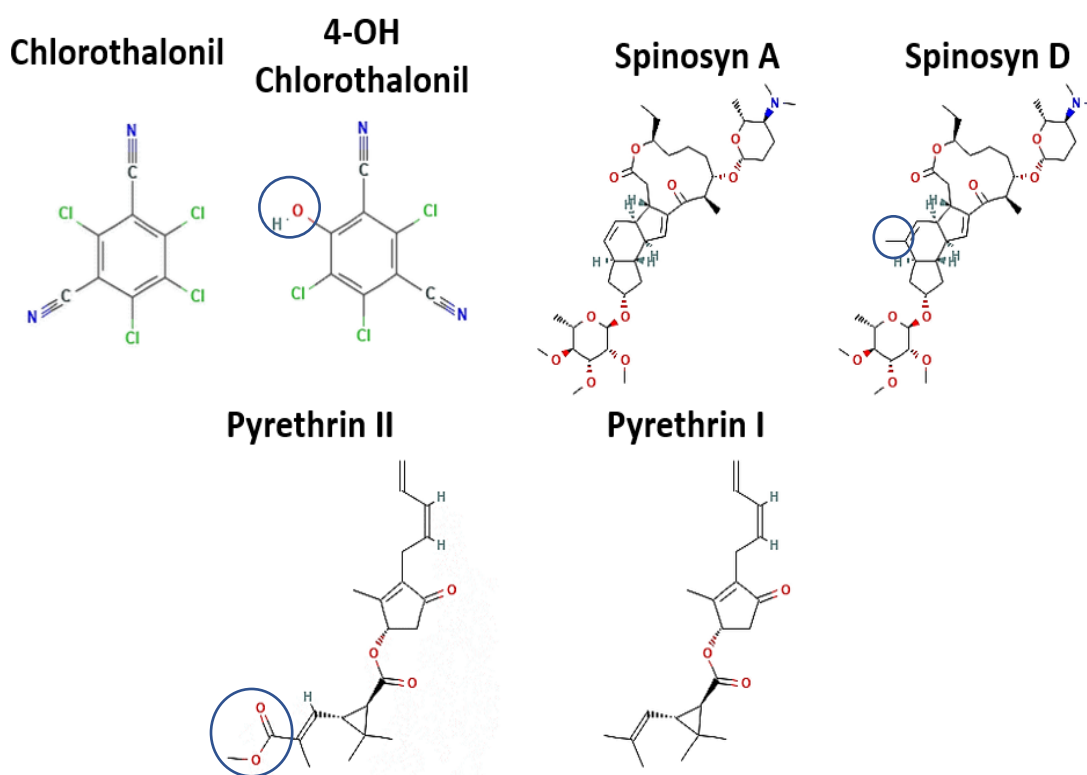
TRENDS in Plant Science

Εικόνα 3. Οι τάσεις στην έρευνα των βοτανικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων. Η έρευνα βασίστηκε στη διαθέσιμη βιβλιογραφία στην CAB μεταξύ 1980 και 2012. Με μαύρο και κόκκινο απεικονίζονται οι γραμμές τάσης για τα διαστήματα 1980-1999 και 2000-2012. Φαίνεται η αύξηση του όγκου της βιβλιογραφίας γύρω από τα εκχυλίσματα *Azadirachta indica* και τα αιθέρια έλαια, καθώς και η αύξηση στο ενδιαφέρον γύρω από τα βοτανικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα συνολικά (Isman and Grieneisen, 2014).

ενάντια μόνο σε Ακάρεα, όπως το παρασιτικό τσιμπούρι (Quadros et al. 2020). Τα βοτανικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα, λόγω της προέλευσης τους και των χαμηλών δόσεων εφαρμογής, θεωρούνται ασφαλέστερα από τα συνθετικά (Suciu et al. 2019). Παράλληλα, λόγω της μεγάλης ποικιλίας τους και της δυνατότητας βιοαποδόμησης τους, εκτός από το ότι αποτελούν μία περισσότερο φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση, μπορούν να δώσουν επίσης λύση στο ζήτημα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας των εντόμων στα γεωργικά φάρμακα (Quadros et al. 2020).

1.3.1. Βοτανικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα – Το παράδειγμα των πυρεθρινών

Οι πυρεθρίνες [Εικόνα 4] είναι μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε εκχυλίσματα από το άνθος του φυτού *Tanacetum cinerariifolium* (πρώην ονομασία *Chrysanthemum cinerariifolium*) (Souto et al. 2021). Δρουν ως φυσικά εντομοκτόνα με νευροτοξική δράση, η οποία είναι αποτέλεσμα διάφορων μηχανισμών, όπως κυρίως η παρεμπόδιση του κλεισίματος ταυσεοεξαρτώμενων καναλιών Na^+ (Walters et al. 2009), καθώς και αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης (Holyńska-Iwan and Szezewczyk-Golec, 2020) και διάφορες επιδράσεις στην GABA-εργική, ντοπαμινεργική, νοραδρενεργική και



Εικόνα 4. Σύνοψη των χημικών δομών των δραστικών ενώσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Στην εικόνα απεικονίζονται οι χημικές δομές του Chlorothalonil και του σημαντικότερου μεταβολίτη του, το 4-hydroxy chlorothalonil, καθώς και οι δομές των Spinosyn A και Spinosyn D, συστατικών του Spinosad, και των πυρεθρινών Pyrethrin II και Pyrethrin I, σημαντικών συστατικών του εκχυλίσματος του *Tanacetum cinerariifolium*. Με κύκλους επισημαίνονται οι διαφορές στις δομές των Chlorothalonil και του μεταβολίτη του, των Spinosyn A και D και των Pyrethrin II και I. (Χημικές δομές από: PubChem, National Center for Biotechnology Information (2022)).

χολινεργική διαβίβαση (Mossa et al. 2018). Λόγω της γρήγορης αποδόμησης τους στο περιβάλλον, δεν έχει γίνει η εισαγωγή τους στην αγροτική πρακτική, κάτι που οδήγησε στην ανάπτυξη συνθετικών αναλόγων τους (πυρεθροειδή) (Walters et al. 2009). Τα πυρεθροειδή χρησιμοποιούνται εκτεταμένα, αποτελώντας το 20% των χρησιμοποιούμενων εντομοκτόνων παγκοσμίως (Saied et al. 2021). Λόγω της μη χρήσης των φυσικών πυρεθρινών στην αγροτική πρακτική, η βιβλιογραφία εστιάζει στην τοξικότητα των συνθετικών πυρεθροειδών. Τα συνθετικά πυρεθροειδή παρουσιάζουν μεγαλύτερη τοξικότητα στον άνθρωπο, όπου μπορεί να προκαλέσουν παραισθήσεις, απόφραξη αεραγωγών και δερματίτιδα, ενώ έχουν καταγραφεί εκατοντάδες θάνατοι λόγω δηλητηρίασης από πυρεθροειδή (Walters et al. 2009).

1.4. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

Το γεγονός ότι το έδαφος περιλαμβάνει πληθώρα από ποικίλους μικροβιακούς πληθυσμούς, με σημαντικούς λειτουργικούς ρόλους στη ρύθμιση των βιογεωχημικών κύκλων αλλά και τη γονιμότητα του εδάφους (Suciu et al. 2019), καθιστά την πραγματοποίηση οικοτοξικολογικών δοκιμών απαραίτητη για να εκτιμηθεί η επίδραση ουσιών που χρησιμοποιούνται ως γεωργικά φάρμακα, στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Ωστόσο, η συμπεριφορά και οι οικοτοξικολογικές επιδράσεις αρκετών γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον (και την εδαφική υγεία) δεν έχουν διερευνηθεί αρκετά (Wirsching et al. 2020). Η εδαφική υγεία (soil health) περιγράφει την ικανότητα ενός εδάφους να λειτουργεί πραγματικά ως ένα οικοσύστημα ικανό να διατηρήσει την ανάπτυξη φυτών, ζώων και του ανθρώπου (Lehmann et al. 2020), με την μικροβιακή δραστηριότητα να αποτελεί σημαντική συνιστώσα της εδαφικής υγείας (Ozlu et al. 2019). Σε αντίθεση με λειτουργίες που εμφανίζουν πλεονασμό στη μικροβιακή κοινότητα, λειτουργίες του εδαφικού οικοσυστήματος που πραγματοποιούνται από συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών (πχ. νιτροδοποίηση) επηρεάζονται σημαντικά από τη μείωση της ποικιλότητας της μικροβιακής κοινότητας (de Souza et al. 2017). Οι μικροοργανισμοί του εδάφους έχουν ταυτοποιηθεί από την EFSA (European Food Safety Authority) ως ειδικός στόχος προστασίας κατά την εκτίμηση ρίσκου γεωργικών φαρμάκων (Gallego et al. 2018), ενώ η βελτίωση της εδαφικής υγείας συνολικά αποτελεί

στόχο των Ηνωμένων Εθνών, αποτελώντας ένα πεδίο στους Στόχους Βιώσιμης Ανάπτυξης (United Nations).

1.4.1. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους – Η δοκιμή OECD216

Μία από τις βασικότερες δοκιμές για τη μελέτη της επίδρασης γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, και κατ' επέκταση στην εδαφική υγεία, είναι η δοκιμή OECD216, η οποία είναι απαραίτητη για την αδειοδότηση νέων γεωργικών φαρμάκων (Hund-Rinke et al. 2019). Η δοκιμή OECD216 έχει ως στόχο να προσδιορίσει επιδράσεις ρύπων στην ανοργανοποίηση του οργανικού αζώτου του εδάφους με τελικό προϊόν την παραγωγή νιτρωδών (OECD, 2000). Κατά συνέπεια, η συγκεκριμένη δοκιμή περιλαμβάνει την μέτρηση δύο διεργασιών, που είναι η αμμωνιοποίηση (μετατροπή του οργανικού αζώτου στο έδαφος σε αμμωνία) και την νιτρωδοποίηση (την μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρώδη) (Hund-Rinke and Schlich, 2014). Η νιτρωδοποίηση είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα στο βιοχημικό κύκλο του αζώτου (Sorokin et al. 2012). Σύμφωνα με τις οδηγίες, η συγκέντρωση των νιτρωδών στη μεταχείριση με το υπό εξέταση γεωργικό φάρμακο δεν πρέπει να είναι 25% χαμηλότερη ή υψηλότερη από τη συγκέντρωση του μάρτυρα (OECD, 2000), κάτι που μπορεί να θεωρηθεί ότι προσδίδει μειωμένη ευαισθησία στη μέθοδο. Επιπλέον, η δοκιμή δεν ελέγχει άλλους σημαντικούς δείκτες της υγείας του εδαφικού μικροβιώματος, όπως ο κύκλος του θείου, ο αναπνευστικός ρυθμός του εδάφους (Campbell et al. 2003), η δραστηριότητα διάφορων άλλων ενζύμων (πχ. οξειδοαναγωγάσες, φωσφατάσες, μεταφοράσες του θείου) (Alkorta et al. 2003), και η συνολική σύσταση της μικροβιακής κοινότητας (Kim et al. 2022).

1.4.2. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους – Μέθοδοι βασισμένες στην PCR

Από τις βασικές μεθόδους ανάλυσης της μικροβιακής κοινότητας είναι οι μέθοδοι που βασίζονται σε PCR fingerprinting (Vischetti et al. 2020). Οι πιο δημοφιλείς μοριακοί δείκτες είναι τα γονίδια 16SrRNA και 18SrRNA, που κωδικοποιούν για rRNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας σε προκαρυώτες και ευκαρυώτες αντίστοιχα και χρησιμοποιούνται ως παγκόσμιοι φυλογενετικοί δείκτες (Tzeneva et al. 2008). Την τελευταία δεκαετία, είχαν επικρατήσει μέθοδοι όπως η DGGE (Denaturing Gradient Gel

Electrophoresis), η οποία επιτρέπει γρήγορη ανάγνωση της σύστασης μίας μικροβιακής κοινότητας με βάσει δείκτες που βρίσκονται σε αφθονία (Tzeneva et al. 2008), ενώ είναι αποτελεσματική στην ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων πολύπλοκων οικοσυστημάτων (Vischetti et al. 2020). Ωστόσο χαρακτηρίζεται από περιορισμούς όπως η μεροληπτικότητα της PCR, και η μειωμένη ευαισθησία και ευκρίνεια, κάτι που έχει οδηγήσει σε αντικατάστασή της από μεθόδους βασισμένες στην αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS) σε πολλές περιπτώσεις (Vischetti et al. 2020).

1.4.3. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους – Μέθοδοι βασισμένες στην NGS και Μεταταξινομική

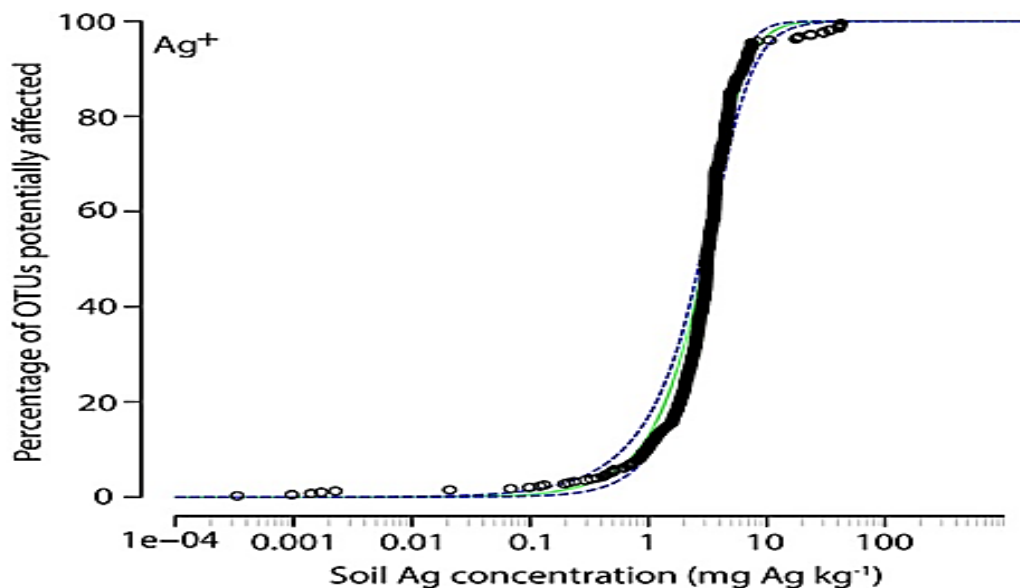
Οι μέθοδοι βασισμένες στην NGS μπορούν να αποκαλύψουν χρήσιμους βιοδείκτες για την εκτίμηση της υγείας του εδάφους και της αντίστοιχης μικροβιακής κοινότητας (Kim et al. 2022). Η μελέτη μικροβιωμάτων με βάση την αλληλούχιση του δείκτη 16S rRNA πραγματοποιείται πλέον ευρέως λόγω της υψηλής απόδοσης της αλληλούχισης (Wongkiew et al. 2022), επιτρέποντας αναλύσεις υψηλής ευκρίνειας της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας, του δυναμικού της και την προσαρμογή της σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως η εφαρμογή κάποιου γεωργικού φαρμάκου (Breitkreuz et al. 2021).

