

Περίληψη

Τα συνθετικά καρβαμιδικά αποτελούν μια σημαντική ομάδα γεωργικών φαρμάκων με το oxamyl να είναι ο κύριος εκπρόσωπος τους σήμερα στην αγορά εντομοκτόνων/νηματοδοκτόνων. Η μικροβιακή αποδόμηση αποτελεί μία από τις κύριες διεργασίες που ελέγχει την περιβαλλοντική τύχη του oxamyl. Παραδόξως, η μικροβιακή αποδόμηση, η οποία αρχικά θεωρήθηκε ως μια επιθυμητή διεργασία για τη μείωση των περιβαλλοντικών κινδύνων, έχει μετατραπεί σε δίκικο μαχαίρι με την ανάπτυξη του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης, η οποία υπό ευνοϊκές συνθήκες μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της αποτελεσματικότητας των γεωργικών φαρμάκων. Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία της βιοαποδόμησης στην περιβαλλοντική τύχη και στην αποτελεσματικότητα των καρβαμιδικών εντομοκτόνων που εφαρμόζονται στο έδαφος στοχεύσαμε (1) στην απομόνωση και ταυτοποίηση βακτηρίων που αποδομούν το καρβαμιδικό oxamyl και στον χαρακτηρισμό των γονιδίων που εμπλέκονται στη αποδόμηση του, (2) στην διερεύνηση της οικολογίας, της κατανομής και της λειτουργίας των γονιδίων που κωδικοποιούν υδρολάσες των καρβαμιδικών σε γεωργικά εδάφη και (3) στη διερεύνηση της προέλευσης και των μηχανισμών εξέλιξης των συγκεκριμένων γονιδίων.

Ως πηγή για την απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το oxamyl χρησιμοποιήσαμε έδαφος από μια εμπορική καλλιέργεια μπανάνας που βρίσκεται στην περιοχή της Σητείας, βορειοανατολικά της Κρήτης, στην Ελλάδα με ιστορικό προηγούμενων εφαρμογών oxamyl. Παρατηρήθηκε ταχύτατη μικροβιακή υδρόλυση του oxamyl σε oxamyl oxime στο υπό μελέτη έδαφος η οποία είναι σε συμφωνία με την μειωμένη αποτελεσματικότητα του oxamyl στον συγκεκριμένο αγρό. Επακόλουθες καλλιέργειες εμπλουτισμού εμβολιασμένες με το υπό μελέτη έδαφος οδήγησαν στην απομόνωση τεσσάρων βακτηριακών στελεχών που αποδομούν το oxamyl τα οποία ταυτοποιήθηκαν, με βάση την ανάλυση αλληλουχίας πολλαπλών γενετικών τόπων (MLSA), ως *Pseudomonas*. Τα απομονωθέντα βακτήρια ήταν ικανά να μεταβολίζουν το oxamyl σε oxamyl oxime το οποίο δεν μετασχηματίστηκε περαιτέρω από τα στελέχη μας σε αντίθεση με την σταδιακή του αποδόμηση του στο έδαφος. Η αποστείρωση του εδάφους είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη ανασχεση της αποδόμησης του oxamyl oxime υποδηλώνοντας ότι ο μετασχηματισμός του ήταν βιολογικά εξαρτώμενος. Ωστόσο, οι επαναλαμβανόμενες προσπάθειες μας να απομονώσουμε βακτήρια που διασπών το

oxamyl oxime ακολουθώντας την ίδια μέθοδο εμπλουτισμένων καλλιεργειών απέτυχαν, υποδηλώνοντας ότι ο μετασχηματισμός του στο έδαφος είναι πιθανώς μια συµμεταβολική διεργασία που εκτελείται από µη εξειδικευµένα βακτήρια ή µύκητες. Όλα τα αποµονωθέντα βακτηριακά στελέχη έφεραν το γονίδιο *cehA* που κωδικοποιεί µια καρβαµιδική υδρολάση και το οποίο δείχθηκε, µέσω µεταγραφικής ανάλυσης, να είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση του oxamyl. Τα αποµονωθέντα στελέχη µπορούσαν να χρησιµοποιούν την οµάδα του µεθυλοκαρβαµικού οξέος (που απελευθερώνεται κατά την διάρκεια της υδρόλυσης του oxamyl) ως πηγή C και N, σε συµφωνία µε τα υψηλά επίπεδα ανοργανοποίησης του σηµασµένου oxamyl µε ¹⁴C στο καρβαµικό τµήµα από όλα τα στελέχη, και την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε µεθυλαµίνη, η οποία ελευθερώνεται από την διάσπαση της ασταθούς οµάδας του µεθυλοκαρβαµικού οξέος.

