

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΕΠΙΦΥΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ
ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΠΕΜΠΕΛΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβέπων:

Β. Ζιώγας, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μέλη:

Γ. Αράρης, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κ. Λιαπής, Ερευνητής Β', Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γ. Αράπης, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κ. Λιαπής, Ερευνητής Β', Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

Ν. Εμμανουήλ, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Γ. Μηλιάδης, Ερευνητής Α', Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

Ιωαν. Βόντας, Αν. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας

Αν. Μαρκόγλου, Επίκ. Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Φ. Φλουρή, Λέκτορας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ζιώγα Βασίλειου. Μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στο Καθηγητή κ. Ζιώγα Βασίλειο για την ανάθεση του θέματος της παρούσας διατριβής και την ουσιαστική καθοδήγηση και επίβλεψή της, αλλά και την ευγνωμοσύνη μου για την στήριξη και εμπιστοσύνη που έδειξε στο άτομό μου καθόλη τη διάρκεια εκπόνησής της.

Θερμά ευχαριστώ, επίσης, το Δρ Λιαπή Κωνσταντίνο, Ερευνητή Β' στο Εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, για την καθοδήγησή του στο αναλυτικό τμήμα της μελέτης, την στήριξή του και για τη λεπτομερή διόρθωσή της μελέτης.

Επίσης ευχαριστώ τον κ. Αράπη Γεράσιμο, Καθηγητή στο Εργαστήριο Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, για την ανάγνωση και διόρθωση της παρούσας διατριβής και για το φιλικό και ζεστό χαμόγελο το οποίο πάντα διαθέτετε για το άτομό μου.

Καθοριστική ήταν η συμβολή του Δρ. Μηλιάδη Γεώργιου, Ερευνητή Α' και Προϊστάμενο στο Εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, στην εκπόνηση τμήματος της μελέτης στο Εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων, για το οποίο τον ευχαριστώ θερμά, όπως και για την ανάγνωση και διόρθωση του παρόντος πονήματος.

Συνεχίζοντας θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Βόντα Ιωάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, για την καθοδήγηση του στα βιοχημικά πειράματα της μελέτης, για το φιλικό κλίμα και τις πάντα εύστοχες παρατηρήσεις και κριτικές του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Επικ. Καθηγητή κ. Μαρκόγλου Αναστάσιο και τη Λέκτορα κα Φλουρή Φωτεινή για την ανάγνωση και διόρθωση του τελικού κειμένου της διατριβής. Να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Μαρκόγλου για την καθοδήγησή του στα αρχικά στάδια της μελέτης και στην κα Φλουρή για την προθυμία και τις πολύ εποικοδομητικές συζητήσεις μας.

Ευχαριστώ τον κ. Εμμανουήλ Νικόλαο, Καθηγητή στο Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, για τη συμμετοχή του στην επταμελή εξεταστική επιτροπή και την ανάγνωση του παρόντος πονήματος.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ Μώρου Ευαγγελία για την προθυμία αλλά και την

απεριόριστη βοήθεια και συμπαράστασή της κατά τη διεξαγωγή των βιοχημικών πειραμάτων της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργ. Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων του Μ.Φ.Ι., τις κυρίες Απλαδά- Σαρλή Πιπίνα, Μαλάτου Παναγιώτα και Τσίρου Κωνσταντίνα και τον κο Αναγνωστόπουλο Χρήστο, για τη φιλική διάθεση, τη συνεργασία και τη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής.

Τέλος αλλά όχι τελευταία ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου, τις αδερφές μου και κυρίως το σύζυγό μου Θάνο για την υποστήριξη και κυρίως την υπομονή που έδειξαν στις καλές και λιγότερες καλές στιγμές μου τα τελευταία αυτά πέντε χρόνια.

Κλείνοντας θα εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην κόρη μου Μαρία – Χριστίνα για την καλή παρέα που μου έκανε κατά τη συγγραφή του παρόντος πονήματος πριν και μετά τη γέννησή της.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ικανότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* να αποδομούν τα εντομοκτόνα chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron σε καθαρές καλλιέργειες και φυτικές επιφάνειες και συγκεκριμένα σε καρπούς τομάτας. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και των παραγόμενων μεταβολιτών τους πραγματοποιήθηκε με επιτυχία στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS, με τη χρήση μεταπτώσεων προδρόμου- παραγόμενου ιόντος. Στο σύστημα αυτό αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού όλων των αναλυτών από το υγρό θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των καλλιεργειών και από καρπούς τομάτας. Οι επικυρώσεις έδωσαν και για τα δύο υποστρώματα αποδεκτές τιμές ανακτήσεων και σχετικών τυπικών αποκλίσεων σύμφωνα με το έγγραφο SANCO 2007/3131. Στα πειράματα βιοαποδόμησης παρατηρήθηκε αύξηση της βιοαποδομητικής ικανότητας και των δύο ζυμών αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και την πληθυσμιακή πυκνότητα κάθε ζύμης. Επιπλέον, οι ζύμες του γένους *Rhodotorula* αποδείχτηκαν περισσότερο δραστήριες στη θερμοκρασία επώασης των καλλιεργειών στους 25°C. Η ύπαρξη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό αλάτων, ως επιπλέον πηγή άνθρακα, καθυστέρησε τη δράση της *Rhodotorula glutinis* ως αποδομητή των εντομοκτόνων, ενώ στην περίπτωση της *Rhodotorula rubra* παρουσία γλυκόζης ο ρυθμός βιοαποδόμησης αυξήθηκε. Με την εφαρμογή ενζυμικών πειραμάτων διερευνήθηκε η επίδραση των εντομοκτόνων στα ενζυμικά συστήματα αποτοξικοποίησης τους, ενώ σε επόμενο στάδιο η προσθήκη των ενεργιστών triphenyl phosphate, piperonyl butoxide και diethyl maleate στα πειράματα βιοαποδόμησης «ενοχοποίησαν» τις εστεράσες για τη βιοαποδόμηση του chlorpyrifos, τις μεταφοράσες της γλουταθειόνης για το diazinon και τις μονοοξυγονάσες, οι οποίες έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀, για την αποδόμηση των lufenuron και teflubenzuron. Η μείωση των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στους καρπούς τομάτας έπειτα από τον ψεκάσμό τους με κύτταρα ζύμης και εντομοκτόνο επιβεβαιώνουν τα αντίστοιχα ευρήματα στο τεχνητό θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν πως οι ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* θα μπορούσαν αφενός να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία για την απομάκρυνση ή την αποτοξικοποίηση των chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron από τα λαχανικά, αφετέρου θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη κατά τον καθορισμό του χρόνου τελευταίας επέμβασης πριν τη συγκομιδή στα πειράματα υπολειμμάτων.

ABSTRACT

In the present study an effort has been made in order to investigate the role of epiphytic yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula rubra* in the biodegradation of the insecticides chlorpyrifos, diazinon, lufenuron and teflubenzuron in pure cultures and in plant surfaces, and in particular in tomato fruits. The detection and quantification of the four analytes and their metabolites was successfully achieved in the LC/MS/MS chromatographic system using multiple reactions monitoring (MRM). The analytical methods of determination of the parent compounds and their metabolites from the liquid nutrient medium and tomato fruits were also validated in the LC/MS/MS. The obtained results were acceptable and in accordance with the document SANCO 2007/3131. The results of the biodegradation trials showed biodegradation rates to be proportional with the pesticide concentration and the yeasts' inoculum. Moreover, the yeasts proved to be more active at 25°C. The presence of glucose in the mineral nutrient medium, as an extra source of carbon, delayed the biodegradation of pesticides by *Rhodotorula glutinis*. On the contrary, in the case of *Rhodotorula rubra* higher biodegradation rates were observed in the presence of glucose. Enzymatic assays were applied in order to examine the effect of the insecticides in the enzymes involved in the detoxification of the four insecticides and later the synergists triphenyl phosphate, piperonyl butoxide and diethyl maleate were added in the biodegradation trials. The obtained results indicated esterases to be involved in the biodegradation of chlorpyrifos, glutathione-S-transferases for diazinon and mixed function oxidases with cytochrome P₄₅₀ for the benzoylureas lufenuron and teflubenzuron. Finally, the biodegradation activity of yeasts was studied on tomato fruits and the insecticide residues were measured by the LC/MS/MS chromatographic system. The decrease of pesticide residues confirmed the results of the biodegradation trials on pure cultures. The results of the present study indicate that the yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula rubra* could possibly be used successfully for the removal or detoxification of chlorpyrifos, diazinon, lufenuron and teflubenzuron residues in/on vegetables. Moreover, the presence of epiphytic microorganisms should be taken under consideration during the conduction of residue trials setting the preharvest interval.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ

Βιοαποδόμηση ή μικροβιακή αποδόμηση (biodegradation ή biotransformation) ονομάζεται η διάσπαση οργανικών ουσιών σε μικρότερα μόρια μέσω της δράσης ενζύμων που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς. Η μετατροπή αυτή των ουσιών βασίζεται σε μεταβολικές ή ενζυματικές διαδικασίες. Κατά τη βιοαποδόμηση σύνθετα οργανικά μόρια μετατρέπονται σε πιο απλά ή τοξικές ουσίες σε λιγότερο ή μη-τοξικές. Η αποδόμηση της οργανικής ύλης λαμβάνει χώρα είτε υπό αερόβιες συνθήκες (παρουσίας οξυγόνου) ή αναερόβιες συνθήκες (απουσίας οξυγόνου). Ο όρος σχετίζεται με την οικολογία, τη διαχείριση αποβλήτων καθώς την περιβαλλοντική αποκατάσταση (environmental remediation- bioremediation) (Chapelle, 2000).

Η μικροβιακή αποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών θεωρείται ως μια από τις σημαντικότερες οδούς απομάκρυνσης τους στο περιβάλλον. Τα είδος των ουσιών ποικίλει από υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Polychlorinated diphenyls- PCBs), πολυαρωματικούς υδρογονθράκες (Polyaromatic Hydrocarbons- PaHs), ραδιονουκλίδια, μέταλλα έως και φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Diaz, 2008).

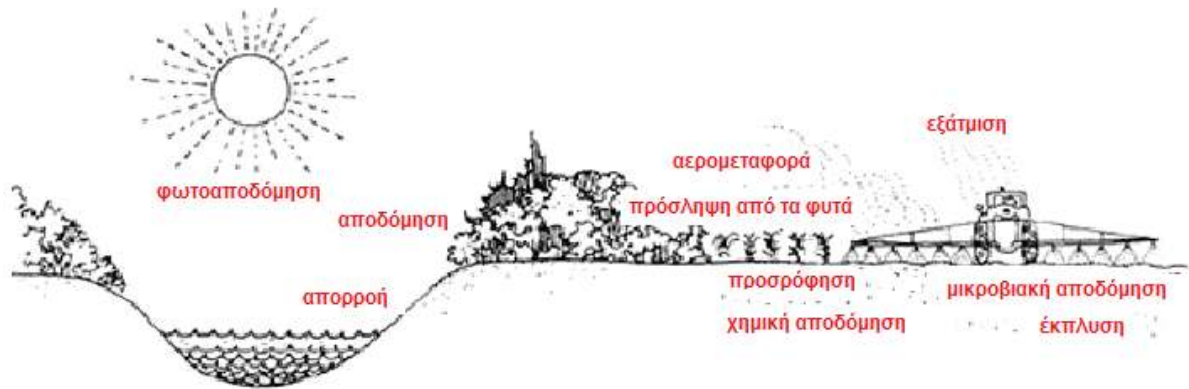
Η βιοαποδόμηση χαρακτηρίζεται ως μια πολύπλοκη αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων, η οποία συχνά διαφοροποιείται ανάλογα με το μικροοργανισμό- αποδομητή. Το μονοπάτι βιοαποδόμησης κάθε ουσίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ενζυμικό σύστημα το οποίο καταλύει τις συγκεκριμένες αντιδράσεις.

Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τις οργανικές ενώσεις ως υποστρώματα ανάπτυξής τους. Κάποιες φορές παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τη θέση διάσπασης του μορίου της χημικής ένωσης, ενώ υπάρχουν και μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αποδομούν ενώσεις διαφόρων κατηγοριών.

Τόσο η ύπαρξη όσο και η ένταση του φαινομένου της βιοαποδόμησης επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH του μέσου στο οποίο πραγματοποιείται το φαινόμενο (έδαφος, νερό, φυτό) και η περιεκτικότητά του σε νερό και οξυγόνο. Τόσο οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όσο και η χημική σύσταση της ουσίας επηρεάζουν την ανάπτυξη και εξάπλωση των αποικιών των μικροοργανισμών καθώς και τη διάσπαση των μορίων.

Όσον αφορά τη βιοαποδόμηση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ειδικά, θα λέγαμε πως αποτελεί έναν από τους πιθανούς τρόπους της απομάκρυνσης των ουσιών αυτών στο περιβάλλον. Στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 1) περιγράφονται όλες οι οδοί δυνητικής απομάκρυνσης ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος έπειτα από την εφαρμογή του. Έτσι, λοιπόν, οι διαδικασίες οι οποίες είναι πιθανό να ακολουθηθούν είναι η εξάτμιση στην

ατμόσφαιρα, η αερομεταφορά, η φωτοαποδόμηση, η απορροή, η πρόσληψη από τα φυτά, η προσρόφιση στα συστατικά του εδάφους, η έκλυση, η χημική αποδόμηση και τέλος η μικροβιακή αποδόμηση (Fishel, 1997 και Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).



Σχήμα 1. Τύχη ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος στο περιβάλλον έπειτα από την εφαρμογή του.

Η μικροβιακή δραστηριότητα θεωρείται πολύ σημαντική αιτία αποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο περιβάλλον. Τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα πραγματοποιείται έντονη διάσπαση ουσιών, η οποία, όμως, δεν είναι ποσοτικά συγκρίσιμη με την αντίστοιχη που προκαλείται από τους μικροοργανισμούς. Η πλήρης αποδόμηση ενός οργανικού μορίου σε ανόργανα (mineralization) είναι συνήθως προϊόν μικροβιακής δράσης. Μέσω της διαδικασίας αυτής οι μικροοργανισμοί αυξάνουν τη βιομάζα τους χρησιμοποιώντας τον άνθρακα των οργανικών ενώσεων ως πηγή ενέργειας και άνθρακα για την ανάπτυξή τους. Με τον τρόπο αυτό αυξάνουν τους πληθυσμούς ή τις αποικίες τους σε αριθμό και μέγεθος.

Δεδομένου ότι ποτέ δεν υπάρχει μόνο μια οργανική ένωση παρούσα αλλά πλήθος αυτών, η διαδικασία πλήρους αποδόμησής των ουσιών είναι διαφορετική. Έχει παρατηρηθεί πως κάποιες ουσίες μεταβολίζονται στο έδαφος ή το νερό, αν και δε βρέθηκε κάποιος μικροοργανισμός με την ικανότητα να τις χρησιμοποιήσει ως πηγή ενέργειας. Οι ουσίες αυτές μεταβολίζονται σε μη αποστειρωμένα εδάφη αλλά όχι σε αποστειρωμένα. Τέτοιες ουσίες είναι τα DDT, 2,4,5-T, aldrin, heptachlor και άλλα χλωριωμένα ή μη μόρια. Παρόλο που δεν έχουν απομονωθεί μικροοργανισμοί ικανοί να χρησιμοποιούν τις ουσίες αυτές ως πηγή ενέργειας και θρέψης, έχει παρατηρηθεί πως υφίστανται αλλαγές στη χημική δομή τους στο έδαφος. Η διαδικασία αυτή οφείλεται κυρίως στο φαινόμενο του **συμμεταβολισμού**

(cometabolism). Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται μεν σε άλλο υπόστρωμα, αλλά σε αυτούς οφείλεται η διάσπαση των μορίων. Στην ουσία η ύπαρξη της οργανικής ουσίας επάγει την ενεργοποίηση του ενζυμικού συστήματος του μικροοργανισμού στη δράση του οποίου οφείλεται η βιοαποδόμηση. Η πληθυσμιακή πυκνότητα των μικροοργανισμών αυτών δεν αυξάνεται και συνήθως ο μεταβολισμός της ουσίας είναι πολύ αργός (University of Waterloo).

Τα τελευταία χρόνια η έντονη αναζήτηση του ανθρώπου προς νέους βιώσιμους τρόπους απορρύπανσης του επιβαρυσμένου με φυτοπροστατευτικά προϊόντα περιβάλλοντος, έχει εντατικοποιήσει τη μελέτη της βιοαποδόμησης. Η μοναδική αυτή ικανότητα των μικροοργανισμών να αποδομούν ουσίες- ρυπαντές μελετάται εντατικά σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο προσφέροντας πολύ αναλυτικές και σημαντικές πληροφορίες τόσο για το μονοπάτι βιοαποδόμησης κάθε ουσίας, όσο και για την ικανότητα των μικροοργανισμών να προσαρμόζονται σε εναλλασσόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (Diaz, 2008).

1.2 ΕΠΙΦΥΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

1.2.1 Μικροοργανισμοί στη φυλλόσφαιρα και τους καρπούς

Η φυτική επιφάνεια αποτελεί ένα σημαντικό βίοτοπο επιφυτικών και ενδοφυτικών μικροοργανισμών, οι οποίοι προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, αλλά και τα προστατεύουν (Wilson, 1989). Τα βακτήρια, οι ζύμες και οι μυκηλιακοί μύκητες εγκαθίστανται και αναπτύσσονται πληθυσμούς στη φυλλόσφαιρα και τους καρπούς. Οι πιθανές πηγές προέλευσης των αποικιστών αυτών είναι το έδαφος, τα σπόρια, ο αέρας, οι οφθαλμοί και οι διαχειμάζοντες βλαστοί. Η σχετική σημασία των πηγών είναι άγνωστη, η μεταφορά σπορίων, όμως, με τον αέρα είναι η πιθανότερη πηγή μόλυνσεων από μυκηλιακούς μύκητες και σε σημαντικό βαθμό πολύ σημαντική και για τις υπόλοιπες κατηγορίες μικροχλωρίδας (Andrews, 1992). Στους καρπούς παρατηρείται πυκνός και ποικίλος πληθυσμός μικροοργανισμών, όπως ζύμες, μύκητες, βακτήρια και πρωτόζωα σε διάφορα στάδια ανάπτυξης (McCormack et al., 1994). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζυμών και φυτών, οι οποίες υποστηρίζουν την ανάπτυξή τους, δεν έχουν διασαφηνιστεί (Carimo-Souza, 1969; Phaff et al., 1987; Phaff and Starmer, 1987 και Robbs et al., 1989).

Οι ζύμες αναπτύσσονται σε μικροβιοτόπους όπως φύλλα, ιστοί σε αποσύνθεση, άνθη, νέκταρ, καρποί και φλοιοί δέντρων (Martini et al., 1980; Hagler et al., 1993; Rosa et al., 1994 και Rosa et al., 1995). Ο αποικισμός των καρπών από τις ζύμες επηρεάζεται από το βαθμό προσβολής από έντομα, τις καλλιεργητικές πρακτικές και τις καιρικές συνθήκες. Για την ανάπτυξη των ζυμών είναι αναγκαίες οι συνθήκες υψηλής υγρασίας (>90%) για κάποια χρονική περίοδο μέσα στην ημέρα (Bashi & Fokkema, 1977 και Fokkema et al., 1979). Οι πληθυσμοί των ζυμών και των βακτηρίων αυξάνονται ανάλογα με τις δυνατότητες που τους παρέχονται στον καρπό ή το φύλλο κάτω από τις δεδομένες επικρατούσες συνθήκες (Fokkema and Schippers, 1986). Θα πρέπει να τονιστεί πως οι συνθήκες που προάγουν την ανάπτυξη ενός πληθυσμού δεν προάγουν απαραίτητα και την ανάπτυξη κάποιου άλλου (Hirano & Upperr, 1989 και Hirano & Upperr, 1991). Επίσης η σχετική θέση του φύλλου ή του καρπού μέσα στο φύλλωμα μπορεί επίσης να επηρεάσει την πληθυσμιακή ανάπτυξη των διαφόρων μικροοργανισμών (Carroll, 1979 και Andrews et al., 1980). Τα σημεία πάνω στα φύλλα και τους καρπούς στα οποία αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί είναι κυρίως οι νευρώσεις και οι αύλακες πάνω από τα αντικλινή κυτταρικά τοιχώματα των επιδερμικών κυττάρων (Diem, 1974). Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανώς στην τοπική συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων, την προστασία από εξωτερικούς παράγοντες, τα φαινόμενα παγίδευσης και απόθεσης μικροοργανισμών και τη συγκράτηση λεπτής στρώσης νερού σε αυτές τις θέσεις. Κάποιες από τις θέσεις αυτές είναι πιθανό να είναι εξειδικευμένες ανάλογα με την

κατηγορία του μικροοργανισμού (Andrews, 1992). Τα γένη *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* και *Candida* είναι οι ζύμες οι οποίες απομονώνονται συνήθως από τις φυλλικές επιφάνειες και τους καρπούς (Phaff και Starmer, 1987). Οι ζύμες *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces* και *Rhodotorula* έχουν απομονωθεί επίσης από εδάφη ποικίλης σύστασης, υγρασίας και pH, σε διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές και κάτω από διαφορετικές κλιματικές συνθήκες (Di Menna, 1957; Phaff and Starmer, 1987 και Babeva and Chernov, 1995).

1.2.2 Μηχανισμός δράσης ζυμών

Ο κύριος μηχανισμός δράσης των ζυμών βασίζεται στον ανταγωνισμό τους με τους αντίστοιχους παθογόνους για χώρο και θρεπτικά στοιχεία (Chand- Goyal & Spotts, 1996a, 1996b; Drobby & Chalutz, 1994; Janisiewicz, 1996 και Filonow, 1998), ισχυρισμός ο οποίος ενισχύεται από το γεγονός ότι οι οργανισμοί αυτοί εμφανίζουν αδυναμία παραγωγής αντιβιοτικών ουσιών (Drobby & Chalutz, 1994a; El-Ghaouth και Wilson, 1995). Η παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών συνιστάται ως μηχανισμός δράσης κυρίως των βακτηρίων. Υπάρχουν ενδείξεις πως οι ζύμες μπορούν να διεγείρουν μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή (Wilson et al., 1994 και Arras, 1996), όπως διαπιστώθηκε για το γένος *Debaryomycetes*, το οποίο επάγει την παραγωγή φυτοαλεξινών από τα φυτά (Wilson & Chalutz, 1989 και Wilson et al., 1994). Εκτός του ανταγωνισμού για χώρο και θρεπτικά στοιχεία, διαπιστώθηκε επίσης ισχυρή προσκόλληση των ζυμών στις υφές των παθογόνων και υψηλή παραγωγή ενζύμων τα οποία προκαλούν τη λύση και αποδιοργάνωση των κυτταρικών τοιχωμάτων των τελευταίων (Wisniewki et al., 1991; Castoria et al., 1997). Έχει βρεθεί από τον Wilson και τους συνεργάτες του (1994) πως η ζύμη *Candida saitoana* παράγει το ένζυμο χιτινάση, το οποίο αποσυνθέτει τη χιτίνη του κυτταρικού τοιχώματος των παθογόνων.

Οι ζύμες *Rhodotorula*, συγκεκριμένα, χρησιμοποιούν για την επιβίωσή τους τα ίδια θρεπτικά στοιχεία που απαιτούνται για τη βλάστηση και σποριοποίηση πολλών παθογόνων, όπως *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* (Elad 1996 και Leibinger et al., 1997). Ο Castoria και οι συνεργάτες του (1997) διαπίστωσαν τη μεγάλη εξάρτηση της συγκεκριμένης ζύμης από την ύπαρξη των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων για την επιβίωση και τον ανταγωνισμό της με άλλα παθογόνα. Οι ίδιοι διαπίστωσαν επίσης ότι η αντιβίωση δε φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο ως πιθανός μηχανισμός δράσης της.

1.2.3 Οι ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

Οι ζύμες *Rhodotorula* ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων, στην τάξη των Urediniomycetes του φύλου Basidiomycota και στην οικογένεια Sporidiobolaceae. Οι αποικίες των ζυμών αυτών είναι εύκολα αναγνωρίσιμες εξαιτίας του χαρακτηριστικού χρωματισμού τους, ο οποίος ποικίλει από κρεμώδες και κίτρινο ή πορτοκαλί έως ροζ και κόκκινο (Postgate, 1994 και de Hoog et al., 2000). Το χρώμα αυτό οφείλεται στις χρωστικές ουσίες τις οποίες παράγουν οι ζύμες με στόχο να απομακρύνουν συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός τα οποία θα ήταν καταστρεπτικά για τα κύτταρά τους (Postgate, 1994). Τα κύτταρα τους είναι σφαιρικά, ωοειδή ή επιμήκη. Η αναπαραγωγή των ζυμών πραγματοποιείται με πλευρική ή πολική βλάστηση, ενώ είναι πιθανή και η ανάπτυξη ψευδοϋφών.

Επιπλέον, κανένα είδος του γένους *Rhodotorula* δε διασπά άμυλο, ενώ δεν εμφανίζουν και την ικανότητα ζύμωσης (Kurtzman and Fell, 1998).

Οι ζύμες παρουσιάζουν ευρύ φάσμα υποστρωμάτων ανάπτυξης. Ανάπτυξη των καλλιεργειών μπορεί να επιτευχθεί στο έδαφος, το νερό, τον αέρα, στην επιφάνεια των φυτών, σε υφάσματα ή τρόφιμα και σε εσωτερικά όργανα ζώων. Οι ζύμες χαρακτηρίζονται ως ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί (Kwon- Chung και Bennett, 1992 και Postgate, 1994), αν και κάποια στελέχη αναπτύσσονται στους 37°C. Κατά κανόνα δεν έχει παρουσιαστεί δράση στον άνθρωπο, ενώ έχουν αναφερθεί δερματοπάθειες σε όρνιθες από το είδος *Rhodotorula glutinis* (Kwon- Chung και Bennett, 1992). Όμως, σύμφωνα με άλλους ερευνητές (Anaissie et al., 1989; Krcmery et al., 1999; Alliot et al., 2000 και Groll and Walsh, 2001) είναι πιθανή η πρόκληση μυκητιάσεων σε ευαίσθητες ομάδες ατόμων όπως ασθενείς που πάσχουν από AIDS ή οξεία λευχαιμία. Επιπλέον έχουν παρατηρηθεί περιστατικά μηνιγγίτιδας (Pore, 1976; Giaurgieva et al., 1996 και Huttova et al., 1998), ενδοκαρδίτιδας (Naveh, 1975), περιτονίτιδας και πάθησης οφθαλμών (Pinna et al., 2001). Οι παθήσεις αυτές συνήθως προκαλούνται από τη *Rhodotorula rubra* (Kurtzman and Fell, 1998).

Το γένος *Rhodotorula* παρουσιάζει τρία δραστήρια είδη, το *Rhodotorula glutinis*, το *Rhodotorula minuta* και το *Rhodotorula mucilaginosa*, το οποίο ονομάζεται και *Rhodotorula rubra*. Θα ακολουθήσει περιγραφή των ειδών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*.

Όσον αφορά τη *Rhodotorula glutinis* πρόκειται για ζύμη η οποία αποτελεί την απλοειδή φάση της *Rhodotorula sphaerocarpon*. Η πιθανή σύνδεση μεταξύ δύο κυττάρων διαφορετικού φυλετικού τύπου οδηγεί στη δημιουργία ενός δικαρυωτικού μυκηλίου με πολύ σφιχτές συνδέσεις. Σε αυτή την περίπτωση το μυκήλιο με τη σειρά του παράγει τελειοσπόρια, με μονούς διπλοειδείς πυρήνες, τα οποία προέρχονται από την πυρηνική συγχώνευση κατά την ανάπτυξη τους. Όταν αυτά τα σπόρια με τα παχιά τοιχώματα σχηματιστούν,

πραγματοποιείται μείωση και το μικρό προμυκήλιο, αντίστοιχο με βασίδιο, δίνει τελικά σπορίδια (βασιδιοσπόρια) (Carlile and Watkinson, 1997b). Η *Rhodotorula glutinis* παρουσιάζει και τέλεια μορφή στο γένος *Rhodosporidium*, στα είδη *Rhodosporidium diobovatum*, *Rhodosporidium sphaerocarpum* και *Rhodosporidium toruloides* (de Hoog et al., 2000). Είναι πολύ γρήγορης ανάπτυξης και σχηματίζει κρεμώδεις, ροδόχρωου ή κοραλί - κοκκινωπού χρώματος αποικίες (Εικόνα 1). Μυκηλιακές υφές δε σχηματίζονται, ενώ μπορεί να παρατηρηθούν ατροφικές ψευδοϋφές κατά την ανάπτυξη των αποικιών της. Τα βλαστοσπόριά της είναι μονοκύτταρα με σφαιρικό ή επίμηκες σχήμα.

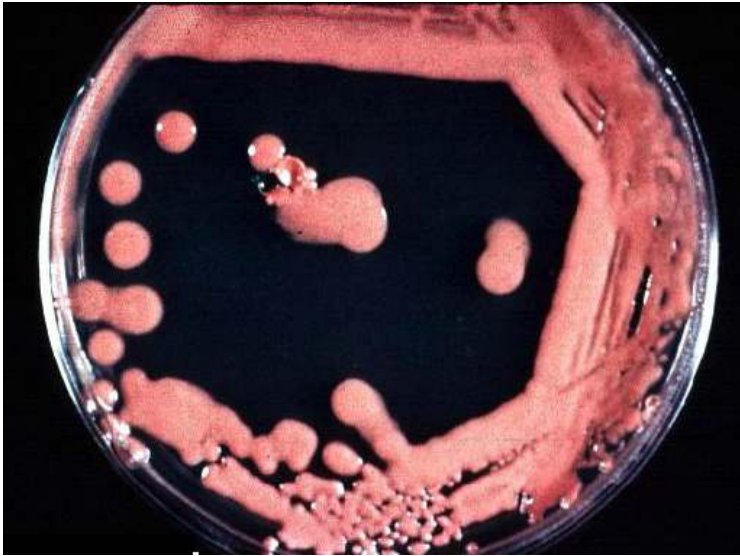


Εικόνα 1. Γραμμική σπορά της ζύμης *Rhodotorula glutinis*.

Η *Rhodotorula glutinis* παρουσιάζει παγκόσμια εξάπλωση. Έχει απομονωθεί σε περιοχές όπως Ιαπωνία, Σουηδία, Η.Π.Α., Κένυα, Γερμανία, Ισπανία, Καναδά καθώς και στον Ατλαντικό και τον Ινδικό Ωκεανό. Μεγάλος είναι ο αριθμός των υποστρωμάτων ανάπτυξής της και είναι ίσως το πιο κυρίαρχο είδος του γένους *Rhodotorula* (Kwon- Chung, 1992).

Η *Rhodotorula rubra* είναι επίσης πολύ γρήγορης ανάπτυξης και σχηματίζει ρόδινες αποικίες (Εικόνα 2) αποτελούμενες από σφαιρικά κύτταρα τα οποία επιμηκύνονται κατά τη διαίρεσή τους και έχουν συνήθως μέγεθος 2,5- 6,5 x 6,5- 14,0 nm. Δεν παρατηρούνται ψευδοϋφές. Τα βλαστοσπόριά της είναι μονοκύτταρα με σφαιρικό ή επίμηκες σχήμα.

Η ζύμη αυτή δεν αφομοιώνει νιτρικά ως μορφή αζώτου, ενώ αφομοιώνουν τη σακχαρόζη, τη μαλτόζη και τη ραφινόζη, αλλά όχι τη λακτόζη (Kreger-Van, 1984). Η έντονη διασπορά της ζύμης στον αέρα αποτελεί τον κύριο λόγο μόλυνσης του δέρματος, των πνευμόνων, των ούρων και των κοπράνων ζώων και ανθρώπων. Συχνά αναφέρεται μυκητιακή περιτονίτιδα ασθενών οφειλόμενη στο σαπροφυτικό αποικισμό της *Rhodotorula rubra* σε καθετήρες ή μηχανήματα διάλυσης (Rippon, 1988).



Εικόνα 2. Αποικίες της ζύμης *Rhodotorula rubra*.

1.2.4 Ικανότητα των ζυμών του γένους *Rhodotorula* στην αποδόμηση οργανικών ενώσεων

Οι ζύμες του γένους *Rhodotorula* παρουσιάζουν δράση στην αποδόμηση οργανικών ενώσεων διαφόρων κατηγοριών. Οι Ni και Xu (2002) παρατήρησαν την αποδόμηση των κετονών acetophenone (αρχικής συγκέντρωσης 50Mm) και *a*-bromoacetophenone (αρχικής συγκέντρωσης 2mM) από την *Rhodotorula* AS2.2241. Η αποδόμηση πραγματοποιήθηκε σε 48 ώρες και βασίστηκε στη δράση του ενζύμου ρεδοουκτάση.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί αποδόμηση του πολυκυκλικού αρωματικού υδρογονάνθρακα phenanthrene από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* (Romero et al., 1998). Έπειτα από προσθήκη 200mg phenanthrene στην καλλιέργεια της ζύμης ως μόνη πηγή άνθρακα και ενέργειας, παρατηρήθηκε πλήρης αποδόμησή του σε χρονικό διάστημα ενός μήνα. Σύμφωνα με τους MacGillivray and Shiaris (1993, 1994) η αποδόμηση των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων στηρίζεται στην ενεργοποίηση του ενζυμικού συστήματος των μονοοξυγονασών (Mixed Function Oxidases, MFOs), που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀. Αποδόμηση και του πολυκυκλικού αρωματικού υδρογονάνθρακα pyrene έχει διαπιστωθεί από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula minuta*. Έπειτα από 17 ημέρες μετρήθηκε το 35% της αρχικής χορηγηθείσας συγκέντρωσης (40mg/L). Θα πρέπει να σημειωθεί πως στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας της *Rhodotorula glutinis* στο οποίο είχε προστεθεί γλυκόζη η έναρξη της αποδόμησης του pyrene καθυστέρησε (Romero et al., 2002). Έχει αναφερθεί η αποδόμηση της φαινόλης και άλλων συγγενών ενώσεων (*p*-nitrophenol, *m*-hydroxyphenol, *o*-methoxyphenol κ.λ.π.) από διάφορες ζύμες μεταξύ των οποίων και δέκα στελέχη της *Rhodotorula creatinivora* και ένα στέλεχος της *Rhodotorula ingeniosa*. Η

φαινόλη θεωρείται ενδιάμεσο προϊόν της διάσπασης των αρωματικών ενώσεων (Bergauer et al., 2005). Όμοια αποτελέσματα δίνονται και από τον Fritsche (1992) ο οποίος περιγράφει την ικανότητα ζυμών του γένους *Rhodotorula* που έχουν απομονωθεί από το έδαφος να αποδομούν τη φαινόλη και τα παράγωγά του σε επιβαρυμένα εδάφη.

Οι Wright και Ratledge (1991) απομόνωσαν δύο στελέχη της *Rhodotorula rubra* τα οποία αποδόμησαν το 4-hydroxybenzoate και άλλες αρωματικές ενώσεις σε έδαφος όπου είχε προηγηθεί ρύπανση με πετρέλαιο. Το σπάσιμο του δακτυλίου των αρωματικών ενώσεων βασίζεται στη δράση δύο εξειδικευμένων υδρολασών της ζύμης. Έχει επίσης αναφερθεί διάσπαση του benzoate από τις *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* από τους Muncnerova και Augustin (1995). Στη μελέτη αυτή προστέθηκαν στις καλλιέργειες των ζυμών γλυκόζη ή ξυλόζη ως επιπλέον πηγή άνθρακα. Όπως διαπιστώθηκε παρουσία γλυκόζης (<5g/L) η *Rhodotorula glutinis* κατανάλωσε το benzoate αφότου εξαντλήθηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης. Στην περίπτωση, όμως, που στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας είχε προστεθεί ξυλόζη, η ζύμη κατανάλωσε ταυτόχρονα και τις δύο πηγές άνθρακα. Όσον αφορά τη *Rhodotorula rubra* δεν παρατηρήθηκε διαφορά στον τρόπο δράσης της στα δύο υλικά και η αποδόμηση του benzoate δεν παρουσίασε καθυστέρηση.

Μια άλλη κατηγορία ενώσεων στην οποία έχει παρατηρηθεί διάσπασή τους από ζύμες του γένους *Rhodotorula*, είναι οι πλαστικοποιητές bis-2-ethylhexyl adipate (B(EH)A), dioctyl phthalate (DOP), dioctyl terephthalate (DOTP), dipropylene glycol dibenzoate (D(PG)DB) και diethylene glycol dibenzoate (D(EG)DB) (Gartshore et al., 2003). Παρατηρήθηκε πως η *Rhodotorula rubra* μέσω της δράσης του ενζυμικού συστήματος των εστερασών, οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση του phthalate ester σε phthalate acid, αποδομεί όλες τις παραπάνω ουσίες. Οι δύο τελευταίες στη σειρά ενώσεις είχαν ως στόχο να αντικαταστήσουν τις υπόλοιπες οι οποίες παρουσίαζαν αρνητικές συνέπειες στο περιβάλλον. Η δράση, όμως, της ζύμης οδήγησε στην παραγωγή μεταβολιτών υψηλής τοξικότητας, γεγονός το οποίο απέρριψε τον αρχικό στόχο των ερευνών.

Τέλος, η Fattakhova και οι συνεργάτες της (1991) παρατήρησαν την αποδόμηση των ρυπαντών triethanolamine και diethanolamine από τη ζύμη *Rhodotorula rubra*. Η αποδόμηση των ενώσεων αυτών πραγματοποιήθηκε με την κατάλυση της οξειδωτικής απαλκυλίωσης των αμινο-αλκοολών από τη δράση των μονοοξυγονασών, που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀.

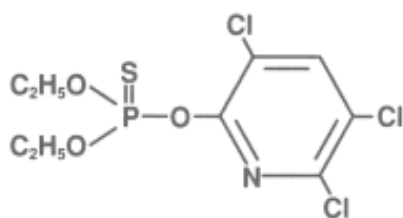
Δεν βρέθηκαν ερευνητικές εργασίες στις οποίες οι ζύμες του γένους *Rhodotorula* να αποδομούν φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

1.3 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ- ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

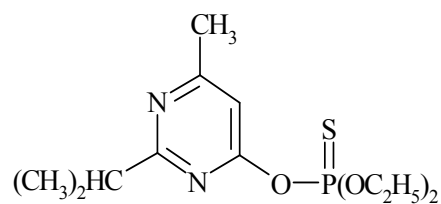
1.3.1 Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα

Τα οργανοφωσφορικά (organophosphates) εντομοκτόνα είναι η πλέον πολυπληθής ομάδα συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων. Παρουσιάζουν ευρύ φάσμα δράσης εναντίον πολλών εντόμων- εχθρών των καλλιεργειών. Τα εντομοκτόνα αυτά έτυχαν ευρύτατης εφαρμογής στη γεωργία, από τη λήξη σχεδόν του β' Παγκοσμίου Πολέμου και ιδιαίτερα μετά τη διαπίστωση των κινδύνων χρόνιας τοξικότητας από τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα (Cupra, 2005). Η ταχύτατη και ευρεία εφαρμογή τους οφείλεται κυρίως στις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες τους. Χαρακτηρίζονται κατά γενικό κανόνα από υψηλή εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση, έχουν ευρύ φάσμα δράσης, μικρή υπολειμματική διάρκεια και σχετικά γρήγορη αποδόμηση σε μεταβολικά προϊόντα μη τοξικά για τον άνθρωπο και τα ζώα. Πολλά από αυτά επιδεικνύουν διασυστηματικές ιδιότητες ή τοπική διεισδυτική δράση εισερχόμενα και διακινούμενα εντός των ιστών των φυτών.

Από άποψη χημικής δομής οι οργανοφωσφορικές ενώσεις είναι προϊόντα του πεντασθενούς τετραεδρικού φωσφόρου από τις οποίες εκείνες που συνήθως χρησιμοποιούνται στη γεωργία είναι οι εστέρες του φωσφορικού, του φωσφονικού (φωσφορώδους), του θειοφωσφορικού, του θειονοφωσφορικού και του πυροφωσφορικού οξέος. Οι οργανοφωσφορικοί εστέρες με βάση τη χημική δομή ταξινομούνται σε τρεις κύριες υποομάδες τα αλειφατικά παράγωγα, τα αρωματικά και τα ετεροκυκλικά παράγωγα. Δύο σημαντικά μέλη της ομάδας των ετεροκυκλικών παραγόντων, είναι το **chlorpyrifos (ethyl)** και το **diazinon**, οι συντακτικοί τύποι των οποίων παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 2). Οι ενώσεις της υποομάδας αυτής χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου με άζωτο, θείο ή οξυγόνο στο μόριό τους. Τα ετεροκυκλικά οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχουν γενικά μεγαλύτερη υπολειμματική δράση σε σχέση με τα αλειφατικά και αρωματικά παράγωγα (Chambers and Levi, 1992; Chambers, 1992 και Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).



Chlorpyrifos

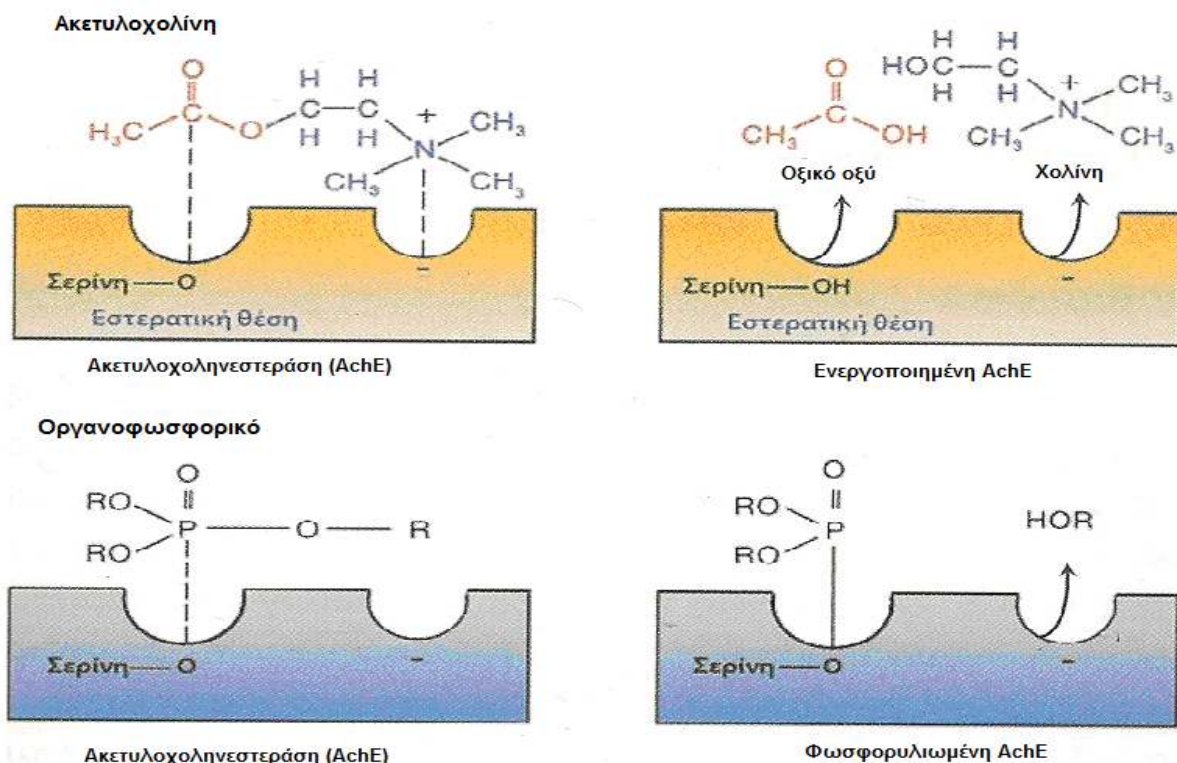


Diazinon

Σχήμα 2. Συντακτικοί τύποι των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων chlorpyrifos και diazinon.

1.3.1.1 Βιοχημικός μηχανισμός δράσης των οργανοφωσφορικών

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα δρουν στο νευρικό σύστημα των εντόμων, παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του και συγκεκριμένα, δρουν στις χολινεργικές συνάψεις, στις συνάψεις, δηλαδή, που νευροδιαβιβαστής είναι η ακετυλοχολίνη. Ειδικότερα, ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης τους στα αρθρόποδα, αλλά και στα θηλαστικά, είναι η μη αναστρέψιμη παρεμπόδιση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE, acetylcholine esterase inhibitors). Για τη δράση αυτή είναι απαραίτητη η ύπαρξη της ομάδας P=O στο μόριο τους, ενώ για τα οργανοφωσφορικά με ομάδα P=S, όπως τα chlorpyrifos και diazinon, πρέπει προηγουμένως να γίνει μετατροπή της ομάδας αυτής, στο φυτό ή στο έντομο, σε P=O. Σε κατάσταση φυσιολογικής λειτουργίας η συγκέντρωση της ακετυλοχολίνης στο συνοπτικό διάκενο ελέγχεται άμεσα από την ακετυλοχολινεστεράση, η οποία μετά τη μεταβίβαση του νευρικού σήματος, υδρολύει την ακετυλοχολίνη σε οξικό οξύ και χολίνη που είναι φυσιολογικά αδρανή και έτσι η σύναψη αποφορτίζεται. Όταν όμως εισέλθει στον οργανισμό του εντόμου κάποιος οργανοφωσφορικός εστέρας τότε γίνεται φωσφορυλίωση της χολινεστεράσης, η φωσφορική ομάδα παραμένει προσκολλημένη στο ένζυμο παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του για πολλές ημέρες, με αποτέλεσμα την υπέρμετρη συσσώρευση της ακετυλοχολίνης (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης από την ακετυλοχολινεστεράση και του μηχανισμού δράσης των οργανοφωσφορικών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Η υπέρμετρη συσσώρευση του νευροδιαβιβαστή έχει ως αποτέλεσμα τη "βραχυκύκλωση" του συστήματος μετάδοσης των νευρικών μηνυμάτων, προκαλώντας έτσι πληθώρα νευρομεταδόσεων στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος, με αποτέλεσμα υπερδιέγερση, μεγάλη κινητικότητα, τρόμο, σπασμούς, παράλυση και τελικά θάνατο (O'Brian, 1973; Coats, 1982; Cremlyn, 1991; Copping και Hewitt, 1998 και Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

1.3.1.2 Τύχη των οργανοφωσφορικών στο περιβάλλον

Η ευρεία χρήση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων έχει οδηγήσει στη συσσώρευσή τους στο περιβάλλον και ειδικά στον αέρα, τους υδάτινους όγκους, (υπόγεια και επιφανειακά νερά) και το έδαφος. Υπολείμματα τους έχουν ανιχνευτεί σε μεγάλες αποστάσεις από την τοποθεσία εφαρμογής τους (Racke, 1993). Η αναφορά στην τύχη και τη συμπεριφορά των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων στο περιβάλλον θα επικεντρωθεί στο chlorpyrifos και το diazinon.

1.3.1.2.1 Τύχη των chlorpyrifos και diazinon στον αέρα

Το **chlorpyrifos** αποδομείται στον αέρα κυρίως μέσω της διαδικασίας της φωτόλυσης. Η φωτολυτική αυτή διάσπαση λαμβάνει χώρα είτε άμεσα είτε έμμεσα. Στην άμεση φωτόλυση το φυτοπροστατευτικό προϊόν απορροφά την UV ακτινοβολία και εισέρχεται στη διαδικασία αποδόμησης του μορίου του. Τόσο το chlorpyrifos όσο και ο κύριος μεταβολίτης του το 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) απορροφούν την ηλιακή ακτινοβολία σε μήκος κύματος υψηλότερο των 295nm. Στην έμμεση φωτολυτική διάσπαση το ηλιακό φως ενεργοποιεί χουμικά ή ανόργανα υλικά τα οποία αλληλεπιδρούν με το chlorpyrifos και παράγονται υπεροξειδία (Racke, 1993).

Στον αέρα το **diazinon** αρχικά φωτοοξειδώνεται στην ενεργή μορφή του το diazoxon (Schomburg et al., 1991 και Seiber et al., 1993) απορροφώντας ηλιακή ακτινοβολία σε μήκος κύματος 290nm (HHS, 1996).

1.3.1.2.2 Τύχη των chlorpyrifos και diazinon στο νερό

Οι πιθανοί δίοδοι των εντομοκτόνων προς το νερό είναι είτε από απευθείας ρίψη, ως αποτέλεσμα απορροής από γεωργικές και αστικές περιοχές ή από έκπλυση κατά τη διάρκεια της επέμβασης. Επιπλέον, είναι πιθανό να μετακινηθούν από την ατμόσφαιρα μέσω ομίχλης ή βροχόπτωσης (Seiber et al., 1993; Domagalski et al., 1997). Τα οργανοφωσφορικά

εντομοκτόνα έχουν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί σε υγρά απόβλητα, χείμαρρους, υπόγεια ύδατα και υδρόβιους οργανισμούς (EPA, 1995).

Η κύρια οδός υποβάθμισης του **chlorpyrifos** στα υδάτινα οικοσυστήματα είναι η υδρόλυση. Από διάφορες μελέτες έχει προκύψει πως σε συνθήκες θερμοκρασίας 25°C και pH 7, ο χρόνος ημιζωής του chlorpyrifos στην υδρόσφαιρα ποικίλει από 35 έως 74 ημέρες (Meikle and Youngson, 1978; Chapman and Cole, 1982; McCall, 1986a; και Batzer et. al, 1990). Απαραίτητο κρίνεται να αναφερθεί πως οι παραπάνω τιμές χρόνου ημιζωής του chlorpyrifos έχουν προκύψει έπειτα από μελέτη σε αποσταγμένο νερό σε συνθήκες εργαστηρίου. Στην πραγματικότητα οι τιμές αυτές είναι πολύ χαμηλότερες, δεδομένου ότι σε ένα φυσικό υδάτινο περιβάλλον σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του δρώντος συστατικού παίζουν και άλλοι παράγοντες όπως η φωτόλυση και η μικροβιακή αποδόμηση (βιοαποδόμηση) (Racke, 1993).

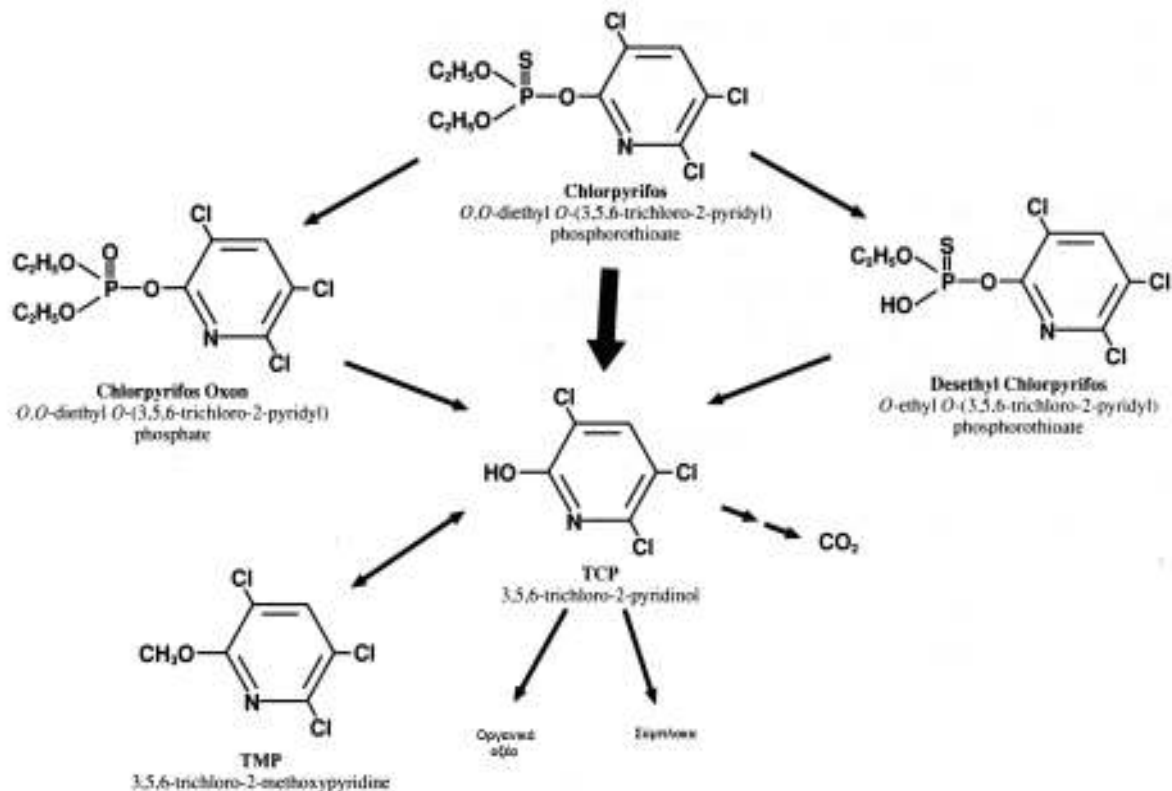
Σχετικά με το **diazinon**, όταν βρεθεί στο νερό, μπορεί να εξατμιστεί στην ατμόσφαιρα, να προσροφηθεί στο έδαφος ή στο ίζημα, να απορροφηθεί από υδάτινους οργανισμούς ή να παραμείνει στο υδατικό διάλυμα (Domagalski και Kuivila, 1993). Η αποδόμηση του στο νερό μπορεί να γίνει μέσω των μηχανισμών της υδρόλυσης, της φωτόλυσης και της βιοαποδόμησης. Οι μηχανισμοί αυτοί επηρεάζονται έντονα από το pH, τη θερμοκρασία, την αλμυρότητα και την καθαρότητα του νερού (Frank et al., 1991a και Howard, 1991). Ως παράδειγμα αναφέρεται πως σε διακύμανση του pH από 7 έως 4,5 ο χρόνος ημιζωής του diazinon από αβιοτική αποδόμηση κυμάνθηκε από 70 έως 3,15 ημέρες, αντίστοιχα (Chapman και Cole, 1982). Το κύριο προϊόν της υδρόλυσης είναι το 2-isopropyl-6-methyl-4-hydroxypyrimidine (IMHP) (Burkhard και Guth, 1979). Πολύ σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του diazinon από τα επιφανειακά νερά παίζει επίσης και ο μηχανισμός της φωτόλυσης. Ο Frank και οι συνεργάτες του (1991a) ανέφεραν πως ο χρόνος ημιζωής του δρώντος συστατικού υπό συνθήκες φωτός ήταν κατά 11 ημέρες πιο σύντομος από τον αντίστοιχο υπό συνθήκες σκότους.

1.3.1.2.3 Τύχη των **chlorpyrifos** και **diazinon** στο έδαφος

Ο ρυθμός αποδόμησης των εντομοκτόνων στο έδαφος επηρεάζεται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία η μορφή του σκευάσματος με το οποίο έγινε η επέμβαση, η δόση εφαρμογής του σκευάσματος και τέλος η ύπαρξη μικροοργανισμών.

Στο έδαφος οι κύριοι τρόποι μείωσης της συγκέντρωσης του **chlorpyrifos** είναι η υδρόλυση και η μικροβιακή αποδόμηση. Ο Bidlack (1979) ερεύνησε το μεταβολισμό του chlorpyrifos σε επτά διαφορετικούς τύπους εδάφους κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Κάτω από αερόβιες συνθήκες παρατήρησε πως ο κύριος παραγόμενος μεταβολίτης ήταν το

διοξειδίου του άνθρακα (88,5%) και σε χαμηλότερα ποσοστά οι μεταβολίτες 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) (32,5%) και ο 3,5,6-trichloro-2-methoxyypyrimidine (TMP) (10,7%). Κάτω από αναερόβιες συνθήκες παράχθηκε σε μεγάλο ποσοστό ο μεταβολίτης TCP και σε μικρότερο το διοξείδιο του άνθρακα, ενώ δεν παρατηρήθηκε καθόλου ο μεταβολίτης TMP. Ο χρόνος ημιζωής του chlorpyrifos στο έδαφος (DT₅₀) κυμαίνεται από 10- 120 ημέρες στους 25°C υπό εργαστηριακές συνθήκες, σε 35- 56 ημέρες στην περίπτωση κατά την οποία πραγματοποιείται ενσωμάτωση του φυτοπροστατευτικού προϊόντος στο έδαφος και 7- 15 ημέρες σε εφαρμογές στην επιφάνεια του εδάφους (Getzin, 1981 και Racke, 1988). Ένα γενικό σχήμα απεικόνισης του chlorpyrifos στο περιβάλλον παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί.

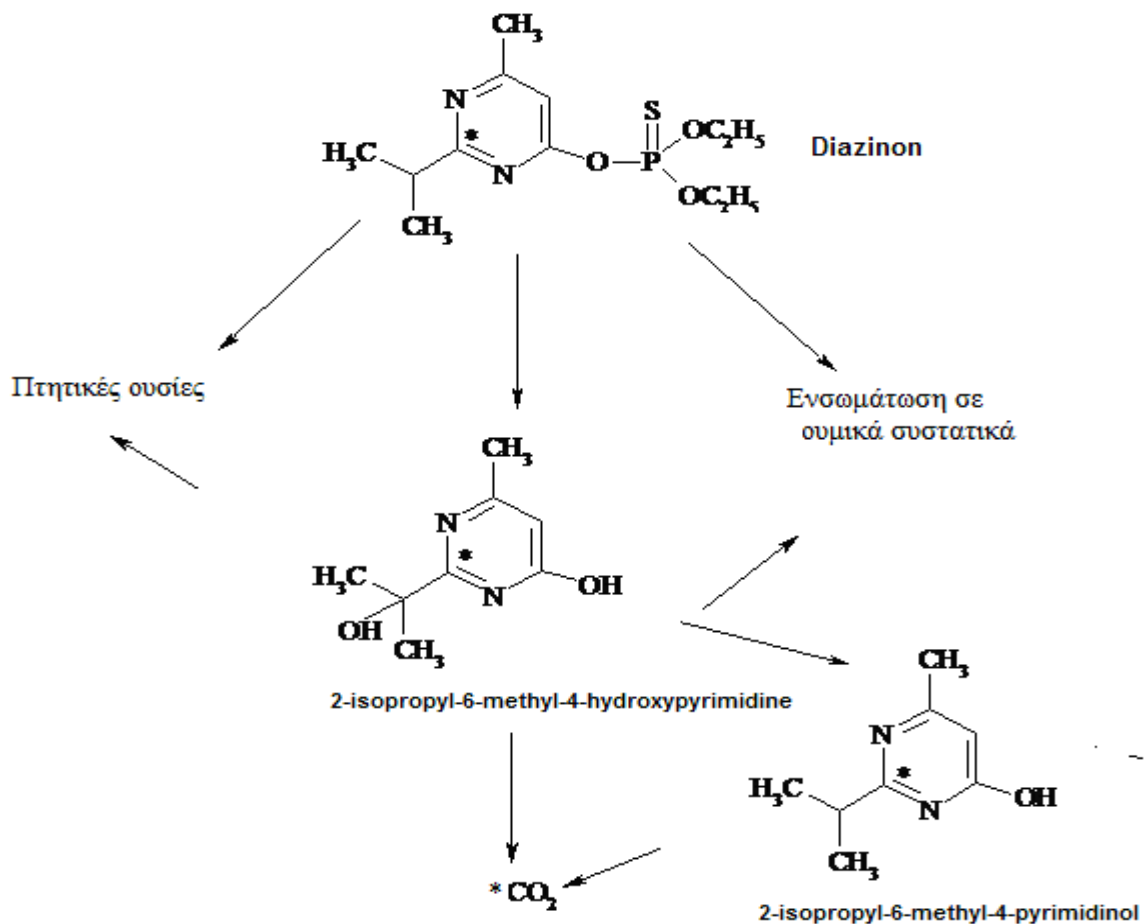


Σχήμα 4. Γενικό σχήμα απεικόνισης της αποδόμησης του chlorpyrifos στο περιβάλλον (Racke, 1993).

Όσον αφορά την αποδόμηση του chlorpyrifos στο έδαφος από μικροοργανισμούς θα ακολουθήσει σε επόμενη ενότητα λεπτομερής αναφορά.

Το έδαφος αποτελεί τον κύριο αποδέκτη των επεμβάσεων του **diazinon** ως εντομοκτόνο ή νηματωδοκτόνο (HHS, 1996). Το diazinon διασπάται στο έδαφος μέσω των μηχανισμών της υδρόλυσης, της φωτόλυσης και της μικροβιακής αποδόμησης, έχοντας την τελευταία ως

επικρατούσα διαδικασία στα περισσότερα εδάφη (Howard, 1991) αλλά και την αβιοτική υδρόλυση να κυριαρχεί σε αναερόβιες συνθήκες. Δεν παρουσιάζει εμμονή στο έδαφος και ο χρόνος ημιζωής του έχει εκτιμηθεί στις 2 έως 4 εβδομάδες (Wauchop, 1992). Το κύριο προϊόν αποδόμησης του diazinon στο έδαφος είναι το οξυγυριμιδίνη, το οποίο παρουσιάζει μεγαλύτερη εμμονή από ότι το μητρικό μόριο (EPA, 1990). Άλλα παραγόμενα προϊόντα είναι το 2-isopropyl-6-methyl-4-hydroxygυριμιδίνη (IMHP), το οποίο παράγεται τόσο από υδρόλυση όσο και από φωτόλυση, το isodiazinon, το οποίο παράγεται από φωτόλυση και τα διοξειδίου του άνθρακα και 2-isopropyl-6-methyl-4-pυριμιδίνολ (IMP) από μικροβιακή δραστηριότητα (Burkhard και Guth, 1979; Mansour et al., 1997; Michel et al., 1997). Οι Shoen και Winterlin (1987) απέδειξαν πως η αποδόμηση του diazinon είναι ταχύτερη σε όξινα εδάφη, λόγω της αυξημένης υδρολυτικής διάσπασης. Το diazinon σπάνια μετακινείται σε κατώτερα επίπεδα εδάφους, αν και έχει παρατηρηθεί να ρυπαίνει υπόγεια ύδατα (Howard, 1991). Ένα γενικό σχήμα απεικόνισης του diazinon στο περιβάλλον παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Σχήμα 5. Γενικό σχήμα απεικόνισης της αποδόμησης του diazinon στο περιβάλλον (FAO/WHO, 1967).

1.3.1.2.4 Μεταβολισμός των chlorpyrifos και diazinon στα φυτά

Ο ρυθμός απώλειας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τη φυλλική επιφάνεια επηρεάζεται από παράγοντες όπως το είδος του φυτού (μέγεθος φυλλικής επιφάνειας), οι συνθήκες εφαρμογής (αγρού ή θερμοκηπίου), η μορφή του σκευάσματος με το οποίο έγινε η επέμβαση, η δόση εφαρμογής του σκευάσματος και τέλος η γεωγραφική θέση της περιοχής στην οποία πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή.

Το **chlorpyrifos** υποβαθμίζεται πάρα πολύ γρήγορα στη φυλλική επιφάνεια των φυτών, παρουσιάζοντας χρόνο ημιζωής από 1 (σε φύλλα αραβόσιτου) έως 9 ημέρες (σε φύλλα βαμβακιού). Ο κυρίαρχος μηχανισμός μείωσης του είναι η εξάτμιση, ενώ η φωτόλυση παρουσιάζει δευτερεύοντα ρόλο (Bauriedel, 1986a). Από τα αποτελέσματα μελετών για την υποβάθμιση και το μεταβολισμό του chlorpyrifos στα φυτά, έπειτα από επέμβαση φυλλώματος, συμπεραίνεται πως η μεγαλύτερη ποσότητα της ουσίας εξατμίζεται από τα φύλλα σε 1 ή 2 ημέρες, ενώ η ποσότητα που αφομοιώνεται στους ιστούς του φύλλου μετατρέπεται σε TCP το οποίο στη συνέχεια ενσωματώνεται σε πολικά σύμπλοκα (Racke, 1993). Γενικά, η ποσότητα του chlorpyrifos που εισέρχεται στο φυτό διαμέσου του ριζικού συστήματος θεωρείται αμελητέα, επιβεβαιώνοντας το μη διασυστηματικό του χαρακτήρα (Smith και Watson, 1964). Η περιορισμένη μετακίνηση του chlorpyrifos εντός του καρπού μπορεί να αποδοθεί στην αδυναμία διασυστηματικής κίνησης (Bauriedel και Miller, 1980).

Γενικά ο χρόνος ημιζωής του **diazinon** είναι ταχύς στα φυλλώδη λαχανικά, στη χορτονομή και το γρασίδι, από 2 έως 14 ημέρες. Στα φυτά με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος η εμμόνη του diazinon είναι μεγαλύτερη (Bartsch, 1974). Έπειτα από μελέτες υποβάθμισης και μεταβολισμού του diazinon σε διάφορες κατηγορίες φυτών (τομάτα, σπανάκι, μαρούλι και φασόλια), παρατηρήθηκε πως η κύρια οδός μεταβολισμού του στους φυτικούς ιστούς ήταν παρόμοια. Πραγματοποιείται διάσπαση του εστερικού δεσμού και παράγεται το 2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxypyrimidine, το οποίο στη συνέχεια ή οξειδώνεται και σχηματίζει 2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinol (Coffin and McKinely, 1964; Ralls et al., 1966 και FAO/WHO, 1967).

1.3.1.2.5 Μεταβολισμός των chlorpyrifos και diazinon στα ζώα

Το **chlorpyrifos** μεταβολίζεται και εξαλείφεται πολύ γρήγορα σε όλα τα ζωικά είδη. Ωστόσο ο μεταβολισμός του στα ζώα παρουσιάζει διαφορές σε σχέση με τον αντίστοιχο στα φυτά. Ως κυριότερη διαφορά αναφέρεται εκείνη όπου κατά την πρώτη φάση του μεταβολισμού στα ζώα, πραγματοποιείται τόσο ενεργοποίηση του μορίου και παραγωγή του chlorpyrifos oxon, όσο και απενεργοποίηση του με την παραγωγή του μεταβολίτη TCP. Ως δεύτερη διαφορά

αναφέρεται το γεγονός ότι στα ζώα η συμπλοκοποίηση των μεταβολικών εμφανίζεται ως η πρόδρομη κατάσταση πριν την απέκκριση των τελικών προϊόντων.

Η πλειοψηφία των μελετών σχετικά με την τύχη του chlorpyrifos στα μηρυκαστικά ζώα έπειτα από χορήγησή του είτε από στόματος είτε από δέρματος, επικεντρώνουν το ενδιαφέρον τους στον προσδιορισμό των ραδιοσημασμένων υπολειμμάτων στο κρέας και το γάλα (Ivey et al., 1972; Leschchev et al., 1972; Luke and Dahl, 1976; McKellar et al., 1976; Dishburger et al., 1977; Ivey and Palmer, 1979 και Ivey and Palmer, 1981). Οι Luke και Dahl (1976) παρατήρησαν πως στο λίπος από το Αυστραλιανό πρόβατο εκτός του μητρικού μορίου του chlorpyrifos και του μεταβολίτη του TCP, ανιχνεύθηκαν και ίχνη του *O,O*-diethyl *O*-(3,6-dichloro-2-pyridyl) phosphorothioate. Ο Osman και οι συνεργάτες του (1982) χορήγησαν για 5 ημέρες σε γαλακτοπαραγωγές αίγες 0,7- 1,6mg/kg chlorpyrifos και στους μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στα ούρα και το γάλα συμπεριλαμβάνονταν το diethylphosphate, το diethylthiophosphate και το monoethylphosphate. Τέλος, ο Bauriedel (1986b) εξέτασε το μεταβολισμό 20ppm chlorpyrifos στο διαιτολόγιο ωοτόκων ορνίθων. Όπως παρατήρησε το δρων συστατικό μεταβολίστηκε ταχύτατα και απεκκρίθηκε. Ο κύριος μεταβολίτης που προσδιορίστηκε ήταν ο TCP καθώς και σε μικρότερες συγκεντρώσεις μη ταυτοποιήσιμα πολικά προϊόντα.

Όσον αφορά τους ωφέλιμους οργανισμούς, το chlorpyrifos είναι τοξικό σε ένα μεγάλο αριθμό ωφέλιμων αρθροπόδων περιλαμβανομένων των μελισσών και παρασιτικών σφηκών (Wiles and Frampton, 1996). Είναι θανατηφόρο για τα ψάρια σε συγκεντρώσεις πολύ χαμηλές της τάξης των ppt (parts per trillion) (Wiles and Frampton, 1996 και NCAP, 2000). Στα πουλιά έχουν παρατηρηθεί επιδράσεις στο βάρος των νεογνών, παραμορφώσεις ακόμη και θάνατος (NCAP, 2000).

Οι ρυθμοί μεταβολισμού και απέκκρισης του **diazinon** στα ζώα είναι ταχείς. Ο χρόνος ημιζωής του στα ζώα είναι 12 ώρες. Το φυτοπροστατευτικό προϊόν αποβάλλεται από το σώμα μέσω των ούρων και των περιττωμάτων. Σε ποσοστό 70% τα υπολείμματα που αποβάλλονται αποτελούνται από μεταβολίτες. Έκθεση βοοειδών σε diazinon οδήγησε σε αποθήκευσή του στο λιπώδη ιστό για μικρή χρονική περίοδο. Το δρων συστατικό έπαψε να ανιχνεύεται στα ζώα 2 εβδομάδες αφότου τελείωσε ο ψεκασμός. Τέλος, εφαρμογή του diazinon στο δέρμα αγελάδων κατέληξε σε ανίχνευση υπολειμμάτων αυτού στο γάλα 24 ώρες έπειτα από την εφαρμογή (U.S. Public Health Service, 1995).

1.3.1.3 Τοξικολογικό προφίλ των chlorpyrifos και diazinon - Επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό

Από άποψη οξείας τοξικότητας τόσο το **chlorpyrifos** όσο και το **diazinon** είναι μέτρια τοξικά στον άνθρωπο (EPA, 1989). Πιθανή δηλητηρίαση από chlorpyrifos ή diazinon μπορεί να επηρεάσει το κεντρικό νευρικό σύστημα, το καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό σύστημα, ενώ είναι ερεθιστικό στο δέρμα και τα μάτια. Παρόλο που σε άλλα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα παρατηρείται απορρόφησή τους από το δέρμα, εντούτοις η δερματική απορρόφηση των συγκεκριμένων είναι πολύ περιορισμένη. Η έκθεση του ανθρώπου σε δρώντα συστατικά που δρουν ως παρεμποδιστές της χολινεστεράσης, μπορεί να επιφέρει μούδιασμα, αίσθηση τσουξίματος, έλλειψη συντονισμού, πονοκέφαλο, ίλιγγο, ρίγος, ναυτία, γαστρικές κράμπες, εφίδρωση, θαμπή όραση, δυσκολίες στην αναπνοή και βραδυκαρδία. Πολύ υψηλές δόσεις είναι πιθανό να προκαλέσουν αναισθησία, ακράτεια, συσπάσεις ακόμα και θάνατο. Ιδιαίτερο κίνδυνο διατρέχουν τα άτομα με αναπνευστικά προβλήματα (Gallo et al., 1991).

Το chlorpyrifos έχει LD₅₀ από στόματος 95 έως 270mg/kg για τους αρουραίους και 1000mg/kg στα κουνέλια (Dow Chemical Co, 1986; Gallo et al., 1991 και Kidd, 1991). Οι τιμές LD₅₀ από δέρματος είναι υψηλότερες, αναφέροντας 2000mg/kg για τους αρουραίους και 1000 έως 2000mg/kg στα κουνέλια (Gallo et al., 1991; Kidd, 1991; Dow Chemical Co, 1986).

Όσον αφορά τη χρόνια τοξικότητα, η επαναλαμβανόμενη και παρατεταμένη έκθεση ενός ατόμου σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα μπορεί να προκαλέσει τα ίδια συμπτώματα με εκείνα που αναφέρθηκαν στην οξεία, ίσως με καθυστερημένη την εμφάνισή τους. Άλλα συμπτώματα που έχουν παρατηρηθεί σε εργαζόμενους-ψεκαστές είναι απώλεια μνήμης και αυτοσυγκέντρωσης, αποπροσανατολισμός, κατάθλιψη, εφιάλτες, ερεθιστικότητα, σύγχυση, πονοκέφαλος, δυσκολίες στο λόγο και αϋπνία (U.S.P.H.S., 1995). Ο Gallo και οι συνεργάτες του (1991) διεξήγαγαν μια μελέτη 2 χρόνων κατά την οποία επίμυες διατρέφονταν με chlorpyrifos σε δόσεις 1 και 3mg/kg/ημέρα και παρατήρησαν μείωση των επιπέδων της χολινεστεράσης στο πλάσμα του αίματος. Σημαντική αλλαγή παρατηρήθηκε στα επίπεδα της χολινεστεράσης τόσο στο πλάσμα όσο και στα ερυθρά αιμοσφαίρια των ψεκαστών που εκτέθηκαν σε ψεκαστικό διάλυμα chlorpyrifos. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα μελετών με εθελοντές στους οποίους χορηγήθηκε chlorpyrifos σε δόση 0,1mg/kg/ημέρα για 4 εβδομάδες (American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 1986). Τα εντομοκτόνα chlorpyrifos και diazinon χαρακτηρίζονται ως μη τερατογόνα (U.S.P.H.S., 1995; Dow Chemical Co, 1986, Conference of Governmental

Industrial Hygienists, 1986), μη μεταλλαξιγόνα και μη καρκινογόνα (Dow Chemical Co, 1986). Το chlorpyrifos έχει Ημερήσια Αποδεκτή Λήψη (Acceptable Daily Intake- ADI) της τάξης των 0,01mg/kg σωματικού βάρους (JMPR, 2004), και ArfD= 0,1mg/kg/ημέρα (JMPR, 2004). Οι αντίστοιχες τιμές για το diazinon είναι ADI= 0,0002mg/kg σωματικού βάρους ArfD= 0,025mg/kg σωματικού βάρους /ημέρα (EFSA, 2006).

Το **chlorpyrifos** αποτοξικοποιείται γρήγορα στους μύες, τους αρουραίους, τον σκύλο και άλλα ζώα. Ο κύριος μεταβολίτης που ταυτοποιήθηκε στους μύες έπειτα από χορήγηση 1 δόσης από στόματος ήταν ο TCP. Ο TCP δεν παρεμποδίζει τη δράση της χοληνεστεράσης και δεν είναι μεταλλαξιγόνο. Τέλος, το chlorpyrifos δε χαρακτηρίζεται από τη δυνατότητα βιοσυσσώρευσης (U.S.P.H.S., 1995), με εξαίρεση το λιπώδη ιστό (Gallo et al., 1991, National Academy of Sciences, 1982), στον οποίο παρουσιάζει για τον άνθρωπο χρόνο ημιζωής στις 62 ώρες (Gallo et al., 1991).

Ιστορικά αξίζει να αναφερθεί πως το chlorpyrifos ανήκει στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Dursban) τα οποία αναπτύχθηκαν από τους Γερμανούς τη δεκαετία του '30 και χρησιμοποιήθηκαν αργότερα στα στρατόπεδα συγκέντρωσης κατά τη διάρκεια του 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου.

Έπειτα από έκθεση του ανθρώπου στο **diazinon**, έχει παρατηρηθεί ανίχνευσή του στο αίμα και τα ούρα. Στην Ινδονησία, μια μελέτη με αγρότες οι οποίοι είχαν προηγουμένως ψεκάσει με diazinon, έδειξε πως σε ποσοστό 21% τα άτομα εμφάνισαν ενοχλήσεις- προβλήματα στο νευρικό σύστημα, την αναπνοή καθώς και στο πεπτικό σύστημα (Kishi et al., 1995). Η μείωση των υπολειμμάτων παρουσιάζει πολύ γρηγορότερο ρυθμό στον αγρό από ότι σε προστατευμένο περιβάλλον, κυρίως λόγω αυξανόμενης διάλυσης του diazinon (Nigg, 1980). Στον άνθρωπο, η κατάποση του diazinon έχει κατά γενικό κανόνα άμεσα αποτελέσματα, όπως εκτεταμένα οιδήματα και αιμορραγία εσωτερικών ιστών και οργάνων (HHS, 1996). Ωστόσο έχουν καταγραφεί θάνατοι ανθρώπων τόσο έπειτα από έκθεσή τους από στόματος όσο και από δέρματος (Gallo and Lawryl, 1991 και USPHS, 1995).

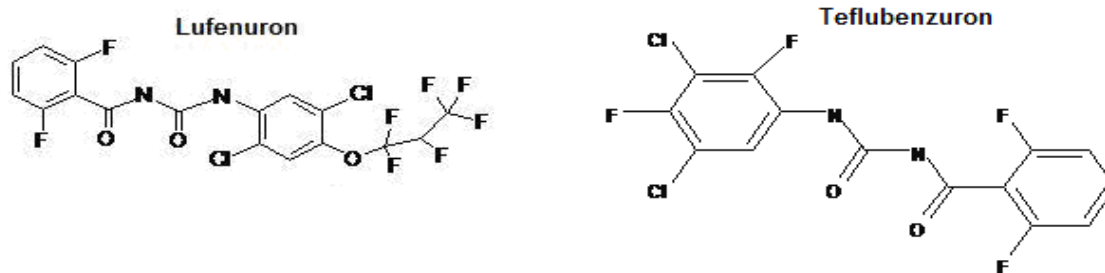
Τα πουλιά θεωρούνται αρκετά ευάλωτα στη δηλητηρίαση από το diazinon. Το 1998, το Environmental Protection Agency- EPA κατέληξε στο συμπέρασμα ότι εφαρμογή του diazinon σε ανοιχτές περιοχές αποτελεί έναν εκτεταμένο και συνεχή κίνδυνο για τα πουλιά. Οι τιμές LD₅₀ (Lethal Dose) για τα πουλιά κυμαίνονται από 2,75mg/kg έως 40,8mg/kg (U.S. Public Health Service, 1995). Έχουν καταγραφεί πολλοί θάνατοι πουλιών έπειτα από βόσκησή τους σε γρασίδι ψεκασμένο με diazinon (Frank et al., 1991b). Η μεγαλύτερη απειλή από το «εδαφικό» diazinon είναι οι επιπτώσεις στους οργανισμούς εδάφους, όπως ο γαιοσκώληκας *Lambicus terrestris* (Poter et al., 1994). Το diazinon είναι πάρα πολύ τοξικό

στα ψάρια με εκείνα των θερμών νερών εμφανίζονται πιο ανθεκτικά. (Howard, 1991 και U.S. Public Health Service, 1995). Τέλος, το diazinon είναι πολύ τοξικό στις μέλισσες (Kidd, 1991).

1.3.2 Ρυθμιστές Ανάπτυξης

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης (Insect Growth Regulators, IGRs) αντιπροσωπεύουν μια νέα γενιά εντομοκτόνων ουσιών που παρεμποδίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη και εξέλιξη των εντόμων. Η ανάπτυξη των IGRs είναι το αποτέλεσμα ερευνητικών προσπαθειών των τελευταίων 2-3 δεκαετιών, σε μια προσπάθεια μείωσης των επικίνδυνων τόσο για τη δημόσια υγεία όσο και για το περιβάλλον εντομοκτόνων. Πρόκειται για εντομοκτόνα που δεν είναι τοξικά στον άνθρωπο και τα θηλαστικά, δεν βλάπτουν σοβαρά τα ωφέλιμα παράσιτα και αρπακτικά, είναι φιλικά προς το περιβάλλον και μπορούν να ενταχθούν σε προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης.

Με βάση το βιοχημικό μηχανισμό δράσης ή τις μεταβολικές διεργασίες που επηρεάζουν οι ενώσεις αυτές μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: (α) τους παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της χιτίνης και (β) τις ενώσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος των εντόμων. Στην πρώτη κατηγορία υπάγονται οι βενζουλουρίες, οι οποίες δρουν ως παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της χιτίνης, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση σχηματισμού νέου δερματοσκελετού κατά την έκδυση και μετάβαση του εντόμου από το ένα στάδιο στο άλλο. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι η διακοπή της εξέλιξης των προνυμφικών σταδίων ή της μετάβασης στο στάδιο της νύμφης και της μεταμόρφωσης σε ακμαία και τελικά ο θάνατος των εντόμων. Εκτός από την προαναφερθείσα δράση τα εντομοκτόνα αυτά επιδεικνύουν και ωοκτόνο δράση, αναστέλλοντας την εμβρυογένεση. Ακμαία που έχουν δεχθεί την επίδραση των παρεμποδιστών αυτών γεννούν στείρα ωά (Wright, 1987 και Tomlin, 2003, Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Ειδικότερα, τα εντομοκτόνα αυτά παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό της N-ακετυλο-D- γλυκοζαμίνης και κατά συνέπεια τη σύνθεση και εναπόθεση της χιτίνης, με αποτέλεσμα το θάνατο του υπό εξέλιξη εντόμου (Mercl & Co., 2006). Η σημαντικότητα του συγκεκριμένου τρόπου δράσης έγκειται στο γεγονός ότι η βιοσύνθεση χιτίνης ως λειτουργία απουσιάζει από τα ζώα και τα φυτά (Wright, 1987 και Roberts and Hutson, 1999). Δύο σημαντικοί εκπρόσωποι της ομάδας των βενζουλουριών, είναι το **lufenuron** και το **teflubenzuron**, οι συντακτικοί τύποι των οποίων παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 6).



Σχήμα 6. Συντακτικοί τύποι των εντομοκτόνων lufenuron και teflubenzuron.

Για την ιστορία αξίζει να αναφερθεί πως η χρήση αυτών των βενζουλουριών ως εντομοκτόνα οφείλεται στην τυχαία ανακάλυψή τους από τον Philips-Duphar τη δεκαετία του 1970, κατά την προσπάθεια σύνθεσης παραγώγων (derivatives) των ζιζανιοκτόνων dichlobenyl και fenuron (να Dalen et al., 1972). Τα προϊόντα της σύνθεσης δεν είχαν ζιζανιοκτόνο δράση, αλλά παρουσίαζαν υψηλή τοξικότητα στα έντομα (Verloop and Ferrell, 1977).

1.3.2.1 Τύχη των βενζουλουριών στο περιβάλλον

Η χρήση των εντομοκτόνων lufenuron και teflubenzuron στη γεωργική πρακτική καθιστά αναγκαία τη μελέτη της συμπεριφοράς τους στο περιβάλλον (αέρα, νερό και έδαφος), καθώς και τον τρόπο μεταβολισμού τους στα φυτά και τα ζώα. Η αναζήτηση των στοιχείων αυτών στη διεθνή βιβλιογραφία, όμως, κατέληξε σε περιορισμένα αποτελέσματα, τα οποία παρατίθενται στη συνέχεια.

1.3.2.1.1 Τύχη των lufenuron και teflubenzuron στον αέρα

Το **lufenuron** έχει ως ουσία τάση ατμών $< 4 \times 10^{-6}$ Pa στους 25°C και το **teflubenzuron** $1,3 \times 10^{-8}$ Pa στους 25°C, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την πολύ μικρή εξάτμισή τους από το έδαφος ή την επιφάνεια των φύλλων (Neilson και Allard, 2008).