Η Μεταταξινομική αναφέρεται στην διαδικασία χαρακτηρισμού ολόκληρου του μικροβιώματος και της κατασκευής ενός μεταταξινομικού δέντρου που αποκαλύπτει τις σχέσεις των μελών της μικροβιακής κοινότητας (Marchesi and Ravel, 2015). Ως μεθοδολογία επιτρέπει την αποτελεσματική ανάλυση μεγάλου όγκου δειγμάτων με μικρό κόστος, ενώ οι εκτεταμένες βάσεις δεδομένων με αλληλουχίες των γονιδίων 16S rRNA των προκαρυωτών και της περιοχής ITS των μυκήτων καθιστούν εύκολη την ανάλυση της σύστασης της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας (Pérez-Losada et al. 2022). Σε αντίθεση με μεθόδους fingerprinting, οι οποίες παρέχουν πληροφορία μόνο για τα κυρίαρχα μέλη της μικροβιακής κοινότητας, η αλληλούχιση νέας γενιάς επιτρέπει ταυτοποίηση μέχρι και του 99,99% των μελών (Papadopoulou et al. 2018). Ωστόσο, η αναλυτική ικανότητα αυτών των δύο δεικτών περιορίζεται στο επίπεδο του είδους (Pérez-Losada et al. 2022). Επειδή η μεθοδολογία βασίζεται σε ενίσχυση των γονιδίων-δεικτών στο δείγμα, είναι χαρακτηριστική η εμφάνιση μεροληπτικότητας ενίσχυσης

(Breitwieser et al. 2019). Αντίθετα, προσεγγίσεις που χρησιμοποιούν αλληλούχιση τυχαίας προσπέλασης (shotgun sequencing) αποφεύγουν αυτό το μειονέκτημα, απαιτούν όμως ολόκληρα γονιδιώματα αναφοράς και όχι βάσεις δεδομένων με αλληλουχίες μόνο των γονιδίων-δεικτών, και είναι λιγότερο αποδοτικές ως προς το κόστος (Breitwieser et al. 2019).

1.4.4. Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους – Καμπύλες Κατανομής Ευαισθησίας Ειδών

Οι καμπύλες Κατανομής Ευαισθησίας Ειδών (Species Sensitivity Distribution curves, SSD curves) [Εικόνα 5] είναι μία σχετικά πρόσφατη μεθοδολογία που έχει προταθεί για την ταξινόμηση της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην ποικιλότητα της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας (Sala et al. 2012). Ως γενική αρχή, κάθε είδος εμφανίζει διαφορετική ευαισθησία σε ένα γεωργικό φάρμακο και οι ευαισθησίες περιγράφονται από μία παραμετρική ή μη παραμετρική εξίσωση στατιστικής κατανομής, απ' όπου στη συνέχεια μπορούν να υπολογιστούν δείκτες όπως το HC₅ (Hazardous Concentration 5%, επικίνδυνη συγκέντρωση για το 5% των οργανισμών) (Rizzi et al. 2021). Η κατασκευή



Εικόνα 5. Παράδειγμα καμπύλης Κατανομής Ευαισθησίας Ειδών. Στην εικόνα παρουσιάζεται ένα παράδειγμα καμπύλης Κατανομής Ευαισθησίας Ειδών της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας ως απόκριση σε εφαρμογή νανοσωματιδίων αργύρου. Με σημεία φαίνεται για κάθε είδος σε ποια συγκέντρωση νανοσωματιδίων αντιστοιχεί η τιμή EC₂₀ (Doolette et al. 2016).

αξιόπιστων καμπυλών απαιτεί ένα πολύ ποιοτικό σύνολο δεδομένων τοξικότητας, κάτι που αποτελεί φραγμό για την εφαρμογή τους σε γεωργικά φάρμακα για τα οποία υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα (Sala et al. 2012; Iwasaki and Sorgog 2021), ενώ η κατασκευή τους με βάσει καμπύλες δόσης-απόκρισης που προκύπτουν από Μεταταξινομική είναι δυνατή (Doolette et al. 2016) [Εικόνα 5], αλλά απαιτεί αξιόπιστες καμπύλες δόσης-απόκρισης και τελικά σημεία τοξικότητας (πχ. EC₂₀). Λίγες μελέτες έχουν εφαρμόσει καμπύλες SSD για τοξικές ουσίες σε χερσαίους μικροοργανισμούς, κυρίως λόγω της απουσίας δεδομένων τοξικότητας σε όλα τα τροφικά επίπεδα, ενώ φαίνεται να υπάρχει στοχαστικότητα, με τον τύπο του εδάφους να είναι καθοριστικός παράγοντας (Doolette et al. 2016).

1.5. Σκοπός της εργασίας

Τα βοτανικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα θεωρούνται γενικά ασφαλέστερα από τα συνθετικά, ωστόσο απαιτείται σημαντική έρευνα για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης όσον αφορά τη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Κατά τη διάρκεια της εργασίας ο στόχος ήταν να μελετηθεί η αποδόμηση στο έδαφος τριών γεωργικών φαρμάκων βοτανικής προέλευσης (προϊόντα MIF) και να συγκριθεί με αυτή τριών άλλων, ενός γνωστού φυτικού εκχυλίσματος με έντονη εντομοκτόνο δράση (εκχύλισμα Pyrethrum), ενός αναλόγου βακτηριακής προέλευσης (Spinosad) και ενός συνθετικού γνωστού για τοξικές επιδράσεις στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα (Chlorothalonil). Η αποδόμηση των βοτανικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων επιχειρήθηκε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης που να ερμηνεύει το επίπεδο και τη διάρκεια της έκθεσης της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους στις παραπάνω δραστικές ενώσεις. Επομένως, έγινε επώαση αντίστοιχων μικροκόσμων, μελετήθηκε ο ρυθμός αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων, ενώ ακολούθησε και εκχύλιση ολικού DNA από τους μικροκόσμους, προκειμένου να επιτραπεί μελλοντική Μεταταξινομική μελέτη και κατασκευή καμπυλών Κατανομής Ευαισθησίας Ειδών για την λεπτομερέστερη μελέτη της επίδρασης των βοτανικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (δεν αποτελούν τμήμα της παρούσας διατριβής).

2. Μέθοδοι και Υλικά

2.1 Εδάφη

Αποφασίστηκε το πείραμα να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά εδαφικά δείγματα, ένα από τη Γαλλία (Dijon) και ένα από τη Γερμανία (Prüfbericht). Τα δύο εδάφη διέφεραν σε χημικές και φυσικές ιδιότητες [Πίνακας 1]. Και για τα δύο εδάφη η δειγματοληψία είχε γίνει στα πρώτα 10cm εδάφους, ενώ στη συνέχεια κοσκινίστηκαν σε σωματίδια διαμέτρου 2cm. Τα εδάφη μετά το κοσκίνισμα αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Πίνακας 1. Σύνοψη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των δύο εδαφών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Έδαφος	Σύσταση	pH	TOC (%)	TN (%)	Λόγος C/N
Γαλλία	Πηλώδες, αργιλώδες	7,14	0,82	0,09	9,13
Γερμανία	Αμμώδες - πηλώδες	5,80	0,50	0,05	10,0

Συντομογραφίες: TOC – Total Organic Carbon, TN – Total Nitrogen

2.2. Γεωργικά Φάρμακα

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 6 διαφορετικά γεωργικά φάρμακα, με τα 4 να είναι βοτανικής προέλευσης, ένα ανάλογο συστατικού βακτηριακής προέλευσης και ένα συνθετικό. Ως βοτανικής προέλευσης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής: MIF004 (αλειφατική αλκοόλη), MIF030 (διϋδροχαλκόνη) και MIF053 (ισοφλαβόνη) (Metabolic Insights, Ltd., Ziona Industrial Park, Israel, καθαρότητα 99,9%). Τα MIF004 και MIF030 αναπτύχθηκαν ως μυκητοκτόνα για τον έλεγχο *Rhizoctonia* και *Pythium*, ενώ το MIF053 αναπτύχθηκε ως μυκητοκτόνο για τον έλεγχο *Puccinia*. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το Pyrethrum (εκχύλισμα pyrethrum, Chem Service, Inc., West Chester, PA 19381-0599, USA, καθαρότητα 50%). Ως βακτηριακής προέλευσης γεωργικό φάρμακο χρησιμοποιήθηκε το Spinosad (Bayer AG, Leverkusen, Germany, καθαρότητα 92%), ένα συνθετικό ανάλογο spinosyn, ενώ ως συνθετικό γεωργικό φάρμακο χρησιμοποιήθηκε το Chlorothalonil (BLD Pharmatech, Ltd., Shanghai, China, καθαρότητα 98%).

Σε όλες τις περιπτώσεις, τα γεωργικά φάρμακα ήταν σε μορφή αναλυτικού προτύπου. Το εκχύλισμα pyrethrum, εκτός από τις Pyrethrin I και Pyrethrin II, περιείχε επίσης τις Cinerin I, Cinerin II, Jasmolin I και Jasmolin II (Antonious 2004). Το Spinosad περιείχε 2 ανάλογα (SNS A – Spinosyn A και SNS D – Spinosyn D), με την SNS A να είναι η κυρίαρχο και οι υπολογισμοί έγιναν με βάση αυτή.

2.3. Προετοιμασία διαλυμάτων εργασίας

Από τα γεωργικά φάρμακα, το εκχύλισμα pyrethrum και το MIF004 βρίσκονταν σε υγρή μορφή, ενώ τα υπόλοιπα σε μορφή σκόνης. Για την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας, έγινε διάλυση σε ακετόνη με χρήση υπερήχων για 15 λεπτά, προκειμένου να παρασκευαστούν διαλύματα με συγκεντρώση 3400mg/L και 1200mg/L. Τα υπόλοιπα διαλύματα εργασίας, συγκεντρώσεων 400mg/L, 150mg/L, 50mg/L και 15mg/L παρασκευάστηκαν με αραιώση των προηγούμενων.

2.4. Πειραματικός σχεδιασμός

Το πείραμα προέβλεπε τη χρήση 6 διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων σε 6 διαφορετικές δόσεις εφαρμογής και ένα δείγμα μάρτυρα σε καθένα από τα δύο εδάφη, με 4 επαναλήψεις για κάθε μία από τις παραπάνω μεταχειρίσεις. Η μεταχείριση μάρτυρα έγινε με εφαρμογή ακετόνης και νερού χωρίς παρουσία γεωργικού φαρμάκου, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας σε μετέπειτα μοριακές αναλύσεις. Από την αρχική ποσότητα κάθε εδάφους δημιουργήθηκαν δείγματα για την κάθε συνθήκη. Χρησιμοποιήθηκαν από κάθε εδαφικό δείγμα 365,5g εδάφους.

Οι συγκεντρώσεις εφαρμογής των γεωργικών φαρμάκων επιλέχθηκε να είναι ίδιες για όλα τα γεωργικά φάρμακα. Ο όγκος των εφαρμογών των γεωργικών φαρμάκων από κάθε ένα από τα 6 διαλύματα εργασίας, καθορίστηκε με βάση την τελική μάζα των εδαφών και εξασφάλιζε τις εξής συγκεντρώσεις κάθε γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος: 0,2mg/kg (προσεγγίζει την προτεινόμενη δόση χορήγησης Pyrethrum, 0,25mg/kg), 0,6mg/kg (προσεγγίζει την προτεινόμενη δόση χορήγησης Spinosad και των προϊόντων MIF, 0,5mg/kg), 1,8mg/kg (προτεινόμενη δόση χορήγησης Chlorothalonil) και υψηλότερες δόσεις 5,4mg/kg, 16,2mg/kg και 48,6mg/kg.

Για την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων, τα 365g εδάφους για κάθε διαφορετική μεταχείριση τοποθετήθηκαν πάνω σε μαύρες σακούλες. Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων έγινε με χρήση πιπέτας, ώστε να εφαρμοστεί φάρμακο σε κάθε πλευρά του απλωμένου εδάφους. Στη συνέχεια υπήρξε αναμονή 5min – 10min για να εξατμιστεί η ακετόνη στην οποία ήταν διαλυμένα τα γεωργικά φάρμακα, και έγινε προσεκτική χειρωνακτική ανάδευση του εδάφους. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη του απαραίτητου όγκου νερού (35mL) και δεύτερη ανάδευση, ώστε τελικά το γεωργικό φάρμακο να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένο και το ποσοστό υγρασίας να προσεγγίζει το 40% της υδατοχωρητικότητας. Το έδαφος για κάθε μεταχείριση μοιράστηκε ισομερώς (100g) σε 4 πλαστικές σακούλες προς δημιουργία των 4 μικροκόσμων – επαναλήψεων. Σε κάθε μικρόκοσμο δημιουργήθηκαν τρεις οπές στο πάνω μέρος για να εξασφαλιστεί αερισμός κατά την επώαση. Ακολούθως οι μικρόκοσμοι τοποθετήθηκαν σε εωπαστικούς θαλάμους, στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία 25°C. Η υγρασία των μικροκόσμων ελέγχθηκε κάθε 5 με 7 μέρες από την έναρξη της επώασης. Σε περίπτωση που η απώλεια νερού ξεπερνούσε το 0,5% της αρχικής μάζας των μικροκόσμων έγινε προσθήκη ανάλογης ποσότητας ddH₂O.

Η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων μελετήθηκαν σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης: 1,8mg/kg και 16,2mg/kg. Δείγματα (10g) από κάθε μεταχείριση συλλέχθηκαν τις ημέρες 0, 2, 5, 10, 20 και 40 μετά την έναρξη επώασης των μικροκόσμων.

