



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας» «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ –
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Απομόνωση βακτηρίων που υδρολύουν το καρβαμιδικό
εντομοκτόνο οxaμγl και διερεύνηση του μηχανισμού
αποδόμησης του κύριου μεταβολικού προϊόντος οxaμγl
oxime»**

ΚΟΛΟΒΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

**«Απομόνωση βακτηρίων που υδρολύουν το καρβαμδικό εντομοκτόνο οχαμγΙ
και διερεύνηση του μηχανισμού αποδόμησης του κύριου μεταβολικού προϊόντος
οχαμγΙ oxime»**

Υπεύθυνος Καθηγητής

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

Τριμελής Επιτροπή:

- Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Μόσιαλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κύριο Καρπούζα Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα θέμα ιδιαίτερα ενδιαφέρον και για την άψογη συνεργασία και κατανόηση εκ μέρους του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την κ. Παπαδοπούλου Καλιόπη και τον κ. Μόσιαλο Δημήτριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την υποψήφια διδακτορικό κ. Ρουσίδου Κωνσταντίνα για την εξαιρετική συνεργασία και την σημαντική καθοδήγησή της στην εκμάθηση όλων των καινούργιων τεχνικών που έπρεπε να εφαρμόσω στο εργαστήριο ώστε να πραγματοποιηθεί το πειραματικό μέρος της εργασίας. Ακόμη, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία καθόλη τη διάρκεια της παραμονής μου σ' αυτό.

Ευχαριστώ θερμά την φίλη μου Νικολέτα Χαραλάμπους που με στήριξε και με ενθάρρυνε ώστε να μπορέσω να ολοκληρώσω το μεταπτυχιακό μου.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς τους γονείς μου για την πλήρη υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μικροβιακή αποδόμηση είναι η κύρια διεργασία απομάκρυνσης από το περιβάλλον των καρβαμιδικών νηματωδοκτόνων όπως είναι το οχαμγλ. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας απομονώθηκαν βακτήρια με την μέθοδο των εμπλουτισμένων καλλιεργειών που έχουν την ικανότητα να αποδομούν το καρβαμιδικό εντομοκτόνο οχαμγλ από έδαφος από περιοχή της Κρήτης με ιστορικό χρήσης του γεωργικού φαρμάκου. Η απομόνωση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MSM όπου το οχαμγλ (20 mg/L) αποτελεί τη μοναδική πηγή C και N. Μία αμιγής και μια αξενική βακτηριακή καλλιέργεια που απομονώθηκαν σε MSM + οχαμγλ είχαν την ικανότητα να διασπών ταχύτατα το νηματωδοκτόνο. Ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rRNA τους έδειξε ότι ανήκουν στο γένος *Aminobacter aminovorans* η αμιγής και στα *Mesorhizobium tamadayense*, *Pseudomonas stutzeri* η αξενική. Τα παραπάνω βακτήρια είχαν την ικανότητα να υδρολύουν το οχαμγλ προς οχαμγλ oxime χωρίς όμως να μπορούν να το μεταβολίσουν παραπέρα. Παράλληλες μελέτες στο έδαφος από το οποίο απομονώθηκαν τα παραπάνω βακτήρια έδειξαν ότι το οχαμγλ μεταβολίζεται ταχύτατα προς οχαμγλ oxime το οποίο διασπάται πλήρως και δεν εμμένει στο έδαφος. Με βάση το τελευταίο εύρημα έγινε προσπάθεια απομόνωσης βακτηρίων που να είναι ικανά να αποδομούν και το οχαμγλ oxime τόσο σε εκλεκτικά όσο και σε μη εκλεκτικά θρεπτικά μέσα χωρίς αποτέλεσμα. Περαιτέρω μελέτες σε αποστειρωμένο έδαφος αλλά και σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα που εμπλουτίστηκαν με φρέσκο ή αποστειρωμένο έδαφος έδειξαν ότι η αποδόμηση του οχαμγλ oxime στο έδαφος πραγματοποιείται τόσο με βιοτικές όσο και με αβιοτικές διεργασίες.