1.3.2.1.2 Τύχη των lufenuron και teflubenzuron στο νερό

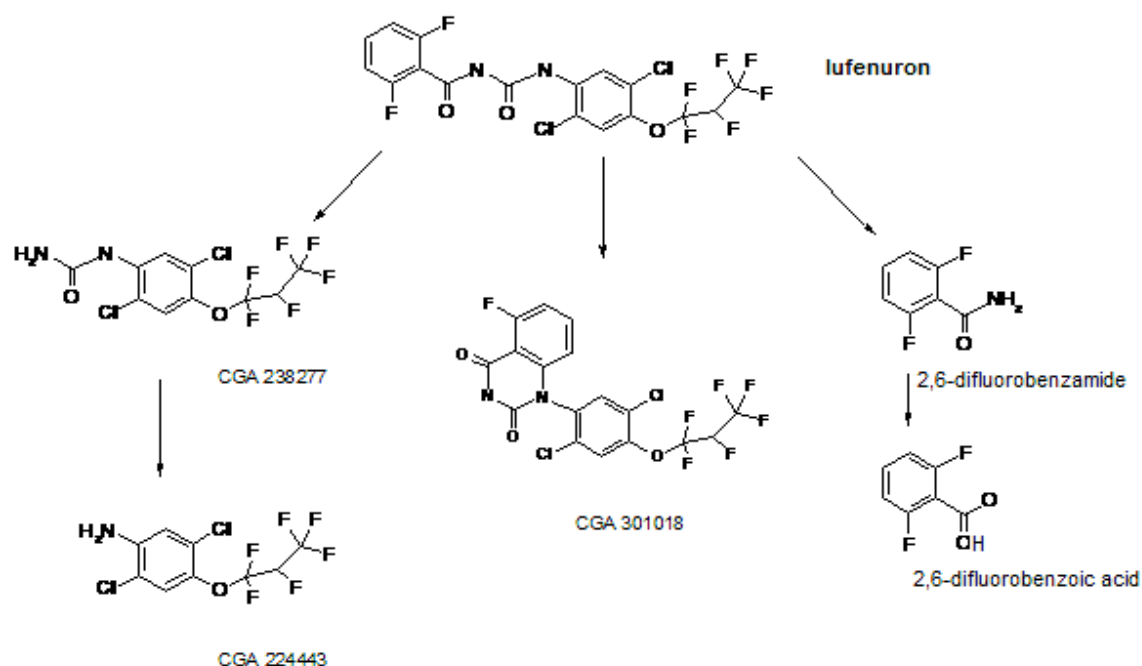
Το **lufenuron** είναι σταθερό στην υδρόλυση κάτω από συνήθεις περιβαλλοντικές συνθήκες, θερμοκρασία 25°C και pH 5, 7 και 9. Η φωτόλυση παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του δρώντος συστατικού στο νερό στη φύση. Δεν παρατηρείται ωστόσο υπό συνθήκες σκότους (Neilson και Allard, 2008).

Το **teflubenzuron** δεν υδρολύεται κάτω από συνήθεις περιβαλλοντικές συνθήκες για χρονικό διάστημα περίπου 30 ημερών. Έχει παρατηρηθεί υδρόλυση έπειτα από 30 ημέρες σε αλκαλικό περιβάλλον, δίνοντας κυρίως τους μεταβολίτες 3,5-dichloro-2,4-difluorophenylurea

και 2,6-difluorobenzoic acid. Επίσης το teflubenzuron παρουσιάζεται σταθερό και στη φωτόλυση (Roberts and Hutson, 1999).

1.3.2.1.3 Τύχη των lufenuron και teflubenzuron στο έδαφος

Το **lufenuron** παρουσιάζει έντονη προσρόφηση στα εδαφικά κolloειδή, έχοντας K_{oc} (μέση τιμή) 38mg/kg. Η προσρόφηση εξαρτάται από την περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία και όχι από το pH. Κατά την αποδόμηση του στο έδαφος το κύριο τελικό προϊόν είναι το διοξείδιο του άνθρακα, ενώ ενδιάμεσοι παραγόμενοι μεταβολίτες είναι οι 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Στη διάσπαση του δρώντος συστατικού μέσω φωτόλυσης παρατηρείται κυρίως ο σχηματισμός του 2,6-difluorobenzamide. Σε μη αποστειρωμένα εδάφη παρατηρήθηκε έντονη και ταχύτατη αποδόμηση με DT_{50} στις 13- 20 ημέρες, γεγονός το οποίο υποδηλώνει μικροβιακή αποδόμηση. Ένα γενικό σχήμα αποδόμησης του lufenuron στο περιβάλλον παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί.

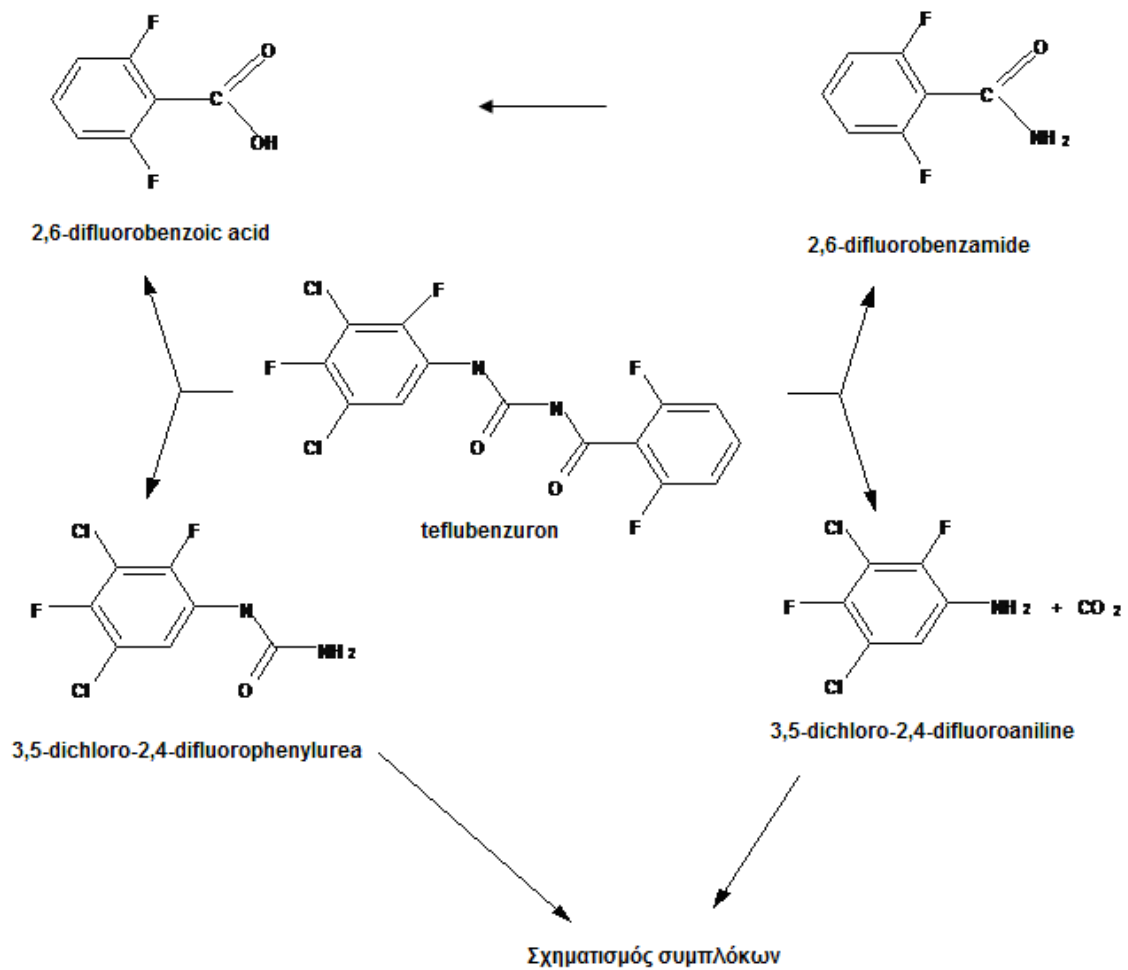


Σχήμα 7. Γενικό σχήμα απεικόνισης της αποδόμησης του lufenuron στο περιβάλλον (Neilson και Allard, 2008).

Όσον αφορά το **teflubenzuron**, παρουσιάζει στο έδαφος DT_{50} της τάξης των 2-12 εβδομάδων. Κατά κύριο λόγο ενώνεται στα εδαφικά συστατικά (bound residues) και τελικά μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα. Επιπλέον παράγονται και οι μεταβολίτες 3,5-dichloro-2,4-difluoroaniline και 3,5-dichloro-2,4-difluorophenylurea, σε πολύ μικρότερες αναλογίες. Κατά τη διάσπαση του teflubenzuron μέσω φωτόλυσης σχηματίζεται κυρίως το

3,5-dichloro-2,4-difluorophenylurea, ενώ παρατηρείται, επίσης, και μικροβιακή αποδόμηση (Roberts and Hutson, 1999, Tomlin, 2003 και Hdcchem, 2009).

Ένα γενικό σχήμα αποδόμησης του teflubenzuron στο περιβάλλον παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 8. Γενικό σχήμα απεικόνισης της αποδόμησης του teflubenzuron στο περιβάλλον (Neilson και Allard, 2008).

1.3.2.1.4 Μεταβολισμός των lufenuron και teflubenzuron στα φυτά

Η μελέτη μεταβολισμού του lufenuron σε βαμβάκι και τομάτες δεν έδειξε παραγωγή μεταβολιτών (Roberts and Hutson, 1999, Tomlin, 2003).

Το teflubenzuron δεν απορροφάται σχεδόν καθόλου από τα φυτά και συνεπώς δε μεταβολίζεται σε αυτά (Tomlin, 2003 and Hdcchem, 2009).

1.3.2.1.5 Μεταβολισμός των **lufenuron** και **teflubenzuron** στα ζώα

Η κύρια οδός απομάκρυνσης του **lufenuron** στα ζώα είναι από το απεκκριτικό σύστημα, παρουσιάζοντας ελάχιστη διάσπαση (Tomlin, 2003). Ραδιενεργά επισημασμένο [¹⁴C]lufenuron χορηγήθηκε από στόματος σε επίμυες και η μεγαλύτερη ποσότητα απεκκρίθηκε ως μητρικό μόριο. Αν και αρκετοί μεταβολίτες ήσσονος σημασίας ανιχνεύθηκαν στα ούρα, δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίησή τους (Grant, 1998). Επιπλέον, το lufenuron παρουσιάζει χαμηλές οξεία και χρόνια τοξικότητα στα πουλιά, τα ψάρια, τα φύκη (algae), χαμηλή οξεία στις μέλισσες και τους γαιοσκώληκες, ενώ έχει πολύ υψηλές οξεία και χρόνια τοξικότητα στα υδρόβια ασπόνδυλα (Tomlin, 2003 και FAO, 2007).

Έπειτα από χορήγηση από στόματος **teflubenzuron** σε επίμυες, παρατηρήθηκε ταχύτατη αποβολή τόσο του μητρικού μορίου όσο και των μεταβολιτών του από τα περιττώματα και τα ούρα (Eichler et al., 1986). Σύμφωνα με τους Van Laecke και Degheele (1991) όταν το δρων συστατικό χορηγήθηκε σε Lepidoptera της οικογένειας Noctuidae, μεταβολίστηκε πολύ γρήγορα και απεκκρίθηκε, ενώ οι κύριοι μεταβολίτες που παρατηρήθηκαν ήταν σύμπλοκα της ουρίας ή της ανιλίνης. Οι ίδιοι μεταβολίτες παρατηρήθηκαν και κατά το μεταβολισμό του teflubenzuron στο *Spodoptera littoralis* όπου ανιχνεύθηκε επίσης και το hydroxyl-teflubenzuron (El Saily et al., 1989). Δεν είναι τοξικό στις μέλισσες, ενώ παρουσιάζει οξεία τοξικότητα στα πουλιά (Hdchem, 2009).

1.3.2.2 Τοξικολογικό προφίλ των **lufenuron** και **teflubenzuron** - Επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό

Το **lufenuron** παρουσιάζει μικρή οξεία τοξικότητα από στόματος για τους αρουραίους με LD₅₀ >2000mg/kg. Το **teflubenzuron** παρουσιάζει επίσης πολύ μικρή οξεία τοξικότητα από στόματος για επίμυες και αρουραίους με LD₅₀ >5000mg/kg (Tomlin, 2003).

Τα εντομοκτόνα **lufenuron** και **teflubenzuron** χαρακτηρίζονται ως μη τερατογόνα (PSD, 1991 και FAO, 2007), μη μεταλλαξιογόνα και μη καρκινογόνα. Τόσο το lufenuron όσο και το teflubenzuron έχουν Ημερήσια Αποδεκτή Λήψη (Acceptable Daily Intake- ADI) της τάξης των 0,01mg/kg σωματικού βάρους (Tomlin, 2003).

Γενικά οι βενζοϋλουρίες παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά, άρα και στον άνθρωπο, δεδομένου ότι η δράση τους είναι εξαιρετικά εξειδικευμένη στο ατελές στάδιο ανάπτυξης των εντόμων (Khay et al., 2008).

1.4 Ικανότητα μικροοργανισμών στην αποδόμηση των εντομοκτόνων chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron

Έπειτα από βιβλιογραφική ανασκόπηση, απαραίτητο κρίνεται να ακολουθήσει μια λεπτομερής αναφορά στις ερευνητικές εργασίες που έχουν προηγηθεί, στις οποίες έχει μελετηθεί η βιοαποδόμηση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron από μικροοργανισμούς.

1.4.1 Ικανότητα μικροοργανισμών στην αποδόμηση του chlorpyrifos

Τόσο το chlorpyrifos όσο και το diazinon (Sethunathan, 1971 και Sethunathan & Pathak, 1972), χαρακτηρίζονται από το δεσμό P-O-C, όπως και άλλα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, όπως το parathion (Sethunathan & Yoshida, 1973), το methyl parathion και το fenitrothion (Mishra et al., 1992).

Τα αποτελέσματα μελετών βιοαποδόμησης του chlorpyrifos στο έδαφος απέδειξαν πως η δράση των μικροοργανισμών βασίζεται στη διάσπαση του ετεροκυκλικού δακτυλίου (Bidlack, 1979, Getzin, 1981a, Somasundaram et al., 1987 και Rack et al., 1988, 1990). Το πλέον συχνό μονοπάτι βιοαποδόμησης του chlorpyrifos είναι εκείνο κατά το οποίο το μητρικό μόριο υδρολύεται και μετατρέπεται στους μεταβολίτες TCP ή TMP.

Σε μια προσπάθεια παράθεσης των αναφορών σχετικά με την ικανότητα διαφόρων μικροοργανισμών να αποδομούν το chlorpyrifos χρονολογικά, θα λέγαμε πως πρώτος ο Thiags (1966) ανέφερε πως η αποδόμηση του μορίου είχε βραδύτερο ρυθμό σε αποστειρωμένο αμμο-πηλώδες έδαφος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο σε φυσικό έδαφος, αν και η παραγωγή του μεταβολίτη TCP έλαβε χώρα και στις δυο περιπτώσεις. Στη συνέχεια ο Hirakoso (1969) εξέτασε την πιθανή βιοαποδόμηση του chlorpyrifos από 27 διαφορετικά είδη βακτηρίων, τα οποία αναπτύσσονταν σε θρεπτικό διάλυμα με πεπτόνη, γλυκόζη και 20ppm chlorpyrifos και παρατήρησε πως δεν υπήρχε καμία επίδραση στη συγκέντρωση του δρώντος συστατικού. Το γεγονός αυτό δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση κάποιων άλλων οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (parathion, fenitrothion, diazinon και fenthion) οι συγκεντρώσεις των οποίων μειώθηκαν έπειτα από την δράση των βακτηρίων.

Ο Munnecke και οι συνεργάτες του (1975) παρατήρησαν πως το ένζυμο parathion υδρολάση, ένα ένζυμο που υδρολύει τον εστέρα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, το οποίο είχε απομονωθεί από μια μικτή καλλιέργεια μικροοργανισμών, αποδομούσε το chlorpyrifos. Οι Jones και Hastings (1981) ανέφεραν το μεταβολισμό 50ppm chlorpyrifos σε καλλιέργειες διαφόρων δασικών μυκήτων, όπως *Trichoderma harzianum*, *Penicillium vermiculatum*, *Mucor sp.* κ. ά. Έπειτα από 28 ημέρες, το chlorpyrifos και ο μεταβολίτης του 3,5,6-trichloro-

2-pyridinol (TCP) ήταν παρόντες σε όλες τις καλλιέργειες σε επίπεδα 2-5% και 1-14% των αρχικών συγκεντρώσεων, αντίστοιχα. Μεταγενέστερα, ο Ivashina (1986) μελέτησε την αποδόμηση του chlorpyrifos σε υγρές καλλιέργειες μικροοργανισμών στις οποίες είχε προστεθεί 10ppm chlorpyrifos. Όπως παρατήρησε η μείωση των επιπέδων του chlorpyrifos ήταν ταχύτερη στην περίπτωση όπου στο υλικό που περιείχε το *Trichoderma sp.* είχε προστεθεί σακχαρόζη καθώς και στην υγρή καλλιέργεια του *Bacillus sp.* που είχε προστεθεί γλυκόζη. Τα επίπεδα του chlorpyrifos εξαντλήθηκαν με γραμμικό τρόπο (linear fuction) σε 15 ημέρες. Οι Lal και Lal (1987) παρατήρησαν την πιθανή αποδόμηση του chlorpyrifos από τη ζύμη *Saccharomyces cervisiae*. Έπειτα από επώαση της καλλιέργειας της ζύμης με 1-10ppm chlorpyrifos για 12 ώρες ανακτήθηκε σχεδόν η μισή συγκέντρωση. Ο πιθανός μεταβολισμός της δραστικής ουσίας από τα βακτήρια *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*, αναφέρθηκε από τον Shaker και τους συνεργάτες του (1988). Η αρχική συγκέντρωση του chlorpyrifos στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των βακτηρίων ήταν 7,4ppm και έπειτα από 96 ώρες μειώθηκε κατά 72-83%. Σε μια διαφορετική προσέγγιση του φαινομένου, οι Havens και Rase (1991) χρησιμοποίησαν μια συμπαγή (packed) στήλη η οποία περιείχε 0,25% υδατικό διάλυμα (EC) chlorpyrifos με ενεργοποιημένο ένζυμο parathion υδρολάση το οποίο απομονώθηκε από το *Pseudomonas diminuta*. Το 25% σχεδόν της αρχικής δόσης είχε αποδομηθεί έπειτα από 3 ώρες συνεχούς κυκλοφορίας εντός της στήλης. Επιπρόσθετα να αναφέρουμε τη μελέτη του Iijima και των συνεργατών του (1991), οι οποίοι φόρτισαν αμμώδη και αργιλλο-πηλώδη εδάφη με 300ppm chlorpyrifos και έπειτα από 30 ημέρες παρατήρησαν πως στα εδάφη τα οποία είχαν υποστεί αποστείρωση μέτρησαν το 90% της αρχικής εφαρμοσθείσας ποσότητας, ενώ στα μη αποστειρωμένα εδάφη μετρήθηκε το 50% αντίστοιχα. Η δράση των μικροοργανισμών επιβεβαιώθηκε με την εφαρμογή μυκητοκτόνου στα μη αποστειρωμένα εδαφη, έπειτα από την οποία παρατηρήθηκε καθυστέρηση στη μείωση των επιπέδων chlorpyrifos. Συνεχίζοντας, αναφέρουμε πως ο Guha και οι συνεργάτες του (1997) ανέφεραν την ανάμιξη πλασμιδίων στην αποδόμηση του malathion και του chlorpyrifos από το *Micrococcus sp.*, το οποίο είχε απομονωθεί από το έδαφος. Οι Mallick et al., (1999) ανέφεραν την ταχεία αποδόμηση του chlorpyrifos από τα βακτήρια *Flavobacterium sp.* ATCC 27551 και *Arthrobacter sp.*, όταν το δρων συστατικό χορηγούνταν σε αυτά ως η μόνη πηγή άνθρακα σε θρεπτικό διάλυμα αλάτων. Το *Flavobacterium sp.* ATCC 27551 είχε απομονωθεί από ορυζώνες στους οποίους είχε εφαρμοστεί diazinon (Sethunathan & Yoshida, 1973) ενώ το *Arthrobacter sp.* είχε απομονωθεί από πλημμυρισμένο έδαφος το οποίο είχε δεχθεί επέμβαση με parathion methyl (Mishra e tal., 1992). Επιπλέον, στελέχη των *Aspergillus flavus* και *Aspergillus niger*, τα

οποία απομονώθηκαν από έδαφος στο οποίο είχε προηγουμένως εφαρμοστεί chlorpyrifos, παρουσίασαν ικανότητα βιοαποδόμησής του σε υγρές καλλιέργειες (Swati & Singh, 2002).

Οι Singh et al., (2003) μελέτησαν την επίδραση του pH του εδάφους στην αποδόμηση του chlorpyrifos σε δύο είδη εδαφών, ένα από το Ηνωμένο Βασίλειο και ένα από την Αυστραλία. Στο πρώτο έδαφος παρατηρήθηκε πως σε εύρος pH 4,7 έως 8,4 τα επίπεδα του chlorpyrifos μειώθηκαν από το συµμεταβολισμό μικροοργανισμών του εδάφους. Στο αυστραλιανό έδαφος απομονώθηκε πληθυσμός βακτηρίων, με πολύ έντονη την ικανότητα αποδόμησης του chlorpyrifos ως μόνη πηγή άνθρακα και η ικανότητά τους αυτή μεταφέρθηκε επιτυχώς και στο έδαφος από το Ηνωμένο Βασίλειο. Η ικανότητα βιοαποδόμησης διατηρήθηκε για πάνω από 90 ημέρες στα εδάφη που είχαν $pH \geq 6,7$. Ένα χρόνο αργότερα (2004) ο Singh και οι συνεργάτες του κατέγραψαν την αποδόμηση του chlorpyrifos από το *Enterobacter* strain B-14. Το εν λόγω στελέχος χρησιμοποίησε το chlorpyrifos ως μόνη πηγή άνθρακα και φωσφόρου και προκάλεσε την υδρόλυση του σε diethylthiophosphoric acid (DETP) αρχικά και 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) στη συνέχεια. Από περαιτέρω μελέτες προέκυψε πως στη δράση του στελέχους B14 στην αποδόμηση του chlorpyrifos παρουσιάζεται το καινοτόμο ενζυμικό μονοπάτι της φωσφοτριεστεράσης. Χαρακτηρίζεται ως καινοτόμο για το λόγο ότι το γονίδιο έκφρασης του ενζύμου αυτού παρουσιάζει διαφορετική αλληλουχία από εκείνη του γονιδίου opd, το οποίο είναι ευρέως μελετημένο ως υπεύθυνο για την αποδόμηση των οργανοφωσφορικών. Ο Yang και οι συνεργάτες του (2005) απομόνωσαν το *Alcaligenes faecalis* DSP3, το οποίο παρουσιάζει ικανότητα αποδόμησης τόσο του μητρικού μορίου του chlorpyrifos όσο και του μεταβολίτη του TCP. Πρόσφατα (2006) οι ίδιοι ερευνητές κλωνοποίησαν με επιτυχία το γονίδιο mpd από ένα βακτήριο ικανό να βιοαποδομεί το chlorpyrifos και χρησιμοποίησαν το βακτήριο αυτό στην βιοαπορρύπανση επιβαρυσμένου εδάφους. Απομόνωσαν 6 βακτήρια με ικανότητα αποδόμησης του chlorpyrifos και παρατήρησαν πως από τα έξι, το *Strenotrophomonas* strain YC-1 ήταν εκείνο που παρουσίασε την ταχύτερη αποδόμηση. Σε 24 ώρες βιοαποδομήθηκαν 100mg/L chlorpyrifos σε DETP και TCP. Το DETP χρησιμοποιήθηκε από το βακτήριο ως πηγή άνθρακα και φωσφόρου και αποδομήθηκε, γεγονός το οποίο δεν επαναλήφθηκε και στο TCP. Το mpd γονίδιο του *Strenotrophomonas* strain YC-1 ήταν κατά 99% σε επίπεδο νουκλεοτιδίου όμοιο με τα αντίστοιχα mpd γονίδια των *Plesimonas sp.* M6 (GenBank accession no. AF338729), *Pseudomonas putida* (GenBank accession no. AYO29773) και *Ochrobactrum sp.* MP-4 (GenBank accession no. AY627036). Οι Li, He και Li (2007) μελέτησαν την αποδόμηση του chlorpyrifos από το βακτήριο *Sphingomonas sp.* strain Dsp-2, το οποίο απομονώθηκε από μολυσμένα νερά σε περιοχή της Κίνας όπου για πάνω από δέκα χρόνια υπήρχε βιομηχανία

παρασκευής chlorpyrifos. Αποδομήθηκαν 100μg/mL chlorpyrifos σε 12 ώρες. Παρατηρήθηκε παραγωγή του μεταβολίτη TCP και στη συνέχεια αποδόμησή του. Αργότερα (2008) ο Xu και οι συνεργάτες του ερεύνησαν την αποδόμηση του από το βακτήριο *Paracoccus sp.* strain TRP. Σε μια διαφορετική προσέγγιση του θέματος ο Fang και οι συνεργάτες του (2008) μελέτησαν την αποδόμηση του chlorpyrifos από το μύκητα *Verticillium sp DSP* σε καθαρές καλλιέργειες του μικροοργανισμού, στο έδαφος και σε φυτά κινέζικου λάχανου (*Brassica chinensis L.*), συγκρίνοντας την ένταση του φαινομένου κάτω από διαφορετικές πειραματικές παραμέτρους. Αποδόμηση του δρώντος συστατικού στο έδαφος παρατηρήθηκε επίσης από τη δράση πέντε βακτηρίων, των *Pseudomonas fluorescence*, *Brucella melitensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella sp.*, *Serratia marcescens* και *Pseudomonas aeruginosa* (Lakshmi, Kumar and Khanna, 2008). Η πλέον πρόσφατη βιβλιογραφική αναφορά (2009) έρχεται από τον Anwar και τους συνεργάτες του οι οποίοι παρατήρησαν αποδόμηση τόσο του chlorpyrifos όσο και του μεταβολίτη του TCP από το βακτήριο *Bacillus pumilus* strain C2A1, το οποίο είχε απομονωθεί από το έδαφος. Διαπιστώθηκε ικανότητα του βακτηρίου να υδρολύει το chlorpyrifos απουσία και παρουσία γλυκόζης, ενώ ήταν πολύ δραστήριο και στην αποδόμηση του TCP, δεδομένου ότι αποδόμησε το 90% της αρχικής ποσότητας (300mg/L) σε 8 ημέρες επώασης.

1.4.2 Ικανότητα μικροοργανισμών στην αποδόμηση του diazinon

Κατά γενικό κανόνα, η ικανότητα αποδόμησης του diazinon έχει αναγνωριστεί σε βακτήρια των γενών *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Flavobacter* και *Pseudomonas*.

Η παλαιότερη χρονολογικά αναφορά (1968) έρχεται από τους Gunner και Zuckerman οι οποίοι διαπίστωσαν τη συνεργιστική δράση των βακτηρίων *Arthrobacter sp.* και *Streptomyces sp.* στην αποδόμηση του diazinon. Ένα χρόνο αργότερα (1969) οι Sethunathan και MacRae παρατήρησαν τη δράση του βακτηρίου *Streptomyces sp.*, το οποίο είχε απομονωθεί από έδαφος ορυζώνων, ως αποδομητή του φυτοπροστατευτικού προϊόντος μόνο στην περίπτωση που στο θρεπτικό υλικό υπήρχε γλυκόζη. Αργότερα (1972) παρατηρήθηκε η αποδόμηση του diazinon από βακτήρια *Arthrobacter* και *Flavobacter* επίσης σε ορυζώνες (Sethunathan και Pathak, 1972). Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε διάσπαση 14ppm diazinon σε 5 ημέρες στο νερό στα τηγάνια, 15ppm diazinon σε 10 ημέρες στη ριζόσφαιρα και 15ppm diazinon σε 10 ημέρες στο έδαφος εκτός της ριζόσφαιρας. Σε καμιά περίπτωση, όμως, δεν παρατηρήθηκε πλήρης βιοαποδόμηση. Η επόμενη αναφορά έρχεται από τους Rosenberg και Alexander (1979) οι οποίοι παρέιχαν το diazinon σε στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas* ως μόνη πηγή φωσφόρου και παρατήρησαν βιοαποδόμηση την οποία απέδωσαν σε επαγόμενη

ενζυμική δραστηριότητα. Στη διαπίστωση αυτή βασίστηκαν οι Barik και Munnecke (1982) και χρησιμοποιώντας το ένζυμο parathion υδρολάση, που απομόνωσαν από κάποιο βακτήριο του γένους *Pseudomonas* στο έδαφος, απέδειξαν πως ο ρυθμός αποδόμησης του diazinon εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση του ενζύμου και όχι από τις φυσικές παραμέτρους του συστήματος φυτοπροστατευτικό προϊόν- έδαφος. Ο Munnecke (1976, 1980) είχε αποδείξει πως το ένζυμο parathion υδρολάση είναι υπεύθυνο για την απόδόμηση των parathion, parathion methyl, chlorpyrifos, diazinon, paraoxon, amino-parathion και άλλα ethoxy- και methoxy- οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Ο Adhya και οι συνεργάτες του (1981) παρατήρησαν την υδρόλυση του diazinon από το βακτήριο *Flavobacterium* sp. ATCC 27551. Με το ίδιο βακτήριο ασχολήθηκε και ο Sethunathan (1989) στους ορυζώνες της Ινδίας, στους οποίους λόγω της παρατεταμένης χρήσης του diazinon το εντομοκτόνο έπαψε να είναι αποτελεσματικό στην καταπολέμηση των εντόμων εχθρών. Το *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 απομονώθηκε από τα νερά της λεκάνης του ορυζώνα και εμφάνισε εξαιρετική ικανότητα στην υδρόλυση του diazinon σε 2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxypyrimidine αρχικά και στη συνέχεια σε διοξείδιο του άνθρακα. Η αποδόμηση αποδόθηκε στα ένζυμα φωσφοτριεστεράσες του *Flavobacterium*. Ο ίδιος ερευνητής βρήκε επίσης πως το *Pseudomonas* sp. 29353 το οποίο είχε απομονωθεί από έδαφος στην Ινδία που είχε προηγηθεί επέμβαση με parathion είχε την ικανότητα αποδόμησης του diazinon. Το *Arthrobacter* sp. από έδαφος που είχε φυτευτεί γκαζόν, αποδόμησε διάφορα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα μεταξύ των οποίων και το diazinon (Ohshiro et al., 1996). Ο Singh και οι συνεργάτες του (2004) απέδειξαν πως το στέλεχος B-14 του *Enterobacter*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την βιοαποκατάσταση επιβαρυσμένων εδαφών από chlorpyrifos, αποδόμησε 25μg/mL diazinon σε 2 ημέρες. Ο Yang και οι συνεργάτες του (2005) απομόνωσαν το *Alcaligenes faecalis* DSP3, το οποίο αποδόμησε 100μg/mL κατά 90% σε 10 ημέρες. Σε μια πιο πρόσφατη αναφορά (2006) αναφέρεται η υδρόλυση του δρώντος συστατικού από μικροοργανισμούς σε έδαφος από τη Σρι Λάνκα. Δεν γίνεται, όμως, αναφορά σε συγκεκριμένα είδη ή γένη μικροοργανισμών. Ο Yasouri (2006) παρατήρησε πως βακτήρια από τα γένη *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. και *Agrobacterium* sp. χρησιμοποίησαν το diazinon ως πηγή άνθρακα, φωσφόρου και ενέργειας προσδίδοντας την ικανότητά τους αυτή σε κάποιο πλασμίδιο. Τέλος, στην πλέον πρόσφατη βιβλιογραφική αναφορά έχει παρατηρηθεί η αποδόμηση του diazinon από τα βακτήρια *Pseudomonas* sp., *Serratia liquefaciens* και *Serratia marcescens*. Σημειώθηκε αποδόμηση 50mg/mL diazinon κατά 80- 92% σε 14 ημέρες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως ο ρυθμός βιοαποδόμησης αυξήθηκε υπό την παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης της καλλιέργειας καθώς και πως εκτός της

μικροβιακής υδρόλυσης του diazinon, έντονη ήταν και η χημική υδρόλυση (Cycon et al., 2009).

1.4.3 Ικανότητα μικροοργανισμών στην αποδόμηση του lufenuron

Η μόνη ερευνητική εργασία που αναφέρεται στην αποδόμηση του lufenuron από μικροοργανισμούς είναι εκείνη του Pesaro και των συνεργατών του (2004), κατά την οποία διαπιστώθηκε η αποδόμηση του από μικροοργανισμούς από τα γένη *Archaea* και *Pseudomonas*. Δεν παρατίθενται, όμως, λεπτομέρειες για τη βιοαποδόμηση.

1.4.4 Ικανότητα μικροοργανισμών στην αποδόμηση του teflubenzuron

Έως τώρα έχει καταγραφεί η αποδόμηση του teflubenzuron μόνο από μικροοργανισμούς εδάφους. Συγκεκριμένα, ο Finkelstein και οι συνεργάτες του (2001) μελέτησαν την αποδόμηση του teflubenzuron από τα *Acinetobacter calcoaceticus* 21, *Bacillus brevis* 625, *Alcaligenes sp.* 1431 και *Pseudomonas sp.* 10W. Με αρχικές συγκεντρώσεις του teflubenzuron στα 19-50μg/mL, παρατηρήθηκε αποδόμηση του κατά μέσο όρο 30% και παραγωγή των μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide (10-15%), 2,6-difluoronoic acid (3-5%) και 2,4-difluoro-3,5-dichloroaniline (10-12%).

1.5 ENZYMA- ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΕΣ

1.5.1 Ένζυμα

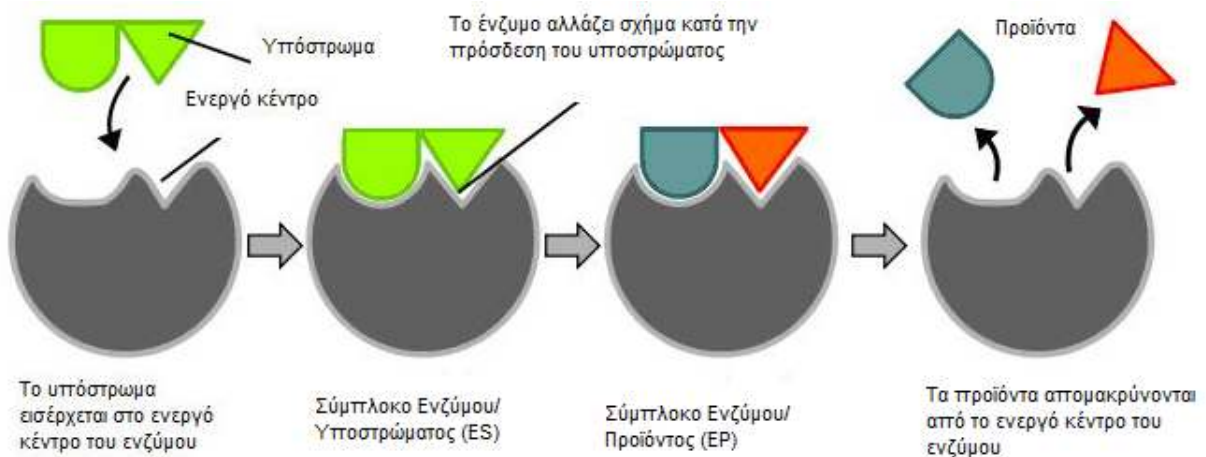
Τα **ένζυμα** είναι μόρια πρωτεϊνικής φύσεως τα οποία καταλύουν χημικές αντιδράσεις (Smith, 1997; Garrett και Grisham, 1999). Στα αρχικά βήματα των ενζυμικών αντιδράσεων τα ένζυμα αναγνωρίζουν τα υποστρώματα τους, με τα οποία συνδέονται και σχηματίζουν σύμπλοκα και στη συνέχεια τα μετατρέπουν σε διαφορετικά μόρια, τα προϊόντα. Η πλειοψηφία των αντιδράσεων στο κύτταρο χρειάζονται σε σημαντικό βαθμό τα ένζυμα ώστε να πραγματοποιηθούν. Ως καταλύτες τα ένζυμα δε συμμετέχουν στη χημική αντίδραση, επιταχύνουν την επίτευξη της ισορροπίας της, αλλά δε μεταβάλλουν τη θέση της (Stryer, 1997). Περίπου 4.000 βιοχημικές αντιδράσεις είναι γνωστές ότι καταλύονται από ένζυμα (Bairoch, 2000).

Τα ένζυμα διαφοροποιούνται από τους υπόλοιπους καταλύτες ως προς την έντονη εξειδίκευσή τους. Είναι πολύ εξειδικευμένα ως προς το υπόστρωμά τους και επιταχύνουν λίγες και συγκεκριμένες αντιδράσεις ανάμεσα σε πολλές πιθανές, έτσι ώστε το ενζυμικό σύστημα να καθορίζει το είδος της μεταβολικής οδού που διαδραματίζεται εντός του κυττάρου.

Όπως σε όλους τους καταλύτες, η δράση των ενζύμων βασίζεται στη μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης (activation energy) (ΔG^\ddagger) μιας αντίδρασης, το φράγμα ενεργοποίησης, και τη δραματική αύξηση του ρυθμού αντίδρασης. Στις περισσότερες περιπτώσεις σε μια ενζυμική αντίδραση ο ρυθμός της είναι έως και εκατομμύρια φορές υψηλότερος του αντίστοιχου εάν η αντίδραση αυτή ήταν μη καταλυόμενη.

Το μεγαλύτερο μέρος της καταλυτικής ισχύος των ενζύμων πηγάζει από το ότι φέρνουν τα υποστρώματα τους κοντά στο ευνοϊκό προσανατολισμό μέσα σε σύμπλοκα *ενζύμου-υποστρώματος* (ES, enzyme-substrate). Τα υποστρώματα προσδένονται σε μια ειδική περιοχή του ενζύμου, ένα μικρό τμήμα του μορίου του (3-4 αμινοξέα), που ονομάζεται ενεργό κέντρο. Το ενεργό κέντρο καταλαμβάνει ένα σχετικά μικρό μέρος από το συνολικό όγκο ενός ενζύμου και περιέχει τις καταλυτικές ομάδες, οι οποίες συμμετέχουν απευθείας στη σύνθεση ή τη διάσπαση δεσμών. Επιπλέον το ενεργό κέντρο αποτελεί μια τρισδιάστατη οντότητα, η οποία έχει σχηματιστεί από ομάδες που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές μιας γραμμικής αλληλουχίας αμινοξέων. Ουσιαστικά αποτελεί μία εσοχή ή σχισμή στο ένζυμο στην οποία προσδένεται το υπόστρωμα με πολλαπλές ασθενείς έλξεις. Η εξειδίκευση της πρόσδεσης εξαρτάται από την επακριβώς καθορισμένη τοποθέτηση των ατόμων στο ενεργό κέντρο και βασίζεται στο συμπληρωματικό σχήμα, το φορτίο και τα υδρόφιλα ή υδρόφοβα χαρακτηριστικά.

Ο Emil Fischer (1894) πρότεινε πως η εξειδίκευση των ενζύμων βασίζεται στο ότι τόσο αυτά όσο και τα υποστρώματα σχηματίζουν συμπληρωματικά γεωμετρικά σχήματα τα οποία ταιριάζουν απόλυτα μεταξύ τους, γεγονός το οποίο συχνά αναφέρεται ως "μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς". Το 1958 ο Daniel Koshland πρότεινε το "μοντέλο της επαγόμενης προσαρμογής", το οποίο αποτελεί μια τροποποίηση του παραπάνω μοντέλου. Σύμφωνα με αυτό, το ενεργό κέντρο των ενζύμων είναι αρκετά ευέλικτο και αλλάζει συνεχώς σχήμα κατά τη διάρκεια αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτού και του υποστρώματος. Ως αποτέλεσμα το υπόστρωμα δε δεσμεύεται σε ένα σταθερό ενεργό κέντρο, αλλά οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων, οι οποίες απαρτίζουν το ενεργό κέντρο, τροποποιούνται ώστε να διευκολύνεται η καταλυτική δράση του ενζύμου, έτσι ώστε το ενεργό κέντρο να έχει συμπληρωματικό σχήμα προς αυτό του υποστρώματος μόνο μετά την πρόσδεση του υποστρώματος (Σχήμα 9). Σε κάποιες περιπτώσεις, όπως στις γλυκοσιδάσες, το μόριο του υποστρώματος αλλάζει επίσης ελαφρώς το σχήμα του όπως εισέρχεται στο ενεργό κέντρο (Vasella, 2002). Το ενεργό κέντρο εξακολουθεί να αλλάζει έως ότου το υπόστρωμα δεσμευτεί πλήρως (Boyer, 2002).



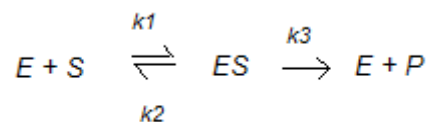
Σχήμα 9. Μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής της αλληλεπίδραση υποστρώματος και ενζύμου σύμφωνα με τον Koshland (1958).

Τα ένζυμα εμφανίζουν επίσης σε σημαντικό επίπεδο στερεοεξειδίκευση και χημειοεκλεκτικότητα (Jaeger, 2004).

1.5.2 Κινητικές ιδιότητες ενζύμων

Αντικείμενο της κινητικής των ενζύμων είναι η μελέτη του ρυθμού της αντίδρασης ή όπως συνήθως λέγεται, της ταχύτητας αντίδρασης και των παραγόντων που την επηρεάζουν. Το μοντέλο Michaelis- Menten εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων.

Σε πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης V , μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$. Ως ταχύτητα V ορίζεται ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο (M/sec). Σε σταθερή συγκέντρωση ενζύμου και σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, η ταχύτητα V είναι σχεδόν ευθέως ανάλογη προς την συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$. Το 1913 ο Leonor Michaelis και η Maud Menten πρότειναν ένα απλό μοντέλο που να εξηγεί αυτά τα κινητικά χαρακτηριστικά. Το κρίσιμο χαρακτηριστικό στη συμπεριφορά των ενζύμων είναι το ότι ένα ειδικό σύμπλοκο ES είναι το αναγκαίο ενδιάμεσο στάδιο στην κατάλυση. Το μοντέλο που προτάθηκε, το οποίο είναι το απλούστερο που εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων, είναι:



Ένα ένζυμο (E) αντιδρά με το υπόστρωμα (S) για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο (ES) με μια κινητική σταθερά k_1 . Το σύμπλοκο (ES) μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους: είτε να διασπαστεί σε E και S με μια κινητική σταθερά k_2 , ή να σχηματίσει προϊόν P με μια κινητική σταθερά k_3 . Υποτίθεται ότι το προϊόν δεν επανέρχεται στο αρχικό υπόστρωμα, μια συνθήκη η οποία ισχύει στο αρχικό στάδιο μιας αντίδρασης προτού η συγκέντρωση του προϊόντος αυξηθεί σημαντικά.

Η ταχύτητα κατάλυσης είναι ίση με το γινόμενο της συγκέντρωσης του συμπλόκου [ES] με την κινητική σταθερά k_3 .

$$V = k_3 \times [ES]$$

Οι ταχύτητες σχηματισμού και διάσπασης του συμπλόκου [ES] δίνονται από τις σχέσεις:

$$\text{Ταχύτητα σχηματισμού του [ES]} = k_1 \times [E] [S]$$

$$\text{Ταχύτητα διάσπασης του [ES]} = (k_2 + k_3) \times [ES]$$

Στη σταθερή κατάσταση οι συγκεντρώσεις των ενδιάμεσων παραμένουν σταθερές, ενώ οι συγκεντρώσεις των αρχικών ενώσεων και των προϊόντων αλλάζουν. Από τις παραπάνω σχέσεις ορίζεται η σταθερά Michaelis K_M .

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

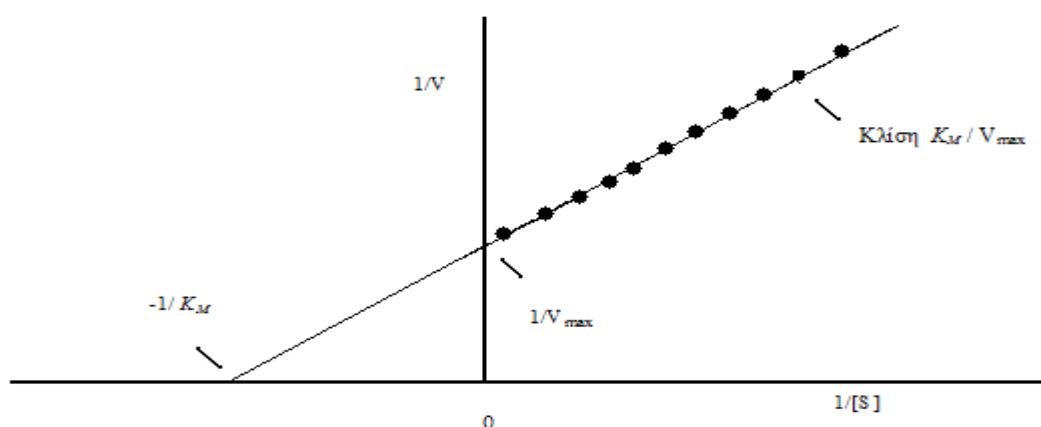
Η μέγιστη ταχύτητα (V_{\max}) επιτυγχάνεται όταν τα ενεργά κέντρα των μορίων του ενζύμου είναι κορεσμένα με υποστρώμα, δηλαδή όταν η $[S]$ είναι πολύ μεγαλύτερη από την K_M .

Τα κινητικά δεδομένα μιας ενζυμικής εξίσωσης περιγράφονται στην **εξίσωση Michaelis-Menten**, σύμφωνα με την οποία:

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα είναι μέγιστη, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Από την παραπάνω εξίσωση είναι προφανής η έννοια της K_M , όταν $[S] = K_M$, τότε $V = V_{\max}/2$, έτσι ώστε η K_M είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της.

Απαραίτητο κρίνεται να αναφερθεί και το διάγραμμα του διπλού αντιστρόφου της $1/V$ με την $1/[S]$ το οποίο ονομάζεται διάγραμμα Lineweaver-Burk και αποτελεί μια ευθεία γραμμή με κλίση K_M / V_{\max} και τομές των αξόνων y και x αντίστοιχα, $1/V_{\max}$ και $-1/K_M$ (Σχήμα 10).



Σχήμα 10. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η $1/V$ παριστάνεται ως συνάρτηση της $1/[S]$. Η κλίση είναι K_M / V_{\max} , η τεταγμένη επί την αρχή είναι $1/V_{\max}$ και η τεταγμένη επί την αρχή είναι $-1/K_M$.

Η σταθερά Michaelis K_M έχει δύο έννοιες: Πρώτον είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος

όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα έχουν καταληφθεί από υπόστρωμα. Δεύτερον, είναι ίση με τη σταθερά διάσπασης του συμπλόκου εάν η k_3 είναι πολύ μικρότερη της k_2 . Έτσι ώστε η υψηλή τιμή της K_M δείχνει ασθενή πρόσδεση, ενώ η χαμηλή τιμή της K_M δείχνει ισχυρή πρόσδεση, εκφράζοντας συνεπώς τη συγγένεια του υποστρώματος με το υπόστρωμα (Ganske, 2009).

1.5.3 Παρεμπόδιση της δράσης των ενζύμων από ειδικά μόρια

Η παρεμπόδιση της ενζυμικής ενεργότητας από ειδικά μικρά μόρια και ιόντα θεωρείται πολύ σημαντική γιατί αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς ελέγχου των βιολογικών συστημάτων. **Παρεμποδιστές (αναστολείς- inhibitors)** ονομάζονται τα μόρια τα οποία μειώνουν την ενεργότητα των ενζύμων, ενώ **ενεργοποιητές (activators)** ονομάζονται τα μόρια τα οποία αυξάνουν την ενεργότητα των ενζύμων. Πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες δρουν με παρεμπόδιση της ενζυμικής ενεργότητας.

Η ενζυμική παρεμπόδιση μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, γιατί συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, ομοιοπολικά ή μη. Συχνά ο αναστολέας αυτός ονομάζεται και αδρανοποιητής (inactivator). Η αντιστρεπτή ενζυμική παρεμπόδιση, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα και διαχωρίζεται σε τρία είδη, τη συναγωνιστική, τη μη συναγωνιστική και τη μικτή.

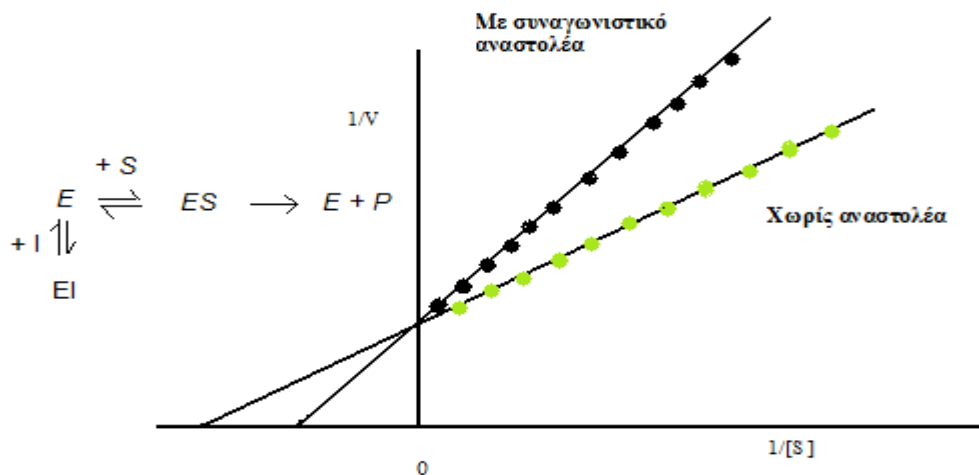
Στη **συναγωνιστική παρεμπόδιση (competitive inhibition)** το ένζυμο μπορεί να προσδέσει υπόστρωμα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή παρεμποδιστή (EI) αλλά όχι και τα δύο (ESI). Πολλοί συναγωνιστικοί παρεμποδιστές μοιάζουν με το υπόστρωμα και προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, υπάρχει, δηλαδή, συναγωνισμός μεταξύ παρεμποδιστή (I) και υποστρώματος (S) για την ίδια θέση δέσμευσης στο ένζυμο. Ως εκ τούτου, το υπόστρωμα εμποδίζεται από το να προσδεθεί στο ίδιο ενεργό κέντρο. Ένας συναγωνιστικός παρεμποδιστής ελαττώνει την ταχύτητα κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα με το υπόστρωμα. Έχει παρατηρηθεί, επίσης, πως ένα ένζυμο μπορεί να αναστέλλεται συναγωνιστικά από το δικό του προϊόν, εξαιτίας της δομικής ομοιότητας με το υπόστρωμα. Η συναγωνιστική παρεμπόδιση μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος σχεδόν όλα τα ενεργά κέντρα καταλαμβάνονται από το υπόστρωμα και έτσι το ένζυμο είναι πλήρως λειτουργικό.

Στη **μη συναγωνιστική παρεμπόδιση (ή ανταγωνιστική παρεμπόδιση) (non-competitive inhibition)**, ο παρεμποδιστής και το υπόστρωμα μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα σε

ένα μόριο ενζύμου. Ο αναστολέας (I) και το υπόστρωμα (S) δεσμεύονται σε διαφορετική θέση στο ένζυμο (E), ωστόσο προκειμένου να δεσμευτεί ο παρεμποδιστής, απαραίτητη προϋπόθεση είναι να έχει προηγουμένως δεσμευτεί το υπόστρωμα στο ένζυμο. Η δέσμευση του παρεμποδιστή (I) στο σύμπλοκο ES οδηγεί σε σχηματισμό καταλυτικού αδιεξόδου συμπλόκου ESI, το οποίο αδυνατεί να δώσει προϊόν (Κλώνης, 2007). Ένας μη συναγωνιστικός παρεμποδιστής δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδμένα με το υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική παρεμπόδιση δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

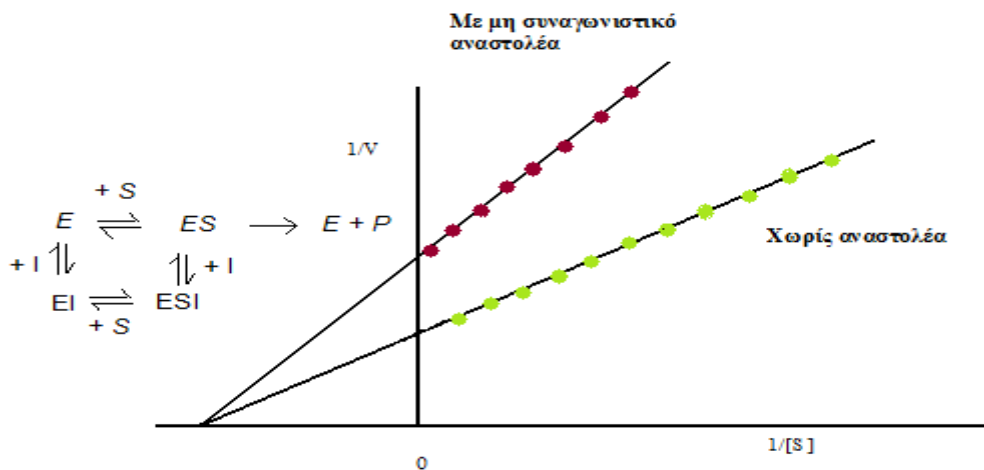
Τέλος, η **μικτή παρεμπόδιση** αποτελεί συνδυασμό συναγωνιστικής και μη συναγωνιστικής παρεμπόδισης. Ένας παρεμποδιστής επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου.

Σε μια προσπάθεια να δείξουμε πως η συναγωνιστική και η μη συναγωνιστική παρεμπόδιση είναι κινητικά διακριτές, θα λέγαμε τα εξής: οι μετρήσεις των ταχυτήτων της κατάλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και παρεμποδιστή έχουν σκοπό τη διάκριση μεταξύ συναγωνιστικής και μη συναγωνιστικής παρεμπόδισης. Στη συναγωνιστική παρεμπόδιση η τεταγμένη επί την αρχή της γραφικής παράστασης της $1/V$ σε σχέση με την $1/[S]$ είναι ίδια παρουσία ή απουσία του παρεμποδιστή, αν και η κλίση είναι διαφορετική (Σχήμα 11) γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η V_{\max} δε μεταβάλλεται από ένα συναγωνιστικό παρεμποδιστή, ενώ η K_M αυξάνεται. Η αύξηση της κλίσης της γραφικής παράστασης $1/V$ σε συνάρτηση με την $1/[S]$ δείχνει την ισχύ της πρόσδεσης του συναγωνιστικού παρεμποδιστή.



Σχήμα 11. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου μιας ενζυμικής αντίδρασης παρουσία (●●) και απουσία (●●) συναγωνιστικού παρεμποδιστή. Η V_{\max} δε μεταβάλλεται, ενώ η K_M αυξάνεται.

Στη μη συναγωνιστική παρεμπόδιση (Σχήμα 12) η V_{\max} ελαττώνεται και έτσι η τετμημένη επί την αρχή αυξάνεται. Η καινούργια κλίση αυξάνεται κατά τον ίδιο παράγοντα, ενώ η K_M δεν επηρεάζεται από το είδος της παρεμπόδισης.



Σχήμα 12. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου μιας ενζυμικής αντίδρασης παρουσία (●●) και απουσία (●●) μη συναγωνιστικού παρεμποδιστή. Η V_{\max} ελαττώνεται, ενώ η K_M δε μεταβάλλεται.

Μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας να παρεμποδίζει τη βιολογική ή βιοχημική δράση, αποτελεί το IC_{50} (**half maximal inhibitory concentration**), το οποίο εκφράζει τη συγκέντρωση του παρεμποδιστή με την οποία μειώνεται κατά 50% η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης. Οι τιμές της παραμέτρου αυτής εξαρτώνται από τις συνθήκες κάτω

από τις οποίες έχουν λάβει χώρα οι μετρήσεις, καθώς και από το είδος του αναστολέα. Κατά γενικό κανόνα, όσο υψηλότερη είναι η IC₅₀, τόσο χαμηλότερη θα είναι η ανταγωνιστική δραστηριότητα. Οι τιμές της τιμής της IC₅₀ αυξάνουν με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου (Cheng and Prusoff, 1973).

1.5.4 Ένζυμα αποδόμησης των ξενοβιοτικών ουσιών

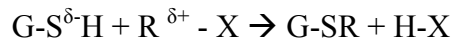
Οι ζώντες οργανισμοί έχουν αναπτύξει αμυντικούς οργανισμούς με τους οποίους προστατεύονται, έως κάποιο βαθμό, από τη δηλητηριώδη επίδραση ξενοβιοτικών ενώσεων, π.χ. εντομοκτόνων, ζιζανιοκτόνων κλπ. Σε τέτοιους οργανισμούς σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν συγκεκριμένα ένζυμα, ικανά να μεταβολίζουν τις ξενοβιοτικές αυτές ουσίες. Τα ένζυμα άμυνας έναντι εξωγενών ενώσεων διακρίνονται στις κατηγορίες των μεταφορασών, των οξειδοορεδοκτασών (οξειδωτικά και αναγωγικά ένζυμα), και των υδρολασών.

1.5.4.1 Μεταφοράσες της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferases- GSTs)

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (glutathione S-transferases- GSTs) αποτελούν μία σημαντική υπερ-οικογένεια ενζύμων η οποία περιλαμβάνει μια πληθώρα κυτταροπλασματικών, μιτοχονδριακών και μικροσωμικών πρωτεϊνών που απαντούν σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς ως ισοένζυμα. Συμμετέχουν σε μεγάλο αριθμό αντιδράσεων με πλήθος υποστρωμάτων τόσο ενδογενών όσο και ξενοβιοτικών. Παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στην άμυνα του οργανισμού έναντι ξενοβιοτικών τοξικών ενώσεων (Leaver and George, 1998) και στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών (Dixon et al., 1998; Edwards et al., 2000 και Sheehan et al., 2001). Εμπλέκονται επίσης στο μηχανισμό ανθεκτικότητας και αποτοξινώσεως του κυττάρου που σχετίζεται με τη χημειοθεραπεία του καρκίνου, τα ξενοβιοτικά και τα αντιβιοτικά.

Οι μεταφοράσες θεωρούνται ένζυμα συζεύξεως, αφού καταλύουν τη σύζευξη (conjugation) μιας ενδογενούς συζευγματοποιούς ένωσης (π.χ. γλουταθειόνης, γλουκουρονικού οξέως, κλπ) με ξενοβιοτικές ενώσεις, δημιουργώντας συζεύγματα περισσότερο υδατοδιαλυτά και επιδεκτικά σε έκκριση συγκριτικά με τις ενώσεις που αρχικά είχαν εισχωρήσει στο κύτταρο. Οι S-μεταφοράσες της γλουταθειόνης καταλύουν τη σύζευξη της σουλφυδρυλομάδας (ως σουλφυδρίου -S-) του τριπεπτιδίου γλουταθειόνης με ενδογενείς και εξωγενείς (ξενοβιοτικές ενώσεις) στο κύτταρο πριν αυτές υποστούν οξείδωση ή υδρόλυση. Τα ένζυμα δρουν σε ποικιλία κυρίως υδρόφοβων υποστρωμάτων, έχοντας ως πρώτο υπόστρωμα πάντα το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη (GSH, γ-L-Glu-L-Cys-Gly), χωρίς συνένζυμο, προσθετική ομάδα,

ή μεταλλοϊόν. Το ένζυμο καταλύει την πυρηνόφιλη προσβολή του θειολοανιόντος της κυστεΐνης της γλουταθειόνης (1^ο υπόστρωμα, G-S⁻) στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο διαφόρων οργανικών ενώσεων (2^ο υπόστρωμα, R-X) του κυττάρου, σχηματίζοντας αντίστοιχες ενώσεις συζεύξεως (G-SR)

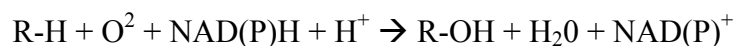


Ως R-X υπόστρωμα λειτουργούν διάφορες υδρόφοβες ενδογενείς και ξενοβιοτικές τοξικές ενώσεις (R αλειτική, αρωματική, ετεροκυκλική ή εποξειδική ομάδα) οι οποίες με τη μορφή περισσότερο υδατοδιαλυτών G-SR συμπλόκων και προϊόντων αυτών, εκκρίνονται τελικά από το κύτταρο (Douglas, 1987 και Κλώνης, 2007).

Τα ένζυμα αυτά αποτελούν το 10% των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών σε κάποια ζωικά όργανα των θηλαστικών (Boyer, 1989). Μελέτη της δράσης των GSTs στην αποτοξικοποίηση ζιζανιοκτόνων (Marrs, 1996) απέδειξε πως τα παραγόμενα GSH σύμπλοκα είναι κατά γενικό κανόνα λιγότερο τοξικά και περισσότερο υδατοδιαλυτά από τα μητρικά μόρια. Επιπλέον οι GSTs μπορούν να δεσμεύουν τοξίνες και να λειτουργούν ως μεταφορείς πρωτεϊνών (Liwak, G. et al., 1971).

1.5.4.2 Μεταλλο-εξαρτώμενες μονοξυγονάσες- Κυτόχρωμα P₄₅₀

Τα κυτοχρώματα P₄₅₀ είναι σημαντικά μέλη μεταλλο-εξαρτώμενων μονοξυγονασών (συντμ. CYP, P₄₅₀, CYP₄₅₀). Φέρουν ως προσθετική ομάδα ένα μόριο αίμης που συγκρατείται μέσω του σιδήρου της στο ένζυμο από ένα αμινοξικό κατάλοιπο Cys. Ο έκτος δεσμός του μεταλλοϊόντος καταλαμβάνεται από ένα μόριο νερού. Τα CYP θεωρούνται ως μεταλλο-εξαρτώμενα λόγω της παρουσίας του σιδήρου της προσθετικής ομάδας. Καταλύουν τη μονοξυγόνωση διαφόρων υποστρωμάτων (R-H), χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο, το ένα άτομο του οποίου εισάγουν στο υπόστρωμα ως υδροξύλιο και το άλλο ανάγουν ως νερό:



Το πεδίο αντιδράσεων των CYP είναι αρκετά ευρύ, π.χ. βιοσύνθεση ορμονών στα ζώα, δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά, βιοαποδόμηση ξενοβιοτικών, τοξικών και αγροχημικών ενώσεων.

Τα CYP ένζυμα έχουν ταυτοποιηθεί σε όλες τις μορφές ζωής, συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών, πουλιών, ψαριών, εντόμων, θαλάσσιων οργανισμών, φυτών, μυκήτων και

βακτηρίων. Σύμφωνα με στοιχεία της Επιτροπής Ονοματολογίας Ενζύμων (Σεπτέμβριος, 2007) είναι γνωστές πάνω από 7700 αλληλουχίες. Όσον αφορά τους μύκητες και τα βακτήρια, τα ευρέως χρήσης αζολικά μυκητοκτόνα σκευάσματα βασίζονται στην παρεμπόδιση της 14α- απομεθυλάσης, η δράση του ενζύμου αυτού καταλύει ένα από τα πολλά διαδοχικά στάδια που οδηγούν στη μετατροπή της λανοστερόλης σε εργοστερόλη, που είναι συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Στα βακτήρια τα ένζυμα του κυτοχρώματος P₄₅₀ είναι συνήθως διαλυτά ένζυμα και σχετίζονται συνήθως με κρίσιμα στάδια μεταβολισμού. Το κυτόχρωμα P₄₅₀ eryF (CYP107A1) του βακτηρίου *Saccharopolyspora erythraea* είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση του αντιβιοτικού ερυθρομυκίνη. Τέλος, το κυτόχρωμα P₄₅₀ BM3 (CYP102A1) του βακτηρίου εδάφους *Bacillus megaterium* καταλύει τη NADPH- εξαρτώμενη υδροξυλίωση αρκετών λιπαρών οξέων στις ω-1 έως ω-3 θέσεις (Narhi, 1986 και Girvan et al., 2006).

1.5.4.3 Υδρολάσες- Εστεράσες

Οι υδρολάσες καταλύουν αντιδράσεις κατά τις οποίες μία ομάδα λύεται από ένα υπόστρωμα- δότη και μεταφέρεται στο υδροξύλιο ενός νερού- δέκτη. Συνεπώς, προκειμένου να επιτελέσουν την καταλυτική τους λειτουργία, απαιτούν τη βοήθεια του νερού. Εάν το υπόστρωμα- δότης είναι (πολύ)πεπτιδίο ή εστέρας τότε λύεται και μεταφέρεται στο νερό μια ακυλομάδα από πρωτεάσες/ πεπτιδάσες ή εστεράσες/ λιπάσες αντιστοίχως. Διασπών δεσμούς επιδεκτικούς σε υδρόλυση, όπως εστερικούς, αμιδικούς, φωσφορικούς και εποξειδικούς. Αντίθετα με τα οξειδωτικά ένζυμα και τις μεταφοράσες, οι υδρολάσες δεν απαιτούν συνένζυμα και προσθετικές ομάδες προκειμένου να δράσουν στα υποστρώματά τους, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις απαιτούν μεταλλοϊόν. Υπάρχουν ωστόσο περιπτώσεις στις οποίες οι εν δυνάμει υδρολύσιμοι δεσμοί ομάδων δεν προσβάλλονται από υδρολάσες. Λόγου χάριν υπάρχουν οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα τα οποία δε διαπώνται υδρολυτικά, αλλά μέσω Ο-απαλκυλιώσεως ή σύζευξης με γλουταθειόνη.

Τα ένζυμα εστεράσες είναι υδρολάσες οι οποίες υδρολύουν εστερικούς δεσμούς και διακρίνονται σε Α-εστεράσες και Β-εστεράσες. Οι Α-εστεράσες υδρολύουν ξενοβιοτικές ουσίες (π.χ. οργανοφωσφορικά) όταν αυτά βρίσκονται στις συνηθισμένες συγκεντρώσεις εφαρμογής τους, ενώ οι Β-εστεράσες αδρανοποιούνται στις ίδιες συγκεντρώσεις των ξενοβιοτικών ουσιών. Δηλαδή, για τις Α-εστεράσες το οργανοφωσφορικό δρα ως υπόστρωμα ενώ για τις Β-εστεράσες ως αναστολέας (Κλώνης, 2007). Οι εστεράσες διαφέρουν στη συγγένεια που παρουσιάζουν προς συγκεκριμένα υποστρώματα και η συγγένεια αυτή εκφράζεται με τη σταθερά των Michaelis-Menten, K_m (Ganske, 2009).

1.5.5 Συνεργιστές εντομοκτόνων

Συνεργισμός ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων δραστικών ουσιών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της βιοκτόνου δράσης τους και μάλιστα σε βαθμό μεγαλύτερο του αθροίσματος της τοξικής δράσης των επιμέρους συστατικών του μίγματος. Ειδική περίπτωση φαινομένου συνεργισμού είναι η αύξηση ή η διατήρηση της αποτελεσματικότητας μιας ένωσης με την προσθήκη μιας μη τοξικής ουσίας. Οι μη τοξικές αυτές ενώσεις ονομάζονται συνεργιστές ή συνεργιστικοί παράγοντες και βρίσκουν ιδιαίτερη εφαρμογή στην περίπτωση των εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων για τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα είναι πολύ σοβαρό. Ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στις ουσίες αυτές είναι η αποτοξικοποίηση των χημικών ενώσεων με τη δράση ενζυμικών συστημάτων των φυτοπαρασίτων. Ειδικότερα, η αποτοξικοποίηση των δραστικών μορίων μπορεί να γίνει:

- (α) με τη δράση μονοοξυγονασών (Mixed Function Oxidases, MFOs), που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀,
- (β) με τη δράση μεταφορασών της γλουταθειόνης και
- (γ) με τη δράση εστερασών.

Ο οξειδωτικός μεταβολισμός, ως μηχανισμός ανθεκτικότητας έχει διαπιστωθεί για όλες τις κύριες ομάδες εντομοκτόνων, εκτός των κυκλοδιενίων. Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης είναι μια πολύ κοινή ομάδα ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την αποτοξικοποίηση των οργανοφωσφορικών και την αναγωγική αποχλωρίωση των οργανοχλωριωμένων. Οι καρβοξυλεστεράσες είναι επίσης μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των πυρεθρινοειδών και των οργανοφωσφορικών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ικανότητα των επιφυτικών ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* να αποδομούν τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα diazinon και chlorpyrifos και τα εντομοκτόνα της κατηγορίας των βενζοϋλουριών lufenuron και teflubenzuron.

Οι λόγοι επιλογής των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σχετίζονται με το γεγονός ότι παρουσιάζουν ευρεία και πολυετή χρήση στη γεωργική παραγωγή και έχουν ανιχνευτεί σε μεγάλο βαθμό στα γεωργικά οικοσυστήματα και επιπλέον, στα μόριά τους υπάρχουν πολλά αλκύλια και αυτό τους προσδίδει πολλές πιθανές θέσεις διάσπασης. Όσον αφορά τις βενζοϋλουρίες είναι φυτοπροστατευτικά προϊόντα με ήπιο τοξικολογικό προφίλ και ιδιότητες τέτοιες που τους επιτρέπουν να ενταχθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης καλλιεργειών και να αυξηθεί η χρήση τους, ενώ για τις ουσίες αυτές δεν υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία πολλά δεδομένα για την τύχη και το μεταβολισμό τους στο περιβάλλον, τα φυτά και τα ζώα.

Οι επιφυτικές ζύμες του γένους *Rhodotorula* εμφανίζουν την ικανότητα αποδόμησης οργανικών μορίων διαφόρων κατηγοριών, αλλά μέχρι τώρα δεν έχει καταγραφεί από αυτές βιοαποδόμηση φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών που παρουσιάζουν την ικανότητα να αποδομούν τα chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron είναι βακτήρια εδάφους και σε μικρότερο βαθμό μύκητες και δη ζύμες. Επιπλέον η βιοαποδόμησή τους έχει μελετηθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό στο έδαφος, αλλά πολύ λίγο στην επιφάνεια των φυτών.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιείται μελέτη της βιοαποδόμησης των chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron από τις επιφυτικές ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*:

- α) σε χημικό επίπεδο, καταγράφοντας ποιοτικά και ποσοτικά το φαινόμενο με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (LC/MS/MS)
- β) σε βιοχημικό επίπεδο, ελέγχοντας αρχικά την επίδραση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα ενζυμικά συστήματα αποτοξικοποίησής τους και στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση συνεργιστικών παραγόντων και
- γ) σε φυτικές επιφάνειες, με την παρακολούθηση της εξέλιξης του φαινομένου σε καρπούς τομάτας.

Από τα παραγόμενα αποτελέσματα θα διερευνηθεί η δυνατότητα χρησιμοποίησής των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* ως μέσο αποτοξικοποίησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις φυτικές επιφάνειες, γεγονός το οποίο θα ενισχύσει

τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων. Επιπλέον, θα διερευνηθεί η επίδραση των επιφυτικών αυτών μικροοργανισμών στα υπολείμματα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στις επιφάνειες των φυτών, γεγονός το οποίο θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων υπολειμμάτων με στόχο τον καθορισμό του χρόνου τελευταίας επέμβασης πριν τη συγκομιδή.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Θρεπτικά υλικά – Αντιδραστήρια

2.1.1 Θρεπτικά Υλικά

Για την απομόνωση, καλλιέργεια και διατήρηση των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, καθώς και για τη διεξαγωγή των πειραμάτων βιοαποδόμησης, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υλικά:

1. Πλήρες θρεπτικό υλικό (*Ustilago Complete Medium- UCM*):

Συστατικά	Περιεκτικότητα
Γλυκόζη	5g
Νουκλεϊνικά οξέα	0,5g
Καζαμινοξέα	3g
Εκχύλισμα ζύμης	1g
Διάλυμα αλάτων	250mL
Διάλυμα βιταμινών	1mL
Άγαρ	15g
Αποσταγμένο νερό	Έως όγκου 1000mL

Η περιεκτικότητα του διαλύματος αλάτων ανά 1000mL αποσταγμένου νερού ήταν:

Συστατικά	Περιεκτικότητα
Νιτρικό αμμώνιο (NH_4NO_3)	12g
Δισόξινο Φωσφορικό Κάλιο (KH_2PO_4)	8g
Θειικό Νάτριο (Na_2SO_4)	2g
Χλωριούχο Κάλιο (KCl)	4g
Ενυδρο Θεϊκό Μαγνήσιο ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1g
Χλωριούχο Ασβέστιο (CaCl_2)	0,5g
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	1,2mL
Απεσταγμένο νερό	Έως όγκου 1000mL

Το διάλυμα ιχνοστοιχείων ανά 300mL αποσταγμένου νερού περιείχε:

Συστατικά	Περιεκτικότητα
Ενυδρο Θεϊκό Μαγγάνιο ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	46mg
Ενυδρος Θεϊκός Ψευδάργυρος ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	65mg
Ενυδρος Θεϊκός Χαλκός ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	60mg
Ενυδρο Μολυβδαινικό Νάτριο ($\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	37,5mg

Η περιεκτικότητα του διαλύματος βιταμινών ανά 100mL αποσταγμένου νερού ήταν:

Συστατικά	Περιεκτικότητα
Θειαμίνη (B1)	20mg
Πανθοθενικό Ασβέστιο	20mg
Βιοτίνη	10mg
Πυριδοξίνη (B6)	10mg
Νιασίνη	20mg
Ινοσιτόλη	200mg

Το θρεπτικό αυτό υλικό χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βιομάζας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* καθώς και για τη μελέτη του ρυθμού αύξησης των ζυμών, χωρίς όμως, την προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και για τη μελέτη της μυκητοτοξικής δράσης των δραστικών ουσιών των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην ανάπτυξη τους. Η προσθήκη ή μη άγαρ καθόριζε το αν το υλικό θα ήταν σε υγρή ή στερεή μορφή.

2. Εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (P.D.A)

Συστατικά	Περιεκτικότητα
Εκχύλισμα πατάτας	200g
Δεξτρόζη	20g
Άγαρ	20g
Αποσταγμένο νερό	1000mL

Το υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση των καλλιεργειών των ζυμών.

3. Υλικό Πειραμάτων Βιοαποδόμησης (ΥΠΒ)

Συστατικά	Περιεκτικότητα
Γλυκόζη	5g
Διάλυμα αλάτων	250mL
Άγαρ	15g
Αποσταγμένο νερό έως όγκου	1000mL

Αποστείρωση για 20 λεπτά.

Το θρεπτικό υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες. Ανάλογα με τον στόχο του πειράματος περιείχε ή όχι γλυκόζη.

Η αποστείρωση όλων των υλικών καλλιέργειας έλαβε χώρα σε κλίβανο υγρής θερμότητας (autoclave) σε συνθήκες θερμοκρασίας 121°C για 20 λεπτά.

2.1.2 Αντιδραστήρια- Αναλυτικά πρότυπα- Διαλύματα

Κατά την πειραματική διαδικασία της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω διαλύτες:

- διχλωρομεθάνιο, ακετόνη, ακετονιτρίλιο, εξάνιο και οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας pesticide residues grade,
- πετρελαϊκός αιθέρας καθαρότητας analytical reagent A.R.,
- μεθανόλη και νερό καθαρότητας LC-MS και
- μυρμηγκικό αμμώνιο (HCCONH₄).

Τα αναλυτικά πρότυπα των δραστικών ήταν όλα γνωστής καθαρότητας και προμηθεύτηκαν από τριεταρείες εμπορίας τους. Συγκεκριμένα, τα chlorpyrifos (98,4%), diazinon (97,5%), lufenuron (99,2%), και teflubenzuron (97%) αγοράστηκαν από την εταιρεία Dr Ehrenstoffer (Augsburg, Γερμανία), όπως και ο μεταβολίτης 2,6-difluorobenzoic acid (99%) και ο συνεργιστικός παράγοντας piperonyl butoxide (92,5%). Οι μεταβολίτες 3,5,6-trichloro-2-pyridinol- TCP (99%), 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol- IMP (99,1%) και 2,6-difluorobenzamide (95%), καθώς και οι συνεργιστικοί παράγοντες triphenyl phosphate (99,5%) και diethyl maleate (95%) αγοράστηκαν από την εταιρεία ChemService (West Chester, Ηνωμένο Βασίλειο).

Πρότυπα διαλύματα: Διαλύματα παρακαταθήκης των προτύπων ουσιών σε συγκεντρώσεις των 1000μg/mL και 10000μg/mL παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη ή ακετόνη (στην περίπτωση του teflubenzuron) και σε συγκέντρωση των 1000μg/mL σε ακετονιτρίλιο και αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Από τα διαλύματα αυτά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κατηγορία πειραμάτων της παρούσας μελέτης.

Διαλύματα για τα βιοχημικά πειράματα: Κατά τη διεξαγωγή των βιοχημικών πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- p-Nitrophenyl acetate (PNPA),
- a-naphthyl acetate,
- b-naphthyl acetate,
- 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate buffer solution- SPB) 100mM, pH 7
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate buffer solution- SPB) 100mM, pH 7,2 + 0,2% Triton

2.2 Βιολογικός παράγοντας

Ως βιολογικοί παράγοντες της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν οι ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*. Η *Rhodotorula glutinis* απομονώθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ζύμη αυτή, η οποία χαρακτηρίστηκε ως Y-44, απεστάλη στο Mycotheque De l' Université Catholique de Louvain (MUCL), όπου και ταυτοποιήθηκε ως *Rhodotorula glutinis* (Καλαγιάννης, 1999). Η ζύμη αυτή απομονώθηκε από την επιφάνεια φυτών τομάτας. Τα φυτά τομάτας προέρχονταν από α) θερμοκηπιακή καλλιέργεια στην Περιοχή της Πρέβεζας, όπου γίνεται συστηματική χημική καταπολέμηση για την αντιμετώπιση ασθενειών και β) από υπαίθριες καλλιέργειες στις περιοχές της Σαλαμίνας και της Τίρυνθας όπου δεν έγινε χρήση χημικών ουσιών (Στεργίου, 2002).

Η ζύμη *Rhodotorula rubra* απομονώθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, από την επιφάνεια φυτών φράουλας.

2.2.1 Καλλιέργεια και διατήρηση μικροοργανισμών

Οι καλλιέργειες των ζυμών αναπτύσσονταν με στόχο την παραγωγή βιομάζας. Κάθε ζύμη καλλιεργούνταν σε διάλυμα με υγρό θρεπτικό υλικό UCM. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνταν σε περιστροφικό αναδευτήρα (orbital incubator) με 150 στροφές ανά λεπτό (rpm) στους 25°C. Η διατήρηση των καλλιεργειών των ζυμών για μεγάλο χρονικό διάστημα πραγματοποιήθηκε με μεταφορές κυττάρων ζύμης σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό υπόστρωμα P.D.A.. Οι σωλήνες τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 23-25°C για 48-72 ώρες. Μετά την ανάπτυξη τους οι καλλιέργειες μεταφέρονταν σε θερμοκρασία 4 °C.

2.2.2 Μελέτη του ρυθμού αύξησης

Ο ρυθμός αύξησης των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* μελετήθηκε έπειτα από ανάπτυξη τους σε υγρό θρεπτικό υλικό UCM, προκειμένου να διαπιστωθεί: (α) ο χρόνος στον οποίο θα πρέπει να μελετηθεί η ευαισθησία των ζυμών στα υπό εξέταση φυτοπροστατευτικά προϊόντα και (β) το απαραίτητο χρονικό διάστημα επώασης των καλλιεργειών, ώστε να αποτελέσουν την πηγή μολύσματος για τα πειράματα βιοαποδόμησης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 2 φορές και χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των ευρεθέντων τιμών.

Εφαρμόστηκε η μέθοδος μέτρησης αριθμού κυττάρων ζύμης, σύμφωνα με την οποία, από την κωνική φιάλη επώασης της καλλιέργειας κάθε ζύμης γίνονταν διαδοχικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αποσταγμένο νερό (0,5mL υγρής καλλιέργειας σε 4,5mL νερό). Ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε μέτρηση προσδιοριζόταν με τη χρήση αιματοκυττόμετρου

ανά δύο ώρες. Ο αριθμός των σπορίων της ζύμης που καταμετρούνταν κάθε φορά εκφραζόταν ανά mL καλλιέργειας με τη βοήθεια της παρακάτω σχέσης:

$$\text{Αριθμός κυττάρων ανά mL} = A \times 3,2 \times 10^4 \times 10^x$$

Όπου *A*: μέτρηση από το αιματοκυττόμετρο και

x: αριθμός αραιώσεων

2.3 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Στην παρούσα εργασία ερευνήθηκε η ικανότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* να αποδομούν τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα diazinon και chlorpyrifos καθώς και τα εντομοκτόνα της κατηγορίας των βενζοϋλουριών lufenuron και teflubenzuron. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί πως οι παραπάνω δραστικές ουσίες επιλέχθηκαν έπειτα από τον πειραματισμό της ευαισθησίας των ζυμών με μια πληθώρα φυτοπροστατευτικών προϊόντων (βλ. Παράρτημα).

Όσον αφορά τα υπό μελέτη φυτοπροστατευτικά προϊόντα, θα ακολουθήσει αναφορά των κυρίων χαρακτηριστικών τους, όπως ο τρόπος και το φάσμα δράσης τους και το πεδίο εφαρμογής τους, σημαντικές φυσικές και χημικές ιδιότητες καθώς και τα πιο αντιπροσωπευτικά από τα σκευάσματα με τα οποία κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά.

2.3.1 Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα

❖ Chlorpyrifos

Το chlorpyrifos (ethyl) [*O,O*-diethyl *O*-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl)-phosphorothiorate] είναι ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα παγκοσμίως στη γεωργική πρακτική. Είναι μη διασυστηματικό εντομοκτόνο και δρα από στομάχου και ασφυκτικά (μέσω αναπνοής). Χρησιμοποιείται τόσο για την καταπολέμηση εντόμων – εχθρών των καλλιεργειών (Orthoptera, Diptera, Homoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera και Hemiptera) με εφαρμογή στο έδαφος ή στο φύλλωμα, όσο και στην καταπολέμηση εντόμων υγειονομικής σημασίας σε κατοικίες (Blattellidae, Muscidae, Isoptera), κουνουπιών (νύμφες και ακμέα) και εκτοπαρασίτων των οικιακών ζώων.