2.5. Ανάλυση επιπέδων γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος

2.5.1 Εκχύλιση γεωργικών φαρμάκων από το έδαφος

Για την εκχύλιση των MIF004, MIF030 και MIF053 πραγματοποιήθηκε διπλή εκχύλιση ως εξής. Αρχικά, ζυγίστηκαν από κάθε δείγμα 5g εδάφους και διαλύθηκαν σε 10mL ακετονιτριλίου σε κωνικές φιάλες. Οι φιάλες ανακινήθηκαν για 1 ώρα στα 300rpm και κρατήθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο χωρίς το έδαφος σε σωλήνες τύπου Teflon. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για δεύτερη φορά, με τη διαφορά ότι στο τέλος κρατήθηκαν τόσο το υπερκείμενο όσο και διαλυμένα μικρά κομμάτια εδάφους. Τα συνολικά εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 8.000rpm. Από το υπερκείμενο λήφθηκε κάθε φορά όγκος περίπου 5mL με σύριγγα και πραγματοποιήθηκε

φιλτράρισμα με χρήση υδρόφοβου φίλτρου PTFE (0.45 μm), και 1mL προστέθηκε σε σωληνάκι τύπου HPLC.

Για την εκχύλιση του Chlorothalonil και του Pyrethrum πραγματοποιήθηκε απλή εκχύλιση. Ζυγίστηκε η ίδια ποσότητα δείγματος εδάφους και διαλύθηκε σε 20mL ακετονιτριλίου για το Chlorothalonil και 15mL ακετονιτριλίου για το Pyrethrum. Οι φυάλες ανακινήθηκαν και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν όπως περιγράφηκε πριν, ενώ από την ανακίνηση κρατήθηκε τόσο το υπερκείμενο όσο και διαλυμένα μικρά κομμάτια εδάφους. Το φιλτράρισμα έγινε όπως περιγράφηκε πριν με χρήση υδρόφοβου φίλτρου.

Για το Spinosad χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κατά QuEChERS ως εξής: 5g εδάφους τοποθετήθηκαν απευθείας σε σωλήνες τύπου Teflon και διαλύθηκαν σε 5mL ψυχρού ddH₂O και 10mL ακετονιτριλίου και ανακινήθηκε σε vortex για 1min. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη μείγματος αλάτων αποτελούμενου από 4g MgSO₄, 1g NaCl, and 1.5g C₆H₅Na₃O₇·2H₂O και το συνολικό μείγμα ανακινήθηκε σε vortex για 1min και φυγοκεντρήθηκε στα 8000rpm για 5min. 1mL του υπερκειμένου συλλέχθηκε με πιπέτα σε σωληνάκια τύπου Eppendorf 1,5mL και αναμίχθηκε με 0,15g MgSO₄ και 0,025 g PSA. Τα σωληνάκια ανακινήθηκαν σε vortex για 30s, φυγοκεντρήθηκαν στα 3000rpm για 1min και το υπερκείμενο φιλτραρίστηκε και 1mL συλλέχθηκε σε σωληνάκι τύπου HPLC.

Για να προσδιοριστεί το ποσοστό ανάκτησης της μεθόδου εκχύλισης του Chlorothalonil, πραγματοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Τρία δείγματα εδάφους 5g το καθένα δέχθηκαν εφαρμογή διαλυμάτων Chlorothalonil στοχεύοντας σε τελικές συγκεντρώσεις στο έδαφος 0,1mg/kg, 1mg/kg and 10mg/kg. Μετά την εφαρμογή ακολουθήθηκε άμεσα η μέθοδος εκχύλισης χωρίς ενδιάμεση επώαση. Ύστερα από την ολοκλήρωση της εκχύλισης έγινε προσδιορισμός στην HPLC όπως περιγράφηκε παρακάτω. Από την όλη διαδικασία, υπολογίστηκε ότι το ποσοστό ανάκτησης του Chlorothalonil ήταν 89,5% ($\sigma = 2,63$, $CV = 2,94\%$ ανάμεσα στα ποσοστά ανάκτησης από τις τρεις επαναλήψεις στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις). Τα ποσοστά ανάκτησης των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα είχαν προσδιοριστεί σε προηγούμενο πείραμα και ήταν 91,4% (MIF004), 90,7% (MIF030), 84,1% (MIF053), 85,3% (Spinosad), 96,0% (Pyrethrins).

2.5.2 Ανάλυση των γεωργικών φαρμάκων σε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης - HPLC

Η ανάλυση και ποσοτικός προσδιορισμός των γεωργικών φαρμάκων στα εδάφη πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Shimadzu HPLC-PDA με στήλη CNH Athena RP C18 150 mm (CNW Technologies, Dusseldorf, Germany), χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες παραμέτρους. Ο προσδιορισμός του MIF004 έγινε στα 202nm με την κινητή φάση να αποτελείται από ακετονιτρίλιο και ddH₂O σε αναλογία 85:15 (κ.ο), ενώ ο χρόνος κατακράτησης του MIF004 ήταν 5 min. Τα MIF030 και MIF053 ανιχνεύθηκαν στα 210nm και 248nm αντίστοιχα, με κινητή φάση που αποτελούταν από μίγμα ακετονιτρίλιου/νερού σε αναλογία κατ' όγκο 60:40, ενώ ο χρόνος κατακράτησης ήταν 4,7min για το MIF030 και 3,8min για το MIF030. Ο προσδιορισμός του Chlorothalonil πραγματοποιήθηκε με κινητή φάση 60:40 ακετονιτρίλιο:ddH₂O + 0,1% H₃PO₄ (κ.ο.) και χρόνο κατακράτησης 5,4min. Οι Spinosyn A και Spinosyn D προσδιορίστηκαν στα 245nm με κινητή φάση 45% ακετονιτρίλιο, 43% μεθανόλη και 12% διάλυμα οξικού αμμωνίου 2%. (κ.ο.) Ο χρόνος κατακράτησης ήταν 10,3min για τη Spinosyn A και 12,4min για τη Spinosyn D. Τέλος, για τον προσδιορισμό των Pyrethrin II και Pyrethrin I χρησιμοποιήθηκε μήκος κύματος 230nm και κινητή φάση με βαθμίδωση διαλυτών, ξεκινώντας από ένα λόγο 20:80 ακετονιτρίλιο προς ddH₂O (κ.ο.), ο οποίος σταδιακά μεταβλήθηκε σε 50:50 στα 5min και σε 70:30 στα 20min, μένοντας σταθερός μέχρι τα 35min, ενώ στη συνέχεια επέστρεψε σταδιακά στον αρχικό λόγο 20:80 στα 40min και παρέμεινε εκεί μέχρι το τέλος. Ο ρυθμός ροής ήταν 1mL/min σε όλες τις περιπτώσεις με εξαίρεση το Chlorothalonil, όπου ήταν 1,4mL/min.

2.6. Υπολογισμός DT₅₀ και DT₉₀ των γεωργικών φαρμάκων στα εδάφη

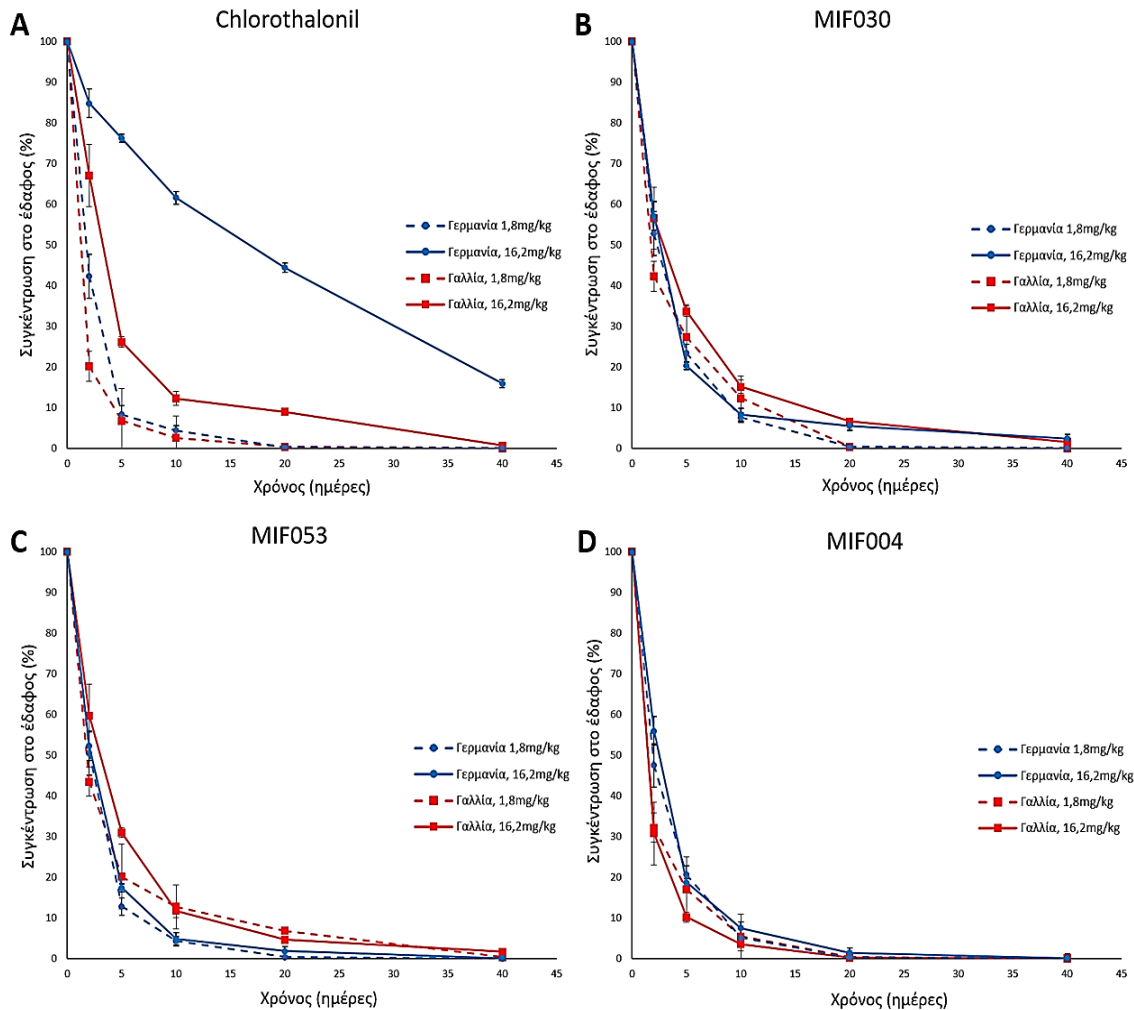
Οι συγκεντρώσεις των γεωργικών φαρμάκων στα διαφορετικά χρονικά σημεία μετρήθηκαν στην HPLC και, με κατάλληλους υπολογισμούς, υπολογίστηκαν οι πραγματικές συγκεντρώσεις στο έδαφος κάθε μικροκόσμου. Για τη μελέτη αποδόμησης, οι μέσοι όροι κάθε τριπλέτας επαναλήψεων την Ημέρα 0 μετατράπηκαν σε 100% συγκέντρωσης και οι συγκεντρώσεις τις επακόλουθες ημέρες για κάθε μεταχείριση εκφράστηκαν ως ποσοστό αυτής της αρχικής συγκέντρωσης. Η κινητική αποδόμησης σε κάθε διαφορετική μεταχείριση διερευνήθηκε με τη χρήση της R. Εν συντομία,

χρησιμοποιήθηκε το πακέτο `mkIn` στο RStudio, με είσοδο τις τιμές των γεωργικών φαρμάκων ύστερα από την έκφραση τους ως ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης, και έξοδο τις τιμές της κινητικής αποδόμησης (DT50, DT90, κλπ.) που υπολογίστηκαν με τη χρήση τεσσάρων μαθηματικών μοντέλων, των Single First-Order (SFO), First-Order Multi-Compartment (FOMC), Double First-Order Parallel kinetics (DFOP) και Hockey-Stick (HS). Το καταλληλότερο μοντέλο επιλέχθηκε για κάθε διαφορετική μεταχείριση σύμφωνα με τις οδηγίες της Σύμπραξης FOCUS (FOCUS 2006). Ως κριτήρια επιλογής χρησιμοποιήθηκαν η οπτική εκτίμηση προσαρμογής (optical fit assessment) και η τιμή χ^2 (αξιόπιστα αποτελέσματα αν $\chi^2 < 15\%$).

Αποτελέσματα

Τα μαθηματικά μοντέλα που περιέγραφαν βέλτιστα τις παρατηρούμενες τιμές ήταν τα SFO και HS, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις το μοντέλο που επιλέχθηκε περιέγραφε ικανοποιητικά τα δεδομένα ($\chi^2 < 15\%$) [Πίνακας 2].

Το Chlorothalonil παρουσίασε ένα πρότυπο γρήγορης αποδόμησης στα δείγματα στα οποία έγινε εφαρμογή της χαμηλής δόσης (1,6mg/kg), τόσο στο έδαφος από τη Γαλλία όσο και σε αυτό από τη Γερμανία, με την τιμή DT90 στο έδαφος από τη Γερμανία να είναι στις 5,16 ημέρες, και στο έδαφος από τη Γαλλία 2,97 ημέρες [Πίνακας 2]. Το πρότυπο ήταν παρόμοιο και στα δύο εδάφη, με μοναδική μικρή απόκλιση την Ημέρα 2, και φαίνεται να ακολουθεί μία κινητική πρώτου βαθμού [Εικόνα 6A], ενώ και στις δύο περιπτώσεις η συγκέντρωση έφτασε σε επίπεδα χαμηλότερα από το κατώτερο όριο ανίχνευσης την Ημέρα 20. Ωστόσο, όταν εφαρμόστηκε η υψηλή δόση (16,2mg/kg), η αποδόμηση του Chlorothalonil ήταν πολύ πιο αργή, ιδιαίτερα στο έδαφος από τη Γερμανία. Η διαφορά ανάμεσα στα δύο εδάφη ήταν σημαντική, καθώς στο έδαφος από τη Γαλλία η συγκέντρωση την Ημέρα 40 ήταν 0,59%, ενώ στο έδαφος από τη Γερμανία παρέμεινε υψηλά στο 15,86%, με τις αντίστοιχες τιμές DT90 να είναι 14,05 ημέρες και 55,5 ημέρες αντίστοιχα. Τα πρότυπα αποδόμησης ήταν επίσης ασταθή, καθώς η αποδόμηση στο έδαφος από τη Γαλλία ακολουθεί ένα πρότυπο παρόμοιο με αυτό της αποδόμησης στην εφαρμογή χαμηλής δόσης, αλλά στο έδαφος από τη Γερμανία φαίνεται να είναι περισσότερο όμοια με μία διφασική κινητική [Εικόνα 6A].