ABSTRACT

Microbial degradation is the main process controlling the degradation of carbamate nematicides, such as oxamyl, in soil. In this study, bacteria were isolated via enrichment culture that were capable of degrading oxamyl from a soil originated from a field site in Crete having a history previous exposure to the given pesticide. The isolation of the bacteria occurred on selective medium wherein the MSM oxamyl (20 mg/L) is the only source of C and N. A pure and an axenic oxamyl degrading culture were isolated. 16S rRNA gene sequencing showed that the pure bacterial culture was an *Aminobacter aminovorans* strain while the axenic culture comprised of two bacterial strains identified as *Mesorhizobium tamadayense* and *Pseudomonas stutzeri*, although we are not currently sure which of the two bacteria or if both of these bacteria are able to degrade oxamyl in pure culture. The aforementioned bacteria were capable of hydrolyzing oxamyl to oxamyl oxime although no further degradation of this product was observed. Parallel studies in the soil from where the oxamyl-degrading bacteria had been isolated showed that oxamyl was rapidly transformed to oxamyl oxime which was further degraded and did not accumulate in the soil environment. Based on the last finding we tried to isolate bacteria that were able to degrade oxamyl oxime via enrichment culture using both selective and not selective media without success. Further studies in sterilized soil samples and in selective media which were augmented with fresh or sterilized soil showed that the degradation of oxamyl oxime in the studied soil proceeded via both abiotic and biotic processes.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων.....	9
1.2. Μικροβιακή αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων	10
1.3. Μικροοργανισμοί που συντελούν στη βιολογική αποδόμηση.....	11
1.4. Χημική δομή καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων	12
1.5. Μηχανισμός δράσης των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων	13
1.6. Απομόνωση μικροοργανισμών που αποδομούν νηματωδοκτόνα	13
1.7. Oxamyl	14
1.7.1. Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αερόβιες συνθήκες.....	15
1.7.2. Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αναερόβιες συνθήκες.....	16
1.7.3. Χρόνος ημιζωής (Half-life) DT50 του oxamyl στο έδαφος.....	17
1.8. Σκοπός του πειράματος	18

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα εδάφους	19
2.2. Πρότυπες ουσίες και γεωργικά φάρμακα	19
2.3. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης	19
2.3.1. Παρασκευή θρεπτικού μέσου εκχυλίσματος εδάφους (SEM).....	20
2.3.2. Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (MSM+N).....	20
2.3.3. Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων (MSM)	21
2.3.4. Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο και ηλεκτρικό οξύ (MSM+N+succinate)	21
2.4. Μέθοδος ανάλυσης γεωργικών φαρμάκων σε σύστημα HPLC	21
2.4.1. Σύστημα Χρωματογραφίας	21
2.4.2. Διαλύτες και γεωργικά φάρμακα.....	22
2.4.3. Χρωματογραφικές συνθήκες	22
2.4.4. Καμπύλες αναφοράς	22
2.5. Μελέτη της αποδόμησης των oxamyl και oxamyl oxime στο έδαφος	22
2.5.1. Εμπλουτισμένες καλλιέργειες για την απομόνωση αποδομητικών βακτηρίων	23
2.5.2. Αξιολόγηση του μηχανισμού αποδόμησης του oxamyl oxime	24
2.6. Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το νηματωδοκτόνο oxamyl	25
2.6.1. Επιλογή αποικιών και έλεγχος της αποδομητικής τους ικανότητας	25
2.6.2. Εξαγωγή DNA από τις αμιγείς αποικίες των βακτηρίων.....	26
2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	26
2.8. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	28
2.9. Εξαγωγή ζώνης της πηκτής για καθαρισμό PCR προϊόντων (gel extraction) ..	28
2.10. Ένθεση.....	29
2.11. Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα E. Coli	30
2.12. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 3.1. Αποδόμηση του οξαμγl και οξαμγl oxime στο έδαφος32
- 3.2. Αποδόμηση των οξαμγl και οξαμγl oxime στις καλλιέργειες εμπλουτισμού ..
.....33
- 3.3. Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το οξαμγl40
- 3.4. Ταυτοποίηση των βακτηρίων που αποδομούν το οξαμγl.....41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- 4.1. Απομόνωση βακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης του οξαμγl44
- 4.2. Μελλοντική ερευνητική κατεύθυνση.....46

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Περιβαλλοντική ρύπανση από τη χρήση γεωργικών φαρμάκων

Για πολλά χρόνια η πιθανότητα της ρύπανσης των υπόγειων νερών από συνθετικές οργανικές ουσίες αγνοούταν διαρκώς, καθώς κυριαρχούσε η πεποίθηση πως το εδαφικό προφίλ λειτουργεί πάντα ως ένα αποτελεσματικό φίλτρο απορρύπανσης. Η υπερβολική χρήση γεωργικών φαρμάκων και χημικών λιπασμάτων συνδυάστηκε με την υπερπαραγωγή των γεωργικών προϊόντων και τη διασφάλιση του αγροτικού εισοδήματος. Αντίθετα όμως με τις επικρατούσες απόψεις, η ποιότητα του εδάφους και των υδροφόρων συστημάτων έχει επηρεαστεί δυσμενώς από τις ανθρώπινες πρακτικές και ειδικότερα από την αλόγιστη χρήση οργανικών ξενοβιοτικών ουσιών. Η περιβαλλοντική ρύπανση έχει επιφέρει σοβαρές μεταβολές στη χλωρίδα και πανίδα, καθώς και διατάραξη της ομαλής λειτουργίας των βιογεωχημικών κύκλων (1).