Το chlorpyrifos παρουσιάζει μεγάλο φάσμα δράσης και είναι αποτελεσματικό στην καταπολέμηση εντόμων σε μεγάλο πεδίο καλλιεργειών και καλλωπιστικών φυτών, ενώ επιπλέον εφαρμόζεται με στόχο την απολύμανση αστικών περιοχών και την προστασία της ξυλείας. Δεν παρουσιάζει φυτοτοξικότητα στα περισσότερα είδη φυτών όταν χρησιμοποιείται

σύμφωνα με την εγκεκριμένη Ορθή Γεωργική Πρακτική (ΟΓΠ), με εξαίρεση κάποια καλλωπιστικά (Tomlin, 2003).

Είναι διαθέσιμο στην αγορά σε διάφορα εμπορικά σκευάσματα, όπως Dursban, Pyrifos, Pyrinex, Cyren, Destroyer, Aspida και Pirisip, ο αριθμός των οποίων έχει μειωθεί δεδομένου ότι σε αρκετά έχει ανακληθεί η έγκριση κυκλοφορίας τους. Τα εμπορικά σκευάσματα αυτά κυκλοφορούν σε διάφορες μορφές τυποποίησης όπως κοκκώδη (GR- Granules-), βρέξιμες σκόνες (Wettable Powder-WP), εναιωρήματα μικροκαψυλίων (Capsule Suspension- CS) και γαλακτωματοποιήσιμα εναιωρήματα (Emulsifiable Concentrate- EC) (Agrotypos, 2009).

Το chlorpyrifos έχει μοριακή μάζα (Mw) 350,6 και συντελεστή κατανομής οκτανόλης/ νερού ($k_{ow} \log P$)= 5,267 (De Bruijn et al., 1989). Επίσης παρουσιάζει διαλυτότητα στο νερό 2mg/L και στους οργανικούς διαλύτες αιθανόλη, οξικό αιθυλεστέρα, μεθανόλη και διχλωρομεθάνιο > 45g/100g (Hummel and Crummet, 1964 και Drummond, 1986).

❖ **Diazinon**

Το diazinon, [*O, O-diethyl O-[6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pyrimidinyl]* εστέρας, θεωρείται ευρέως φάσματος οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο και νηματοδοκτόνο. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού εχθρών, όπως κατσαρίδες, ψείρες, νηματώδεις, Diptera που προσβάλλουν καρπούς, μυρμήγκια και γρύλους, ενώ χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στους χλοοτάπητες (Michel et al., 1997). Κατέχει σημαίνων ρόλο στη γεωργία, την κτηνιατρική και την καταπολέμηση των εντόμων σε αστικό περιβάλλον. Είναι μη διασυστηματικό εντομοκτόνο και δρα από στομάχου και ασφυκτικά. Δεν παρουσιάζει φυτοτοξικότητα στα περισσότερα είδη φυτών όταν χρησιμοποιείται σύμφωνα με την εγκεκριμένη Ορθή Γεωργική Πρακτική (ΟΓΠ) (Tomlin, 2003).

Είναι διαθέσιμο στην αγορά σε διάφορα εμπορικά σκευάσματα, όπως Diazinon Ελλαγράφ, Diziktol, Diaziper, Efdiazon, Diamizin, Dion, Diazin κ.ά. (Agrotypos, 2009) και σε διάφορες μορφές σκευάσματος, ενώ σε πολλά από τα κυκλοφορούντα σκευάσματά του έχει πραγματοποιηθεί ανάκληση της έγκρισης κυκλοφορίας τους. Λόγω της ευρείας χρήσεως του diazinon, υπάρχει συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον από ρυθμιστικές αρχές, ερευνητικά κέντρα, και περιβαλλοντολόγους σχετικά με τις αρνητικές επιπτώσεις του.

Το diazinon έχει μοριακή μάζα (Mw) 304,3 και συντελεστή κατανομής οκτανόλης/ νερού ($k_{ow} \log P$)= 3,81 (HHS, 1996). Επίσης παρουσιάζει διαλυτότητα στο νερό 0,06g/L και από τους οργανικούς διαλύτες, στο εξάνιο >200 g/100mL και στη μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο > 900g/100mL (Merck, 1996).

2.3.2 Βενζοϋλουρίες

❖ Lufenuron

Το lufenuron, *(RS)-1-[2,5-dichloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxy)phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea*, είναι εντομοκτόνο το οποίο δρα ως παρεμποδιστής ανάπτυξης, παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση της χιτίνης. Δρα από στομάχου και ασθενώς δι επαφής. Καταπολεμά έντομα όπως Lepidoptera, Coleoptera και Homoptera σε καλλιέργειες μηλοειδών, πυρηνοκάρπων, αμπελιού και κηπευτικών, ενώ εφαρμόζεται και για την αντιμετώπιση των ψείρων στα κατοικίδια ζώα.

Είναι διαθέσιμο στην αγορά σε διάφορα εμπορικά σκευάσματα, όπως Lufox, Control, Lufenuron- Hillfield, Lufenuron- Ανοργκαχήμ, Match, Υpsilon Paron και Zabrin (Agrotypus, 2009) και όλα κυκλοφορούν στη μορφή υγρού γαλακτωματοποιήσιμου σκευάσματος (Emulsion Concentrate-EC).

Το lufenuron έχει μοριακή μάζα (Mw) 511,2 και συντελεστή κατανομής οκτανόλης/ νερού ($k_{ow} \log P$)= 5,12 (FAO, 2008). Επίσης παρουσιάζει διαλυτότητα στο νερό <0,06mg/L στους 25°C και από τους οργανικούς διαλύτες, στο διχλωρομεθάνιο 84g/L, στη μεθανόλη 52g/L και στον οξικό αιθυλεστέρα 330g/L (Tomlin, 2003).

❖ Teflubenzuron

Το teflubenzuron, *1-(3,5-dichloro-2,4-difluorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea*, είναι εντομοκτόνο το οποίο παρουσιάζει όμοιο τρόπο δράσης με το lufenuron, δρα ως παρεμποδιστής ανάπτυξης, παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση της χιτίνης, από στομάχου και ασθενώς δι επαφής. Καταπολεμά έντομα όπως Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera και Homoptera σε καλλιέργειες μηλοειδών, πυρηνοκάρπων, εσπεριδοειδών, αμπελιού, κηπευτικών, καπνού και βαμβακιού. Εφαρμόζεται, επίσης και για την αντιμετώπιση των ψειρών στα κατοικίδια ζώα, μυγών, προνυμφών κουνουπιών καθώς και κάποιων ατελών σταδίων ακριδών. Είναι διαθέσιμο στην αγορά στα εμπορικά σκευάσματα Farmalan 15 EC και Nomolt 15 SC (Agrotypus, 2009).

Το teflubenzuron έχει μοριακή μάζα (Mw) 381,1 και συντελεστή κατανομής οκτανόλης/ νερού ($k_{ow} \log P$)= 4,8. Επίσης παρουσιάζει διαλυτότητα στο νερό 0,019g/L στους 23°C και από τους οργανικούς διαλύτες, στο διχλωρομεθάνιο 1,8g/L, στην αιθανόλη 1,4g/L και στο εξάνιο 0,05g/L (Tomlin, 2003).

2.4 Πειράματα ευαισθησίας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Στα πρώτα στάδια της μελέτης πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση της επίδρασης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αύξηση των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* με στόχο (α) τη διαπίστωση της ύπαρξης ή μη ευαισθησίας των μικροοργανισμών στα δρώντα συστατικά και (β) την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων για το κάθε φυτοπροστατευτικό προϊόν στην οποία θα πραγματοποιηθούν τα πειράματα βιοαποδόμησης.

Η ευαισθησία των δύο ζυμών στα εντομοκτόνα εκτιμήθηκε με πειράματα μυκητοτοξικότητας *in vitro* τα οποία βασίστηκαν στη σύγκριση της ανάπτυξης των ζυμών σε θρεπτικό υλικό στο οποίο είχε προστεθεί φυτοπροστατευτικό προϊόν σε σχέση με την αντίστοιχη σε θρεπτικό υλικό χωρίς την παρουσία φυτοπροστατευτικού προϊόντος (μάρτυρας), με βάση τη μέτρηση αποικιών της ζύμης σε σταθερό θρεπτικό υπόστρωμα. Αιώρημα υγρής καλλιέργειας ζύμης ηλικίας 24 ωρών, κατάλληλης συγκέντρωσης (10^2 κύτταρα/ mL) εμβολιάστηκε σε τρυβλία Petri στο θρεπτικό υλικό των οποίων είχε προηγουμένως προστεθεί το φυτοπροστατευτικό προϊόν. Στη συνέχεια, για χρονική περίοδο 20 περίπου ημερών, ανά 7 ημέρες, πραγματοποιούνταν εκτίμηση της ανάπτυξης των αποικιών της ζύμης στις διάφορες συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών. Η εκτίμηση της ευαισθησίας αποδιδόταν ως % επιβίωση του μάρτυρα.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το UCM, στο οποίο οι ζύμες παρουσιάζουν ταχύτερο ρυθμό αύξησης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, ενώ ο συνολικός όγκος του οργανικού διαλύτη δεν υπερέβαινε το 1% (o/o) του όγκου του θρεπτικού διαλύματος. Για την κατασκευή των καμπυλών μυκητοτοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δρών συστατικό οι συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 100 150 και 200μg/mL σε τρεις επαναλήψεις. Για τις συγκεντρώσεις αυτές κατασκευάστηκαν οι καμπύλες μυκητοτοξικότητας, με βάση τις οποίες υπολογίστηκαν οι τιμές της EC_{50} , που είναι οι συγκεντρώσεις που προκαλούν 50% παρεμπόδιση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, καθώς και η MIC (η ελάχιστη συγκέντρωση του εντομοκτόνου στην οποία επιτυγχάνεται πλήρης παρεμπόδιση της ανάπτυξης των ζυμών).

2.5 Πειράματα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες

Rhodotorula glutinis και *Rhodotorula rubra*

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ελέγχου της ικανότητας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* να αποδομούν τα υπό εξέταση φυτοπροστατευτικά προϊόντα, χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250mL οι οποίες περιείχαν 50mL θρεπτικό υλικό ΥΠΒ.

Προετοιμασία πειραμάτων βιοαποδόμησης

Σε κάθε πειραματική διαδικασία συμμετείχαν 3 κατηγορίες κωνικών φιαλών με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- *μάρτυρας της καλλιέργειας της ζύμης σε υλικό*

Στην κωνική φιάλη είχε προστεθεί μόνο το μόλυσμα της εκάστοτε ζύμης (κύτταρα /mL).

- *μάρτυρας του φυτοπροστατευτικού προϊόντος σε υλικό χωρίς καλλιέργεια ζύμης*

Στην κωνική φιάλη είχε προστεθεί μόνο φυτοπροστατευτικό προϊόν (μg/L).

- *καλλιέργεια ζύμης και φυτοπροστατευτικό προϊόν σε υλικό*

Στην κωνική φιάλη είχε προστεθεί το φυτοπροστατευτικό προϊόν και η εκάστοτε ζύμη.

Εμβολιασμός

Κατά τον εμβολιασμό των κωνικών φιαλών προσθέτονταν φυτοπροστατευτικό προϊόν και κύτταρα της ζύμης στην επιθυμητή συγκέντρωση και στο επιθυμητό μόλυσμα, αντίστοιχα. Το μόλυσμα προέρχονταν από καλλιέργειες των ζυμών στις οποίες είχε προηγηθεί επώαση με το φυτοπροστατευτικό προϊόν για 24 ώρες. Για κάθε κατηγορία εξεταζόμενου δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 3 κωνικές φιάλες και το αποτέλεσμα αποδίδεται ως η μέση τιμή των τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης (relative standard deviation- RSD), ώστε να εξασφαλίζεται η πιστότητα της μεθόδου.

Επώαση

Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνταν σε περιστροφικό αναδευτήρα (Orbital incubator) με 150 στροφές ανά λεπτό (rpm) στους 25°C.

Δειγματοληψία

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν ασηπτικά από κάθε κωνική φιάλη 5mL υγρής καλλιέργειας. Οι δειγματοληψίες ξεκινούσαν από μία ώρα μετά τον εμβολιασμό (0+) και

συνεχίζονταν ανά ημέρα στην περίπτωση του chlorpyrifos, ανά 2 ημέρες για το diazinon και ανά 3 ημέρες για τα lufenuron και teflubenzuron. Ανάλογα τους παράγοντες που εξετάζε το εκάστοτε πείραμα επιλέγονταν και οι κατάλληλοι χρόνοι δειγματοληψίας.

2.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων βιοαποδόμησης εξετάστηκαν οι παρακάτω παράγοντες:

❖ Περιεκτικότητα υλικού σε γλυκόζη

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας θρεπτικό υλικό ΥΠΒ, το οποίο

(α) περιείχε γλυκόζη,

(β) δεν περιείχε γλυκόζη και το φυτοπροστατευτικό προϊόν ήταν η μόνη πηγή άνθρακα.

Η επίδραση της γλυκόζης στη μικροβιακή αποδόμηση διερευνήθηκε ταυτόχρονα με κάθε έναν από τους παράγοντες. Δηλαδή, σε κάθε πείραμα βιοαποδόμησης συμμετείχαν τόσο υγρές καλλιέργειες των ζυμών σε υλικό το οποίο περιείχε γλυκόζη, όσο και καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη, κάτω από τις εκάστοτε συνθήκες πειραματισμού.

❖ Συγκέντρωση φυτοπροστατευτικού προϊόντος

Διατηρώντας σταθερή την πυκνότητα του μολύσματος (10^6 κύτταρα/mL) για κάθε ζύμη, πραγματοποιήθηκε φόρτιση του θρεπτικού υλικού με:

A) 10 και 25 $\mu\text{g/mL}$ για τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα chlorpyrifos και diazinon και

B) 50 και 100 $\mu\text{g/mL}$ για το lufenuron

Γ) 25 και 50 $\mu\text{g/mL}$ για το teflubenzuron.

❖ Πληθυσμιακή πυκνότητα ζύμης

Στη χαμηλότερη συγκέντρωση εμβολιασμού για το κάθε δρων συστατικό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα βιοαποδόμησης για κάθε ζύμη με μολύσματα των 10^2 , 10^4 και 10^6 κύτταρα/mL. Στις περιπτώσεις πληθυσμιακής πυκνότητας των ζυμών της τάξης των 10^2 και 10^4 κύτταρα/mL, οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν για όλα τα εντομοκτόνα ανά 24 ώρες.

❖ Θερμοκρασία επώασης μικροοργανισμών

Στη χαμηλότερη συγκέντρωση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και σε συγκέντρωση μολύσματος 10^6 κύτταρα/mL επαναλήφθηκαν τα πειράματα βιοαποδόμησης κάτω από διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας στον επωαστικό θάλαμο, δηλαδή στους 15°C , 25°C και 35°C .

2.5.2 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε χημικό επίπεδο

Η ικανότητα ή μη των *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* να αποδομούν τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα της μελέτης διερευνήθηκε αρχικά με τη χρήση χρωματογραφίας.

2.5.2.1 Μέθοδος εκχύλισης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από το θρεπτικό υλικό

Από κάθε κωνική φιάλη υγρή καλλιέργειας λαμβάνονταν ασηπτικά 5mL και ακολουθούσε εκχύλιση υγρής- υγρής κατανομής (liquid- liquid extraction). Ο όγκος των 5mL λαμβάνονταν από όλες τις κωνικές φιάλες. Στη συνέχεια το διάλυμα διηθείτο από πτυχωτό ηθμό (φίλτρο) Whatman No2 πάνω από διαχωριστική χοάνη των 100mL. Στη διαχωριστική χοάνη προστίθονταν:

- α) 20mL εξανίου, για την εκχύλιση του chlorpyrifos,
- β) 20 mL μίγματος διχλωρομεθάνιο: ακετόνη (1:1) για την εκχύλιση του diazinon και
- γ) 20mL διχλωρομεθάνιο για την εκχύλιση των lufenuron και teflubenzuron.

Ακολουθούσε ανακίνηση της χοάνης επί ~30s, αφήνονταν να ηρεμήσει και να γίνει ο διαχωρισμός των φάσεων και συλλέγονταν η κάτω φάση σε ογκομετρική φιάλη των 100mL μέσα από χωνί με άνυδρο Na_2SO_4 , το οποίο είχε προηγουμένως διαβραχεί με το διαλύτη εκχύλισης. Το έκλουσμα εξατμίζονταν σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) έως ξηρού και επαναδιαλύονταν σε 2mL μίγματος μεθανόλης / νερού (30 / 70). Στο τελικό έκλουσμα γίνονταν διήθηση μέσα από μεμβρανώδες φίλτρο διαμέτρου πόρων $0,2\mu\text{m}$ πριν από την έγχυσή του στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS. Στα προκαταρκτικά πειράματα βιοαποδόμησης το τελικό έκλουσμα επαναδιαλύθηκε σε μεθανόλη και αναλύθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Δεδομένης της υψηλής συγκέντρωσης των αναλυτών στα δείγματα, σκόπιμο κρίθηκε να πραγματοποιείται αραίωσή τους πριν από την έγχυσή τους στο LC/MS/MS.

2.5.2.2 Ανάπτυξη μεθόδου Χρωματογραφίας Λεπτής στοιβάδας- Thin Layer Chromatography (TLC)

Το τελικό έκλουσμα της μεθόδου αναλύθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με στόχο τη απόκτηση πρώτων οπτικών αποτελεσμάτων σχετικά με την ικανότητα των ζυμών να αποδομούν την υπό εξέταση σε κάθε πείραμα δραστική ουσία καθώς και την πιθανή παραγωγή μεταβολιτών της.

Οι πλάκες λεπτής χρωματογραφίας (TLC) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι Alugram^R Sil G της εταιρείας Macherey- Nagel από υλικό silica gel 60 με πάχος 0,20mm.

Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε για το κάθε φυτοπροστατευτικό προϊόν παρουσιάζεται στο πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1):

Πίνακας 1. Σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography) για τα εντομοκτόνα chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron.

Φυτοπροστατευτικό προϊόν	Σύστημα διαλυτών TLC
Chlorpyrifos	εξάνιο: οξικό αιθυλεστέρας (90: 10)
Diazinon	εξάνιο: ακετόνη (80: 20)
Lufenuron	εξάνιο: οξικό αιθυλεστέρας (70: 30)
Teflubenzuron	εξάνιο: οξικό αιθυλεστέρας (70: 30)

Η οπτική παρατήρηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση λάμπας UV ακτινοβολίας. Η παρατήρηση ενός (ή και περισσότερων) επιπλέον μετώπων στην TLC πλάκα θα αποτελεί μια πιθανή ένδειξη διάσπασης του μορίου του φυτοπροστατευτικού προϊόντος και παραγωγής κάποιου μεταβολίτη του.

2.5.2.3 Ανάπτυξη μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Συζευγμένης Φασματομετρίας Μαζών (LC/MS/MS)

Έπειτα από τον πρώτο ποιοτικό έλεγχο του φαινομένου της βιοαποδόμησης με TLC, ακολούθησε ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή (α) η ταυτοποίηση των παραγόμενων μεταβολιτών, ένδειξη για την ύπαρξη των οποίων έχει προκύψει από την παρατήρηση των πλακών της TLC και (β) η ποσοτική απόδοση της μείωσης της συγκέντρωσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Για τον προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών προϊόντων chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron, καθώς και των μεταβολιτών τους 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP), 2-

isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP), 2,6-difluorobenzoic acid και 2,6-difluorobenzamide, αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τριπλό τετράπολο MS-MS της Varian [2 x prostar 210 (LC) και 1200L (quadrupole MS-MS)], με στήλη Varian Polaris C18-A μήκους 5cm, εσωτερικής διαμέτρου 2mm και μεγέθους σωματιδίων 5μm, η οποία διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($25 \pm 4^{\circ}\text{C}$). Οι διαλύτες του συστήματος κινητής φάσης ήταν:

- Διαλύτης έκλουσης A: μίγμα μεθανόλη/ νερό (10/90) στο οποίο περιέχεται 1mM HCOONH_4 .
- Διαλύτης έκλουσης B: μίγμα μεθανόλη/ νερό (90/10) στο οποίο περιέχεται 1mM HCOONH_4 .

Η ροή των διαλυτών έκλουσης ήταν σταθερή στα 0,25mL/min, ο όγκος έγχυσης στα 5μL (full loop) και το πρόγραμμα έκλουσης των ουσιών το παρακάτω (Πίνακας 2):

Πίνακας 2. Πρόγραμμα έκλουσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron στο LC/MS/MS.

Χρόνος (min)	% Διαλύτης έκλουσης A	% Διαλύτης έκλουσης B
0,00	90,0	10,0
14,00	0,0	100,0
20,00	0,0	100,0
20,12	90,0	10,0
25,00	90,0	10,0

Χαρακτηριστικά συστήματος MS/MS: Ο ανιχνευτής MS ρυθμίστηκε σε τάση 1500V. Η θερμοκρασία της πηγής ιονισμού ήταν 50°C , του αερίου ξήρανσης (άζωτο) 250°C και η πίεση του αερίου ξήρανσης 19psi.

Η πηγή ιονισμού ηλεκτροδιάχυσης (electrospray ionization) επιλέχθηκε ανάλογα με την υπό προσδιορισμό ουσία. Το αέριο εκνέφωσης στο θετικό ιονισμό ήταν άζωτο, ενώ το αντίστοιχο στον αρνητικό ιονισμό αέρας. Η πίεση του αερίου εκνέφωσης και στις δυο περιπτώσεις είχε ρυθμιστεί στα 50psi. Το neddle voltage ήταν 5000V στο ESI(+) και 4500V στο ESI(-) και το spray shield voltage ήταν 600V και -600V, αντίστοιχα.

Ειδικά για τα lufenuron και teflubenzuron οι αρχικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (LC/MS) της Shimantzu. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε αντλία HPLC βαθμωτής έκλουσης τεσσάρων διαλυτών, με διπλή κεφαλή/ εμβόλου (LC-10AD), αυτόματο εισαγωγέα δείγματος με βαλβίδα Rheodyne 7725i όγκου 50μL (SIL-10AD), ανιχνευτής ορατού υπεριώδους διάταξης διόδων (UV-diode array detector, DAD, SPD-

M10AVP) συζευγμένο με τετραπολικό αναλυτή μαζών (quadrupole MS-detector, LCMS-2010A) και πηγή αρνητικού χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI). Ο διαχωρισμός των αναλυτών έγινε με ισοκρατικό σύστημα διαλυτών μεθανόλης: νερού (80:20) σε θερμοστατούμενη αναλυτική στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈ (250 x 4,6mm, 5μm reverse phase C₁₈ narrow-bore column, Discovery, Supelco), με ροή 0,6ml/min και θερμοκρασία στήλης στους 30°C. Οι συνθήκες του MS ήταν: τάση πηγής ιονισμού -4kV, τάση ανιχνευτή 1,5kV, θερμοκρασία πηγής ιονισμού 300°C και ροή φέροντος αερίου (N₂) 2,5 L/min.

2.5.2.4 Επικύρωση μεθόδου εκχύλισης των chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron από το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των ζυμών

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία της μεθόδου προσδιορισμού των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και των μεταβολιτών τους, απαραίτητη κρίθηκε η επικύρωσή της. Για το σκοπό αυτό, σε υγρό θρεπτικό υλικό ΥΠΒ προστέθηκαν γνωστές συγκεντρώσεις από κάθε φυτοπροστατευτικό προϊόν σύμφωνα με τις οδηγίες της SANCO 2007/3131. Τα επίπεδα φόρτισης ήταν κοινά για όλους τους αναλύτες, 0,05μg/mL, 0,1μg/mL και 0,5μg/mL. Από το εμβολιασμένο υλικό αυτό λαμβάνονταν δείγμα των 5mL και ακολουθούσε η διαδικασία της μεθόδου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.2.1. Στη συνέχεια τα δείγματα αναλύονταν στον υγρό χρωματογράφο με τριπλό τετράπολο MS/MS, σύμφωνα με την παράγραφο 2.5.2.3. Ταυτόχρονα στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS αναλύονταν και πρότυπα διαλύματα αναφοράς των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και εφαρμόζοντας την τεχνική του εγκλωβισμού υπολογίζονταν η τιμή της ανάκτησης. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε 5 επαναλήψεις ώστε να παραχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα.

2.6 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε βιοχημικό επίπεδο

Όπως έχει αναφερθεί τα βασικά ενζυμικά συστήματα που εμπλέκονται στην αποτοξικοποίηση των εντομοκτόνων είναι οι εστεράσες, οι μονοξυγονάσες με προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀ και οι μεταφοράσες (ή τρανσφεράσες) της γλουταθειόνης. Για τη μελέτη της επίδρασης των εντομοκτόνων της μελέτης στην ενεργότητα των ενζύμων τροποποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι και τεχνικές που εφαρμόζονται σε αρθρόποδα. Σε επόμενο στάδιο χρησιμοποιήθηκαν οι συνεργιστικοί παράγοντες οι οποίοι παρεμποδίζουν τη δράση των παραπάνω ενζυμικών συστημάτων.

2.6.1 Προσδιορισμός ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης

❖ Προετοιμασία Δείγματος

Ποσότητα 1mL από την υγρή καλλιέργεια της κάθε ζύμης τοποθετούνταν σε eppendorf tube των 1,5mL και ακολουθούσε φυγοκέντριση για 5min στις 5000 στροφές. Το υπερκείμενο απομακρύνονταν και στο ίζημα προστέθηκαν 1mL διαλύματος φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate buffer- SPB) 100mM, pH 7. Ακολουθούσε φυγοκέντριση για 5min στις 5000 στροφές και στη συνέχεια, αφού είχε αφαιρεθεί το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλύονταν σε 0,5mL 100mM διάλυμα SPB pH 7,2 το οποίο περιείχε 0,2% Triton. Με ένα μικρό γουδοχέρι και τη χρήση vortex ακολουθούσε σπάσιμο των κυττάρων.

❖ Μέτρηση πρωτεΐνης

Στα βοηθία μικροπλάκας (96-well plate) τοποθετούνταν διαδοχικά 5 και 10μL δείγματος (σε δύο επαναλήψεις) και ακολουθούσε προσθήκη 300μL διαλύματος Bradford [Bio-rad σε 1:4 H₂O]. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνονταν στο σπεκτροφωτόμετρο στα 595nm στα 2 min (end point), στους 25°C. Στη μικροπλάκα τοποθετούνταν και αντίστοιχη ποσότητα με το δείγμα διαλύματος SPB και 300μL Bradford, ως μάρτυρας (blank). Στις τιμές απορρόφησης που προέκυπταν, αφαιρούνταν η τιμή του μάρτυρα και μετατρέπονταν σε mg/mL πρωτεΐνης (Bradford et al., 1976).

Οι μετρήσεις πρωτεϊνών στα δείγματα καθώς και οι μετρήσεις ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης πραγματοποιήθηκαν με σπεκτροφωτόμετρο SpectraMax M2^e microplate reader (Molecular Devices). Όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τη Sigma (Steinheim, Germany).

2.6.1.1 Μέτρηση ενεργότητας του ενζυμικού συστήματος των μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs)

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας των GSTs χρησιμοποιήθηκαν τα ενζυμικά υποστρώματα CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) και GSH (reduced glutathione) (Roditakis et al., 2009).

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 1000μL, αποτελούμενος από 1,5mg πρωτεΐνης (δείγμα ζύμης), 30μL (0,03mM) GSH, 33μL (0,2mM) CDNB και ρυθμιστικό διάλυμα έως πλήρωσης όγκου 1000μL. Για την παρασκευή του διαλύματος GSH διαλύθηκαν 32,4mg GSH σε 10mL διαλύματος SPB 0,1M, pH 6,5, ενώ για την παρασκευή του διαλύματος CDNB διαλύθηκαν 12,78mg CDNB σε 10mL μεθανόλης. Το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάζονταν από την προσθήκη 500μL CDNB σε 10mL διαλύματος GSH. Οι μετρήσεις στην απορρόφηση έγιναν στο σπεκτροφωτόμετρο στα 340nm κινητικά κάθε 2 λεπτά, στους 25°C.

2.6.1.2 Μέτρηση ενεργότητας του ενζυμικού συστήματος των εστερασών

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας των εστερασών χρησιμοποιήθηκαν τα ενζυμικά υποστρώματα: PNPA (p-Nitrophenyl acetate) και a και b-naphthyl acetate, στις παρακάτω ενζυμικές δοκιμές (Roditakis et al., 2009):

A) PNPA

Σε μικροπλάκα (96 well) προσθέτονταν 0,5mg πρωτεΐνης (δείγματος ζύμης) και 200μL ρυθμιστικού διαλύματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάζονταν προσθέτοντας 20mL διαλύματος phosphate buffer 50mM pH 7,2 σε 100mL διαλύματος paranitrophenol acetate (PNPA) 0,2M (200mM). Το διάλυμα αυτό παρασκευάζονταν λίγο πριν τη χρήση του. Το διάλυμα paranitrophenol acetate (PNPA) 200mM παρασκευάστηκε διαλύοντας 363mg PNPA σε 10mL ακετονιτρίλιο. Στο μάρτυρα αντί για το δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 10μL διαλύματος phosphate buffer pH 7. Ο μάρτυρας στην ουσία αντιπροσωπεύει την υδρόλυση του PNPA απουσίας ενζύμου. Η ενεργότητα των εστερασών μετρήθηκε στο σπεκτροφωτόμετρο στα 405nm για 2min κινητικά, στους 25°C.

B) Naphthyl acetate (general esterases)

Στη συγκεκριμένη ενζυμική δοκιμή εξετάστηκε η ενεργότητα των εστερασών χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα τα a-naphthyl acetate και b-naphthyl acetate ταυτόχρονα σε διαφορετικά βοθρία της μικροπλάκας.

Σε μικροπλάκα (96 well) προσθέτονταν 1mg πρωτεΐνης (δείγματος ζύμης) και 200μL ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο περιείχε ένα από τα δύο υποστρώματα. Τα ρυθμιστικά

διάλυμα παρασκευάζονταν από την προσθήκη 120mL μεθανολικού διαλύματος 30mM a-naphthyl acetate ή b-naphthyl acetate σε 12mL 0,02M διαλύματος SPB pH 7,2. Τα δείγματα αφήνονταν στη μικροπλάκα για 30min και ακολουθούσε προσθήκη 50μL διαλύματος, το οποίο αποτελείτο από 0,023g fast blue διαλυμένα σε 2,25mL απιονισμένου νερού και 5,25mL διαλύματος 5% SDS phosphate buffer. Ακολουθούσε αναμονή για 5min και στη συνέχεια μέτρηση της ενεργότητας των εστερασών στα 570nm στα 2min (end point), στους 25°C.

2.6.1.3 Έλεγχος επίδρασης των εντομοκτόνων στα ενζυμικά συστήματα αποτοξικοποίησης

Προκειμένου να εξετάσουμε την επίδραση των εντομοκτόνων της παρούσας μελέτης (diazinon, chlorpyrifos, lufenuron και teflubenzuron) στην ενεργότητα των GSTs και των εστερασών, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σύμφωνα με τις τεχνικές της προηγούμενης παραγράφου, με προσθήκη, όμως, ενός από τα παραπάνω εντομοκτόνα. Έτσι λοιπόν για τις GSTs εφαρμόστηκε η διαδικασία που έχουμε περιγράψει ήδη, διατηρώντας σταθερούς τους όγκους των GSH, CDNB και του δείγματος της ζύμης και ανάλογα τον όγκο του εντομοκτόνου μεταβάλλονταν ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος έως πλήρωσης τελικού όγκου τα 1000mL. Για τις εστεράσες εφαρμόστηκε η ενζυμική δοκιμή των a και b-naphthyl acetate προσθέτοντας εντομοκτόνο. Στους μάρτυρες προστέθηκε ποσότητα ακετονιτριλίου (το οποίο είναι ο διαλύτης των προτύπων διαλυμάτων των εντομοκτόνων) ίση με τον εκάστοτε όγκο του εντομοκτόνου, ώστε να αποφευχθεί λανθασμένο συμπέρασμα αναστολής της δράσης των ενζύμων από το διαλύτη. Οι συγκεντρώσεις κάθε εντομοκτόνου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Επίπεδα συγκέντρωσης των diazinon, chlorpyrifos, lufenuron και teflubenzuron, τα οποία προστέθηκαν στις ενζυμικές δοκιμές μέτρησης της ενεργότητας των μεταφορασών της γλουταθειόνης και των εστερασών.

Εντομοκτόνο	Συγκέντρωση (μM)
Diazinon	23 - 46 - 59 - 66 και 79
Chlorpyrifos	14,25 - 28,5 - 42,75 και 57
Lufenuron	9,8 - 19,6 - 29,4- και 39,2
Teflubenzuron	13 - 26 - 39 και 52

2.6.1.4 Διερεύνηση της κινητικής της παρεμπόδισης των ενζυμικών συστημάτων αποτοξικοποίησης

Για το εντομοκτόνο diazinon και το συνεργιστικό παράγοντα diethyl maleate έγινε προσπάθεια διερεύνησης της κινητικής της παρεμπόδισης των GSTs και κατά συνέπεια του τρόπου πρόσδεσης στο ένζυμο, σύμφωνα με το μοντέλο Michaelis- Menten. Για το λόγο αυτό (και σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο μέτρησης της ενεργότητας των GSTs) διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του δείγματος (ομογενοποιημάτος), του υποστρώματος CDNB και του εντομοκτόνου- ή- του συνεργιστή, προσθέσαμε διαδοχικά αυξανόμενες ποσότητες του υποστρώματος GSH καταγράφοντας σε κάθε περίπτωση τις τιμές της ενεργότητας. Στη συνέχεια επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία αυξάνοντας τη συγκέντρωση του αναστολέα (εντομοκτόνου ή συνεργιστή). Το σύνολο των τιμών τοποθετήθηκε σε σύστημα ορθογωνίων αξόνων ώστε να διαπιστωθεί εάν παρατηρείται συναγωνιστική ή μη συναγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ παρεμποδιστή και υποστρώματος ως προς το ένζυμο. Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το εντομοκτόνο chlorpyrifos. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο μέτρησης της ενεργότητας των εστερασών με τα υποστρώματα a & b-naphthyl acetate, όπου διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του δείγματος (ομογενοποιημάτος) και του εντομοκτόνου- ή- του συνεργιστή, προσθέσαμε διαδοχικά αυξανόμενες ποσότητες των υποστρωμάτων a ή b-naphthyl acetate καταγράφοντας σε κάθε περίπτωση τις τιμές της ενεργότητας.

2.6.2 Χρήση συνεργιστών στα πειράματα βιοαποδόμησης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι συνεργιστικοί παράγοντες αναστέλλουν την αποτοξικοποίηση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων παρεμποδίζοντας τη δράση του υπεύθυνου για αυτή ενζυμικού συστήματος.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι συνεργιστικοί παράγοντες:

- A) **triphenyl phosphate**, ο οποίος παρεμποδίζει τη δράση του ενζυμικού συστήματος των εστερασών,
- B) **piperonyl butoxide**, ο οποίος παρεμποδίζει κυρίως τη δράση των μονοξυγονασών, που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀ και
- Γ) **diethyl maleate**, ο οποίος παρεμποδίζει είτε τη δράση των μονοξυγονασών, είτε το ενζυμικό σύστημα των μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs).

2.6.2.1 Πειράματα ευαισθησίας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στους συνεργιστικούς παράγοντες triphenyl phosphate, piperonyl butoxide και diethyl maleate

Προκειμένου να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση κάθε συνεργιστή για τα πειράματα βιοαποδόμησης, πραγματοποιήθηκε η διεξαγωγή πειραμάτων ευαισθησίας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στους παραπάνω συνεργιστές. Στα πειράματα αυτά ακολουθήθηκε τη μεθοδολογία της παραγράφου 2.4, με τη χρήση θρεπτικού υλικού UCM και η παρατήρηση ύπαρξης ή μη ευαισθησίας των ζυμών στα δρώντα συστατικά βασίστηκε στη σύγκριση της ανάπτυξή τους σε θρεπτικό υλικό στο οποίο είχε προστεθεί ο εκάστοτε συνεργιστής σε σχέση με την ανάπτυξή τους σε θρεπτικό υλικό χωρίς προσθήκη συνεργιστή. Τα αποτελέσματα βασίστηκαν στη μέτρηση αποικιών της ζύμης σε σταθερό θρεπτικό υπόστρωμα, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4. Οι συγκεντρώσεις κάθε συνεργιστή ήταν: 1, 5, 10 και 15μg/mL.

2.6.2.2 Πειράματα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* με προσθήκη συνεργιστικού παράγοντα

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα βιοαποδόμησης σύμφωνα με τη μεθοδολογία η οποία έχει ήδη αναπτυχθεί (παράγραφος 2.5), κατά τα οποία στις υγρές καλλιέργειες ανάπτυξης των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* εκτός του υπό μελέτη φυτοπροστατευτικού προϊόντος προστέθηκε και συνεργιστικός παράγοντας.

Κατά τη χρησιμοποίηση των συνεργιστών ακολουθήθηκε η παρακάτω σειρά: Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το triphenyl phosphate, έτσι ώστε εάν παρατηρηθεί παρεμπόδιση του φαινομένου της βιοαποδόμησης να θεωρηθεί πως το εμπλεκόμενο ενζυμικό σύστημα είναι εκείνο των εστερασών. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη του piperonyl butoxide, ώστε στην περίπτωση αυτή η μη παρατήρηση βιοαποδόμησης του φυτοπροστατευτικού προϊόντος να «ενοχοποιήσει» τη δράση των ενζυμικών συστημάτων των μονοξυγονασών που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀. Τελευταίο χρησιμοποιήθηκε το diethyl maleate, ώστε εάν δεν παρατηρηθεί βιοαποδόμηση της δραστικής ουσίας παρουσία του, τότε το ενζυμικό σύστημα είναι μεταφορασών της γλουταθειόνης να θεωρηθεί «υπεύθυνο».

2.7 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε καρπούς τομάτας

Με στόχο τη παρακολούθηση της εξέλιξης της βιοαποδόμησης σε φυτικές επιφάνειες, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε καρπούς τομάτας. Οι καρποί προέρχονταν από φυτά ποικιλίας Noa από θερμοκήπιο στην περιοχή Ωρωπού Αττικής, είχαν συγκομιστεί λίγο πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων και δεν είχαν συντηρηθεί σε ψυγείο για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Σύμφωνα με τη μεθοδολογία των πειράματων αυτών, αρχικά οι καρποί καθαρίζονταν επιφανειακά με νερό βρύσης και σαπούνι και αφήνονταν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια κάθε καρπός απολυμαίνονταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 95% και τοποθετούνταν σε χάρτινες θήκες. Ακολουθούσε ψεκασμός των καρπών με τα κύτταρα της εκάστοτε ζύμης σε συγκέντρωση 10^8 κύτταρα/mL, δηλαδή 10^{10} κύτταρα/100mL και μία ημέρα αργότερα πραγματοποιήθηκε ψεκασμός με το υπό μελέτη φυτοπροστατευτικό προϊόν σε συγκεντρώση 2mg/kg και όγκο ψεκαστικού υγρού 500mL.

Οι καρποί χωρίζονταν σε δύο ομάδες. Η πρώτη αντιστοιχούσε στην επέμβαση του μάρτυρα στην οποία είχε γίνει μόνο ψεκασμός με το δρων συστατικό και η δεύτερη σε αυτή όπου είχε γίνει ψεκασμός τόσο του εντομοκτόνου όσο και των κυττάρων της ζύμης. Η κάθε ομάδα αποτελούνταν από 5 καρπούς. Οι χάρτινες θήκες με τους καρπούς τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών σε θερμοκρασία 20°C, φωτοπερίοδο 12 ωρών και υψηλή σχετική υγρασία. Δειγματοληψίες για τους καρπούς πραγματοποιήθηκαν στους παρακάτω χρόνους:

1^η Δειγματοληψία: για τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (chlorpyrifos και diazinon) στις 5 ημέρες και για τις βενζοϋλουρίες στις 3 ημέρες για το lufenuron και 1 ημέρα για το teflubenzuron.

2^η Δειγματοληψία: για όλα τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα στο χρόνο αναμονής από την τελευταία επέμβαση στη συγκομιδή (PreHarvest Interval- PHI), όπως αναγράφεται στο έντυπο της έγκρισης κυκλοφορίας των σκευασμάτων για την καλλιέργεια της τομάτας. Τα εγκεκριμένα προϊόντα στα οποία βασιστήκαμε ήταν το Dursban 75 WG (chlorpyrifos 75% β/β), το οποίο έχει έγκριση κυκλοφορίας στην καλλιέργεια της τομάτας με PHI στις 30 ημέρες, το Diazinon- Ινάγκρο 40 WP (diazinon 40% β/β) με PHI στις 20 ημέρες, το Match 5 EC (lufenuron 5% β/ο) με PHI στις 7 ημέρες και τέλος, το Farmalan 15 SC (teflubenzuron 15% β/ο) με PHI στις 3 ημέρες.

Οι καρποί τομάτας απομακρύνονταν από το θάλαμο, ομογενοποιούνταν ανά κατηγορία και αποθηκεύονταν σε καταψύκτη στους -20°C.

2.7.1 Μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε καρπούς τομάτας

Με στόχο τον προσδιορισμό υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων χρειάστηκε να αναπτυχθούν δύο μεθοδολογίες εκχύλισης, η μία για τον προσδιορισμό των chlorpyrifos και diazinon και η δεύτερη για τον προσδιορισμό των lufenuron και teflubenzuron. Ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων όλων των ουσιών πραγματοποιήθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS. Πρωτίστως απαραίτητη κρίθηκε η επικύρωση των αναλυτικών αυτών μεθόδων.

2.7.1.1 Μεθοδολογία εκχύλισης chlorpyrifos και diazinon από δείγματα καρπών τομάτας

Σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 250mL ζυγίζονται $15 \pm 0,15$ g δείγματος. Προστίθενται 30mL ακετόνη και ακολουθεί ανάδευση για 1min σε ομογενοποιητή ultraturrax σε μεσαία ταχύτητα (13500 στροφές/ min). Στη συνέχεια προστίθενται 30mL διχλωρομεθάνιο και 30mL πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C και ακολουθεί νέα ανάδευση για 1min. Ακολουθεί φυγοκέντριση του δείγματος για 2min στις 4000 rpm. 15mL από το υπερκείμενο υγρό συλλέγονται και εξατμίζονται έως ξηρού σε υδατόλουτρο στους 65-70 °C (Bilthoven, 1996). Το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 3mL μεθανόλη: νερό (30:70) και αναλύεται χρωματογραφικά στο σύστημα LC/MS/MS.

2.7.1.2 Μεθοδολογία εκχύλισης lufenuron και teflubenzuron από δείγματα καρπών τομάτας

Σε δοχείο του omni mixer ζυγίζονται 50g δείγματος και ομογενοποιούνται με 100mL οξικού αιθυλεστέρα και 50g άνυδρου θειϊκού νατρίου σε ομογενοποιητή στις 6000 στροφές για 3min. Το διάλυμα αφήνεται να ηρεμήσει για 2min. Το υπερκείμενο υγρό διηθείται σε ογκομετρικό κύλινδρο μέσα από φίλτρο Whatman No2 στο οποίο έχουν προστεθεί 10g άνυδρου θειϊκού νατρίου. 50mL από το διήθημα μεταφέρονται σε σφαιρική φιάλη των 250mL και ακολουθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) υπό συνθήκες χαμηλής πίεσης στους 40°C. Το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 5mL εξάνιο σε λουτρό υπερήχων για 30sec και 1mL από το διάλυμα μεταφέρεται σε ενεργοποιημένο φυσίγγιο silica για καθαρισμό του δείγματος.

Το φυσίγγιο silica τοποθετείται στο κάτω μέρος υάλινης σύριγγας των 10mL μέσω ενός συνδετή Teflon. Εξισορροπείται το φυσίγγιο silica με 10mL εξάνιο και απομακρύνεται το εξάνιο. Διαβιβάζεται στο φυσίγγιο 1mL από το διάλυμα του δείγματος και 5mL εξανίου. Το

κλάσμα αυτό απομακρύνεται. Οι βενζοϋλουρίες εκλύονται από το φυσίγγιο με 2 mL διχλωρομεθάνιο: 2-προπανόλη (9:1). Το έκλουσμα που συλλέγεται εξατμίζεται έως ξηρού σε ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύεται σε 1mL μεθανόλη. Το μεθανολικό διάλυμα διηθείται μέσα από συριγγα με 0,2μm μεμβρανώδες φίλτρο σε φιαλίδιο υγρού χρωματογράφου και ακολουθεί χρωματογραφική ανάλυση στο σύστημα LC/MS/MS.

2.7.1.3 Χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων καρπών τομάτας

Τα δείγματα καρπών τομάτας αναλύθηκαν χρωματογραφικά με υγρή χρωματογραφία συζευγμένης φασματομετρίας μαζών με στόχο τον προσδιορισμό υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου έχουν αναφερθεί στο κεφάλαιο 2.4.2.2.

2.7.1.4 Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε καρπούς τομάτας

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό και τον έλεγχο της ανάκτησης των αναλυτών από εκχυλίσματα φυτικών υποστρωμάτων, έγιναν φορτίσεις δειγμάτων τομάτας με τα 4 εντομοκτόνα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν καρποί τομάτας βιολογικής καλλιέργειας, οι οποίοι αφού ομογενοποιήθηκαν, εκχυλίστηκαν και καθαρίστηκαν σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, αναλύθηκαν χρωματογραφικά προκειμένου να αποκλεισθεί η επίδραση του μάρτυρα. Σε υποδείγματα έγινε εμβολιασμός με τις υπό μελέτη ουσίες, σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων και για κάθε επίπεδο φόρτισης χρησιμοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις. Τα επίπεδα φόρτισης για το chlorpyrifos και diazinon ήταν 0,05mg/kg και 0,1mg/kg. Όσον αφορά τις βενζοϋλουρίες, η αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού τους επικυρώθηκε σε δύο χρωματογραφικά συστήματα: στο HPLC/DAD/APCI/MS σε επίπεδα για το lufenuron 0,2mg/kg και 1mg/kg και για το teflubenzuron 0,5mg/kg και 1mg/kg και στο LC/MS/MS στα 0,05mg/kg και 0,1mg/kg και για τις δύο ουσίες.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μελέτη του ρυθμού αύξησης των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* σε τεχνητό θρεπτικό υλικό

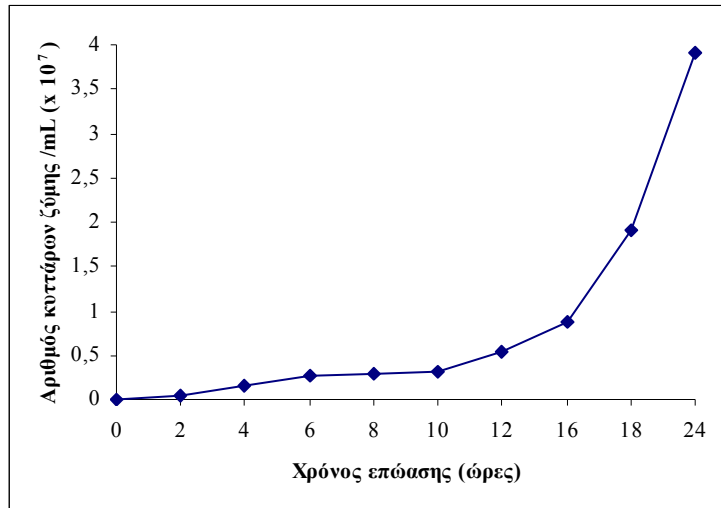
Ως σημείο εκίνησης της μελέτης μας διερευνήθηκε ο ρυθμός αύξησης των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* σε θρεπτικό υλικό. Για τον σκοπό αυτό, στο θρεπτικό υλικό UCM και χωρίς προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης, προσδιορίστηκε η καμπύλη αύξησης των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* σε σχέση με το χρόνο επώασής τους. Τα πείραματα πραγματοποιήθηκαν 2 φορές και χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή των ευρεθέντων τιμών.

Η αύξηση της ζύμης *Rhodotorula glutinis* μελετήθηκε με τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων της και προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Αριθμός κυττάρων ζύμης *Rhodotorula glutinis* κατά τη διάρκεια επώασης της σε θρεπτικό υλικό UCM στους 25°C και η μέση τιμή αυτών όπως προέκυψαν από τις 2 επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν.

Ώρες	Αριθμός κυττάρων		
	1 ^η Μέτρηση	2 ^η Μέτρηση	Μέση Τιμή
0	10^2	10^2	10^2
2	$3,52 \times 10^5$	$3,71 \times 10^5$	$3,62 \times 10^5$
4	$1,72 \times 10^6$	$1,55 \times 10^6$	$1,64 \times 10^6$
6	$2,82 \times 10^6$	$2,41 \times 10^6$	$2,62 \times 10^6$
8	$3,27 \times 10^6$	$2,39 \times 10^6$	$2,83 \times 10^6$
10	$4,06 \times 10^6$	$2,40 \times 10^6$	$3,23 \times 10^6$
12	$6,18 \times 10^6$	$4,74 \times 10^6$	$5,46 \times 10^6$
14	$9,05 \times 10^6$	$7,87 \times 10^6$	$8,46 \times 10^6$
16	$7,04 \times 10^6$	$1,04 \times 10^7$	$8,72 \times 10^6$
18	$1,86 \times 10^7$	$1,98 \times 10^7$	$1,92 \times 10^7$
24	$5,32 \times 10^7$	$2,52 \times 10^7$	$3,92 \times 10^7$

Διαγραμματικά οι τιμές του Πίνακα 4 παρουσιάζονται στο σχήμα που ακολουθεί:



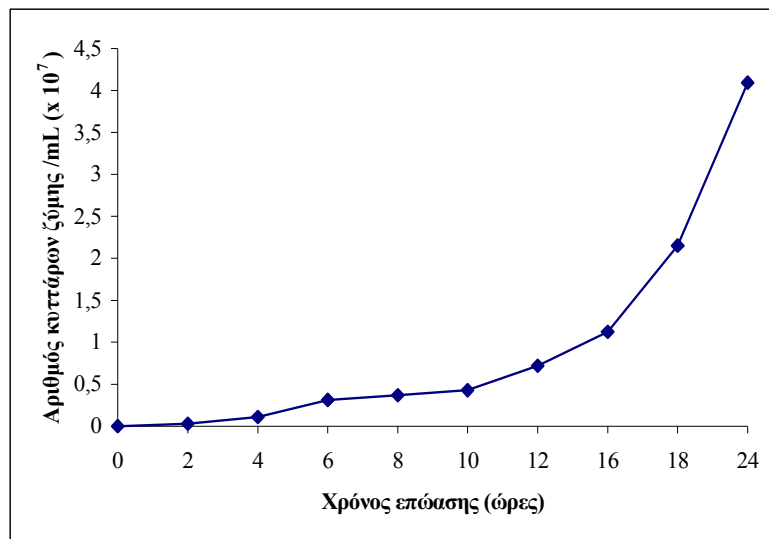
Σχήμα 13. Ρυθμός αύξησης της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε θρεπτικό υλικό UCM στους 25°C όπως προσδιορίστηκε από τη μεταβολή του αριθμού κυττάρων της ζύμης. Οι τιμές είναι η μέση τιμή 2 επαναλήψεων.

Ακολουθώντας όμοια μεθοδολογία, αποκτήθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα (Πίνακας 5) όσον αφορά την αύξηση της με τη *Rhodotorula rubra*.

Πίνακας 5. Αριθμός κυττάρων ζύμης *Rhodotorula rubra* κατά τη διάρκεια επώασης της σε θρεπτικό υλικό UCM στους 25°C και η μέση τιμή αυτών όπως προέκυψαν από τις 2 επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν.

Ωρες	Αριθμός κυττάρων		
	1 ^η Μέτρηση	2 ^η Μέτρηση	Μέση Τιμή
0	10 ²	10 ²	10 ²
2	2,82 x 10 ⁵	3,071 x 10 ⁵	2,946 x 10 ⁵
4	1,05 x 10 ⁶	1,12 x 10 ⁶	1,085 x 10 ⁶
6	3,04 x 10 ⁶	3,24 x 10 ⁶	3,14 x 10 ⁶
8	3,57 x 10 ⁶	3,79 x 10 ⁶	3,68 x 10 ⁶
10	4,23 x 10 ⁶	4,33 x 10 ⁶	4,28 x 10 ⁶
12	6,63 x 10 ⁶	7,74 x 10 ⁶	7,185 x 10 ⁶
14	9,11 x 10 ⁶	9,87 x 10 ⁶	9,49 x 10 ⁶
16	1,04 x 10 ⁷	1,21 x 10 ⁷	1,125 x 10 ⁷
18	1,86 x 10 ⁷	2,44 x 10 ⁷	2,15 x 10 ⁷
24	5,32 x 10 ⁷	2,867 x 10 ⁷	4,094 x 10 ⁷

Διαγραμματικά οι τιμές του Πίνακα 5 παρουσιάζονται στο σχήμα που ακολουθεί:



Σχήμα 14. Ρυθμός αύξησης της ζύμης *Rhodotorula rubra* σε θρεπτικό υλικό UCM στους 25°C όπως προσδιορίστηκε από τη μεταβολή του αριθμού κυττάρων της ζύμης. Οι τιμές είναι η μέση τιμή δυο επαναλήψεων.

Από τις καμπύλες αύξησης των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* (Σχήματα 13 και 14) με βάση τη μεταβολή του αριθμού των κυττάρων τους, διαπιστώνεται ότι η φάση υστέρησης της ανάπτυξής τους διαρκεί περίπου 8-10 ώρες. Κατόπιν, εισέρχονται στη λογαριθμική - εκθετική φάση, η οποία διαρκεί περισσότερο από 24 ώρες από την έναρξη της επώασης τους.

Η μελέτη της ευαισθησίας των εν λόγω ζυμών στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα της παρούσας μελέτης θα πραγματοποιηθεί έπειτα από την πάροδο 24 ωρών επώασης τους σε υγρό θρεπτικό υλικό UCM στους 25°C. Επιλέχτηκε το υλικό αυτό γιατί οι ζύμες παρουσίασαν με βάση τις συγκεκριμένες μετρήσεις ομοιόμορφο ρυθμό ανάπτυξης.

Αξίζει να αναφερθεί πως έγινε προσπάθεια μέτρησης της αύξησης και των δύο ζυμών με μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας με φάσματα υπεριώδους - ορατού για την εφαρμογή του νόμου των Beer και Lambert. Το έντονο χρώμα ρόδινης χρωστικής στα κυτταρικά τοιχώματα των κυττάρων, όμως, εμπόδιζε τον ακριβή υπολογισμό του πληθυσμού των κυττάρων των ζυμών. Η διαδικασία αυτή θα έπρεπε ίσως να διεξαχθεί σε νωρίτερο χρόνο ανάπτυξης, ίσως στις 16 ώρες, πριν εμφανιστεί η έντονη χρωστική στα κύτταρα των δύο ζυμών.

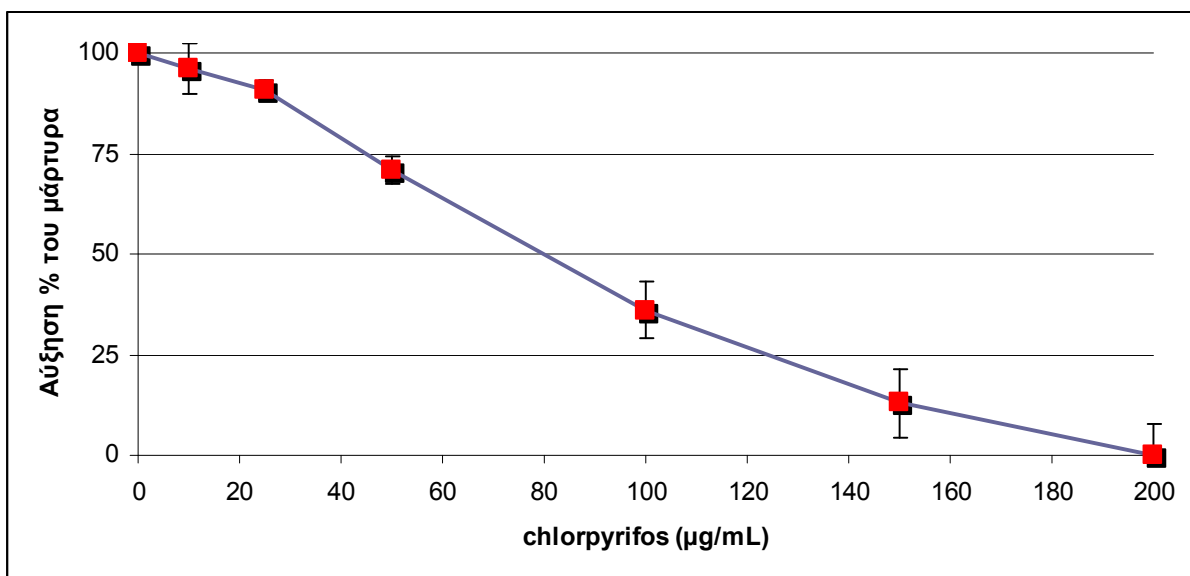
3.2 Διερεύνηση της ικανότητας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στην αποδόμηση του chlorpyrifos

3.2.1 Ευαισθησία των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στο chlorpyrifos

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων θα παρουσιαστούν ανά μικροοργανισμό:

❖ *Rhodotorula glutinis*

Η ευαισθησία της *Rhodotorula glutinis* σε διάφορες συγκεντρώσεις του chlorpyrifos παρουσιάζεται στην παρακάτω καμπύλη μυκητοτοξικότητας (Σχήμα 15).

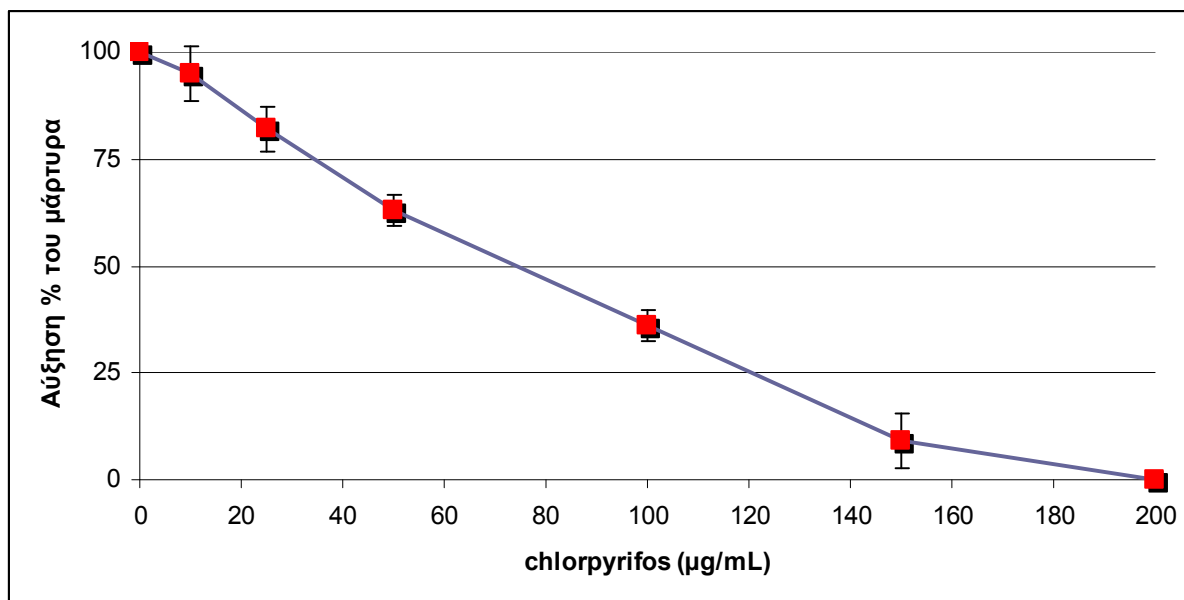


Σχήμα 15. Ευαισθησία της ζύμης *Rhodotorula glutinis* στο chlorpyrifos σε υλικό UCM έπειτα από 14 ημέρες επώασης στους 25°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων.

Όπως παρατηρείται δεν παρουσιάστηκε ουσιαστική παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της ζύμης έως και της συγκέντρωσης των 25μg/mL. Στα 50μg/mL η επιβίωση ήταν εξίσου αυξημένη (71% του μάρτυρα), αλλά παρατηρήθηκε καθυστέρηση στην εμφάνιση του ρόδινου χρώματος των αποικιών και στην αύξηση του μεγέθους τους. Έντονη ήταν η παρεμπόδιση σε συγκεντρώσεις υψηλότερες των 100μg/mL. Η τιμή της EC₅₀ υπολογίστηκε στα 80μg/mL, ενώ στα 200μg/mL παρατηρήθηκε πλήρης παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της ζύμης.

❖ *Rhodotorula rubra*

Όμοια, η ευαισθησία της *Rhodotorula rubra* στο chlorpyrifos παρουσιάζεται στην αντίστοιχη καμπύλη μυκητοτοξικότητας (Σχήμα 16).



Σχήμα 16. Ευαισθησία της ζύμης *Rhodotorula rubra* στο chlorpyrifos σε υλικό UCM έπειτα από 14 ημέρες επώασης στους 25°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων.

Η *Rhodotorula rubra*, παρουσιάστηκε λίγο περισσότερο ευαίσθητη στο chlorpyrifos από ότι η *Rhodotorula glutinis*, κυρίως στις υψηλές συγκεντρώσεις. Παρατηρήθηκε μείωση στο μέγεθος των αποικιών, η οποία δεν ανακτήθηκε σε σχέση με το μάρτυρα έως και μετά από 20 ημέρες. Η τιμή της EC_{50} υπολογίστηκε στα 78μg/mL, ενώ στα 200μg/mL παρατηρήθηκε πλήρης παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της ζύμης.

Δεδομένου, συνεπώς, τι έως και τη συγκέντρωση των 25μg/mL chlorpyrifos δεν παρουσιάζεται σημαντική παρεμπόδιση στην αύξηση και των δύο ζυμών, το φαινόμενο της βιοαποδόμησης του chlorpyrifos θα μελετηθεί στις συγκεντρώσεις των 10 και 25μg/mL.

3.2.2 Αποτελέσματα διερεύνησης της βιοαποδόμησης του chlorpyrifos από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* σε χημικό επίπεδο

Έπειτα από τον εμβολιασμό υγρών καλλιεργειών 24 ωρών των υπό εξέταση ζυμών με το δρων συστατικό chlorpyrifos και την επώασή τους, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες και το τελικό έκλουσμα αναλύθηκε αρχικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και στη συνέχεια σε υγρή χρωματογραφία μάζας με τριπλό τετράπολο (LC/MS/MS).

3.2.2.1 Μέθοδος ανίχνευσης του chlorpyrifos και του μεταβολίτη 3,5,6- trichloro-2-pyridinol (TCP) με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας- Thin Layer Chromatography (TLC)

Η TLC παρείχε τα πρώτα θετικά αποτελέσματα σχετικά με την ικανότητα των δύο ζυμών να αποδομούν το chlorpyrifos. Η ανάλυση του τελικού εκλούσματος, το οποίο προέρχονταν από κωνική φιάλη που περιείχε καλλιέργεια της *Rhodotorula glutinis* 7 ημερών και chlorpyrifos, έδωσε την υποψία για την παραγωγή κάποιου μεταβολίτη. Μια πρώτη ταυτοποίηση του μεταβολίτη αυτού ως το 3,5,6-trichloro-2-pyridinol πραγματοποιήθηκε τρέχοντας στην ίδια πλάκα TLC το τελικό έκλουσμα με υποψία βιοαποδόμησης και πρότυπα διαλύματα του chlorpyrifos και του 3,5,6-trichloro-2-pyridinol και συγκρίνοντας τα ύψη ανίχνευσής τους, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3. Διαπιστώνεται ότι εφαρμόζοντας το σύστημα διαλυτών εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας (90: 10) πραγματοποιήθηκε επιτυχής ανίχνευση και των δύο ουσιών.

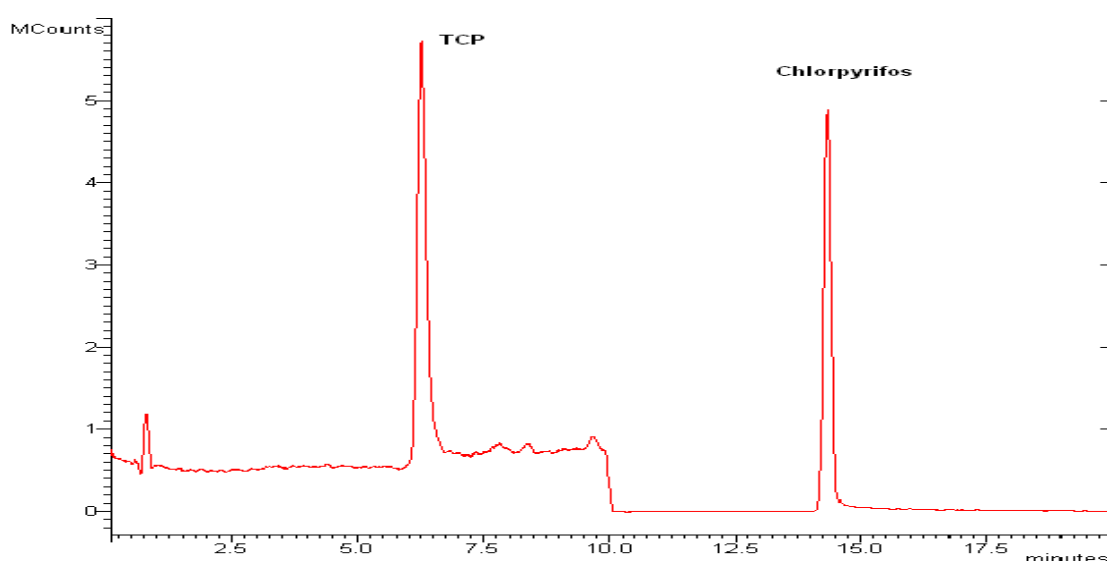


Εικόνα 3. Ανίχνευση των ουσιών chlorpyrifos και 3,5,6-trichloro-2-pyridinol με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) έπειτα από επώαση της ζύμης *Rhodotorula glutinis* με chlorpyrifos σε υλικό ΥΠΒ για 7 ημέρες.

Η κωνική φιάλη ανάπτυξης της *Rhodotorula rubra* με chlorpyrifos έδωσε όμοια εικόνα κατά την ανάλυση του εκλούσματος της με TLC.

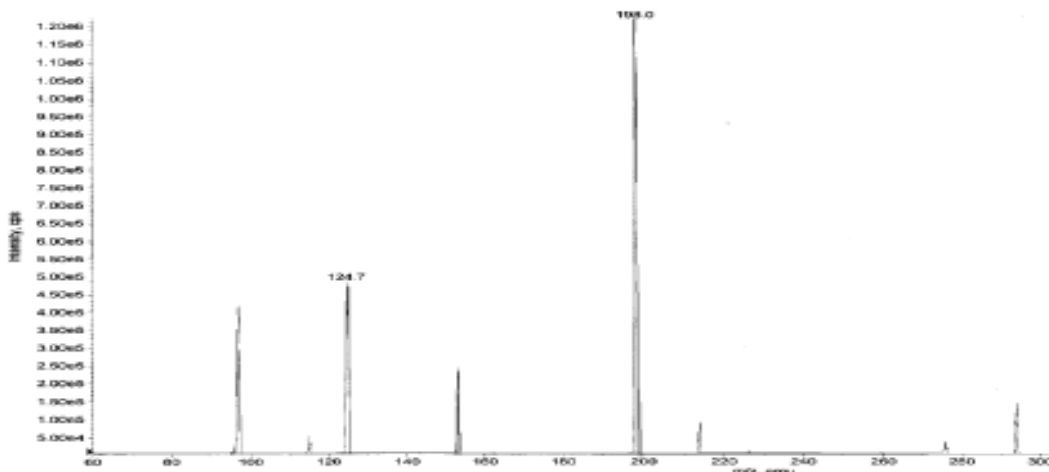
3.2.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού του chlorpyrifos και του μεταβολίτη 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) με υγρή χρωματογραφία συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (LC/MS/MS)

Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός του chlorpyrifos και του 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) με το χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS ήταν επιτυχής. Για τον προσδιορισμό του chlorpyrifos εφαρμόστηκε ESI(+) (θετικός ιονισμός), ενώ για τον προσδιορισμό του μεταβολίτη 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) ESI(-) (αρνητικός ιονισμός). Στο ίδιο χρωματογράφημα δηλαδή (Σχήμα 17) προσδιορίστηκαν και οι δυο αναλύτες με εναλλαγή της μορφής ιονισμού. Η τεχνική αυτή μπορεί να θεωρηθεί καινοτόμος.



Σχήμα 17. Προσδιορισμός του chlorpyrifos και του μεταβολίτη του 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) με εφαρμογή εναλλαγής μορφής ιονισμού, ESI(+) για το chlorpyrifos και ESI(-) για το 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS.

Ο προσδιορισμός της ταυτότητας των ουσιών και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους πραγματοποιήθηκε με βάση την τεχνική συζευγμένης φασματομετρίας μαζών, με τη χρήση μεταπτώσεων (προδρόμου – παραγόμενου ιόντος) (Multiple Reaction Monitoring-MRMs). Το φάσμα του chlorpyrifos παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 18. Φάσμα του εντομοκτόνου chlorpyrifos στο LC/MS/MS.

Οι χρόνοι κατακράτησης των δύο ουσιών, οι μεταπτώσεις προσδιορισμού τους, η ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy), η σχετική ένταση μεταπτώσεων καθώς και η τάση τριχοειδούς (capillary) παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Χρόνοι κατακράτησης των chlorpyrifos και 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP), κύρια θραύσματα, ενέργεια θραυσματοποίησης (V), σχετική ένταση μεταπτώσεων και τάση τριχοειδούς. Με έντονη γραφή παρουσιάζονται τα ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για ποσοτικό προσδιορισμό.

Ουσία	Χρόνος κατακράτησης (min)	Μεταπτώσεις (MRMs)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (collision energy) (V)	Σχετική ένταση μεταπτώσεων (% της βασικής μετάπτωσης)	Τάση τριχοειδούς (capillary) (V)
TCP	6,2	196 > 196	5	89,1	30
		198 > 198		100	
		200 > 200		27,5	
Chlorpyrifos	14,3	350 > 125	20	80,5	21
		350 > 198		100	
		352 > 125		80,5	
		352 > 200		81,5	

Η ταυτοποίηση (confirmation) των αναλυτών βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησής τους και στην αναλογία ποιοτικών και ποσοτικών ιόντων, όπως αναφέρεται στο έγγραφο SANCO 2007/3131. Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών, πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση με ένα αναλυτικό πρότυπο (single peak calibration) το οποίο δεν παρουσίαζε απόκλιση πάνω από $\pm 20\%$. Σύμφωνα με τη SANCO, η συγκεκριμένη μέθοδος ποσοτικοποίησης θεωρείται πολύ ακριβής στην ανάλυση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Ποσοτικά ιόντα θεωρήθηκαν εκείνα που παρουσίασαν την υψηλότερη αναλογία σήματος/ θόρυβο (S/N- Signal/ Noise ratio) και παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα με έντονη γραφή.

3.2.2.3 Έλεγχος καταλληλότητας της μεθόδου

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με την ανάλυση δειγμάτων θρεπτικού υλικού ΥΠΒ φορτισμένων με chlorpyrifos και TCP και την εκτίμηση των βασικών παραμέτρων, της ορθότητας, της πιστότητας και της ευαισθησίας της μεθόδου. Η ορθότητα ελέγχθηκε με τον υπολογισμό της ανάκτησης (recovery) των αναλυτών στα επιλεγμένα επίπεδα συγκεντρώσεων, η πιστότητα με τη μέτρηση της σχετικής τυπικής απόκλισης (Relative Standard Deviation- RSD) και τέλος, η ευαισθησία της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό των ορίων ποσοτικού προσδιορισμού (Limits of Quantification –LOQs). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από τη σύγκριση της επιφάνειας των κορυφών των δρώντων συστατικών στο εμβολιασμένο δείγμα με τις αντίστοιχες επιφάνειες σε δύο διαλύματα αναλυτικών προτύπων. Η τιμή της επιφάνειας στο δείγμα εγκλωβίστηκε ανάμεσα στις αντίστοιχες των προτύπων διαλυμάτων, έτσι ώστε να μη διαφέρουν στη συγκέντρωση πάνω από 20% από την κάθε μία. Δεν χρησιμοποιήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 7. Ανακτήσεις, σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) και σήμα προς θόρυβο (S/N) για τις ουσίες chlorpyrifos και 3,5,6-trichloro-2-pyridinol έπειτα από τον εμβολιασμό θρεπτικού υλικού ΥΠΒ με κάθε ουσία σε συγκεντρώσεις 0,05, 0,1 και 0,5μg/mL σε 5 επαναλήψεις.

Ουσία	C (μg/mL)	Μέση Ανάκτηση (%)	RSD (%)	S/N ratio
Chlorpyrifos	0,05	78,6	13,0	45
	0,1	84,4	10,4	68
	0,5	88,7	9,3	64
TCP	0,05	82,3	6,4	25
	0,1	89,6	7,8	35
	0,5	95,3	11,2	42

Τόσο οι τιμές των ανακτήσεων όσο και οι τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων είναι αποδεκτές σύμφωνα με τη SANCO 2007/3131, κατά την οποία οι αποδεκτές ανακτήσεις πρέπει να βρίσκονται εντός του εύρους 70-110% και οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης να είναι μικρότερες ή ίσες του 20%. Ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου (Limit of Quantification, LOQ) θεωρήθηκε το χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης στο οποίο είχαμε αποδεκτές τιμές ανακτήσεων και σχετικών τυπικών αποκλίσεων, δηλαδή το 0,05μg/mL. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Limit of Detection, LOD) υπολογίστηκε ως τρεις φορές χαμηλότερο από το LOQ (LOQ = 3 x LOD), δηλαδή το 0,02μg/mL.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την αξιοπιστία και την καταλληλότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό του chlorpyrifos και του μεταβολίτη TCP από το ΥΠΒ.

3.2.2.4 Βιοαποδόμηση του chlorpyrifos από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* σε συνάρτηση του χρόνου επώασης των καλλιέργειών και του μεγέθους του μολύσματος

Η επίδραση της πληθυσμιακής πυκνότητας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στην ικανότητά τους να αποδομούν το chlorpyrifos μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τη χαμηλή συγκέντρωση 10μg/mL του δρώντος συστατικού. Χρησιμοποιήθηκαν μολύσματα ζύμης 10²κύτταρα/mL, 10⁴κύτταρα/mL και 10⁶κύτταρα/mL. Ταυτόχρονα διερευνήθηκε και η επίδραση της γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό.

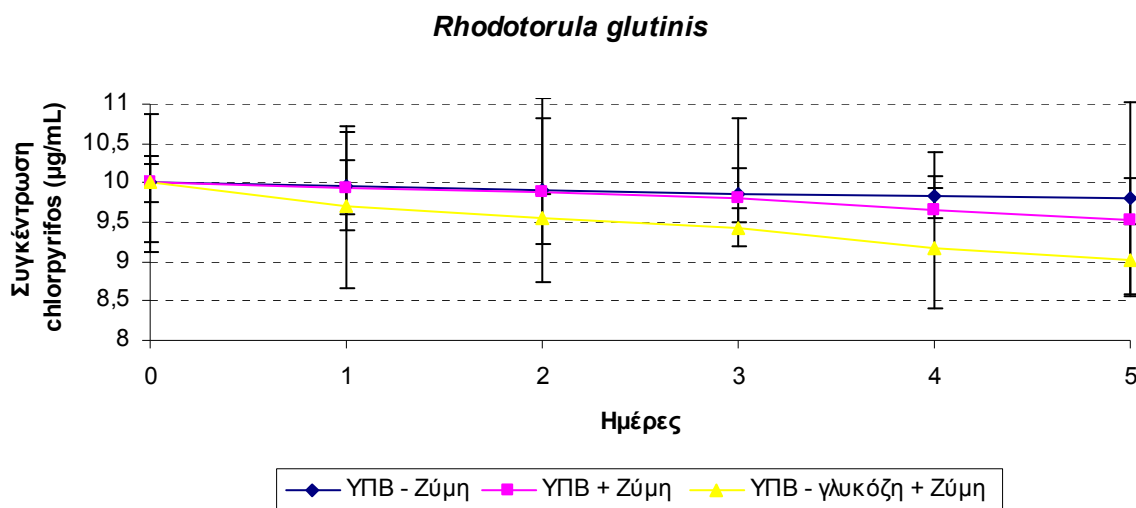
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται αρχικά στους πίνακες που ακολουθούν και στη συνέχεια απεικονίζονται στα αντίστοιχα σχήματα.

- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10² κύτταρα/mL – φόρτιση chlorpyrifos 10μg/mL

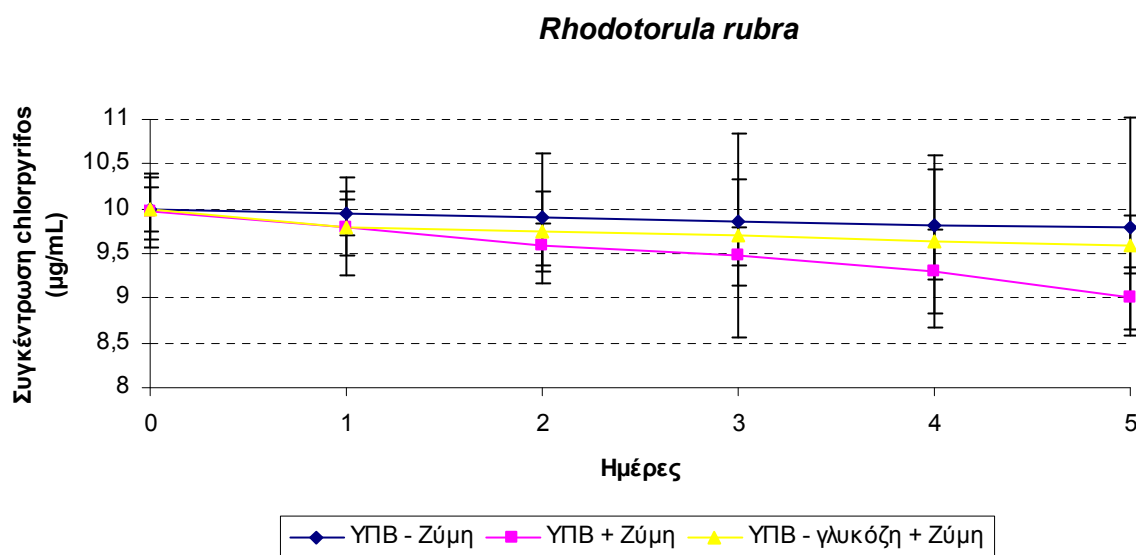
Τα αποτελέσματα από τη χρήση καλλιέργειας ζύμης με πληθυσμό 10² κύτταρα/mL παρουσιάζονται στον πίνακα και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

Πίνακας 8. Αποδόμηση του chlorpyrifos από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10² κύτταρα/mL ζύμης και 10μg/mL chlorpyrifos. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση του chlorpyrifos ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση chlorpyrifos (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)		
	ΥΠΒ – Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη	(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη
<i>Rhodotorula glutinis</i>			
0+	10 ± 3,53	10 ± 7,48	10 ± 4,32
1	9,97 ± 2,45	9,96 ± 6,33	9,8 ± 10,65
2	9,9 ± 7,32	9,92 ± 5,22	9,79 ± 3,43
3	9,85 ± 4,89	9,82 ± 11,87	9,72 ± 2,56
4	9,82 ± 6,3	9,77 ± 10,89	9,64 ± 8,34
5	9,8 ± 12,44	9,72 ± 3,02	9,53 ± 5,05
<i>Rhodotorula rubra</i>			
0+	10 ± 10,43	10 ± 4,21	10 ± 2,44
1	9,97 ± 2,95	9,92 ± 3,22	9,8 ± 5,67
2	9,9 ± 12,07	9,8 ± 2,35	9,75 ± 4,56
3	9,85 ± 10,79	9,74 ± 3,44	9,7 ± 11,86
4	9,82 ± 4,68	9,7 ± 5,07	9,64 ± 10,04
5	9,8 ± 7,66	9,5 ± 3,93	9,6 ± 3,47



Σχήμα 19. Μείωση επιπέδων του chlorpyrifos από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^2 κύτταρα/mL ζύμης και $10\mu\text{g/mL}$ chlorpyrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.



Σχήμα 20. Μείωση επιπέδων του chlorpyrifos από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^2 κύτταρα/mL ζύμης και $10\mu\text{g/mL}$ chlorpyrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Όπως παρατηρείται υπάρχει σταδιακή μικρή μείωση των επιπέδων του chlorpyrifos και στις τρεις επεμβάσεις. Η μείωση αυτή αποδίδεται στην αβιοτική υδρόλυση στο υδατικό διάλυμα αλάτων (θρεπτικό υλικό ΥΠΒ). Συνεπώς, η πληθυσμιακή πυκνότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* της τάξης των 10^2 κυττάρων/mL δεν ήταν ικανή για να μειώσει τα επίπεδα του chlorpyrifos στη συγκέντρωση των $10\mu\text{g/mL}$ σε χρόνο επώασης 5 ημερών. Προφανώς για την εμφάνιση του φαινομένου της βιοαποδόμησης απαιτείται περισσότερος των 5 ημερών χρόνος επώασης.