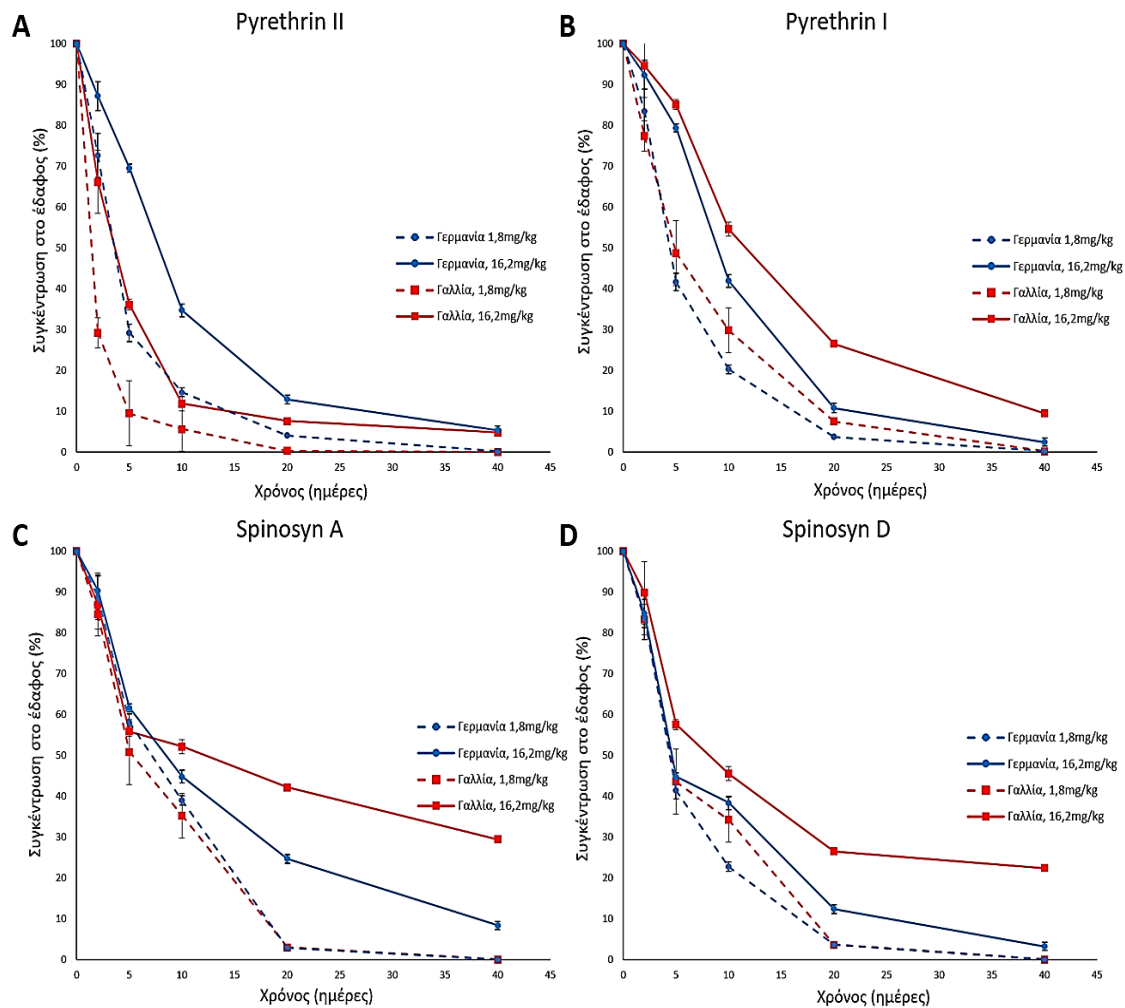
Εικόνα 6. Αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος (I). Τα διαγράμματα απεικονίζουν τα πρότυπα αποδόμησης των (A) Chlorothalonil, (B) MIF030, (C) MIF053 και (D) MIF004. Οι μαύρες γραμμές παρουσιάζουν το εύρος σφάλματος, το οποίο είναι η τυπική απόκλιση μεταξύ των 3 επαναλήψεων. Οι συγκεντρώσεις είναι εκφρασμένες ως ποσοστά της αρχικής συγκέντρωσης (Ημέρα 0). Τιμές χαμηλότερες από το κατώτερο όριο ανίχνευσης θεωρήθηκαν 0%.

Και τα τρία σκευάσματα MIF ακολουθούσαν, και στα δύο εδάφη, και στις δυο δόσεις εφαρμογής, ένα κοινό πρότυπο αποδόμησης, το οποίο προσομοιάζει κινητική πρώτου βαθμού [Εικόνες 6B-D], ιδιαίτερα στην περίπτωση του MIF004. Ο ρυθμός αποδόμησης ήταν υψηλός σε όλες τις μεταχειρίσεις, με την υψηλότερη DT90 να έχει παρατηρηθεί για το MIF030 στην εφαρμογή υψηλής δόσης στο έδαφος από τη Γαλλία, και να είναι 15,23 ημέρες [Πίνακας 2], ενώ η υψηλότερη δόση εφαρμογής δεν φαίνεται να επιβραδύνει την αποδόμηση, καθώς οι τιμές DT50 και DT90 και για τα τρία προϊόντα MIF είναι

παρόμοιες με τις τιμές που προέκυψαν από την εφαρμογή χαμηλής δόσης [Πίνακας 2]. Σε αντίθεση με το πρότυπο αποδόμησης του Chlorothalonil, όπου η εφαρμογή υψηλής δόσης οδήγησε σε πιο αργή αποδόμηση και στα δύο εδάφη [Εικόνα 6A], στην περίπτωση των σκευασμάτων MIF, η αποδόμηση ήταν γρήγορη ανεξάρτητα από τη δόση εφαρμογής. Τα MIF053 και MIF030 παρουσίασαν ταχύτερη αποδόμηση στο έδαφος από τη Γερμανία [Εικόνες 6B-C], ενώ το MIF004 αποδομήθηκε ταχύτερα στο έδαφος από τη Γαλλία [Εικόνα 6D].

Οι ουσίες ενδιαφέροντος που περιέχονταν στο εκχύλισμα Pyrethrum (Pyrethrin I και Pyrethrin II) παρουσίασαν ένα μεικτό πρότυπο αποδόμησης [Εικόνες 7A-B]. Η αποδόμηση της Pyrethrin II ήταν ταχύτερη στο έδαφος από τη Γαλλία τόσο στην χαμηλή όσο και στην υψηλή δόση εφαρμογής [Εικόνα 7A]. Για την Pyrethrin I, η κατάσταση φαίνεται να είναι ανεστραμμένη, καθώς η αποδόμηση στο έδαφος από τη Γερμανία ήταν πλέον ταχύτερη από αυτή στο έδαφος από τη Γαλλία, και στις δύο δόσεις εφαρμογής [Εικόνα 7B].

Οι κυρίαρχες ενώσεις στο Spinosad (Spinosyn A και Spinosyn D) αποδομήθηκαν πλήρως κατά τη διάρκεια της επώασης 40 ημερών στην περίπτωση της χαμηλότερης δόσης εφαρμογής και στα δύο εδάφη, ενώ στην περίπτωση της υψηλής δόσης εφαρμογής, υπολείμματα του Spinosad εντοπίστηκαν με την ολοκλήρωση της επώασης στο έδαφος (29,43% για την Spinosyn A και 22,40% για την Spinosyn D την Ημέρα 40) [Εικόνες 7C-D]. Φαίνεται ότι, στην περίπτωση της υψηλής δόσης εφαρμογής, η αποδόμηση και των δύο ουσιών ενδιαφέροντος είναι πιο αργή στο έδαφος από τη Γαλλία, ενώ στην περίπτωση της χαμηλής δόσης εφαρμογής δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση. Επίσης, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, όπως για την Spinosyn A στην εφαρμογή υψηλής δόσης στο έδαφος από τη Γαλλία [Εικόνα 7C], η αποδόμηση φαίνεται να ακολουθεί ένα πρότυπο διφασικής καμπύλης, ενώ η αντίστοιχη μεταχείριση στην περίπτωση της Spinosyn D δεν έχει το ίδιο ξεκάθαρο πρότυπο [Εικόνα 7D].



Εικόνα 7. Αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος (II). Τα διαγράμματα απεικονίζουν τα πρότυπα αποδόμησης των (A) Pyrethrin II, (B) Pyrethrin I, (C) Spinosyn A και (D) Spinosyn D. Οι μαύρες γραμμές παρουσιάζουν το εύρος σφάλματος, το οποίο είναι η τυπική απόκλιση μεταξύ των 3 επαναλήψεων. Οι συγκεντρώσεις είναι εκφρασμένες ως ποσοστά της αρχικής συγκέντρωσης (Ημέρα 0). Τιμές χαμηλότερες από το κατώτερο όριο ανίχνευσης θεωρήθηκαν 0%.

Λαμβάνοντας υπόψιν τις τιμές DT₅₀ και DT₉₀ σε όλες τις μεταχειρίσεις, μπορούν να παρατηρηθούν διαφορετικές περιβαλλοντικές καταλήξεις για τα διαφορετικά γεωργικά φάρμακα, με την δόση εφαρμογής αλλά και τον τύπο του εδάφους να έχουν σημαντική επίδραση [Πίνακας 2]. Όσον αφορά τα προϊόντα MIF, όπως αναφέρθηκε και πριν, η αποδόμηση τους φαίνεται να είναι γρήγορη. Η αρχική φάση της αποδόμησης φαίνεται να μην εξαρτάται από την δόση εφαρμογής, καθώς σε μόλις 2/6 περιπτώσεις η τιμή DT₅₀

Πίνακας 2. Παράμετροι κινητικών αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων

Μεταχείριση	DT50 (ημέρες)	DT90 (ημέρες)	Μοντέλο	χ^2 (%)
Chlorothalonil				
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 1,8mg/kg	0,86	2,97	HS	0,08
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 16,2mg/kg	2,84	14,05	HS	7,75
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 1,8mg/kg	1,55	5,16	SFO	4,90
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 16,2mg/kg	15,40	55,50	HS	2,61
MIF004				
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 1,8mg/kg	1,43	4,74	SFO	12,53
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 16,2mg/kg	1,25	4,14	SFO	7,36
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 1,8mg/kg	2,04	6,78	SFO	4,35
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 16,2mg/kg	2,25	7,49	SFO	4,84
MIF030				
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 1,8mg/kg	1,62	11,92	HS	3,30
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 16,2mg/kg	2,94	15,23	HS	7,05
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 1,8mg/kg	2,33	7,75	SFO	3,28
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 16,2mg/kg	2,30	7,62	HS	3,75
MIF053				
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 1,8mg/kg	1,67	13,51	HS	1,87
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 16,2mg/kg	2,95	9,80	HS	3,90
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 1,8mg/kg	1,89	6,27	SFO	4,67
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 16,2mg/kg	2,07	6,89	SFO	2,94
Pyrethrin II				
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 1,8mg/kg	1,13	4,75	HS	2,17
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 16,2mg/kg	3,34	11,11	HS	1,10
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 1,8mg/kg	3,29	10,92	SFO	8,25
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 16,2mg/kg	7,18	23,84	SFO	5,81
Pyrethrin I				
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 1,8mg/kg	5,32	17,67	HS	3,98
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 16,2mg/kg	11,71	32,74	HS	3,10
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 1,8mg/kg	4,30	14,28	SFO	8,06
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 16,2mg/kg	7,92	26,30	SFO	9,07
Spinosyn A				
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 1,8mg/kg	5,65	18,77	HS	9,38
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 16,2mg/kg	10,62	94,38	HS	4,20
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 1,8mg/kg	6,25	20,76	HS	10,22
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 16,2mg/kg	8,79	34,90	HS	6,37
Spinosyn D				
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 1,8mg/kg	5,23	17,38	HS	12,25
Έδαφος: Γαλλία, Δόση: 16,2mg/kg	6,61	62,68	HS	7,79
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 1,8mg/kg	4,42	14,70	SFO	8,25
Έδαφος: Γερμανία, Δόση: 16,2mg/kg	5,92	23,02	HS	12,39

Συντομογραφίες: SFO – Single First-Order, και HS – Hockey-Stick.

ήταν μεγαλύτερη στην υψηλή δόση εφαρμογής σε σχέση με τη χαμηλή για το ίδιο προϊόν στον ίδιο τύπο εδάφους [Πίνακας 2]. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την όψιμη φάση της αποδόμησης, όπου μόλις σε 1/6 περιπτώσεις η τιμή DT₉₀ ήταν μεγαλύτερη στην υψηλή δόση εφαρμογής σε σχέση με τη χαμηλή για το ίδιο προϊόν στον ίδιο τύπο εδάφους [Πίνακας 2]. Μάλιστα, και για την τιμή DT₅₀ και για την τιμή DT₉₀, υπήρχε μία κοινή περίπτωση, που εντοπίζεται στο προϊόν MIF030 στο έδαφος από τη Γαλλία. Όσον αφορά το Chlorothalonil, σε κάθε περίπτωση οι τιμές DT₅₀ και DT₉₀ ήταν υψηλότερες στις περιπτώσεις της υψηλής δόσης εφαρμογής, ενώ η τιμή DT₉₀ ήταν υψηλότερη στο έδαφος από τη Γερμανία [Πίνακας 2], κάτι που δείχνει ότι το Chlorothalonil είναι περισσότερο υπολειμματικό στο έδαφος αυτό με μία εφ' άπαξ εφαρμογή υψηλής δόσης. Οι Spinosyn A και Spinosyn D παρουσιάζουν επίσης αποδόμηση που εξαρτάται εξίσου από τον τύπο του εδάφους και τη δόση εφαρμογής. Σε 4/4 περιπτώσεις η τιμή DT₅₀ ήταν υψηλότερη στην περίπτωση της υψηλής δόσης εφαρμογής σε σύγκριση με τη χαμηλή στον ίδιο τύπο εδάφους [Πίνακας 2], ενώ το ίδιο ίσχυε και για την DT₉₀ [Πίνακας 2]. Επιπλέον, σε 3/4 περιπτώσεις η τιμή DT₅₀ ήταν υψηλότερη στην περίπτωση του εδάφους από τη Γαλλία, ενώ το ίδιο ισχύει και για την τιμή DT₉₀. Η εξαίρεση είναι για την Spinosyn A στη χαμηλή δόση εφαρμογής, όπου οι DT₅₀ και DT₉₀ ήταν υψηλότερες στο έδαφος από τη Γερμανία [Πίνακας 2]. Τέλος, σε 4/4 περιπτώσεις για το εκχύλισμα Pyrethrum οι τιμές DT₅₀ και DT₉₀ ήταν μεγαλύτερες στη μεγαλύτερη δόση εφαρμογής. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, οι τιμές DT₅₀ και DT₉₀ ήταν μεγαλύτερες στο έδαφος από τη Γερμανία σε σχέση με την αντίστοιχη μεταχείριση στο έδαφος από τη Γαλλία για την Pyrethrin II, ενώ είναι μεγαλύτερες στο έδαφος από τη Γαλλία για την Pyrethrin I [Πίνακας 2]. Επίσης, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, οι τιμές DT₅₀ και DT₉₀ για την Pyrethrin I είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές στον ίδιο τύπο εδάφους και στην ίδια δόση εφαρμογής για την Pyrethrin II [Πίνακας 2]. Συνολικά, το Chlorothalonil παρουσίασε τη μεγαλύτερη τιμή DT₅₀ [Πίνακας 2], και οι Spinosyn A και Spinosyn D τις 2 μεγαλύτερες και 3/5 μεγαλύτερες τιμές DT₉₀ συνολικά [Πίνακας 2], ενώ τα προϊόντα MIF παρουσίασαν γενικά τις περισσότερο χαμηλές τιμές.