Με βάση μελέτη του Ο.Η.Ε., εκτιμάται ότι από τη συνολική ποσότητα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται για αγροτικούς σκοπούς μόνο το 1% φτάνει τελικά, στο καλλιεργούμενο φυτό, ενώ το υπόλοιπο καταλήγει και ρυπαίνει το περιβάλλον, δηλαδή το έδαφος, τον αέρα και κυρίως το νερό (2).

Μέχρι τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, τα πρώτα χημικά εντομοκτόνα περιελάμβαναν ανόργανα στοιχεία, όπως το θείο, το αρσενικό και τον υδράργυρο. Ακολούθησαν αρκετά, φυτικής προέλευσης υλικά, όπως τα πυρεθρινοειδή (χρυσάνθεμα), η νικοτίνη και η ροτενόνη. Τα καρβαμιδικά όπως και τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα αποτελούν σημαντικές και παραδοσιακές ομάδες εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται εδώ και 50 περίπου χρόνια. Πρωτοχρησιμοποιήθηκαν ως αντικαταστάτες των λιπόφιλων και ιδιαίτερα υπολειμματικών οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων όπως το DDT (3). Το DDT παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1874 και μέχρι το 1939 δεν είχαν ανακαλυφθεί οι εντομοκτόνες ιδιότητές του. Στην συνέχεια αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι χαμηλού κόστους παραγωγής του και χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην πρόληψη της ελονοσίας και του κίτρινου πυρετού. Κατά τη διάρκεια των δεκαετιών 1940 και 1950 η παγκόσμια χρήση του DDT στον έλεγχο των εντόμων επέφερε σημαντικά οφέλη στην γεωργία. Όμως η εκτεταμένη χρήση του DDT είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα παράσιτα, αλλά και περιβαλλοντικές συνέπειες (4). Το πρώτο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο, ο πυροφωσφορικός τετρααιθυλαιθέρας, παρασκευάστηκε το 1937 (5). Αργότερα, πολλά άλλα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα παρασκευάστηκαν και έφτασαν στην αγορά, με τα chlorpyrifos και glyphosate (ζιζανιοκτόνο) να καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μερίδιο στην αγορά (6). Γενικά, τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα καταλαμβάνουν το 38% και τα καρβαμιδικά το 19% του συνόλου των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως (7). Μόνο στις Η.Π.Α., περισσότεροι από 40 χιλιάδες τόνοι οργανοφωσφορικών εφαρμόζονται ετησίως (8). Η εκτεταμένη χρήση τους, ειδικά σε αναπτυσσόμενες χώρες όπου οι παραγωγοί δε λαμβάνουν τα

κατάλληλα μέτρα προστασίας κατά την εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων, έχει οδηγήσει στην συχνότερη αναφορά δηλητηριάσεων ή θανάτων. Στατιστικά, καταγράφονται ετησίως περίπου 3×10^6 δηλητηριάσεις και 2×10^5 θάνατοι λόγω έκθεσης σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (9).

Εκτός των προβλημάτων υγείας που δημιουργεί η χρήση οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων, η συνεχιζόμενη χρήση τους έχει οδηγήσει και σε εκτεταμένη ρύπανση υπόγειων και επιφανειακών υδροφόρων συστημάτων αλλά και χερσαίων οικοσυστημάτων. Οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα όπως τα coumaphos, diazinon χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο εκτοπαρασίτων στην κτηνοτροφία οδηγώντας στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων ιδιαίτερα επιβαρυσμένων με οργανοφωσφορικά, τα οποία χρίζουν επεξεργασίας πριν την ελευθέρωσή τους στο περιβάλλον. Επιπρόσθετα, λόγω των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα μπορούν να εισχωρήσουν διαμέσω του δέρματος των ζώων και ενδεχομένως να καταλήξουν στο κρέας και στο γάλα (10). Υπολείμματα οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων έχουν ανιχνευτεί σε λαχανικά και φρούτα καθώς και σε μεταποιημένα προϊόντα (11).