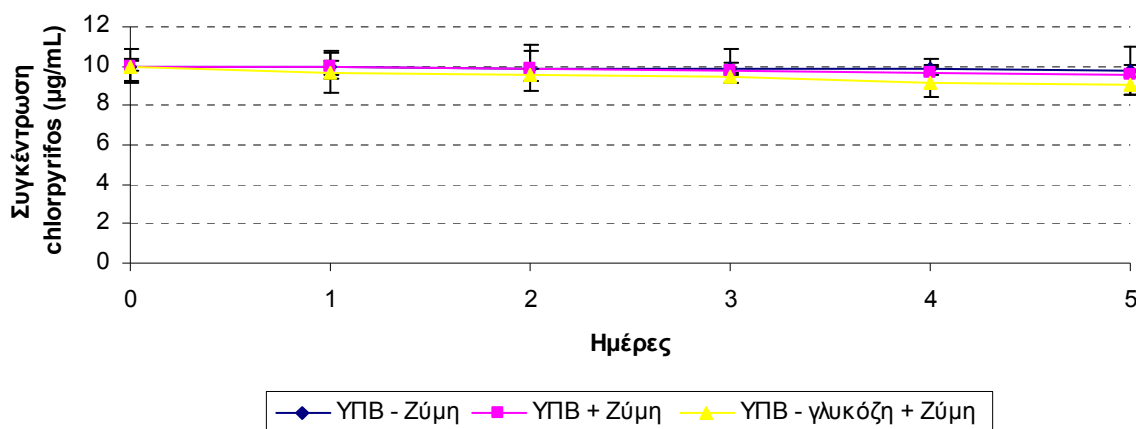
- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10^4 κύτταρα/ mL – φόρτιση chlorpyrifos 10 μ g/mL

Τα αποτελέσματα από τη χρήση καλλιέργειας ζύμης με πληθυσμό 10^4 κύτταρα/mL παρουσιάζονται στον πίνακα και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

Πίνακας 9. Αποδόμηση του chlorpyrifos από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και 10 μ g/mL chlorpyrifos. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση του chlorpyrifos ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

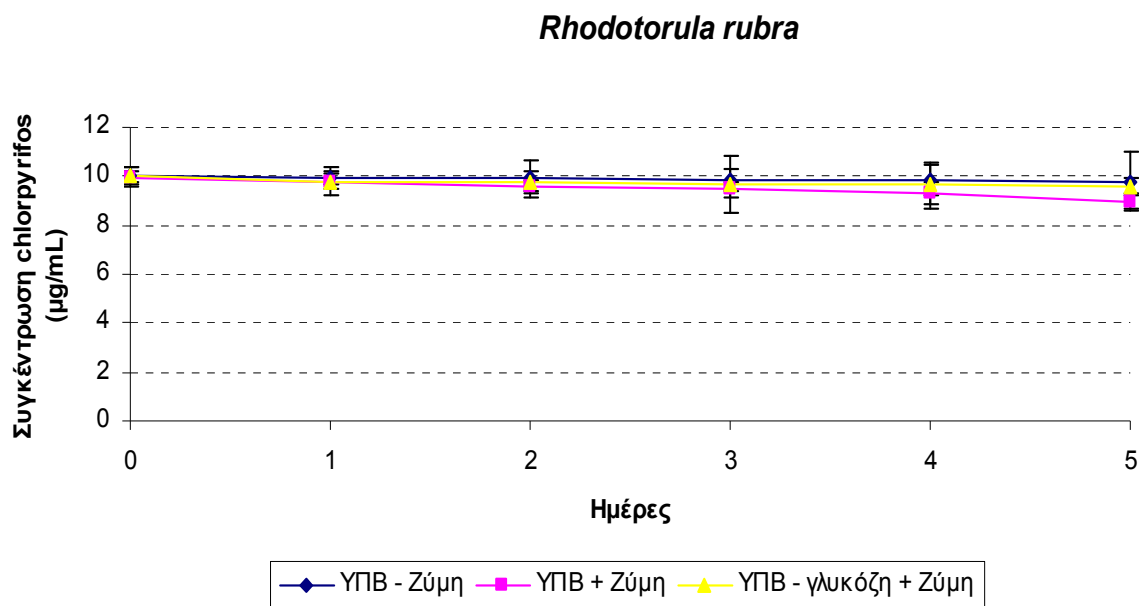
Ημέρες	Συγκέντρωση chlorpyrifos (μ g/mL) \pm Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)		
	ΥΠΒ - Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη	(ΥΠΒ - γλυκόζη) + Ζύμη
<i>Rhodotorula glutinis</i>			
0+	9,99 \pm 2,34	10 \pm 3,46	9,93 \pm 8,7
1	9,95 \pm 3,43	9,93 \pm 7,17	9,7 \pm 6,84
2	9,9 \pm 2,33	9,87 \pm 9,72	9,54 \pm 11,68
3	9,86 \pm 11,78	9,8 \pm 10,53	9,5 \pm 12,4
4	9,81 \pm 3,44	9,64 \pm 7,89	9,17 \pm 6,51
5	9,8 \pm 2,78	9,53 \pm 5,67	9,07 \pm 8,54
<i>Rhodotorula rubra</i>			
0+	9,99 \pm 2,34	9,98 \pm 7,46	9,94 \pm 4,87
1	9,95 \pm 3,43	9,8 \pm 4,07	9,7 \pm 3,84
2	9,9 \pm 2,33	9,6 \pm 10,97	9,43 \pm 5,68
3	9,86 \pm 11,78	9,47 \pm 2,26	9,24 \pm 11,04
4	9,81 \pm 3,44	9,3 \pm 3,09	9,07 \pm 5,61
5	9,8 \pm 2,78	9,0 \pm 9,33	8,88 \pm 3,54

Rhodotorula glutinis



Σχήμα 21. Μείωση επιπέδων του chlorpyrifos από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και 10 μ g/mL chlorpyrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Στην πληθυσμιακή πυκνότητα της *Rhodotorula glutinis* των 10^4 κύτταρα/mL παρατηρήθηκε διαφορετική εξέλιξη του φαινομένου στις φιάλες που περιείχαν θρεπτικό υλικό με γλυκόζη σε σχέση με τις αντίστοιχες με υλικό χωρίς γλυκόζη. Στο θρεπτικό υλικό με γλυκόζη δεν παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του chloryrifos σε σχέση με το μάρτυρα έως και την 3^η με 4^η ημέρα, ενώ στη συνέχεια διαπιστώθηκε πολύ μικρή μείωση. Αντίθετα, στο θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη παρατηρήθηκε μείωση της αρχικής συγκέντρωσης του chloryrifos από τη 2^η ημέρα του πειράματος. Στο τέλος των μετρήσεων (5^η ημέρα) παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του chloryrifos κατά 8,66% της αρχικής χορηγηθείσας ποσότητας, ποσοστό το οποίο θεωρείται σχετικά χαμηλό. Επιπλέον, δεν ανιχνεύτηκε κάποιο προϊόν διάσπασης του chloryrifos. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει μια πρώτη ένδειξη σχετικά με την επίδραση του μεγέθους του μολύσματος της ζύμης *Rhodotorula glutinis* και του θρεπτικού υλικού (με ή χωρίς γλυκόζη) στη μικροβιακή αποδόμηση του chloryrifos.



Σχήμα 22. Μείωση επιπέδων του chloryrifos από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και $10\mu\text{g/mL}$ chloryrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Στην πληθυσμιακή πυκνότητα της ***Rhodotorula rubra*** των 10^4 κύτταρα/mL παρατηρήθηκε μικρή μείωση στην αρχική συγκέντρωση του chlopyrifos από τη 2^η ημέρα του πειράματος και στα δύο είδη θρεπτικού υλικού. Η μείωση αυτή συνεχίστηκε έως και την 5^η ημέρα, τελευταία δειγματοληψία. Στο τέλος των μετρήσεων παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του chlopyrifos κατά 9,8% της αρχικής χορηγηθείσας ποσότητας στο θρεπτικό υλικό που περιείχε γλυκόζη και 10,7% στο υλικό χωρίς γλυκόζη, ενώ δεν ανιχνεύτηκε κάποιο προϊόν διάσπασης του chlopyrifos. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτουν, όπως και στην περίπτωση της *Rhodotorula glutinis*, οι πρώτες ενδείξεις σχετικά με την επίδραση του μεγέθους του μολύσματος της ζύμης στη μικροβιακή αποδόμηση του chlopyrifos, καθώς και το ότι η *Rhodotorula rubra* παρουσιάζει όμοια δράση και στα δύο είδη θρεπτικού υλικού (με ή χωρίς γλυκόζη).

- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10^6 κύτταρα/mL – φόρτιση chlorpyrifos 10μg/mL

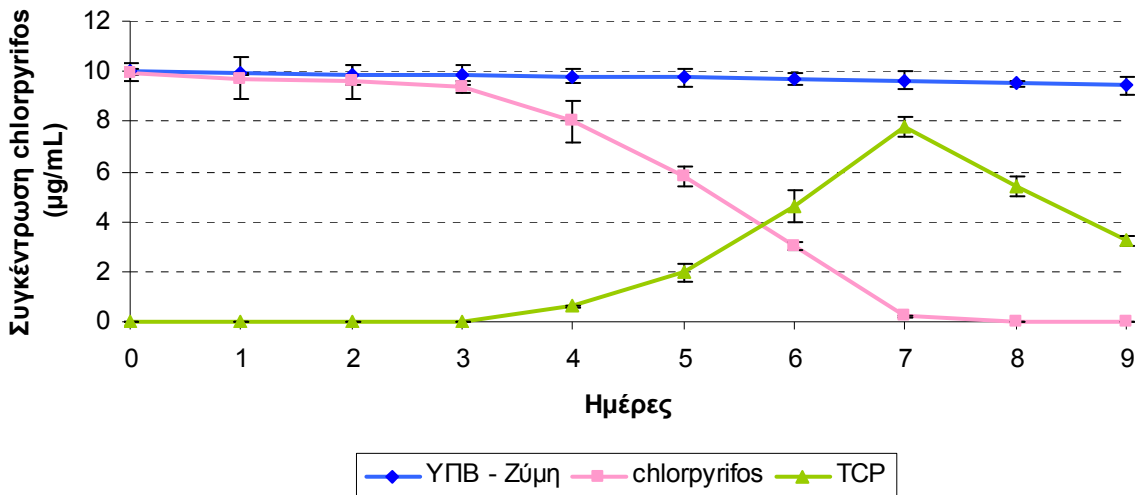
Έπειτα από επώαση καλλιεργειών των ζυμών αρχικής πληθυσμιακής πυκνότητας 10^6 κύτταρα/mL με 10μg/mL chlorpyrifos στο θρεπτικό υλικό παρατηρήθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 10 και τα σχήματα 23 έως 26.

Πίνακας 10. Αποδόμηση του chlorpyrifos από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 10μg/mL chlorpyrifos. Παραγωγή μεταβολίτη TCP. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των chlorpyrifos και TCP ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) chlorpyrifos και TCP ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)				
	ΥΠΒ – Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη		(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη	
		Chlorpyrifos	TCP	Chlorpyrifos	TCP
<i>Rhodotorula glutinis</i>					
0+	9,99 ± 7,23	9,97 ± 3,33	MA	9,98 ± 1,97	MA
1	9,9 ± 5,49	9,73 ± 8,26	MA	8,47 ± 3,92	0,08 ± 4,39
2	9,87 ± 3,79	9,6 ± 7,20	MA	6,04 ± 6,24	0,73 ± 12,07
3	9,85 ± 4,08	9,4 ± 2,59	MA	4,62 ± 9,07	2,45 ± 8,53
4	9,8 ± 11,12	8 ± 10,37	0,6 ± 9,31	3,21 ± 9,14	4,27 ± 6,07
5	9,74 ± 8,43	5,8 ± 6,63	1,97 ± 7,54	1,33 ± 7,53	6,24 ± 4,23
6	9,7 ± 9,54	3,04 ± 4,62	4,63 ± 8,39	0,27 ± 2,64	7,23 ± 5,39
7	9,65 ± 6,07	0,2 ± 5,69	7,79 ± 4,78	MA	5,03 ± 3,72
8	9,5 ± 12,00	MA	5,43 ± 7,32	MA	2,64 ± 6,09
9	9,42 ± 7,62	MA	3,24 ± 5,65	MA	2,01 ± 7,54
<i>Rhodotorula rubra</i>					
0+	9,99 ± 7,23	10 ± 7,87	MA	10 ± 6,44	MA
1	9,9 ± 5,49	8,74 ± 10,34	0,1 ± 13,55	9,03 ± 11,65	0,07 ± 9,23
2	9,87 ± 3,79	6,23 ± 2,92	0,98 ± 12,43	6,98 ± 9,31	0,84 ± 12,4
3	9,85 ± 4,08	3,74 ± 3,56	2,47 ± 9,46	4,04 ± 3,67	1,98 ± 8,92
4	9,8 ± 11,12	1,12 ± 4,87	4,54 ± 5,68	2,24 ± 5,36	2,73 ± 7,32
5	9,74 ± 8,43	MA	6,22 ± 5,08	0,07 ± 11,79	4,09 ± 6,23
6	9,7 ± 9,54	MA	4,97 ± 6,78	MA	3,74 ± 5,26
7	9,65 ± 6,07	MA	3,67 ± 7,89	MA	2,87 ± 6,34
8	9,5 ± 12,00	MA	3,07 ± 7,09	MA	2,04 ± 7,55
9	9,42 ± 7,62	MA	1,05 ± 11,87	MA	1,99 ± 9,38

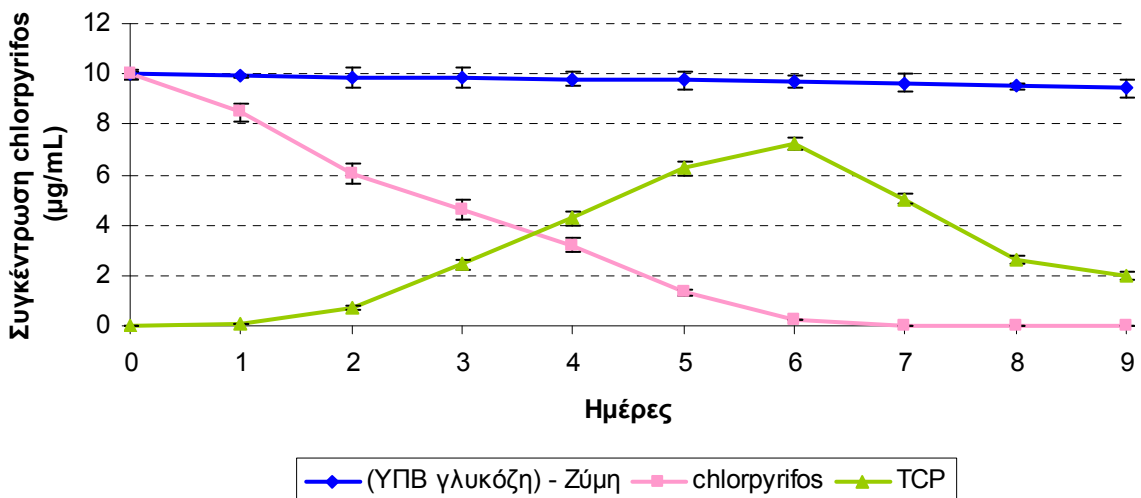
MA: Μη Ανιχνεύσιμα υπολείμματα

Rhodotorula glutinis - Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 23. Μείωση επιπέδων του chlorpyrifos από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 10µg/mL chlorpyrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula glutinis - Υλικό χωρίς γλυκόζη

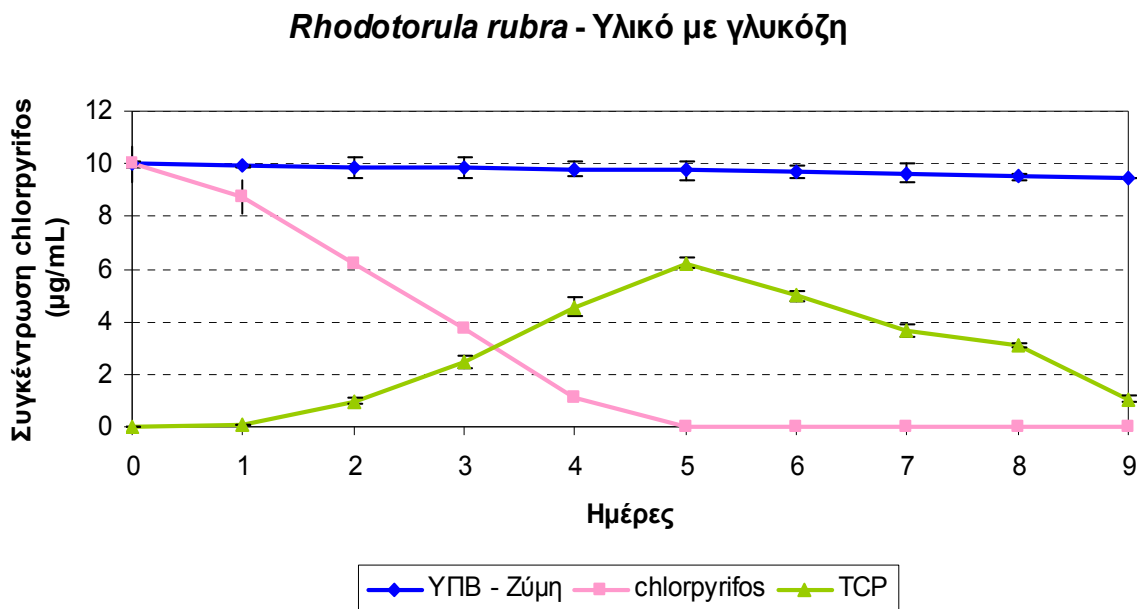


Σχήμα 24. Μείωση επιπέδων του chlorpyrifos από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 10µg/mL chlorpyrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα και όσον αφορά τη *Rhodotorula glutinis*, παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό δεν πραγματοποιήθηκε σχεδόν καθόλου αποδόμηση του chlorpyrifos κατά τις 3 πρώτες ημέρες του πειράματος. Μετά την 3^η ημέρα, όμως, η συγκέντρωση του μειώθηκε και τα αποθέματα του εξαντλήθηκαν ταχύτατα κατά την 7^η προς 8^η ημέρα. Έπειτα από την 3^η ημέρα ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης TCP, τα επίπεδα του οποίου παρουσίασαν μέγιστο την 7^η ημέρα (7,79µg/mL). Από την επόμενη ακριβώς

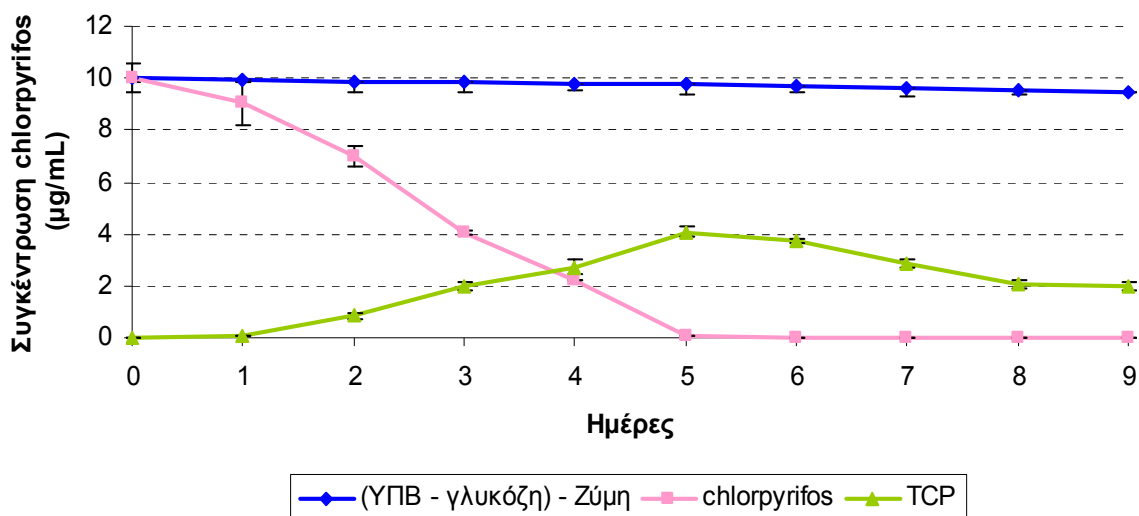
ημέρα παρατηρήθηκε συνεχής μείωση τους, φτάνοντας το 41,6% της μέγιστης τιμής στην τελευταία δειγματοληψία (9^η ημέρα). Στο θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει γλυκόζη η μικροβιακή αποδόμηση του chlorpyrifos ξεκίνησε από τη 1^η ημέρα του πειράματος και ολοκληρώθηκε την 7^η ημέρα όπου δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα chlorpyrifos. Από την 1^η ημέρα ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης TCP, τα επίπεδα του οποίου παρουσίασαν μέγιστο την 6^η ημέρα (7,23μg/mL). Από την επόμενη ακριβώς ημέρα παρατηρήθηκε συνεχής μείωση τους, φτάνοντας το 27,8% της μέγιστης τιμής στην τελευταία δειγματοληψία (9^η ημέρα).

Η μείωση της συγκέντρωσης του μεταβολίτη TCP είναι ενδεικτική της ικανότητας της ζύμης *Rhodotorula glutinis* να αποδομεί εκτός του μητρικού μορίου και το μεταβολίτη του TCP.



Σχήμα 25. Μείωση επιπέδων του chlorpyrifos από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 10μg/mL chlorpyrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula rubra - Υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 26. Μείωση επιπέδων του chlorpyrifos από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YGPB (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 10µg/mL chlorpyrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Όσον αφορά τη *Rhodotorula rubra*, στο θρεπτικό υλικό με γλυκόζη η αποδόμηση του chlorpyrifos ξεκίνησε από την 1^η ημέρα του πειράματος και τα αποθέματά του εξαντλήθηκαν έως και την 5^η ημέρα. Από την 2^η δειγματοληψία επίσης ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης TCP. Τα επίπεδα του TCP άγγιζαν το μέγιστό τους την 5^η ημέρα και ήταν της τάξης των 6,22µg/mL. Από την επόμενη ακριβώς ημέρα παρατηρήθηκε συνεχής μείωση τους, φτάνοντας το 16,88% της μέγιστης τιμής στην τελευταία δειγματοληψία (9^η ημέρα). Στο θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη, στο οποίο το chlorpyrifos παρέχεται στη ζύμη ως η μόνη πηγή άνθρακα, η αποδόμηση του chlorpyrifos ξεκίνησε από την 1^η ημέρα του πειράματος (2^η δειγματοληψία) και τα αποθέματά του εξαντλήθηκαν έως και την 6^η ημέρα. Από την 2^η δειγματοληψία επίσης ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης TCP. Τα επίπεδα του TCP άγγιζαν το μέγιστό τους την 5^η ημέρα και ήταν της τάξης των 4,09µg/mL, τιμή χαμηλότερη της αντίστοιχης στο υλικό με γλυκόζη και στη συνέχεια μειώθηκαν. Η μείωση της συγκέντρωσης του μεταβολίτη TCP, η οποία λαμβάνει χώρα έπειτα από την πλήρη διάσπαση του chlorpyrifos, υποδηλώνει την ικανότητα της ζύμης *Rhodotorula rubra* να αποδομεί και το μεταβολίτη TCP.

Από τη σύγκριση των παραπάνω διαγραμμάτων διαπιστώνουμε πως η προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό ως επιπλέον πηγή άνθρακα δεν επηρέασε την ικανότητα της ζύμης *Rhodotorula rubra* να αποδομεί το chlorpyrifos. Μικρή υπεροχή στη δράση της παρατηρήθηκε στην περίπτωση του θρεπτικού υλικού με γλυκόζη.

3.2.2.5 Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του chlorpyrifos στο ρυθμό αποδόμησής του από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

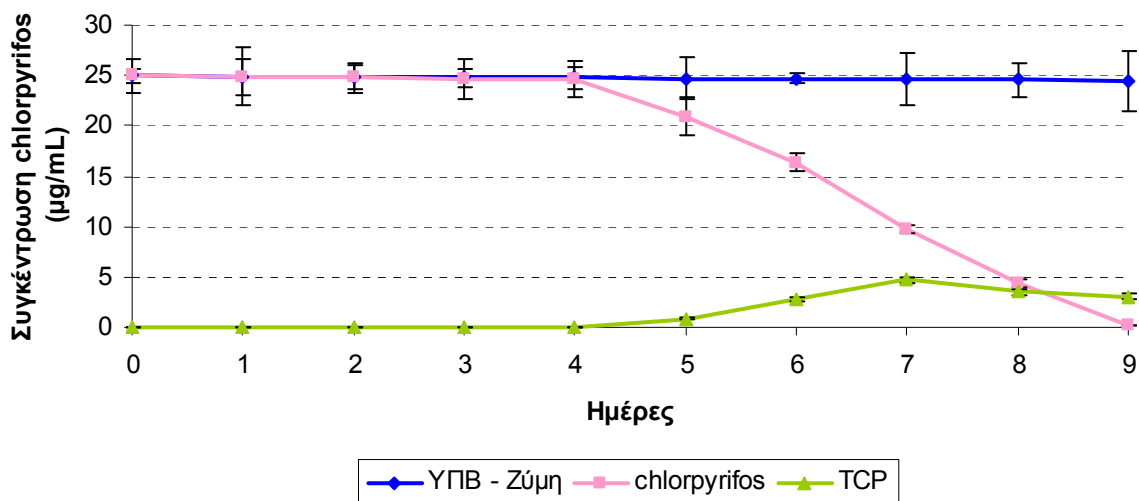
Σε θρεπτικό υλικό με πληθυσμιακή πυκνότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* 10^6 κύτταρα /mL, στην οποία η βιοαποδόμηση ήταν πιο έντονη, προστέθηκαν 25μg/mL chlorpyrifos. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

Πίνακας 11. Αποδόμηση του chlorpyrifos από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25μg/mL chlorpyrifos. Παραγωγή μεταβολίτη TCP. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των chlorpyrifos και TCP ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) Chlorpyrifos και TCP ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)				
	ΥΠΒ - Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη		(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη	
		Chlorpyrifos	TCP	Chlorpyrifos	TCP
<i>Rhodotorula glutinis</i>					
0+	25 ± 2,80	24,97 ± 6,79	MA	25 ± 3,49	MA
1	24,84 ± 7,34	24,88 ± 11,68	MA	22,1 ± 9,21	0,32 ± 4,62
2	24,81 ± 6,09	24,80 ± 4,87	MA	16,85 ± 7,88	2,04 ± 5,15
3	24,76 ± 3,38	24,69 ± 8,07	MA	11,46 ± 3,80	5,65 ± 3,97
4	24,74 ± 9,07	24,65 ± 7,43	MA	7,53 ± 5,24	7,21 ± 7,34
5	24,73 ± 8,52	20,93 ± 9,24	0,83 ± 3,28	1,32 ± 10,80	8,64 ± 3,16
6	24,71 ± 2,09	16,34 ± 5,32	2,78 ± 5,42	MA	8,07 ± 8,09
7	24,63 ± 10,41	9,65 ± 4,24	4,67 ± 4,53	MA	5,85 ± 7,34
8	24,56 ± 11,57	4,33 ± 10,32	3,54 ± 9,07	MA	4,64 ± 6,09
9	24,44 ± 12,51	0,24 ± 2,04	3,04 ± 9,6	MA	4,62 ± 5,13
<i>Rhodotorula rubra</i>					
0+	25 ± 2,80	25 ± 12,2	MA	24,98 ± 6,90	MA
1	24,84 ± 7,34	17,76 ± 5,60	2,46 ± 9,44	21,33 ± 8,66	1,89 ± 4,09
2	24,81 ± 6,09	12,04 ± 13,8	4,76 ± 2,39	16,89 ± 6,68	2,79 ± 5,22
3	24,76 ± 3,38	4,57 ± 8,11	6,89 ± 3,27	11,53 ± 2,22	4,02 ± 8,86
4	24,74 ± 9,07	2,99 ± 7,72	12,45 ± 4,14	6,58 ± 4,31	6,9 ± 6,29
5	24,73 ± 8,52	MA	16,99 ± 11,0	1,02 ± 12,06	11,3 ± 4,52
6	24,71 ± 2,09	MA	12,22 ± 7,20	MA	13,59 ± 7,46
7	24,63 ± 10,41	MA	8,87 ± 10,9	MA	8,54 ± 7,43
8	24,56 ± 11,57	MA	5,43 ± 7,5	MA	5,34 ± 3,09
9	24,44 ± 12,51	MA	1,79 ± 5,25	MA	3,12 ± 9,04

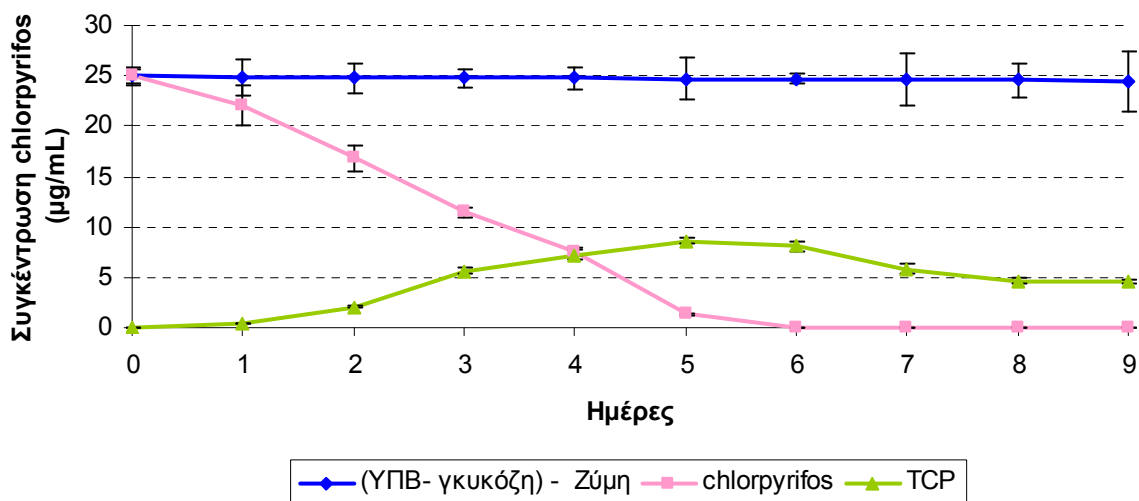
MA: Μη Ανιχνεύσιμα υπολείμματα

Rhodotorula glutinis - Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 27. Μείωση επιπέδων του chlorpyrifos από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL chlorpyrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula glutinis - Υλικό χωρίς γλυκόζη

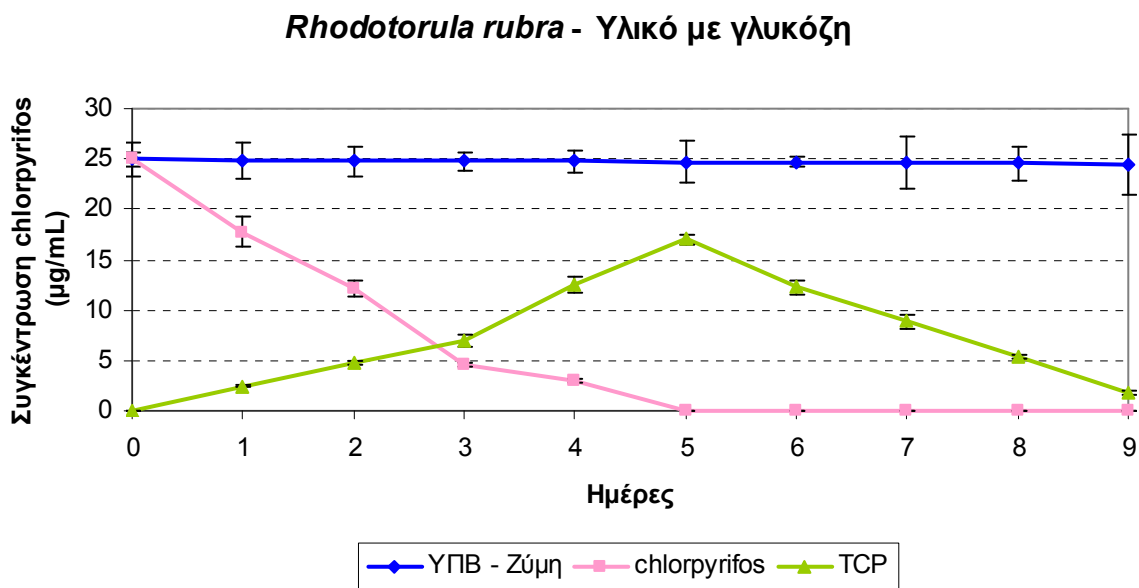


Σχήμα 28. Μείωση επιπέδων του chlorpyrifos από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL chlorpyrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Στην περίπτωση της *Rhodotorula glutinis* στο θρεπτικό υλικό με γλυκόζη δεν πραγματοποιήθηκε καθόλου αποδόμηση του chlorpyrifos κατά τις 4 πρώτες ημέρες του πειράματος. Μετά την 4^η ημέρα, όμως, τα αποθέματα του μειώθηκαν ταχύτατα φτάνοντας κατά την 9^η ημέρα στην ελάχιστη συγκέντρωση των 0,24µg/mL. Έπειτα από την 4^η ημέρα ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης TCP, τα επίπεδα του οποίου παρουσίασαν μέγιστο την 7^η

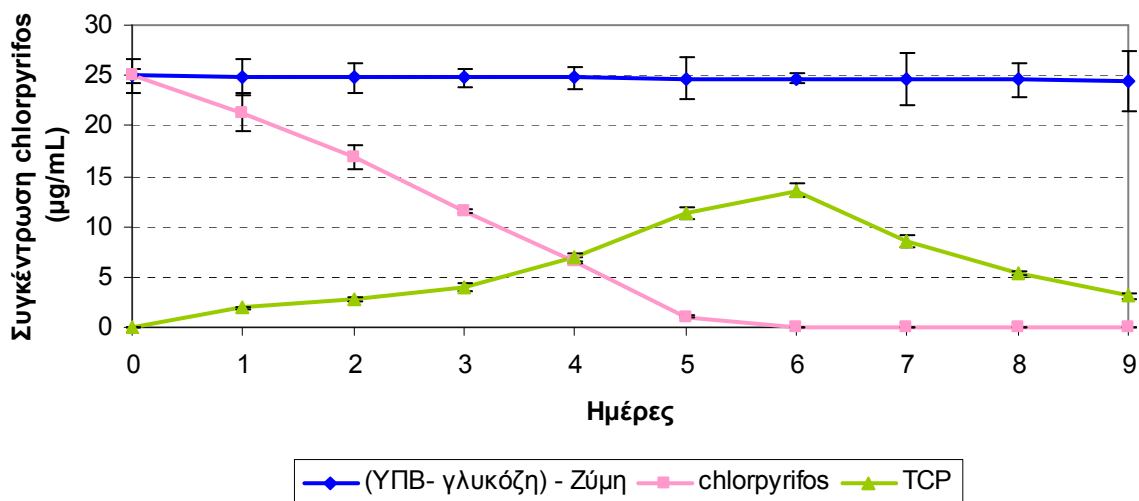
ημέρα (4,67μg/mL). Από την επόμενη ακριβώς ημέρα παρατηρήθηκε συνεχής μείωση τους, φτάνοντας το 65,1% της μέγιστης τιμής στην τελευταία δειγματοληψία (9^η ημέρα).

Στο θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη, η αποδόμηση του chlorpyrifos ξεκίνησε από την 1^η ημέρα του πειράματος και την 6^η ημέρα δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματά του. Από την 2^η δειγματοληψία επίσης ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης TCP, τα επίπεδα του οποίου άγγιξαν το μέγιστό τους την 6^η ημέρα και ήταν της τάξης των 8,64μg/mL. Από την επόμενη ακριβώς ημέρα παρατηρήθηκε συνεχής μείωση τους, φτάνοντας το 53,5% της μέγιστης τιμής στην τελευταία δειγματοληψία (9^η ημέρα). Η μείωση της συγκέντρωσης του μεταβολίτη TCP ενισχύει την ένδειξη σχετικά με την ικανότητα της ζύμης *Rhodotorula glutinis* να αποδομεί τόσο το μητρικό μόριο chlorpyrifos όσο και το μεταβολίτη του TCP. Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης του φυτοπροστατευτικού προϊόντος στο υλικό χωρίς γλυκόζη είχε ως συνέπεια και την αύξηση του ρυθμού αποδόμησής του. Στη συγκέντρωση chlorpyrifos 10μg/mL υπολογίστηκε ρυθμός βιοαποδόμησης 1,62μg/mL/ημέρα ενώ η αντίστοιχη τιμή στη συγκέντρωση chlorpyrifos 25μg/mL ήταν 4,76μg/mL/ημέρα.



Σχήμα 29. Μείωση επιπέδων του chlorpyrifos από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25μg/mL chlorpyrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula rubra - Υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 30. Μείωση επιπέδων του chlorpyrifos από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL chlorpyrifos. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Όσον αφορά τη *Rhodotorula rubra*, στο θρεπτικό υλικό με γλυκόζη η αποδόμηση του chlorpyrifos ξεκίνησε από την 1^η ημέρα του πειράματος και τα αποθέματά του εξαντλήθηκαν έως και την 5^η ημέρα. Από την 2^η δειγματοληψία επίσης ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης TCP. Τα επίπεδα του TCP άγγιζαν το μέγιστό τους την 5^η ημέρα και ήταν της τάξης των 16,99µg/mL. Από την επόμενη ακριβώς ημέρα παρατηρήθηκε συνεχής μείωση τους, φτάνοντας το 10,54% της μέγιστης τιμής στην τελευταία δειγματοληψία (9^η ημέρα).

Στο θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη, στο οποίο το chlorpyrifos παρέχεται στη ζύμη ως η μόνη πηγή άνθρακα, η αποδόμηση του chlorpyrifos ξεκίνησε από την 1^η ημέρα του πειράματος (2^η δειγματοληψία) και τα αποθέματά του εξαντλήθηκαν έως και την 6^η ημέρα. Από την 2^η δειγματοληψία επίσης ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης TCP. Τα επίπεδα του TCP άγγιζαν το μέγιστό τους την 5^η ημέρα και ήταν της τάξης των 13,6µg/mL, τιμή χαμηλότερη της αντίστοιχης στο υλικό με γλυκόζη. Όμοια με το υλικό με γλυκόζη παρατηρήθηκε μείωση τους, φτάνοντας το 23% της μέγιστης τιμής στην τελευταία δειγματοληψία (9^η ημέρα).

Η μείωση της συγκέντρωσης του μεταβολίτη TCP ενισχύει και σε αυτήν την περίπτωση την ένδειξη ικανότητας της ζύμης *Rhodotorula rubra* να αποδομεί τόσο το μητρικό μόριο chlorpyrifos όσο και το μεταβολίτη του TCP. Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης του φυτοπροστατευτικού προϊόντος είχε ως συνέπεια και την αύξηση του ρυθμού αποδόμησης του. Στη συγκέντρωση chlorpyrifos 10µg/mL υπολογίστηκε ρυθμός βιοαποδόμησης 1,94µg/mL/ημέρα για το θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη και 2,22µg/mL/ημέρα για το υλικό με

γλυκόζη, ενώ οι αντίστοιχες τιμές στη συγκέντρωση chlorpyrifos 25μg/mL ήταν 4,8μg/mL/ημέρα και 5,5μg/mL/ημέρα.

3.2.2.6 Έλεγχος της ικανότητας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* να αποδομούν το μεταβολίτη 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP)

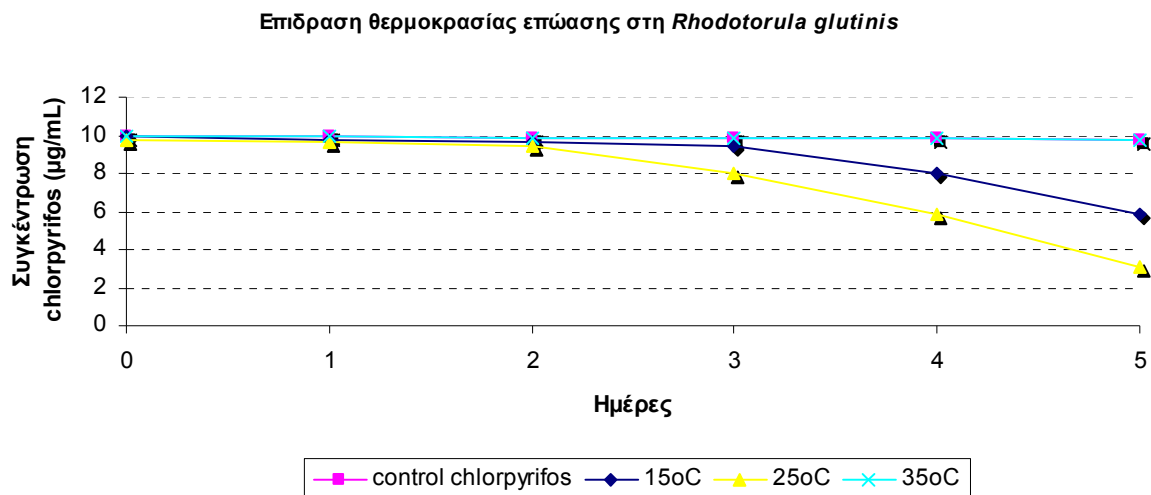
Προκειμένου να επιβεβαιωθούν ή όχι οι αρχικές ενδείξεις για τη βιοαποδόμηση του TCP από τις δύο ζύμες, πραγματοποιήθηκε πείραμα βιοαποδόμησης στο οποίο αντί για το chlorpyrifos προστέθηκε ο μεταβολίτης 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP). Το επίπεδο φόρτισης του TCP ήταν τα 5μg/mL και χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη. Όπως παρατηρείται και στον παρακάτω πίνακα, και οι δύο ζύμες αποδόμησαν το TCP, όχι όμως έως εξάντλησης των αποθεμάτων του, γεγονός το οποίο διαπιστώθηκε και στα βασικά πειράματα βιοαποδόμησης του chlorpyrifos.

Πίνακας 12. Αποδόμηση του 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ χωρίς γλυκόζη 106 κύτταρα/mL ζύμης και 5μg/mL TCP. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση του TCP ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

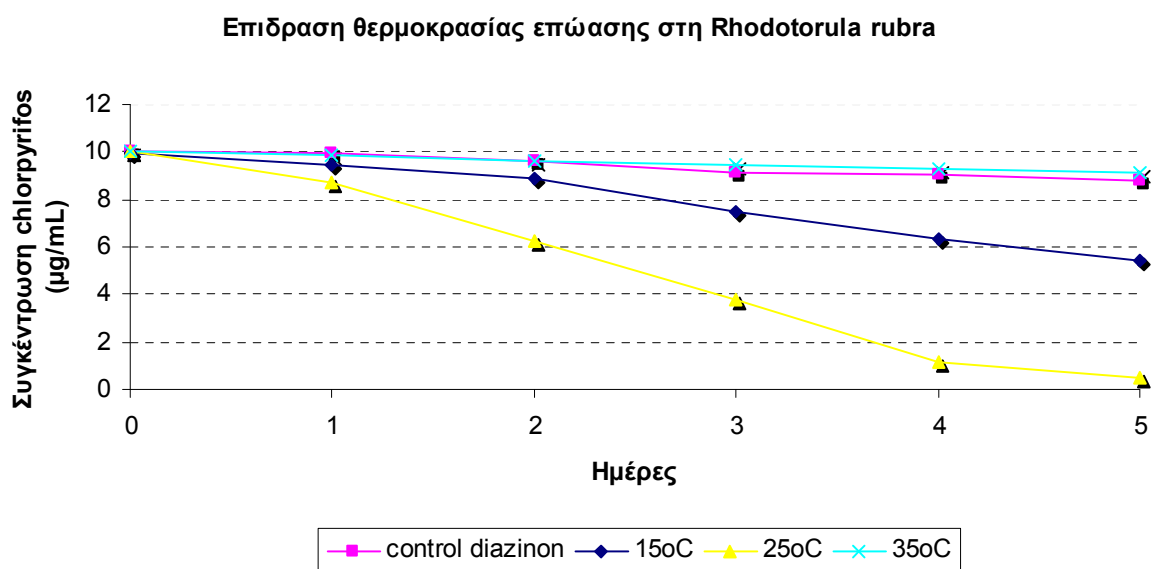
Ημέρες	Συγκέντρωση TCP (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)		
	(ΥΠΒ – γλυκόζη) - Ζύμη	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
0+	5 ± 5,34	4,99± 4,35	4,98 ± 1,28
1	4,85 ± 3,43	3,93 ± 3,72	3,12 ± 4,86
2	4,11 ± 2,97	3,27 ± 3,51	2,54 ± 1,63
3	3,76 ± 1,78	2,38 ± 10,24	1,95 ± 1,24
4	3,51 ± 6,42	2,14 ± 2,96	1,72 ± 6,51
5	3,05 ± 7,18	1,93± 6,75	1,43 ± 13,84

3.2.2.7 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη βιοαποδόμηση του chlorpyrifos από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

Το φαινόμενο της βιοαποδόμησης μελετήθηκε στις θερμοκρασίες επώασης των καλλιεργειών 15°C, 25°C και 35°C. Το μόλυσμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα 10⁶ κύτταρα/mL και η συγκέντρωση του chlorpyrifos τα 10μg/mL, ενώ το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των καλλιέργειας δεν περιείχε γλυκόζη. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνοψίζονται στα διάγραμμα που ακολουθούν:



Σχήμα 31. Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης της ζύμης *Rhodotorula glutinis* στη βιοαποδόμηση του chlorpyrifos.



Σχήμα 32. Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης της ζύμης *Rhodotorula rubra* στη βιοαποδόμηση του chlorpyrifos.

Η θερμοκρασία επώασης στην οποία παρατηρήθηκε η βέλτιστη ικανότητα των ζυμών να αποδομούν το chlorpyrifos είναι οι 25°C. Στους 35°C δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καθόλου αποδόμηση, ενώ στους 15°C ο ρυθμός βιοαποδόμησης ήταν μικρότερος εκείνου στους 25°C. Τα αποτελέσματα θεωρούνται αποδεκτά, δεδομένου ότι οι ζύμες του γένους *Rhodotorula* ανήκουν στους ψυχρόφιλους μικροοργανισμούς.

3.2.3 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης του chlorpyrifos σε βιοχημικό επίπεδο

3.2.3.1 Επίδραση του chlorpyrifos στην ενεργότητα των ενζυμικών συστημάτων βιοαποδόμησης

Έπειτα από την προσθήκη chlorpyrifos στις ενζυμικές δοκιμές που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 2.6, παρατηρήθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

➤ Επίδραση του chlorpyrifos στην ενεργότητα των μεταφορασών της γλουταθειόνης

Στο πρωτόκολλο πειραματισμού της παραγράφου 2.6.1.3 προστέθηκαν διαδοχικά 14,25μM, 28,5μM, 42,75μM και 57μM chlorpyrifos και έπειτα από μετρήσεις στο σπεκτροφωτόμετρο στα 340nm κινητικά κάθε 2 λεπτά, προέκυψαν για κάθε ζύμη τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 13. Επίδραση του chlorpyrifos στην ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος των μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs) των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*.

Ζύμη	Συγκέντρωση chlorpyrifos (μM)	Ενεργότητα (μmol/min/ μg πρωτεΐνης)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	2,603
	14,25	2,654
	28,5	2,432
	42,75	2,457
	57	2,338
<i>Rhodotorula rubra</i>	0	6,324
	14,25	6,123
	28,5	6,222
	42,75	6,035
	57	5,897

Με βάση τις τιμές του πίνακα, το chlorpyrifos δε μείωσε την ενεργότητα των GSTs σε καμία από τις δύο ζύμες και συνεπώς δεν μπορεί να θεωρηθεί παρεμποδιστής των εν λόγω ενζύμων. Σημαντική κρίνεται επίσης η παρατήρηση της αυξημένης ενεργότητας των GSTs στη ζύμη *Rhodotorula rubra* (απουσία εντομοκτόνου μετρήθηκε ενεργότητα 6,324μmol/min/μg πρωτεΐνης) συγκριτικά με την αντίστοιχη στη *Rhodotorula glutinis* (απουσία εντομοκτόνου μετρήθηκε ενεργότητα 2,603μmol/min/μg πρωτεΐνης). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως το chlorpyrifos δεν αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο πρόσδεσης των GSTs με το υπόστρωμα.

➤ Επίδραση του chlorpyrifos στην ενεργότητα των εστερασών

Στο πρωτόκολλο πειραματισμού της παραγράφου 2.6.1.4 για το υπόστρωμα PNPA (p-Nitrophenyl acetate) προστέθηκαν διαδοχικά 14,25μM, 28,5μM, 42,75μM και 57μM chlorpyrifos. Έπειτα από μετρήσεις στο σπεκτροφωτόμετρο στα 405nm κινητικά κάθε 2 λεπτά, δεν ήταν δυνατή η κατάληξη σε κάποια παρατήρηση για καμιά από τις δύο ζύμες. Αρχικά παρατηρήθηκε πως το υπό μέτρηση μίγμα θόλωνε και για το λόγο αυτό έγινε αλλαγή του διαλύτη, με την παρασκευή προτύπου διαλύματος chlorpyrifos σε μεθανόλη. Με τη χρήση των μεθανολικών διαλυμάτων ξεπεράστηκε το πρόβλημα της θόλωσης, ωστόσο δεν ήταν δυνατή η εξαγωγή αποτελεσμάτων για την επίδραση του chlorpyrifos στις εστεράσες των δύο ζυμών. Δεδομένης της ισχυρής συγγένειας που παρουσιάζουν οι εστεράσες με το υπόστρωμά τους PNPA, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος PNPA από 200mM στα 20mM και στη συνέχεια στα 2mM. Σύμφωνα με τις μετρήσεις του πιο αραιού διαλύματος PNPA (2mM), το ενζυμικό σύστημα των εστερασών παρουσίασε ενεργότητα και στις δύο ζύμες, αλλά το chlorpyrifos δεν παρεμπόδισε τη δράση τους. Όσον αφορά τη *Rhodotorula glutinis* απουσία του chlorpyrifos μετρήθηκε τιμή ενεργότητας 15,468μmol/min/μg πρωτεΐνης, ενώ έπειτα από την προσθήκη της υψηλότερης συγκέντρωσής του (57μM) η αντίστοιχη τιμή ήταν 16,978μmol/min/μg πρωτεΐνης. Στη *Rhodotorula rubra* απουσία του chlorpyrifos μετρήθηκε τιμή ενεργότητας 10,083μmol/min/μg πρωτεΐνης, ενώ έπειτα από την προσθήκη της υψηλότερης συγκέντρωσής του (57μM) η αντίστοιχη τιμή ήταν 10,345μmol/min/μg πρωτεΐνης.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο πειραματισμού της παραγράφου 2.6.1.4 για τα υπόστρωματα a-naphthyl acetate και b-naphthyl acetate με προσθήκη διαδοχικά, ίδιων συγκεντρώσεων chlorpyrifos (14,25μM, 28,5μM, 42,75μM και 57μM). Οι μετρήσεις παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί, στον οποίο θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι δεδομένου ότι οι τιμές της ενεργότητας για τα δύο υποστρώματα ήταν κατά πολύ όμοιες παρουσιάζεται η μέση τιμή αυτών σε κάθε συγκέντρωση chlorpyrifos.

Πίνακας 14. Επίδραση του chlorpyrifos στην ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος των εστερασών των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*, με χρήση των ενζυμικών υποστρωμάτων a & b-naphthyl acetate. Οι τιμές της ενεργότητας δίνονται ως μέση τιμή των δύο υποστρωμάτων.

Ζύμη	Συγκέντρωση chlorpyrifos (μM)	Ενεργότητα (μmol/min/ μg πρωτεΐνης)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	3,255
	14,25	2,851
	28,5	2,554
	42,75	1,653
	57	1,441
<i>Rhodotorula rubra</i>	0	3,603
	14,25	3,054
	28,5	2,554
	42,75	1,841
	57	1,236

Όπως παρατηρείται υπάρχει παρεμπόδιση της δράσης των εστερασών. Στην υψηλότερη συγκέντρωση chlorpyrifos για τη *Rhodotorula glutinis* παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας κατά 55,7%, ενώ για τη *Rhodotorula rubra* η ενεργότητα μειώθηκε κατά 65,7%. Από τις τιμές του Πίνακα 14 υπολογίστηκαν και οι τιμές της IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration -IC₅₀), οι οποίες ήταν:

- *Rhodotorula rubra*: **IC₅₀=42μM** και
- *Rhodotorula glutinis*: **IC₅₀=43μM**.

Δηλαδή, τα 42μM και 43μM chlorpyrifos ευθύνονται για τη μείωση της ενεργότητας των εστερασών κατά 50%. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδεικτικά πιθανής αλληλεπίδρασης του chlorpyrifos με το ενεργό κέντρο πρόσδεσης του ενζύμου στο οποίο προσδένεται το υπόστρωμα (a-naphthyl acetate ή b-naphthyl acetate).

Τέλος, ακολούθησε προσπάθεια διερεύνησης της κινητικής της παρεμπόδισης των εστερασών από το chlorpyrifos, σύμφωνα με το μοντέλο Michaelis- Menten. Ακολούθηθηκε το πρωτόκολλο μέτρησης της ενεργότητας των ενζύμων με τα υποστρώματα a & b-naphthyl acetate χωρίς, όμως να οδηγηθούμε σε κάποιο αποτέλεσμα για καμία από τις δύο ζύμες γεγονός το οποίο πιθανώς να αποδίδεται στην πολύ ισχυρή συγγένεια των εστερασών με το υπόστρωμά τους.

3.2.3.2 Βιοχημική διερεύνηση του υπεύθυνου ενζυμικού συστήματος με τη χρήση συνεργιστών

Με στόχο την επιβεβαίωση των ενδείξεων για αλληλεπίδραση του chlorpyrifos με το ενεργό κέντρο των εστερασών και την ταυτοποίηση του υπεύθυνου ενζυμικού συστήματος για τη βιοαποδόμηση του εντομοκτόνου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με εξειδικευμένους συνεργιστές τα οποία παρουσιάζονται στη συνέχεια.

3.2.3.2.1 Πειράματα ευαισθησίας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στους συνεργιστικούς παράγοντες triphenyl phosphate, piperonyl butoxide και diethyl maleate

Έπειτα από την προσθήκη συνεργιστή σε στερεό θρεπτικό υλικό στις συγκεντρώσεις 1, 5, 10 και 15μg/mL, για τη *Rhodotorula glutinis* παρατηρήθηκαν τα εξής, όπως εμφανίζονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15. Έλεγχος της ευαισθησίας της ζύμης *Rhodotorula glutinis* έπειτα από επώασή της με τους συνεργιστικούς παράγοντες triphenyl phosphate, diethyl maleate και piperonyl butoxide σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10 και 15μg/mL.

Συγκέντρωση συνεργιστικού παράγοντα (μg/mL)	% επιβίωση του μάρτυρα (Αριθμός αποικιών)		
	Triphenyl phosphate	Diethyl maleate	Piperonyl butoxide
0	100	100	100
1	100	100	100
5	99	100	99
10	98	100	99
15	98	97	96

Οι αντίστοιχες τιμές για τη *Rhodotorula rubra* ήταν:

Πίνακας 16. Έλεγχος της ευαισθησίας της ζύμης *Rhodotorula rubra* έπειτα από επώασή της με τους συνεργιστικούς παράγοντες triphenyl phosphate, diethyl maleate και piperonyl butoxide σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10 και 15μg/mL.

Συγκέντρωση συνεργιστικού παράγοντα (μg/mL)	% επιβίωση του μάρτυρα (Αριθμός αποικιών)		
	Triphenyl phosphate	Diethyl maleate	Piperonyl butoxide
0	100	100	100
1	100	100	100
5	98	100	99
10	97	100	98
15	96	98	96

Όπως παρατηρείται, ακόμη και στη μέγιστη συγκέντρωση οι συνεργιστικοί παράγοντες δεν

παρουσίασαν κάποια αξιοσημείωτη παρεμπόδιση στην ανάπτυξη των *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*. Επιλέχθηκε, συνεπώς, η συγκέντρωση των 10μg/mL.

3.2.3.2.2 Πειράματα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* με προσθήκη συνεργιστικού παράγοντα

Η σειρά σύμφωνα με την οποία χρησιμοποιήθηκαν οι συνεργιστικοί παράγοντες στα πειράματα βιοαποδόμησης ήταν: αρχικά το triphenyl phosphate, στη συνέχεια το piperonyl butoxide και τέλος το diethyl maleate. Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη, στο οποίο και οι δυο ζύμες έχουν δείξει δράση βιοαποδόμησης του chlorpyrifos από την 1^η ημέρα, πληθυσμιακή πυκνότητα ζύμης τα 10⁶ κύτταρα/mL, συγκέντρωση chlorpyrifos 10μg/mL και συγκέντρωση συνεργιστή 10μg/mL. Οι μετρήσεις στο LC/MS/MS έδειξαν τα εξής:

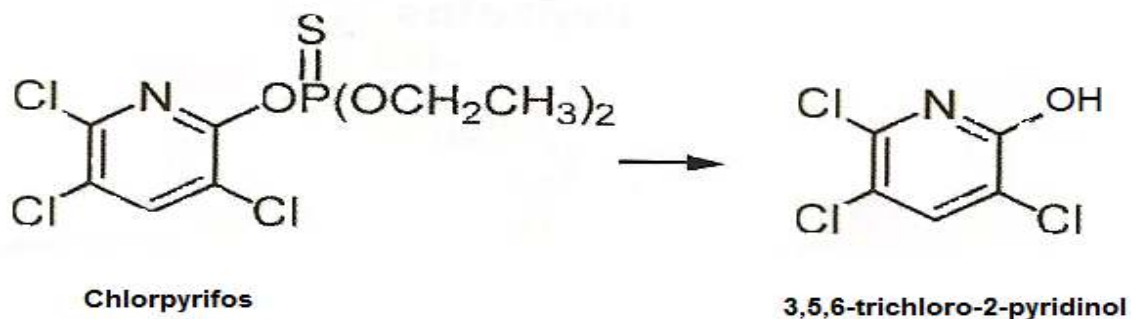
Πίνακας 17. Αποδόμηση του chlorpyrifos από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (χωρίς γλυκόζη) 10⁶ κύτταρα/mL ζύμης, 10μg/mL chlorpyrifos και 10μg/mL triphenyl phosphate ή 10μg/mL diethyl maleate ή 10μg/mL piperonyl butoxide και επώαση για 5 ημέρες.

Ημέρες	Συγκέντρωση chlorpyrifos (μg/mL)		
	ΥΠΒ – Ζύμη	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
Triphenyl phosphate			
0+	10	10	10
1	10	9,9	9,88
2	9,9	9,87	9,86
3	9,86	9,82	9,80
4	9,81	9,77	9,74
5	9,8	9,75	9,72
Piperonyl butoxide			
0+	10	10	10
1	9,92	9,04	8,44
2	9,89	7,07	6,64
3	9,85	4,66	5,08
4	9,80	2,99	3,12
5	9,79	1,37	0,19
Diethyl maleate			
0+	10	10	10
1	9,9	8,74	9,03
2	9,87	6,33	6,45
3	9,83	4,51	4,14
4	9,80	3,69	2,31
5	9,8	1,75	0,08

Από τα ποτελέσματα του πίνακα 17 διαπιστώνεται ότι η αποδόμηση του chlorpyrifos από τις δύο ζύμες παρεμποδίστηκε από την παρουσία του triphenyl phosphate στο υλικό ανάπτυξής τους, ενώ στην περίπτωση των piperonyl butoxide και diethyl maleate το φαινόμενο της βιοαποδόμησης εξελίχθηκε χωρίς εμφανή παρεμπόδιση. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως το ενζυμικό σύστημα των εστερασών εμπλέκεται στην αποδόμηση του chlorpyrifos από τις δύο ζύμες.

3.2.3.3 Προτεινόμενο μονοπάτι βιοαποδόμησης του chlorpyrifos από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

Κατά την αποδόμηση, συνεπώς του chlorpyrifos από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* μέσω της δράσης του ενζυμικού συστήματος των εστερασών, πραγματοποιείται υδρολυτική διάσπαση του εστέρα του μητρικού μορίου και παραγωγή αλκοόλης, δηλαδή του μεταβολίτη 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP), σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 33. Προτεινόμενο μονοπάτι βιοαποδόμησης του chlorpyrifos από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*.

3.2.4 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε καρπούς τομάτας

3.2.4.1 Αποτελέσματα επικύρωσης αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων του chlorpyrifos σε καρπούς τομάτας

Δείγματα καρπών τομάτας εμβολιάστηκαν με chlorpyrifos σε συγκεντρώσεις των 0,05 και 0,1mg/kg. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε 6 επαναλήψεις και τα κριτήρια αξιολόγησης της μεθόδου ήταν η ορθότητα (τιμές ανακτήσεων), η πιστότητα (τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης), τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί και η ευαισθησία της μεθόδου (όριο ποσοτικού προσδιορισμού –LOQ).

Πίνακας 18. Ανακτήσεις και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) για την ουσία chlorpyrifos έπειτα από τον εμβολιασμό καρπών τομάτας σε συγκεντρώσεις 0,05 και 0,1μg/mL σε 6 επαναλήψεις.

Ουσία	C (mg/kg)	Μέση Ανάκτηση (%)	RSD (%)
Chlorpyrifos	0,05	84,4	10,7
Chlorpyrifos	0,1	92,4	8,3

Ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου (LOQ) θεωρήθηκε το χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης στο οποίο υπολογίστηκαν αποδεκτές τιμές ανακτήσεων και σχετικών τυπικών αποκλίσεων, δηλαδή το 0,05mg/kg. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Limit of Detection, LOD) υπολογίστηκε ως τρεις φορές χαμηλότερο από το LOQ ($LOQ = 3 \times LOD$), δηλαδή, το 0,02μg/mL. Οι τιμές των ανακτήσεων βρίσκονταν εντός του αποδεκτού εύρους 70- 110% από τη SANCO 2007/3131, καθώς και εκείνες των σχετικών τυπικών αποκλίσεων (χαμηλότερες του 20%), γεγονός που υποδεικνύει την αξιοπιστία και την καταλληλότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό του chlorpyrifos σε καρπούς τομάτας.

3.2.4.2 Υπολείμματα chlorpyrifos σε καρπούς τομάτας έπειτα από συνδυασμένη εφαρμογή τους με chlorpyrifos και κύτταρα ζυμών

Καρποί τομάτας ψεκάστηκαν με chlorpyrifos συγκέντρωσης 2mg/kg και κύτταρα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις 5 και τις 30 ημέρες από την εφαρμογή. Στις 30 ημέρες αντιστοιχεί ο εγκεκριμένος χρόνος αναμονής από την τελευταία επέμβαση στη συγκομιδή (PreHarvest Interval- PHI) σύμφωνα με την ετικέτα του σκευάσματος Dursban 75 WG. Έπειτα από την επεξεργασία των δειγμάτων και τη χρωματογραφική τους ανάλυση προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 19. Υπολείμματα chlorpyrifos σε καρπούς τομάτας έπειτα από τον ψεκάσμό τους με 2mg/kg chlorpyrifos και 10⁸κύτταρα/ kg των ζυμών *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra*. Ως «μάρτυρας» αναφέρονται οι καρποί που έχουν ψεκαστεί μόνο με chlorpyrifos και ως «επέμβαση» οι καρποί που έχουν ψεκαστεί με chlorpyrifos και με κύτταρα ζύμης.

Ημέρες	Συγκέντρωση chlorpyrifos C (mg/kg)					
	<i>Rhodotorula glutinis</i>			<i>Rhodotorula rubra</i>		
	Μάρτυρας	Επέμβαση	Μείωση (%) του μάρτυρα	Μάρτυρας	Επέμβαση	Μείωση (%) του μάρτυρα
5	1,75	1,27	27,4	1,75	1,31	25,1
30	1,02	0,32	68,6	1,02	0,08	92,2

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 19, υπάρχει σαφής υπεροχή της μείωσης του chlorpyrifos στην επέμβαση σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση της *Rhodotorula glutinis* στη δειγματοληψία των 30 ημερών (PHI) σημειώθηκε ελάττωση της συγκέντρωσης στην επέμβαση κατά 68,6% του μάρτυρα, ενώ στη *Rhodotorula rubra* κατά 92,2% του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αντίστοιχα αποτελέσματα των in vitro πειραμάτων βιοαποδόμησης.

Επιπλέον, τα υπολείμματα στους καρπούς που είχαν ψεκαστεί μόνο με chlorpyrifos μειώθηκαν ανάμεσα στις δύο δειγματοληψίες, δεν έφτασαν, όμως, σε επίπεδα χαμηλότερα από το μέγιστο όριο υπολείμματος (Maximum Residue Limit- MRL) που έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για το chlorpyrifos στις τομάτες, το οποίο είναι 0,5mg/kg (Κανονισμός (ΕΚ) 396/2005). Αντίθετα, στους καρπούς τομάτας που είχαν ψεκαστεί και με κύτταρα ζύμης τα υπολείμματα του chlorpyrifos στις 30 ημέρες ήταν χαμηλότερα από το MRL, με την περίπτωση της *Rhodotorula rubra* να πλεονεκτεί.

Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε μεμονωμένους καρπούς τομάτας. Μελετήθηκε, δηλαδή, η αλληλεπίδραση ζύμης εντομοκτόνου υπό ελεγχόμενες και σταθερές συνθήκες. Θεωρούνται συνεπώς ακραία περίπτωση, δεδομένου ότι δεν υπαισέρχονται σε αυτά άλλοι παράγοντες (βιολογικοί, περιβαλλοντικοί) οι οποίοι να συντελούν σε πιθανή απομάκρυνση του diazinon από την επιφάνεια των καρπών ιδιαίτερα στην περίπτωση της επέμβασης.

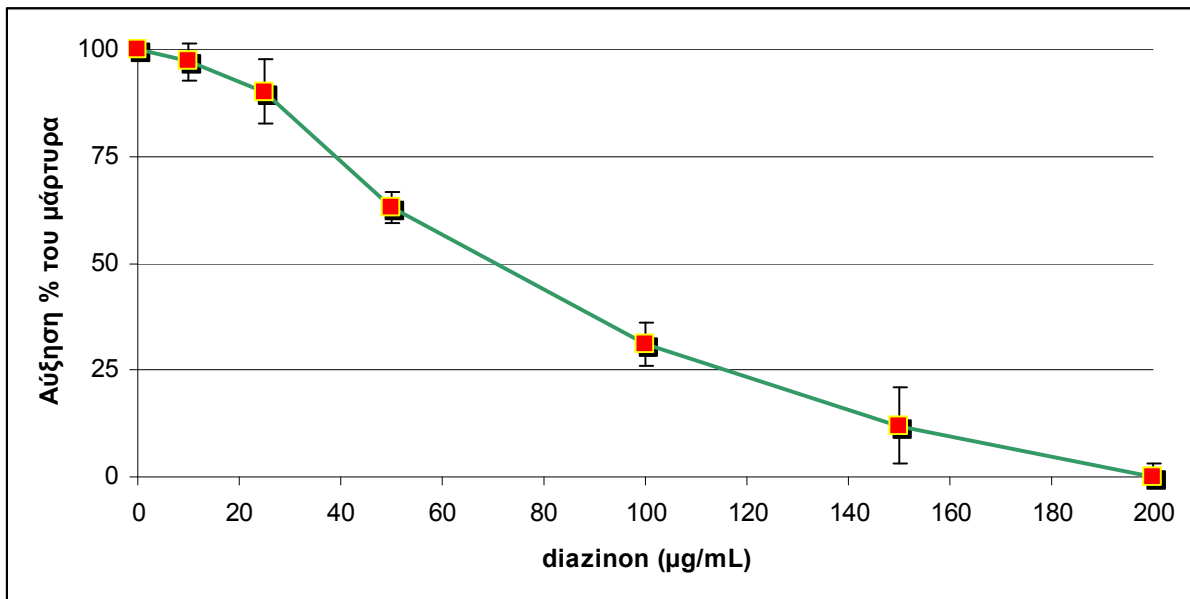
3.3 Διερεύνηση της ικανότητας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στην αποδόμηση του diazinon

3.3.1 Ευαισθησία των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στο diazinon

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τη διερεύνηση της ευαισθησίας των ζυμών στο diazinon παρουσιάζονται παρακάτω ανά μικροοργανισμό:

❖ *Rhodotorula glutinis*

Η ευαισθησία της *Rhodotorula glutinis* σε διάφορες συγκεντρώσεις του diazinon παρουσιάζεται στην παρακάτω καμπύλη μυκητοτοξικότητας (Σχήμα 34).

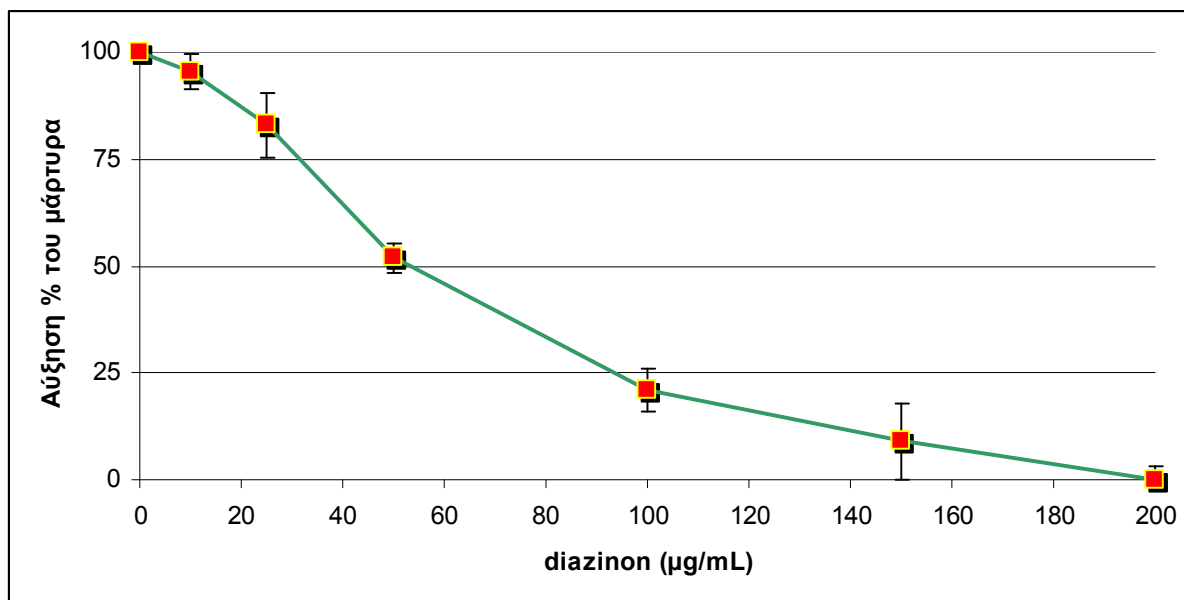


Σχήμα 34. Ευαισθησία της ζύμης *Rhodotorula glutinis* στο diazinon σε υλικό UCM έπειτα από 14 ημέρες επώασης στους 25°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων.

Εμφανές είναι το ότι δεν παρουσιάστηκε ουσιαστική παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της *Rhodotorula glutinis* στις συγκεντρώσεις του diazinon έως και 25µg/mL. Σημαντική ήταν η παρεμπόδιση στη συγκέντρωση των 50µg/mL (63% του μάρτυρα), ενώ πολύ έντονη στα 150µg/mL (12% του μάρτυρα). Η τιμή της EC₅₀ υπολογίστηκε στα 67µg/mL, ενώ στα 200µg/mL παρατηρήθηκε πλήρης παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της ζύμης.

❖ *Rhodotorula rubra*

Όμοια, η ευαισθησία της *Rhodotorula rubra* στο diazinon παρουσιάζεται στην αντίστοιχη καμπύλη μυκητοτοξικότητας (Σχήμα 35).



Σχήμα 35. Ευαισθησία της ζύμης *Rhodotorula rubra* στο diazinon σε υλικό UCM έπειτα από 14 ημέρες επώασης στους 25°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων.

Η *Rhodotorula rubra*, παρουσιάστηκε περισσότερο ευαίσθητη στο diazinon από ότι η *Rhodotorula glutinis*, κυρίως στις υψηλές συγκεντρώσεις των 100µg/L (21% του μάρτυρα) και 150µg/L (9% του μάρτυρα). Η τιμή της EC_{50} υπολογίστηκε στα 53µg/mL, ενώ στα 200µg/mL παρατηρήθηκε πλήρης παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της ζύμης.

Με βάση συνεπώς τα παραπάνω αποτελέσματα, το φαινόμενο της βιοαποδόμησης του diazinon από τις δύο ζύμες θα μελετηθεί στις συγκεντρώσεις 10 και 25µg/mL.

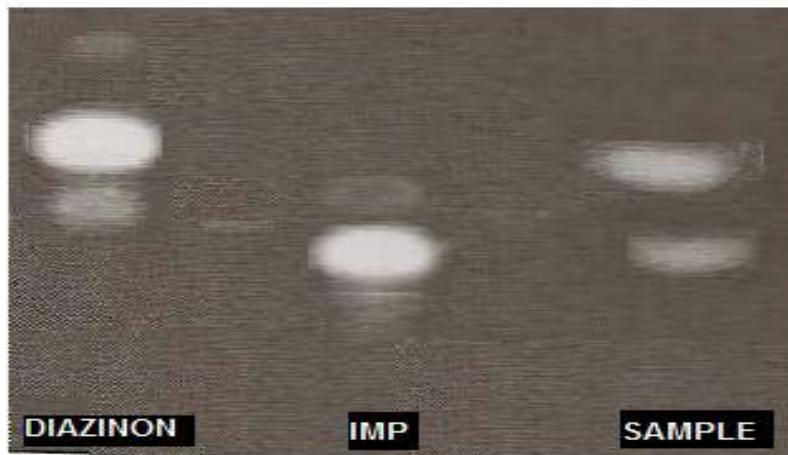
3.3.2 Αποτελέσματα διερεύνησης της βιοαποδόμησης του diazinon από τις ζύμες

Rhodotorula glutinis και *Rhodotorula rubra* σε χημικό επίπεδο

Όπως και στην περίπτωση του *chlorpyrifos*, έπειτα από τον εμβολιασμό υγρών καλλιεργειών 24 ωρών των υπό εξέταση ζυμών με το δρων συστατικό diazinon και την επώασή τους, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες και το τελικό έκλουσμα αναλύθηκε αρχικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και στη συνέχεια σε υγρή χρωματογραφία μάζας με τριπλό τετράπολο (LC/MS/MS).

3.3.2.1 Μέθοδος ανίχνευσης του δρόντος συστατικού diazinon και του μεταβολίτη 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP) με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας- Thin Layer Chromatography (TLC)

Η ανάλυση του τελικού εκλούσματος, το οποίο προέρχονταν από την κωνική φιάλη που περιείχε καλλιέργεια της *Rhodotorula glutinis* 7 ημερών και diazinon, παρείχε την υποψία για την παραγωγή κάποιου μεταβολίτη. Μια πρώτη ταυτοποίηση του μεταβολίτη αυτού ως το 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP) πραγματοποιήθηκε τρέχοντας στην ίδια πλάκα TLC το τελικό έκλουσμα με υποψία βιοαποδόμησης και πρότυπα διαλύματα diazinon και 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP) και συγκρίνοντας τα ύψη ανίχνευσής τους (Εικόνα 4). Διαπιστώνεται ότι εφαρμόζοντας το σύστημα διαλυτών εξαίνιου: ακετόνης (80: 20) πραγματοποιήθηκε επιτυχής ανίχνευση και των δύο ουσιών.

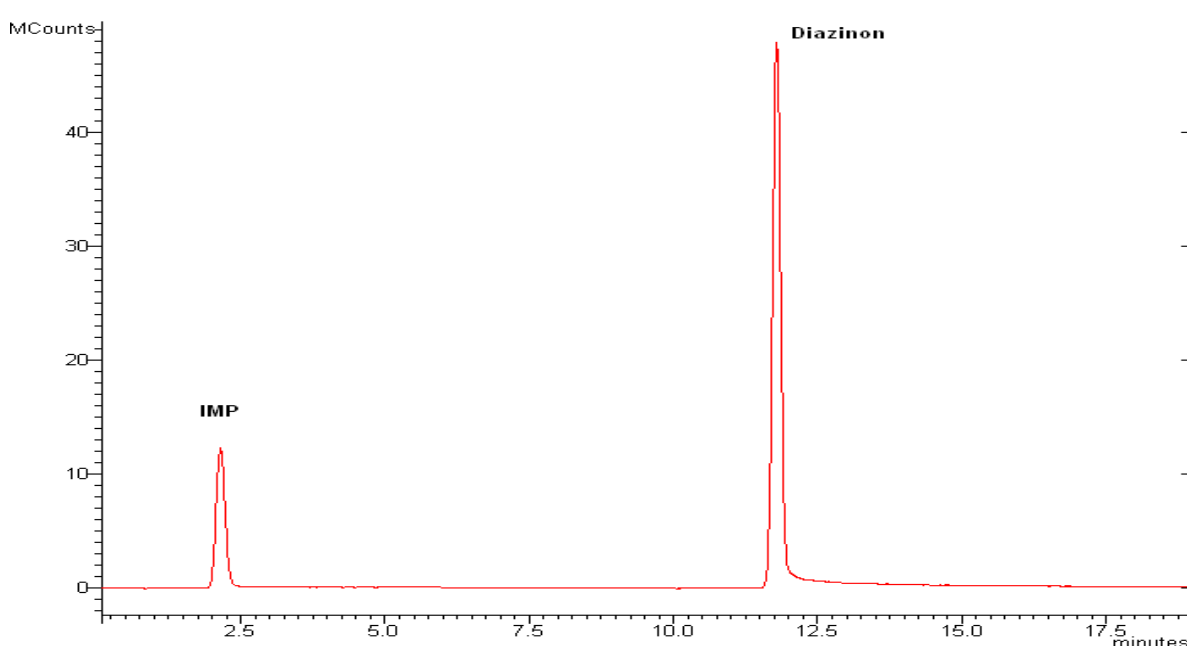


Εικόνα 4. Ανίχνευση των ουσιών diazinon και 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP) με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) έπειτα από επώαση της ζύμης *Rhodotorula glutinis* με diazinon σε υλικό ΥΠΒ για 7 ημέρες.

Η εικόνα που πήραμε από την καλλιέργεια ανάπτυξης της *Rhodotorula rubra* παρουσία diazinon ήταν παρόμοια.

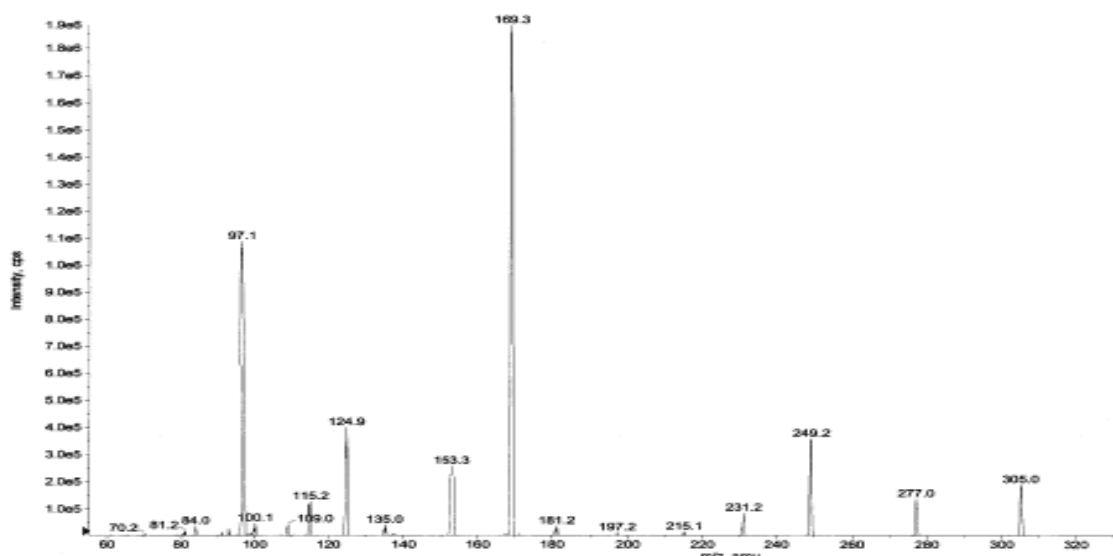
3.3.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού του δρώντος συστατικού diazinon και του μεταβολίτη 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP) με υγρή χρωματογραφία συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (LC/MS/MS)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απευθείας έγχυση (infusion) των δύο ουσιών στο χρωματογραφικό σύστημα με εφαρμογή θετικής μορφής ιονισμού ESI(+) και αποκτήθηκε το πλήρες φάσμα ιόντων για κάθε μία και στη συνέχεια επιλέχθηκαν οι καλύτερες μεταπτώσεις προσδιορισμού τους. Για το diazinon επιλέχθηκαν οι μεταπτώσεις m/z 305,1 > 169,1 και m/z 305,1 > 96,6, ενώ για το IMP οι μεταπτώσεις m/z 153 > 84 και m/z 153 > 70. Στο σχήμα 36 παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα ανίχνευσης των δύο ουσιών.



Σχήμα 36. Προσδιορισμός του diazinon και του μεταβολίτη του 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP) με εφαρμογή θετικής μορφής ιονισμού ESI(+) στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS.

Ο προσδιορισμός της ταυτότητας των ουσιών και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους πραγματοποιήθηκε με βάση την τεχνική συζευγμένης φασματομετρίας μαζών, με τη χρήση μεταπτώσεων (προδρόμου – παραγόμενου ιόντος) (Multiple Reaction Monitoring-MRMs). Το φάσμα του diazinon παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 37. Φάσμα του εντομοκτόνου diazinon στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS.

Οι χρόνοι κατακράτησης των δύο ουσιών, οι μεταπτώσεις προσδιορισμού τους, η ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy), η σχετική ένταση μεταπτώσεων καθώς και η τάση τριχοειδούς (capillary) παρουσιάζονται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20. Χρόνοι κατακράτησης των diazinon και 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP), κύρια θραύσματα, ενέργεια θραυσματοποίησης (V), σχετική ένταση μεταπτώσεων και τάση τριχοειδούς. Με έντονη γραφή παρουσιάζονται τα ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για ποσοτικό προσδιορισμό.

Ουσία	Χρόνος κατακράτησης (min)	Μεταπτώσεις (MRMs)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (collision energy) (V)	Σχετική ένταση μεταπτώσεων (% της βασικής μετάπτωσης)	Τάση τριχοειδούς (capillary) (V)
IMP	2,0	153 > 84	21	100	76
		153 > 70	25	69,4	76
Diazinon	11,6	305,1 >	29	100	21
		169,1	41	13	21
		305,1 > 96,6			

Η ταυτοποίηση (confirmation) των δύο αναλυτών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται

στην περίπτωση του chlorpyrifos.

3.3.2.3 Έλεγχος καταλληλότητας της μεθόδου

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο έλεγχος της καταλληλότητας της μεθόδου βασίστηκε σε δείγματα ελέγχου ποιότητας, τα οποία αποτελούσαν δείγματα θρεπτικού υλικού ΥΠΒ εμβολιασμένα με diazinon και IMP σε συγκεντρώσεις των 0,05, 0,1 και 0,5μg/mL. Τα κριτήρια αξιολόγησης της μεθόδου ήταν η ορθότητα, η πιστότητα και η ευαισθησία και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 21. Ανακτήσεις, σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) και σήμα προς θόρυβο (S/N) για τις ουσίες diazinon και 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP), έπειτα από τον εμβολιασμό θρεπτικού υλικού ΥΠΒ με κάθε ουσία σε συγκεντρώσεις 0,05, 0,1 και 0,5μg/mL σε 5 επαναλήψεις.