4. Συζήτηση

4.1. Αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων

Το Chlorothalonil, παρουσίασε μία ιδιαίτερα γρήγορη αποδόμηση στη χαμηλή δόση εφαρμογής (1,8mg/kg), καθώς και μία σχετικά γρήγορη αποδόμηση στην περίπτωση της υψηλής δόσης εφαρμογής (16,2mg/kg) στο έδαφος από τη Γαλλία (τιμή DT₉₀ 14,05 ημέρες). Ωστόσο, η αποδόμηση ήταν εξαιρετικά πιο αργή στην περίπτωση της υψηλής δόσης εφαρμογής στο έδαφος από τη Γερμανία. Οι χαμηλές τιμές DT₅₀ στις 3/4 περιπτώσεις [Πίνακας 2] συμφωνούν με τα αποτελέσματα των White and Potter, οι οποίοι παρατήρησαν τιμή DT₅₀ 2,3 ημέρες (White and Potter 2010), αλλά και με τα αποτελέσματα των de Souza et al., οι οποίοι παρατήρησαν τιμή DT₅₀ μικρότερη της 1 ημέρας (de Souza et al. 2017), ενώ οι μικρές διαφορές μπορούν να αποδοθούν σε πιθανή διαφορετική προσρόφηση και ελαφρώς διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα του Chlorothalonil στα εδάφη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Η βιοδιαθεσιμότητα είναι καθοριστικός παράγοντας για την περιβαλλοντική κατάληξη των γεωργικών φαρμάκων, καθορίζοντας την υπολειμματικότητα και το ρυθμό αποδόμησης (de Souza et al. 2017). Οι τιμές DT₅₀ ήταν στις 3/4 περιπτώσεις [Πίνακας 2] αρκετά μικρότερες από αυτές που αναφέρουν οι Wang et al. (8,77 – 27,09 ημέρες) (Wang et al. 2020), οι οποίοι πραγματοποίησαν τη μελέτη τους σε δύο τύπους εδαφών, εφαρμόζοντας ωστόσο υψηλότερες δόσεις εφαρμογής 20mg/kg και 50mg/kg. Ακόμα και στη χαμηλότερη τους δόση εφαρμογής (5mg/kg) η τιμή DT₅₀ ήταν υψηλή και στους 2 τύπους εδαφών (9,79 και 15,07 ημέρες). Επομένως, στη δική μας περίπτωση, η γρηγορότερη αποδόμηση του Chlorothalonil μπορεί να οφείλεται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν, είτε σε μία περισσότερο ικανή προς αποδόμηση ενδογενή μικροβιακή κοινότητα. Συγκεκριμένα, ο συνολικός οργανικός άνθρακας (36,06g/kg) στο ένα έδαφος από αυτά που χρησιμοποίησαν οι Wang et al., και το pH (8,1 και 7,71) και στα δύο εδάφη τους (Wang et al. 2020) ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με τα δικά μας εδάφη [Πίνακας 1], κάτι που θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένη προσρόφηση του Chlorothalonil στο έδαφος και αυξημένη υπολειμματικότητα. Από την άλλη, η περίπτωση της ικανότερης ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας μπορεί να επαληθευτεί από την μετέπειτα επεξεργασία δεδομένων NGS. Οι τιμές DT₅₀ και DT₉₀ ήταν ωστόσο

εντός του εύρους που αναφέρεται στην ανασκόπηση της EFSA για το Chlorothalonil (EFSA 2018a), παρόλο που το εύρος είναι μεγάλο (DT₅₀ 0,44 – 31,6 ημέρες και DT₉₀ 1,46 – 68,2 ημέρες). Η τιμή DT₅₀ [Πίνακας 2] ήταν πολύ μικρότερη από το εύρος 1 – 12 μήνες που αναφέρεται από τους Wang et al. και λαμβάνει υπόψιν την επίδραση του τύπου του εδάφους (Wang et al. 2011), αλλά και από το εύρος 19 – 30 ημέρες που αναφέρεται από τους Baćmaga et al. (Baćmaga et al. 2018), υποδεικνύοντας ότι είναι πολύ πιθανό η ενδογενής μικροβιακή κοινότητα στις 3/4 περιπτώσεις να προάγει γρήγορη βιοαποδόμηση του Chlorothalonil. Υπάρχουν στη βιβλιογραφία αναφορές για βακτηριακά στελέχη με ικανότητα αποδόμησης του Chlorothalonil, απομονωμένα από εδαφικά δείγματα επιβαρυσμένα με το γεωργικό φάρμακο (Wang et al. 2011; Zhang et al. 2014; Zhang et al. 2019). Η αποδόμηση αναφέρεται ότι μπορεί να συμβεί είτε για μικρές συγκεντρώσεις μέσω συμμεταβολισμού, είτε για μεγαλύτερες απουσία πηγής άνθρακα, χωρίς ωστόσο το Chlorothalonil να χρησιμοποιείται για βακτηριακή αύξηση (Wang et al. 2011), ενώ η βιοαποδόμησή του μπορεί να παρεμποδιστεί από την μερική ή ολική έλλειψη απαραίτητων θρεπτικών (Baćmaga et al. 2018). Η ύπαρξη δύο ατόμων αζώτου στη χημική δομή του Chlorothalonil [Εικόνα 4] θα μπορούσε να δικαιολογήσει την υπόθεση ότι το γεωργικό φάρμακο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενδεχομένως από τους μικροοργανισμούς του εδάφους ως οργανική πηγή αζώτου κατά την αμμωνιοποίηση στο γεωχημικό κύκλο του αζώτου. Το ενδεχόμενο αυτό θα μπορούσε να διερευνηθεί μέσω εξέτασης της συσχέτισης μεταξύ της αφθονίας γονιδίων που συμμετέχουν γενικότερα στον κύκλο του αζώτου (πχ. *amoA*) στα εδαφικά δείγματα και της εφαρμογής του Chlorothalonil, ύστερα από πολυπαραγοντική ανάλυση (multivariate analysis) σε δεδομένα NGS, ώστε να διευκρινιστεί η φύση της απόκρισης της εκάστοτε μικροβιακής κοινότητας στην έκθεση στο Chlorothalonil. Στην περίπτωση της υψηλής δόσης εφαρμογής στο έδαφος από τη Γερμανία, η τιμή DT₉₀ (55,5 ημέρες) βρίσκεται και πάλι εντός του εύρους της EFSA (EFSA 2018a), ωστόσο αποκλίνει εξαιρετικά από τις υπόλοιπες τιμές που παρατηρήσαμε, υποδεικνύοντας μία περισσότερο αρνητική απόκριση της μικροβιακής κοινότητας στην έκθεση της στο Chlorothalonil. Επιπλέον, αποκλίνει σημαντικά από το εύρος τιμών 10 – 20 ημέρες που παρατήρησαν οι de Souza et al. (de Souza et al. 2017). Συμπερασματικά, αν και η γρήγορη αποδόμηση του Chlorothalonil υποδεικνύει μία θετική απόκριση της μικροβιακής κοινότητας στην

έκθεσή της στο Chlorothalonil στη χαμηλή δόση εφαρμογής, η απόκριση μεταβλήθηκε στην υψηλή δόση εφαρμογής, δείχνοντας ένα πιθανό αντίστροφο πρότυπο δόσης – απόκρισης, το οποίο θα μπορούσε να φανεί με μετέπειτα κατασκευή καμπύλων Κατανομής Ευαισθησίας Ειδών βασιζόμενη σε δεδομένα αφθονίας ειδών από NGS.

Οι ενώσεις ενδιαφέροντος στο Spinosad (Spinosyn A και Spinosyn D) παρουσίασαν την πιο αργή αποδόμηση. Σε πρώτη φάση, η αποδόμηση τους ακολούθησε παρόμοιο ρυθμό με τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα, κάτι που φαίνεται από τις παραπλήσιες τιμές DT_{50} [Πίνακας 2], ωστόσο η αποδόμηση επιβράδυνε στην όψιμη φάση, ιδιαίτερα στην περίπτωση της υψηλής δόσης εφαρμογής στο έδαφος από τη Γαλλία και για τις δύο ενώσεις ενδιαφέροντος [Πίνακας 2]. Η αποδόμηση είναι πιο αργή στην υψηλότερη δόση εφαρμογής και, με μία εξαίρεση που προαναφέρθηκε, είναι πιο αργή στο έδαφος από τη Γαλλία. Η EFSA αναφέρει σε ανασκόπησή της εύρος DT_{50} 6,5 – 46,3 ημέρες για την Spinosyn A και 11,3 – 62,6 ημέρες για την Spinosyn D (EFSA 2018c), εύρη με τα οποία οι τιμές που παρατηρήσαμε συμφωνούν μερικώς. Συγκεκριμένα, οι τιμές DT_{50} για την Spinosyn A ήταν σε 3/4 περιπτώσεις εντός του εύρους, ενώ σε μία περίπτωση παρατηρήθηκε ελαφρώς μικρότερη τιμή, ενώ όλες οι τιμές DT_{50} για την Spinosyn D είναι χαμηλότερες και εκτός του εύρους [Πίνακας 2]. Αντίστοιχα, η EFSA αναφέρει εύρος DT_{90} 22,6 – 170,9 ημέρες για την Spinosyn A και 40,5 – 268,1 ημέρες για την Spinosyn D (EFSA 2018c). Σε 2/4 περιπτώσεις για την Spinosyn A οι παρατηρούμενες τιμές βρίσκονται εντός του εύρους, ενώ στις 2 περιπτώσεις της χαμηλής δόσης εφαρμογής παρατηρήθηκαν τιμές DT_{90} χαμηλότερες και εκτός του εύρους [Πίνακας 2]. Για την Spinosyn D, μόλις μία τιμή (υψηλή δόση εφαρμογής, έδαφος από τη Γαλλία) βρίσκεται εντός του εύρους, με τις υπόλοιπες να είναι χαμηλότερες [Πίνακας 2]. Επιπλέον, η Spinosyn A παρουσιάζει πιο αργή αποδόμηση από την Spinosyn D συγκρίνοντας τις τιμές DT_{50} και DT_{90} μεταξύ ίδιου εδάφους και δόσης εφαρμογής, με σημαντικές διαφορές σε συγκεκριμένες περιπτώσεις [Πίνακας 2], ενώ στην ανασκόπηση της EFSA τα αντίστοιχα εύρη παρουσιάζουν μεν αλληλοεπικάλυψη, αλλά η Spinosyn D χαρακτηρίζεται ελαφρώς περισσότερο υπολειμματική από την Spinosyn A (EFSA 2018c). Οι Sharma et al αναφέρουν στη μελέτη τους τιμές DT_{50} 1,5 και 2,6 ημέρες για 2 δόσεις εφαρμογής (Sharma et al, 2007), ωστόσο τα αποτελέσματα δεν είναι απολύτως συγκρίσιμα λόγω πειραματικού σχεδιασμού. Αντίστοιχα, οι Telesiński et al. αναφέρουν

επίσης γρήγορη αποδόμηση, με τιμή DT_{50} 1,11 ημέρες για μία δόση εφαρμογή κοντά στη δική μας υψηλή δόση, ενώ ακόμα και για μία δόση εφαρμογής 25 φορές μεγαλύτερη, η τιμή DT_{50} ήταν μόλις 2,21 ημέρες (Telesiński et al, 2015). Και στις δύο περιπτώσεις, η γρήγορη αποδόμηση αποδίδεται σε αερόβια βιοαποδόμηση του Spinosad, ωστόσο οι τιμές είναι πολύ χαμηλότερες από το εύρος της EFSA (EFSA 2018c). Στη δική μας περίπτωση, η γρηγορότερη αποδόμηση των δύο ενώσεων, αλλά και το ανεστραμμένο πρότυπο μεταξύ Spinosyn A και Spinosyn D σε σχέση με τα εύρη τιμών της EFSA (EFSA 2018c) θα μπορούσαν να αποδοθούν σε μία ενδογενή μικροβιακή κοινότητα περισσότερο ικανή a priori για την αποδόμηση των δύο ενώσεων, αλλά με αυξημένη ευαισθησία ως προς την έκθεση της σε Spinosyn D. Η αυξημένη ευαισθησία, αν πράγματι υπάρχει, αναμένεται να φανεί κατά την κατασκευή καμπύλων Κατανομής Ευαισθησίας Ειδών, με την HC_5 (Hazardous Concentration 5%) για την Spinosyn D να είναι μικρότερη από αυτήν της Spinosyn A.

Οι Pyrethrin II και Pyrethrin I φάνηκε να ακολουθούν μία αρκετά αργή αποδόμηση, ιδιαίτερα στην περίπτωση της Pyrethrin I, η οποία έχει συγκρίσιμες τιμές DT_{50} και DT_{90} με τις Spinosyn A και Spinosyn D [Πίνακας 2]. Σε πρώτη φάση, η αποδόμηση της Pyrethrin II προσεγγίζει αυτή του Chlorothalonil, με παρόμοιες τιμές DT_{50} , σε αντίθεση με την Pyrethrin I που προσεγγίζει τις ενώσεις του Spinosad. Όπως αναφέρθηκε και πριν, σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές DT_{50} και DT_{90} ήταν μεγαλύτερες στην υψηλότερη δόση εφαρμογής, δείχνοντας ένα δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο. Επιπλέον, η Pyrethrin II εμφάνιζε γρηγορότερη αποδόμηση στο έδαφος από τη Γαλλία, ενώ η Pyrethrin I στο έδαφος από τη Γερμανία. Η EFSA αναφέρει σε ανασκόπησή της εύρος DT_{50} 3 ημέρες για την Pyrethrin I, ενώ δεν αναφέρεται τιμή DT_{50} για την Pyrethrin II (EFSA 2013). Οι παρατηρούμενες τιμές DT_{50} για την Pyrethrin I είναι όλες μεγαλύτερες από την τιμή που αναφέρει η EFSA, η οποία ωστόσο είναι βασισμένη σε μη ολοκληρωμένο σετ δεδομένων και απαιτεί περισσότερες μετρήσεις σε διαφορετικά εδαφικά δείγματα (EFSA 2013), κάτι που εξηγεί αυτή τη στιγμή την απόκλιση των δικών μας τιμών. Οι φυσικές πυρεθρίνες που εξετάσαμε φαίνεται να αποδομούνται σχετικά γρήγορα, παρουσιάζοντας τιμές DT_{50} [Πίνακας 2] που βρίσκονται στο χαμηλό σημείο του εύρους που αναφέρει η EFSA για το Cypermethrin, ένα συνθετικό πυρεθροειδές (DT_{50} 2,0 – 24,2 ημέρες) (EFSA 2018b), ενώ ξανά ο τύπος του εδάφους έχει σημαντική επίδραση στην κινητική της αποδόμησης.