Επεκτείναµε τις έρευνές µας από την *in vitro* βακτηριακή υδρόλυση του oxamyl στο ρόλο της µικροβιακής κοινότητας του εδάφους στην *in situ* βιοδιάσπαση των καρβαµιδικών στο έδαφος. Μελετήσαµε την διάσπαση του oxamyl και καθορίσαµε την αφθονία των τριών πιο µελετηµένων γονιδίων που κωδικοποιούν υδρολάσες καρβαµιδικών *cehA*, *mcd* και *cahA* σε 16 εδάφη από µια περιοχή µονοκαλλιέργειας πατάτας στην Ελλάδα, όπου το oxamyl χρησιµοποιείται συχνά. Το oxamyl έδειξε χαµηλή υπολειµµατικότητα (DT₅₀ = 2.4-26.7 ηµέρες) και µέσω qPCR ανιχνεύσαµε τα γονίδια *cehA* και *mcd* σε 10 και 3 από τα εδάφη που µελετήθηκαν, αντίστοιχα. Η αφθονία του *cehA* γονιδίου εµφάνισε σηµαντική θετική συσχέτιση µε το pH, ενώ και η αφθονία του *cehA* και το pH εµφάνισαν σηµαντική αρνητική συσχέτιση µε το DT₅₀ του oxamyl. Λαµβάνοντας υπόψη την ανίχνευση του *mcd* στα µελετούµενα εδάφη, παρά την απουσία του carbofuran, του κυριότερου υποστρώµατός του, του οποίου η χρήση έχει απαγορευθεί και δεν χρησιµοποιήθηκε στην υπό µελέτη περιοχή τουλάχιστον τα τελευταία 10 έτη, εξετάσαµε την υπόθεση ότι άλλα καρβαµιδικά που χρησιµοποιήθηκαν στη περιοχή θα µπορούσαν να χρησιµεύσουν ως υποστρώµατα για το *mcd*. Κανένα από τα εναλλακτικά καρβαµιδικά που δοκιµάστηκαν δεν οδήγησε σε αύξηση της αφθονίας των γονιδίων *cehA* και *mcd* εκτός από (i) το oxamyl το οποίο προκάλεσε αύξηση της αφθονίας και της έκφρασης µόνο του *cehA* γονιδίου και (ii) το carbofuran που οδήγησε σε αύξηση της αφθονίας και της έκφρασης και των δύο γονιδίων υποδηλώνοντας έναν ενδιαφέρον καταβολικό λειτουργικό πλεονασµό ο οποίος αναφέρεται πρώτη φορά για καρβαµιδικά εντοµοκτόνα εδάφους. Το *cehA*

γονίδιο ανιχνεύθηκε επίσης σε μη γεωργικά εδάφη (που δεν είχαν εκτεθεί ποτέ σε συνθετικά καρβαμίδικά) μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές oxamyl και carbofuran και μόνο σε εδάφη με $\text{pH} \geq 7.2$, όπου παρατηρήθηκε η πιο ταχεία αποδόμηση του oxamyl. Η ύπαρξη του γονιδίου *cehA* σε γεωργικά που έχουν εκτεθεί σε συνθετικά καρβαμίδικά εντομοκτόνα και σε μη γεωργικά εδάφη που δεν έχουν εκτεθεί σε συνθετικά καρβαμίδικά υποδεικνύει την ευρεία κατανομή του συγκεκριμένου γονιδίου που θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα ενός παράλληλου εξελικτικού μηχανισμού από έναν κοινό πρόγονο, πιθανότατα εμπλεκόμενου στην αποτοξικοποίηση φυσικών καρβαμίδικών ενώσεων που παράγονται στο έδαφος από μικροοργανισμούς και φυτά.

Συνολικά, μελετήσαμε την αποδόμηση του oxamyl από βακτήρια που έχουν την ικανότητα να διασπούν το oxamyl και την μικροβιακή αποδόμηση του σε εδάφη. Αναφέραμε την απομόνωση και την ταυτοποίηση τεσσάρων στελεχών *Pseudomonas* με την ικανότητα να αποδομούν το oxamyl και προσδιορίσαμε το μονοπάτι του μικροβιακού μετασχηματισμού του oxamyl. Όλα τα στελέχη έφεραν το γονίδιο *cehA* το οποίο δείχθηκε να είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση του oxamyl. Περαιτέρω μελέτες σε δείγματα εδάφους επιβεβαίωσαν το ρόλο του γονιδίου *cehA* στη διάσπαση του oxamyl, ενώ και τα δύο γονίδια *cehA* και *mcd* εμπλέκονται στην αποδόμηση του carbofuran. Η ανίχνευση του γονιδίου *cehA* σε γεωργικά και μη γεωργικά εδάφη, μετά από εφαρμογή oxamyl υποδηλώνει την ευρεία εμφάνισή του και τονίζει τον σημαντικό ρόλο του pH στην κατανομή του *cehA* στα εδάφη. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αναμένεται να έχουν σημαντικές συνέπειες σχετικά με την διατήρηση γονιδίων που κωδικοποιούν υδρολάσες καρβαμίδικών σε εδάφη, έχουν πρακτικές εφαρμογές σχετικά με την γεωργική χρήση των καρβαμίδικών και παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη του γονιδίου *cehA*.