Ουσία	C (μg/mL)	Μέση Ανάκτηση (%)	RSD (%)	S/N ratio
Diazinon	0,05	95,6	0,34	47
	0,1	91,4	2,8	53
	0,5	100	1,59	112
IMP	0,05	85,2	3,55	17
	0,1	93,0	2,79	32
	0,5	96,6	2,06	51

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου (LOQ) ήταν το χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης, 0,05μg/mL και το όριο ανίχνευσης (LOD) 0,02μg/mL. Τόσο οι τιμές των ανακτήσεων όσο και οι τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων είναι αποδεκτές σύμφωνα με τα κριτήρια του SANCO 2007/3131 (ανακτήσεις 70-110% και $RSD \leq 20\%$), γεγονός που υποδεικνύει την αξιοπιστία και την καταλληλότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό του diazinon και του μεταβολίτη του IMP από το θρεπτικό υλικό (ΥΠΒ).

3.3.2.4 Βιοαποδόμηση του diazinon από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* σε συνάρτηση του χρόνου επώασης των καλλιεργειών και του μεγέθους του μολύσματος

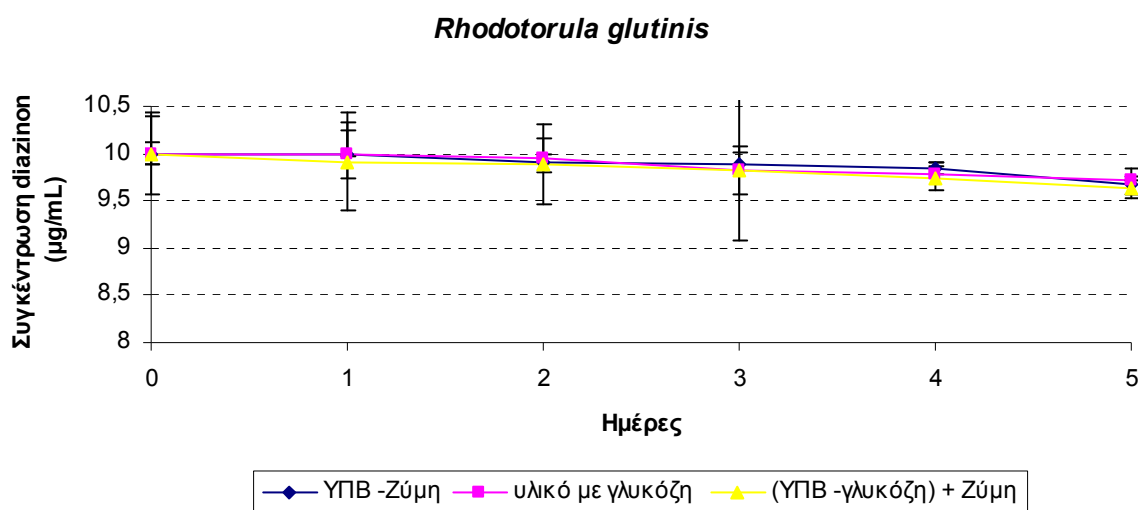
Η επίδραση της πληθυσμιακής πυκνότητας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στην ικανότητά τους να αποδομεί το diazinon μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τη χαμηλή συγκέντρωση του δρώντος συστατικού, δηλαδή τα 10μg/mL. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται αρχικά στους πίνακες που ακολουθούν και στη συνέχεια απεικονίζονται στα αντίστοιχα σχήματα.

- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10^2 κύτταρα/ mL – φόρτιση diazinon 10μg/mL

Τα αποτελέσματα από τη χρήση καλλιέργειας ζύμης με πληθυσμό 10^2 κύτταρα/mL παρουσιάζονται στον πίνακα και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

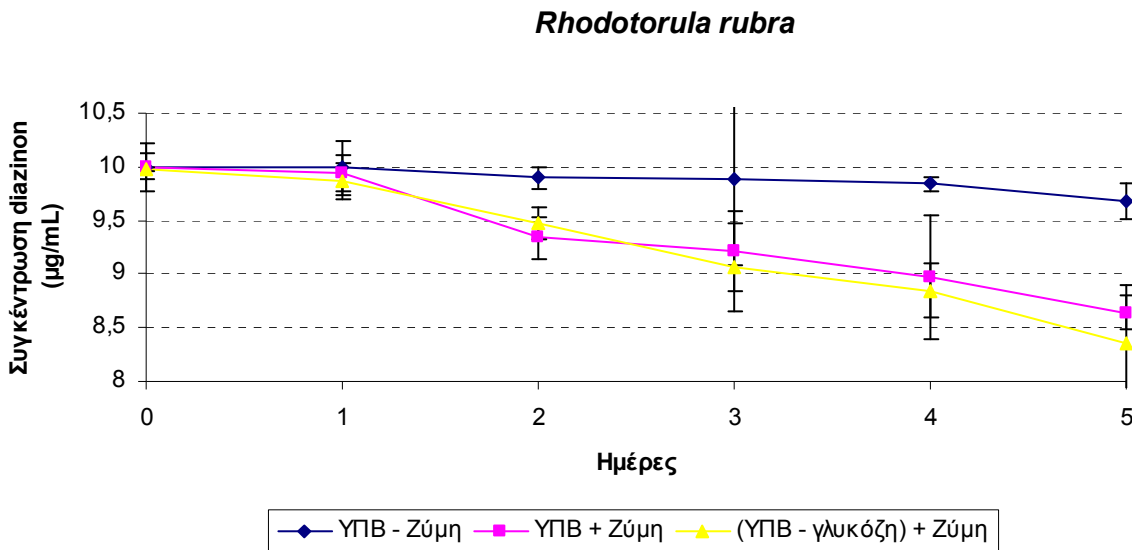
Πίνακας 22. Αποδόμηση του diazinon από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^2 κύτταρα/mL ζύμης και 10μg/mL diazinon. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση του diazinon ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση diazinon (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)		
	ΥΠΒ – Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη	(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη
<i>Rhodotorula glutinis</i>			
0+	10 ± 1,24	10 ± 3,84	10 ± 4,32
1	9,99 ± 2,50	10 ± 3,31	9,91 ± 5,23
2	9,9 ± 1,02	9,94 ± 2,22	9,89 ± 4,31
3	9,88 ± 8,09	9,83 ± 1,87	9,82 ± 2,56
4	9,84 ± 0,63	9,79 ± 1,09	9,74 ± 1,34
5	9,68 ± 1,65	9,72 ± 0,29	9,64 ± 0,85
<i>Rhodotorula rubra</i>			
0+	10 ± 1,24	10 ± 2,26	9,98 ± 0,24
1	9,99 ± 2,50	9,94 ± 1,71	9,86 ± 1,72
2	9,9 ± 1,02	9,34 ± 2,08	9,47 ± 1,54
3	9,88 ± 8,09	9,21 ± 4,09	9,07 ± 4,51
4	9,84 ± 0,63	8,97 ± 6,54	8,84 ± 2,85
5	9,68 ± 1,65	8,64 ± 1,79	8,36 ± 6,31



Σχήμα 38. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^2 κύτταρα/mL ζύμης και 10μg/mL

diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.



Σχήμα 39. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με και χωρίς γλυκόζη) 10^2 κύτταρα/mL ζύμης και $10\mu\text{g/mL}$ diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται πως υπάρχει σταδιακή μικρή υποβάθμιση των επιπέδων του diazinon στο θρεπτικό υλικό το οποίο δεν περιέχει ζύμη παρά μόνο το φυτοπροστατευτικό προϊόν. Η μείωση αυτή της συγκέντρωσης αποδίδεται στην αβιοτική υδρόλυση του στο θρεπτικό υλικό και είναι συγκρίσιμη με την αντίστοιχη στις κωνικές φιάλες που περιέχουν και ζύμη. Κατά συνέπεια η πληθυσμιακή πυκνότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* της τάξης των 10^2 κυττάρων/mL δεν ήταν ικανή για να μειώσει τα επίπεδα του diazinon στη χαμηλή συγκέντρωση των $10\mu\text{g/mL}$ και χρόνο επώασης 5 ημερών. Προφανώς για την εμφάνιση του φαινομένου της βιοαποδόμησης και στο συγκεκριμένο μόλυσμα απαιτείται περισσότερος των 5 ημερών χρόνος επώασης.

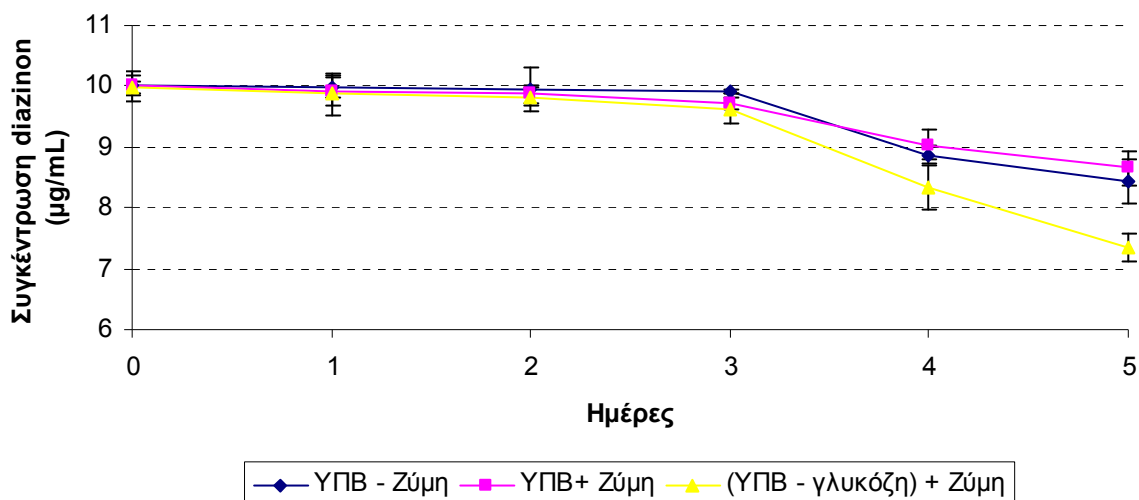
- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10^4 κύτταρα/ mL – φόρτιση diazinon 10 μ g/mL

Τα αποτελέσματα από τη χρήση καλλιέργειας ζύμης με πληθυσμό 10^4 κύτταρα/mL παρουσιάζονται στον πίνακα και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

Πίνακας 23. Αποδόμηση του diazinon από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και 10 μ g/mL diazinon. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση του diazinon ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

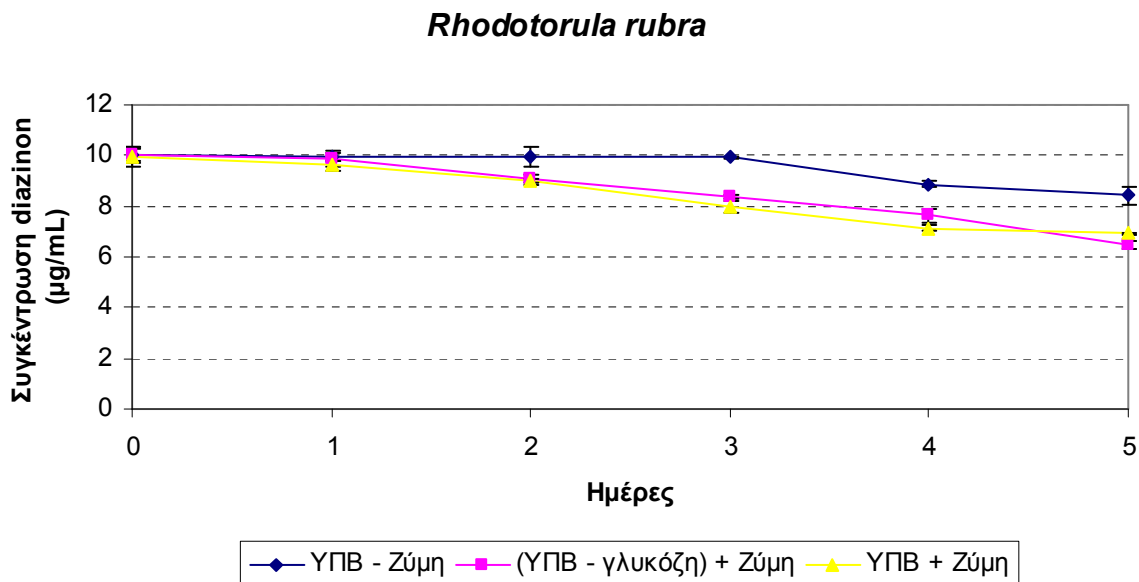
Ημέρες	Συγκέντρωση diazinon (μ g/mL) \pm Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)		
	ΥΠΒ – Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη	(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη
<i>Rhodotorula glutinis</i>			
0+	10 \pm 2,34	10 \pm 1,67	9,98 \pm 1,023
2	9,98 \pm 1,73	9,92 \pm 2,54	9,87 \pm 3,43
4	9,94 \pm 3,71	9,87 \pm 1,45	9,82 \pm 1,47
6	9,91 \pm 0,24	9,72 \pm 0,98	9,63 \pm 2,57
8	8,87 \pm 1,64	9,03 \pm 2,75	8,34 \pm 4,34
10	8,43 \pm 4,37	8,65 \pm 3,09	7,35 \pm 2,99
<i>Rhodotorula rubra</i>			
0+	10 \pm 2,34	10,02 \pm 3,41	9,97 \pm 4,07
2	9,98 \pm 1,73	9,83 \pm 3,07	9,62 \pm 2,05
4	9,94 \pm 3,71	9,04 \pm 2,22	8,99 \pm 1,07
6	9,91 \pm 0,24	8,34 \pm 1,59	8,01 \pm 3,57
8	8,87 \pm 1,64	7,63 \pm 3,45	7,14 \pm 1,97
10	8,43 \pm 4,37	6,48 \pm 2,04	6,94 \pm 0,56

Rhodotorula glutinis



Σχήμα 40. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και $10\mu\text{g/mL}$ diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Στην πληθυσμιακή πυκνότητα της *Rhodotorula glutinis* των 10^4 κύτταρα/mL, στο υλικό που περιείχε γλυκόζη, παρατηρήθηκε σχετική μείωση της συγκέντρωσης του diazinon στις κωνικές φιάλες που περιείχαν τη ζύμη, η οποία, όμως, δε διαφέρει από εκείνη που καταγράφεται στην κωνική μάρτυρα του φπ, λόγω αβιοτικής υδρόλυσης του. Στην περίπτωση του θρεπτικού υλικού χωρίς γλυκόζη η δράση της ζύμης εμφανίζει μείωση των επιπέδων του diazinon και κατά συνέπεια ως πρώτο, πρώιμο ίσως, αποτέλεσμα θα μπορούσε να διατυπωθεί πως η ζύμη εμφανίζει την ικανότητα βιοαποδόμησης του diazinon. Η ένδειξη αυτή θα επιβεβαιωθεί ή όχι από τα επόμενα αποτελέσματα. Επιπλέον, δεν ανιχνεύτηκε κάποιο προϊόν διάσπασης του diazinon.



Σχήμα 41. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και $10\mu\text{g/mL}$ diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Στην πληθυσμιακή πυκνότητα της *Rhodotorula rubra* των 10^4 κύτταρα/mL παρατηρήθηκε υποβάθμιση στην αρχική συγκέντρωση του diazinon από τη 2^η ημέρα του πειράματος και στα δύο είδη θρεπτικού υλικού. Η υποβάθμιση αυτή συνεχίστηκε έως και την 5^η ημέρα, τελευταία δειγματοληψία. Στο τέλος των μετρήσεων παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του diazinon κατά 35,32% στο θρεπτικό υλικό που περιείχε γλυκόζη και 30,4% στο υλικό χωρίς γλυκόζη. Δεν ανιχνεύτηκε κάποιο προϊόν διάσπασης του diazinon. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει η ένδειξη σχετικά με το ότι η ζύμη *Rhodotorula rubra* παρουσιάζει όμοια δράση στη μικροβιακή αποδόμηση του diazinon και στα δύο είδη θρεπτικού υλικού (με ή χωρίς

γλυκόζη), με ίσως πιο αυξημένο ρυθμό βιοαποδόμησης στο υλικό με γλυκόζη.

- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10^6 κύτταρα/mL – φόρτιση diazinon 10μg/mL

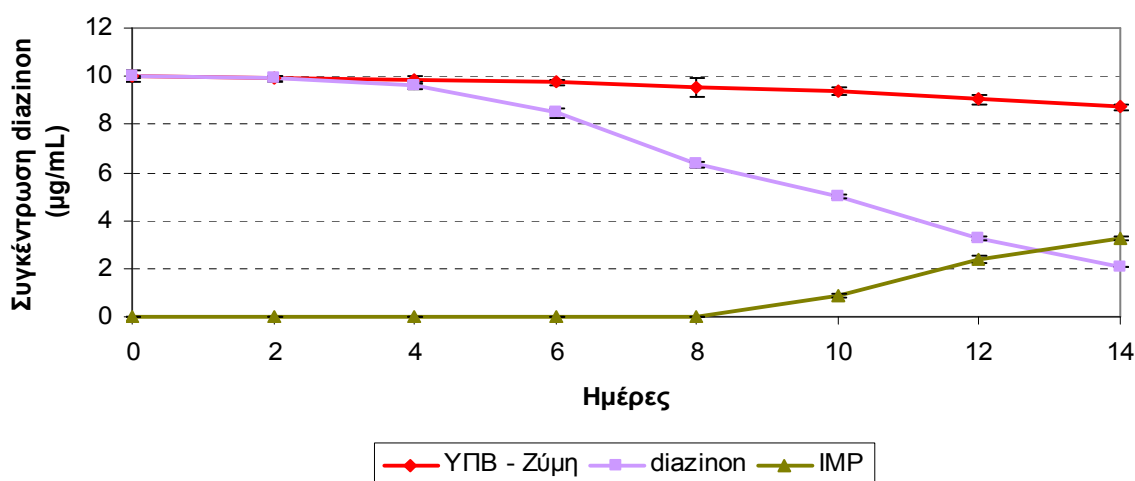
Έπειτα από επώαση καλλιιεργειών των ζυμών αρχικής πληθυσμιακής πυκνότητας 10^6 κύτταρα/mL με 10μg/mL chlorpyrifos στο θρεπτικό υλικό παρατηρήθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 24 και τα σχήματα 42 έως 45.

Πίνακας 24. Αποδόμηση του diazinon από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 10μg/mL diazinon. Παραγωγή μεταβολίτη IMP. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των diazinon και IMP ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) Diazinon και IMP ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)				
	ΥΠΒ – Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη		(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη	
		Diazinon	IMP	Diazinon	IMP
<i>Rhodotorula glutinis</i>					
0+	10 ± 2,40	9,99 ± 0,33	MA	10,01 ± 3,53	MA
2	9,94 ± 0,79	9,91 ± 1,07	MA	9,54 ± 2,46	MA
4	9,84 ± 1,54	9,64 ± 1,54	MA	8,13 ± 3,90	MA
6	9,76 ± 1,24	8,47 ± 2,33	MA	7,06 ± 0,87	0,08 ± 4,62
8	9,06 ± 4,26	6,32 ± 1,82	MA	6,54 ± 1,00	1,54 ± 5,07
10	8,98 ± 1,77	5,01 ± 1,47	0,89 ± 3,2	4,07 ± 4,07	3,6 ± 3,91
12	8,62 ± 2,01	3,24 ± 3,07	2,41 ± 4,53	1,05 ± 1,06	5,72 ± 3,06
14	8,02 ± 1,37	2,05 ± 1,09	3,24 ± 3,01	MA	5,34 ± 7,53
<i>Rhodotorula rubra</i>					
0+	10 ± 2,40	10,02 ± 3,05	MA	9,99 ± 3,74	MA
2	9,94 ± 0,79	9,63 ± 1,39	0,08 ± 4,08	8,35 ± 1,93	MA
4	9,84 ± 1,54	6,54 ± 1,99	1,34 ± 0,41	7,68 ± 3,22	0,11 ± 4,22
6	9,76 ± 1,24	3,23 ± 3,57	2,54 ± 7,62	4,71 ± 2,06	1,58 ± 2,06
8	9,06 ± 4,26	MA	4,54 ± 2,97	1,84 ± 4,07	2,89 ± 5,43
10	8,98 ± 1,77	MA	4,13 ± 4,62	MA	3,62 ± 5,08
12	8,62 ± 2,01	MA	4,33 ± 1,74	MA	3,55 ± 1,07
14	8,02 ± 1,37	MA	4,28 ± 9,31	MA	3,73 ± 7,06

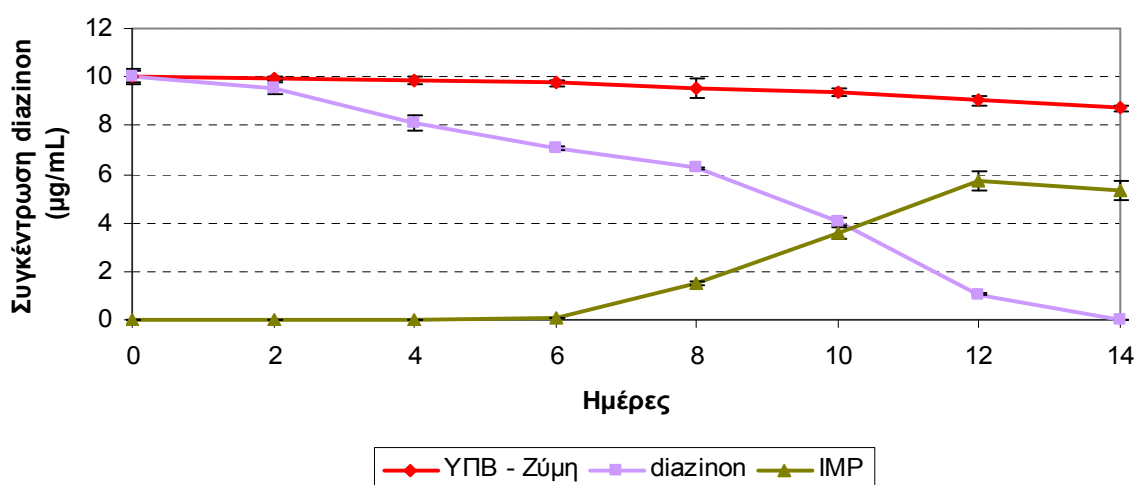
MA: Μη Ανιχνεύσιμα υπολείμματα

Rhodotorula glutinis - Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 42. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 10µg/mL diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula glutinis - Υλικό χωρίς γλυκόζη

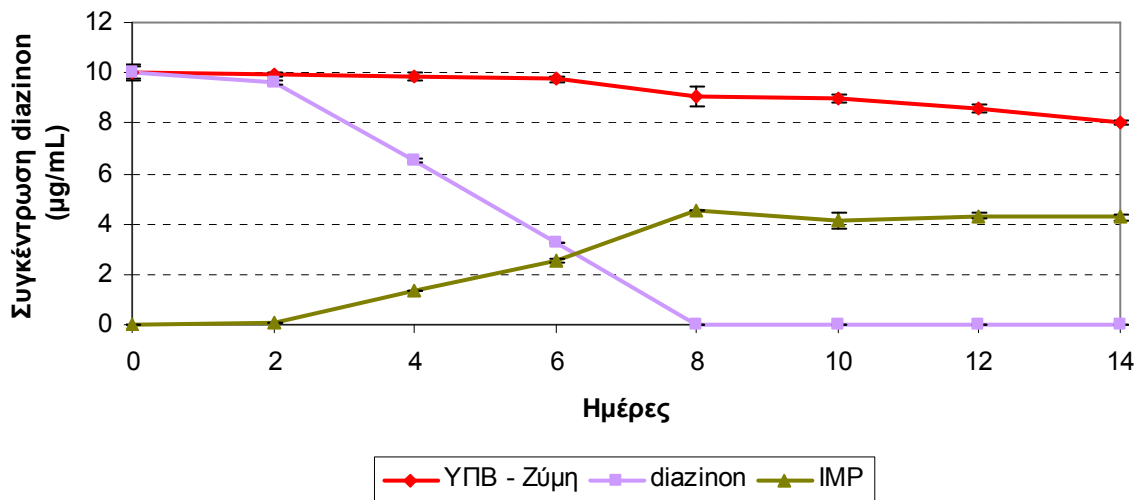


Σχήμα 43. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 10µg/mL diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Όπως παρατηρείται, όπως και στην περίπτωση του φυτοπροστατευτικού προϊόντος chlorpyrifos, η παρουσία ή μη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης της ζύμης *Rhodotorula glutinis* επιδρά στην ικανότητά της να αποδομεί το diazinon. Παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό η ζύμη εμφάνισε δράση αποδομητή ουσιαστικά έπειτα από την 4^η ημέρα του πειράματος. Μετά την 3^η δειγματοληψία η συγκέντρωση του diazinon μειώθηκε χωρίς, όμως, τα αποθέματα του να εξαντληθούν έως το πέρας των δειγματοληψιών. Κατά τη

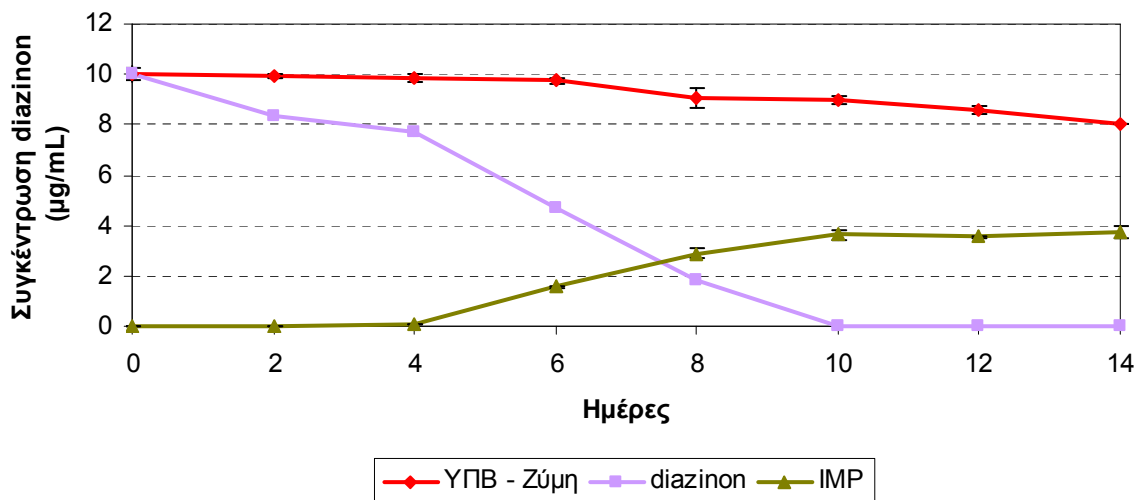
μέτρηση της 10¹⁵ ημέρας ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης IMP, ο οποίος παρουσίασε μέγιστη συγκέντρωση στην τελευταία δειγματοληψία (14^η ημέρα), της τάξης των 3,24μg/mL. Στο θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει γλυκόζη η μικροβιακή αποδόμηση του diazinon διαπιστώθηκε τη 2^η ημέρα του πειράματος και ολοκληρώθηκε την 14^η ημέρα (τελευταία δειγματοληψία), κατά την οποία δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα diazinon. Από την 6^η ημέρα παρατηρήθηκε και η παραγωγή του μεταβολίτη IMP και η συγκέντρωσή του σημείωσε μέγιστο την 12^η ημέρα (5,72μg/mL).

Rhodotorula rubra - Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 44. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με γλυκόζη) 10⁶ κύτταρα/mL ζύμης και 10μg/mL diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula rubra - Υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 45. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (χωρίς γλυκόζη) 10⁶ κύτταρα/mL ζύμης και 10μg/mL diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Όσον αφορά τη *Rhodotorula rubra* στο θεραπευτικό υλικό με γλυκόζη η αποδόμηση του diazinon ξεκίνησε την 2^η προς 4^η ημέρα του πειράματος και τα αποθέματά του εξαντλήθηκαν την 8^η ημέρα, σημειώνοντας ρυθμό βιοαποδόμησης 1,25μg/mL/ημέρα. Έπειτα από την 2^η ημέρα ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης IMP. Τα επίπεδα του IMP άγγιζαν το μέγιστό τους την 8^η ημέρα και ήταν της τάξης των 4,54μg/mL και παρέμειναν σχεδόν σταθερά έως το τέλος του πειράματος.

Στο θεραπευτικό υλικό χωρίς γλυκόζη, στο οποίο το diazinon παρέχεται στη ζύμη ως η μόνη πηγή άνθρακα, η αποδόμηση του diazinon ξεκίνησε από την 2^η ημέρα του πειράματος (2^η δειγματοληψία) και τα αποθέματά του εξαντλήθηκαν κατά την 10^η ημέρα, σημειώνοντας ρυθμό βιοαποδόμησης 0,99μg/mL/ημέρα. Από την 6^η ημέρα επίσης ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης IMP. Τα επίπεδα του IMP άγγιζαν το μέγιστό τους την 10^η ημέρα και ήταν της τάξης των 3,62μg/mL, τιμή χαμηλότερη της αντίστοιχης στο υλικό με γλυκόζη. Από τη σύγκριση των παραπάνω διαγραμμάτων διαπιστώνουμε πως η *Rhodotorula rubra* εμφάνισε εντονότερη δράση αποδομητή στην περίπτωση που στο θεραπευτικό υλικό είχε προηγηθεί προσθήκη γλυκόζης.

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι έπειτα από την πλήρη αποδόμηση του diazinon ουσιαστικά η μόνη πηγή άνθρακα η οποία παρέχεται στις ζύμες είναι ο μεταβολίτης IMP και δεδομένου ότι τα επίπεδα του δε μειώθηκαν έως το πέρας του πειράματος, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε πως οι ζύμες *Rhodotorula* δεν έχουν τη δυνατότητα να το αποδομούν.

Όσον αφορά την επίδραση της πληθυσμιακής πυκνότητας των δύο ζυμών στην ικανότητά τους να αποδομούν το diazinon, εκείνη των 10⁶ κύτταρα/mL ήταν η πιο ενεργή. Σε μόλυσμα ζύμης χαμηλότερο των 10⁴ κύτταρα/mL δεν παρατηρήθηκε ή παρατηρήθηκε σε χαμηλό βαθμό μικροβιακή αποδόμηση.

3.3.2.5 Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του diazinon στο ρυθμό αποδόμησης του από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

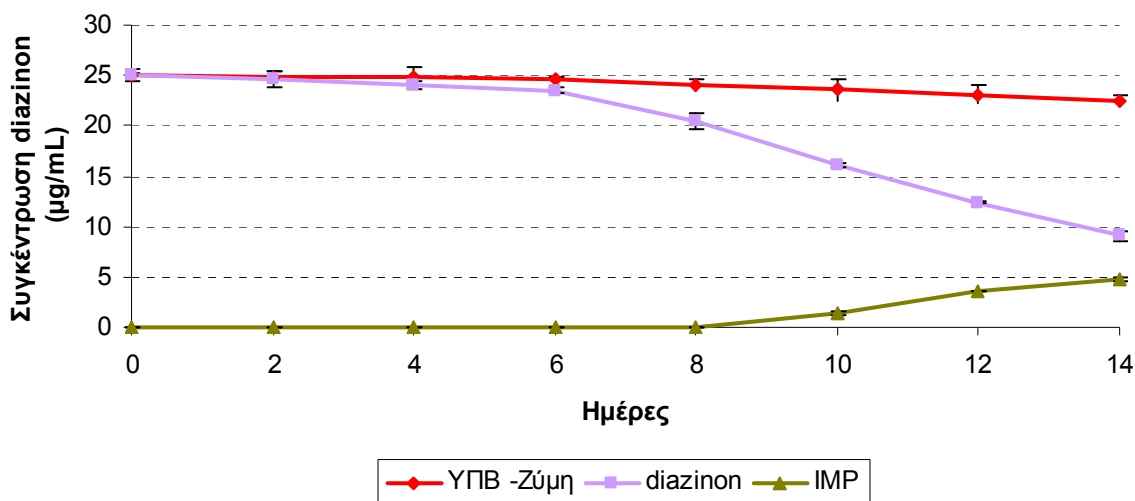
Σε θρεπτικό υλικό με πληθυσμιακή πυκνότητα των ζυμών 10^6 κύτταρα /mL, στην οποία παρατηρήθηκε ο υψηλότερος ρυθμός βιοαποδόμησης προστέθηκαν 25μg/mL diazinon. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

Πίνακας 24. Αποδόμηση του diazinon από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25μg/mL diazinon. Παραγωγή μεταβολίτη IMP. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των diazinon και IMP ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) Diazinon και IMP \pm Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)				
	ΥΠΒ - Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη		(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη	
		Diazinon	IMP	Diazinon	IMP
<i>Rhodotorula glutinis</i>					
0+	25 \pm 1,04	25,02 \pm 2,67	MA	24,98 \pm 0,64	MA
2	24,82 \pm 2,32	24,62 \pm 3,04	MA	21,33 \pm 2,09	MA
4	24,8 \pm 4,07	24 \pm 1,72	MA	17,04 \pm 1,06	MA
6	24,66 \pm 0,74	23,54 \pm 0,89	MA	12,37 \pm 2,09	1,47 \pm 0,74
8	24 \pm 2,34	20,5 \pm 3,64	MA	7,06 \pm 3,53	4,62 \pm 4,51
10	23,6 \pm 4,68	16,09 \pm 1,53	1,42 \pm 7,04	3,62 \pm 1,47	7,62 \pm 1,93
12	23,12 \pm 3,69	12,39 \pm 0,99	3,54 \pm 1,22	MA	9,82 \pm 0,93
14	22,54 \pm 2,07	9,04 \pm 6,59	4,83 \pm 3,86	MA	10,4 \pm 6,52
<i>Rhodotorula rubra</i>					
0+	25 \pm 1,04	24,99 \pm 6,22	MA	24,97 \pm 1,04	MA
2	24,82 \pm 2,32	20,84 \pm 1,07	0,09 \pm 6,43	23,8 \pm 4	MA
4	24,8 \pm 4,07	16,54 \pm 3,24	2,74 \pm 3,24	20,52 \pm 5,22	MA
6	24,66 \pm 0,74	14,00 \pm 6,07	5,43 \pm 2,07	17,64 \pm 3,08	0,22 \pm 1,76
8	24 \pm 2,34	10,54 \pm 0,68	6,22 \pm 4,74	13,42 \pm 7,04	1,53 \pm 6,54
10	23,6 \pm 4,68	5,07 \pm 6,38	8,37 \pm 2,63	7,65 \pm 2,11	3,36 \pm 3,07
12	23,12 \pm 3,69	MA	11,31 \pm 5,01	3,22 \pm 5,03	6,24 \pm 1,47
14	22,54 \pm 2,07	MA	11,54 \pm 3,07	MA	6,02 \pm 1,54

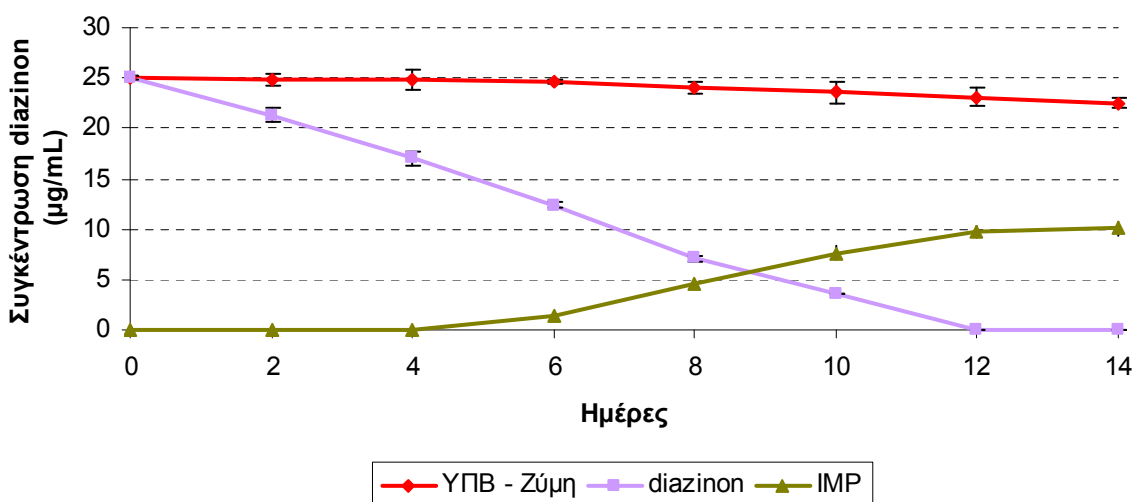
MA: Μη Ανιχνεύσιμα υπολείμματα

Rhodotorula glutinis - Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 46. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula glutinis - Υλικό χωρίς γλυκόζη



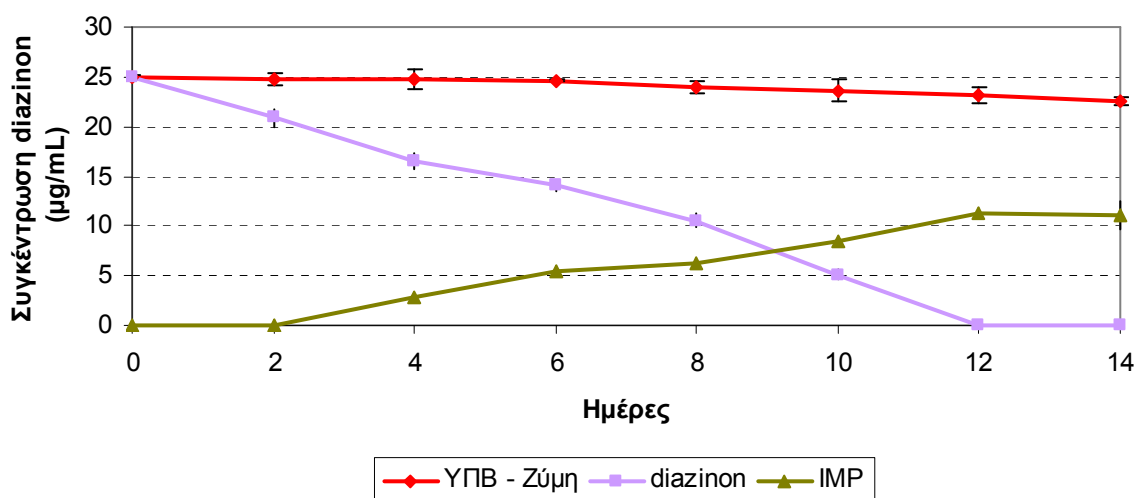
Σχήμα 47. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Όσον αφορά τη *Rhodotorula glutinis* στο θρεπτικό υλικό με γλυκόζη δεν πραγματοποιήθηκε καθόλου αποδόμηση του diazinon κατά τις 4 πρώτες ημέρες του πειράματος, ενώ μετρήσιμα ποσοστά αποδόμησης παρατηρήθηκαν έπειτα από την 6^η ημέρα. Μετά την 9^η ημέρα, όμως, τα αποθέματα του μειώθηκαν ταχύτατα φτάνοντας κατά την 14^η ημέρα στη συγκέντρωση των 9,04µg/mL παρουσιάζοντας μείωση κατά 63,84% της αρχικής χορηγηθείσας συγκέντρωσης. Έπειτα από την 8^η ημέρα ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης IMP, τα επίπεδα του

οποίου παρουσίασαν μέγιστο την 14^η ημέρα (4,83μg/mL). Στο θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη, η αποδόμηση του diazinon ξεκίνησε από την 2^η ημέρα του πειράματος και την 12^η ημέρα δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα. Από την 4^η δειγματοληψία επίσης ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης IMP. Τα επίπεδα του IMP άγγιξαν το μέγιστό τους την 14^η ημέρα και ήταν της τάξης των 10,4μg/mL

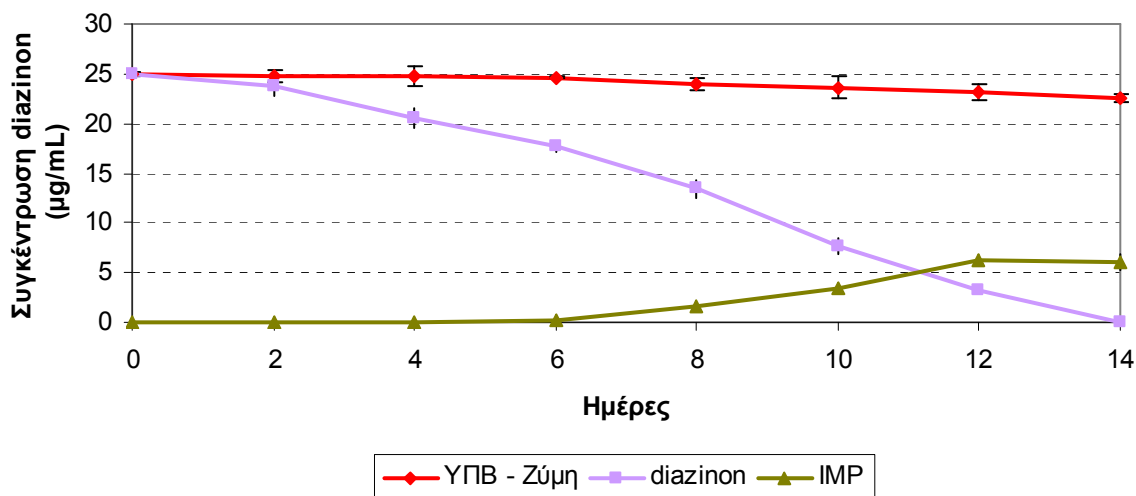
Η αύξηση της συγκέντρωσης του φυτοπροστατευτικού προϊόντος στο υλικό χωρίς γλυκόζη είχε ως συνέπεια και την αύξηση του ρυθμού αποδόμησής του. Στη συγκέντρωση diazinon 10μg/mL υπολογίστηκε ρυθμός βιοαποδόμησης 0,72μg/mL/ημέρα ενώ η αντίστοιχη τιμή στη συγκέντρωση diazinon 25μg/mL ήταν 2,1μg/mL/ημέρα. Επίσης η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης φόρτισης του diazinon στο θρεπτικό υλικό οδήγησε και σε αυξημένες παραγόμενες συγκεντρώσεις του μεταβολίτη IMP.

Rhodotorula rubra - Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 48. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25μg/mL diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula rubra - Υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 49. Μείωση επιπέδων του diazinon από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25μg/mL diazinon. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

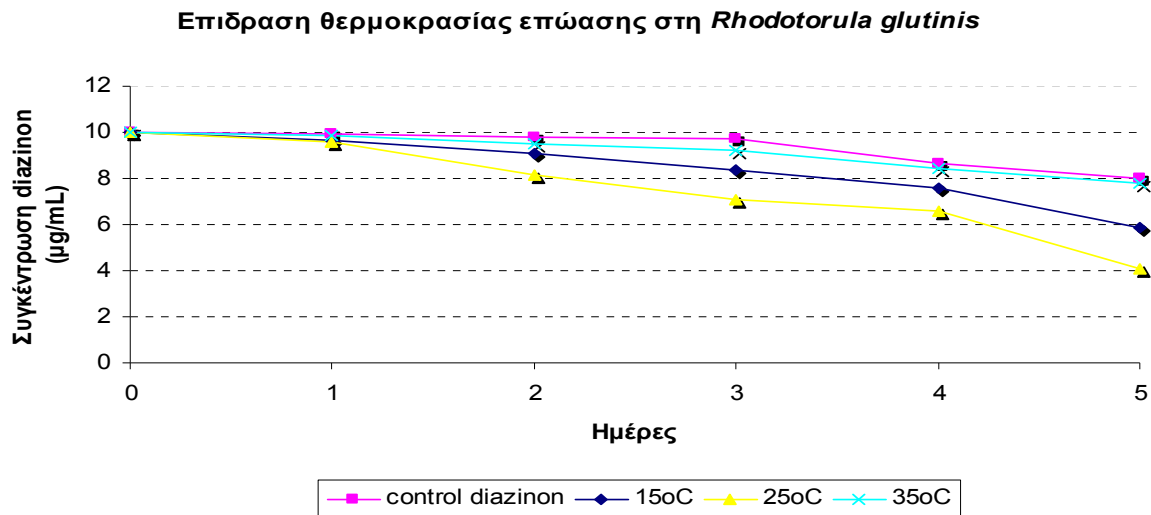
Στην περίπτωση της *Rhodotorula rubra* στο θρεπτικό υλικό με γλυκόζη η αποδόμηση του diazinon ξεκίνησε από την 2^η ημέρα του πειράματος και τα αποθέματά του εξαντλήθηκαν έπειτα από την 12^η ημέρα, παρουσιάζοντας ρυθμό αποδόμησης ίσο με 2,4μg/mL/ημέρα. Από την 2^η ημέρα επίσης ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης IMP. Τα επίπεδα του IMP άγγιζαν το μέγιστό τους την 14^η ημέρα και ήταν της τάξης των 11,54μg/mL. Στο θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη, στο οποίο το diazinon παρέχεται στη ζύμη ως η μόνη πηγή άνθρακα, η αποδόμηση του diazinon ξεκίνησε από την 2^η ημέρα του πειράματος και τα αποθέματά του εξαντλήθηκαν την 14^η ημέρα, παρουσιάζοντας ρυθμό αποδόμησης ίσο με 1,78μg/mL/ημέρα. Έπειτα από την 6^η ημέρα επίσης ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης IMP. Τα επίπεδα του IMP άγγιζαν το μέγιστό τους την 12^η ημέρα και ήταν της τάξης των 6,24μg/mL, τιμή χαμηλότερη της αντίστοιχης στο υλικό με γλυκόζη.

Η αύξηση της συγκέντρωσης του φυτοπροστατευτικού προϊόντος είχε ως συνέπεια και την αύξηση του ρυθμού αποδόμησης του. Επίσης η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης φόρτισης του diazinon στο θρεπτικό υλικό οδήγησε και σε αυξημένες παραγόμενες συγκεντρώσεις του μεταβολίτη IMP.

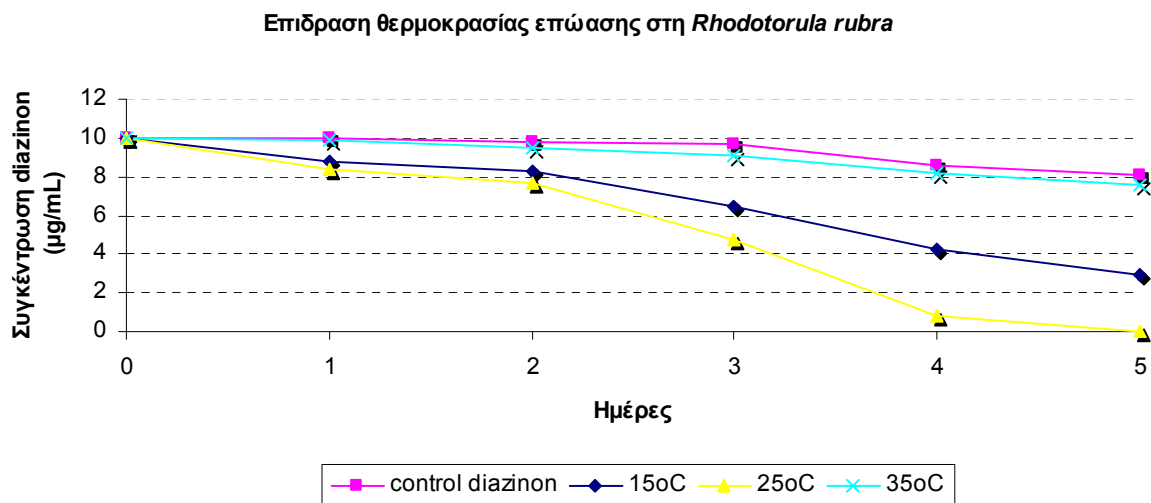
Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την υπόθεση ότι οι ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* δεν αποδομούν το μεταβολίτη IMP.

3.3.2.6 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη βιοαποδόμηση του diazinon από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

Το φαινόμενο της βιοαποδόμησης μελετήθηκε στις θερμοκρασίες επώασης των καλλιιεργειών 15°C, 25°C και 35°C. Το μόλυσμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10⁶ κύτταρα/mL και η συγκέντρωση του diazinon στα 10μg/mL, ενώ το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης της καλλιέργειας ήταν χωρίς γλυκόζη. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνοψίζονται στα διαγράμματα που ακολουθούν:



Σχήμα 50. Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης της ζύμης *Rhodotorula glutinis* στη βιοαποδόμηση του chlorpyrifos.



Σχήμα 51. Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης της ζύμης *Rhodotorula rubra* στη βιοαποδόμηση του chlorpyrifos.

Όπως και στην περίπτωση του chlorpyrifos, η θερμοκρασία επώασης στην οποία παρατηρήθηκε η βέλτιστη ικανότητα των ζυμών να αποδομούν το diazinon είναι οι 25°C, με επόμενη εκείνη των 15°C. Στους 35°C δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καθόλου αποδόμηση.

3.3.3 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης του diazinon σε βιοχημικό επίπεδο

3.3.3.1 Επίδραση του diazinon στην ενεργότητα των ενζυμικών συστημάτων βιοαποδόμησης

Έπειτα από την προσθήκη του diazinon στις ενζυμικές δοκιμές που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 2.6, παρατηρήθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

➤ Επίδραση του diazinon στην ενεργότητα των μεταφορασών της γλουταθειόνης

Στο πρωτόκολλο πειραματισμού της παραγράφου 2.6.1.3 προστέθηκαν διαδοχικά 23μM, 33μM, 46μM, 59μM, 66μM και 79μM diazinon και έπειτα από μετρήσεις στο σπεκτροφωτόμετρο στα 340nm κινητικά κάθε 2 λεπτά, προέκυψε για κάθε ζύμη:

Πίνακας 25. Επίδραση του diazinon στην ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος των μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs) των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*.

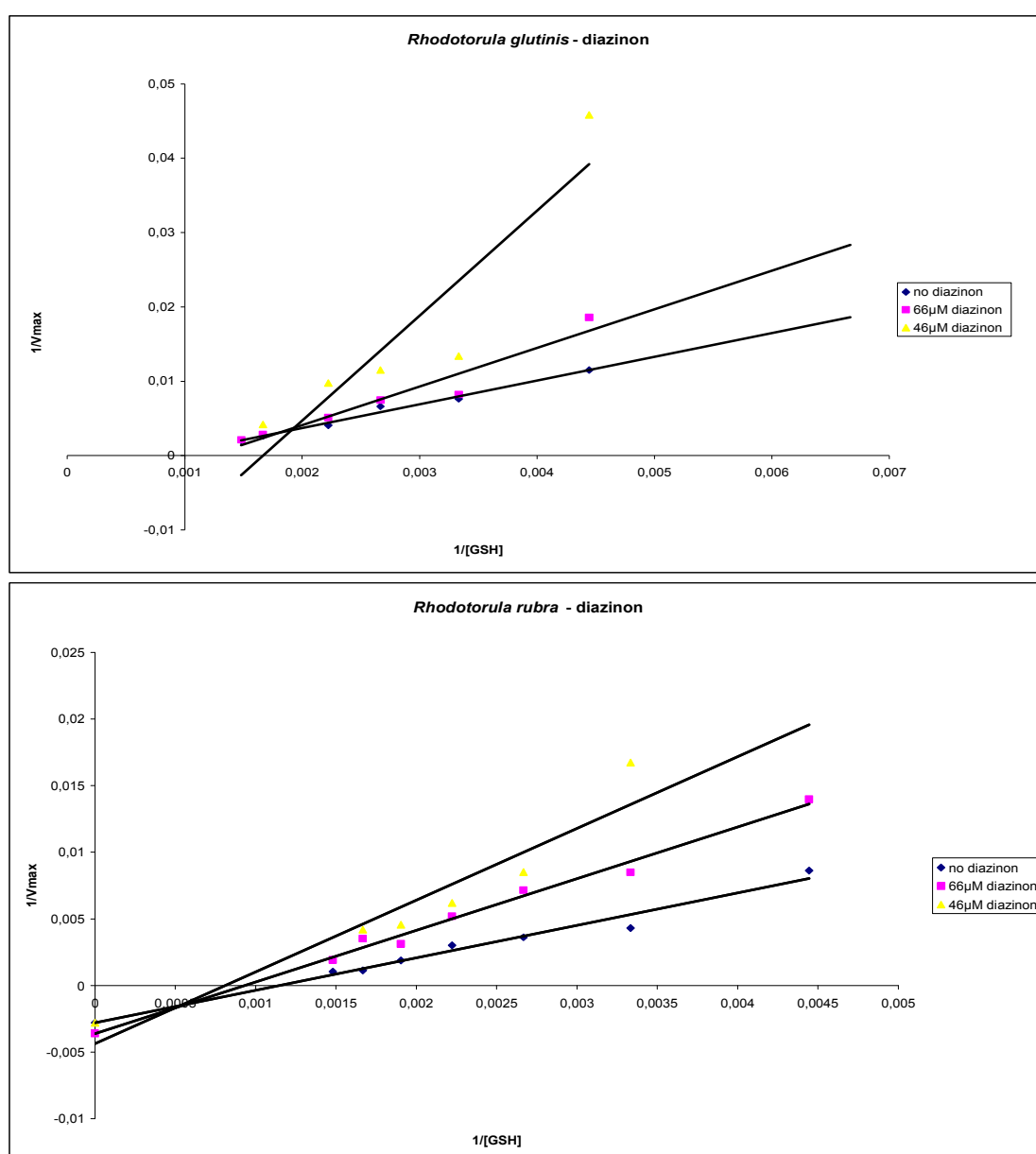
Ζύμη	Συγκέντρωση diazinon (μM)	Ενεργότητα (μmol/min/ μg πρωτεΐνης)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	5,427
	23	5,067
	33	4,758
	46	2,254
	59	2,054
	66	-0,834
	79	-1,456
<i>Rhodotorula rubra</i>	0	8,188
	23	7,095
	33	5,211
	46	5,017
	59	3,506
	66	0,594
	79	-0,935

Φανερή είναι από τις τιμές του πίνακα η επίδραση του diazinon στην ενεργότητα των GSTs και των δύο ζυμών. Οι τιμές της ενεργότητας μειώθηκαν έπειτα από την προσθήκη του εντομοκτόνου, έτσι ώστε το diazinon να θεωρείται αναστολέας του ενζυμικού συστήματος των μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs). Σημαντική κρίνεται επίσης και η παρατήρηση της αυξημένης ενεργότητας των GSTs στη ζύμη *Rhodotorula rubra* (απουσία εντομοκτόνου μετρήθηκε ενεργότητα 8,188μmol/min/μg πρωτεΐνης) συγκριτικά με την αντίστοιχη στη *Rhodotorula glutinis* (απουσία εντομοκτόνου μετρήθηκε ενεργότητα 5,427μmol/min/μg πρωτεΐνης). Από τις τιμές του Πίνακα 25 υπολογίστηκαν και οι τιμές της IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration -IC₅₀), οι οποίες ήταν:

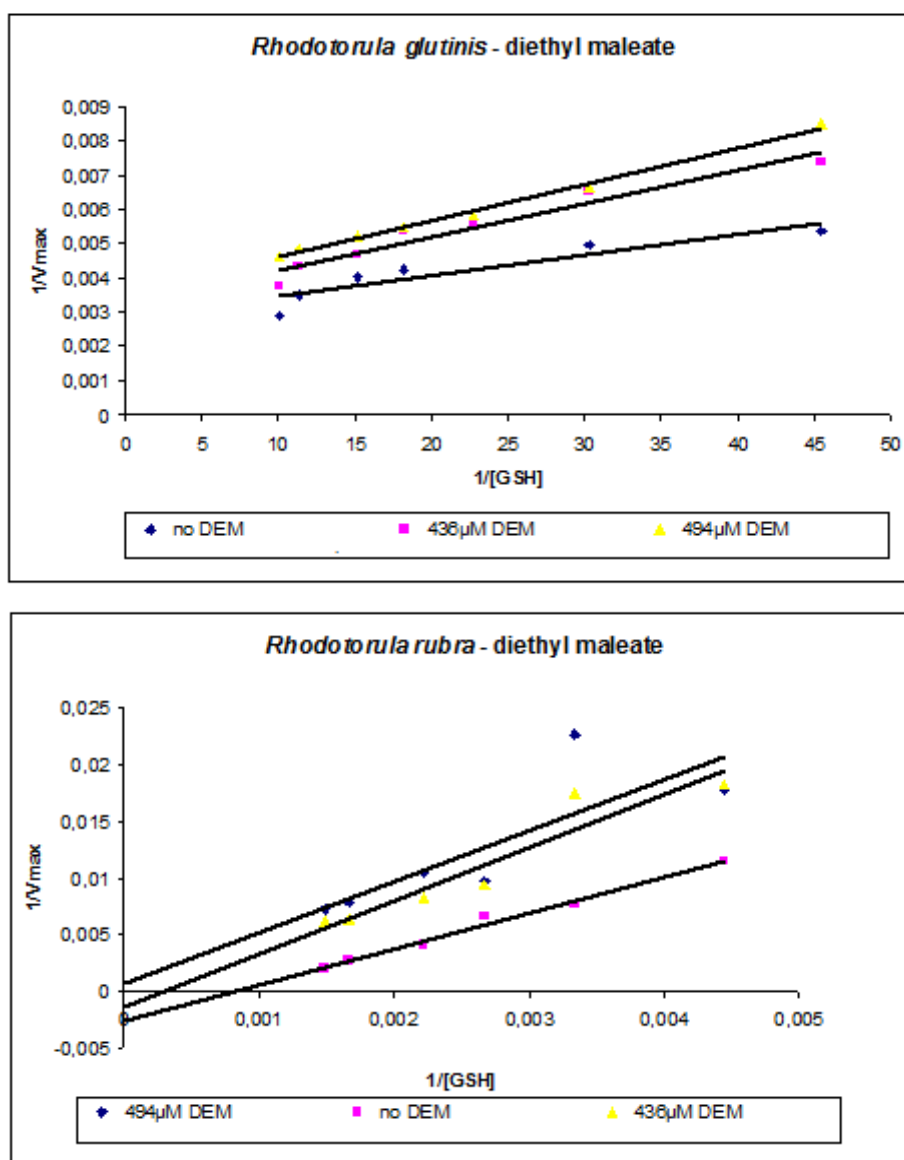
- *Rhodotorula rubra*: $IC_{50}=52\mu M$ και
- *Rhodotorula glutinis*: $IC_{50}=39\mu M$.

Δηλαδή, $52\mu M$, δηλαδή και $39\mu M$ diazinon προκαλούν παρεμπόδιση στην ενεργότητα των GSTs κατά 50% στις ζύμες *Rhodotorula rubra* και *Rhodotorula glutinis*, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδεικτικά πιθανής αλληλεπίδρασης του diazinon με το ενεργό κέντρο πρόσδεσης στο υπόστρωμα (GSH).

Για το εντομοκτόνο diazinon και το συνεργιστικό παράγοντα diethyl maleate έγινε προσπάθεια ελέγχου της κινητικής της παρεμπόδισης των ενζύμων των GSTs από το diazinon σύμφωνα με το μοντέλο Michaelis- Menten, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στα παρακάτω σχήματα.



Σχήμα 52. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της ενζυμικής αντίδρασης των GSTs των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* παρουσία diazinon.



Σχήμα 53. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της ενζυμικής αντίδρασης των GSTs παρουσία diethyl maleate.

Με βάση τις τιμές της ενεργότητας των ενζύμων που προέκυψαν σε συνδιασμό με τις συγκεντρώσεις του diazinon ή του diethyl maleate, προέκυψαν ενδείξεις συναγωνιστικής παρεμπόδισης για το diazinon και μη συναγωνιστικής παρεμπόδισης για το συνεργιστή diethyl maleate. Οφείλουμε να αναφέρουμε πως κατά την προετοιμασία των δειγμάτων στην ουσία ομογενοποιούμε τα κύτταρα των ζυμών και έχουμε ένα ακατέργαστο μίγμα ενζύμων, δεν απομονώνουμε, δηλαδή κάποιο ισοένζυμο ώστε να μελετήσουμε την κινητική του. Προφανώς, τα διαγράμματα του διπλού αντιστρόφου της ενζυμικής αντίδρασης των GSTs παρουσία του diazinon ή του diethyl maleate ήταν το αποτέλεσμα της παρεμπόδισης με διαφορετικά ισοένζυμα των GSTs με διαφορετική συγγένεια προς τους παρεμποδιστές.

➤ Επίδραση του diazinon στην ενεργότητα των εστερασών

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο πειραματισμού της παραγράφου 2.6.1.4 για το υποστρώματα a-naphthyl acetate και b-naphthyl acetate με προσθήκη διαδοχικά, ίδιων συγκεντρώσεων diazinon (23μM, 33μM, 46μM, 59μM, 66μM και 79μM). Οι μετρήσεις παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί, στον οποίο θα πρέπει να διευκρινήσουμε ότι δεδομένου ότι οι τιμές της ενεργότητας για τα δύο υποστρώματα ήταν κατά πολύ όμοιες παρουσιάζεται η μέση τιμή αυτών σε κάθε συγκέντρωση chlorpyrifos.

Πίνακας 26. Επίδραση του diazinon στην ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος των εστερασών των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*, με χρήση των ενζυμικών υποστρωμάτων a & b-naphthyl acetate. Οι τιμές της ενεργότητας δίνονται ως μέση τιμή των δύο υποστρωμάτων.

Ζύμη	Συγκέντρωση diazinon (μM)	Ενεργότητα (μmol/min/ μg πρωτεΐνης)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	5,453
	23	5,621
	33	5,407
	46	5,239
	59	5,124
	66	5,487
	79	5,233
<i>Rhodotorula rubra</i>	0	6,985
	23	7,093
	33	6,834
	46	6,844
	59	7,112
	66	6,222
	79	6,754

Με βάση τις τιμές του πίνακα καταλήγουμε πως το diazinon δε μείωσε την ενεργότητα των εστερασών σε καμία από τις δύο ζύμες και συνεπώς δεν μπορεί να θεωρηθεί αναστολέας των εν λόγω ενζύμων. Προφανώς το δρων συστατικό δεν αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο πρόσδεσης των εστερασών στο υποστρώμα (a-naphthyl acetate ή b-naphthyl acetate).

3.3.3.2 Βιοχημική διερεύνηση του υπεύθυνου ενζυμικού συστήματος με τη χρήση συνεργιστών

Με στόχο την επιβεβαίωση των ενδείξεων για αλληλεπίδραση του diazinon με το ενεργό κέντρο των των μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs) και την ταυτοποίηση του υπεύθυνου ενζυμικού συστήματος για τη βιοαποδόμηση του εντομοκτόνου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με εξειδικευμένους συνεργιστές τα οποία παρουσιάζονται στη συνέχεια.

3.3.3.2.1 Πειράματα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* με προσθήκη συνεργιστικού παράγοντα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στα πειράματα βιοαποδόμησης παρουσία συνεργιστή χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη, στο οποίο και οι δυο ζύμες έχουν δείξει δράση βιοαποδόμησης του diazinon από τις πρώτες ημέρες του πειράματος, η πληθυσμιακή πυκνότητα ζύμης ήταν 10^6 κύτταρα/mL, η συγκέντρωση του diazinon ήταν 10μg/mL και η συγκέντρωση του συνεργιστή ήταν 10μg/mL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 27. Αποδόμηση του diazinon από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης, 10μg/mL diazinon και 10μg/mL triphenyl phosphate, ή 10μg/mL diethyl maleate ή 10μg/mL piperonyl butoxide.

Ημέρες	Συγκέντρωση diazinon (μg/mL)		
	Control diazinon	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
Triphenyl phosphate			
0+	10	9,99	9,99
1	9,94	9,91	8,35
2	9,84	9,64	7,68
3	9,56	8,47	4,71
4	8,86	6,32	0,84
5	8,48	4,73	MA
Piperonyl butoxide			
0+	10	10,01	10,02
1	9,94	9,54	9,63
2	9,84	8,13	6,54
3	9,56	7,06	3,23
4	8,86	6,24	0,27
5	8,48	4,07	MA
Diethyl maleate			
0+	10	10	9,98
1	9,94	9,94	9,86
2	9,84	9,87	9,47
3	9,56	9,33	9,07
4	8,86	8,79	8,84
5	8,48	8,72	8,36

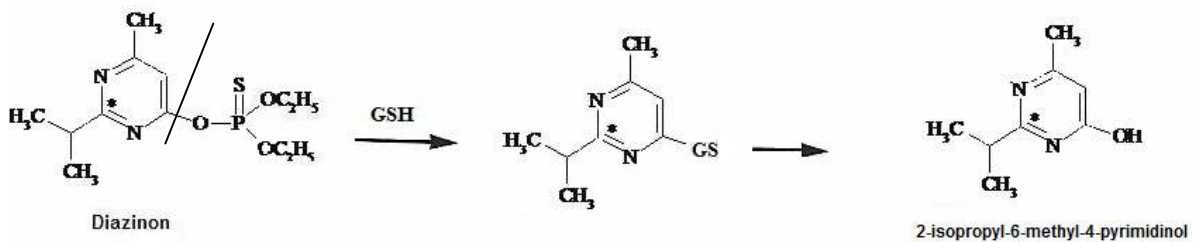
Όπως παρατηρείται η αποδόμηση του diazinon από τις δύο ζύμες δεν παρεμποδίστηκε από την παρουσία των triphenyl phosphate και piperonyl butoxide στο υλικό ανάπτυξής τους.

Κατά συνέπεια αποκλείεται η λειτουργία των ενζυμικών συστημάτων των εστερασών και

των μονοξυγονασών στην αποδόμηση του diazinon. Το αντίθετο διαπιστώθηκε στην περίπτωση του diethyl maleate και συνεπώς τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την υπόθεση πως οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs) εμπλέκονται στην αποδόμηση του diazinon από τις δυο ζύμες.

3.3.3.3 Προτεινόμενο μονοπάτι βιοαποδόμησης του diazinon από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

Κατά την αποδόμηση, συνεπώς του diazinon από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* μέσω της δράσης του ενζυμικού συστήματος των μεταφορασών της γλουταθειόνης πραγματοποιείται διάσπαση του μορίου του φυτοπροστατευτικού προϊόντος και σύζευξη της γλουταθειόνης με την αποχωρούσα ομάδα. Το σύμπλοκο αυτό στη συνέχεια υδρολύεται και παράγεται ο μεταβολίτης isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP), σύμφωνα με το σχήμα 54.



Σχήμα 54. Προτεινόμενο μονοπατι βιοαποδόμησης του diazinon από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*.

--	--

3.3. 4 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε καρπούς τομάτας

3.3.4.1 Αποτελέσματα επικύρωσης αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων του diazinon σε καρπούς τομάτας

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελέγχου ποιότητας καρπών τομάτας εμβολιασμένα με diazinon σε συγκεντρώσεις των 0,05 και 0,1μg/kg. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε 6 επαναλήψεις και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 28. Ανακτήσεις και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) για την ουσία diazinon έπειτα από τον εμβολιασμό καρπών τομάτας σε συγκεντρώσεις 0,05 και 0,1μg/mL σε 6 επαναλήψεις.

Ουσία	C (μg/kg)	Μέση Ανάκτηση (%)	RSD (%)
Diazinon	0,05	97,6	1,7
Diazinon	0,1	91,4	2,8

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου (Limit of Quantification, LOQ) ήταν το χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης, 0,05mg/kg και το όριο ανίχνευσης (LOD) το 0,02mg/kg. Οι τιμές των ανακτήσεων βρίσκονταν εντός του αποδεκτού εύρους 70- 110% από το SANCO 2007/3131, καθώς και εκείνες των σχετικών τυπικών αποκλίσεων (χαμηλότερες του 20%), γεγονός που υποδεικνύει την αξιοπιστία και την καταλληλότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό του diazinon σε καρπούς τομάτας.

3.3.4.2 Υπολείμματα diazinon σε καρπούς τομάτας έπειτα από συνδυασμένη εφαρμογή με diazinon και κύτταρα ζυμών

Καρποί τομάτας ψεκάστηκαν με diazinon συγκέντρωσης 2mg/kg και κύτταρα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις 5 και τις 20 ημέρες από την εφαρμογή. Στις 20 ημέρες αντιστοιχεί ο εγκεκριμένος χρόνος αναμονής από την τελευταία επέμβαση στη συγκομιδή (PreHarvest Interval- PHI) σύμφωνα με την ετικέτα του σκευάσματος Diazinon- Ινάγκρο 40 WP. Έπειτα από την επεξεργασία των δειγμάτων και τη χρωματογραφική τους ανάλυση προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 29. Υπολείμματα diazinon (συγκέντρωση σε mg/kg) σε καρπούς τομάτας έπειτα από τον ψεκάσμό τους με 2mg/kg diazinon και 10⁸κύτταρα/kg των ζυμών *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra*. Ως μάρτυρας αναφέρονται οι καρποί που έχουν ψεκαστοί μόνο με diazinon και ως επέμβαση οι καρποί που έχουν ψεκαστεί με diazinon και με κύτταρα ζύμης.

	Συγκέντρωση diazinon C (mg/kg)					
Ημέρες	<i>Rhodotorula glutinis</i>			<i>Rhodotorula rubra</i>		
	Μάρτυρας	Επέμβαση	Μείωση (%) του μάρτυρα	Μάρτυρας	Επέμβαση	Μείωση (%) του μάρτυρα
5	1,68	1,37	18,5	1,68	1,13	67,3
20	0,83	0,1	88	0,83	ΜΑ	94

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 29, υπάρχει σαφής υπεροχή της μείωσης του diazinon στην επέμβαση σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση της *Rhodotorula glutinis* στη δειγματοληψία των 20 ημερών (PHI) σημειώθηκε ελάττωση της συγκέντρωσης στην επέμβαση κατά 88% του μάρτυρα, ενώ στη *Rhodotorula rubra* κατά 94% του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αντίστοιχα αποτελέσματα των in vitro πειραμάτων βιοαποδόμησης.

Επιπλέον, τα υπολείμματα στους καρπούς που είχαν ψεκαστεί μόνο με diazinon μειώθηκαν ανάμεσα στις δύο δειγματοληψίες, δεν έφτασαν, όμως, σε επίπεδα χαμηλότερα από το μέγιστο όριο υπολείμματος (MRL) που έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για το diazinon στις τομάτες, το οποίο είναι 0,05mg/kg (Κανονισμός (ΕΚ) 396/2005). Στις 20 ημέρες μετρήθηκε το 41,5% της αρχικής συγκέντρωσης. Στους καρπούς τομάτας που είχαν ψεκαστεί με κύτταρα της *Rhodotorula glutinis* και με diazinon τα υπολείμματα του diazinon στις 20 ημέρες ήταν 0,1mg/kg, υψηλότερα από το MRL, παρόλα αυτά, όμως, η μείωση των υπολειμμάτων ήταν πολύ σημαντική. Στους καρπούς τομάτας που είχαν ψεκαστεί με κύτταρα της *Rhodotorula rubra* και με diazinon στις 20 ημέρες δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα diazinon.

Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε μεμονωμένους καρπούς τομάτας. Μελετήθηκε, δηλαδή, η αλληλεπίδραση ζύμης εντομοκτόνου υπό ελεγχόμενες και σταθερές συνθήκες. Θεωρούνται συνεπώς ακραία περίπτωση, δεδομένου ότι δεν υπεισέρχονται σε αυτά άλλοι παράγοντες (βιολογικοί, περιβαλλοντικοί) οι οποίοι να συντελούν σε πιθανή απομάκρυνση

του diazinon από την επιφάνεια των καρπών ιδιαίτερα στην περίπτωση της επέμβασης.

3.4 Διερεύνηση της ικανότητας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στην αποδόμηση των βενζοϋλουριών lufenuron και teflubenzuron

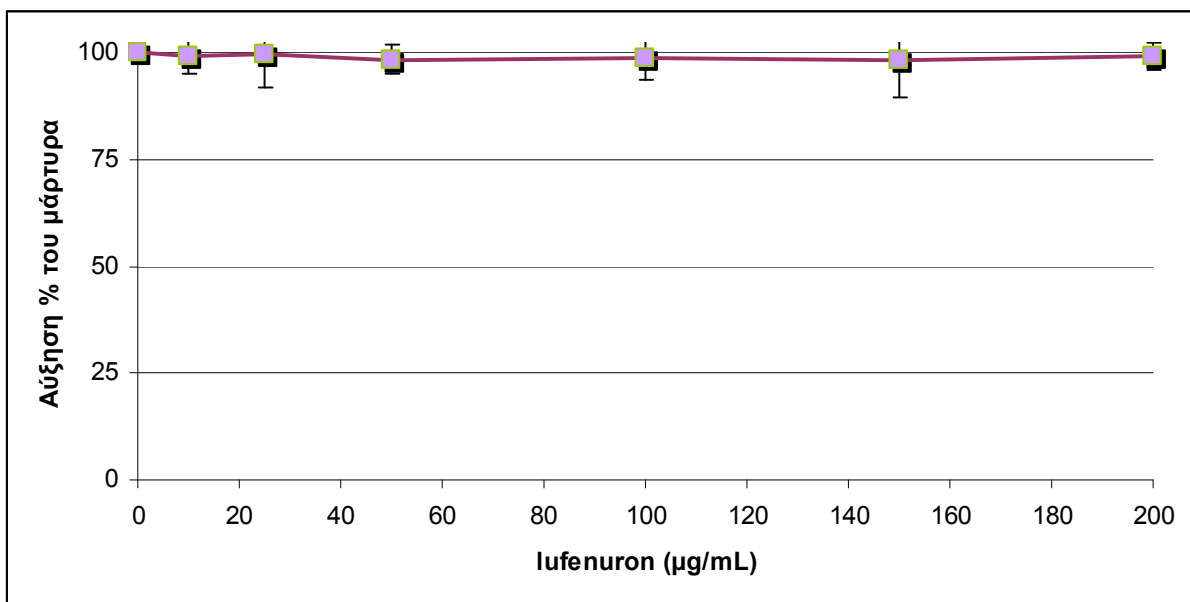
Τα εντομοκτόνα lufenuron και teflubenzuron παρουσίασαν παρόμοια οδό μικροβιακής αποδόμησης από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* και για το λόγο αυτό τα αποτελέσματα τους θα παρουσιαστούν στο ίδιο κεφάλαιο.

3.4.1 Ευαισθησία των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στα lufenuron και teflubenzuron

Τα αποτελέσματα του ελέγχου της επίδρασης των lufenuron και teflubenzuron στην ανάπτυξη των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* ανά οργανισμό είναι τα ακόλουθα:

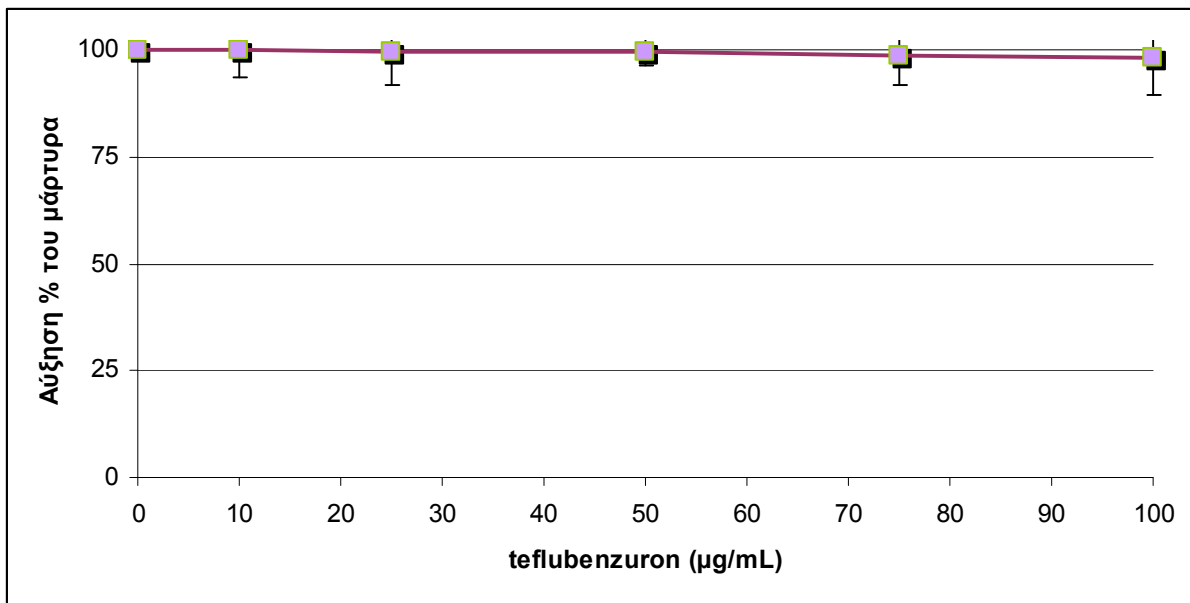
❖ *Rhodotorula glutinis*

Η ευαισθησία της *Rhodotorula glutinis* σε διάφορες συγκεντρώσεις του lufenuron παρουσιάζεται στην παρακάτω καμπύλη μυκητοτοξικότητας (Σχήμα 55).



Σχήμα 55. Ευαισθησία της ζύμης *Rhodotorula glutinis* στο lufenuron σε υλικό UCM έπειτα από 14 ημέρες επώασης στους 25°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων.

Αντίστοιχα, η ευαισθησία της *Rhodotorula glutinis* σε διάφορες συγκεντρώσεις του teflubenzuron παρουσιάζεται στην παρακάτω καμπύλη μυκητοτοξικότητας (Σχήμα 56).



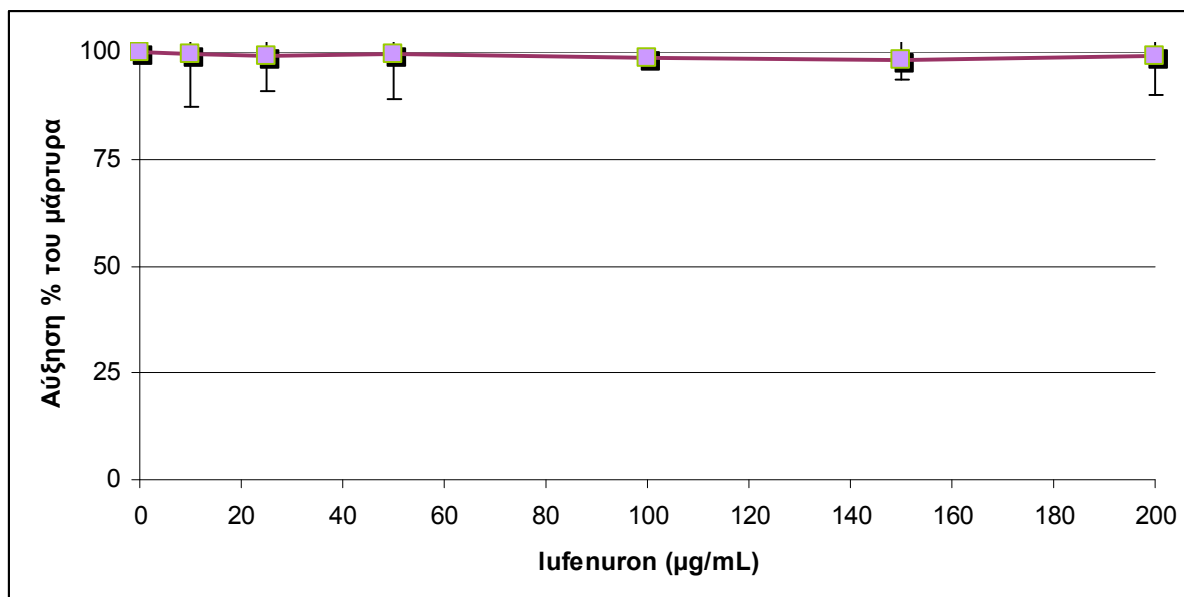
Σχήμα 56 . Ευαισθησία της ζύμης *Rhodotorula glutinis* στο teflubenzuron σε υλικό UCM έπειτα από 14 ημέρες επώασης στους 25°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, έπειτα από την προσθήκη lufenuron δεν παρουσιάστηκε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της *Rhodotorula glutinis* έως και την υψηλότερη συγκέντρωση των 200μg/mL (99% του μάρτυρα). Η ζύμη αναπτύχθηκε ταχύτατα και όμοια με το μάρτυρα σε όλες τις περιπτώσεις. Δεν υπολογίστηκαν συνεπώς οι τιμές των EC₅₀ και MIC. Στην περίπτωση του teflubenzuron χρησιμοποιήθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις, εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητάς του στους οργανικούς διαλύτες. Για τον ίδιο λόγο το πρότυπο διάλυμα από το οποίο πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του φυτοπροστατευτικού προϊόντος στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης της ζύμης ήταν η ακετόνη. Όπως παρατηρήθηκε η ζύμη *Rhodotorula glutinis* δεν είναι ευαίσθητη στο teflubenzuron και παρουσίασε ομαλή ανάπτυξη ακόμη και στην πιο υψηλή συγκέντρωση των 100μg/mL (99,4% του μάρτυρα). Όπως και στην περίπτωση του lufenuron δεν υπολογίστηκαν οι τιμές των EC₅₀ και MIC.

Προκειμένου, συνεπώς, να μελετηθεί την ικανότητα της *Rhodotorula glutinis* να αποδομεί τα lufenuron και teflubenzuron επιλέχθηκαν οι ενδιάμεσες συγκεντρώσεις 50 και 100μg/mL για το πρώτο και 25 και 50μg/mL για το δεύτερο αντίστοιχα.

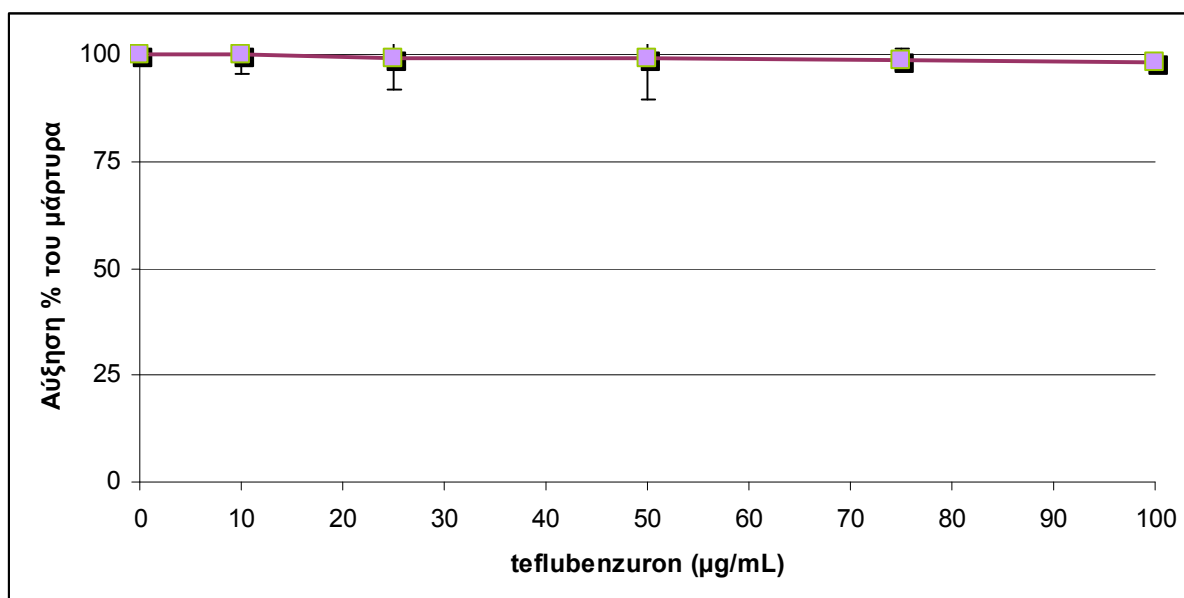
❖ *Rhodotorula rubra*

Όμοια, η ευαισθησία της *Rhodotorula rubra* στο lufenuron παρουσιάζεται στην αντίστοιχη καμπύλη μυκητοτοξικότητας (Σχήμα 57).