Αντίστοιχα, οι τιμές DT₉₀ για τις Pyrethrin II και I ήταν αρκετά μικρότερες από αυτές που παρατήρησαν οι Meyer et al. για αρκετά συνθετικά πυρεθροειδή υπό αερόβιες συνθήκες (Meyer et al. 2013) και ο Laskowski σε αερόβια εδάφη (Schleider and Peterson 2011). Η γρηγορότερη αποδόμηση των πυρεθρινών, εκτός από τις διαφορές στους τύπους εδαφών σε συνδυασμό με τον συντελεστή προσρόφησης σε οργανικό άνθρακα (K_{oc}), μπορεί να αποδοθεί και στο γεγονός ότι, ως φυσικές ενώσεις, η δυνατότητα βιοαποδόμησής τους από την ενδογενή μικροβιακή κοινότητα του εδάφους είναι αυξημένη ως απόκριση και προσαρμογή σε συνεχή έκθεση εξελικτικά. Η μεγαλύτερη ευαισθησία των φυσικών πυρεθρινών στην ακτινοβολία UV αναμένεται να μην έχει συνεισφέρει σημαντικά στην αποδόμηση τους, καθώς η επώαση των μικροκόσμων δεν επέτρεπε σημαντική έκθεση σε UV.

Τέλος, τα προϊόντα MIF παρουσίασαν τη γρηγορότερη αποδόμηση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα, κάτι που αναμέναμε, καθώς αποτελούν βοτανικής προέλευσης γεωργικά φάρμακα. Κάτι που εμφανίζει ενδιαφέρον είναι ότι οι τιμές DT₅₀ και DT₉₀ μεταξύ υψηλής και χαμηλής δόσης για την ίδια μεταχείριση δεν διαφέρουν σημαντικά σε αρκετές περιπτώσεις [Πίνακας 2] και ο δοσο-εξαρτώμενος χαρακτήρας της αποδόμησης είναι λιγότερο ισχυρός. Η εξάρτηση από τον τύπο του εδάφους παρατηρείται και στις περιπτώσεις των προϊόντων MIF, καθώς το MIF030 αποδομείται γρηγορότερα στο έδαφος από τη Γαλλία, ενώ τα MIF004 και MIF053 στο έδαφος από τη Γερμανία, με τις διαφορές στις αντίστοιχες τιμές DT₅₀ και DT₉₀ να είναι σχετικά μικρές [Πίνακας 2], κάτι που ωστόσο παρέχει μία ένδειξη του πώς η διαφορετική ενδογενής μικροβιακή κοινότητα και οι ιδιότητες κάθε εδάφους μπορεί να επηρεάζουν την αποδόμηση των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων. Φαίνεται ότι η ενδογενής μικροβιακή κοινότητα και στα δύο εδάφη εμφανίζει ικανοποιητική δυνατότητα για αποδόμηση και των τριών προϊόντων MIF, και αρνητική απόκριση των μικροοργανισμών στην έκθεση σε αυτά αναμένεται να χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλές τιμές EC₂₀ και μία καμπύλη κατανομής ευαισθησίας ειδών μετατοπισμένη προς τα δεξιά. Η υψηλή δόση εφαρμογής, σε συνδυασμό με την πιθανότητα να μην υπάρχουν τοξικές επιδράσεις των προϊόντων MIF μπορεί να οδήγησε σε εμπλουτισμό μίας ομάδας μικροοργανισμών με ικανότητα αποδόμησης των προϊόντων αυτών, οδηγώντας σε συζευγμένη με την μικροβιακή αύξηση βιοαποδόμηση τους, ένα φαινόμενο που

αναφέρεται ως επιταχυμένη βιοαποδόμηση (accelerated biodegradation) (Katsoula et al. 2020). Εξάλλου, η μικροβιακή αποδόμηση φαίνεται να είναι το κύριο μονοπάτι αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων (Fomsgaard 1997), και τα προϊόντα MIF μπορούν θεωρητικά να αποδομηθούν ευκολότερα ή δυσκολότερα και να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα, ενώ ένα από αυτά (MIF030) ίσως και ως πηγή αζώτου κατά την αμμωνιοποίηση στο γεωχημικό κύκλο. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η πιθανότητα να υπάρχουν είδη που δεν συνεισφέρουν σημαντικά στην αποδόμηση και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε υψηλότερες συγκεντρώσεις των προϊόντων MIF σε σύγκριση με είδη που καθοδηγούν την αποδόμηση και πιθανώς να είναι και περισσότερο ανθεκτικά σε έκθεση σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

4.2. Υποθέσεις και μελλοντικές κατευθύνσεις

Το Chlorothalonil, ιδιαίτερα στο έδαφος από τη Γαλλία, αποδομήθηκε ταχέως, με την αποδόμησή του να παρουσιάζει τιμές DT₅₀ και DT₉₀ μικρότερες από τις αντίστοιχες των Spinosyn A και Spinosyn D, αλλά και των πυρεθρινών, και παρόμοιες με αυτές των βοτανικής προέλευσης προϊόντων MIF. Αρχικά, η διαφορά στην αποδόμηση μεταξύ των δύο τύπων εδάφους που μελετήθηκαν, μπορεί να αποδοθεί μερικώς στις διαφορές μεταξύ των δύο ενδογενών μικροβιακών κοινοτήτων όσον αφορά το δυναμικό αποδόμησης, καθώς και στο pH [Πίνακας 1], το οποίο είναι σημαντικός παράγοντας για την τύχη των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος. Μάλιστα, διαφορά pH μίας μονάδας, έχει αναφερθεί να επιταχύνει ή να επιβραδύνει την αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων κατά 100 φορές, επιδρώντας και στη λειτουργία των βακτηριακών ενζυμικών συστημάτων βιοαποδόμησης (Hultgren et al. 2002). Η διαφορά μεταξύ των δυναμικών αποδόμησης των δύο διαφορετικών βακτηριακών κοινοτήτων θα μπορούσε να ελεγχθεί από μετέπειτα δεδομένα σχετικής αφθονίας ειδών, με την σχετική κυριαρχία διαφορετικών ειδών στο έδαφος από τη Γαλλία σε σύγκριση με το έδαφος από τη Γερμανία να μπορεί να καθοδηγήσει υποψία για αυξημένο δυναμικό αποδόμησης. Επιπλέον, λόγω της υψηλής ταχύτητας της αποδόμησης, παρουσιάζει ενδιαφέρον το μεταβολικό μονοπάτι που ακολουθείται για τον καταβολισμό του Chlorothalonil και η συνεισφορά του στην συνολική αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου. Η διερεύνηση αυτή θα μπορούσε να γίνει μελλοντικά συγκρίνοντας την αποδόμηση παρουσία ενδογενούς μικροβιακής

κοινότητας, με την αποδόμηση σε μία αβιοτική μεταχείριση. Σε περίπτωση που η συνιστώσα της βιοτικής αποδόμησης θεωρηθεί σημαντική, θεωρητικά, είτε απομόνωση σε καλλιέργεια και συνδυασμός μεταγονιδιωματικής, μεταπρωτεομικής και μεταβολομικής (Wright et al. 2021) είτε in silico ανακατασκευή του μεταβολικού μονοπατιού καθοδηγούμενη από τα συναρμολογούμενα γονιδιώματα (De Bernardini et al. 2022), θα μπορούσαν να προσφέρουν πληροφορίες για το καταβολισμό του Chlorothalonil σε επίπεδο είδους ή και μικροβιακής κοινότητας στα συγκεκριμένα εδάφη.

Οι Spinosyn A και Spinosyn D, αν και βακτηριακής προέλευσης και βιοαποδομήσιμα, εμφάνισαν πολύ αργή αποδόμηση κατά τη χρονική διάρκεια του πειράματος, και ειδικά στην υψηλή δόση εφαρμογής. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ποια είδη μικροοργανισμών είναι ικανά να αποκριθούν θετικά στην έκθεσή τους, και ίσως να καθοδηγήσουν και τον καταβολισμό των δύο ενώσεων σε χαμηλότερες δόσεις εφαρμογής, αλλά πιθανόν μειώνεται η σχετική τους αφθονία λόγω ευαισθησίας στις υψηλότερες δόσεις εφαρμογής. Επίσης, λόγω της πολύπλοκης δομής τους [Εικόνα 4], τόσο οι πυρεθρίνες όσο και οι ενώσεις ενδιαφέροντος του Spinosad ενδέχεται να παρουσίασαν σημαντική προσκόλληση στο έδαφος, οδηγώντας σε αργότερο ρυθμό αποδόμησης. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες του εδάφους που επηρεάζουν την προσρόφηση φαίνεται να είναι το pH και το περιεχόμενο του εδάφους σε οργανική ύλη (Kodešová et al. 2011). Λαμβάνοντας υπόψιν μία ταξινόμηση σύμφωνα με τους Huang et al., και τα δύο εδάφη που χρησιμοποιήθηκαν έχουν περιεχόμενο σε οργανική ύλη μικρότερο του 3% (με δεδομένο ότι κατά μέσο όρο η οργανική ύλη αποτελείται κατά 58% από άνθρακα και ισχύει Total Organic Matter = 1,72 * TOC (Pribyl 2010)). Επομένως, μπορεί να εξαχθεί η υπόθεση ότι το ποσοστό οργανικής ύλης οδήγησε σε προσρόφηση απλών οργανικών μορίων, όπως το Chlorothalonil και το MIF004, τα οποία παρουσίασαν γρήγορη αποδόμηση, ενώ η προσρόφηση των περισσότερο λιπόφιλων Pyrethrin II, Pyrethrin I, Spinosyn A και Spinosyn D ήταν υψηλότερη, εξηγώντας την μειωμένη αποδόμηση τους, καθώς και τη σχετικά πιο αργή αποδόμηση των Spinosyn A και Spinosyn D σε σύγκριση με τις πυρεθρίνες [Εικόνα 4].

Τέλος, μέσω μελλοντικής Μεταταξινομικής μελέτης, θα μπορούσαν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το ποια μέλη της μικροβιακής κοινότητας αποκρίνονται περισσότερο θετικά κατά την έκθεσή τους και ενδέχεται επίσης να χρησιμοποιούν τα προϊόντα MIF ως πηγή άνθρακα, αλλά και αζώτου, για να ενισχύσουν την αύξησή τους.

4.3. Η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων ως δείκτης απόκρισης της μικροβιακής κοινότητας

Τα γεωργικά φάρμακα πρέπει να χαρακτηρίζονται από χαμηλή υπολειμματικότητα, κάτι που μπορεί να μειώσει και την πιθανότητα να εκπλυθούν προς υπόγεια ή επιφανειακά ύδατα αλλά και να ασκήσουν τοξικές επιδράσεις σε οργανισμούς μη-στόχους (Tudi et al. 2021). Με βάση την τιμή DT_{50} , τα γεωργικά φάρμακα στο έδαφος κατατάσσονται σε μη-υπολειμματικά ($DT_{50} < 30$ ημέρες), μετρίως υπολειμματικά ($DT_{50} 30 - 100$ ημέρες) και υπολειμματικά ($DT_{50} > 100$ ημέρες) (Issa et al. 2017). Υπό αυτό το κριτήριο, τα προϊόντα MIF δεν παρουσιάζουν υπολειμματικότητα. Ωστόσο, το ίδιο ισχύει και για τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα που εξετάστηκαν, καθώς η μεγαλύτερη τιμή DT_{50} στο πείραμα ήταν για το Chlorothalonil και ήταν 15,39 ημέρες. Επομένως, ενώ η αποδόμηση των βοτανικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων, αλλά και των γεωργικών φαρμάκων γενικότερα, μπορεί να ερμηνεύσει σε γενικές γραμμές την απόκριση της μικροβιακής κοινότητας κατά τη διάρκεια της έκθεσης, δεν είναι σίγουρο ότι μπορεί να αποκαλύψει επιδράσεις με τη μορφή οξείας τοξικότητας σε συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών, ιδιαίτερα αν αυτές οι επιδράσεις δεν συσχετίζονται με μεταβολή του ρυθμού αποδόμησης. Στη συγκεκριμένη εργασία για παράδειγμα, η μειωμένη αποδόμηση του Chlorothalonil στο έδαφος από τη Γερμανία και των Spinosyn A και D στο έδαφος από τη Γαλλία [Εικόνες 6A, G-H] υποδεικνύει μία αρνητική απόκριση της μικροβιακής κοινότητας στην έκθεση της στα συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα, η οποία μπορεί να συμβαίνει λόγω μείωσης της αφθονίας ή και απώλειας συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών με μείωση της ικανότητας βιοαποδόμησης είτε άμεσα, είτε έμμεσα λόγω επίδρασης σε άλλες απαραίτητες για τη βιωσιμότητα λειτουργίες της μικροβιακής κοινότητας. Ωστόσο, η γρηγορότερη αποδόμηση των προϊόντων MIF, ενώ εκ πρώτης όψεως υποδεικνύει μία είτε ουδέτερη είτε θετική απόκριση της μικροβιακής κοινότητας, και μπορεί να εξηγηθεί με βάση το φαινόμενο της επιταχυμένης βιοαποδόμησης, δεν

οδηγεί σε συμπέρασμα για τη φύση της απόκρισης κατά την πολύ αρχική φάση της επώασης, όπου φαινόμενα τοξικότητας σε συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών (πχ. μύκητες) και μείωση της ποικιλότητας μπορεί να μην φανούν. Επιπροσθέτως, στην περίπτωση του Chlorothalonil, η ταχεία αποδόμηση δεν μπορεί να συνδεθεί με θετική απόκριση της μικροβιακής κοινότητας στην έκθεσή της σε αυτό. Συγκεκριμένα, η αποδόμηση του Chlorothalonil ακολουθείται συνήθως από την εμμονή σημαντικών συγκεντρώσεων του βασικού του προϊόντος μετασχηματισμού (4-hydroxy chlorothalonil) (Wu et al. 2014), το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλότερη τοξικότητα. Επομένως, είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψιν και τα προϊόντα μετασχηματισμού.