Είναι λοιπόν εμφανές πως η συνεχής και σε μεγάλη έκταση χρήση των γεωργικών φαρμάκων έχει δημιουργήσει προβλήματα στο περιβάλλον και την υγεία. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητο να υπάρξει σχεδιασμός και ανάπτυξη μεθόδων οι οποίες προστατεύουν την υγεία των ανθρώπων αλλά και το περιβάλλον αλλά και μεθόδους που θα χρησιμοποιηθούν για την αποκατάσταση των επιπτώσεων της περιβαλλοντικής ρύπανσης από τα γεωργικά φάρμακα. Η χρήση βιολογικών μεθόδων για περιβαλλοντική εξυγίανση αποτελεί μια ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο. Έτσι λοιπόν η χρήση μικροοργανισμών ή των ενζύμων που οδηγούν στην αποτοξικοποίηση των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων θεωρείται μία θεμιτή και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος απορρύπανσης(1).

1.2. Μικροβιακή αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων

Μικροβιακή αποδόμηση ή βιοαποδόμηση (biodegradation ή biotransformation) ονομάζεται η διάσπαση οργανικών ουσιών σε μικρότερα μόρια μέσω της δράσης ενζύμων που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς(12). Στην διάρκεια της μικροβιακής αποδόμησης σύνθετα οργανικά μόρια μετατρέπονται σε πιο απλά ή τοξικές ουσίες σε λιγότερο ή μη-τοξικές, είτε υπό αερόβιες συνθήκες (παρουσίας οξυγόνου) είτε υπό αναερόβιες συνθήκες (απουσίας οξυγόνου). Οι πιο πολλοί μικροοργανισμοί, που κατοικούν στο έδαφος, όπου το οξυγόνο είναι άφθονο αποδομούν τα γεωργικά φάρμακα μέσω του αερόβιου μεταβολισμού τους. Όταν ένα γεωργικό φάρμακο υφίσταται πλήρη αερόβιο μεταβολισμό, ανοργανοποιείται και μετατρέπεται πλήρως σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Υπό συνθήκες αναερόβιου μεταβολισμού, η αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς μπορεί να παράγει πρόσθετα προϊόντα όπως μεθάνιο. Πολλές ανθρωπογενείς οργανικές ουσίες που αναπτύχθηκαν τον 20ο αιώνα, όπως τα παρασιτοκτόνα και τα πλαστικά, έχουν διεγείρει τους αποδομητικούς μηχανισμούς των μικροοργανισμών.

Η μικροβιακή αποδόμηση χαρακτηρίζεται ως μια πολύπλοκη αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων, η οποία συχνά διαφοροποιείται ανάλογα με το

μικροοργανισμό-αποδομητή. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τις οργανικές ενώσεις ως υποστρώματα ανάπτυξης τους, ενώ υπάρχουν και μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αποδομούν ενώσεις διαφορετικών κατηγοριών. Έτσι, η μικροβιακή αποδόμηση θεωρείται η σημαντικότερη διαδικασία για τις περισσότερες σύγχρονες ομάδες γεωργικών φαρμάκων και ιδιαίτερα για τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα (13) και εμποδίζει τη συσσώρευση τους στο περιβάλλον.

Κάτω από ειδικές συνθήκες όμως, η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή των ίδιων γεωργικών φαρμάκων στο ίδιο έδαφος μπορεί να οδηγήσει σε αυξανόμενους ρυθμούς αποδόμησης. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση. Θεωρείται γενικά ότι προκύπτει από τη σταδιακή μικροβιακή προσαρμογή στο εφαρμοζόμενο γεωργικό φάρμακο και στην ακραία του μορφή οδηγεί συνήθως σε σημαντική μείωση στην αποτελεσματικότητα του γεωργικού φαρμάκου (14). Το φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης έχει παρατηρηθεί για αρκετά οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα συμπεριλαμβανομένων των νηματωδοκτόνων fenamiphos και oxamyl (15).

Η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος, χαρακτηρίζεται συνήθως από μία φάση αρχικής βραδείας αποδόμησης, η οποία παρατηρείται αμέσως μετά την εφαρμογή του στο έδαφος και είναι γνωστή ως φάση υστέρησης (lag phase) και ακολουθείται από τη φάση ταχείας αποδόμησης (16).

Γενικά, κάθε περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει τη μικροβιακή ανάπτυξη όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία, το pH, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών, οι αποδέκτες ηλεκτρονίων, η παρουσία ανταγωνιστών μπορεί να επηρεάσει τη διάρκεια της περιόδου προσαρμογής των μικροοργανισμών. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι τα βακτήρια αποτελούν τους κυρίαρχους παράγοντες της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης σε αντίθεση με τους μύκητες που έχουν περιορισμένο ρόλο στην εμφάνιση του φαινομένου (15, 17).