Σχήμα 57. Ευαισθησία της ζύμης *Rhodotorula glutinis* στο lufenuron σε υλικό UCM έπειτα από 14 ημέρες επώασης στους 25°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων.

Αντίστοιχα, η ευαισθησία της *Rhodotorula rubra* σε διάφορες συγκεντρώσεις του teflubenzuron παρουσιάζεται στην παρακάτω καμπύλη μυκητοτοξικότητας (Σχήμα 58).



Σχήμα 58. Ευαισθησία της ζύμης *Rhodotorula rubra* στο teflubenzuron σε υλικό UCM έπειτα από 14 ημέρες επώασης στους 25°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων.

Όμοια επίδραση είχε η προσθήκη των lufenuron και teflubenzuron και στη δεύτερη ζύμη της

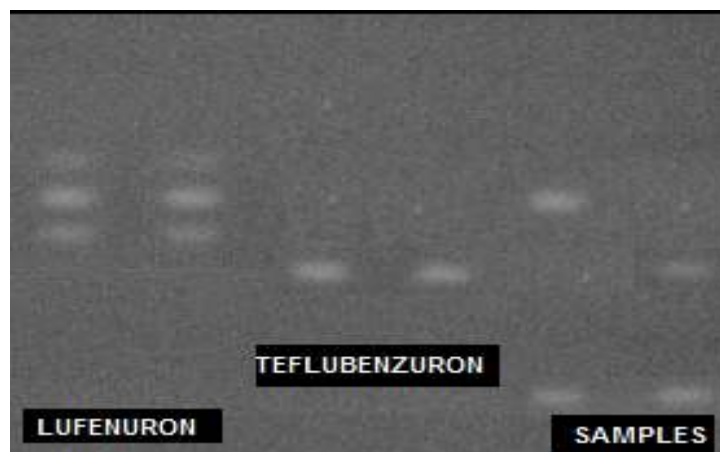
μελέτης, την *Rhodotorula rubra*. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα δεν παρουσιάστηκε καμιά παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της καλλιέργειας. Οι τιμές των EC₅₀ και MIC δεν υπολογίστηκαν.

Συνεπώς, όσον αφορά τα πειράματα μικροβιακής αποδόμησης των εντομοκτόνων lufenuron και teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν είναι ίδιες με εκείνες της *Rhodotorula glutinis*, δηλαδή για το lufenuron τα 50 και 100μg/mL και για το teflubenzuron τα 25 και 50μg/mL.

3.4.2 Αποτελέσματα διερεύνησης της βιοαποδόμησης των lufenuron και teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* σε χημικό επίπεδο

3.4.2.1 Μέθοδος ανίχνευσης των δρώντων συστατικών lufenuron και teflubenzuron με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας- Thin Layer Chromatography (TLC)

Όπως και στην περίπτωση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων η TLC μας έδωσε τις πρώτες ενδείξεις σχετικά με την ικανότητα των δύο ζυμών να αποδομούν το lufenuron και το teflubenzuron. Η εικόνα, όμως, δεν ήταν τόσο ξεκάθαρη όπως στα οργανοφωσφορικά. Η ανάλυση του τελικού εκλούσματος, το οποίο προέρχονταν από κωνική φιάλη που περιείχε καλλιέργεια ζύμης *Rhodotorula glutinis* 7 ημερών και lufenuron ή teflubenzuron, παρουσίασε κατά την παρατήρηση της silica πλάκας με λάμπα UV μία επιπλέον ουσία. Το αποτύπωμα της ουσίας αυτής ήταν άλλοτε πιο ισχνό και άλλοτε πιο έντονο και μεγαλύτερο σε μέγεθος, με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολη η διαπίστωση αν πρόκειται για μια ή δύο ουσίες. Απαραίτητη κρίθηκε, συνεπώς, η χρήση υγρής χρωματογραφίας με τριπλό τετράπολο ώστε να ταυτοποιηθούν ο/οι παραγόμενοι μεταβολίτες και φυσικά να αναπτυχθεί μέθοδος διαχωρισμού τους.



Εικόνα 5. Ανίχνευση των ουσιών lufenuron και teflubenzuron με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) έπειτα από επώαση της ζύμης *Rhodotorula glutinis* με lufenuron ή

teflubenzuron σε υλικό ΥΠΒ για 7 ημέρες.

Η κωνική φιάλη ανάπτυξης της *Rhodotorula rubra* με lufenuron ή teflubenzuron έδωσε όμοια εικόνα κατά την ανάλυση του εκλούσματός της με TLC.

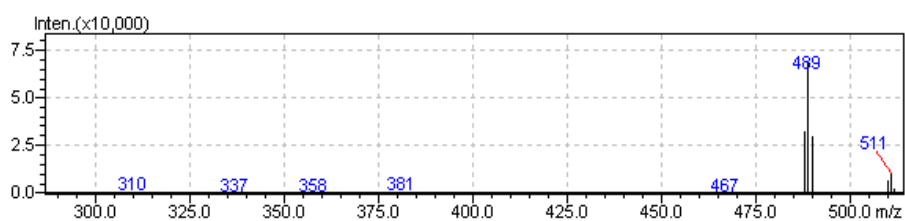
3.4.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού των δρώντων συστατικών lufenuron και teflubenzuron με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή σειράς διόδων σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών με αρνητικό χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης HPLC/APCI-MS

Στα πρώτα πειράματα βιοαποδόμησης για τον προσδιορισμό των εντομοκτόνων lufenuron και teflubenzuron χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας με αρνητικό χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης HPLC/APCI-MS και επιτεύχθηκε ικανοποιητικός χρωματογραφικός διαχωρισμός των ουσιών αυτών. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου και την επικύρωσή της σε καρπούς τομάτας για το σύνολο των βενζοϋλουριών (lufenuron, diflubenzuron, teflubenzuron, triflumuron και flufenoxuron), χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο ανιχνευτές του συστήματος, ο ανιχνευτής ορατού υπεριώδους διάταξης διόδων (UV-diode array detector, DAD) και ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (quadrupole MS-detector), όπως αναφέρεται από τους Μαρκόγλου, Μπεμπέλου, Λιαπή και Ζιώγα (2007). Όσον αφορά τον ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (MS), παρατηρήθηκε παραγωγή των ιόντων $[M]^-$, $[M-H]^-$, $[M-H-HF]^-$, $[M-Na]^+$ και $[M-NH_4]^+$, με κύριο ιόν το $[M-H-HF]^-$ για το lufenuron και το teflubenzuron (Σχήμα 59). Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα κύρια ιόντα που παρήχθησαν για τις βενζοϋλουρίες lufenuron και teflubenzuron στον ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (MS).

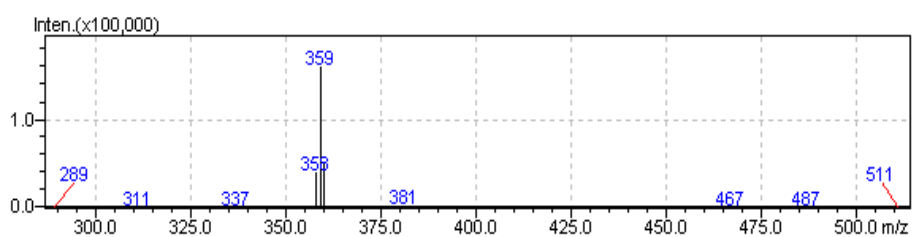
Πίνακας 30. Κύρια θραύσματα από των βενζοϋλουριών σε τάση θραυσματοποίησης 60V έπειτα από έγχυση στον ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (MS).

Αναλύτης	Χρόνος Κατακράτησης (min)	Μοριακό Βάρος	Θραύσματα ιόντων m/z	
			$[Mw-H]^-$	$[Mw-H-HF]^-$
Lufenuron	17.41	511	509	489, 490
Teflubenzuron	19.15	381	379	359, 360

Lufenuron (Mw=511.2)

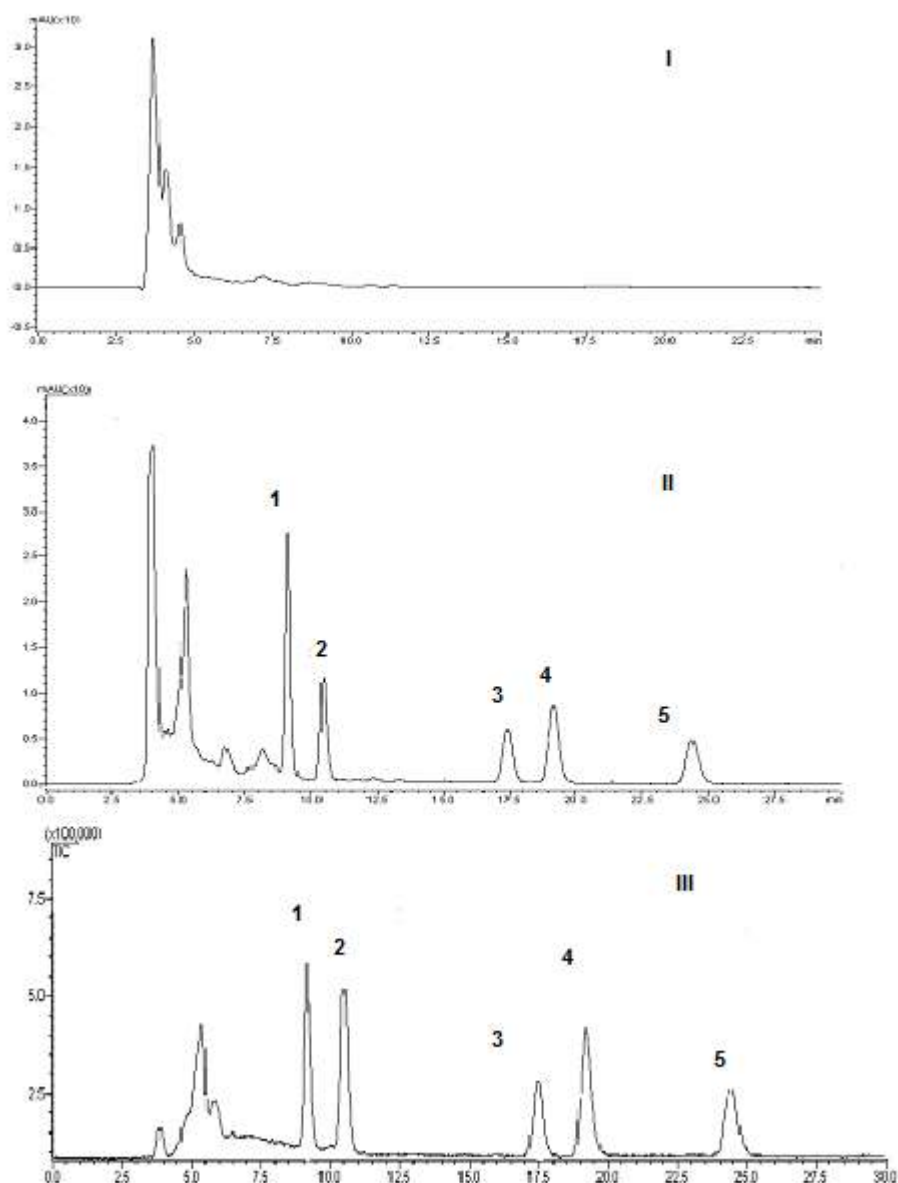


Teflubenzuron (Mw=381.1)



Σχήμα 59. Φάσματα των lufenuron και teflubenzuron σε σύστημα HPLC/APCI-MS με αρνητικό χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης.

Και στους δύο ανιχνευτές παρουσιάστηκε ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα των ουσιών (Σχήμα 60 (II και III)) και δεν παρουσιάστηκαν παρεμποδίζουσες κορυφές από το φυτικό εκχύλισμα στους χρόνους έκλουσης των βενζοϋλουριών (Σχήμα 60 (I)).



Σχήμα 60. Χρωματογραφήματα I) εκχυλίσματος τομάτας (μάρτυρα) με ανιχνευτή σειράς διόδων (DAD), II) δείγματος τομάτας εμβολιασμένο με (1) Diflubenzuron, (2) Triflumuron, (3) Lufenuron, (4) Teflubenzuron and (5) Flufenoxuron έπειτα από έγχυση στον ανιχνευτή σειράς διόδων (DAD) και III) δείγματος τομάτας εμβολιασμένο έπειτα από έγχυση στον ανιχνευτή MS.

Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων με το εν λόγω σύστημα, πραγματοποιήθηκε ποσοτική εκτίμηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης των lufenuron και teflubenzuron από τις δυο ζύμες, με τη μέτρηση της υποβάθμισης της επιφάνειας των κορυφών των μητρικών μορίων.

3.4.2.3 Μέθοδος προσδιορισμού των δρώντων συστατικών lufenuron και teflubenzuron και των μεταβολιτών 2,6-difluorobenzoic acid και 2,6- difluorobenzamide με υγρή χρωματογραφία συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (LC/MS/MS)

Στη συνέχεια με στόχο τον προσδιορισμό των μητρικών μορίων lufenuron και teflubenzuron και των μεταβολιτών 2,6-difluorobenzoic acid και 2,6- difluorobenzamide χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τριπλό τετράπολο MS-MS της εταιρείας Varian. Όπως και για τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα ο προσδιορισμός της ταυτότητας των ουσιών και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους πραγματοποιήθηκε με βάση την τεχνική συζευγμένης φασματομετρίας μαζών, με τη χρήση μεταπτώσεων (προδρόμου – παραγόμενου ιόντος) (Multiple Reaction Monitoring-MRMs).

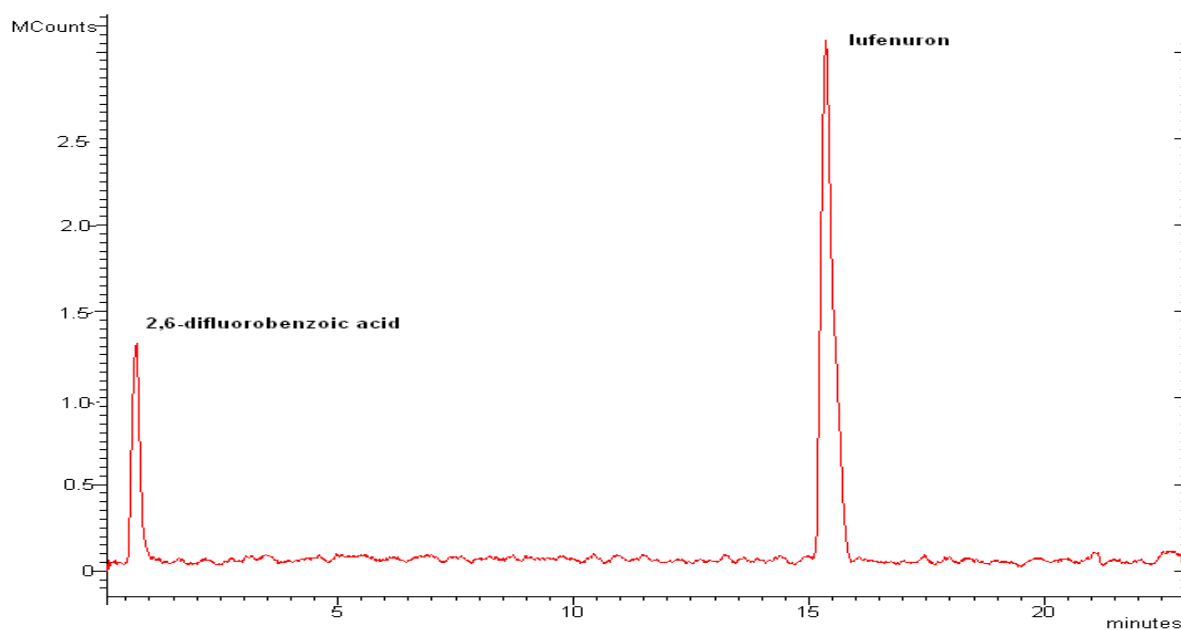
Όσον αφορά τα μητρικά μόρια lufenuron και teflubenzuron οι βέλτιστες συνθήκες προσδιορισμού τους επιτεύχθηκαν με εφαρμογή πηγής ιονισμού ηλεκτροδιάχυσης σε αρνητικό ιονισμό- ESI(-). Οι χρόνοι κατακράτησης των δύο ουσιών, οι μεταπτώσεις προσδιορισμού τους, η ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy), η σχετική ένταση μεταπτώσεων καθώς και η τάση τριχοειδούς (capillary) παρουσιάζονται στον Πίνακα 31.

Σχετικά με τον προσδιορισμό των μεταβολιτών αρχικά πραγματοποιήθηκε απευθείας έγχυση (infusion) των δύο ουσιών στο χρωματογραφικό σύστημα και αποκτήθηκε το πλήρες φάσμα ιόντων για κάθε μία και στη συνέχεια επιλέχθηκαν οι καλύτερες μεταπτώσεις. Για το 2,6-difluorobenzoic acid επιλέχθηκαν οι μεταπτώσεις m/z 157 > 113 και m/z 157 > 93 σε συνθήκες αρνητικού ιονισμού, ESI(-). Στην περίπτωση του 2,6- difluorobenzamide, όμως, στον αρνητικό ιονισμό δεν είχαμε ικανοποιητικά αποτελέσματα και για το λόγο αυτό οδηγηθήκαμε στην εφαρμογή θετικής πηγής ιονισμού, ESI(+), παίρνοντας τελικά τις μεταπτώσεις m/z 158 > 140,9 και m/z 158 > 113. Επιπλέον, όπως διαπιστώνεται και από τα χρωματογραφήματα στα Σχήματα 61 έως 63 οι δύο μεταβολίτες παρουσίασαν ίδιο χρόνο κατακράτησης. Συνεπώς ο ταυτόχρονος προσδιορισμός τους σε ένα χρωματογράφημα με εναλλαγή της πολικότητας των ιόντων (όπως στην περίπτωση του chlorpyrifos και του μεταβολίτη του 3,5,6-trichloro-2-pyridinol) ήταν αδύνατος.

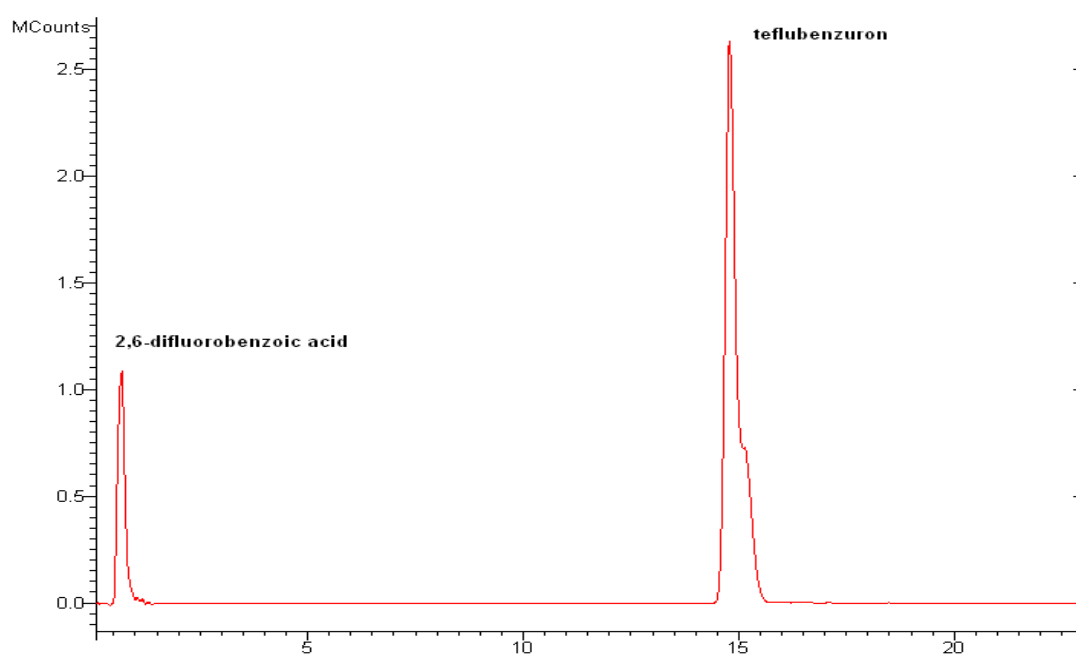
Προκειμένου, λοιπόν, να μελετηθεί το φαινόμενο της αποδόμησης των lufenuron και teflubenzuron με το χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS, αποφασίστηκε πως τα δείγματα θα αναλύονταν με δύο χρωματογραφικές μεθόδους:

Μέθοδος 1: Προσδιορισμός των lufenuron, teflubenzuron και 2,6-difluorobenzoic acid με ESI(-) (Σχήμα 61 και Σχήμα 62).

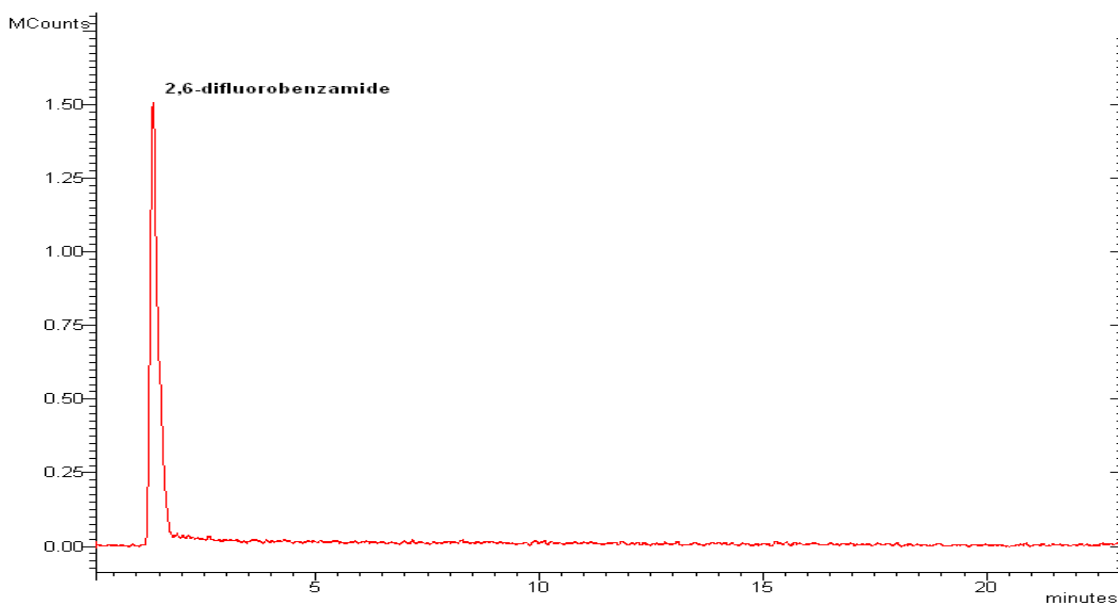
Μέθοδος 2: Προσδιορισμός του 2,6-difluorobenzamide με ESI(+), (Σχήμα 63).



Σχήμα 61. Προσδιορισμός του lufenuron και του μεταβολίτη 2,6-difluorobenzoic acid με εφαρμογή αρνητικής μορφής ιονισμού. ESI(-) στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS.



Σχήμα 62. Προσδιορισμός του teflubenzuron και του μεταβολίτη 2,6-difluorobenzoic acid με εφαρμογή αρνητικής μορφής ιονισμού ESI(-) στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS.



Σχήμα 63. Προσδιορισμός του μεταβολίτη 2,6-difluorobenzamide με εφαρμογή θετικής μορφής ιονισμού ESI(+) στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS.

Οι χρόνοι κατακράτησης των δύο μεταβολιτών, οι μεταπτώσεις προσδιορισμού τους, η ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy), η σχετική ένταση μεταπτώσεων καθώς και η τάση τριχοειδούς (capillary) παρουσιάζονται στον Πίνακα 31.

Πίνακας 31. Χρόνοι κατακράτησης των lufenuron, teflubenzuron, 2,6-difluorobenzoic acid και 2,6-difluorobenzamide, κύρια θραύσματα, ενέργεια θραυσματοποίησης (V), σχετική ένταση μεταπτώσεων και τάση τριχοειδούς. Με έντονη γραφή παρουσιάζονται τα ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για ποσοτικό προσδιορισμό.

Ουσία	Χρόνος κατακράτησης (min)	Μεταπτώσεις (MRMs)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (collision energy) (V)	Σχετική ένταση μεταπτώσεων (% της βασικής μετάπτωσης)	Τάση τριχοειδούς (capillary) (V)
2,6- difluorobenzoic acid	0,9	157 > 113	15	100	35
		157 > 93	35	98,4	45
2,6- difluorobenzamide	1,0	158 > 140,9	26,5	100	56
		158 > 113	45	18,3	56
Teflubenzuron	14,86	379 > 358,8	8	82,9	6
		379 > 338,9	12	100	6
Lufenuron	15,34	509 > 175	45	28,3	32
		509 > 326	44	100	32

3.4.2.4 Έλεγχος καταλληλότητας της μεθόδου

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα θρεπτικού υλικού ΥΠΒ εμβολιασμένα με lufenuron, teflubenzuron, 2,6-difluorobenzoic acid και 2,6-difluorobenzamide σε συγκεντρώσεις των 0,05, 0,1 και 0,5μg/mL. Τα παραγόμενα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 32. Ανακτήσεις, σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) και σήμα προς θόρυβο (S/N) για τις ουσίες lufenuron, teflubenzuron, 2,6-difluorobenzoic acid και 2,6-difluorobenzamide, έπειτα από τον εμβολιασμό θρεπτικού υλικού ΥΠΒ με κάθε ουσία σε συγκεντρώσεις 0,05, 0,1 και 0,5μg/mL σε 5 επαναλήψεις.

Ουσία	C (μg/mL)	Μέση Ανάκτηση (%)	RSD (%)	S/N ratio
2,6-difluorobenzoic acid	0,05	83,4	11,4	17
	0,1	79,5	9,03	31
	0,5	80,3	12,8	68
2,6-difluorobenzamide	0,05	88,4	10,6	22
	0,1	79,3	9,6	58
	0,5	87,1	7,4	82
Teflubenzuron	0,05	95,7	1,23	42
	0,1	99,4	3,67	75
	0,5	93,5	2,47	234
Lufenuron	0,05	100	3,07	66
	0,1	102	0,98	73
	0,5	97,8	1,66	156

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου (LOQ) ήταν το χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης, 0,05μg/mL και το όριο ανίχνευσης (LOD) ήταν 0,02μg/mL. Οι τιμές των ανακτήσεων είναι αποδεκτές, δεδομένου ότι βρίσκονται εντός του αποδεκτού εύρους από τη SANCO 2007/3131 (70 – 110%). Το ίδιο ισχύει και για τις τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων, οι οποίες είναι χαμηλότερες του ορίου των 20%. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την αξιοπιστία και την καταλληλότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό του lufenuron, teflubenzuron, 2,6-difluorobenzoic acid και 2,6-difluorobenzamide από το θρεπτικό υλικό (ΥΠΒ).

3.4.2.5 Βιοαποδόμηση του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* σε συνάρτηση του χρόνου επώασης των καλλιιεργειών και του μεγέθους του μολύσματος

Η επίδραση της πληθυσμιακής πυκνότητας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στην ικανότητά τους να αποδομούν το lufenuron μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τη χαμηλή συγκέντρωση του δρώντος συστατικού, δηλαδή τα 50μg/mL και μολύσματα όπως έχουν ήδη αναφερθεί στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται αρχικά στον πίνακα που ακολουθεί και στη συνέχεια απεικονίζονται στα αντίστοιχα σχήματα.

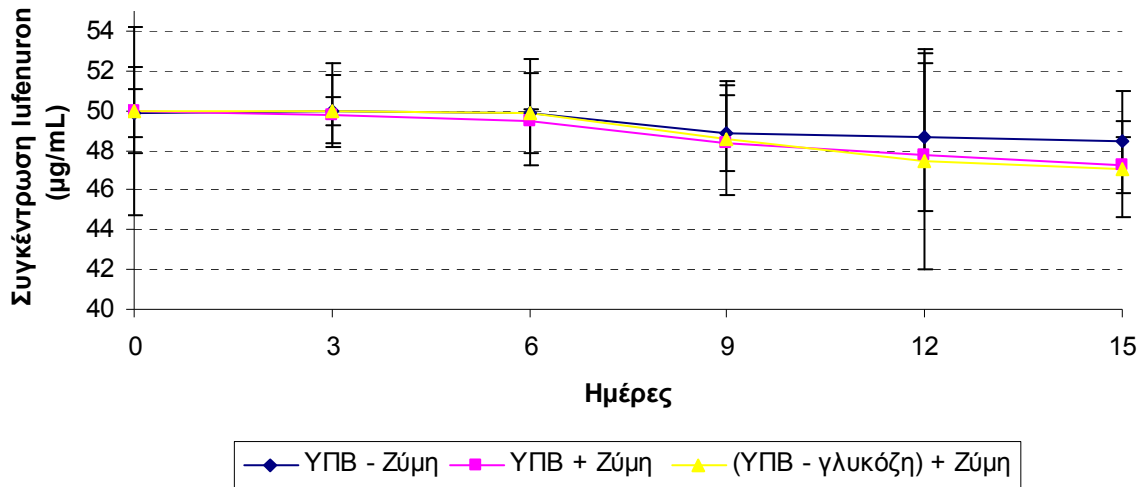
- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10² κύτταρα/ mL – φόρτιση lufenuron 50μg/mL

Τα αποτελέσματα από τη χρήση καλλιέργειας ζύμης με πληθυσμό 10² κύτταρα/mL παρουσιάζονται στον πίνακα και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

Πίνακας 33. Αποδόμηση του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10² κύτταρα/mL ζύμης και 50μg/mL lufenuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση του lufenuron ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

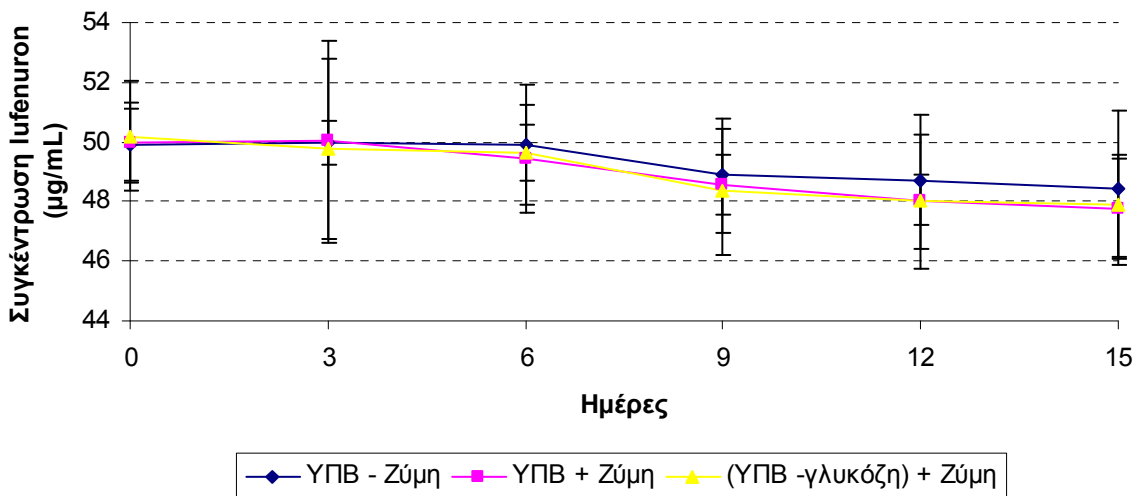
Ημέρες	Συγκέντρωση lufenuron (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)		
	ΥΠΒ – Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη	(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη
<i>Rhodotorula glutinis</i>			
0+	49,89 ± 2,41	50 ± 8,44	50 ± 4,32
3	49,99 ± 1,46	49,76 ± 5,31	49,98 ± 3,65
6	49,9 ± 4,02	49,43 ± 1,29	49,89 ± 5,37
9	48,88 ± 3,89	48,37 ± 6,36	48,52 ± 5,63
12	48,68 ± 4,63	47,79 ± 11,0	47,44 ± 11,42
15	48,45 ± 5,3	47,29 ± 2,91	47,04 ± 5,08
<i>Rhodotorula rubra</i>			
0+	49,89 ± 2,41	49,99 ± 2,67	50,2 ± 3,67
3	49,99 ± 1,46	50,03 ± 6,78	49,78 ± 6,02
6	49,9 ± 4,02	49,45 ± 3,64	49,67 ± 1,89
9	48,88 ± 3,89	48,56 ± 2,09	48,34 ± 4,35
12	48,45 ± 7,63	48,05 ± 1,78	48,0 ± 4,67
15	48,68 ± 5,3	47,76 ± 3,56	47,86 ± 3,56

Rhodotorula glutinis



Σχήμα 64. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με και χωρίς γλυκόζη) 10^2 κύτταρα/mL ζύμης και $50\mu\text{g/mL}$ lufenuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula rubra



Σχήμα 65. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με και χωρίς γλυκόζη) 10^2 κύτταρα/mL ζύμης και $50\mu\text{g/mL}$ lufenuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Η υποβάθμιση αυτή των επιπέδων του lufenuron στο υλικό χωρίς κύτταρα ζύμης είναι συγκρίσιμη με τις αντίστοιχες που παρατηρήθηκαν στις κωνικές φιάλες με τις ζύμες και συνεπώς, η πληθυσμιακή πυκνότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* της τάξης των 10^2 κυττάρων/mL δεν μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνη για τη μείωση των επιπέδων του lufenuron στη συγκέντρωση των $50\mu\text{g/mL}$.

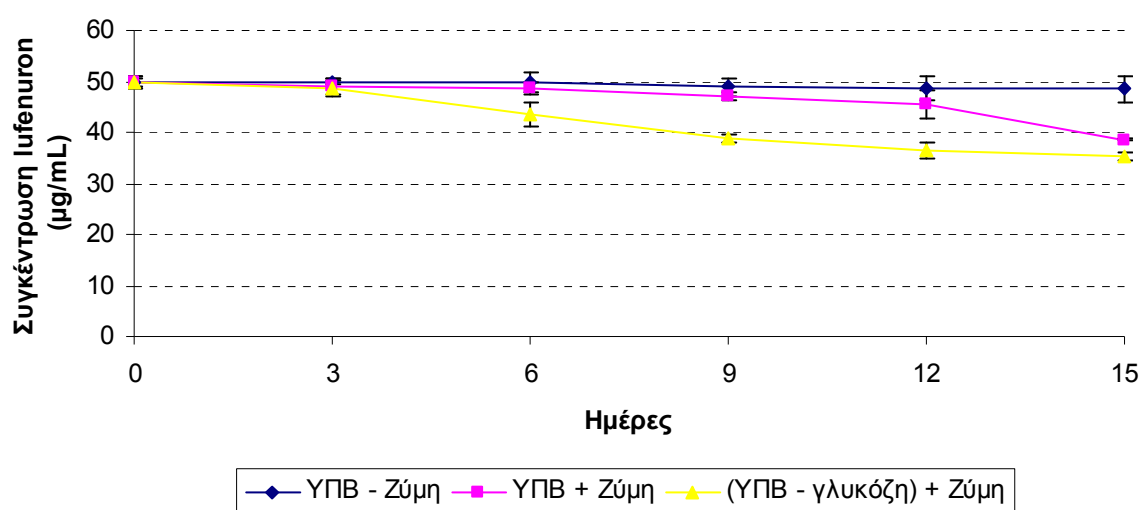
- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10^4 κύτταρα/ mL – φόρτιση lufenuron 50μg/mL

Τα αποτελέσματα από τη χρήση καλλιέργειας ζύμης με πληθυσμό 10^4 κύτταρα/mL παρουσιάζονται στον πίνακα και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

Πίνακας 33. Αποδόμηση του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και 50μg/mL lufenuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση του lufenuron ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

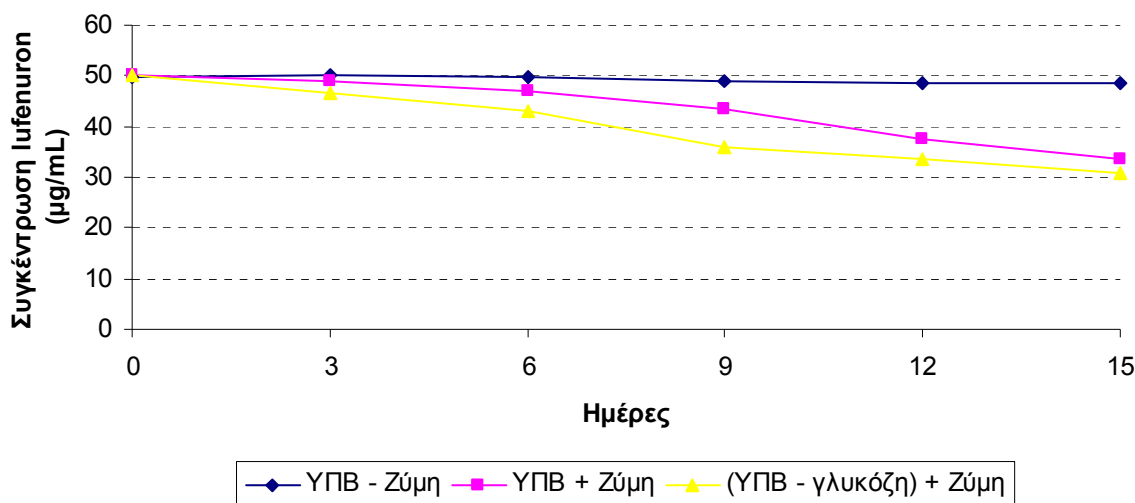
Ημέρες	Συγκέντρωση lufenuron (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)		
	ΥΠΒ – Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη	(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη
<i>Rhodotorula glutinis</i>			
0+	49,89 ± 2,41	49,76 ± 2,45	49,87 ± 1,78
3	49,99 ± 1,46	49,12 ± 3,06	48,57 ± 3,23
6	49,9 ± 4,02	48,78 ± 2,42	43,44 ± 5,30
9	48,88 ± 3,89	47,04 ± 1,33	38,89 ± 2,05
12	48,45 ± 7,63	45,44 ± 6,04	36,44 ± 4,35
15	48,68 ± 5,3	38,55 ± 0,54	35,32 ± 2,56
<i>Rhodotorula rubra</i>			
0+	49,89 ± 2,41	50,07 ± 4,33	49,98 ± 4,03
3	49,99 ± 1,46	48,76 ± 1,78	46,53 ± 4,62
6	49,9 ± 4,02	46,98 ± 2,08	42,87 ± 0,81
9	48,88 ± 3,89	43,51 ± 1,91	36,02 ± 2,04
12	48,45 ± 7,63	37,45 ± 0,76	33,45 ± 1,93
15	48,68 ± 5,3	33,67 ± 2,34	30,88 ± 3,43

Rhodotorula glutinis



Σχήμα 65. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και 50μg/mL lufenuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula rubra



Σχήμα 66. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και $50\mu\text{g/mL}$ lufenuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Σε αντίθεση με τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (chlorpyrifos και diazinon), στην περίπτωση του lufenuron παρατηρήθηκε εμφανής μικροβιακή αποδόμηση στην πληθυσμιακή πυκνότητα των ζυμών στα 10^4 κύτταρα/mL.

Όσον αφορά τη *Rhodotorula glutinis* παρατηρήθηκε ξανά το φαινόμενο κατά το οποίο όταν στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξής της υπάρχει γλυκόζη (ως επιπλέον πηγή άνθρακα) η αποδόμηση του φυτοπροστατευτικού προϊόντος lufenuron καθυστερεί. Έτσι, έως την 6^η ημέρα του πειράματος η υποβάθμιση του lufenuron ήταν συγκρίσιμη με εκείνη του μάρτυρά του. Στις επόμενες δειγματοληψίες, παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης του lufenuron φτάνοντας στην τελευταία (15^η ημέρα πειράματος) στα $38,55\mu\text{g/mL}$, αποδομήθηκε δηλαδή το 22,5% της αρχικής χορηγηθείσας ποσότητας. Στο υλικό χωρίς γλυκόζη (το lufenuron η μόνη πηγή άνθρακα) παρατηρήσαμε μείωση των επιπέδων του εντομοκτόνου από τη 2^η δειγματοληψία (3^η ημέρα πειράματος) και κατά την τελευταία (15^η ημέρα αντίστοιχα) μετρήθηκε συγκέντρωση lufenuron της τάξης των $35,32\mu\text{g/mL}$, αποδομήθηκε δηλαδή το 29,36%.

Όσον αφορά τη *Rhodotorula rubra* και στις δύο κατηγορίες υλικών παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του lufenuron από τη 2^η δειγματοληψία. Κατά την τελευταία ημέρα του πειράματος ανακτήθηκαν τα 67,24% της αρχικής χορηγηθείσας ποσότητας lufenuron στο υλικό με γλυκόζη και 61,78% αντίστοιχα, στο υλικό χωρίς γλυκόζη.

- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10^6 κύτταρα/ mL – φόρτιση lufenuron 50μg/mL

Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν 2 τύποι θρεπτικού υλικού, με γλυκόζη και χωρίς γλυκόζη. Στο υλικό που περιείχε γλυκόζη τα αποτελέσματα της βιοαποδόμησης του lufenuron παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 34. Αποδόμηση του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ με γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50μg/mL lufenuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των lufenuron, 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)			
	ΥΠΒ - Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη		
		Lufenuron	2,6-difluorobenzamide	2,6-difluoro benzoic acid
<i>Rhodotorula glutinis</i>				
0+	49,94 ± 1,53	49,92 ± 1,06	MA	MA
3	49,98 ± 2,37	49,23 ± 2,15	MA	MA
6	49,0 ± 2,90	48,57 ± 2,07	MA	MA
9	48,79 ± 6,23	42,67 ± 3,69	0,74 ± 4,67	MA
12	48,68 ± 1,47	37,72 ± 6,11	1,45 ± 13,87	0,73 ± 6,07
15	48,38 ± 2,63	34,8 ± 2,93	2,09 ± 3,53	1,024 ± 6,51
<i>Rhodotorula rubra</i>				
0+	49,94 ± 1,53	49,98 ± 3,56	MA	MA
3	49,98 ± 2,37	43,65 ± 1,43	0,67 ± 13,69	MA
6	49,0 ± 2,90	38,96 ± 2,51	1,23 ± 5,23	0,67 ± 8,43
9	48,67 ± 6,23	31,64 ± 3,89	3,05 ± 10,26	1,44 ± 9,56
12	48,79 ± 1,47	24,38 ± 2,45	4,35 ± 7,45	3,56 ± 11,55
15	48,38 ± 2,63	17,34 ± 1,23	5,73 ± 2,34	3,88 ± 6,44

MA: Μη Ανιχνεύσιμα υπολείμματα

Τα αποτελέσματα στο υλικό χωρίς γλυκόζη δίνονται στον πίνακα 35.

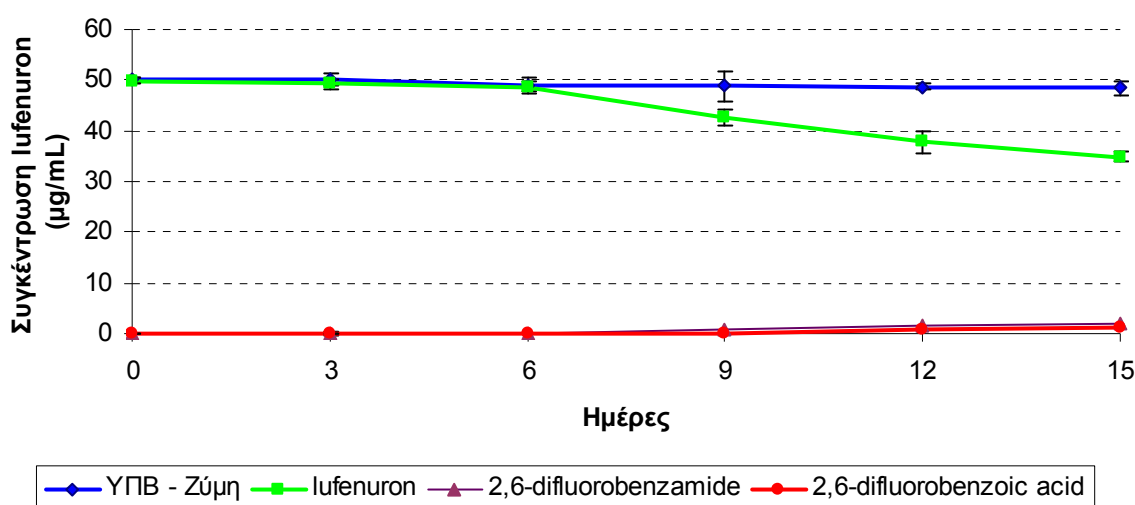
Πίνακας 35. Αποδόμηση του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ χωρίς γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50μg/mL lufenuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των lufenuron, 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)			
	ΥΠΒ - Ζύμη	(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη		
		Lufenuron	2,6-difluorobenzamide	2,6-difluoro benzoic acid
<i>Rhodotorula glutinis</i>				
0+	49,94 ± 1,53	50 ± 6,03	MA	MA
3	49,98 ± 2,37	46,34 ± 2,34	0,12 ± 3,76	MA
6	49,0 ± 2,90	42,45 ± 3,07	0,89 ± 12,92	MA
9	48,67 ± 6,23	36,4 ± 2,33	1,53 ± 4,34	0,11 ± 12,94
12	48,79 ± 1,47	27,32 ± 1,24	2,32 ± 5,33	0,87 ± 11,59
15	48,38 ± 2,63	22,71 ± 4,12	3,67 ± 8,12	1,64 ± 10,95
<i>Rhodotorula rubra</i>				
0+	49,94 ± 1,53	49,97 ± 2,45	MA	MA
3	49,98 ± 2,37	45,62 ± 3,52	0,09 ± 4,76	MA
6	49,0 ± 2,90	41,82 ± 2,08	0,43 ± 3,09	0,07 ± 11,78
9	48,67 ± 6,23	36,42 ± 7,9	1,73 ± 11,76	0,88 ± 1,93
12	48,79 ± 1,47	29,92 ± 1,68	2,9 ± 3,76	1,23 ± 13,82
15	48,38 ± 2,63	22,55 ± 3,36	4,24 ± 10,23	1,78 ± 9,08

MA: Μη Ανιχνεύσιμα υπολείμματα

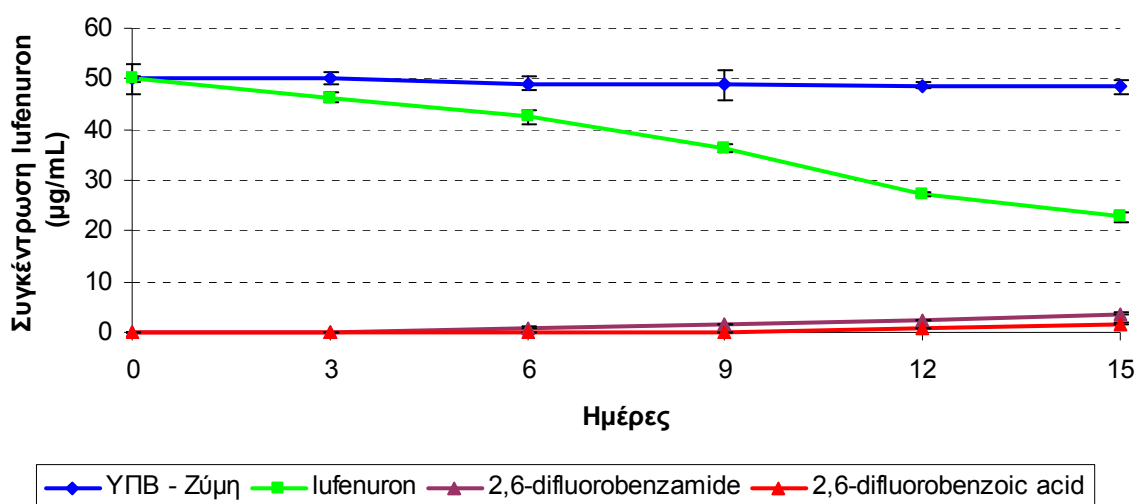
Τα αποτελέσματα των παραπάνω πινάκων επιβεβαιώνουν την ικανότητα των δύο ζυμών να αποδομούν το lufenuron.

Rhodotorula glutinis- υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 67. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ με γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50μg/mL lufenuron. Παραγωγή μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

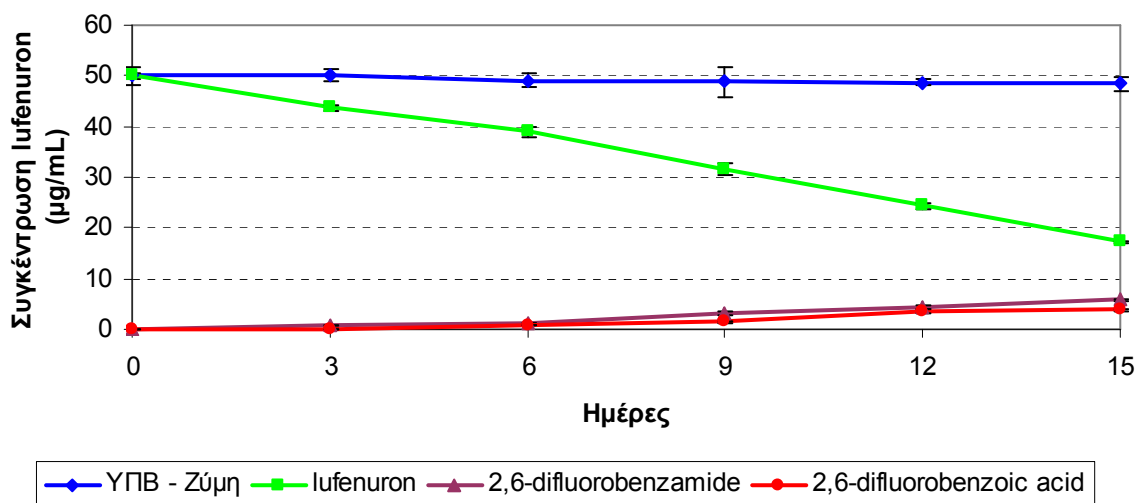
Rhodotorula glutinis- υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 68. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ χωρίς γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50µg/mL lufenuron. Παραγωγή μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

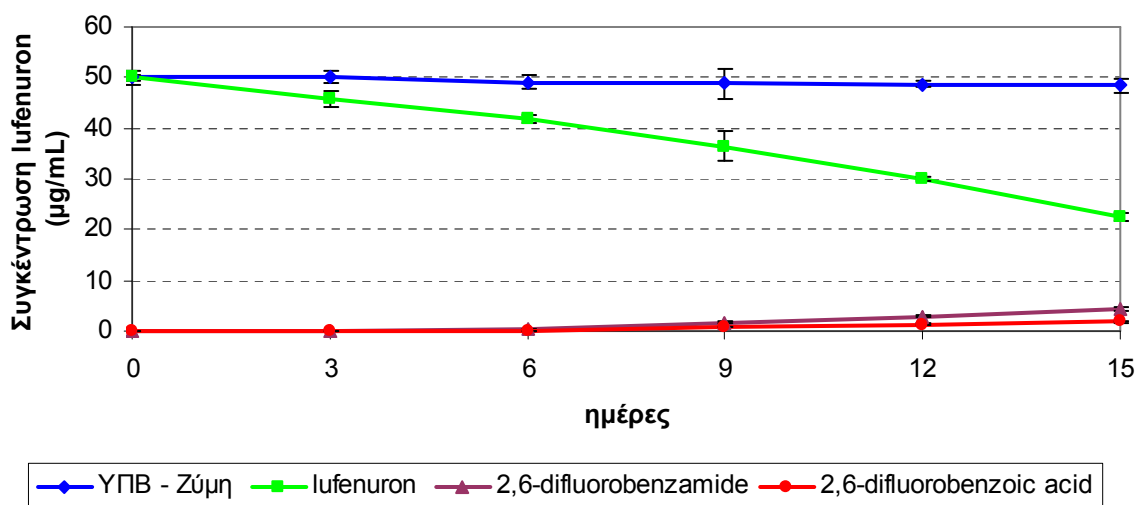
Όσον αφορά τη *Rhodotorula glutinis* παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, δεν πραγματοποιήθηκε καθόλου αποδόμηση του lufenuron κατά τις πρώτες ημέρες του πειράματος. Μετά την 6^η ημέρα (3^η δειγματοληψία), όμως, η συγκέντρωση του μειώθηκε και η συγκέντρωση του κατά την 15^η ημέρα ήταν 34,8µg/mL. Κατά την 9^η ημέρα ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης 2,6-difluorobenzamide και κατά την 12^η ημέρα ο μεταβολίτης 2,6-difluorobenzoic acid. Στο θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει γλυκόζη η μικροβιακή αποδόμηση του lufenuron ξεκίνησε από την αρχή του πειράματος (2^η δειγματοληψία) και στο πέρας του πειράματος η συγκέντρωσή του ήταν 22,71µg/mL, αποδομήθηκε δηλαδή το 54,6%, περισσότερο από το μισό της χορηγούμενης συγκέντρωσης. Από την 3^η ημέρα ανιχνεύτηκε και ο μεταβολίτης 2,6-difluorobenzamide, τα επίπεδα του οποίου παρουσίασαν αυξητική τάση έως το πέρας του πειράματος, ενώ ο μεταβολίτης 2,6-difluorobenzoic acid ανιχνεύτηκε κατά την 9^η ημέρα.

Rhodotorula rubra- Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 69. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB με γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50µg/mL lufenuron. Παραγωγή μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula rubra- Υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 70. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB χωρίς γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50µg/mL lufenuron. Παραγωγή μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Στην περίπτωση της *Rhodotorula rubra*, παρατηρήθηκε ταχύτατη αποδόμηση του lufenuron από την έναρξη του πειράματος και στα δύο είδη θρεπτικού υλικού. Στην τελευταία δειγματοληψία στο υλικό με γλυκόζη αποδομήθηκε το 65,3% της αρχικής ποσότητας, ενώ στο υλικό χωρίς γλυκόζη το 54,8%, αντίστοιχα. Όσον αφορά τους χρόνους παραγωγής

μεταβολιτών παρατηρήθηκε ίδια εικόνα και στα δύο υλικά, δηλαδή από την 3^η ημέρα ανιχνεύτηκε ο μεταβολίτης 2,6-difluorobenzamide, από την 6^η ο μεταβολίτης 2,6-difluorobenzoic acid. Διαφορές υπήρξαν στα δύο υλικά ως προς τις παραγόμενες συγκεντρώσεις. Όσον αφορά το 2,6-difluorobenzamide οι μέγιστες τιμές ήταν 5,73μg/mL στο υλικό με γλυκόζη και 4,24μg/mL στο υλικό χωρίς γλυκόζη. Οι αντίστοιχες τιμές για το μεταβολίτη 2,6-difluorobenzoic acid ήταν 3,88μg/mL και 1,78μg/mL. Διαπιστώνουμε, συνεπώς, πως η προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό ως επιπλέον πηγή άνθρακα δεν επηρέασε την ικανότητα της ζύμης *Rhodotorula rubra* να αποδομεί το lufenuron. Αντιθέτως, στην περίπτωση του θρεπτικού υλικού με γλυκόζη το ρυθμός βιοαποδόμησης ήταν μεγαλύτερος του αντίστοιχου στο υλικό χωρίς γλυκόζη, στις 15 ημέρες ήταν 2,18 και 1,83 αντίστοιχα.

3.4.2.6 Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του lufenuron στο ρυθμό αποδόμησής του από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

Σε θρεπτικό υλικό με πληθυσμιακή πυκνότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* 10^6 κύτταρα/mL, στην οποία παρατηρήθηκε ο υψηλότερος ρυθμός βιοαποδόμησης προστέθηκαν 100μg/mL lufenuron. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

Στο υλικό που περιείχε γλυκόζη τα αποτελέσματα της βιοαποδόμησης του lufenuron παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 36. Αποδόμηση του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ με γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 100μg/mL lufenuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των lufenuron, 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)			
	ΥΠΒ - Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη		
		Lufenuron	2,6-difluorobenzamide	2,6-difluoro Benzoic acid
<i>Rhodotorula glutinis</i>				
0+	99,98 ± 2,54	99,99 ± 2,66	MA	MA
3	99,65 ± 3,42	99,08 ± 4,32	MA	MA
6	99,04 ± 4,06	98,34 ± 1,66	MA	MA
9	98,76 ± 5,12	93,23 ± 2,64	1,54 ± 12,09	0,76 ± 11,05
12	98,49 ± 1,65	87,52 ± 4,08	1,87 ± 9,53	1,34 ± 7,59
15	98,32 ± 4,06	79,34 ± 2,45	3,45 ± 8,66	2,01 ± 9,54
<i>Rhodotorula rubra</i>				
0+	99,98 ± 2,54	99,97 ± 2,53	MA	MA
3	99,65 ± 3,42	84,23 ± 1,97	1,09 ± 8,67	MA
6	99,04 ± 4,06	72,37 ± 11,35	2,68 ± 9,29	0,87 ± 6,98
9	98,76 ± 5,12	56,7 ± 6,05	4,63 ± 11,08	2,05 ± 10,43
12	98,49 ± 1,65	34,23 ± 4,62	6,89 ± 10,45	3,89 ± 7,9
15	98,32 ± 4,06	22,4 ± 5,32	9,34 ± 11,45	4,76 ± 11,45

MA: Μη Ανιχνεύσιμα υπολείμματα

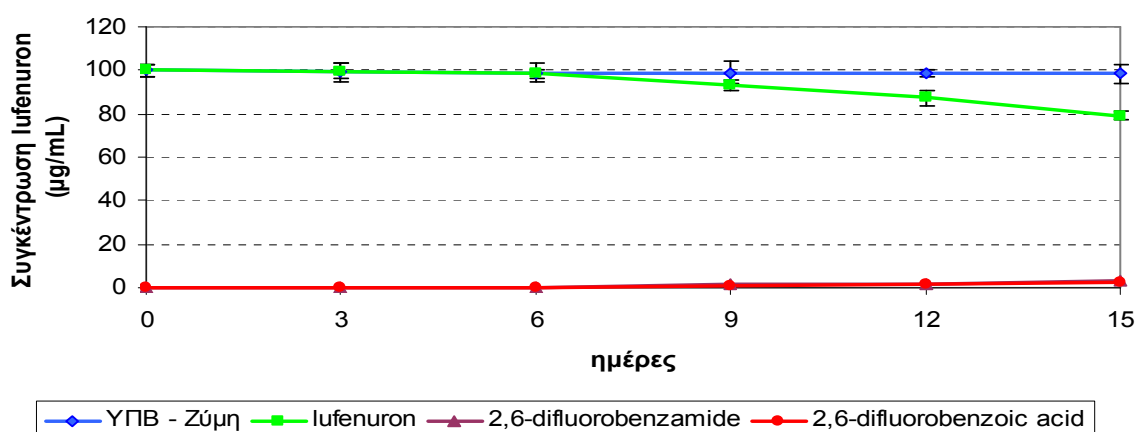
Αντίστοιχα, στο υλικό χωρίς γλυκόζη, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 37.

Πίνακας 37. Αποδόμηση του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ χωρίς γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 100μg/mL lufenuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των lufenuron, 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)			
	ΥΠΒ - Ζύμη	(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη		
		Lufenuron	2,6-difluorobenzamide	2,6-difluoro Benzoic acid
<i>Rhodotorula glutinis</i>				
0+	99,98 ± 2,54	99,89 ± 4,25	MA	MA
3	99,65 ± 3,42	90,3 ± 2,32	MA	MA
6	99,04 ± 4,06	79,51 ± 1,02	0,24 ± 11,89	MA
9	98,76 ± 5,12	64,37 ± 3,76	1,08 ± 13,45	0,57 ± 12,63
12	98,49 ± 1,65	49,88 ± 5,23	2,55 ± 9,35	1,55 ± 11,08
15	98,32 ± 4,06	43,12 ± 3,07	4,43 ± 14,7	3,24 ± 12,34
<i>Rhodotorula rubra</i>				
0+	99,98 ± 2,54	99,89 ± 0,84	MA	MA
3	99,65 ± 3,42	91,04 ± 5,59	0,68 ± 9,56	MA
6	99,04 ± 4,06	79,53 ± 4,64	1,46 ± 11,3	1,66 ± 9,36
9	98,76 ± 5,12	62,82 ± 1,94	2,4 ± 10,34	3,01 ± 7,45
12	98,49 ± 1,65	48,45 ± 3,68	4,98 ± 2,45	3,67 ± 10,8
15	98,32 ± 4,06	35,06 ± 3,44	7,53 ± 13,1	4,03 ± 11,1

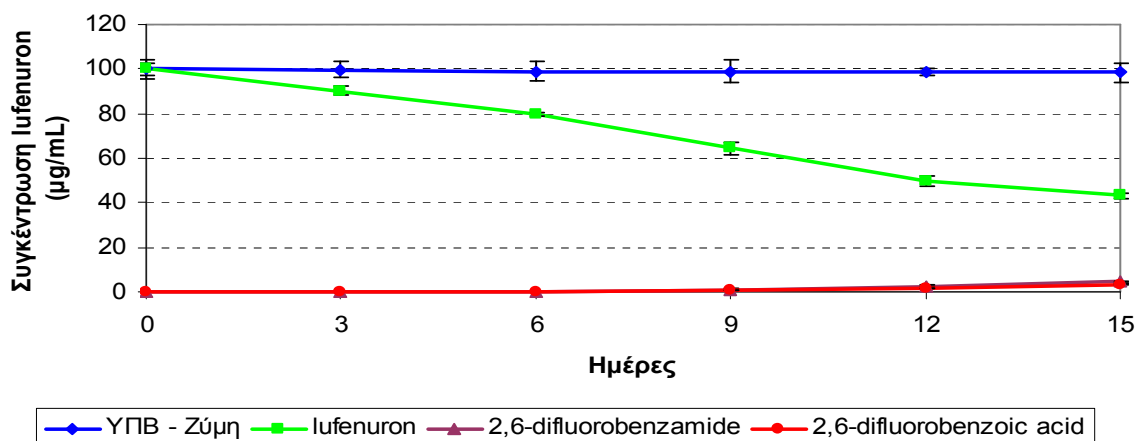
Στην περίπτωση της υψηλής συγκέντρωσης lufenuron (100μg/mL) στις δύο ζύμες, παρατηρήσαμε ποιοτικά όμοια κατάσταση με εκείνη των 50μg/mL στην ίδια πληθυσμιακή πυκνότητα των οργανισμών. Ποσοτικά, όμως, θα λέγαμε πως η μικροβιακή αποδόμηση ήταν πιο έντονη.

Rhodotorula glutinis- Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 71. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ με γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 100μg/mL lufenuron. Παραγωγή μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

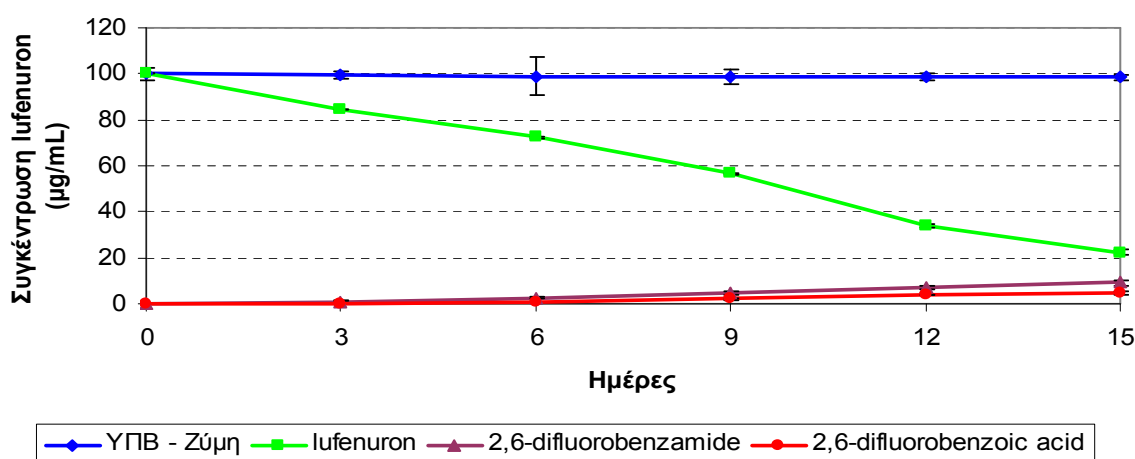
Rhodotorula glutinis- Υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 72. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ χωρίς γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 100µg/mL lufenuron. Παραγωγή μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

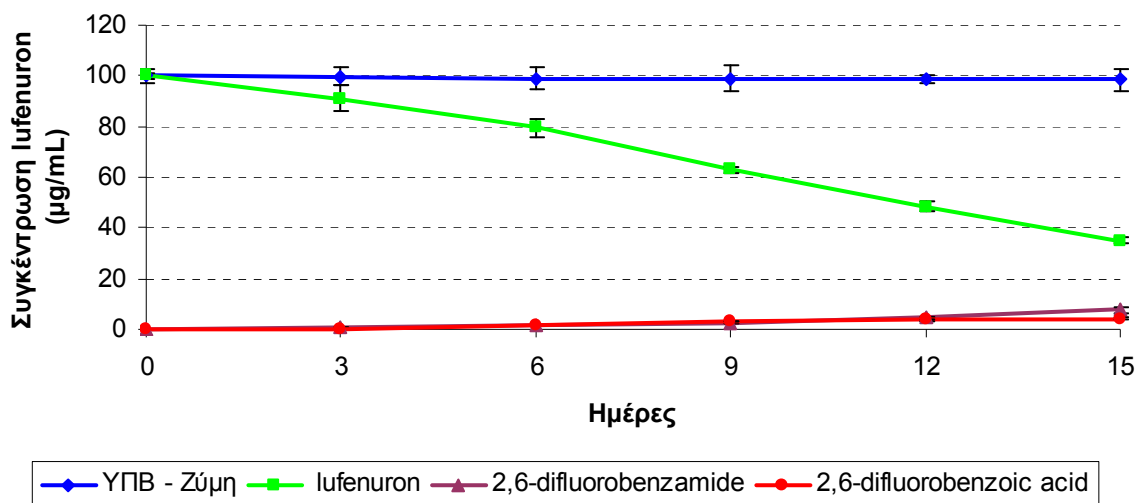
Η *Rhodotorula glutinis* στο υλικό με γλυκόζη αποδόμησε κατά την 15^η ημέρα το 20,66% της αρχικής ποσότητας του lufenuron στην υγρή καλλιέργειά της, ενώ στο υλικό χωρίς γλυκόζη παρουσίασε πιο έντονη δράση αποδομώντας το 56,84% της αρχικής ποσότητας. Όσον αφορά τους μεταβολίτες, στο υλικό με γλυκόζη ανιχνεύτηκαν ταυτόχρονα την 6^η ημέρα του πειράματος και κατά το τέλος τους εμφάνισαν μέγιστες τιμές 3,45µg/mL το 2,6-difluorobenzamide και 2,01µg/mL το 2,6-difluorobenzoic acid.

Rhodotorula rubra- Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 73. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ με γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 100µg/mL lufenuron. Παραγωγή μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula rubra- Υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 74. Μείωση επιπέδων του lufenuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YΠB χωρίς γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 100µg/mL lufenuron. Παραγωγή μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Η *Rhodotorula rubra* αποδείχτηκε για άλλη μια φορά πιο δραστήρια στην αποδόμηση, αποδομώντας έως την τελευταία ημέρα του πειράματος το 77,59% της αρχικής ποσότητας lufenuron στο υλικό γλυκόζη και το 64,91% στο υλικό χωρίς γλυκόζη. Ο μεταβολίτης 2,6-difluorobenzamide παρατηρήθηκε κατά την 3^η ημέρα και στα δύο είδη υλικών και παρουσίασε μέγιστο την 15^η στα 9,34µg/mL, στο υλικό με γλυκόζη και 4,76µg/mL στο υλικό χωρίς γλυκόζη. Τέλος το 2,6-difluorobenzoic acid ανιχνεύτηκε και στα δύο υλικά την 6^η ημέρα και έφτασε στα 4,76µg/mL και 4,03 µg/mL στα υλικά με και χωρίς γλυκόζη, αντίστοιχα.

Η αυξημένη συγκέντρωση lufenuron οδήγησε σε μεγαλύτερους ρυθμούς βιοαποδόμησης και αυξημένες παραγόμενες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών.

3.4.2.7 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη βιοαποδόμηση του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

Όπως και στα προηγούμενα φυτοπροστατευτικά προϊόντα η θερμοκρασία επώασης στην οποία παρατηρήθηκε η βέλτιστη ικανότητα και των δύο ζυμών να αποδομούν το lufenuron ήταν οι 25°C. Στους 35°C δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καθόλου αποδόμηση, ενώ στους 15°C ο ρυθμός βιοαποδόμησης ήταν μικρότερος εκείνου στους 25°C.

3.4.2.8 Βιοαποδόμηση του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* σε συνάρτηση του χρόνου επώασης των καλλιέργειών και του μεγέθους του μολύσματος

Η επίδραση της πληθυσμιακής πυκνότητας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στην ικανότητά τους να αποδομούν το teflubenzuron μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τη χαμηλή συγκέντρωση του δρώντος συστατικού, δηλαδή τα 25μg/mL. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται αρχικά στον πίνακα που ακολουθεί και στη συνέχεια απεικονίζονται στα αντίστοιχα σχήματα.

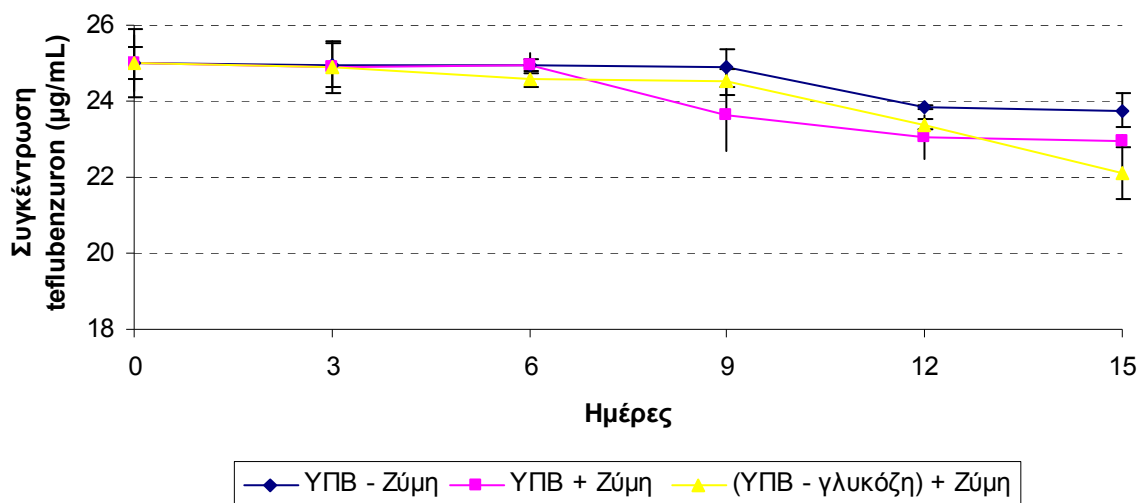
- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10^2 κύτταρα/ mL – φόρτιση teflubenzuron 25μg/mL

Τα αποτελέσματα από τη χρήση καλλιέργειας ζύμης με πληθυσμό 10^2 κύτταρα/mL παρουσιάζονται στον πίνακα και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

Πίνακας 38. Αποδόμηση του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^2 κύτταρα/mL ζύμης και 50μg/mL teflubenzuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση του teflubenzuron ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

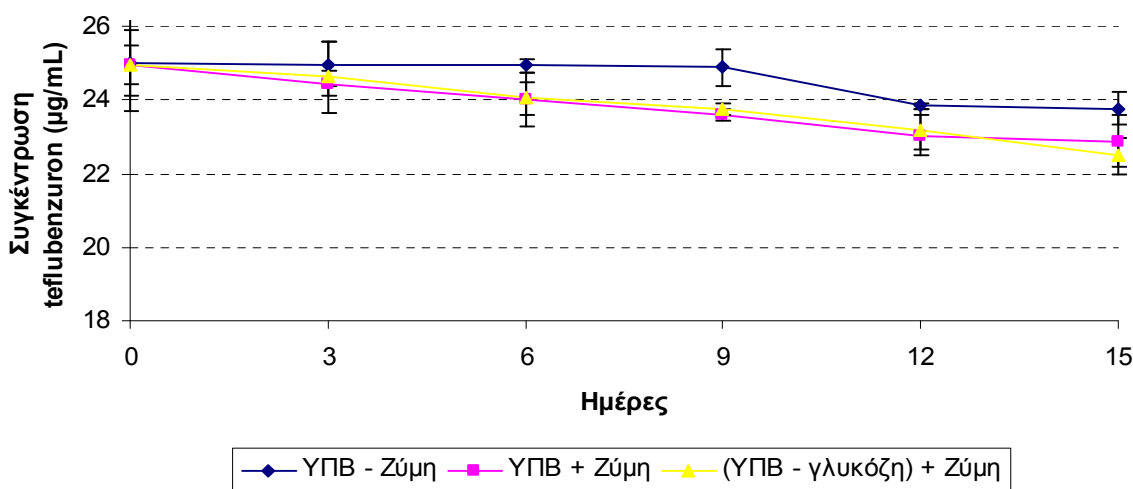
Ημέρες	Συγκέντρωση teflubenzuron (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)		
	ΥΠΒ – Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη	(ΥΠΒ - γλυκόζη) + Ζύμη
<i>Rhodotorula glutinis</i>			
0+	25,00 ± 3,53	24,99 ± 2,99	25,00 ± 1,67
3	24,97 ± 2,44	24,92 ± 0,33	24,89 ± 2,66
6	24,93 ± 0,68	24,95 ± 1,32	24,57 ± 0,91
9	24,89 ± 2,00	23,61 ± 4,03	24,51 ± 1,35
12	23,84 ± 0,32	23,05 ± 2,45	23,38 ± 0,55
15	23,76 ± 1,88	22,95 ± 0,66	22,12 ± 3,08
<i>Rhodotorula rubra</i>			
0+	25,00 ± 3,53	24,98 ± 5,06	24,97 ± 2,06
3	24,97 ± 2,44	24,45 ± 1,34	24,63 ± 3,91
6	24,93 ± 0,68	24,03 ± 3,06	24,05 ± 1,88
9	24,89 ± 2,00	23,57 ± 0,67	23,76 ± 0,59
12	23,84 ± 0,32	23,04 ± 2,45	23,19 ± 2,39
15	23,76 ± 1,88	22,87 ± 3,11	22,48 ± 2,25

Rhodotorula glutinis



Σχήμα 75. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με και χωρίς γλυκόζη) 10^2 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula rubra



Σχήμα 76. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με και χωρίς γλυκόζη) 10^2 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Η υποβάθμιση των επιπέδων του teflubenzuron στο θρεπτικό υλικό το οποίο δεν περιείχε μικροοργανισμό ήταν της ίδιας τάξης σχεδόν με τις αντίστοιχες που παρατηρήθηκαν στο δρων συστατικό που περιέχονταν στις κωνικές φιάλες με τις ζύμες και συνεπώς η πληθυσμιακή πυκνότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* της τάξης των 10^2 κυττάρων/mL δεν μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνη για τη μείωση των επιπέδων του teflubenzuron στη συγκέντρωση των 25µg/mL.

- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10^4 κύτταρα/ mL – φόρτιση teflubenzuron 25μg/mL

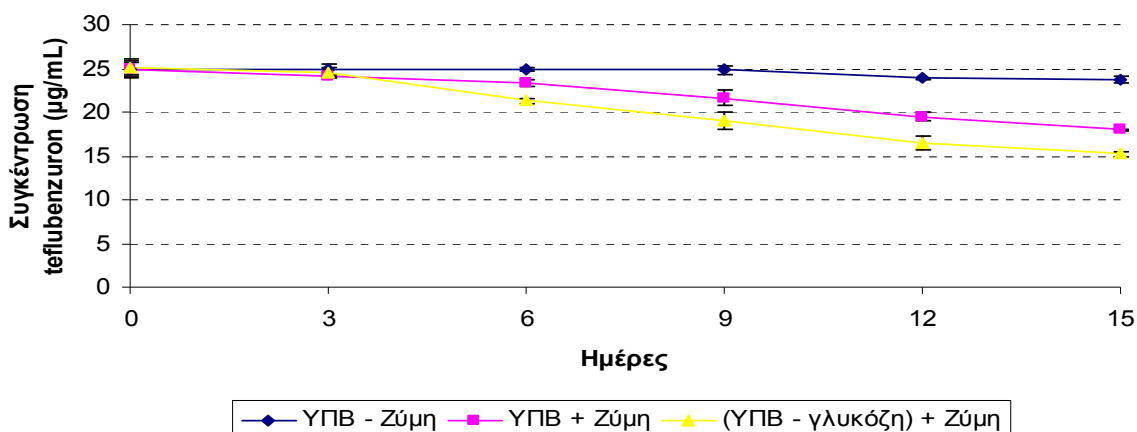
Τα αποτελέσματα από τη χρήση καλλιέργειας ζύμης με πληθυσμό 10^4 κύτταρα/mL παρουσιάζονται στον πίνακα και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

Πίνακας 39. Αποδόμηση του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και 25μg/mL teflubenzuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση του teflubenzuron ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση teflubenzuron (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)		
	ΥΠΒ - Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη	(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη
<i>Rhodotorula glutinis</i>			
0+	24,98 ± 1,21	24,99 ± 2,99	25,02 ± 4,54
3	24,93 ± 3,09	24,02 ± 0,33	24,56 ± 2,32
6	24,87 ± 2,56	23,32 ± 1,32	21,34 ± 1,45
9	23,87 ± 2,78	21,61 ± 4,03	19,00 ± 5,23
12	23,65 ± 2,31	19,45 ± 2,45	16,43 ± 5,01
15	23,03 ± 2,19	18,00 ± 0,66	15,22 ± 2,21
<i>Rhodotorula rubra</i>			
0+	24,98 ± 1,21	24,98 ± 5,06	24,99 ± 0,89
3	24,93 ± 3,09	21,45 ± 4,15	22,03 ± 1,11
6	24,87 ± 2,56	18,43 ± 0,54	20,10 ± 1,45
9	23,87 ± 2,78	14,66 ± 2,98	17,36 ± 2,35
12	23,65 ± 2,31	11,23 ± 1,32	14,22 ± 2,13
15	23,03 ± 2,19	10,34 ± 3,43	12,16 ± 1,34

Όπως και στην περίπτωση του lufenuron, έτσι και στο teflubenzuron η ικανότητα των δύο ζυμών να το αποδομούν ήταν εμφανής και από την πληθυσμιακή πυκνότητά τους στα 10^4 κύτταρα/mL ζύμης.

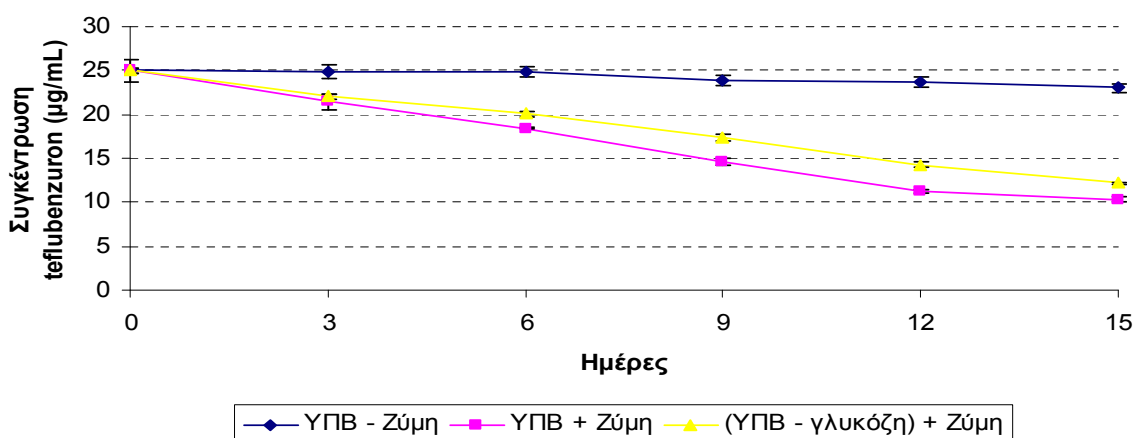
Rhodotorula glutinis



Σχήμα 77. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Όσον αφορά τη *Rhodotorula glutinis* στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης με γλυκόζη παρατηρήθηκε και στην περίπτωση αυτή καθυστέρηση και η αποδόμηση του teflubenzuron διαπιστώθηκε την 6^η ημέρα του πειράματος. Στις επόμενες δειγματοληψίες παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης του teflubenzuron φτάνοντας στην τελευταία (15^η ημέρα πειράματος) στα 18µg/mL, αποδομήθηκε, δηλαδή, το 28%. Στο υλικό χωρίς γλυκόζη παρατηρήσαμε μείωση των επιπέδων του δρώντος συστατικού από τη 2^η δειγματοληψία (3^η ημέρα πειράματος) και κατά την τελευταία μετρήθηκε συγκέντρωση teflubenzuron της τάξης των 15,22µg/mL, έχοντας αποδομηθεί το 39%.

Rhodotorula rubra



Σχήμα 78. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YPB (με και χωρίς γλυκόζη) 10^4 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Όσον αφορά τη *Rhodotorula rubra* και στις δύο κατηγορίες υλικών παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του teflubenzuron από τη 2^η δειγματοληψία. Κατά την τελευταία ημέρα του πειράματος είχε αποδομηθεί το 41,3% της αρχικής χορηγηθείσας ποσότητας teflubenzuron στο υλικό με γλυκόζη και το 48,65% στο υλικό χωρίς γλυκόζη.

- Μόλυσμα ζύμης *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra* 10⁶ κύτταρα/ mL – φόρτιση teflubenzuron 25μg/mL

Έπειτα από επώαση καλλιεργειών των ζυμών αρχικής πληθυσμιακής πυκνότητας 10⁶ κύτταρα/mL με 25μg/mL teflubenzuron σε 2 τύπους θρεπτικού υλικού, με γλυκόζη και χωρίς γλυκόζη παρατηρήθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα, όπως παρουσιάζονται στους πίνακες 40 και 41 και τα σχήματα 79 έως 82.