Επιπλέον, μία αργή αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος, δεν μπορεί πάντα να θεωρηθεί ως δείκτης αρνητικής απόκρισης της μικροβιακής κοινότητας στην έκθεσή της, καθώς δεν λαμβάνεται υπόψιν η βιοδιαθεσιμότητα. Συγκεκριμένα, υπάρχουν πληροφορίες για αρκετούς ρύπους οι οποίοι παρουσιάζουν υπολειμματικότητα στο έδαφος παρότι είναι πλήρως βιοαποδομήσιμοι στο εργαστηριακό περιβάλλον, κάτι που εξηγείται για τα γεωργικά φάρμακα από τον πιθανό σχηματισμό υδρόφοβων συμπλόκων με την οργανική ουσία του εδάφους (Wirsching et al. 2020). Ο μηχανισμός αυτός μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα των γεωργικών φαρμάκων και συνεπώς την αποδόμησή τους, παράλληλα ωστόσο μειώνεται θεωρητικά και η πιθανότητα να εκφράσουν αυτά τοξικές επιδράσεις και να εμφανιστεί αρνητική απόκριση από την μικροβιακή κοινότητα. Ακόμα όμως και σε περιπτώσεις που υπάρχει σημαντική βιοδιαθεσιμότητα, η πρόσληψη και βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων μπορεί να είναι μειωμένη λόγω του περιορισμού της διάχυσης και την ετερογενή κατανομή του γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος, σε ζώνες χωρίς μικροβιακό αποικισμό («ανενεργές ζώνες», inactive zones), όπου η μόνη ευκαιρία για βιοαποδόμηση είναι de novo αποικισμός της ζώνης από γειτονικές (Wirsching et al. 2020). Τέλος, μικρές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων τείνουν να επιμένουν στο έδαφος καθώς η μεγάλη απόσταση μεταξύ των μορίων και των κυττάρων των μικροοργανισμών μπορεί να δυσχεραίνει την πρόσληψη τους, ή η αποδόμηση τους να μην είναι ενεργειακά συμφέρουσα όταν βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση (Wirsching et al. 2020). Και σε αυτή την περίπτωση ωστόσο, η υπολειμματική συγκέντρωση μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες τιμές DT_{50} και DT_{90} , μεγαλύτερη υπολειμματικότητα του γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος και πιο αργή αποδόμηση,

χωρίς ωστόσο να υπάρχουν αρνητικές επιδράσεις στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.

5. Κατακλείδα

Συμπερασματικά, η αποδόμηση των υπό εξέταση βοτανικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων παρουσίασε ένα αναμενόμενο πρότυπο και ρυθμό στο έδαφος, σε σύγκριση με άλλες βοτανικής και βακτηριακής προέλευσης φυτοπροστατευτικές ουσίες, ενώ το συνθετικό γεωργικό φάρμακο παρουσίασε μία γρήγορη αποδόμηση παρόμοια με τα υπό εξέταση. Η αποδόμηση των προϊόντων MIF ήταν γρήγορη ανεξάρτητα από τη δόση εφαρμογής, ενώ τα ίδια, όπως και όλα τα γεωργικά φάρμακα που εξετάστηκαν, δεν εμφάνιζαν υπολειμματικότητα. Σε γενικές γραμμές, η αποδόμηση των βοτανικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας πρώτος, γενικός δείκτης της απόκρισης της μικροβιακής κοινότητας κατά την έκθεση της σε αυτά, αντανακλώντας τόσο την ικανότητα των μικροοργανισμών να τα αποτοξικοποιήσουν ή και να τα χρησιμοποιήσουν ως πηγή αύξησης, καθώς και το δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο αυτής της απόκρισης. Ωστόσο, διάφοροι παράγοντες, όπως η μειωμένη διαθεσιμότητα των γεωργικών φαρμάκων, αλλά και η απουσία συμπερασμάτων σχετικά με φαινόμενα κυρίως οξείας τοξικότητας σε συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών, καθιστούν αναγκαίο η αποδόμηση νέων βοτανικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων να συνδυάζεται με δεδομένα Μεταταξινόμικής και μεταγονιδιωματικής για την περισσότερο λεπτομερή και ακριβή μελέτη της απόκρισης, και ιδιαίτερα του δυναμικού βιοαποδόμησης, της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Επιπλέον, μελλοντικές μελέτες βασιζόμενες σε συνδυασμό ομικών προσεγγίσεων και βιοπληροφορικών εργασιών θα μπορούσαν να διαφωτίσουν τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούνται κατά την βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων που μελετήθηκαν στα συγκεκριμένα εδάφη, παράγοντας πιθανόν και νέες πληροφορίες για τη δημιουργία βιοτεχνολογικών εφαρμογών βιοεπανόρθωσης σε διάφορα περιβάλλοντα.

Βιβλιογραφία

Acheuk, F., Basiouni, S., Shehata, A. A., Dick, K., Hajri, H., Lasram, S., Yilmaz, M., Emekci, M., Tsiamis, G., Spona-Friedl, M., May-Simera, H., Eisenreich, W., & Ntougias, S. (2022). Status and Prospects of Botanical Biopesticides in Europe and Mediterranean Countries. *Biomolecules*, 12(2), 311. <https://doi.org/10.3390/biom12020311>

Aditya, S., & Rattan, A. (2012). Spinosad: An effective and safe pediculicide. *Indian dermatology online journal*, 3(3), 213–214. <https://doi.org/10.4103/2229-5178.101825>

Aktar, MW, Sengupta, D., Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol*. Mar;2(1):1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>.

Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amézaga, I., & Garbisu, C. (2003). Soil Enzyme Activities as Biological Indicators of Soil Health. *Reviews on Environmental Health*, 18(1). <https://doi.org/10.1515/reveh.2003.18.1.65>

Antonious, G.F. (2004). Residues and half-lives of pyrethrins on field-grown pepper and tomato. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 39 (4): 491–503. <https://doi.org/10.1081/pfc-20002668>

Baćmaga, M., Wyszowska, J., & Kucharski, J. (2018). The influence of chlorothalonil on the activity of soil microorganisms and enzymes. *Ecotoxicology (London, England)*, 27(9), 1188–1202. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1968-7>

Breitkreuz, C., Heintz-Buschart, A., Buscot, F., Wahdan, S., Tarkka, M., & Reitz, T. (2021). Can We Estimate Functionality of Soil Microbial Communities from Structure-Derived Predictions? A Reality Test in Agricultural Soils. *Microbiology spectrum*, 9(1), e0027821. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00278-21>

Breitwieser, F. P., Lu, J., & Salzberg, S. L. (2019). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in bioinformatics*, 20(4), 1125–1136. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx120>

Campbell, CD, Chapman, SJ, Cameron, CM, Davidson, MS, Potts, JM. (2003). A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Appl Environ Microbiol* 69(6):3593–3599. <https://doi.org/10.1128/aem.69.6.3593-3599.2003>

Crouse, G.D., Demeter, D.A., Samaritoni, G. et al. (2018). De Novo Design of Potent, Insecticidal Synthetic Mimics of the Spinosyn Macrolide Natural Products. *Sci Rep* 8, 4861. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22894-6>

De Bernardini, N., Basile, A., Zampieri, G., Kovalovszki, A., De Diego Diaz, B., Offer, E., Wongfaed, N., Angelidaki, I., Kougiyas, P. G., Campanaro, S., & Treu, L. (2022).

Integrating metagenomic binning with flux balance analysis to unravel syntrophies in anaerobic CO₂ methanation. *Microbiome*, 10(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01311-1>

de Souza, A.J., de Andrade, P.A.M., de Araújo Pereira, A.P. *et al.* (2017). The depleted mineralization of the fungicide chlorothalonil derived from loss in soil microbial diversity. *Sci Rep* 7, 14646. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14803-0>

Ding, H., Zheng, X., Zhang, J., Zhang, Y., Yu, J., & Chen, D. (2019). Influence of chlorothalonil and carbendazim fungicides on the transformation processes of urea nitrogen and related microbial populations in soil. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06213-8>

Doolette, C. L., Gupta, V. V., Lu, Y., Payne, J. L., Batstone, D. J., Kirby, J. K., Navarro, D. A., & McLaughlin, M. J. (2016). Quantifying the Sensitivity of Soil Microbial Communities to Silver Sulfide Nanoparticles Using Metagenome Sequencing. *PloS one*, 11(8), e0161979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161979>

European Food Safety Authority (EFSA), Arena, M., ... , Verani, A., Villamar-Bouza, L. (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyrethrins, *EFSA Journal*, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5126>

European Food Safety Authority (EFSA), Arena, M., ... , Verani, A., Villamar-Bouza, L. (2018). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorothalonil, *EFSA Journal*, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5126>

European Food Safety Authority (EFSA), Arena, M., ... , Verani, A., Villamar-Bouza, L. (2018). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cypermethrin, *EFSA Journal*, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5402>

European Food Safety Authority (EFSA), Arena, M., ... , Verani, A., Villamar-Bouza, L. (2018). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance spinosad, *EFSA Journal*, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5252>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). FAOSTAT statistical database. <https://www.fao.org/faostat/en/>

FOCUS, Boesten, J.J.T., Aden, K., Beigel, C., Beulke, S., Dust, M., Dyson, J.S., Fomsgaard, I.S., Jones, R.L., Karlsson, S., van der Linden, A.M.A., Richter, O., Margans, J.O., Soulas, G. (2006). Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration (The Final Report of the Work Group on Degradation Kinetics of FOCUS (FORum for the Co-ordination of pesticide fate models and their USE)), Sanco/10058/2005, version 2.0

Fomsgaard I. S. (1997). Modelling the mineralization kinetics for low concentrations of pesticides in surface and subsurface soil. *Ecol. Model.* 102 175–208. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(97\)01982-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(97)01982-0)

- Gallego, S., Devers-Lamrani, M., Rousidou, K., Karpouzas, D. G., & Martin-Laurent, F. (2018). Assessment of the effects of oxamyl on the bacterial community of an agricultural soil exhibiting enhanced biodegradation. *Science of The Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.255>
- Haque, M. N., Eom, H. J., Nam, S. E., Shin, Y. K., & Rhee, J. S. (2019). Chlorothalonil induces oxidative stress and reduces enzymatic activities of Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase in gill tissues of marine bivalves. *PloS one*, *14*(4), e0214236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214236>
- Hołyńska-Iwan, I., & Szewczyk-Golec, K. (2020). Pyrethroids: How They Affect Human and Animal Health?. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *56*(11), 582. <https://doi.org/10.3390/medicina56110582>
- Huang, P.-T., Patel, M., Santagata, M.C., Bobet, A. (2009). CLASSIFICATION OF ORGANIC SOILS FHWA/IN/JTRP-2008/2. <https://www.geostructures.com/library/technical-bulletins/pdf/Classification-of-Organic-Soils-FHWA-IN-JTRP-2008-2.pdf>
- Hultgren, R. P., Hudson, R. J. M., & Sims, G. K. (2002). Effects of Soil pH and Soil Water Content on Prosulfuron Dissipation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(11), 3236–3243. <https://doi.org/10.1021/jf011477c>
- Hund-Rinke, K., & Schlich, K. (2014). The potential benefits and limitations of different test procedures to determine the effects of Ag nanomaterials and AgNO₃ on microbial nitrogen transformation in soil. *Environmental Sciences Europe*, *26*(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0028-z>
- Hund-Rinke, K., Hümmler, A., Schlinkert, R. *et al.* (2019). Evaluation of microbial shifts caused by a silver nanomaterial: comparison of four test systems. *Environ Sci Eur* **31**, 86. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0268-z>
- Isman, M. B., & Grieneisen, M. L. (2014). *Botanical insecticide research: many publications, limited useful data*. *Trends in Plant Science*, *19*(3), 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.005>
- Issa, H., Sawalha, H., Sultan, S., Yaghmour, B. (2017). Classification and evaluation of pesticides used in Palestine based on their severity on health and environment (poster). *Lancet Palestinian Health Alliance 8th Conference Health of Palestinians inside and outside the occupied Palestinian territory*, Birzeit University, Ramallah, oPt, 15-16 March 2017
- Iwasaki, Y., & Sorgog, K. (2021). Estimating species sensitivity distributions on the basis of readily obtainable descriptors and toxicity data for three species of algae, crustaceans, and fish. *PeerJ*, *9*, e10981. <https://doi.org/10.7717/peerj.10981>

- Kabasenche, W. P., & Skinner, M. K. (2014). DDT, epigenetic harm, and transgenerational environmental justice. *Environmental health : a global access science source*, 13, 62. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-62>
- Kaczyńska, G., Borowik, A., & Wyszowska, J. (2015). Soil Dehydrogenases as an Indicator of Contamination of the Environment with Petroleum Products. *Water, air, and soil pollution*, 226(11), 372. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2642-9>
- Katsoula, A., Vasileiadis, S., Sapountzi, M., & Karpouzas, D. G. (2020). The response of soil and phyllosphere microbial communities to repeated application of the fungicide iprodione: accelerated biodegradation or toxicity?. *FEMS microbiology ecology*, 96(6), fiae056. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae056>
- Kim, H., Park, Y. H., Yang, J. E., Kim, H. S., Kim, S. C., Oh, E. J., Moon, J., Cho, W., Shin, W., & Yu, C. (2022). Analysis of Major Bacteria and Diversity of Surface Soil to Discover Biomarkers Related to Soil Health. *Toxics*, 10(3), 117. <https://doi.org/10.3390/toxics10030117>
- Kodešová, R., Kočárek, M., Kodeš, V., Drábek, O., Kozák, J., & Hejtmánková, K. (2011). Pesticide adsorption in relation to soil properties and soil type distribution in regional scale. *Journal of Hazardous Materials*, 186(1), 540–550. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.040>
- Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V. (2021). An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1185. <https://doi.org/10.3390/plants10061185>
- Lehmann, J., Bossio, D. A., Kögel-Knabner, I., & Rillig, M. C. (2020). The concept and future prospects of soil health. *Nature reviews. Earth & environment*, 1(10), 544–553. <https://doi.org/10.1038/s43017-020-0080-8>
- Leska, A., Nowak, A., Nowak, I., & Górczyńska, A. (2021). Effects of Insecticides and Microbiological Contaminants on *Apis mellifera* Health. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(16), 5080. <https://doi.org/10.3390/molecules26165080>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3, 31. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Martelli, F., Hernandes, N. H., Zuo, Z., Wang, J., Wong, C. O., Karagas, N. E., Roessner, U., Rupasinghe, T., Robin, C., Venkatachalam, K., Perry, T., Batterham, P., & Bellen, H. J. (2022). Low doses of the organic insecticide spinosad trigger lysosomal defects, elevated ROS, lipid dysregulation, and neurodegeneration in flies. *eLife*, 11, e73812. <https://doi.org/10.7554/eLife.73812>
- McMahon, T. A., Halstead, N. T., Johnson, S., Raffel, T. R., Romansic, J. M., Crumrine, P. W., Boughton, R. K., Martin, L. B., & Rohr, J. R. (2011). The fungicide chlorothalonil is nonlinearly associated with corticosterone levels, immunity, and mortality in

amphibians. *Environmental health perspectives*, 119(8), 1098–1103.
<https://doi.org/10.1289/ehp.1002956>