1.3. Μικροοργανισμοί που συντελούν στη βιολογική αποδόμηση

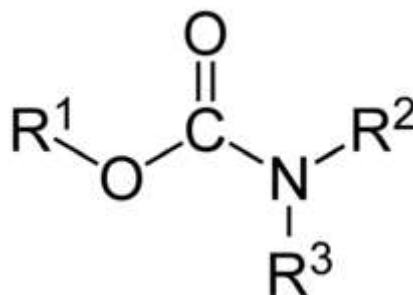
Μέχρι σήμερα πολλοί μικροοργανισμοί έχουν απομονωθεί οι οποίοι είναι ικανοί να διασπούν γεωργικά φάρμακα. Υπάρχουν μερικά παραδείγματα όπως οι μύκητες *Trametes hirsutus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete sorbida* και *Cyathus bulleri* που είναι ικανοί να αποδομούν το οργανοχλωριωμένο εντομοκτόνο lindane και άλλα γεωργικά φάρμακα (18, 19, 20), αλλά τα περισσότερα στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα βακτήρια του εδάφους είναι οι κύριοι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων (21). Αρκετά αμιγή βακτηριακά στελέχη με την ικανότητα να χρησιμοποιούν συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα ως μοναδική πηγή άνθρακα, αζώτου ή φωσφόρου έχουν απομονωθεί. Για παράδειγμα, ένα βακτηριακό στέλεχος του γένους *Enterobacter* που απομονώθηκε από έδαφος που εμφάνισε το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης, ήταν ικανό να αποδομεί ταχύτατα το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο chlorpyrifos και μάλιστα να χρησιμοποιεί τους μεταβολίτες που προκύπτουν ως πηγή C και P (22,23). Επίσης, απομονώθηκε βακτήριο του γένους *Pseudomonas* sp., το οποίο ήταν ικανό να υδρολύει το ενομοκτόνο parathion και να χρησιμοποιεί το προϊόν της υδρόλυσης ως μοναδική

πηγή C και N (24). Ακόμη, βακτήριο του γένους *Alcaligenes* sp., που απομονώθηκε από έδαφος ήταν ικανό να αποδομεί το ζιζανιοκτόνο glyphosate χρησιμοποιώντας το ως μοναδική πηγή P (25). Άλλο ένα βακτηριακό στέλεχος του γένους *Variovorax* sp. είχε την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το ζιζανιοκτόνο linuron και να χρησιμοποιεί το τελευταίο ως μοναδική πηγή C, N και ενέργειας (26). Επίσης απομονώθηκαν τρία βακτηριακά στελέχη του γένους *Pseudomonas* με την ικανότητα να αποδομούν το καρβαμιδικό εντομοκτόνο carbaryl και oxamyl. (27,28).

1.4. Χημική δομή καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.

Τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα (carbamates) ανακαλύφθηκαν από τις αρχές της δεκαετίας του '50 σε μια προσπάθεια των φυτοφαρμακολόγων για ανακάλυψη ουσιών για την καταπολέμηση εχθρών που ήδη είχαν αρχίσει να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά. Πάντως σε πολλές από τις ιδιότητες τους, όπως ο τρόπος δράσης, το φάσμα τοξικότητας, η χαμηλή υπολειμματικότητα στο περιβάλλον, αλλά και η έλλειψη εκλεκτικότητας στα ωφέλιμα έντομα, είναι παρόμοια με τα οργανοφωσφορικά. Σήμερα αποτελούν μια πολύ σημαντική ομάδα ουσιών στην καταπολέμηση των εντόμων, μολονότι όχι τόσο μεγάλη όσο τα οργανοφωσφορικά. Παρόλα τα πλεονεκτήματα των καρβαμιδικών, όσο αφορά στη χαμηλότερη σταθερότητα και τη σχετικά μειωμένη τοξικότητα, η μαζική χρήση τους σε εκτεταμένες γεωργικές περιοχές κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων εποχών έχει αυξήσει σημαντικά τη ρύπανση των επιφανειακών νερών και αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα.