Στο υλικό που περιείχε γλυκόζη τα αποτελέσματα της βιοαποδόμησης του teflubenzuron παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 40. Αποδόμηση του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ με γλυκόζη 10⁶ κύτταρα/mL ζύμης και 25μg/mL teflubenzuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των teflubenzuron, 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)			
	ΥΠΒ - Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη		
		teflubenzuron	2,6-difluoro benzamide	2,6-difluoro benzoic acid
<i>Rhodotorula glutinis</i>				
0+	24,98 ± 0,78	24,99 ± 5,06	MA	MA
3	24,96 ± 2,05	24,87 ± 3,27	MA	MA
6	24,89 ± 1,54	24,67 ± 0,77	MA	MA
9	24,66 ± 3,24	21,45 ± 3,67	MA	MA
12	24,88 ± 4,07	18,34 ± 4,79	0,89 ± 12,34	0,74 ± 8,56
15	24,79 ± 3,07	14,32 ± 2,89	1,45 ± 6,07	1,67 ± 7,09
<i>Rhodotorula rubra</i>				
0+	24,98 ± 0,78	24,98 ± 0,66	MA	MA
3	24,96 ± 2,05	21,56 ± 2,80	MA	MA
6	24,89 ± 1,54	17,56 ± 3,04	MA	MA
9	24,66 ± 3,24	13,22 ± 0,77	1,05 ± 12,96	0,33 ± 4,87
12	24,88 ± 4,07	10,28 ± 5,14	1,45 ± 10,43	0,94 ± 2,50
15	24,79 ± 3,07	6,04 ± 3,67	2,03 ± 7,89	2,86 ± 8,92

Στο θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη παρατηρήθηκαν τα παρακάτω:

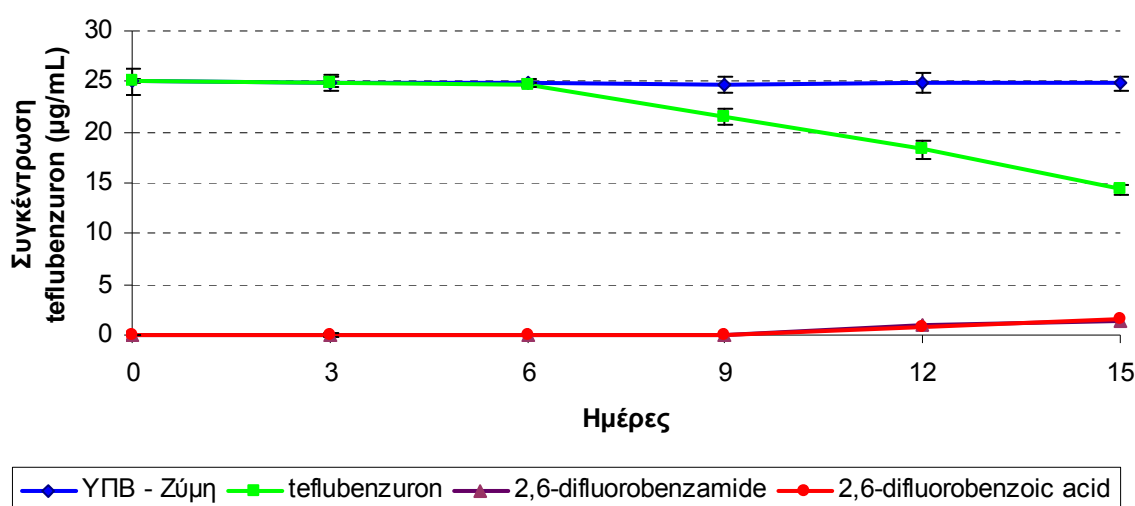
Πίνακας 41. Αποδόμηση του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ χωρίς γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25μg/mL teflubenzuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των teflubenzuron, 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)			
	ΥΠΒ – Ζύμη	(ΥΠΒ – γλυκόζη) + Ζύμη		
		Teflubenzuron	2,6-difluorobenzamide	2,6-difluorobenzoic acid
<i>Rhodotorula glutinis</i>				
0+	24,98 ± 0,78	25,01 ± 2,36	MA	MA
3	24,96 ± 2,05	22,56 ± 1,45	MA	MA
6	24,89 ± 1,54	19,77 ± 0,69	0,84 ± 6,23	0,22 ± 5,62
9	24,66 ± 3,24	14,34 ± 5,03	1,54 ± 11,43	0,87 ± 14,05
12	24,88 ± 4,07	10,56 ± 3,91	1,96 ± 12,08	1,37 ± 11,77
15	24,79 ± 3,07	7,64 ± 0,56	2,62 ± 13,64	2,87 ± 5,14
<i>Rhodotorula rubra</i>				
0+	24,98 ± 0,78	25,03 ± 2,63	MA	MA
3	24,96 ± 2,05	22,88 ± 3,16	MA	MA
6	24,89 ± 1,54	18,76 ± 3,60	MA	MA
9	24,66 ± 3,24	14,61 ± 6,13	MA	MA
12	24,88 ± 4,07	9,69 ± 3,76	1,23 ± 13,94	0,78 ± 9,16
15	24,79 ± 3,07	8,34 ± 2,45	1,89 ± 11,98	2,53 ± 8,64

MA: Μη Ανιχνεύσιμα υπολείμματα

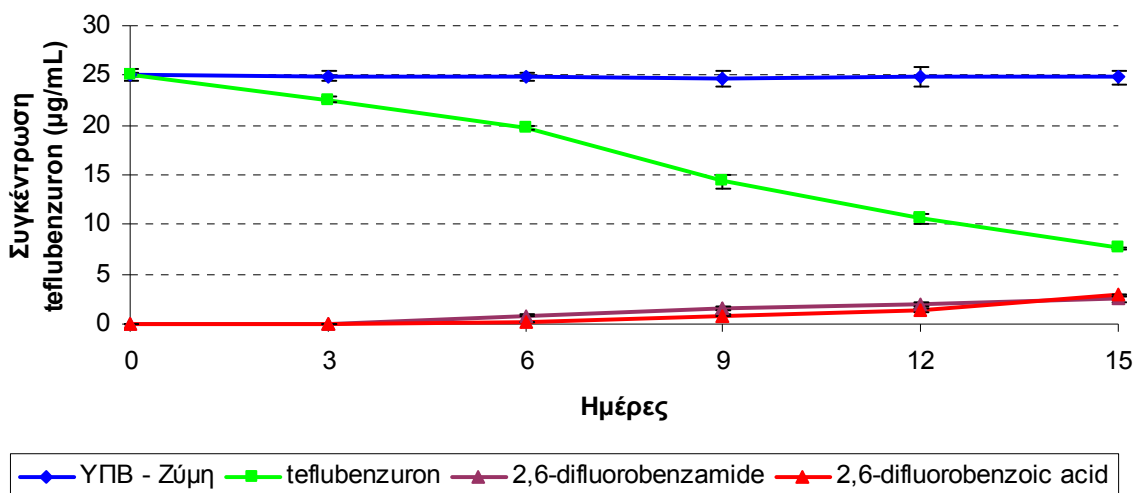
Τα αποτελέσματα των παραπάνω πινάκων επιβεβαιώνουν την ικανότητα των δύο ζυμών να αποδομούν το teflubenzuron.

Rhodotorula glutinis- υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 79. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25μg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

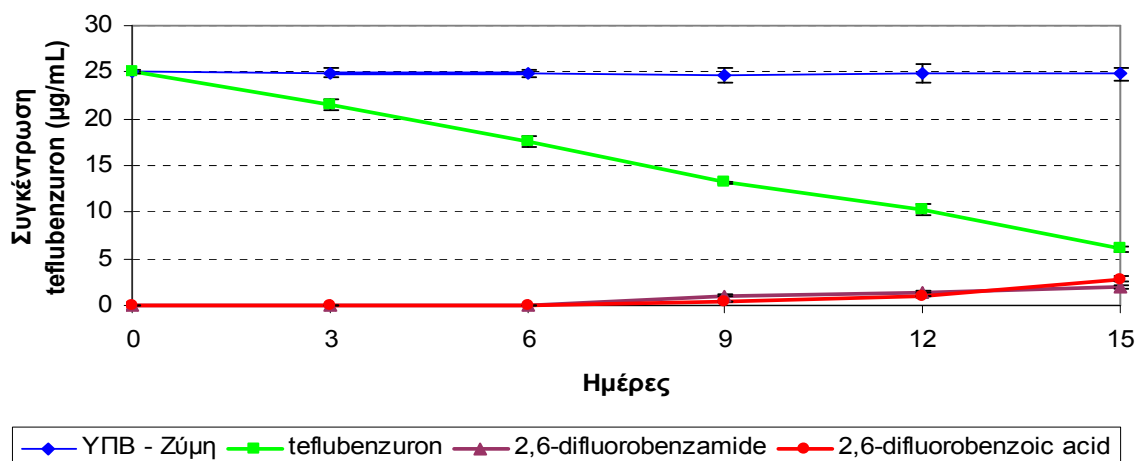
Rhodotorula glutinis- υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 80. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YΠB (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

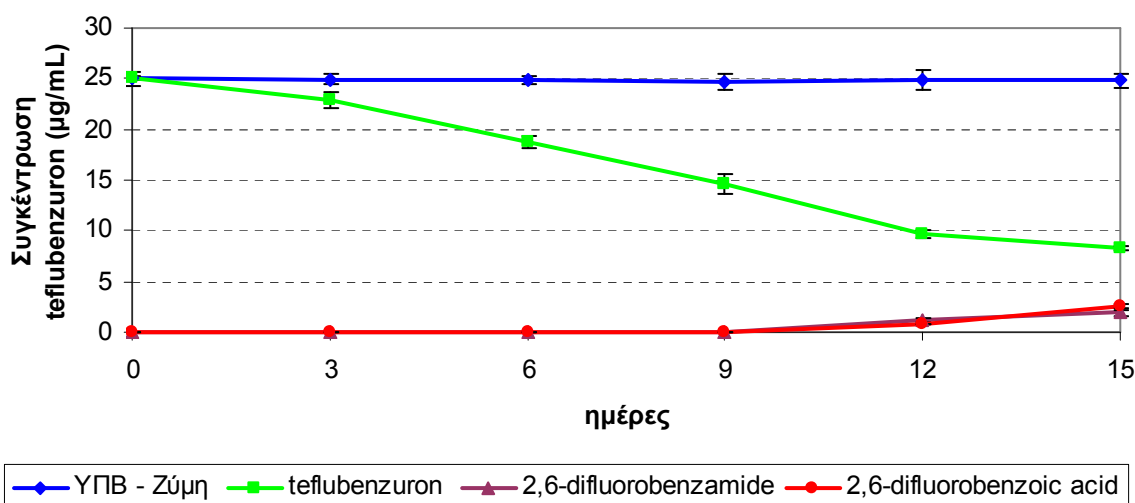
Όσον αφορά τη *Rhodotorula glutinis* παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό, η συγκέντρωση του teflubenzuron μειώθηκε μετά την 6^η ημέρα, όμως, και κατά την 15^η ημέρα ήταν 14,32µg/mL. Κατά την 12^η ημέρα ανιχνεύτηκαν και οι δύο μεταβολίτες 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Στο θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει γλυκόζη η μικροβιακή αποδόμηση του teflubenzuron ξεκίνησε από την αρχή του πειράματος και στο πέρας του αποδομήθηκε δηλαδή το 30,54%. Από την 6^η ημέρα ανιχνεύτηκαν και οι μεταβολίτες 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid, οι οποίοι κατά την τελευταία δειγματοληψία ποσοτικοποιήθηκαν στα 2,62 και 2,87µg/mL, αντίστοιχα.

Rhodotorula rubra- Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 81. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YΠΒ (με γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula rubra- Υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 82. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό YΠΒ (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 25µg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Στην περίπτωση της *Rhodotorula rubra*, παρατηρήθηκε αποδόμηση του teflubenzuron από την 3^η ημέρα του πειράματος και στα δύο είδη θρεπτικού υλικού. Στην τελευταία δειγματοληψία στο υλικό με γλυκόζη αποδομήθηκε το 74,61% της αρχικής ποσότητας, ενώ στο υλικό χωρίς γλυκόζη το 66,7%. Όσον αφορά τους χρόνους παραγωγής μεταβολιτών, στο υλικό με γλυκόζη ανιχνεύτηκαν και οι δυο μεταβολίτες κατά την 9^η ημέρα του πειράματος, ενώ στο υλικό χωρίς γλυκόζη κατά την 12^η ημέρα. Διαφορές υπήρξαν στα δύο υλικά ως προς

τις παραγόμενες συγκεντρώσεις, παρατηρώντας πως και στα δύο είδη υλικού το 2,6-difluorobenzoic acid παράχθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Επιβεβαιώνεται, συνεπώς, πως και στην περίπτωση του teflubenzuron (όπως έχει ήδη παρατηρηθεί και στα άλλα φυτοπροστατευτικά προϊόντα) πως η προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό ως επιπλέον πηγή άνθρακα επηρέασε θετικά την αποδομητική ικανότητα της ζύμης *Rhodotorula rubra*. Στην περίπτωση του θρεπτικού υλικού με γλυκόζη ο ρυθμός βιοαποδόμησης ήταν λίγο μεγαλύτερος του αντίστοιχου στο υλικό χωρίς γλυκόζη, ήταν 1,26μg/mL/ημέρα και 1,11μg/mL/ημέρα αντίστοιχα.

3.4.2.9 Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του teflubenzuron στο ρυθμό αποδόμησής του από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

Σε θρεπτικό υλικό με πληθυσμιακή πυκνότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* 10^6 κύτταρα/mL, στην οποία παρατηρήθηκε ο υψηλότερος ρυθμός βιοαποδόμησης προστέθηκαν 50μg/mL teflubenzuron. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στους πίνακες και τα διαγράμματα που ακολουθούν.

Στο θρεπτικό υλικό που περιείχε γλυκόζη παρατηρήθηκαν τα παρακάτω.

Πίνακας 42. Αποδόμηση του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ με γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50μg/mL teflubenzuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των teflubenzuron, 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)			
	ΥΠΒ - Ζύμη	ΥΠΒ + Ζύμη		
		Teflubenzuron	2,6-difluoro benzamide	2,6-difluoro benzoic acid
<i>Rhodotorula glutinis</i>				
0+	50,02 ± 3,43	49,98 ± 1,56	MA	MA
3	49,88 ± 4,56	49,96 ± 0,87	MA	MA
6	49,93 ± 2,32	49,85 ± 3,45	1,09 ± 7,08	MA
9	49,85 ± 0,65	44,54 ± 2,82	1,68 ± 11,92	1,76 ± 11,05
12	49,73 ± 2,78	39,75 ± 1,59	2,47 ± 13,53	2,34 ± 7,59
15	49,69 ± 1,67	34,33 ± 4,23	3,32 ± 14,26	4,01 ± 9,54
<i>Rhodotorula rubra</i>				
0+	50,02 ± 3,43	49,96 ± 2,32	MA	MA
3	49,88 ± 4,56	43,91 ± 3,56	MA	MA
6	49,93 ± 2,32	38,42 ± 2,34	MA	MA
9	49,85 ± 0,65	33,65 ± 5,21	0,98 ± 14,06	2,05 ± 8,63
12	49,73 ± 2,78	25,87 ± 9,33	1,89 ± 12,55	4,29 ± 11,32
15	49,69 ± 1,67	18,16 ± 11,42	4,04 ± 8,91	6,32 ± 10,25

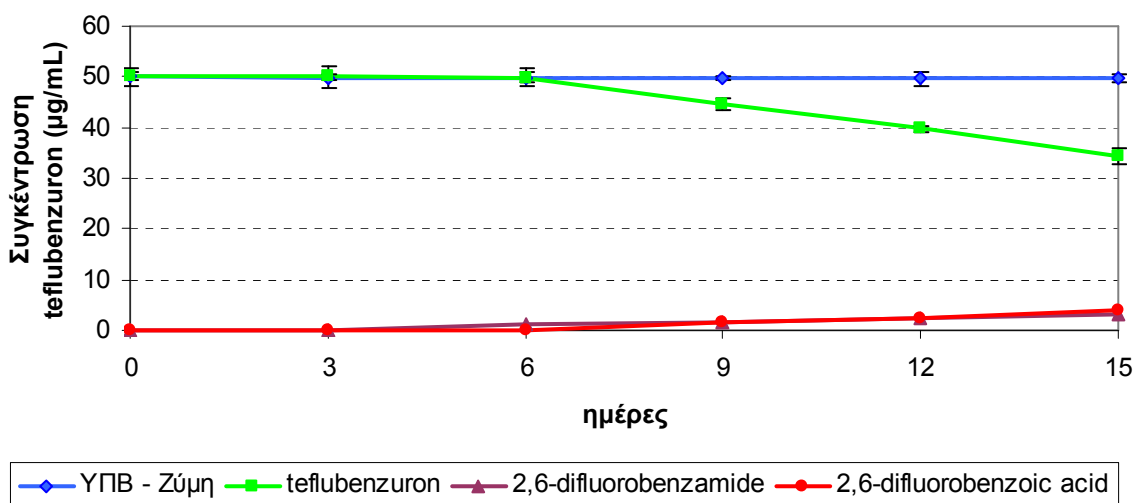
Τα αποτελέσματα στο υλικό χωρίς γλυκόζη ήταν τα παρακάτω:

Πίνακας 43. Αποδόμηση του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ χωρίς γλυκόζη 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50μg/mL teflubenzuron. Στα αποτελέσματα εκφράζεται η συγκέντρωση των teflubenzuron, 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων προσθαφαιρούμενης της σχετικής τυπικής απόκλισης.

Ημέρες	Συγκέντρωση (μg/mL) ± Σχετική τυπική απόκλιση (RSD, %)			
	ΥΠΒ - Ζύμη	(ΥΠΒ - γλυκόζη) + Ζύμη		
		Teflubenzuron	2,6-difluoro Benzamide	2,6-difluoro benzoic acid
<i>Rhodotorula glutinis</i>				
0+	50,02 ± 3,43	49,97 ± 1,89	MA	MA
3	49,88 ± 4,56	49,68 ± 3,35	MA	MA
6	49,93 ± 2,32	46,56 ± 0,67	MA	MA
9	49,85 ± 0,65	40,83 ± 4,36	1,34 ± 11,10	1,57 ± 12,09
12	49,73 ± 2,78	32,45 ± 4,02	2,74 ± 9,15	2,51 ± 7,45
15	49,69 ± 1,67	27,04 ± 5,10	4,03 ± 12,04	5,16 ± 10,72
<i>Rhodotorula rubra</i>				
0+	50,02 ± 3,43	49,89 ± 2,11	MA	MA
3	49,88 ± 4,56	42,45 ± 1,66	MA	MA
6	49,93 ± 2,32	37,67 ± 3,64	MA	MA
9	49,85 ± 0,65	26,81 ± 4,47	2,36 ± 10,65	3,11 ± 8,56
12	49,73 ± 2,78	20,73 ± 1,41	3,93 ± 12,45	4,63 ± 6,83
15	49,69 ± 1,67	15,42 ± 1,39	6,03 ± 9,13	7,83 ± 10,51

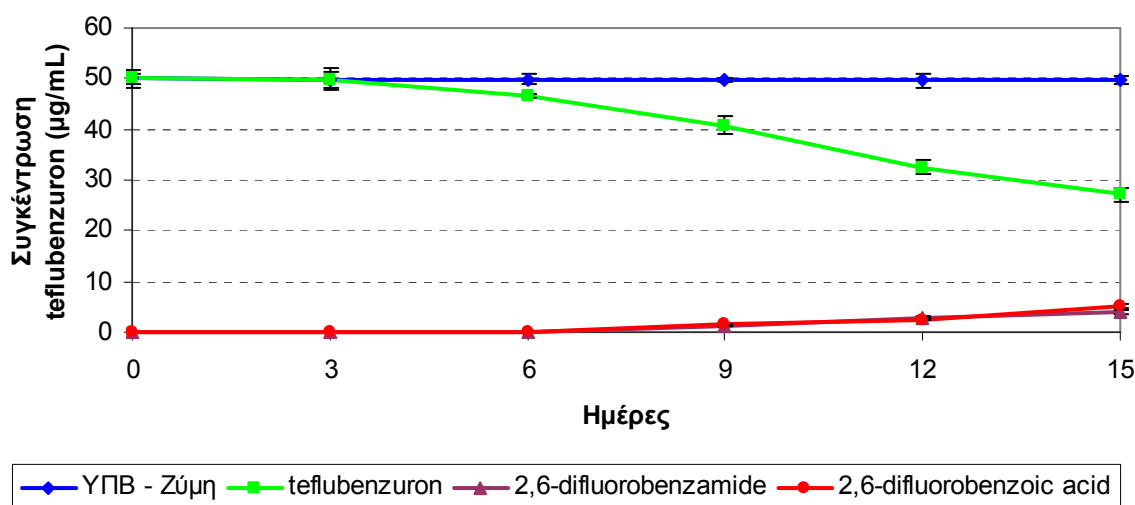
Στην περίπτωση της υψηλής χορηγηθείσας συγκέντρωσης teflubenzuron (50μg/mL) θα λέγαμε πως η μικροβιακή αποδόμηση ήταν πιο έντονη.

Rhodotorula glutinis- Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 83. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (με γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50μg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

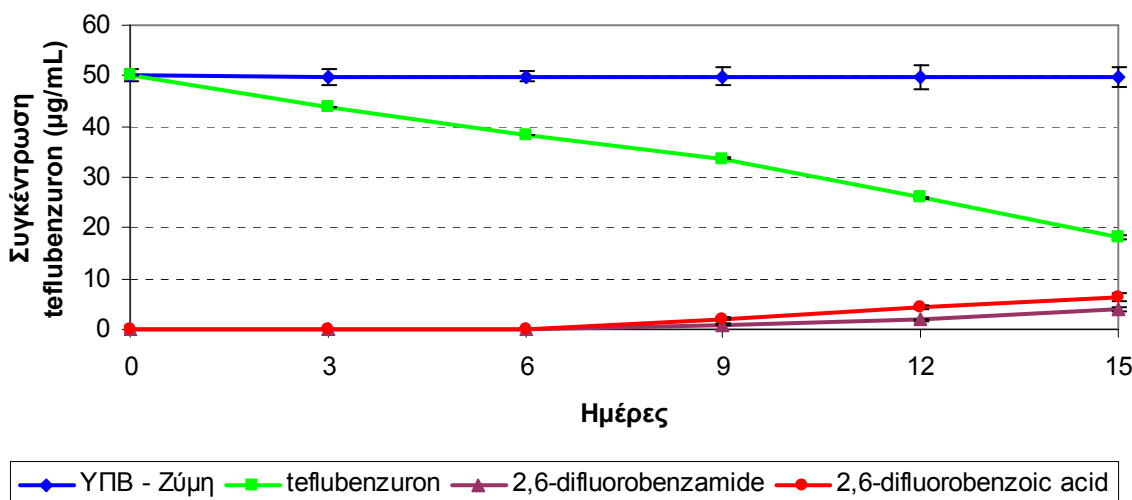
Rhodotorula glutinis- Υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 84. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50µg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

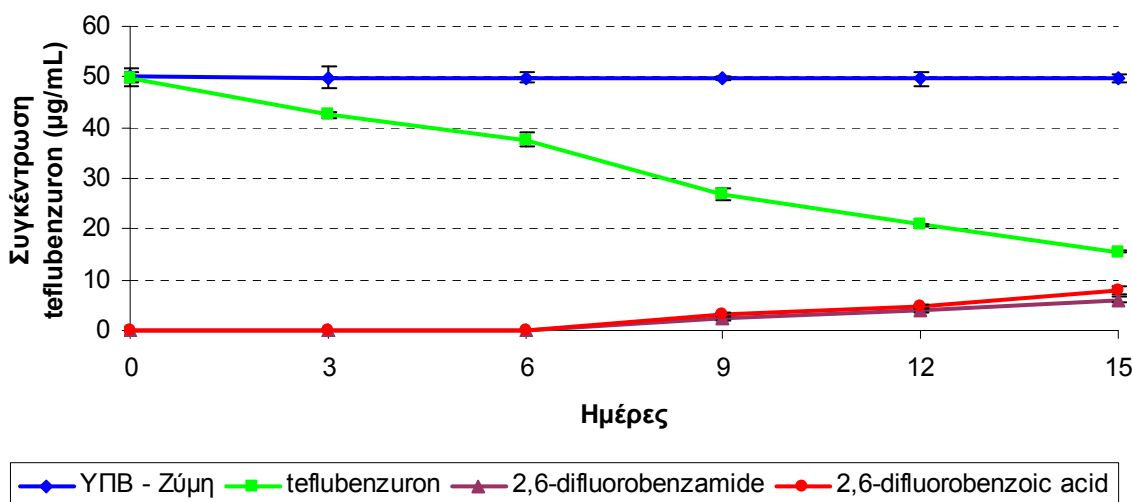
Η *Rhodotorula glutinis* στο υλικό με γλυκόζη αποδόμησε κατά την 15^η ημέρα το 31,3% της αρχικής ποσότητας του teflubenzuron στην υγρή καλλιέργειά της, ενώ στο υλικό χωρίς γλυκόζη παρουσίασε πιο έντονη δράση αποδομώντας το 54,1% της αρχικής ποσότητας. Όσον αφορά τους μεταβολίτες, στο υλικό με γλυκόζη κατά την 6^η ημέρα ανιχνεύτηκε το 2,6-difluorobenzamide το οποίο παρουσίασε μέγιστη συγκέντρωση κατά την 15^η ημέρα στα 3,32µg/mL. Το 2,6-difluorobenzoic acid ανιχνεύτηκε κατά την 9^η ημέρα και παρουσίασε μέγιστη τιμή στα 4,01µg/mL. Στο υλικό χωρίς γλυκόζη παρατηρήθηκε ταυτόχρονη ανίχνευση και των δύο μεταβολιτών στην 9^η ημέρα του πειράματος με μέγιστες τιμές τα 4,03µg/mL για το 2,6-difluorobenzamide και 5,16µg/mL για το 2,6-difluorobenzoic acid. Παρατηρούμε πως στην περίπτωση αυτή η τελική συγκέντρωση του 2,6-difluorobenzoic acid ήταν μεγαλύτερη της αντίστοιχης του 2,6-difluorobenzamide.

Rhodotorula rubra- Υλικό με γλυκόζη



Σχήμα 85. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠB (με γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50µg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Rhodotorula rubra- Υλικό χωρίς γλυκόζη



Σχήμα 86. Μείωση επιπέδων του teflubenzuron από τη ζύμη *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠB (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης και 50µg/mL teflubenzuron. Η κάθετη μπάρα εκφράζει την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Η *Rhodotorula rubra* αποδείχτηκε για άλλη μια φορά πιο δραστήρια στην αποδόμηση, αποδομώντας έως την τελευταία ημέρα του πειράματος το 63,65% της αρχικής ποσότητας teflubenzuron στο υλικό με γλυκόζη και το 69,1% στο υλικό χωρίς γλυκόζη. Η παραγωγή των μεταβολιτών έλαβε χώρα και στα δυο είδη υλικών κατά την 9^η ημέρα. Το 2,6-difluorobenzamide παρουσίασε μέγιστες συγκεντρώσεις στα 4,04µg/mL και 6,03µg/mL στα

υλικά με και χωρίς γλυκόζη αντίστοιχα, ενώ το 2,6-difluorobenzoic acid στα 6,32 και 7,83μg/mL, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ξανά πως οι τιμές του δεύτερου μεταβολίτη είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες του πρώτου, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στην αποδόμηση του lufenuron.

3.4.2.10 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη βιοαποδόμηση του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

Και στην περίπτωση του teflubenzuron η θερμοκρασία επώασης στην οποία παρατηρήθηκε η βέλτιστη ικανότητα και των δύο ζυμών να αποδομούν το teflubenzuron είναι οι 25°C. Στους 35°C δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καθόλου αποδόμηση, ενώ στους 15°C σε μικρότερο βαθμό.

3.4.3 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης των lufenuron και teflubenzuron σε βιοχημικό επίπεδο

3.4.3.1 Επίδραση των lufenuron και teflubenzuron στην ενεργότητα των ενζυμικών συστημάτων βιοαποδόμησης

Έπειτα από την προσθήκη του lufenuron και του teflubenzuron στις ενζυμικές δοκιμές που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 2.6, παρατηρήθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

- Επίδραση των lufenuron και teflubenzuron στην ενεργότητα των μεταφορασών της γλουταθειόνης

Στο πρωτόκολλο πειραματισμού της παραγράφου 2.6.1.3 προστέθηκαν διαδοχικά 10μM, 20μM, 30μM και 40μM lufenuron και 13μM, 26μM, 39μM και 52μM teflubenzuron. Έπειτα από μετρήσεις στο σπεκτροφωτόμετρο στα 340nm κινητικά κάθε 2 λεπτά, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 43.

Όπως παρατηρείται, το lufenuron και το teflubenzuron δε μείωσαν την ενεργότητα των GSTs σε καμία από τις δύο ζύμες και συνεπώς δεν μπορούν να θεωρηθούν αναστολείς των εν λόγω ενζύμων. Δεν υπάρχει συνεπώς αλληλεπίδραση μεταξύ των εντομοκτόνων αυτών και του ενεργού κέντρου πρόσδεσης των GSTs με το υπόστρωμα.

Πίνακας 43. Επίδραση του lufenuron και του teflubenzuron στην ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος των μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs) των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*.

Ζύμη	Lufenuron		Teflubenzuron	
	Συγκέντρωση lufenuron (μM)	Ενεργότητα (μmol/min/μg πρωτεΐνης)	Συγκέντρωση teflubenzuron (μM)	Ενεργότητα (μmol/min/μg πρωτεΐνης)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	3,125	0	3,125
	10	3,098	13	2,985
	20	3,135	26	3,046
	30	2,968	39	3,165
	40	2,957	52	2,865
<i>Rhodotorula rubra</i>	0	6,234	0	6,234
	10	6,136	13	5,995
	20	6,267	26	6,111
	30	6,087	39	6,095
	40	6,106	52	6,256

➤ Επίδραση των lufenuron και teflubenzuron στην ενεργότητα των εστερασών

Στο πρωτόκολλο πειραματισμού της παραγράφου 2.6.1.4 για τα υποστρώματα a-naphthyl acetate και b-naphthyl acetate προστέθηκαν διαδοχικά, 10μM, 20μM, 30μM και 40μM lufenuron και 13μM, 26μM, 39μM και 52μM teflubenzuron. Οι μετρήσεις παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί, στον οποίο θα πρέπει να διευκρινίσουμε ότι δεδομένου ότι οι τιμές της ενεργότητας για τα δύο υποστρώματα ήταν κατά πολύ όμοιες παρουσιάζεται η μέση τιμή αυτών σε κάθε συγκέντρωση εντομοκτόνου.

Πίνακας 44. Επίδραση των lufenuron και teflubenzuron στην ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος των εστερασών των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*, με χρήση των ενζυμικών υποστρωμάτων a & b-naphthyl acetate. Οι τιμές της ενεργότητας δίνονται ως μέση τιμή των δύο υποστρωμάτων.

Ζύμη	Lufenuron		Teflubenzuron	
	Συγκέντρωση lufenuron (μM)	Ενεργότητα (μmol/min/μg πρωτεΐνης)	Συγκέντρωση teflubenzuron (μM)	Ενεργότητα (μmol/min/μg πρωτεΐνης)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	3,255	0	3,255
	10	3,178	13	3,209
	20	3,456	26	2,987
	30	2,908	39	3,056
	40	3,123	52	2,999
<i>Rhodotorula rubra</i>	0	3,603	0	3,603
	10	3,456	13	3,035
	20	3,245	26	3,402
	30	2,965	39	2,892
	40	3,076	52	3,156

Ούτε το lufenuron ούτε το teflubenzuron μείωσαν την ενεργότητα των εστερασών των δύο ζύμες και συνεπώς δεν μπορούν να θεωρηθούν αναστολείς τους. Δεν υπάρχει συνεπώς αλληλεπίδραση μεταξύ των εντομοκτόνων αυτών και του ενεργού κέντρου πρόσδεσης των εστερασών με το υπόστρωμα.

3.4.3.2 Πειράματα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* με προσθήκη συνεργιστή

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη, στο οποίο και οι δυο ζύμες έχουν δείξει έντονη δράση βιοαποδόμησης των lufenuron και teflubenzuron, πληθυσμιακή πυκνότητα ζύμης τα 10^6 κύτταρα/mL και συγκέντρωση για το lufenuron τα 50μg/mL και για το teflubenzuron 25μg/mL. Ο εκάστοτε συνεργιστικός παράγοντας προστέθηκε σε συγκέντρωση 10μg/mL.

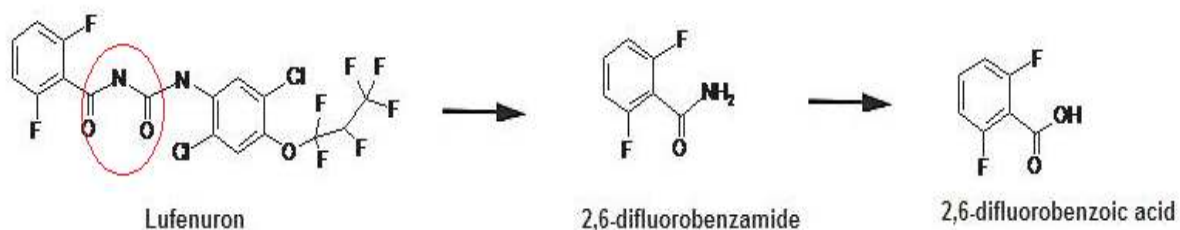
Πίνακας 45. Αποδόμηση του lufenuron και του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* έπειτα από προσθήκη σε θρεπτικό υλικό ΥΠΒ (χωρίς γλυκόζη) 10^6 κύτταρα/mL ζύμης, 50μg/mL lufenuron ή 25μg/mL teflubenzuron και 10μg/mL triphenyl phosphate ή diethyl maleate ή piperonyl butoxide και επώαση για 5 ημέρες.

Ημέρες	Συγκέντρωση lufenuron (μg/mL)			Συγκέντρωση teflubenzuron (μg/mL)		
	ΥΠΒ - Ζύμη	<i>Rh. glutinis</i>	<i>Rh. rubra</i>	ΥΠΒ - Ζύμη	<i>Rh. glutinis</i>	<i>Rh. rubra</i>
Triphenyl phosphate						
0+	49,98	49,99	49,96	25	24,99	24,99
1	49,92	46,23	44,23	24,96	22,46	23,46
2	49,82	44,68	39,87	24,92	19,45	18,56
3	49,87	39,47	37,45	24,95	16,39	13,67
4	49,64	36,11	28,34	23,88	14,56	10,64
5	49,57	29,65	21,39	23,84	11,98	8,53
Piperonyl butoxide						
0+	49,98	50	49,99	25	24,99	24,98
1	49,92	49,84	49,93	24,96	24,98	24,93
2	49,82	49,62	49,85	24,92	24,91	24,87
3	49,87	49,32	49,56	24,95	24,84	24,27
4	49,64	48,99	48,84	23,88	23,98	23,97
5	49,57	48,74	48,61	23,84	23,94	23,72
Diethyl maleate						
0+	49,98	50	49,99	25	25,02	24,98
1	49,92	49,34	49,23	24,96	24,95	24,97
2	49,82	49,22	49,65	24,92	24,95	24,84
3	49,87	49,87	49,06	24,95	24,23	24,55
4	49,64	48,98	48,77	23,88	23,93	23,94
5	49,57	48,94	48,53	23,84	23,97	23,60

Όπως παρατηρείται η αποδόμηση τόσο του lufenuron όσο και του teflubenzuron από τις δύο ζύμες δεν παρεμποδίστηκε από την παρουσία του triphenyl phosphate στο υλικό ανάπτυξής τους. Αντίθετα, παρεμπόδιση παρατηρήθηκε στην περίπτωση των πειραμάτων με προσθήκη piperonyl butoxide, γεγονός το οποίο υποδεικνύει πως το ενζυμικό σύστημα μονοοξυγονασών που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀ εμπλέκεται στη βιοαποδόμηση των δύο βενζοϋλουριών από τις ζύμες του γένους *Rhodotorula*.

3.4.3.3 Προτεινόμενο μονοπάτι βιοαποδόμησης του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

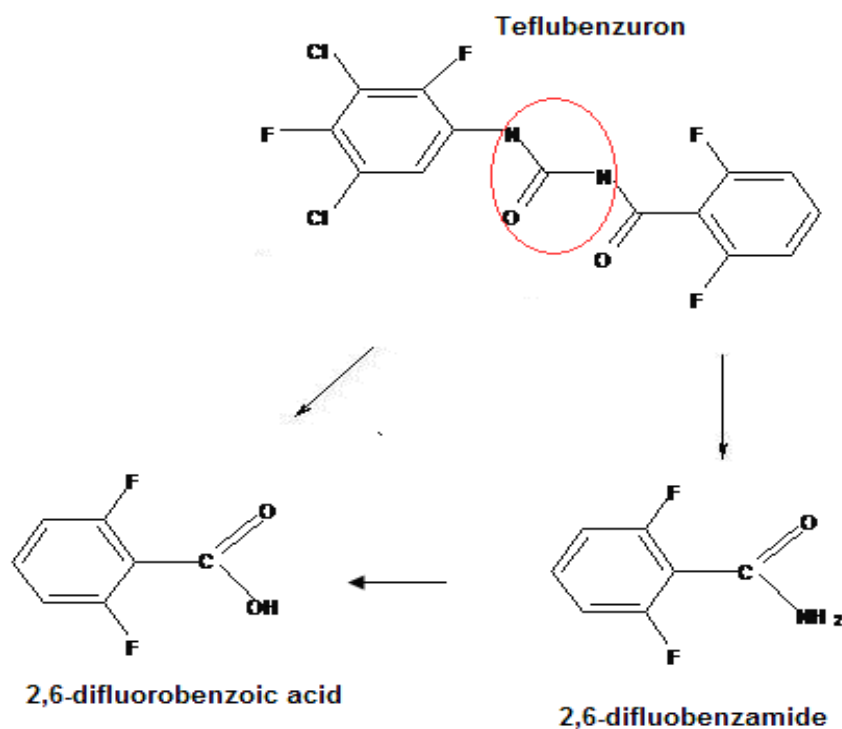
Κατά την αποδόμηση, συνεπώς του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*, μέσω της δράσης των μονοοξυγονασών που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀, πραγματοποιείται διάσπαση του ουρεϊκού δεσμού στο μητρικό μόριο και παραγωγή του μεταβολίτη 2,6-difluorobenzamide, το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται και μετατρέπεται σε 2,6-difluorobenzoic acid (Σχήμα 87). Το προτεινόμενο μονοπάτι αποδόμησης του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 87. Προτεινόμενο μονοπάτι βιοαποδόμησης του lufenuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*.

3.4.3.4 Προτεινόμενο μονοπάτι βιοαποδόμησης του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*

Στην περίπτωση της βιοαποδόμησης του teflubenzuron από τις δύο ζύμες, μέσω της δράσης των μονοοξυγονασών που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀, παρατηρήθηκε σχεδόν πάντα ταυτόχρονη ανίχνευση των μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Επιπλέον, τα επίπεδα του 2,6-difluorobenzoic acid στην τελευταία δειγματοληψία είναι υψηλότερα εκείνων του 2,6-difluorobenzamide. Οι παρατηρήσεις αυτές δεν είναι απόλυτα σύμφωνες με τη διαπίστωση στην οποία καταλήξαμε κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της αποδόμησης του lufenuron, ότι δηλαδή αρχικά παράγεται το 2,6-difluorobenzamide, το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται σε 2,6-difluorobenzoic acid. Θεωρούμαι, συνεπώς, πως πραγματοποιείται απαλκυλίωση και στη συνέχεια διάσπαση του ουρείκού δεσμού στο μητρικό μόριο και παραγωγή και των δύο μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Το 2,6-difluorobenzamide στη συνέχεια υδρολύεται και μετατρέπεται σε 2,6-difluorobenzoic acid, αυξάνοντας έτσι τη συνολική συγκέντρωση του τελευταίου. Το προτεινόμενο μονοπάτι αποδόμησης του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* παρουσιάζεται εντός του πλαισίου στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 88. Προτεινόμενο μονοπάτι βιοαποδόμησης του teflubenzuron από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*.

3.4.4 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε καρπούς τομάτας

3.4.4.1 Αποτελέσματα επικύρωσης αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων των lufenuron και teflubenzuron σε καρπούς τομάτας

Με στόχο τον έλεγχο της ποιότητας της μεθόδου εκχύλισης και προσδιορισμού των lufenuron και teflubenzuron από τους καρπούς τομάτας τους χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελέγχου ποιότητας και πραγματοποιήθηκε επικύρωση της μεθόδου στο χρωματογραφικό σύστημα HPLC/DAD/APCI/MS. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα καρπών τομάτας εμβολιασμένα με lufenuron σε συγκεντρώσεις των 0,2 και 1mg/kg και με teflubenzuron σε συγκεντρώσεις των 0,5 και 1mg/kg.

Πίνακας 46. Μέση τιμή ανακτήσεων και σχετικές τυπικές αποκλίσεις για τις 2 βενζοϋλουρίες (lufenuron και teflubenzuron) όπως προέκυψαν από τη χρωματογραφική ανάλυση εκχυλίσματος δείγματος τομάτας σε δύο επίπεδα εμβολιασμού στο χρωματογραφικό σύστημα HPLC/DAD/APCI/MS.

Αναλύτης	1 ^ο επίπεδο φόρτισης (n=5)					2 ^ο επίπεδο φόρτισης N=6				
	C (mg/kg)	UV DAD Ανιχνευτής		MS Ανιχνευτής		C (mg/kg)	UV DAD Ανιχνευτής		MS Ανιχνευτής	
Ανάκτηση (%)		RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)		RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	
Lufenuron	0,2	96,7	6,18	98,6	13,0	1	88	5,19	92,9	3,74
Teflubenzuron	0,5	99,5	3,29	97,3	5,21	1	90	6,81	98,9	6,77

Οι μέσες τιμές ανάκτησης των αναλυτών ήταν 96,7-99,5% και 92,9- 98,9% για τους ανιχνευτές UV-DAD και MS, αντίστοιχα (Πίνακας 46). Όπως παρατηρείται, η μέση ανάκτηση στο πρώτο επίπεδο εμβολιασμού προέκυψε από 5 (n=5) τιμές, δεδομένου ότι σε ένα από τα φορτισμένα δείγματα υπολογίσθηκαν πολύ χαμηλές τιμές, μικρότερες από 60%. Οι τιμές αυτές με τη βοήθεια της δοκιμασίας Dixon's (Miller, 2000), αποκλείστηκαν ως ακραίες (outliers). Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις που υπολογίσθηκαν για τα δύο επίπεδα φόρτισης κυμάνθηκαν από 3,29- 6,81% και 3,74- 13% για τους ανιχνευτές DAD και MS, αντίστοιχα. Οι τιμές των ανακτήσεων είναι αποδεκτές (εντός του εύρους 70 – 110%), όπως και οι τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων (χαμηλότερες του 20%), γεγονός που υποδεικνύει την αξιοπιστία και την καταλληλότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών lufenuron και teflubenzuron σε καρπούς τομάτας.

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου (LOQ) ήταν το χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης, δηλαδή 0,2mg/kg για το lufenuron και 0,5mg/kg για το teflubenzuron.

Δεδομένου ότι οι μετρήσεις των εμβολιασμένων με τα δύο δρώντα συστατικά καρπών

τομάτας θα πραγματοποιηθούν στο σύστημα LC/MS/MS, πραγματοποιήθηκαν νέα δείγματα ελέγχου ποιότητας σε 3 επαναλήψεις για να ελεγχθεί η καταλληλότητα της μεθόδου και στο συγκεκριμένο χρωματογραφικό σύστημα. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,05 και 0,1mg/kg και υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές ανάκτησης για το lufenuron 93,5% και 89,1% και για το teflubenzuron 97,3% και 101%, για κάθε συγκέντρωση, οι οποίες είναι όλες αποδεκτές. Οι τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης ήταν για το lufenuron 3,12% και 1,56% και για το teflubenzuron 1,67% και 4,03%, για τις συγκεντρώσεις εμβολιασμού 0,05 και 0,1mg/kg, αντίστοιχα.

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου (LOQ) ήταν το χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης, δηλαδή το 0,05mg/kg και το όριο ανίχνευσης (LOD) το 0,02mg/kg.

3.4.4.2 Υπολείμματα lufenuron ή teflubenzuron σε καρπούς τομάτας έπειτα από συνδυασμένη εφαρμογή με lufenuron ή teflubenzuron και κύτταρα ζυμών

Καρποί τομάτας ψεκάστηκαν με lufenuron ή teflubenzuron συγκέντρωσης 2mg/kg και κύτταρα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra*. Όσον αφορά το **lufenuron** οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις 3 και τις 7 ημέρες από την εφαρμογή. Στις 7 ημέρες αντιστοιχεί ο εγκεκριμένος χρόνος αναμονής από την τελευταία επέμβαση στη συγκομιδή (PreHarvest Interval- PHI) σύμφωνα με την ετικέτα του σκευάσματος Match 5 EC.

Όσον αφορά το **teflubenzuron** οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν 1 (μία) και 3 ημέρες από την εφαρμογή. Στις 3 ημέρες αντιστοιχεί ο εγκεκριμένος χρόνος αναμονής από την τελευταία επέμβαση στη συγκομιδή (PreHarvest Interval- PHI) σύμφωνα με την ετικέτα του σκευάσματος Farmalan 15 EC.

Έπειτα από την επεξεργασία των δειγμάτων και τη χρωματογραφική τους ανάλυση προέκυψαν για το lufenuron τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 47. Υπολείμματα lufenuron (συγκέντρωση σε mg/kg) σε καρπούς τομάτας έπειτα από τον ψεκάσμο τους με 2mg/kg lufenuron και 10⁸ κύτταρα/ mL των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*. Ως μάρτυρας αναφέρονται οι καρποί που έχουν ψεκαστού μόνο με lufenuron και ως επέμβαση οι καρποί που έχουν ψεκαστεί με lufenuron και με κύτταρα ζύμης.

Ημέρες	Συγκέντρωση lufenuron C (mg/kg)					
	<i>Rhodotorula glutinis</i>			<i>Rhodotorula rubra</i>		
	Μάρτυρας	Επέμβαση	Μείωση (%) του μάρτυρα	Μάρτυρας	Επέμβαση	Μείωση (%) του μάρτυρα
3	1,87	1,33	28,9	1,87	1,43	23,5
7	1,26	0,35	72,2	1,26	0,18	85,7

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 47, υπάρχει σαφής υπεροχή της μείωσης του lufenuron στην επέμβαση σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση της *Rhodotorula glutinis* στη δειγματοληψία των 7 ημερών (PHI) σημειώθηκε ελάττωση της συγκέντρωσης στην επέμβαση κατά 72,2% του μάρτυρα, ενώ στη *Rhodotorula rubra* κατά 85,7% του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αντίστοιχα αποτελέσματα των in vitro πειραμάτων βιοαποδόμησης.

Αντίστοιχα για το teflubenzuron:

Πίνακας 48. Υπολείμματα teflubenzuron (συγκέντρωση σε mg/kg) σε καρπούς τομάτας έπειτα από τον ψεκάσμο τους με 2mg/kg teflubenzuron και 10⁸ κύτταρα/mL των ζυμών *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula rubra*. Ως μάρτυρας αναφέρονται οι καρποί που έχουν ψεκαστού μόνο με teflubenzuron και ως επέμβαση οι καρποί που έχουν ψεκαστεί με teflubenzuron και με κύτταρα ζύμης.

Ημέρες	Συγκέντρωση teflubenzuron C (mg/kg)					
	<i>Rhodotorula glutinis</i>			<i>Rhodotorula rubra</i>		
	Μάρτυρας	Επέμβαση	Μείωση (%) του μάρτυρα	Μάρτυρας	Επέμβαση	Μείωση (%) του μάρτυρα
1	1,93	1,84	4,7	1,93	1,67	13,5
3	1,32	0,74	56,1	1,32	0,53	60

Όμοια εικόνα με το lufenuron μας δίνει και ο πίνακας 48, σύμφωνα με τον οποίο, στην *Rhodotorula glutinis* στη δειγματοληψία των 3 ημερών (PHI) σημειώθηκε ελάττωση της συγκέντρωσης του teflubenzuron στην επέμβαση κατά 56,1% του μάρτυρα, ενώ στη *Rhodotorula rubra* κατά 60% του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αντίστοιχα αποτελέσματα των in vitro πειραμάτων βιοαποδόμησης.

Επιπλέον, τα υπολείμματα στους καρπούς που είχαν ψεκάσει μόνο με lufenuron ή teflubenzuron μειώθηκαν ανάμεσα στις δύο δειγματοληψίες, δεν έφτασαν, όμως, σε επίπεδα χαμηλότερα από τα μέγιστα όρια υπολείμματος (Maximum Residue Limits- MRLs) που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για το lufenuron στις τομάτες στα 0,5mg/kg και για το teflubenzuron στο 1mg/kg, σύμφωνα με τον Κανονισμό 396/2005 της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στη δεύτερη δειγματοληψία μετρήθηκε το 63% της αρχικής συγκέντρωσης του lufenuron και το 66% της αρχικής συγκέντρωσης του teflubenzuron.

Αντίθετα, στους καρπούς τομάτας που είχαν ψεκάσει τόσο με κύτταρα ζύμης όσο και με lufenuron ή teflubenzuron τα υπολείμματα τους στα αντίστοιχα PHIs ήταν χαμηλότερα από τα MRLs, με την *Rhodotorula rubra* να πλεονεκτεί και στις δύο περιπτώσεις.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ικανότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* να αποδομούν τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα diazinon και chlorpyrifos καθώς και τα εντομοκτόνα της κατηγορίας των βενζοϋλουριών lufenuron και teflubenzuron.

✓ **Ευαισθησία των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* στα εντομοκτόνα**

Στα πρώτα στάδια της εργασίας μελετήθηκε η αύξηση των ζυμών στο τεχνητό θρεπτικό υλικό και η ευαισθησία τους στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Με βάση τα παραγόμενα αποτελέσματα επιλέχθηκαν οι ενδεδειγμένες συγκεντρώσεις για κάθε ένα από τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και οι συνθήκες στις οποίες και διεξήχθησαν τα πειράματα βιοαποδόμησης.

✓ **Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού μητρικών μορίων και μεταβολιτών**

Αφού προηγήθηκε η ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης των δρώντων συστατικών από το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των ζυμών, η διαπίστωση ύπαρξης ή όχι μικροβιακής αποδόμησης πραγματοποιήθηκε αρχικά με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) και στη συνέχεια με υγρή χρωματογραφία συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (LC/MS/MS). Όσον αφορά την TLC, η εφαρμογή του κατάλληλου συστήματος διαλυτών για κάθε δρων συστατικό παρείχε επιτυχή αποτελέσματα ανίχνευσής του καθώς επίσης και ενδείξεις για παραγωγή μεταβολιτών. Έπειτα από μια προκαταρκτική ταυτοποίηση των μεταβολιτών αυτών στην TLC, αναπτύχθηκαν αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των μητρικών μορίων και των μεταβολιτών τους στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS με βάση την τεχνική συζευγμένης φασματομετρίας μαζών, με τη χρήση μεταπτώσεων (προδρόμου – παραγόμενου ιόντος) (Multiple Reaction Monitoring-MRMs).

Όσον αφορά την ανίχνευση και τον προσδιορισμό του **chlorpyrifos** και του μεταβολίτη του 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP), εφαρμόστηκε ESI(+) (θετικός ιονισμός) για το μητρικό μόριο και ESI(-) (αρνητικός ιονισμός) για το μεταβολίτη. Στο ίδιο χρωματογράφημα, δηλαδή, επιτεύχθηκε ταυτόχρονος προσδιορισμός των δύο αναλυτών με εναλλαγή της μορφής ιονισμού. Η τεχνική αυτή μπορεί να θεωρηθεί καινοτόμος, δεδομένου ότι έως τώρα οι προτεινόμενες μέθοδοι ταυτόχρονου προσδιορισμού των δύο ουσιών ήταν μέσω υγρής

χρωματογραφίας με ανιχνευτή UV (Abu-Qare and Abou-Donia, 2001) ή αεριοχρωματογραφίας φασματομετρίας μαζών (GC/MS) με εφαρμογή παραγωγοποίησης (Kogh and Angere, 2001). Ο Sancho και οι συνεργάτες του (2000) αναφέρουν τον προσδιορισμό του chlorpyrifos και του TCP με υγρή χρωματογραφία συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (LC/MS/MS) με τεχνική παρόμοια με την προτεινόμενη στην παρούσα διατριβή (εναλλαγή, δηλαδή, της μορφής ιονισμού) με το μειονέκτημα, όμως, της χρήσης δύο στηλών διαχωρισμού των ουσιών και δύο συστημάτων κινητής φάσης.

Επιτυχής ήταν επίσης και η ανίχνευση και ο προσδιορισμός του **diazinon** και του μεταβολίτη του 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP) με LC/MS/MS με εφαρμογή θετικής μορφής ιονισμού ESI(+) και για τις δύο ουσίες. Έως τώρα οι αναλυτικές μέθοδοι ταυτόχρονου προσδιορισμού των δύο αυτών ουσιών σε διάφορα υποστρώματα (νερό, έδαφος, φυτά, προϊόντα ζωικής προέλευσης - ούρα, πλάσμα αίματος) βασίζονται στην ανίχνευση τους με υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή UV (HPLC/UV) (Abu- Qare et al., 2001 & Abu- Qare and Abou- Donia, 2001). Η πιο πρόσφατη αναφορά (2003) δίνεται από τον Bavcon και τους συνεργάτες του, οι οποίοι παρουσιάζουν τον προσδιορισμό των δύο ουσιών σε περιβαλλοντικά δείγματα με αεριοχρωματογράφο με ανιχνευτή FID (GC/FID). Είναι η πρώτη φορά που αναπτύσσεται και επικυρώνεται μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού των diazinon και IMP με υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τριπλό τετράπολο MS-MS.

Η μέθοδος προσδιορισμού των **lufenuron** και **teflubenzuron** αρχικά αναπτύχθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών με αρνητικό χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης HPLC/APCI-MS, το οποίο εκτός του ανιχνευτή μάζας περιείχε και ανιχνευτή ορατού υπεριώδους διάταξης διόδων. Επιτεύχθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός των δύο ουσιών και η μέθοδος προσδιορισμού τους επικυρώθηκε σε καρπούς τομάτας. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά ο προσδιορισμός τόσο των μητρικών μορίων όσο και των μεταβολιτών τους στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS. Συγκεκριμένα αναπτύχθηκαν δύο μέθοδοι, η πρώτη για τον προσδιορισμό των lufenuron, teflubenzuron και 2,6-difluorobenzoic acid με αρνητικό ιονισμό ESI(-) και η δεύτερη για τον προσδιορισμό του 2,6-difluorobenzamide με θετικό ιονισμό ESI(+). Όσον αφορά τα μητρικά μόρια, η πλειοψηφία των αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού τους βασίζονται στη χρήση υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή UV (Bicchi et al., 1996; Gamon et al., 1998; Miliadis et al., 1999; Tsiropoulos et al., 1999 και Britto et al., 2002) ή με φασματομετρία μαζών με αρνητικό χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης HPLC/APCI-MS (Barnes et al., 1995 και Barnes et al., 1995). Από τους Sannino και Bandini (2005) έχει αναφερθεί προσδιορισμός των βενζουλουριών με LC/ESI-MS/MS. Μελέτες προσδιορισμού των μεταβολιτών με

LC/MS/MS δε βρέθηκαν. Ο Finkelstein και οι συνεργάτες του (2001) ανίχνευσαν το teflubenzuron και τους μεταβολίτες του με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), φασματογράφο μάζας, υγρή χρωματογραφία (HPLC) και ^{19}F NMR (Nuclear Magnetic Resonance).

Αξιολογήθηκε επίσης η αξιοπιστία της μεθόδου εκχύλισης των παραπάνω αναλυτών από το θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των δύο ζυμών. Πραγματοποιήθηκε επικύρωση της μεθόδου σε τρία επίπεδα φόρτισης, με πέντε τουλάχιστον επαναλήψεις ανά επίπεδο και τα αποτελέσματα έδωσαν αποδεκτές τιμές ανακτήσεων και σχετικών τυπικών αποκλίσεων σύμφωνα με τις απαιτήσεις της SANCO 2007/3131.

Η συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS), συνεπώς, αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο ανίχνευσης, διαχωρισμού και ταυτοποίησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και των μεταβολιτών τους και εγγυάται την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων των πειραμάτων βιοαποδόμησης.

✓ Πειράματα βιοαποδόμησης

Η ικανότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* να δρουν ως αποδομητές των φυτοπροστατευτικών προϊόντων της μελέτης διερευνήθηκε σε συνάρτηση διαφόρων παραγόντων όπως η πληθυσμιακή πυκνότητα των μικροοργανισμών, η συγκέντρωση του δρόντος συστατικού, η θερμοκρασία επώασης των υγρών καλλιεργειών καθώς και η ύπαρξη ή μη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό.

Όσον αφορά την επίδραση της πληθυσμιακής πυκνότητας, σε όλες τις περιπτώσεις εκείνη των 10^6 κύτταρα/mL ήταν η πιο ενεργή. Στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα σε μόλυσμα ζύμης χαμηλότερο ή ίσο των 10^4 κύτταρα/mL δεν παρατηρήθηκε μικροβιακή αποδόμηση για χρόνο επώασης 5 ημερών, γεγονός το οποίο έχει διαπιστωθεί και κατά τη μελέτη της αποδόμησης του chlorpyrifos από άλλους μικροοργανισμούς (Li et al., 2007; Yang et al., 2006; Singh et al., 2004). Στην περίπτωση των βενζοϋλουριών, όμως, και η πληθυσμιακή πυκνότητα των 10^4 κύτταρα/mL αποδείχτηκε ικανή για βιοαποδόμηση.

Η παρουσία ή απουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των καλλιεργειών επηρέασε με διαφορετικό βαθμό τη δράση κάθε ζύμης. Η *Rhodotorula glutinis* στο θρεπτικό υλικό με γλυκόζη δε σημείωσε μείωση των επιπέδων του εντομοκτόνου σε σχέση με το μάρτυρα κατά τις πρώτες ημέρες του πειράματος, ενώ στη συνέχεια διαπιστώθηκε ταχύτερη μείωσή τους σε όλα τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και έως και εξάντλησή τους στην περίπτωση των chlorpyrifos και diazinon. Αντίθετα, στο θρεπτικό υλικό χωρίς γλυκόζη παρατηρήθηκε μείωση της αρχικής συγκέντρωσή τους από την αρχή του πειράματος. Παρόμοια

συμπεριφορά διαπιστώθηκε και από τους Muncnerova και Augustin (1995) κατά τη μελέτη της διάσπασης του benzoate από την *Rhodotorula glutinis*, όπου η ζύμη κατανάλωσε το benzoate αφού εξαντλήθηκε η γλυκόζη. Η διαφοροποίηση αυτή της βιοαποδόμησης στα δύο διαφορετικά είδη θρεπτικών υλικών έχει παρατηρηθεί και από τον Singh και τους συνεργάτες του (2004) κατά τη μελέτη της δράσης του βακτηρίου *Enterobacter* strain B-14 στην αποδόμηση του chlorpyrifos, όπου διαπιστώθηκε καθυστέρηση στην αποδόμηση του δρώντος συστατικού παρουσίας γλυκόζης ή άλλης πηγής άνθρακα (ηλεκτρικό οξύ). Σύμφωνα με τους Ruiz-Amil et al. (1965), Torrontegui et al. (1966), Fernandez et al. (1967) και Medrano et al. (1969), η παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης της *Rhodotorula glutinis* εμποδίζει την αφομοίωση ή το μεταβολισμό κάποιας άλλης ουσίας από τα κύτταρα της ζύμης έως ότου εξαντληθούν τα αποθέματα γλυκόζης. Στην ουσία η γλυκόζη παρεμβαίνει στις διαδικασίες της γλυκόλυσης και της γλυκονογένεσης, επηρεάζοντας τη δράση των απαραίτητων ενζύμων, που είναι η pyruvate kinase και η phosphoenolpyruvate carboxykinase, αντίστοιχα.

Αντίθετα, η προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό της ζύμης *Rhodotorula rubra* ως επιπλέον πηγή άνθρακα δεν επηρέασε την ικανότητα της να αποδομεί τα chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron. Και στις δύο κατηγορίες θρεπτικού υλικού η βιοαποδόμηση ξεκίνησε από την αρχή του πειράματος. Ειδικότερα, στην περίπτωση του θρεπτικού υλικού με γλυκόζη η αποδόμηση ήταν ταχύτερη και παρουσίασε μεγαλύτερο ρυθμό βιοαποδόμησης σε όλες τις περιπτώσεις. Το γεγονός αυτό έχει παρατηρηθεί από τον Xu και τους συνεργάτες του (2008) στην αποδόμηση του chlorpyrifos από το βακτήριο *Paracoccus* sp. strain TRP, καθώς και από τον Cycon και τους συνεργάτες του (2009) κατά την αποδόμηση του diazinon από τα *Pseudomonas* sp., *Serratia liquefaciens* και *Serratia marcescens*. Επιπλέον, το βακτήριο *Streptomyces* sp., το οποίο απομονώθηκε από έδαφος ορυζώνων, παρουσίασε ικανότητα στην αποδόμηση του diazinon μόνο υπό την παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας (Sethunathan και MacRae, 1969). Διαπιστώνουμε, συνεπώς, πως η ζύμη *Rhodotorula rubra* χρειάζεται περισσότερη ενέργεια για τη διάσπαση των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Οφείλουμε να αναφέρουμε, όμως, πως τα αποτελέσματά μας βασίζονται στη συγκέντρωση γλυκόζης στο θρεπτικό διάλυμα στα 5g/L, δεδομένου ότι οι Muncnerova και Augustin (1995) μελετώντας τη διάσπαση του benzoate από την *Rhodotorula rubra* ανέφεραν πως σε συγκέντρωση γλυκόζης 10g/L και η *Rhodotorula rubra* ξεκίνησε την αποδόμηση αφότου εξαντλήθηκαν τα αποθέματα της γλυκόζης.

Η αύξηση της συγκέντρωσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο υλικό χωρίς γλυκόζη

είχε ως συνέπεια την αύξηση του ρυθμού αποδόμησής τους και από τις δύο ζύμες. Παρόμοια παρατήρηση δίνεται και από τους Yang (2005) και τον Fang (2008) κατά την αποδόμηση του δρώντος συστατικού από το βακτήριο *Alcaligenes faecalis* DSP3 και το μύκητα *Verticillium sp.* DSP, αντίστοιχα. Αυξημένη συγκέντρωση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων οδήγησε και σε αυξημένη ποσοτικά παραγωγή μεταβολιτών.

Όσον αφορά την παραγωγή μεταβολιτών από τη διάσπαση των μητρικών μορίων μέσω της δράσης των ζυμών του γένους *Rhodotorula*, για κάθε εντομοκτόνο παρατηρήθηκαν τα εξής:

Κατά την αποδόμηση του chlorpyrifos και από τις δύο ζύμες το προϊόν διάσπασής το οποίο ταυτοποιήθηκε ήταν ο μεταβολίτης TCP. Ο μεταβολίτης αυτός ανιχνεύτηκε σε όλες τις περιπτώσεις που παρατηρήθηκε βιοαποδόμηση και αρχικά είχε αυξητική τάση. Στη συνέχεια τα επίπεδά του μειώθηκαν γεγονός που έδινε ενδείξεις για την ικανότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* να το αποδομούν. Η ένδειξη αυτή επιβεβαιώθηκε από τη διεξαγωγή πειράματος βιοαποδόμησης με προσθήκη μόνο του TCP. Να σημειωθεί πως δεν διαπιστώθηκε, όμως, εξάντληση των αποθεμάτων του μεταβολίτη. Ικανότητα αποδόμησης του TCP εμφανίζουν επίσης το *Sphingomonas sp.* strain DSP-2 (Li, et al., 2006), το *Alcaligenes faecalis* strain DSP-3 (Yang et al., 2005), το *Paracoccus sp.* strain TRP (Xu et al., 2008), το *Verticillium sp.* DSP (Fang et al., 2008) και το *Bacillus pumilus* strain C2A1 (Anwar et al., 2009), το οποίο παρουσιάζεται ως το πλέον δραστήριο, αφού διέσπασε 90% της αρχικής ποσότητας (300mg/L) σε 8 ημέρες επώασης. Άλλοι μεταβολίτες που έχουν παρατηρηθεί από τη βιοαποδόμηση του chlorpyrifos είναι το chlorpyrifos-oxon, το 3,5,6-trichloro-2-methoxy-pyridine και το 2-chloro-6-hydroxypyridine (Singh και Walker, 2006 και Yu et al., 2006).

Κατά την αποδόμηση του diazinon από τις δύο ζύμες σε πληθυσμιακή πυκνότητα 10^6 κύτταρα/mL, παρατηρήθηκε η παραγωγή του μεταβολίτη 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP). Τα επίπεδα του IMP παρουσίασαν αυξητική τάση έως εξάντλησης του diazinon και στη συνέχεια παρέμειναν σε σταθερά επίπεδα. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι έπειτα από την πλήρη αποδόμηση του diazinon ουσιαστικά η μόνη πηγή άνθρακα η οποία παρέχεται στις ζύμες είναι ο μεταβολίτης IMP και δεδομένου ότι τα επίπεδα του δε μειώθηκαν έως το πέρας του πειράματος, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε πως οι ζύμες *Rhodotorula* δεν έχουν τη δυνατότητα να το αποδομούν. Η μόνη ερευνητική εργασία στην οποία γίνεται αναφορά σε προϊόντα διάσπασης του diazinon είναι εκείνη του Sethunathan (1989) όπου παρατηρήθηκε αποδόμηση του δρώντος συστατικού από το *Flavobacterium sp.* ATCC27551 σε ορυζώνες και παραγωγή αρχικά του μεταβολίτη 2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxypyrimidine (IMHP) και στη συνέχεια διοξειδίου του άνθρακα.

Όσον αφορά τις βενζοϋλίουρίες lufenuron και teflubenzuron ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες 2,6-difluorobenzamide και 2,6-difluorobenzoic acid. Στην περίπτωση του lufenuron αρχικά ανιχνεύτηκε το 2,6-difluorobenzamide και στη συνέχεια το 2,6-difluorobenzoic acid, το οποίο παράγεται από την υδρόλυση του πρώτου. Στην αποδόμηση του teflubenzuron, όμως, οι δύο μεταβολίτες ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα και στο τέλος των πειραμάτων η συγκέντρωση του 2,6-difluorobenzoic acid ήταν μεγαλύτερη. Έπειτα από την αποδόμηση του lufenuron από μικροοργανισμούς από τα γένη *Archaea* και *Pseudomonas*, διαπιστώθηκε η παραγωγή των μεταβολιτών 1-(2,5-dichloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxy) phenyl) urea και 2,5-dichloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxy) phenylamine (Pesaro et al., 2004). Η αποδόμηση του teflubenzuron από τα *Acinetobacter calcoaceticus* 21, *Bacillus brevis* 625, *Alcaligenes sp.* 1431 και *Pseudomonas sp.* 10W οδήγησε στην παραγωγή των μεταβολιτών 2,6-difluorobenzamide, 2,6-difluorobenzoic acid και 2,4-difluoro-3,5-dichloroaniline (Finkelstein et al., 2001).

Η θερμοκρασία επώασης στην οποία παρατηρήθηκε η βέλτιστη ικανότητα των ζυμών να αποδομούν τα εντομοκτόνα της μελέτης ήταν οι 25°C. Στους 35°C δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καθόλου αποδόμηση, ενώ στους 15°C η βιοαποδόμηση ήταν χαμηλότερη εκείνης στους 25°C. Τα αποτελέσματα θεωρούνται αποδεκτά, δεδομένου ότι οι ζύμες του γένους *Rhodotorula* ανήκουν στους ψυχρόφιλους μικροοργανισμούς.

Συνοψίζοντας, αναφέρουμε πως όσον αφορά το **chlorpyrifos**, οι ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* παρουσιάζουν μέσο έως βραδύ ρυθμό αποδόμησης σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς- αποδομητές του. Συγκεκριμένα, η *Rhodotorula glutinis* εξάντλησε 25μg/mL δρόντος συστατικού σε 9 ημέρες στο υλικό με γλυκόζη και σε 6 ημέρες στο υλικό χωρίς γλυκόζη. Η *Rhodotorula rubra* αποδόμησε πλήρως την ίδια συγκέντρωση chlorpyrifos σε 5 ημέρες στο υλικό με γλυκόζη και σε 6 ημέρες στο υλικό χωρίς γλυκόζη. Όσον αφορά τη δράση άλλων μικροοργανισμών, οι γρηγορότεροι ρυθμοί αποδόμησης έχουν αναφερθεί από το βακτήριο *Sphingomonas sp.* strain DSP-2 (Li, et al., 2007), το οποίο διέσπασε 100μg/mL chlorpyrifos σε 12 ώρες και το βακτήριο *Stenotrophomonas sp.* strain YC-1, το οποίο διέσπασε 100μg/mL chlorpyrifos σε 24 ώρες. Άλλο βακτήριο- αποδομητής είναι το *Alcaligenes faecalis* strain DSP-3 το οποίο απομονώθηκε από τον Yang και τους συνεργάτες του (2005) και αποδόμησε πλήρως 100μg/mL του δρόντος συστατικού σε 10 ημέρες, ενώ τα *Flavobacterium sp.* και *Arthrobacter sp.* αποδόμησαν 10μg/mL chlorpyrifos σε 24 και 48 ώρες αντίστοιχα (Singh et al., 2003). Ο Xu και οι συνεργάτες του (2008) παρατήρησαν την πλήρη αποδόμηση 50μg/mL chlorpyrifos από το βακτήριο *Paracoccus sp.* strain TRP σε 4 ημέρες. Η πλέον πρόσφατη βιβλιογραφική αναφορά (2009) έρχεται από τον Anwar και τους

συνεργάτες του οι οποίοι παρατήρησαν αποδόμηση του εντομοκτόνου από το βακτήριο *Bacillus pumilus* strain C2A1. Ο μύκητας *Verticillium sp.* DSP παρουσίασε την ικανότητα αποδόμησης 1 έως 100μg/mL chlorpyrifos σε χρόνους 1 έως 7 ημερών αντίστοιχα (Fang et al., 2008). Τέλος οι Lakshmi, Kumar και Khanna (2008) ανέφεραν τη μείωση των επιπέδων του chlorpyrifos κατά 75- 87% έπειτα από 20 ημέρες επώασης με τα βακτήρια *Pseudomonas fluorescense*, *Brucella melitensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella sp.*, *Serratia marcescens* και *Pseudomonas aeruginosa*.

Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών που έχουν αναφερθεί ως αποδομητές του chlorpyrifos είναι βακτήρια και λιγότεροι μύκητες. Δεν έχει αναφερθεί βιοαποδόμησή του από τις ζύμες του γένους *Rhodotorula*. Η μοναδική περίπτωση μικροβιακής αποδόμησης του φυτοπροστατευτικού προϊόντος από ζύμες είναι εκείνη που αναφέρεται από τους Lal και Lal (1987), κατά την οποία παρουσιάζεται η μείωση των επιπέδων των εντομοκτόνων DDT, fenitrothion και chlorpyrifos από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, χωρίς να δίνονται, όμως, ποσοτικά αποτελέσματα του φαινομένου για το chlorpyrifos, ούτε να γίνεται αναφορά στην παραγωγή κάποιου μεταβολίτη, πιθανώς λόγω έλλειψης κατάλληλου χρωματογραφικού συστήματος (στην εν λόγω μελέτη έχει χρησιμοποιηθεί αεριοχρωματογράφος με φλογοφωτομετρικό ανιχνευτή- FPD, ενώ όπως διαπιστώθηκε στην παρούσα ο μεταβολίτης TCP προσδιορίζεται αποτελεσματικότερα με υγρή χρωματογραφία).

Όσον αφορά την αποδόμηση του **diazinon** από τις δύο ζύμες, θα πρέπει να αναφερθούμε στην μείωση της συγκέντρωσης του δρώντος συστατικού στο υλικό στο οποίο δεν είχε προστεθεί μικροοργανισμός, λόγω αβιοτικής υδρόλυσης. Η υδρολυτική αυτή αποδόμηση ήταν σημαντική μεν, όχι, όμως, τόσο ώστε να υπερβεί το ρυθμό βιοαποδόμησης του diazinon από τη δράση των δύο ζυμών. Σε παρόμοια παρατήρηση κατέληξε και ο Munnecke (1976) ο οποίος παρατήρησε πως η ενζυματική υδρόλυση του diazinon όταν αυτό προστεθεί σε μικτή καλλιέργεια των βακτηρίων *Pseudomonas fluorescent* (5 είδη), *Brevibacterium sp.*, *Azotomonas sp.*, και *Xanthomonas sp.*, παρουσιάζει ρυθμό ταχύτερο κατά 2,45 φορές από τη χημική. Στη μελέτη αυτή δε γίνεται αναφορά στις αρχικές συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου, στο χρόνο της πειραματικής διαδικασίας, αλλά ούτε και στην παραγωγή ή μη μεταβολιτών. Έντονη χημική υδρόλυση του diazinon έχει διαπιστωθεί επίσης και από τον Cycon και τους συνεργάτες του (2009) κατά την αποδόμηση του από τα βακτήρια *Pseudomonas sp.*, *Serratia liquefaciens* και *Serratia marcescens*.

Οι δύο ζύμες της παρούσας μελέτης αποδείχθηκαν ικανοί αποδομητές του diazinon. Συγκεκριμένα η *Rhodotorula glutinis* αποδόμησε πλήρως 25μg/mL diazinon σε 12 ημέρες στο υλικό χωρίς γλυκόζη. Η *Rhodotorula rubra* διέσπασε πλήρως τα 25μg/mL diazinon σε

12 ημέρες στο υλικό με γλυκόζη και σε 14 ημέρες στο υλικό χωρίς γλυκόζη. Όσον αφορά άλλους μικροοργανισμούς ως πιο δραστήριο εμφανίζεται το *Alcaligenes faecalis* DSP3 το οποίο αποδόμησε 100μg/mL diazinon κατά 90% σε 10 ημέρες (Yang et al., 2005). Επίσης, το βακτήριο *Enterobacter* strain B-14 αποδόμησε 25μg/mL diazinon σε 2 ημέρες (Singh et al., 2004). Ο ίδιος ερευνητής (2005) αναφέρει αποδόμηση 25μg/mL diazinon σε 10 ημέρες από μικροοργανισμούς εδάφους, χωρίς να συγκεκριμενοποιεί τα είδη τους. Οι Barik και Munnecke (1982) επίσης, παρατήρησαν την αποδόμηση υψηλής συγκέντρωσης diazinon σε 24 ώρες. Τα βακτήρια *Arthrobacter* και *Flavobacterium* σημείωσαν διάσπαση του diazinon σε ορυζώνες, 14ppm diazinon σε 5 ημέρες στο νερό στα τηγάνια, 15ppm σε 10 ημέρες στη ριζόσφαιρα και 15ppm σε 10 ημέρες στο έδαφος εκτός της ριζόσφαιρας (Sethunathan και Pathak, 1972). Στην πλέον πρόσφατη βιβλιογραφική αναφορά έχει παρατηρηθεί η αποδόμηση 50mg/mL diazinon κατά 80- 92% σε 14 ημέρες από τα βακτήρια *Pseudomonas sp.* (το οποίο έχει μελετηθεί επανηλημένα), *Serratia liquefaciens* και *Serratia marcescens* (Cycon et al., 2009). Στις υπόλοιπες μελέτες οι οποίες έχουν αναφερθεί στο εισαγωγικό τμήμα της παρούσας μελέτης δε δίνονται πληροφορίες σχετικά με τη χορηγηθείσα συγκέντρωση του δρόντος συστατικού και το χρόνο εξέλιξης της βιοαποδόμησής του. Θα πρέπει να σημειωθεί πως το σύνολο των μικροοργανισμών οι οποίοι έχουν παρατηρηθεί να αποδομούν το diazinon είναι βακτήρια που διαβιούν στο έδαφος. Δεν έχει αναφερθεί βιοαποδόμηση του φυτοπροστατευτικού προϊόντος από επιφυτικούς μικροοργανισμούς και ειδικά από τις ζύμες *Rhodotorula*.

Η μόνη ερευνητική εργασία που αναφέρεται στην αποδόμηση του **lufenuron** από μικροοργανισμούς είναι εκείνη του Pesaro και των συνεργατών του (2004), κατά την οποία διαπιστώθηκε η αποδόμηση του από μικροοργανισμούς από τα γένη *Archaea* και *Pseudomonas*, ενώ έως τώρα δεν έχει καταγραφεί η αποδόμηση του από τις δύο ζύμες της παρούσας μελέτης.

Τέλος, όσον αφορά το **teflubenzuron**, έχει καταγραφεί αποδόμηση του μόνο από μικροοργανισμούς εδάφους. Ο Finkelstein και οι συνεργάτες του (2001) μελέτησαν τη αποδόμηση του teflubenzuron από το *Acinetobacter calcoaceticus* 21, *Bacillus brevis* 625, *Alcaligenes sp.* 1431 και *Pseudomonas sp.* 10W. Με αρχικές συγκεντρώσεις του teflubenzuron στα 19-50μg/mL, παρατηρήθηκε αποδόμησή του κατά μέσο όρο 30% της αρχικής χορηγηθείσας συγκέντρωσης. Τα αντίστοιχα ποσοστά αποδόμησης του μητρικού μορίου από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* είναι σαφώς υψηλότερα, ενώ δεν έχει καταγραφεί μέχρι τώρα η αποδόμηση του teflubenzuron από τις δύο ζύμες.

✓ **Βιοχημικά πειράματα μελέτης των ενζυμικών συστημάτων αποτοξικοποίησης**

Από τα πρώτα βιοχημικά πειράματα προέκυψε πως το **chlorpyrifos** παρεμποδίζει την ενεργότητα του ενζυμικού συστήματος των **εστερασών** των *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* ενώ στη συνέχεια η προσθήκη του συνεργιστικού παράγοντα triphenyl phosphate στα πειράματα βιοαποδόμησης οδήγησε σε παρεμπόδιση της αποδόμησης του εντομοκτόνου από τις δύο ζύμες και κατά συνέπεια επιβεβαιώθηκε η βιοαποδόμηση του chlorpyrifos μέσω του ενζυμικού συστήματος των εστερασών. Σε μελέτες άλλων ερευνητών (Sedar et al., 1982; Mulbry et al., 1986, Havens και Rase, 1991, Horne et al., 2002) γίνεται κυρίως λόγος για το ένζυμο της parathion υδρολάσης ως υπεύθυνο για τη βιοαποδόμηση του chlorpyrifos από μικροοργανισμούς, κυρίως από βακτήρια εδάφους. Η πρώτη αναφορά σχετικά με την ικανότητα του ενζύμου αυτού να υδρολύει τον εστέρα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων έγινε από το Munnecke και τους συνεργάτες του (1975). Όπως έχει διαπιστωθεί η ιδιότητα αυτή του ενζύμου αποδίδεται στο γονίδιο opd. Μεταγενέστερα (2004) ο Singh και οι συνεργάτες του απέδειξαν πως η δράση του *Enterobacter strain* B14 στην αποδόμηση του chlorpyrifos γίνεται με το ενζυμικό μονοπάτι της φωσφοτριεστεράσης και πως το γονίδιο που κωδικοποιεί την έκφραση του ενζύμου αυτού, mpd, παρουσιάζει διαφορετική αλληλουχία από εκείνη του γονιδίου opd, κάτι που επιβεβαίωσαν και ο Yang με τους συνεργάτες του (2005) στο *Alcaligenes faecalis* DSP3. Τέλος, αξίζει να αναφέρουμε και τη μελέτη των Mutch και Williams (2006), σύμφωνα με την οποία το chlorpyrifos μεταβολίζεται στο ανθρώπινο ήπαρ σε TCP μέσω της δράσης ισοενζύμων των μονοξυγονασών που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀.

Όσον αφορά το **diazinon**, θεωρήθηκε παρεμποδιστής του ενζυμικού συστήματος των **μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs)**, μιας και η προσθήκη του στην ενζυμική δοκιμή των GSTs μείωσε θεαματικά την ταχύτητα της αντίδρασης. Η παρεμπόδιση της βιοαποδόμησης του diazinon από τις δύο ζύμες έπειτα από την προσθήκη του συνεργιστή diethyl maleate στα πειράματα βιοαποδόμησης σε συνδιασμό με τη μη παρεμπόδιση της από το συνεργιστή piperonyl butoxide «ενοχοποιεί» το εν λόγω ενζυμικό σύστημα ως εμπλεκόμενο στη βιοαποδόμηση του εντομοκτόνου. Η διαπίστωση αυτή συμφωνεί με τα λεγόμενα του Κλώνη (2007), ενώ έρχεται σε αντίθεση με τις έως τώρα μελέτες οι οποίες απέδιδαν τη διάσπαση του diazinon στη δράση υδρολασών. Ο Munnecke (1976) απέδωσε την αποδόμηση του diazinon και άλλων οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων από μια μικτή καλλιέργεια των βακτηρίων *Pseudomonas fluorescent* (5 είδη), *Brevibacterium sp.*, *Azotomonas sp.*, και *Xanthomonas sp.*, τα οποία προηγουμένως είχαν επωαστεί με parathion,

στην parathion υδρολάση. Το ίδιο ένζυμο θεωρούν υπεύθυνο για την υδρόλυση του diazinon και οι Barik και Munnecke (1982), οι οποίοι διατύπωσαν επίσης πως ο ρυθμός αποδόμησης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου και όχι τόσο από τις χημικές και φυσικές παραμέτρους του συστήματος φυτοπροστατευτικό προϊόν – έδαφος. Ο Sethunathan (1989) απέδειξε πως στη δράση του *Pseudomonas sp.* 29353 στην αποδόμηση του diazinon εμπλέκεται το ενζυμικό μονοπάτι της φωσφοτριεστεράσης. Τέλος, ο Yasouri (2006) ανέφερε πως τα γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση του diazinon βρίσκονται πάνω σε πλασμίδια, ενώ οι Mutch και Williams (2006) μελετώντας το μεταβολισμό οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων στο ήπαρ του ανθρώπου, παρατήρησαν πως η μετατροπή του diazinon σε diazoxon και IMP βασίζεται στη δράση ισοενζύμων των μονοξυγονασών που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀.

Η μελέτη της κινητικής της παρεμπόδισης των ενζύμων GSTs για το diazinon και το συνεργιστικό παράγοντα diethyl maleate δημιούργησε υποψίες πως και στις δύο ζύμες όταν στην ενζυμική δοκιμή προστίθεται diazinon προκύπτει συναγωνιστική παρεμπόδιση, ενώ στην περίπτωση που προστίθεται το diethyl maleate προκύπτει μη συναγωνιστική παρεμπόδιση.