Medo, J., Maková, J., Medová, J., Lipková, N., Cinkocki, R., Omelka, R., & Javoreková, S. (2021). Changes in soil microbial community and activity caused by application of dimethachlor and linuron. *Scientific reports*, 11(1), 12786.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-91755-6>

Mercurio, P., Eaglesham, G., Parks, S., Kenway, M., Beltran, V., Flores, F., Mueller, J. F., & Negri, A. P. (2018). Contribution of transformation products towards the total herbicide toxicity to tropical marine organisms. *Scientific reports*, 8(1), 4808.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23153-4>

Meyer, B. N., Lam, C., Moore, S., & Jones, R. L. (2013). Laboratory Degradation Rates of 11 Pyrethroids under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4702–4708. <https://doi.org/10.1021/jf400382u>

Mohiddin, G. J., Srinivasulu, M., Subramanyam, K., Madakka, M., Meghana, D., & Rangaswamy, V. (2015). Influence of insecticides flubendiamide and spinosad on biological activities in tropical black and red clay soils. *3 Biotech*, 5(1), 13–21.
<https://doi.org/10.1007/s13205-013-0188-3>

Mossa, A. H., Mohafrash, S., & Chandrasekaran, N. (2018). Safety of Natural Insecticides: Toxic Effects on Experimental Animals. *BioMed research international*, 2018, 4308054. <https://doi.org/10.1155/2018/4308054>

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 15910, Chlorothalonil. Retrieved July 17, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorothalonil#section=Structures>.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 34217, 4-Hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile. Retrieved July 17, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxy-2_5_6-trichloroisophthalonitrile#section=2D-Structure.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 443059, Spinosyn A. Retrieved July 17, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spinosyn-A#section=2D-Structure>.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 183094, Spinosyn D. Retrieved July 17, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spinosyn-D#section=Structures>.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5281555, Pyrethrin II. Retrieved July 17, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrethrin-II#section=Structures>.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5281045, Pyrethrin I. Retrieved July 17, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrethrin-I>.

National Research Council (US) Committee on Pesticides in the Diets of Infants and Children. Pesticides in the Diets of Infants and Children. Washington (DC): National Academies Press (US); 1993. 1, Background and Approach to the Study. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK236265/>

OECD (2000), *Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070226-en>.

Ozlu, E., Sandhu, S. S., Kumar, S., & Arriaga, F. J. (2019). Soil health indicators impacted by long-term cattle manure and inorganic fertilizer application in a corn-soybean rotation of South Dakota. *Scientific reports*, 9(1), 11776. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48207-z>

Papadopoulou, E. S., Genitsaris, S., Omirou, M., Perruchon, C., Stamatopoulou, A., Ioannides, I., & Karpouzas, D. G. (2018). Bioaugmentation of thiabendazole-contaminated soils from a wastewater disposal site: Factors driving the efficacy of this strategy and the diversity of the indigenous soil bacterial community. *Environmental Pollution*, 233, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.021>

Pérez-Losada, M., Narayanan, D. B., Kolbe, A. R., Ramos-Tapia, I., Castro-Nallar, E., Crandall, K. A., & Domínguez, J. (2022). Comparative Analysis of Metagenomics and Metataxonomics for the Characterization of Vermicompost Microbiomes. *Frontiers in microbiology*, 13, 854423. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.854423>

Pribyl, D.W. (2010). A critical review of the conventional SOC to SOM conversion factor. *Geoderma* 156, 75–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.02.003>

Quadros, D. G., Johnson, T. L., Whitney, T. R., Oliver, J. D., & Oliva Chávez, A. S. (2020). Plant-Derived Natural Compounds for Tick Pest Control in Livestock and Wildlife: Pragmatism or Utopia?. *Insects*, 11(8), 490. <https://doi.org/10.3390/insects11080490>

Rajmohan, K. S., Chandrasekaran, R., & Varjani, S. (2020). A Review on Occurrence of Pesticides in Environment and Current Technologies for Their Remediation and Management. *Indian journal of microbiology*, 60(2), 125–138. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00841-x>

Rizzi, C., Villa, S., Cuzzi, A. S., & Finizio, A. (2021). Use of the Species Sensitivity Distribution Approach to Derive Ecological Threshold of Toxicological Concern (eco-TTC) for Pesticides. *International journal of environmental research and public health*, 18(22), 12078. <https://doi.org/10.3390/ijerph182212078>

Saied, E., Fouda, A., Alemam, A. M., Sultan, M. H., Barghoth, M. G., Radwan, A. A., Desouky, S. G., Azab, I., Nahhas, N. E., & Hassan, S. E. (2021). Evaluate the Toxicity of Pyrethroid Insecticide Cypermethrin before and after Biodegradation by *Lysinibacillus*

cresolivuorans Strain HIS7. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1903.

<https://doi.org/10.3390/plants10091903>

Sala, S., Migliorati, S., Monti, G. S., & Vighi, M. (2012). *SSD-based rating system for the classification of pesticide risk on biodiversity*. *Ecotoxicology*, 21(4), 1050–1062. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0858-7>

Schleider, J.J. III, Peterson, R.K.D. RSC Green Chemistry No. 11 Green Trends in Insect Control, Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. *Royal Society of Chemistry* (2011)

Sharma, A., Srivastava, A., Ram, B., & Srivastava, P. C. (2007). *Dissipation behaviour of spinosad insecticide in soil, cabbage and cauliflower under subtropical conditions*. *Pest Management Science*, 63(11), 1141–1145.

<https://doi.org/10.1002/ps.1437>

Sorokin, D. Y., Lücker, S., Vejmelkova, D., Kostrikina, N. A., Kleerebezem, R., Rijpstra, W. I., Damsté, J. S., Le Paslier, D., Muyzer, G., Wagner, M., van Loosdrecht, M. C., & Daims, H. (2012). Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *The ISME journal*, 6(12), 2245–2256. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.70>

Souto, A. L., Sylvestre, M., Tölke, E. D., Tavares, J. F., Barbosa-Filho, J. M., & Cebrián-Torrejón, G. (2021). Plant-Derived Pesticides as an Alternative to Pest Management and Sustainable Agricultural Production: Prospects, Applications and Challenges. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(16), 4835. <https://doi.org/10.3390/molecules26164835>

Stefani, A., Jr, Felicio, J. D., & de Andréa, M. M. (2012). Comparative assessment of the effect of synthetic and natural fungicides on soil respiration. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(3), 3243–3252. <https://doi.org/10.3390/s120303243>

Su, X., Chen, Y., Wang, Y., Yang, X., & He, Q. (2019). Impacts of chlorothalonil on denitrification and N₂O emission in riparian sediments: Microbial metabolism mechanism. *Water research*, 148, 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.052>

Suciu, N., Vasileiadis, S., Puglisi, E., Pertile, G., Tourna, M., Karas, P. A., ... Trevisan, M. (2019). *Azadirachtin and trifloxystrobin had no inhibitory effects on key soil microbial functions even at high dose rates*. *Applied Soil Ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.01.016>

Telesiński, A., Michalcewicz, W., Płatkowski, M., Stręk, M., Onyszko, M., Wiśniewska, J. (2015). The side-effect of organic insecticide Spinosad on biochemical and microbiological properties of clay soil. *Journal of Ecological Engineering*, 16(4), 191–197. <https://doi.org/10.12911/22998993/59373>

Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International journal of environmental research and public health*, 18(3), 1112. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>

Turchen, L. M., Cosme-Júnior, L., & Guedes, R. (2020). Plant-Derived Insecticides Under Meta-Analyses: Status, Biases, and Knowledge Gaps. *Insects*, *11*(8), 532. <https://doi.org/10.3390/insects11080532>

Tzeneva, V. A., Heilig, H. G. H. J., van Vliet, W. A., Akkermans, A. D. L., de Vos, W. M., & Smidt, H. (2008). *16S rRNA Targeted DGGE Fingerprinting of Microbial Communities*. *Methods in Molecular Biology*, 335–350. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-548-0_17

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Sustainable Development, <https://sdgs.un.org/topics/food-security-and-nutrition-and-sustainable-agriculture>

United Nations, Department of Economic and Social Affairs . *World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables*. United Nations Department of Economic and Social Affairs; New York, NY, USA: 2015. Working Paper No ESA/P/WP.

USGS (United States Geological Survey): Reston, Virginia, U.S. National Water-Quality Assessment (NAWQA) Project, Pesticide National Synthesis Project, Estimated Annual Agricultural Pesticide Use: Chlorothalonil https://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/usage/maps/show_map.php?year=2017&map=CHLOROTHALONIL&hilo=L

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency) Washington, DC: U.S. EPA; 1999. Re-registration Eligibility Decision: Chlorothalonil: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-081901_1-Apr-99.pdf

Van Scoy, A. R., & Tjeerdema, R. S. (2014). Environmental Fate and Toxicology of Chlorothalonil. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 89–105. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06746-9_4

Vasileiadis, S., Puglisi, E., Papadopoulou, E. S., Pertile, G., Suciú, N., Pappolla, R. A., Tourna, M., Karas, P. A., Papadimitriou, F., Kasiotakis, A., Ipsilanti, N., Ferrarini, A., Sułowicz, S., Fornasier, F., Menkissoglu-Spiroudi, U., Nicol, G. W., Trevisan, M., & Karpouzias, D. G. (2018). Blame It on the Metabolite: 3,5-Dichloroaniline Rather than the Parent Compound Is Responsible for the Decreasing Diversity and Function of Soil Microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, *84*(22), e01536-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01536-18>

Vischetti, C., Casucci, C., De Bernardi, A., Monaci, E., Tiano, L., Marcheggiani, F., Ciani, M., Comitini, F., Marini, E., Taskin, E., & Puglisi, E. (2020). Sub-Lethal Effects of Pesticides on the DNA of Soil Organisms as Early Ecotoxicological Biomarkers. *Frontiers in microbiology*, *11*, 1892. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01892>

- Walters, J. K., Boswell, L. E., Green, M. K., Heumann, M. A., Karam, L. E., Morrissey, B. F., & Waltz, J. E. (2009). Pyrethrin and pyrethroid illnesses in the Pacific northwest: a five-year review. *Public health reports (Washington, D.C. : 1974)*, *124*(1), 149–159. <https://doi.org/10.1177/003335490912400118>
- Wang, G., Liang, B., Li, F. *et al.* (2011). Recent Advances in the Biodegradation of Chlorothalonil. *Curr Microbiol* **63**, 450. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0001-7>
- Wang, J., Wang, M., Li, G. B., Zhang, B. H., Lü, H., Luo, L., & Kong, X. P. (2021). Evaluation of a Spinosad Controlled-Release Formulation Based on Chitosan Carrier: Insecticidal Activity against *Plutella xylostella* (L.) Larvae and Dissipation Behavior in Soil. *ACS omega*, *6*(45), 30762–30768. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04853>
- Wang, Z., Yang, L., Cheng, P., Yu, Y., Zhang, Z., & Li, H. (2020). Adsorption, degradation and leaching migration characteristics of chlorothalonil in different soils. *European Journal of Remote Sensing*, *1-10* <https://doi.org/10.1080/22797254.2020.1771216>
- White, P. M., Jr, & Potter, T. L. (2010). Metolachlor and chlorothalonil dissipation in gypsum-amended soil. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, *45*(7), 729–738. <https://doi.org/10.1080/03601234.2010.502468>
- Wirsching, J., Pagel, H., Ditterich, F., Uksa, M., Werneburg, M., Zwiener, C., Berner, D., Kandeler, E., & Poll, C. (2020). Biodegradation of Pesticides at the Limit: Kinetics and Microbial Substrate Use at Low Concentrations. *Frontiers in microbiology*, *11*, 2107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02107>
- Wongkiew, S., Chaikaew, P., Takrattanasaran, N., & Khamkajorn, T. (2022). Evaluation of nutrient characteristics and bacterial community in agricultural soil groups for sustainable land management. *Scientific reports*, *12*(1), 7368. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09818-1>
- Wright, R.J., Bosch, R., Langille, M.G.I. *et al.* (2021) A multi-OMIC characterisation of biodegradation and microbial community succession within the PET plastisphere. *Microbiome* **9**, 141. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01054-5>
- Wu, X., Yin, Y., Wang, S., & Yu, Y. (2014). Accumulation of chlorothalonil and its metabolite, 4-hydroxychlorothalonil, in soil after repeated applications and its effects on soil microbial activities under greenhouse conditions. *Environmental science and pollution research international*, *21*(5), 3452–3459. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2318-1>
- Zhang, M.-Y., Teng, Y., Zhu, Y., Wang, J., Luo, Y.-M., Christie, P., ... Udeigwe, T. K. (2014). Isolation and Characterization of Chlorothalonil-Degrading Bacterial Strain H4 and Its Potential for Remediation of Contaminated Soil. *Pedosphere*, *24*(6), 799–807. [https://doi.org/10.1016/s1002-0160\(14\)60067-9](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(14)60067-9)

Zhang, Q., Ji, C., Yan, L., Lu, M., Lu, C., & Zhao, M. (2016). The identification of the metabolites of chlorothalonil in zebrafish (*Danio rerio*) and their embryo toxicity and endocrine effects at environmentally relevant levels. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 218, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.026>

Zhang, Q., Saleem, M., & Wang, C. (2017). Probiotic strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* BJ1 degrades and reduces chlorothalonil toxicity to soil enzymes, microbial communities and plant roots. *AMB Express*, 7(1), 227. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0530-y>

Zhang, Q., Liu, H., Saleem, M., & Wang, C. (2019). Biotransformation of chlorothalonil by strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* BJ1 isolated from farmland soil. *Royal Society open science*, 6(11), 190562. <https://doi.org/10.1098/rsos.190562>