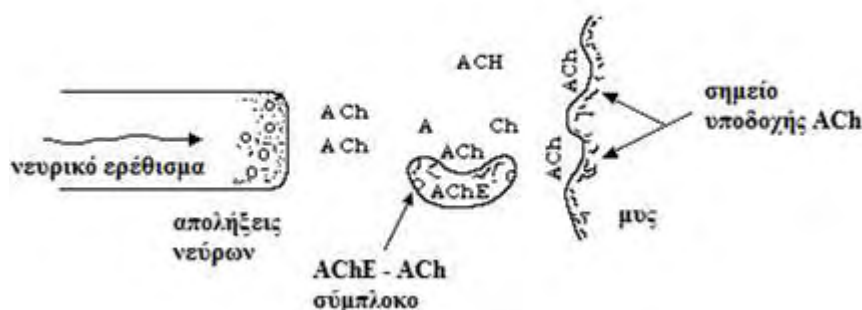
Τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα είναι παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος $\text{HO}(\text{O})\text{NH}_2$. Τα καρβαμικά εντομοκτόνα περιέχουν την γενική δομή του Σχήματος 1, με το R1 να αποτελεί μια βενζολική ή ετεροκυκλική ομάδα ή ένα παράγωγο οξίμης, το R2 να αποτελεί μια μεθυλομάδα και το R3 μια μεθυλομάδα ή υδρογόνο. Έτσι, τα καρβαμιδικά μπορούν να διακριθούν σε τρεις υποομάδες: τους αρωματικούς και τους ετεροκυκλικούς καρβαμιδικούς εστέρες και τα καρβαμιδικά παράγωγα οξιμών. Γενικά, η σχετική τοξικότητα των μονο-μεθυλο-καρβαμιδικών εστέρων είναι κατά πολύ μεγαλύτερη των αντίστοιχων δι-μεθυλο-καρβαμιδικών, ενώ η αποτελεσματικότητα της εντομοκτόνου-ακαρεοκτόνου δράσης μειώνεται με την αύξηση του μεγέθους των N,N-αλκυλο-υποκαταστατών της καρβαμιδικής ομάδας.



Σχήμα 1. Χημική δομή των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.

1.5. Μηχανισμός δράσης των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων

Τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα, όπως και τα οργανοφωσφορικά, αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση AChE στο νευρικό σύστημα, η οποία καταλύει την υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη σε χολίνη και οξικό οξύ, μειώνοντας έτσι τη συγκέντρωσή του και προκαλούν χολινεργική υπερδιέγερση. Παρόλα αυτά, τα καρβαμιδικά προκαλούν μερικώς αντιστρεπτή αναστολή του ενζύμου. Έτσι, η αναστολή της AChE από τα καρβαμιδικά διαρκεί μόνο λίγα λεπτά ή ώρες σε αντίθεση με αυτή των οργανοφωσφορικών που μπορεί να διαρκέσει 3-4 μήνες (29). Μια αναπαράσταση της δράσης της ακετυλοχολίνης (ACh) και της (AChE) δίνεται στο Σχήμα 2 (30).



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης των καρβαμιδικών εντομοκτόνων.

1.6. Απομόνωση μικροοργανισμών που αποδομούν νηματωδοκτόνα

Τα νηματωδοκτόνα, παραμένουν ένα πολύ σημαντικό μέσο για τον έλεγχο των νηματωδών στην καλλιέργεια της πατάτας. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη εναλλακτικών γεωργικών φαρμάκων εξίσου αποτελεσματικών αλλά χαμηλότερης τοξικότητας. Η αυξημένη εμπιστοσύνη των παραγωγών στη χρήση νηματωδοκτόνων καθώς και η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή τους έχουν οδηγήσει σε σημαντική μείωση της βιολογικής τους αποτελεσματικότητας. Τα περισσότερα νηματωδοκτόνα που εφαρμόζονται στην Ελλάδα είναι επιρρεπή στην επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση συμπεριλαμβανομένων των fenamiphos, oxamyl, ethoprophos, aldicarb και cadusafos (31).

Σημαντικός αριθμός μικροοργανισμών είτε σε αμιγείς είτε σε μικτές καλλιέργειες, έχουν απομονωθεί από εδάφη τα οποία παρουσιάζουν το φαινόμενο της επιταχυνόμενης αποδόμησης νηματωδοκτόνων. Οι Ou και Thomas (1994) απομόνωσαν την πρώτη αξενική καλλιέργεια που είχε την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο fenamiphos. Κανένα όμως από τα βακτήρια που αποτελούσαν την αξενική καλλιέργεια όταν απομονώθηκε σε αμιγή μορφή δεν κατάφερε να αποδομήσει αποτελεσματικά το fenamiphos (32). Σημαντικός αριθμός βακτηρίων ικανών να αποδομούν το καρβαμιδικό εντομοκτόνο-νηματωδοκτόνο carbofuran έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα. Παράδειγμα, αποτελεί το βακτηριακό στέλεχος *Arthrobacter* sp., το οποίο ήταν ικανό να αποδομεί πλήρως το carbofuran χρησιμοποιώντας το ως πηγή C και N μέσα σε 72-120 h. Το