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι έως τώρα δεν έχει αναφερθεί η χρήση συνεργιστικών παραγόντων σε μελέτες αποδόμησης οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων

Οι βενζοϋλουρίες **lufenuron** και **teflubenzuron** δεν παρεμπόδισαν την ενεργότητα κανενός από τα δύο παραπάνω ενζυμικά συστήματα. Από τη χρησιμοποίηση των συνεργιστών παρατηρήθηκε πως το piperonyl butoxide παρεμπόδισε τη βιοαποδόμηση και των δύο εντομοκτόνων από τις ζύμες *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra*, γεγονός το οποίο υποδεικνύει το ενζυμικό σύστημα των **μονοξυγονασών που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀** ως εμπλεκόμενο στην αποδόμηση τους. Μελέτες βιοαποδόμησης των βενζοϋλουριών lufenuron και teflubenzuron από μικροοργανισμούς δεν υπάρχουν πολλές στη διεθνή βιβλιογραφία. Επιπλέον, σε καμία από τις ερευνητικές αυτές εργασίες δεν έχει πραγματοποιηθεί χρήση συνεργιστικών παραγόντων και ούτε γίνεται αναφορά στα υπεύθυνα ενζυμικά συστήματα για την αποδόμηση των δρώντων συστατικών. Χρήση συνεργιστικών παραγόντων για τα εν λόγω εντομοκτόνα έχει λάβει χώρα σε μελέτες ανθεκτικότητας εντόμων. Έτσι, κατά τη μελέτη των μηχανισμών αποτοξικοποίησης του teflubenzuron στην προνύμφη του *Spodoptera littoralis* χρησιμοποιήθηκαν οι συνεργιστές DEF (S,S,S-tributylphosphorotrithioate) και piperonyl butoxide και αποδείχτηκε πως η κύρια οδός αποτοξικοποίησης του δρώντος συστατικού ήταν μέσω υδρόλυσης- δράση εστερασών- με την οποία σχετίζεται το DEF, ενώ ο συνεργισμός με το piperonyl butoxide ήταν

περιορισμένος (Saidy et al., 1989). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση του *Spodoptera exigua*, όπου έπειτα από τη χρήση των profenofos, diethyl maleate και piperonyl butoxide αποδείχτηκε πως το teflubenzuron αποτοξικοποιήθηκε κυρίως μέσω υδρόλυσης (συνεργισμός με profenofos) ή σύζευξης (συνεργισμός με diethyl maleate), ενώ η δράση των μονοοξυγενασών, που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀ ήταν πολύ περιορισμένη (Van Laecke and Degheele, 1991). Στην περίπτωση του *Chilo suppressalis*, όμως, το οποίο προσβάλλει τα στελέχη του ρυζιού, η αποτοξικοποίηση του teflubenzuron πραγματοποιήθηκε έπειτα από τη χρήση του piperonyl butoxide (Nakagawa, 1991). Σύμφωνα με τον Daborn και τους συνεργάτες του (2002) η ανθεκτικότητα της *Drosophila melanogaster* στο lufenuron οφείλεται στο γονίδιο Cyp6g1 των μονοοξυγενασών, που έχουν ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀.

✓ Μελέτη της βιοαποδόμησης σε φυτικές επιφάνειες

Η διερεύνηση της ικανότητας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* να αποδομούν τα τέσσερα εντομοκτόνα της μελέτης όταν αυτά έχουν ψεκαστεί σε καρπούς τομάτας είχε επιτυχή αποτελέσματα. Στους χρόνους τελευταίας επέμβασης από τη συγκομιδή όπως αυτός καθορίζεται από την ετικέτα των εμπορικών σκευασμάτων κάθε δρώντος συστατικού στο οποίο βασίστηκε η εφαρμογή, παρατηρήθηκε σαφής εντονότερη μείωση της συγκέντρωσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στους καρπούς της επέμβασης σε σχέση με την αντίστοιχη στο μάρτυρα, γεγονός το οποίο προσδίδει μια περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων βιοαποδόμησης.

Επιπλέον, δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα τους σε επίπεδα υψηλότερα των ανώτατων αποδεκτών ορίων όπως αυτά έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση με τον Κανονισμό (ΕΚ) 396/2005 για κάθε ένα από τα εντομοκτόνα στις τομάτες. Μοναδική εξαίρεση η περίπτωση της *Rhodotorula glutinis* κατά τον ψεκασμό των καρπών με diazinon, όπου τα υπολείμματα ήταν υψηλότερα από το MRL, παρόλα αυτά, όμως, η μείωση των υπολειμμάτων ήταν πολύ σημαντική σε σχέση με το μάρτυρα. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε μεμονωμένους καρπούς τομάτας και όχι σε φυτά υπό συνθήκες αγρού ή θερμοκηπίου. Μελετήθηκε, δηλαδή, η αλληλεπίδραση ζύμης εντομοκτόνου υπό ελεγχόμενες και σταθερές συνθήκες. Θεωρούνται συνεπώς ακραία περίπτωση (worst case scenario), δεδομένου ότι δεν υπεισέρχονται σε αυτά άλλοι παράγοντες (βιολογικοί, περιβαλλοντικοί) οι οποίοι συντελούν στην αποδόμηση ή απομάκρυνση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από την επιφάνεια των καρπών.

Οι αναλυτικές μέθοδοι εκχύλισης και προσδιορισμού των φυτοπροστατευτικών προϊόντων

από τους καρπούς τομάτας επικυρώθηκαν τηρώντας τα κριτήρια του εγγράφου SANCO/2007/3131 και αποδείχτηκαν αξιόπιστες.

Θα μπορούσαμε να προτείνουμε, λοιπόν, τη χρησιμοποίηση των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* για την αποτοξικοποίηση των chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron και τη μείωση των υπολειμμάτων τους από την επιφάνεια καρπών τομάτας. Έπειτα από την εφαρμογή του μολύσματος κάθε ζύμης, η προσρόφηση των κυττάρων στην επιφάνεια των καρπών παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Θα πρέπει, συνεπώς, κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων υπολειμμάτων με στόχο τον ορισμό του χρόνου τελευταίας επέμβασης πριν τη συγκομιδή (PreHarvest Interval- PHI), να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη η πληθυσμιακή πυκνότητα των δύο ζυμών. Απαραίτητο κρίνεται, όμως, να σημειωθεί πως η μικροβιακή ή ενζυμική δραστηριότητα επηρεάζεται από μια πληθώρα παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, η ηλιακή ακτινοβολία, το pH, η βροχόπτωση, η πληθυσμιακή πυκνότητα του μικροοργανισμού, η μορφή του σκευάσματος του φυτοπροστατευτικού προϊόντος καθώς και το είδος – ποικιλία του φυτού. Δεδομένου ότι η τομάτα είναι μια καλλιέργεια που αναπτύσσεται τόσο στο θερμοκήπιο όσο και υπό συνθήκες αγρού, όλοι οι παραπάνω παράγοντες θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί κάποια από τις δύο ζύμες με στόχο τη μείωση των υπολειμμάτων του φυτοπροστατευτικού προϊόντος στους καρπούς.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε για πρώτη φορά η ικανότητα των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* να αποδομούν τα εντομοκτόνα chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron. Η ποιοτική και ποσοτική απεικόνιση της βιοαποδόμησης πραγματοποιήθηκε με την ανάπτυξη και επικύρωση καινοτόμων αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού των μητρικών μορίων και των μεταβολιτών τους στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS. Στη συνέχεια διερευνήθηκε σε βιοχημικό επίπεδο η επίδραση των εντομοκτόνων στα ενζυμικά συστήματα αποτοξικοποίησης και προσδιορίστηκε το εμπλεκόμενο στη βιοαποδόμηση ενζυμικό σύστημα με την προσθήκη συνεργιστικών παραγόντων στα πειράματα βιοαποδόμησης, διαδικασία η οποία δεν έχει εφαρμοστεί ξανά σε παρόμοιες μελέτες. Στο τελικό στάδιο της μελέτης διερευνήθηκε η εξέλιξη της δράσης των δύο ζυμών ως αποδομητές των εντομοκτόνων σε φυτικές επιφάνειες και συγκεκριμένα σε καρπούς τομάτας.

Κλείνοντας θα λέγαμε πως η κατανόηση και η χρήση της μικροβιακής αποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων θα μπορούσε να οδηγήσει σε χαμηλότερα επίπεδα αγροχημικών στο περιβάλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abu- Qare**, A.W. and Abou-Donia, M.B. (2001). *Determination of Diazinon, Chlorpyrifos and their Metabolites in Rat Plasma and Urine by High- Performance Liquid Chromatography*. Journal of Chromatographic Science, Volume 39, Number 5, p. 200- 204.
- Abu- Qare**, A.W. and Abou-Donia, M.B. (2001). *High Performance Liquid Chromatographic Determination of Diazinon, Permethrin, DEET (N, N-diethyl-m-toluamide) and their Metabolites in Rat Plasma and Urine*. Fresenius Journal Analytical Chemistry, 370: 403- 407.
- Adhaya**, T.K., Sudhakar- Barik, Sethunan N. (1981). *Hydrolysis of Selected Organophosphorous Insecticides by two Bacteria Flooded Soil*. J Appl Bacteriol, 50: 167- 172.
- Alliot**, C. B., Desablens, R., Garidi, R. and Tabuteau, S. (2000). *Opportunistic Infection with Rhodotorula in Cancer Patients Treated by Chemotherapy: Two Cases Reports*. ClinOncol- Uk, Volume 12, p.115-117.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Inc.** (1986). *Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices*, Fifth Edition. Cincinnati, OH, 5-48.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists.** (1991). *Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices: Sixth Edition, Volume I*. ACGIH. Cincinnati,OH.
- Armstrong**, R.N. (1997). *Structure, Catalytic Mechanism and Evolution of the Glutathione Transferases*. Chem Res Toxicol, 10 (1), p.2- 18.
- Anaissie**, E. Bodey, G.P., Kantarjian, H. Ro, J., Vartivarian, S.E., Hopfer, R., Hoy, J. and Rolston, K. (1989). *New Spectrum and Fungal Infections in Patients with Cancer*. Rev Infect Dis, Volume 11, p. 369-378.
- Andrews**, J.H., Kenerly, C.M. and Nordheim, E.V. (1980). *Positional Variation of Phylloplane Microbial Population within an Apple Tree Canopy*. Icrobial Ecology, 6, p. 71- 84.
- Andrews**, J.H. (1992). *Biological Control in the Phyllosphere*. Annual Review of Phytopathology, 30, p.603- 635.
- Anfinsen**, C.B. (1973). *Principles that Govern the Folding of Protein Chains*. Science, 181:223-230.
- Ansaruddin**, P.A. and Vijayalakshmi, K. (eds) 2003. *The Womb is not Safe Anymore*.

Indigenous Agriculture News. 2(1), p. 3. Available on the net at <http://www.ciks.org/march-03.pdf>. accessed March 2005

Anwar S., Liaquat, F., Khan, Q.M., Khalid, Z.M. and Iqbal, S. (2009). *Biodegradation of Chlorpyrifos and its Hydrolysis Product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by Bacillus pumilus strain C2A1*. Journal of Hazardous Materials, 168 (1) p. 400-405.

Arras, G. (1996). *Mode of Action of an Isolate of Candida famata in Biological Control of Penicillium digitatum in Orange Fruits*. Postharvest Biology and Technology, 8, p. 191-198.

Babeva, I.P., Chervon, I.Y. (1995). *Geographic Aspect of Yeast Ecology*. Physiol Gen Biol Rev, 9 (3), p.1-54.

Bailey, D.G., Dresser, G.K. (2004). *Interactions Between Grapefruit Juice and Cardiovascular Drugs*. Am J Cardiovasc Drug, 4 (5), p. 281- 297.

Bairoch, A. (2000). *The Enzyme Database in 2000*. Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 1, p. 304-305.

Barik, S., Munnecke, D.M.(1982). *Enzymatic Hydrolysis of Concentrated Diazinon in Soil*. Environ Contam Toxicol, 29: 235-239.

Barnes, K.A., Fussell, R.J., Startin, J.R., Thorpe, S.A. and Reynold, S.L. (1995). Rapid Communication in Mass Spectrometry, 9, p. 1441-1445.

Barnes, K.A., Fussell, R.J., Startin, J.R., Pegg, M.K. and Thorpe, S.A. and Reynold, S.L. (1995). Journal Chromatography A, 712, p. 85-93.

Bartsch, E.(1974). *Diazinon II. Residues in Plants, Soil and Water*. Residue Rev. 51: 37-68, p. 5-59.

Bashi, E. and Fokkema, N.J. (1977). *Environmental Factors Limiting Growth of Sporopholomyces roseus, and Antagonist of Cochiobolus sativus on Wheat Leaves*. Transactions of British Mycological Society, 68, p. 17-25.

Batzer, F.R., Fontaine D.D., white F.H. (1990). *Aqueous Photolysis of Chlorpyrifos*. DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

Bauriedel, W.R. and Miller J.H. (1980). *The Metabolic Fate of ¹⁴C- chlorpyrifos Applied an Apple Tree*. DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

Bauriedel, W.R. and Miller J.H. (1981). *The Metabolic of ¹⁴C- chlorpyrifos Applied Topically to Soybeans*. DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

Bauriedel, W.R. (1986a). *The Early Fate of ¹⁴C- chlorpyrifos Applied to Leaf Surfaces of Corn, Soybean and Sugarbeat*. DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

Bauriedel, W.R. and Miller J.H. (1986a). *The Metabolic Fate of ¹⁴C- chlorpyrifos Applied to Field Corn at Planting (Soil Application) and in Mid-season (Foliar Application)*.

DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

Bavcon, M. Trebse, P. and Zupzncic- Kralj, (2003). *Investigations of the Determination of Transformations of Diazinon and Malathion under Environmental Conditions Using Gas Chromatography Coupled with a Flame Ionization Detector*. Chemosphere, Volume 50, Issue 5, pp. 595- 601.

Bergauer, P., Fonteyne, P.A., Nolard, N., Schinner, F. and Margesin, R. (2005). *Biodegradation of Phenol and Phenol-related Compounds by Psychrophilic and Cold-tolerant Alpine Yeasts*. Chemosphere, 59 (7), p. 909-918.

Bicchi C., Balbo C., Binello A. and D'Amato A. (1996). *HPLC - UV determination of pesticide residues at 0.01 ppm in apple and pear pulp used for baby food*. Journal of High Resolution Chromatography, 19, p. 105-110.

Bidlack, H.D. (1979). *Degradation of Chlorpyrifos in Soil under Aerobic, Aerobic/Anaerobic and Anaerobic Conditions*. DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

Bilthoven. (1996). *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*. Ministry of Public Health, Welfare and Sport. The Netherlands.. Sixth edition, P. Van Zoonen (Ed), p. 4.

Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Eastal, S., Jermlin, L.S., Sculte, G.K., Danley, D.E., Hoth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A.V., Rosner, M.H., Crunyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F. and Pandit, J. (2000). *Identification, Characterization and Crystal Structure of the Omega Cclass Glutathione Transferases*. J Biol Chem, 275 (32) p. 24798- 24806.

Board, P., Chelvanayagam, G., Dulhunty, A., Gage P., Curtis, S. (2001). *The Glutathione Transferase Structural Family Includes a Nuclear Chloride Channel and a Ryanodine Receptor Calcium Release Channel Modulator*. J Biol chem., 276 (5), p. 3319- 3323.

Boyer, T.D. (1989). *The Glutathione S-transferases: an Update*. Hepatology 9: 486- 496.

Bowman, B.T., Sans, W.W. (1983b). *Determination of Octanol-water Partitioning Coefficients (k_{ow}) of 61 Organophosphorus and Carbamate Insecticides and their Relationship to Respective Water Solubility (S) Values*. Journal of Environmental Science and Health B, 18, 667-683.

Bradford, M. M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 72, p. 248- 54.

Brito, N.M., Navickiene, S. Polese, L., Jardin, E.F.G., Albakerli, R.B. and Ribeiro, M. (2002). *Determination of Pesticide Residues in Coconut Water by Liquid-liquid Extraction and Gas Chromatography with Electron- capture plus Thermionic Specific Detection and*

Soil-phase Extraction and High- performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. Journal of Chromatography A, 957 (2), p. 201-209.

Brust, H.F. (1964). *A Summary of Chemical and Physical Properties of O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl)-phosphorothiorate*. DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

Burkhard, N., Guth, J.A. (1979). *Photolysis of Organophosphorous Insecticides on Soil Surfaces*. Pesticide Science 10: 313-319.

Carmo- Souza L do. (1969). *Distribution of Yeasts in Nature*. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds). The yeasts. Volume 1. London Academic Press, p. 79-106.

Carroll, G.C. (1979). *Needle Microepiphytic in a Douglas Fir Canopy: Biomass and Distribution Patterns*. Canadian Journal of Botany, 57, p. 1000-1007.

Cech, T. (2000). Structural biology. *The Ribosome is a Ribozyme*. Science, 289 (5481):878-879.

Castoria, R., De Curtis, F., Lima and De Cicco, V. (1997). *β -1,3-Glucanase Activity of two Saprophytic Yeasts and Possible Mode of Action as Biocontrol Agents against Postharvest Diseases*. Postharvest Biology and Technology, 12, p. 293-300.

Chand- Goyal, T., and Spotts, R.A. (1996a). *Control of Postharvest Pear Diseases Using Natural Saprophytic Yeast Colonists and their Combination with a Low Dosage of Thiabendazole*. Postharvest Biology and Technology, 7, 51-64.

Chand- Goyal, T., and Spotts, R.A. (1996b). *Postharvest Biological Control of Blue Mold of Apples and Brown Rot of Cherries by Saprophytic Yeast Colonists and their Combination with a Low Dosage of Fungicides*. Biological Control, 6, 253- 259.

Chakrabarti, A., Gennrich, S.M. (1987). *Vapor Pressure of Chlorpyrifos*. DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

Chambers, J.E. and Levi, P.E. (eds) (1992). *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects*. Academic Press, Inc. NY, USA, p. 3.

Chambers, H.W. (1992). *Organophosphorous Compounds: An Overview*. In: *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects*. (Chambers, J.E. and Levi, P.E) Academic Press, Inc. NY, USA, p. 3.

Chapelle, F.H. (2000). *Ground-Water Microbiology and Geochemistry*. New York, John Wiley and Sons, p. 468.

Chapman R.A., Cole C.M. (1982). *Observations on the Influence of Water and Soil pH on the Persistence of Insecticides*. Journal of Environmental Science and Health B, 17, 487-504.

Chen, L.H., Kenyon, G.L. Curtin, F. Harayama, S., Bembenek, M.E., Hajipour, G., Whitman, C.P. (1992). *A-oxalochrotonate Tautomerase, an Enzyme Composed of 62 Amino Acids*

- Residues per Monomer*. Journal of Biological Chemistry, 267 (25): 17716- 17221.
- Cheng**, Y. and W.H. Prusoff, W.H. (1973). *Relationship Between Inhibition Constant (K_i) and Concentration of Inhibitor which Causes 50 per cent Inhibition (I_{50}) of an Enzymatic-Reaction*. *Biochem.Pharmacol.* 22, 3099-310
- Chiou**, C.T., Freed, V.H., Schmedding, D.W., Kohnet, R.L. (1977). *Partition Coefficient and Bioaccumulation of Selected Organic Chemicals*. Environmental Science and Technology, 11, 475-478.
- Coats**, J.R., ed. (1982). *Insecticide Mode of Action*. Academic Press, Inc., NY, USA.
- Coffin**, D.E. and McKinely, W.P. (1964) *The metabolism and persistence of Systox, Diazinon and Phosdrin on field-sprayed lettuce*. J. Assoc. Off. Agr. Chem. 47 (4), p. 632 - 640.
- Copping**, L.G. and Hewitt, H.G. (1998). *Chemistry and Mode of Actions of Crop Protection Agents*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Cremllyn**, R.J. (1991). *Agrochemicals: Preparation and Mode of Action*. John Wiley and Sons, UK.
- Cupta**, R.C. (2005). *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Pesticides*. Academic Press, Inc., NY, USA.
- Cycon**, M., Wojcik, M. and Piotrowska-Seget Z. (2009). *Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by Serratia sp. And Pseudomonas sp. And their Use in Bioremediation of Contaminated Soil*. Chemosphere, 76 (4), p. 494-501.
- Daborn**, P. J., Yen, J. L., Bogwitz, M. R., Goff, G. Le., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson, T. G. and ffrench-Constant, R. H. (2002). *A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in Drosophila*. Science, Vol. 297 (5590), p. 2253 – 2256.
- Danielson**, P. (2002). *The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans*. Curr Drug Metab, 3 (6), p. 561- 597.
- David**, C. (eds) 2000. *Dursban is Everywhere*. In: DURSBAN CASE STUDY: The pesticide the EPA has filanny banned. <http://www.tompaine.com/Archive/Scontent/3233.html>. accessed 30-01-2008.
- De Bruijn**, J., Busser, F., Seinen, W. and Hermens, J. (1989). *Determinations of Octanol/water Partition Coefficients for Hydrophobic Organic Chemicals with the Slow-stirring Method*. Environmental toxicology and Chemistry, 8, 499-512.
- De Hoog**, G. S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J. (2000). Figueras. *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd ed, Vol 1. Centraalbureau voor Schimmecultures, Utrecht, The Netherlands.
- Diaz**, E. (editor). (2008). *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology*.

Caister Academic Press.

Diem, H.G. (1974). *Micro-Organisms of the Leaf Surface: Estimation of the Mycoflora of the Barley Phyllosphere*. Journal of General Microbiology, 80, p. 77-83.

Di Menna, M. E. (1957). *The Isolation of Yeasts from Soil*. J Gen Microbiol, 17, p. 678- 688.

Dishburger, H.J., McKellar, R.L., Pennington, J.Y. and Rice, J.R. (1977). *Determination of residues of chlorpyrifos, its oxygen analogue, and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in tissues of cattle fed chlorpyrifos*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 25(6), p. 1325-1329.

Domagalski, J. L., Kuivila, K.M. (1993). *Distributions of Pesticides and Organic Contaminants between Qater and Suspended Sediment, San Francisco Bay, California*. Estuaries 16: 416-426.

Domagalski, J. L., Dubrovsky, N.M., Kratzer, C.R., (1997). *Organic Chemicals in the Environment, Pesticides in the San Joaquin River, California : Inputs from Dormant Sprayed Orchards*. J Environ Qual 26: 454- 465.

Douglas, K. T. (1987). *Mechanism of Action of Glutathione-Dependent Enzymes*. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 59, 103-167.

Dow Chemical Co. (1986). *Summary of Acute Dermal Toxicity Study on Chlorpyrifos in Fischer 344 rats*. Indianapolis, IN, 5-46.

Dr Nelson Lab Website, Nomenclature Committee.
<http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450>. Retrieved on 19.11.2007.

Droby S., and Chalutz, E., 1994a. *Mode of Action of Biocontrol Agents of Postharvest Diseases*. In: Wilson, C.L. and Wisniewski, M.E. (eds). *Biological Control of Postharvest Diseases- Theory and Practice* (p. 63-75), CRC Press, Boca Raton, FL.

Drummond, J.N. (1986). *Solubility of Chlorpyrifos in Various Solvents*. DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

Dunaway- Mariano, D. (2008). *Enzyme Function Discovery*. Structure, 16 (11), p. 1599-1600.

Eaton, D.L., Bammler, T.K. (1999). *Concise Review of the Glutathione S-transferases and their Significance to Toxicology*. Toxicol Sci, 49 (2), p. 156- 164.

Eichler, D. et al. (1986). 6th Int. Congr. Pestic. Chem. IUPAC, Abstr. 7A-10

Elad, Y., Malathrakis, N.E. and Dik, A.J. (1996). *Biological Control of Botrytis-incited Diseases and Powdery Mildews in Greenhouse Crops*. Crop Protection, 15, p. 229-240.

El-Ghauth, A. and Wilson, C.L. (1995). *Biologically-based Technologies for the Control of Postharvest Diseases*. Postharvest Biology and Technology, 19, p.103-110.

El Saïdy, M.F., Auda, M. and Degheele, D. (1989). *Pesticide Biochemistry Physiology*, 35, p.

211-222.

Environmental Protection Agency U.S. (1989). *Registration Standard (Second Round Review) for the Reregistration of Pesticide Products Containing Chlorpyrifos*. Washington, DC, 5-44.

Environmental Protection Agency U.S. (1994). *Integrated Risk Information System Database*, Washington, DC, 5-54.

Enzyme Nomenclature, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/>. Accessed on 03.11.2008.

EPA (1990). *Pesticide Fact Handbook*, Vol.1. Noyes Data Corp, Park Ridge, NJ.

EPA (1995). *Toxic Release Inventory Reporting Modifications Beginning with 1995 Reporting Year*. Office of Pollution Prevention and Toxics. EPA 745-R-95-009, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

European Commission. (2007). *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*, Document No. SANCO/2007/3131. Available from: www.ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf

Fang, H., Xiang, Y.Q., Hao, Y.J., Chu, X.Q., Pan, X.D., Yu, J.Q. and Yu, Y.L. (2008). *Fungal Degradation of Chlorpyrifos by Verticillium sp. DSP in Pure Cultures and its Use in Bioremediation of Contaminated Soil and Pachoi*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61, p. 294-303.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2007). *Fao Specifications and evaluations for agricultural Pesticides*. Evaluation Report 704/2007 for Lufenuron.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008). *Fao Specifications and evaluations for agricultural Pesticides*. Lufenuron [(RS)-1-[2,5-dichloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoro-propoxy)-phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)-urea],

FAO/WHO (1968). Evaluation of Some Pesticides in Food, Diazinon. FAO/PL: 1967/M/11/1 and WHO/Food Add./68.30.

<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v067pr09.htm>, accessed 20-08-2009.

Fattakhova, A.N. Ofitserov, E.N. and Garusov, A.V. (1991). *Cytochrome P450- dependent Catabolism of Triethanolamine in Rhodotorula mucilaginosa*. *Biodegradation*, 2, p.107-113.

Fernandez, M.J., Medrano, L., Ruiz-Amil, M. and Losada, M. (1967). *Regulation and Function of Pyruvate Kinase and Malate Enzyme Yeast*. *European Journal Biochemistry*, 3, p.11-18.

Filonow, A.B. (1998). *Role of Competition for Sugars by Yeasts in the Biocontrol of Gray Mold of Apple*. *Biocontrol Science and Technology*, 8, p. 243-256.

- Finkelstein**, Z.I., Baskunov, B.P., Rietjens, I.M.C., Boersma, M.G., Vervoort, J. and Golovleva, L.A. (2001). *Transformation of the Insecticide Teflubenzuron by Microorganisms*. Journal of Environmental Science and Health Part B, 36 (5), p. 559- 567.
- Firn**, R. *The Screening Hypothesis- a New Explanation of Secondary Product Diversity and Function* (http://www.-users.york.ac.uk/-drf/rdf_sp!.htm) retrieved on 11.10.2006.
- Fishel**, F. (1997). *Pesticides and the Environment*. Agricultural MU Guide, Extension G7520, Department of Agronomy, University of Missouri-Columbia.
- Fischer**, E. (1894). *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. (<http://gallica.bnf.fr/arl:/12148/bpt6k90736r/f364.chemindefer>. Ber. Dt. Chem. Ges. 27: 2985- 2993.
- Fokkema**, N.J., den Houter, J.G., Kosterman Y.J.C. and Nelis, A.I. (1979). *Manipulation of Yeasts on Field- Grown Wheat Leaves and their Antagonists Effect on Cochiobolus sativus and Septoria nodorum*. Transactions of the British Mycological Society. 72, p. 12-29.
- Fokkema**, N.J. and Schippers, B. (1986). *Phyllosphere versus Rhizosphere as Environments for Saprophytic Colonization*. In: Fokkema, N.J. and van den Heuvel, J. (eds). *Mycobiology of the Phyllosphere*(p. 137-159). Cambridge University Press, London.
- Frank**, R., Braun, H.E., Chapman, N., Burchat, C. (1991a). *Degradation of Parent Compounds of Nine Organophosphorous Insecticides in Ontario Surface Waters Under Controlled Conditions*. Bull Environ Contam Toxicol 47: 374-380.
- Fritsche**, W. (1992). *Degradation of Xenobiotics by Fungi*. In: *Preprints of International symposium on Soil Decontamination Using Biological Processes*, Karlsruhe, Germany, 6-9 December, 1992, p. 31-36. Frankfurt am Main, Dechema.
- Gallo**, M. A. and Lawryk, N. J. (1991). *Organic Phosphorus Pesticides*. In Handbook of Pesticide Toxicology. Hayes, W. J., Jr. and Laws, E. R., Jr., Eds. Academic Press, New York, NY, 5-3.
- Gamon**, M., Pelegri, R., Peris I., J.G. de la Cuadra and Coscolla R. (1998). J. AOAC, 81, p. 1037.
- Ganske**, F. (2009). *Enzyme Kinetic Measurements Performed on BMG LABTECH's FLUOstar OPTIMA*. Application Note 185, Rev)4/2009. BMG LABTECH, Offenburg, Germany.
- Garrett**, R.H., Grisham, C.M. (1999). *Biochemistry*. Second Edition. Saunders College Publishing. 426- 427.
- Gartshore**, J. Cooper, D.G. and Nicell, J.A. (2003). *Biodegradation of Plasticizers by Rhodotorula rubra*. Environmental Toxicology and Chemistry, 22 (6), p. 1244-1251.

- Getzin**, L.W. (1981a). *Degradation of Chlorpyrifos in Soil: Influence of Autoclaving, Soil Moisture and Temperature*. J Econ Entomol, 74, 158- 162.
- Girvan**, H., Waltham, T., Neeli, R., Collins, H. McLean, K., Scrutton, N., Leys, D. and Munro, D. (2006). *Flavocytochrome P450 BM3 and the Origin of CYP102 Fusion Species*. Biochem Soc Trans, 34 (Pt 6), p. 1173- 1177.
- Goldstone** and Jared. (2006). *The Chemical Defensome: Environmental Sensing and RGSponse genes in the Strongylocentrotus purpuratus Genome*. Dev Biol, 300 (1), p.366-384.
- Grant**, D.M. (1998). *Comparison and Distribution, Metabolism and Excretion of two Benzoylphenylurea Pesticides, Diflubenzuron and Lufenuron in the Rat and Mouse*. UMI Dissertation Services, Ann Arbor, Michigan.
- Groll**, A.H. and Walsh, T.J. (2001). *Uncommon Opportunistic Fungi: New Nosocomial Threats*. Clin Microbiol Infect, Volume 7, p. 8-24.
- Groves**, J.T., (1997). *Artificial enzymes. The importance of being selective*. Nature, 389 (6649): 329- 330.
- Guengerich**, F.P. (2008). *Cytochrome P450 and Chemical Toxicology*. Chemical Research in Toxicology. 21, p. 70-83.
- Guha**, A., Kumari, B., Bora, T.C. and Roy, M.K. (1997). *Possible Involvement of Plasmids in Degradation of Malathion and Chlorpyrifos by Micrococcus sp.*. Folia Microbiol 42(6), 574-576.
- Gunner**, H.B., Zuckerman, B.M. (1968). *Degradation of Diazinon by Synergistic Microbial Action*. Nature (Lond) 217: 1183- 1184.
- Gyaurgieva**, O.H., Bogomolova, T.S. and Gorshkova, G.I. (1996). *Meningitis Caused by Rhodotorula rubra in an HIV- infected Patient*. J Med Vet Mycol. Volume 34, p. 357-359.
- Habig** W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974) *Glutathione S-transferases. The first Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation*. J Biol Chem, 246, p. 7130-7139.
- Haggler**, A.N., Rosa, C.A., Morais, P.B., Mendoca-Hagler, L.C., Franco, G.M.O., Araujo, F.V. and Soares, C.A. (1993). *Yeasts and Coliform Bacteria of Water Accumulated in Bromeliads of Mangrove and Sand Dune Ecosystems of Southeast Brazil*. Can J Microbiol, 39, p. 973-981.
- Havens**, P.L. and Rase, H.F. (1991). *Detoxification of Organophosphorus Pesticide Solutions*. In: Tedder, D.W., Pohland, F.G. (eds). Emerging technologies in Hazardous waste management II. ACS, Washington, DC, pp 261-281.

- HHS** (1996). *Toxicological Profile for Diazinon* (update). Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, G.A.
- Hirano**, S.S. and Upper, C.D. (1989). *Dial Variation in Population Size and Ice Nucleation Activity of Pseudomonas syringae on Snap Bean Leaves*. Applied Environmental Microbiology, 55, p. 623-630.
- Hirano**, S.S. and Upper, C.D. (1991). *Bacterial Community Dynamics*. In: Andrews, J.H. and Hirano, S.S. (eds). Microbial Ecology of Leaves (p. 271-294). Springer-Verlag, New York.
- Horne**, I., Sutherland, T.D., Harcourt, R.L., Russel, R.J. & Oakeshott, J.G. (2002). *Identification of an opd (organophosphate degradation) Gene in Agrobacterium Isolate*. Applied Environmental Microbiology, 68: 3371- 3376.
- Howard**, P.H., ed. (1991). *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals*. Vol. 3: Pesticides. Lewis Publishers, Chelsea, MI, p. 5-14.
- Hummel**, R.A. and Crummet, W.B. (1964). *Solubility of Ether (O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) Phosphorothioate in Various Solvents*. DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).
- Hundley**, H.K., Cairns, T., Luke, M.A. Masumoto, H.T. (1988). *Pesticide Residue findings by the Luke Method in Domestic and Imported Foods and Animal Feeds for Fiscal Years 1982-1986*. J Assoc Off Anal Chem 71: 875-892.
- Huttova**, M., Kralinsky, K., Horn, J., Marinova, I., Iligova, K., Fric, J., Spanik, S., Filka, J., Uher, J., Kurak, J. and Krcmery, V. (1998). *Prospective study of nosocomial fungal meningitis in children: Report of 10 cases*. Sand J Infect Dis. Volume 30, p.485-487.
- Ivashina**, S.A. (1986). *Interaction of Dursban with soil micro-organisms*. Agrokhimia 8, 75-76.
- Ivey**, M.C., Mann, H.D., Oechler, D.D., Claborn, H.V., Eschle, J.L. and Hogan, B.F. (1972). *Chlorpyrifos and its oxygen analogue in the body tissues of dipped cattle*. J Econ Entomol, 65, 1647- 1649.
- Ivey**, M.C. and Palmer, J.S. (1979). *Chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol: Residues in body tissues of swine treated with chlorpyrifos for hog louse and itch mite control*. J Econ Entomol, 72, 837- 838.
- Ivey**, M.C. and Palmer, J.S. (1981). *Chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol: Residues in body tissues of sheep treated with chlorpyrifos for sheep ked control*. J Econ Entomol, 74, 136- 137.
- Jaeger**, K.E., Eggert, T. (2004). *Enantioselective biocatalysis optimised by directed*

evolution. Current Opinion in Biotechnology, 15 (4): 305- 313.

Janisiewicz, W.J. and bors, B. (1995). *Development of Microbial Community of Bacterial and Yeasts Antagonists to Control of Blue Mold and Gray Mold of Apples in Cold Storage*. Crop Protection, 16, p. 629-633.

Jones, A.S., Hastings, F.L. (1981). *Soil microbe studies*. In: Hastings F.L., Coster J.E. (eds). *Field and laboratory evaluations of insecticides for southern pine beetle control*. USDA. Southern Forest Experimental Station, Forest Service, SE 21, pp 13-14, 35.

Khay, S., Choi, J.H., Abd El-Aty, A.M., Mamum, M.I.R., Parl, B.J., Goudah, A., Shin, H.C. and Shim, J.H. (2008). *Dissipation Behavior of Lufenuron, Benzoylphenylurea Insecticide, in/on Chinese Cabbage Applied by Foliar Spraying Under Greenhouse Conditions*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 81, p. 369-372.

Kidd, H. and James, D. R., (1991). Eds. *The Agrochemicals Handbook*, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, (as updated) 5-14.

Kishi, M., Hirschorn, N., Djajadisastra, M., Satterlee, N.L, Strowman, S., Dilts, R. (1995). *Relationship of Pesticide Spraying to Signs and Symptoms in Indonesian Farmers*. Scand J Work Environ Health 21: 124-133.

Koch, H.M. and Angerer, J. (2001). *Analysis of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in Urine Samples Sfrom the General Population Using Gas Chromatography- Mass Spectrometry after Steam Distillation and Solid Phase Extraction*. Journal of Chromatography B, 759, 43- 49.

Krcmery, V., Krupova, I. and Denning, D.W. (1999). *Invasive Yeast Infections other than Candida spp. In AcuteLleukaemia*. J hosp Infect, Volume 41, p. 181-194.

Kreger- Van Rij, N.J.W. (ed). (1984). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (1998). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier Science B.V., p. 800-822.

Kwon- Chung, K. J. and Bennett, J.E. (1992). *Medical Mycology*. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, p. 866.

Lacorte, S., Lartiges, S.B. Garrigues, P., Barcelo, D. (1995). *Degradation of Organophosphorous Pesticides and their Transformation Products in Estuarine Waters*. Environ Sci Technol 29: 431-438.

Lakshmi, C.V., Kumar, M. and Khanna, S. (2008). *Biotransformation of Chlorpyrifos and Bioremediation of Contaminate Soil*. International Biodeterioration and Biodegradation, 62, p. 204-209.

Lal, S. και Lal, R. (1987). *Bioaccumulation, Metabolism and Effects of DDT, Fenitrothion*

- and Chlorpyrifos on *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Environm Contam Toxicol, 16, 753-757.
- Larone, D. H.** (1995). *Medically Important Fungi- A Guide to Identification*. 3rd ed. ASM Press. Washington, D.C.
- Leaver, M. J., and George, S. G.** (1998). *A Piscine Glutathione S-transferase which Efficiently Conjugates the End-products of Lipid Peroxidation*. Mar. Environ. Res. 46, 71-74.
- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M. and Mendegen, K.** (1997). *Control of Postharvest Pathogens and Colonization of the Apple Surface by Antagonistic Microorganisms in the Field*. Phytopathology, 87, p. 1103-1110.
- Leschchev, V.V., Kan, P.T.Talanov, G.A.** (1972). *Dynamics of Accumulation of Diazinon and Dursban Residues in Calves and Sheep*. Khim Sel Khoz, 10, 704- 706.
- Levanon, D., Meisinger J.J., Codling, E.E., Starr, J.L.** (1994). *Impact of Tillage on Microbial Activity and the Fate of Pesticides in the Upper Soil*. Water Air Soil Pollut 72: 179-189.
- Li, X., He, J. and Li, S.** (2007). *Isolation of a Chlorpyrifos-degrading Bacterium, Sphingomonas sp. strain Dsp-2 and Cloning of the mpd Gene*. Research in Microbiology, 158, p. 143-149.
- Lilley, D.** (2005). *Structure, Folding and Mechanisms of Ribozymes*. Current Opinion in Structural Biology, 15 (3):313- 323.
- Liwak, G., Ketteres, B. & Arias, Irwin, J.,** (1971). *Ligandin: a Hepatic Binding Protein which Binds Steroids, Bilirubin, Carcinogens and a Number of Exogenous Organic Anions*. Nature
- Lu, F. C.** (1995). *A Review of the Acceptable Daily Intakes of Pesticides Assessed by the World Health Organization*. Regul. Toxicol. Pharmacol. 21: 351-364, 5-39.
- Luke, B. G. and Dahl, C.J.** (1976). *Detection of O,O-diethyl-O-(2,5-dichlorophenyl) phosphorothioate and O,O-diethyl-O-(3,6-dichloro-2-pyridyl) phosphorothioate in Meat Fat*. J Assoc Off Anal Chem, 59 (5), p. 1081-1087.
- MacGillivray, A.R. and Shiaris, M.P.** (1993). *Biotransformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Yeasts Isolated from Coastal Sediments*. Applied Environmental Microbiology, 59, p.1613- 1618.
- MacGillivray, A.R. and Shiaris, M.P.** (1994). *Relative Role of Eukaryotic and Prokaryotic Microorganisms in Phenanthrene Transformation in Coastal Sediments*. Applied Environmental Microbiology, 60, p.1154- 1159.
- McKellar, R.L. and Dishburger, H.J.** (1976). *Determination of Residues of Chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in Tissues of Cattle Receiving a Single Treatment of DURS BAN Spot-on*. Report GH-C-930, Dow Chemical Co. (Unpublished).
- Mallick, K., Bharati, K., Banerji, A., Shakil, N.A. and Sethunathan, N.** (1999). *Bacterial*

Degradation of Chlorpyrifos in Pure Cultures and in Soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 62, 48-54.

Mansour, M., Feicht, E.A., Behechti, A., Scheunert, I. (1997). *Experimental Approaches to Studying the Photostability of Selected Pesticides in Water and Soil.* Chemosphere 35: 39-50.

Markoglou, N.A., Bempelou, D.E., Liapis, S.K. and Ziogas, N. B. (2007). *Determination of Benzoylurea Insecticide Residues in Tomatoes by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet-Diode Array and Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry Detection.* Journal of AOAC, 90 (5), p. 1395- 1401.

Marrs, T.C., (2001). *Pesticide Residues in Food, Toxicological Evaluation, Diazinon (Addendum)*, <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr03.htm#4.0>, accessed 25-10-2009.

Martinez- Galera M., Lopez- Lopez T., Gil-Garcia M.D., Martinez-Vidal J.L. and Parrilla Varquez P. (2001). *Determination of Benzoylureas in Tomato by High-Performance Liquid Chromatography Using Continuous On-line Post-elution Photoirradiation with Fluorescence Detection.* Journal of Chromatography A, 918, p. 79-85.

Martini, A., Frederici, F., Rosini, G.A. (1980). *A New Approach to the Study of Yeast Ecology of Natural Substrates.* Can J Microbiol, 26, p. 856-859.

McCall, P.J. (1986a). *Hydrolysis of Chlorpyrifos in Dilute Aqueous Solution.* DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

McCormack, J., Widmman, H.G., Jeffries, P. (1994). *Production of Antibacterial Compounds by Phylloplane Inhabiting Yeast and Yeasts- like fungi.* Applied Environmental Microbiology, 60, p. 927-931.

McDonald, R.A., Karris G.C., Chakrabarti, A. (1985a). *The Melting Behavior, Heat or Melting, Specific Heat Capacity, Thermal Conductivity, and Vapor Pressure of a Recrystallized Dursban Insecticide.* DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

McDonald, I.A., Howes, D.A., Gillis N.A. (1985b). *The Determination of Physicochemical Parameters of Chlorpyrifos.* DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).

Medrano, L. Ruiz-Amil, M and Losada, M. (1969). *Effect of Glucose on Pyruvate Utilization by Rhodotorula glutinis.* Arcives Microbiology, 66, p. 239-249.

Meikle, R.W., Youngson, C.R. (1978). *The hydrolysis rate of chlorpyrifos [O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl)-phosphorothiorate] and its Dimethyl Analog, Chlorpyrifos methyl, in Dilute Aqueous Solution.* Archives in Environmental Contamination and Toxicology, 7, 13-22.

Merck (1996). *The Merck Index*, 12th Ed. Merck, Inc., Whitehouse Station, NJ, p. 508.

- Merck & Co., Inc.** (2006). *Active Chemical Ingredients. The Merck Veterinary Manual*. Whitehouse Station, NJ USA. Merial Ltd.
- Meunier, B., Samuel P. de Visser, and Shaik, S.** (2004). *Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes*. *Chemical Reviews*, 104 (9), p. 3947-3980.
- Michaelis Leonor and Menten Maud.** (1913). *Die Kinetik der Invertinwirkung*. *Biochem. Z.*, 49, p.333- 369.
- Michel, F.C., Reddy, C.A., Forney, L.J.** (1997). *Fate of Carbon-14 Diazinon During the Composting of Yard Trimmings*. *J Environ Qual*, 26, p. 200-205.
- Miliadis, G.E., Tsiropoulos, N.G. and Aplada-Sarlis P.G.** (1999). *High-performance Liquid Chromatographic Determination of Benzoylurea Insecticides Residues in Grapes and Wine Using Liquid and Solid-phase Extraction*. *Journal of Chromatography A*, 835, p. 113-120.
- Miller J.N. and Miller J.C.** (2000) *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th edition, Pearson Education Limited, Edinburgh Gate, England, p. 108-114.
- Ministry of Public Health, Welfare and Sport.** (1996). *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*. Sixth edition.
- Mishra, D.S, Bhuyan, T.K., Adhya and Sethunathan, N.** (1992). *Accelerated Degradation of Methyl parathion, Parathion and Fenitrothion by Suspensions from Methyl parathion and p-nitrophenol Treated Soils*. *Soil Biol Biochem*, 24, 1035-1042.
- Mulbry, W.W., Karns, J.S., Kearney, P.C., Nelson, J.O., McDaniel, C.S. & Wild, J.R.** (1986). *Identification of a Plasmid-borne Parathion Hydrolase Gene from Flavobacterium sp. By Southern Hybridization with Opd from Pseudomonas diminuta*. *Applied Environmental Microbiology*, 51: 926- 930.
- Muncnerova, D. and Augustin, J.** (1995). *Assimilation of Benzoate by Rhodotorula rubra, Rhodotorula glutinis and Rhodosporidium toluroides, as Affected by Glucose or Xylose*. *World Journal of Microbiology and biotechnology*, 11, p. 240-241.
- Munnecke, D. M. and Hsien, D.P.H.** (1975). *Development of Microbial Systems for the Disposal of Concentrated Pesticide Suspensions*. *Med Facul Landbouww Rijksuniv Gent* 40, 1234-1247.
- Munnecke, D. M.** (1976). *Enzymatic Hydrolysis of Organophosphate Insecticides, a Possible Pesticide Disposal Method*. *Applied and Environmental Microbiology*, 32 (1), p. 7-13.
- Munnecke, D. M.** (1980). *Enzymic Detoxification of Waste Organophosphate Pesticides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 28, p. 105-111.
- Mutch, E. and Williams, F.M.** (2006). *Diazinon, Chlorpyrifos, and Parathion are*

Metabolises by Multiple Cytochrome P₄₅₀ in Human Liver. Toxicology, 224, p. 22- 32.

Nakagawa, Y., Izumi, K., Oikawa, N. and Kurozumi, A. (1991). *Quantitative Structure-Activity Relationships of Benzoylphenylurea Larvicides. VII. Separation of Effects of Substituents in the Multisubstituted Anilide Moiety on the Larvicidal Activity Against Chilo suppressalis*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 40, p.12-26.

Narhi, L., Fulco, A. (1986). *Characterization of the Catalytically Self-sufficient 119,000 Dalton Cytochrome P450 Monooxygenase Induced by Barbiturates in Bacillus megaterium*. J Biol Chem, 261 (16), p. 7160- 7169.

National Academy of Sciences. (1982). *Possible Long-term Health Effects of Short-term Exposure to Chemical Agents*. Vol. 1: Anti-cholinesterases and anticholinergics. National Academy Press, Washington, DC, 5-50.

Naveh, Y., Friedman, A. Merzbach, D. and Hashman, N. (1975). *Endocarditis Caused by Rhodotorula Successfully Treated with 5-fluorocytosine*. British Heart Journal. Volume 37, p. 101-104.

NCAP 2000 Insecticide Factsheets. Northwest coalition for alternatives pesticides. <http://pesticide.org>. cited March 2000.

Neely, W.B, Branson, D.R., Blau, G.E. (1974). *Partition Coefficient to Measure Bioconcentration Potential of Organic Chemicals in Fish*. Environmental Science and Technology, 8, 1113- 1115.

Neilson, A.H. and Allrd, A.S. (2008). *Environmental Degradation and Transformation of Organic Chemicals*. CRC Press, Taylor and Francis Group.

Ni, Y. and Xu, J.H. (2002). *Asymmetric Reduction of Aryl Ketones with a New Isolate Rhodotorula sp. AS2.2241*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 18, p. 233-241.

Nigg, H.N. (1980). *Prediction of Agricultural Workers Safety Reentry Times for Organophosphate Insecticides*. Am Ind Hyg Assoc J, 41: 340-344.

O'Brian, R.D. (1973). *Acetylcholinesterase and its Inhibition*. In: *Insect Biochemistry and Physiology* (CF Wilkinson, ed). Plenum Press, New York, USA, p. 271.

Ohashi, N., Tsuchiya, Y., Sasano, H., Hamada, A. (1994). *Ozonization Products of Organophosphorous Pesticides in Water*. Jpn J Toxicol Environ Health, 40: 185-192.

Ohshiro, K., Kakuta, T., Sakai, T., Hirota, H. Hoshino, T. and Uchiyama, T. (1996). *Biodegradation of Organophosphorus Insecticides by Bacteria Isolated from Turf Green Soil*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 82, p. 299-305.

Ortiz P.R. de Montellano, (1995). (Ed.). *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. 2nd edition. New York, Plenum.

- Parker**, M.W., Board, P.g., Polekhima, G., Blackburn, A.C. (2001). *Crystal Structure of Maleylacetoacetate Isomerase/ Glutathione Transferase Zeta Reveals the Molecular Basis for Its Remarkable Catalytic Promiscuity*. *Biochemistry*, 40 (6), p. 1567- 1576.
- Pesaro**, M., Nicollier, G., Zeyer, J. and Widmer, F. (2004). *Impact of Soil Drying-rewetting Stress on Microbial Communities and Activities and on Degradation of Two Crop Protection Products*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70 (5), p. 2577- 2587.
- Phaff**, H.J., Miller, M.W., Mrak E.M. (1966). *The Life of the Yeasts*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Phaff**, H.J., Starmer, W.T. (1987). *Yeasts Associated with Plants, Insects and Soil*. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds). *The Yeasts, Biology of the Yeasts*. Volume 1, New York: Academic Press, p.123-180.
- Pinna**, A., Carta, F., Zanetti, S., Sanna, s. and Sechi, L.A. (2001). *Endogenous Rhodotorula minuta and Candida albicans Endolphthalmitis in An Injecting Drug User*. *Brit J Ophthalmol*. Volume 85, p. 759.
- Pore**, R. S. and Chen, J. (1976). *Meningitis Caused by Rhodotorula*. *Sabouraudia*. Volume 14. p.331-335.
- PSD** (1991). Food and Environmental Protection Act 1985 Part III. *Evaluation on Teflubenzuron*.
- Postgate**, J. (1994). *The Outer Reaches of Life*. Cambridge University Press, p. 132-134.
- Potter**, D.A., Spicer, P.G., Redmond, C.T., Powell, A.J. (1994). *Toxicity of Pesticides to Earthworms in Kentucky Bluegrass Turf*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 52: 176-181.
- Poulos**, T., Finzei, B.C. and Howard A.J. (1987). *High-resolution Crystal Structure of Cytochrome P450*. *Journal of Molecular Biology*, 196 (3), p. 687- 700.
- Racke**, K.D., Coats, J.R., and Titus, K.R. (1988). *Degradation of Chlorpyrifos and Its Hydrolysis Products 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, in Soil*. *Journal of environmental Science and Health B*, 23, 527- 539.
- Racke**, K.D. (1993). *Environmental Fate of Chlorpyrifos*. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 131, 1-151.
- Ralls**, J.W. Gilmore, D.R. Cortes, A., Schutt, S.M. and Mercer, W.A. (1967). *Residue Levels of Diazinon and Its Transformation Products on Tomatoes, Spinach and Beans*. *Food Technology*, 21, p. 92 -94.
- Rigterink**, R.H., Kenaga, E.E. (1966). *Synthesis and Insecticidal Activity of Some O,O-dialkyl O-(3,5,6-trihalo-2-pyridyl) phosphates and Phosphorothioates*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 14, 304-306.

- Roberts**, T. and Hutson, D. (1999). *Metabolic Pathways of Agrochemicals*. Part Two: Insecticides and Fungicides, Editors in Chief. p.795
- Robb**, P.G., Hagler, A.N., Mendonca- Hagler L.C. (1989). *Yeasts Associated with Pineapple Plantation in Rio de Janeiro, Brazil*. *Yeast*, 5, p.485-489.
- Roditakis**, E., Grispou, M., Morou, E., Kristoffersen, J.B., Roditakis, N., Nauen, R., Vontas, J. and Tsagkarakou, A. (2009). *Current status of insecticide resistance in Q biotype Bemisia tabaci populations from Crete*. *Pest Management Science*, 65(3), p. 313-22.
- Romero**, M.C., Cazau, M.C., Giorgieri, S. and Arambarri, A.M. (1998). *Phenanthrene Degradation by Microorganisms Isolated from a Contaminated Stream*. *Environmental Pollution*. 101, p. 355-359.
- Romero**, M.C., Salvioli, M.L.,Cazau and Arambarri, A.M. (2002). *Pyrene Degradation by Yeasts and Filamentous Fungi*. *Environmental Pollution*, 117, p. 159-163.
- Rosa**, C.A, Morais, P.B., Hagler, A.N., Mendonca- Hagler L.C. and Monteiro, R.F. (1994). *Yeats Communities of Cactus Philosocereus arrabidae and Associated Insects in the Sandy Coastal Plains of South Eastern Brazil*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 65, p.55-62.
- Rosa**, C.A, Morais, P.B., Santos, R.S.Neto, P.R.P., Mendonca- Hagler L.C. and Hagler, A.N. (1995). *Yeasts Communities Associated With Different Plant Resources in Sandy Coastal Plains of South Eastern Brazil*. *Mycological Res*, 99, p. 1047-1054.
- Rosenberg** A. and Alexander M. (1979). *Microbial Cleavage of Various Organophosphorus Insecticides*. *Applied and environmental Microbiology*. 37 (5), p. 886-891.
- Ruiz-Amil**, M., Torrontegui, G., Palacian, E, Catalina, L. and Losada, M. (1965). *Properties and Functions of Yeast Puryvate Carboxylase*. *Journal Biology Chemistry*, 240, 3485-3492.
- Saidy**, M. F. El., Auda, M. and Degheele, D. (1989). *Detoxification Mechanisms of Diflubenzuron and Teflubenzuron in the Larvae of Spodoptera littoralis (Boisd.)*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 35, p.211-222.
- Sancho**, J.V, Pozo, O.J. and Hernandez, F. (2000). *Direct Determination of Chlorpyrifos and Its Main Metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in Human Serum and Urine by Coupled-Column Liquid Chromatography/ Electrospray- Tandem Mass Spectrometry*. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 14, 1485- 1490.
- Sannino**, A. and Bandini, M. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 19 (2005) 2729-2733.
- Shoen**, S.R., Winterlin, W.L. (1987). *The Effects of Various Soil Factors and Amendments on the Degradation of Pesticide Mixtures*. *J. Environ Sci Technol*, 25: 155-160.
- Schomburg**, C.J., Glotfelty, D.E., Seiber, J.N. (1991). *Pesticide Sci Technol*, 25 : 155-160.

- Seiber**, J.N., Wilson, B.W., McChesney, M.M. (1993). *Air and Fog Deposition Residues of Four Organophosphorous Insecticides Used on Dormant Orchards in the San Joaquin Valley, California*. Environ Sci Technol, 27: 2236- 2243.
- Serdar**, C.M., Gibson, D.T., Munnecke, D.M., & Lancaster, J.H. (1982). *Plasmid Involment in Parathion Hydrolysis by Pseudomonas diminuta*. Applies Environmental Microbiology, 44: 246- 249.
- Sethunathan**, N. και MacRae, T.C. (1969). *Persistence and Biodegradation of Diazinon in Submerged Soils*. Journal Agriculture and Food Chemistry, 17 (2), p. 221-225.
- Sethunathan**, N. (1971). *Biodegradation of Diazinon in Paddy Fields As a Cause of Its Inefficiency for Controlling Brown Plant Hoppers in Rice Fields*. PANS 17, 18-19.
- Sethunathan**, N. και Yoshida, T. (1973). *A Flavobacterium sp. that Degrades Diazinon and Parathion*. Can Microbiol 19, 873-875.
- Sethunathan**, N. και Pathak, M.D. (1972). *Increased Biological Hydrolysis of Diazinon after Repeated Application in Rice Paddies*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 20, 586-589.
- Sethunathan**, N. (1989). *Biodegradation of Pesticides in Tropical Rice Ecosystems*. Ecotoxicology and Climate. Edited by P. Bourdeau, J.A. Haines, W. Klein and C.R. Krishna Murti. Published by John Wiley & Sons Ltd, p. 247-264.
- Schimmel**, S.C., Garnas, R.L., Patrick, J.M., Moore, J.C. (1983). *Acute Toxicity, Bioconcentration and Persistence of AC 222,705, Benthocarb, Chlorpyrifos, Fenvalerate, Methyl parathion and Permethrin in the Estuarine Environment*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 31, 104- 113.
- Singh**, B.K., Walker, A., Morgan, J.A.W. and Wright, D.J. (2003). *Effects of Soil pH on the Biodegradation of Chlorpyrifos and Isolation of a Chlorpyrifos-degrading Bacterium*. Applied Environmental Microbiology, 69(9), 5198-5206.
- Singh**, B.K., Walker, A., Morgan, J.A.W. and Wright, D.J. (2004). *Biodegradation of Chlorpyrifos by Enterobacter strain-B14 and Its Use in Bioremediation of Contaminated Soils*. Applied Environmental Microbiology, 70(8), 4855-4863.
- Singh**, B.K., Walker, A. and Wright, D.J. (2006). *Bioremedial Potential of Fenamiphos, Chlorpyrifos, Degrading Isolates: Influence of Different Environmental Conditions*. Soil Biology and Biochemistry, 38, p. 2682- 2693.
- Shaker**, N., Abo-Donia, S., El-Shaheed, Y.A. και Ismail. (1988). *Effect of Lactic Acid Bacteria and Heat Treatments on Pesticides Contaminated Milk*. Egypt J Diary Sci 16, 309-317.

- Sligar, G.G., Cinti, D.L., G.G. and Schenkman, J.B. (1979).** *Spin State Control of the Hepatic Cytochrome P450 Redox Potential.* Biochemical and Biophysical Research Communications. 90 (3), p. 925-932.
- Smith, A.D. (Ed) et al., (1997).** *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology.* Oxford University Press.
- Smith, G.N. and Watson, B.S. (1964).** *Uptake and Translocation of Ethel-³⁶Cl in Plants.* DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).
- Smith, L.H., Liyanage, J.A., Watawala, R.C., Aravinna, A.G.P. and Kookana, R.S. (2006).** *Degradation of the Pesticides Carbofuran and Diazinon in Tropical Soils from Sri Lanka.* CSIRO Land and Water Science Report 67/06.
- Smith, S. (1994).** *The Animal Fatty Acid Synthase: One Gene, One Polypeptide, Seven Enzymes.* The FASEBJ Journal, 8 (15), p. 1248- 1259).
- Somasundaram, L., CoatsJ. R., Racke, K. D. and Stahr, H. M. (1987).** *Application of the Microtox System to Assess the Toxicity of Pesticides and Their Hydrolysis Metabolites.* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 44, p. 254-259.
- Stehl, R.H. (1966).** *Partition Coefficients of Dursban and Oxydursban Between Water and n-octanol.* DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).
- Styer Lubert (1997).** *Βιοχημεία.* Τόμος Πρώτος. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Τρίτη έκδοση.
- Sutton, D.A., Forthergill, A.W. and Rinaldi (ed), M.G. (1998).** *Guide to Clinically Significant Fungi.* 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- The Catalytic site atlas at the European Bioinformatics Institute.** (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>) accessed on 04-04-2007.
- Thiegs, B.J. (1966).** *Degradation of [14C] Dursban in Soil.* DowElanco, Indianapolis, IN (Unpublished report).
- Tomlin C, (2003)** *The Pesticide Manual*, 13th edition, British Crop Protection Council.
- Torrontegui, G., Palacian, E. and Losada, M. (1966).** *Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Gluconeogenesis and its Repression by Hexoses in Yeasts.* Biochem Biophys Res Commun, 22, p. 227-231.
- Tsiropoulos, N.G., Aplada-Sarlis, P.G. and Miliadis, G.E. (1999)** J. AOAC,82, p. 213-216.
- University of Waterloo, Canada. Module Five- Biodegradation Microbiology.** http://wvlc.uwaterloo.ca/biology447/modules/module5/5_main.htm, access 3/4/2005.
- U.S.P.H.S. (U.S. Public Health Service). (1995).** *Hazardous Substance Data Bank.* Washington, DC, p. 5-9.

- Van Daalen**, J.J., Meltzer, J., Mulder, R. and Wellinga, K. (1972). *Naturwissenschaften*, 59, 312-313.
- Van Laecke**, K. and Degheele, D. (1991). *Detoxification of diflubenzuron and teflubenzuron in the larvae of the beet armyworm (Spodoptera exigua) (Lepidoptera: Noctuidae)*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 40, p. 181-190.
- Verloop**, A., Ferrell, C.D. (1977). In: *Pesticide Chemistry in the 20th Century*. Volume 37, p. 237- 270. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C.
- Vuilleumier**, S. (1997). *Bacterial Glutathione S-transferases: What Are They Good for?* *J Bacteriol*, 179 (5), p. 1431- 1441.
- Wauchope**, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., Augustijn- Brckers, P.W.M. and Burt, J.P. (1992). *Pesticide Properties Database for Environmental Decisionmaking*. *Review Environmental Contamination Toxicology*, 137 : 1-157, 1992, p. 5-20.
- Wilce**, M.C. and Parker, M.W. (1994). *Structure and Function of Glutathione S-transferases*. *Biochim Biophys Acta*, 1205, p. 1-18.
- Wilson**, C.L. (1989). *Managing the Microflora of Harvested Fruits and Vegetables to Enhanced Resistance*. *Phytopathology*, 79, p.1387-1390.
- Wilson**, C.L. and Chalutz, E.(1989). *Postharvest Biological Control of Penicillium Rots of Citrus with Antagonistic Yeasts and Bacteria*. *Scientia Horticulturae*, 40, p. 105-112.
- Wilson**, C.L., El-Ghauth, A., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Lu, J.Y., Khan, V. and Arul, J. (1994). *Potential of Induced Resistance to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables*. *Plant Disease*, 78, p. 837-844.
- Wisniewki**, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C. and Chalutz, E. (1991). *Mode of Action of the Postharvest Biocontrol Yeast Pichia guilliermondii. I. Characterization of Attachment to Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39, p. 245-258.
- Wright**, J.E. (1987). *Chitin and Benzoylphenyl Ureas*. Kluwer Academic Publishers. By Dr W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Wright**, J.D. and Ratledge, C. (1991). *Isolation of Rhodotorula rubra Strains Showing Differences in the Degradation of Aromatic Compounds*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35 (1), p. 94-99.
- Xu**, G., Zheng, W., Li, Y., Wang, S., Zhang, J. and Yan, Y. (2008). *Biodegradation of Chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by Newly Isolated Paracoccus sp. Straun TRP*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62, p. 51-56.
- Yang**, L., Zhao, Y.H., Zhang, B.X., Yang, C.H. and Zhang, X. (2005). *Isolation and*

Characterization of A Chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol Degrading Bacterium. FEMS Microbiology Letters, 251, p. 67-73.

Yang, C., Liu, N., Guo, X. and Qiao, C. (2006). *Cloning of Mpd Gene from a Chlorpyrifos-Degrading Bacterium and Use of this Strain in Bioremediation of Contaminated Soil.* FEMS Microbiology Letters, 265, p.118-125.

Yasouri, F.N. (2006). *Plasmid Mediated Degradation of Diazinon by Three Bacterial Strains Pseudomonas sp., Flavobacterium sp. and Agrobacterium sp.* Asian Journal of Chemistry, 18 (4), p. 2437-2444.

Yu, Y.L., Fanf, H., Wang, X. Wu, X.M., Shan, M. and Yu, J.Q. (2006). *Characterization of a Fungal Strain Capable of Degrading Chlorpyrifos and its Use in Detoxification of the Insecticide on Vegetables.* Biodegradation, 17, p. 487-494.

Αγροτύπος Α.Ε. <http://www.agrotypos.gr/Pharmacy/PharmSearch.asp?TypeID=2>. cited 25-01-2009.

Ζιώγας, Β. και Μαρκόγλου, Α. (2007). *Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί δράσης και Χρήσεις Φυτοπροστατευτικών προϊόντων.* Ελληνικής Έκδοσης 2007, Ζιώγας, Β. και Μαρκόγλου, Α.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 396/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23^{ης} Φεβρουαρίου 2005. Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκής Ένωσης, 16.03.2005, L70/ 1-16.

Κλώνης Ιωάννης (2007). *Ενζυμολογία.* Εκδ. Έμβρυο και Ιωάννης Κλώνης 2006.

Στεργίου Γ. Αναστασία (2002). *Εφαρμογές Βιολογικής Καταπολέμησης του Μύκητα Botrytis cinerea με Επιφυτικές Ζύμες του Γένους Rhodotorula στο Εργαστήριο και το Θερμοκήπιο.* Μεταπτυχιακή μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme>, accessed 17-02-2009.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Biodegradation>, accessed 12-02-2008.

<http://www.hdcchem.com/Lufenuron.html>, accessed 11-10-2009.

<http://www.hdcchem.com/Teflubenzuron.html>, accessed 11-10-2009.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πειράματα ευαισθησίας των ζυμών *Rhodotorula glutinis* και *Rhodotorula rubra* σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Rhodotorula glutinis

Δραστική ουσία	Κατηγορία / Ομάδα	Φόρτιση	% επιβίωση του μάρτυρα	
			Ξηρό βάρος	Αριθμός αποικιών
Lufenuron	Εντομοκτόνο / Βενζοϋλουρία	200ppm	84% (4 days)	97% (4 days)
Triflumuron	Εντομοκτόνο / Βενζοϋλουρία	200ppm	78% (4 days)	80% (4 days)
Teflubenzuron	Εντομοκτόνο / Βενζοϋλουρία	200ppm	91% (4 days)	96% (4 days)
Flufenoxuron	Εντομοκτόνο / Βενζοϋλουρία	200ppm	82% (4 days)	87% (4 days)
Diflubenzuron	Εντομοκτόνο / Βενζοϋλουρία	200ppm	89% (4 days)	93% (4 days)
Diazinon	Εντομοκτόνο / Οργανοφωσφορικό	100ppm	40% (4 days)	35% (4 days)
Chlorpyrifos ethyl	Εντομοκτόνο / Οργανοφωσφορικό	100ppm	68.5% (4 days)	45% (4 days)
Chlorpyrifos methyl	Εντομοκτόνο / Οργανοφωσφορικό	200ppm	75% (4 days)	72% (4 days) <i>όμως</i> 93% (10 days)
Vinclozolin	Μυκητοκτόνο / dicarboximide	200ppm	87.2% (4 days)	100% (4 days)
Procymidone (1st)	Μυκητοκτόνο / dicarboximide	200ppm	85.5% (4 days)	-
Procymidone (2nd)	Μυκητοκτόνο / dicarboximide	200ppm	84%(4 days)	-
Chlorothalonil	Μυκητοκτόνο / chloronitrile	100ppm	72% (4 days)	80% (4 days)
Malathion	Εντομοκτόνο / Οργανοφωσφορικό	100ppm	86% (4 days)	90% (4 days)
Iprovalicarb	Μυκητοκτόνο / amino acid amide carbamate	10-500ppm	Σαφής παρεμόδιση σε μέγεθος και αριθμό αποικιών σε c>100ppm (4 days). Δεν υπάρχει παρεμπόδιση στα 200ppm (7 days).	
Cyprodinil	Μυκητοκτόνο / anilinopyrimidine	100ppm 250ppm	60% 25%, αποχρωματισμός των αποικιών (κιτρινωπό χρώμα)	
Fenhexamid	Μυκητοκτόνο / hydroxyanilide	100ppm 250ppm	40% 35%	
Fludioxonil	Μυκητοκτόνο / phenylpyrrole	100 ppm 250ppm	40% 19%	

Rhodotorula rubra

Δραστική ουσία	Κατηγορία / Ομάδα	Φόρτιση	% επιβίωση του μάρτυρα	
			Ξηρό βάρος	Αριθμός αποικιών
Lufenuron	Εντομοκτόνο / Βενζοϋλουρία	200ppm	87% (4 days)	98% (4 days)
Triflumuron	Εντομοκτόνο / Βενζοϋλουρία	200ppm	73% (4 days)	87% (4 days)
Teflubenzuron	Εντομοκτόνο / Βενζοϋλουρία	200ppm	93% (4 days)	96% (4 days)
Flufenoxuron	Εντομοκτόνο / Βενζοϋλουρία	200ppm	80% (4 days)	84% (4 days)
Diflubenzuron	Εντομοκτόνο / Βενζοϋλουρία	200ppm	87% (4 days)	94% (4 days)
Diazinon	Εντομοκτόνο / Οργανοφωσφορικό	100ppm	59% (4 days)	47% (4 days)
Chlorpyrifos ethyl	Εντομοκτόνο / Οργανοφωσφορικό	100ppm	51.5% (4 days)	33% (4 days)
Chlorpyrifos methyl	Εντομοκτόνο / Οργανοφωσφορικό	200ppm	78% (4 days)	76% (4 days) <i>όμως</i> 95% (10 days)
Iprovalicarb	Μυκητοκτόνο / amino acid amide carbamate	10-500ppm	Σαφής παρεμπόδιση σε μέγεθος και αριθμό αποικιών σε c>100ppm (4 days). Δεν υπάρχει παρεμπόδιση στα 200ppm (7 days).	
Cyprodinil	Μυκητοκτόνο / anilinopyrimidine	100ppm 250ppm	65% 22%, αποχρωματισμός των αποικιών (κιτρινωπό χρώμα)	
Fenhexamid	Μυκητοκτόνο / hydroxylanilide	100ppm 250ppm	43% 40%	
Fludioxonil	Μυκητοκτόνο / phenylpyrrole	100 ppm 250ppm	40% 23%	

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	13
ABSTRACT	14
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1 ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ	16
1.2 ΕΠΙΦΥΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	19
1.2.1 Μικροοργανισμοί στη φυλλόσφαιρα και τους καρπούς	19
1.2.2 Μηχανισμός δράσης ζυμών	20
1.2.3 Οι ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	21
1.2.4 Ικανότητα των ζυμών του γένους <i>Rhodotorula</i> στην αποδόμηση οργανικών ενώσεων	23
1.3 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ- ENTOMOKTONA	25
1.3.1 Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα	25
1.3.1.1 Βιοχημικός μηχανισμός δράσης των οργανοφωσφορικών	26
1.3.1.2 Τύχη των οργανοφωσφορικών στο περιβάλλον	27
1.3.1.2.1 Τύχη των chlorpyrifos και diazinon στον αέρα	27
1.3.1.2.2 Τύχη των chlorpyrifos και diazinon στο νερό	27
1.3.1.2.3 Τύχη των chlorpyrifos και diazinon στο έδαφος	28
1.3.1.2.4 Μεταβολισμός των chlorpyrifos και diazinon στα φυτά	31
1.3.1.2.5 Μεταβολισμός των chlorpyrifos και diazinon στα ζώα	31
1.3.1.3 Τοξικολογικό προφίλ των chlorpyrifos και diazinon – Επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό	33
1.3.2 Ρυθμιστές Ανάπτυξης	35
1.3.2.1 Τύχη των βενζοϋλουριών στο περιβάλλον	36
1.3.2.1.1 Τύχη των lufenuron και teflubenzuron στον αέρα	36
1.3.2.1.2 Τύχη των lufenuron και teflubenzuron στο νερό	36
1.3.2.1.3 Τύχη των lufenuron και teflubenzuron στο έδαφος	37
1.3.2.1.4 Μεταβολισμός των lufenuron και teflubenzuron στα φυτά	38
1.3.2.1.5 Μεταβολισμός των lufenuron και teflubenzuron στα ζώα	39
1.3.2.2 Τοξικολογικό προφίλ των lufenuron και teflubenzuron – Επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό	39

1.4 ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ENTOMOKTONΩΝ CHLORPYRIFOS, DIAZINON, LUFENURON ΚΑΙ TEFLUBENZURON	40
1.4.1 Ικανότητα μικροοργανισμών στην αποδόμηση του chlorpyrifos	40
1.4.2 Ικανότητα μικροοργανισμών στην αποδόμηση του diazinon	43
1.4.3 Ικανότητα μικροοργανισμών στην αποδόμηση του lufenuron	45
1.4.4 Ικανότητα μικροοργανισμών στην αποδόμηση του teflubenzuron	45
1.5 ENZYMA- ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΕΣ	46
1.5.1 Ένζυμα	46
1.5.2 Κινητικές ιδιότητες ενζύμων	48
1.5.3 Παρεμπόδιση της δράσης των ενζύμων από ειδικά μόρια	50
1.5.4 Ένζυμα αποδόμησης των ξενοβιοτικών ουσιών	53
1.5.4.1 Μεταφοράσες της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferases- GSTs)	53
1.5.4.2 Μεταλλο-εξαρτώμενες μονοξυγονάσες- Κυτόχρωμα P ₄₅₀	54
1.5.4.3 Υδρολάσες- Εστεράσες	55
1.5.5 Συνεργιστές εντομοκτόνων	56
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	57
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	59
2.1 Θρεπτικά υλικά – Αντιδραστήρια	60
2.1.1 Θρεπτικά Υλικά	60
2.1.2 Αντιδραστήρια- Αναλυτικά πρότυπα- Διαλύματα	62
2.2 Βιολογικός παράγοντας	63
2.2.1 Καλλιέργεια και διατήρηση μικροοργανισμών	63
2.2.2 Μελέτη του ρυθμού αύξησης	63
2.3 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα	64
2.3.1 Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα	64
2.3.2 Βενζοϋλουρίες	66
2.4 Πειράματα ευαισθησίας των ζυμών <i>Rhodotorula glutinis</i>	

και <i>Rhodotorula rubra</i> στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα	67
2.5 Πειράματα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	68
2.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	69
2.5.2 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε χημικό επίπεδο	70
2.5.2.1 Μέθοδος εκχύλισης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από το θρεπτικό υλικό	70
2.5.2.2 Ανάπτυξη μεθόδου Χρωματογραφίας Λεπτής στοιβάδας- Thin Layer Chromatography	71
2.5.2.3 Ανάπτυξη μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Συζευγμένης Φασματομετρίας Μαζών (LC/MS/MS)	71
2.5.2.4 Επικύρωση μεθόδου εκχύλισης των chlorpyrifos, diazinon, lufenuron και teflubenzuron από το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των ζυμών	73
2.6 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε βιοχημικό επίπεδο	74
2.6.1 Προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης	74
2.6.1.1 Μέτρηση ενεργότητας του ενζυμικού συστήματος των μεταφορασών της γλουταθειόνης (GSTs)	75
2.6.1.2 Μέτρηση ενεργότητας του ενζυμικού συστήματος των εστερασών	75
2.6.1.3 Έλεγχος επίδρασης των εντομοκτόνων στα ενζυμικά συστήματα αποτοξικοποίησης	76
2.6.1.4 Κινητική διερεύνηση της παρεμπόδισης των ενζυμικών συστημάτων αποτοξικοποίησης	77
2.6.2 Χρήση συνεργιστών στα πειράματα βιοαποδόμησης	77
2.6.2.1 Πειράματα ευαισθησίας των ζυμών <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> στους συνεργιστικούς παράγοντες triphenyl phosphate, piperonyl butoxide και diethyl maleate	78
2.6.2.2 Πειράματα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> με προσθήκη συνεργιστικού παράγοντα	78
2.7 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε καρπούς τομάτας	79
2.7.1 Μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε καρπούς τομάτας	80
2.7.1.1 Μεθοδολογία εκχύλισης chlorpyrifos και diazinon από δείγματα καρπών τομάτας	80

2.7.1.2 Μεθοδολογία εκχύλισης lufenuron και teflubenzuron από δείγματα καρπών τομάτας	80
2.7.1.3 Χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων καρπών τομάτας	81
2.7.1.4 Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε καρπούς τομάτας	81
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	82
3.1 Μελέτη του ρυθμού αύξησης των ζυμών <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	83
3.2 Διερεύνηση της ικανότητας των ζυμών <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> στην αποδόμηση του chlorpyrifos	86
3.2.1 Ευαισθησία των ζυμών <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> στο chlorpyrifos	86
3.2.2 Αποτελέσματα διερεύνησης της βιοαποδόμησης του chlorpyrifos από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> σε χημικό επίπεδο	87
3.2.2.1 Μέθοδος ανίχνευσης του chlorpyrifos και του μεταβολίτη 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας- Thin Layer Chromatography (TLC)	88
3.2.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού του chlorpyrifos και του μεταβολίτη 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) με υγρή χρωματογραφία συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (LC/MS/MS)	89
3.2.2.3 Έλεγχος καταλληλότητας της μεθόδου	91
3.2.2.4 Βιοαποδόμηση του chlorpyrifos από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> σε συνάρτηση του χρόνου επώασης των καλλιιεργειών και του μεγέθους του μολύσματος	92
3.2.2.5 Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του chlorpyrifos στο ρυθμό αποδόμησης του από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	101
3.2.2.6 Έλεγχος της ικανότητας των ζυμών <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> να αποδομούν το μεταβολίτη 3,5,6-trichloro-2-pyridinol	105
3.2.2.7 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη βιοαποδόμηση του chlorpyrifos από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	105
3.2.3 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε βιοχημικό επίπεδο	107
3.2.3.1 Επίδραση του chlorpyrifos στην ενεργότητα των ενζυμικών συστημάτων βιοαποδόμησης	107
3.2.3.2 Βιοχημική διερεύνηση του υπεύθυνου ενζυμικού συστήματος με τη χρήση συνεργιστών	110

3.2.3.2.1 Πειράματα ευαισθησίας των ζυμών <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> στους συνεργιστικούς παράγοντες triphenyl phosphate, piperonyl butoxide και diethyl maleate	110
3.2.3.2.2 Πειράματα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> με προσθήκη συνεργιστικού παράγοντα	111
3.2.3.3 Προτεινόμενο μονοπάτι βιοαποδόμησης του chlorpyrifos από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	112
3.2.4 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε καρπούς τομάτας	113
3.2.4.1 Αποτελέσματα επικύρωσης αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων του chlorpyrifos σε καρπούς τομάτας	113
3.2.4.2 Υπολείμματα chlorpyrifos σε καρπούς τομάτας έπειτα από συνδυασμένη εφαρμογή με chlorpyrifos και κύτταρα ζυμών	113
3.3 Διερεύνηση της ικανότητας των ζυμών <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> στην αποδόμηση του diazinon	115
3.3.1 Ευαισθησία των ζυμών <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> στο diazinon	115
3.3.2 Αποτελέσματα διερεύνησης της βιοαποδόμησης του diazinon από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> σε χημικό επίπεδο	116
3.3.2.1 Μέθοδος ανίχνευσης του δρώντος συστατικού diazinon και του μεταβολίτη 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP) με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας- Thin Layer Chromatography (TLC)	117
3.3.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού του δρώντος συστατικού diazinon και του μεταβολίτη 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP) με υγρή χρωματογραφία συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (LC/MS/MS)	118
3.3.2.3 Έλεγχος καταλληλότητας της μεθόδου	120
3.3.2.4 Βιοαποδόμηση του diazinon από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> σε συνάρτηση του χρόνου επώασης των καλλιεργειών και του μεγέθους του μολύσματος	120
3.3.2.5 Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του diazinon στο ρυθμό αποδόμησης του από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	129
3.3.2.6 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη βιοαποδόμηση του diazinon	

από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	133
3.3.3 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε βιοχημικό επίπεδο	134
3.3.3.1 Επίδραση του chlorpyrifos στην ενεργότητα των ενζυμικών συστημάτων βιοαποδόμησης	134
3.3.3.2 Βιοχημική διερεύνηση του υπεύθυνου ενζυμικού συστήματος με τη χρήση συνεργιστών	137
3.3.3.2.1 Πειράματα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> με προσθήκη συνεργιστικού παράγοντα	138
3.3.3.3 Προτεινόμενο μονοπάτι βιοαποδόμησης του diazinon από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	139
3.3.4 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε καρπούς τομάτας	140
3.3.4.1 Αποτελέσματα επικύρωσης αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων του diazinon σε καρπούς τομάτας	140
3.3.4.2 Υπολείμματα diazinon σε καρπούς τομάτας έπειτα από συνδυασμένη εφαρμογή με diazinon και κύτταρα ζυμών	140
3.4 Διερεύνηση της ικανότητας των ζυμών <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> στην αποδόμηση των βενζοϋλουριών lufenuron και teflubenzuron	142
3.4.1 Ευαισθησία των ζυμών <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> στα lufenuron και teflubenzuron	142
3.4.2 Αποτελέσματα διερεύνησης της βιοαποδόμησης των lufenuron και teflubenzuron από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> σε χημικό επίπεδο	145
3.4.2.1 Μέθοδος ανίχνευσης των δρώντων συστατικών lufenuron και teflubenzuron με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας- Thin Layer Chromatography (TLC)	145
3.4.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού των δρώντων συστατικών lufenuron και teflubenzuron με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή σειράς διοδίων σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών με αρνητικό χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης HPLC/APCI-MS	146
3.4.2.3 Μέθοδος προσδιορισμού των δρώντων συστατικών lufenuron και teflubenzuron και των μεταβολιτών 2,6-difluorobenzoic acid και 2,6- difluorobenzamide με υγρή χρωματογραφία συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (LC/MS/MS)	149
3.4.2.4 Έλεγχος καταλληλότητας της μεθόδου	152
3.4.2.5 Βιοαποδόμηση του lufenuron από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> σε συνάρτηση του χρόνου επώασης των καλλιεργειών και	

του μεγέθους του μολύσματος	153
3.4.2.6 Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του lufenuron στο ρυθμό αποδόμησής του από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	162
3.4.2.7 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη βιοαποδόμηση του lufenuron από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	165
3.4.2.8 Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του lufenuron στο ρυθμό αποδόμησής του από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	166
3.4.2.9 Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του teflubenzuron στο ρυθμό αποδόμησής του από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	174
3.4.2.10 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη βιοαποδόμηση του teflubenzuron από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	178
3.4.3 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε βιοχημικό επίπεδο	178
3.4.3.1 Επίδραση των lufenuron και teflubenzuron στην ενεργότητα των ενζυμικών συστημάτων βιοαποδόμησης	178
3.4.3.2 Πειράματα βιοαποδόμησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i> με προσθήκη συνεργιστή	180
3.4.3.3 Προτεινόμενο μονοπάτι βιοαποδόμησης του lufenuron από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	181
3.4.3.4 Προτεινόμενο μονοπάτι βιοαποδόμησης του teflubenzuron από τις ζύμες <i>Rhodotorula glutinis</i> και <i>Rhodotorula rubra</i>	182
3.4.4 Διερεύνηση του φαινομένου της βιοαποδόμησης σε καρπούς τομάτας	183
3.4.4.1 Αποτελέσματα επικύρωσης αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων των lufenuron και teflubenzuron σε καρπούς τομάτας	183
3.4.4.2 Υπολείμματα lufenuron ή teflubenzuron σε καρπούς τομάτας έπειτα από συνδυασμένη εφαρμογή με lufenuron ή teflubenzuron και κύτταρα ζυμών	184
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	187
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	200
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	221