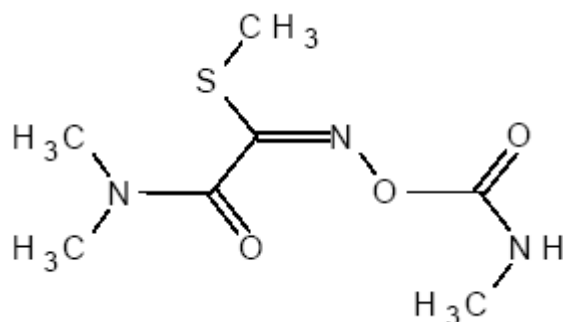
συγκεκριμένο βακτήριο ήταν ικανό να υδρολύει επίσης το εντομοκτόνο carbaryl (33). Ένα άλλο βακτηριακό στέλεχος του γένους *Achromobacter* sp., ήταν σε θέση να υδρολύει πλήρως το carbofuran σε διάστημα 42 h, χρησιμοποιώντας το ως μοναδική πηγή N. Το ίδιο βακτήριο μπορούσε να αποδομήσει ταχύτατα και το aldicarb (34). Άλλα βακτήρια που έχουν απομονωθεί από εδάφη που παρουσίαζαν επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση για το carbofuran βρέθηκε να ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Flavobacterium* (35) και *Sphingomonas* sp. (36). Βακτηριακά στελέχη των ειδών *Stenotrophomonas maltophilia* και *Methylosinus* sp. που απομονώθηκαν από έδαφος και ενεργοποιημένη βιομάζα αντίστοιχα ήταν ικανά για την ταχεία αποδόμηση του καρβαμιδικού νηματωδοκτόνου aldicarb (37,38). Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, βρέθηκε ότι δύο βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas putida* (epI και epII) ήταν ικανά να μεταβολίσουν υψηλές συγκεντρώσεις του οργανοφωσφορικού ethorprophos μέσα σε 48 ώρες (39). Τα βακτήρια αυτά, διατήρησαν την αποδομητική τους ικανότητα σε υγρές καλλιέργειες σε μεγάλο εύρος pH και θερμοκρασιών (14). Στη συνέχεια, απομονώθηκαν δύο αμιγείς βακτηριακές καλλιέργειες που ταυτοποιήθηκαν ως *Sphingomonas* και *Flavobacterium* με την ικανότητα να μεταβολίζουν ταχύτατα το οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο cadusafos (15). Τέλος, απομονώθηκε ένα νέο βακτηριακό στέλεχος του γένους *Stenotrophomonas* από δείγματα νερού στην Αίγυπτο, με την ικανότητα να αποδομεί το καρβαμιδικό νηματωδοκτόνο methomyl (40).

1.7. Oxamyl

Το oxamyl (N,N-dimethyl-2-methylcarbamoyloxyimino-2-(methylthio)-acetamide) είναι ένα ευρέως φάσματος καρβαμιδικό εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο και νηματωδοκτόνο που κυκλοφορεί με διάφορα εμπορικά ονόματα.

Η έκθεση στο oxamyl προκαλεί παρόμοιες επιδράσεις με τα άλλα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα αναστέλλοντας το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση αλλά με αντιστρεπτά αποτελέσματα μικρής διάρκειας. Εφαρμόζεται σε διάφορες καλλιέργειες όπως πατάτας και λαχανοκομικών ειδών στο θερμοκήπιο. Μετά τη σχετικά πρόσφατη απόσυρση των εναλλακτικών νηματωδοκτόνων aldicarb και cadusafos, καθώς και την περιορισμένη χρήση του fenamiphos, το oxamyl αποτελεί πλέον ένα από τα πιο δημοφιλή νηματωδοκτόνα μεταξύ των συνθετικών μη καπνιστικών νηματωδοκτόνων στην Ευρώπη.

Το oxamyl παρουσιάζει μέτρια πτητικότητα (31 mPa). Η διαλυτότητά του στο νερό είναι ιδιαίτερα υψηλή (280 g/L) και η οξεία τοξικότητα LD50 διαμέσου της στοματικής οδού σε αρουραίους είναι υψηλή (5,4 mg/kg). Το μοριακό του βάρος είναι 219,4 και η ADI (Acceptable Daily Intake) είναι 0,03 mg/kg, τιμή που το κατατάσσει στην κατηγορία I τοξικότητας κατά EPA (41). Το oxamyl έχει σχετικά μικρή υπολειμματικότητα στο έδαφος και ο χρόνος ημιζωής του κυμαίνεται από 4-20 ημέρες. Υδρολύεται ταχύτατα σε ουδέτερα και αλκαλικά εδάφη και με πιο αργό ρυθμό σε όξινα (42, 43). Δεν προσροφάται ιδιαίτερα στο έδαφος και είναι πιθανή η έκλυση του στα υπόγεια ύδατα. Το oxamyl στο έδαφος αποδομείται μέσω υδρόλυσης σε μη τοξικούς μεταβολίτες, όπως oxamyl oxime και oxamic acid. Ο χημικός του τύπος δίνεται στο Σχήμα 3.

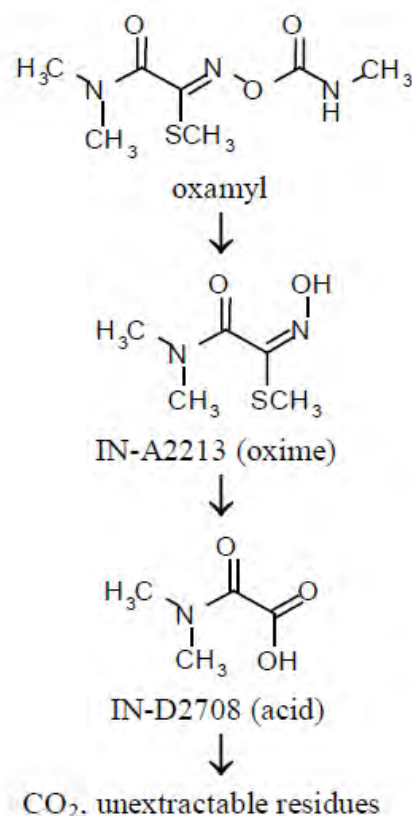


Σχήμα 3. Χημικός τύπος του oxamyl

1.7.1 Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αερόβιες συνθήκες

Η πορεία της αποδόμησης του oxamyl σε αερόβιες συνθήκες είναι ίδια για όλους τους τύπους εδαφών και όλα τα μέσα εκχύλισης (νερό, μεθανόλη / νερό, ακετονιτρίλιο / νερό). Σε αμμοαργιλοπηλώδες έδαφος (pH 7,7 , οργανική ουσία 1,5%) το oxamyl oxime ήταν το αρχικό προϊόν της αποδόμησης φτάνοντας στην μέγιστη τιμή του 24,3% της εφαρμοσθείσας ποσότητας oxamyl στην 10η ημέρα. Στη συνέχεια σχηματίστηκε το oxamic acid που έφτασε την μέγιστη τιμή του 20,3% την 21η ημέρα. Το τελικό προϊόν της αποδόμησης ήταν το CO₂ και έφτασε στο 45,3% την 51η ημέρα (44 (1991)). Σε όξινο πηλώδες έδαφος (pH 4,6 , οργανική ουσία 3,7%) τα κύρια προϊόντα μεταβολισμού το oxamyl ήταν CO₂ και oxamic acid (45 (1989)). Παρόμοια αποτελέσματα για την πορεία αποδόμησης του oxamyl καταγράφηκαν και σε άλλες μελέτες με διαφορετικούς τύπους εδαφών. Οι Mattson and Smyser (2000) μελέτησαν το μεταβολισμό του oxamyl σε τρία διαφορετικής σύστασης εδάφη: ένα αργιλωπηλώδες έδαφος με ουδέτερο pH (pH 7, οργανική ουσία 0,4%), ένα ελαφρώς αλκαλικό αργιλωπηλώδες έδαφος (pH 7,8 , οργανική ουσία 2,1%) και ένα όξινο αργιλωπηλώδες έδαφος (pH 4,8 , οργανική ουσία 4,4%). Το αρχικό προϊόν της αποδόμησης για όλα τα εδάφη ήταν το oxamyl oxime ενώ με την ολοκλήρωση του πειράματος καταγράφηκε σημαντική ανοργανοποίηση με παραγωγή CO₂ και στα τρία εδάφη (46).

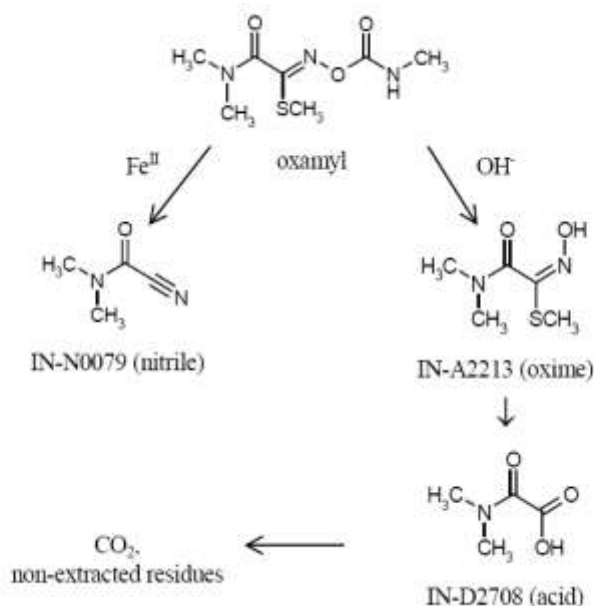
Γενικά το πρώτο βήμα της πορείας της αποδόμησης του oxamyl είναι η υδρόλυση για τον σχηματισμό oxamyl oxime, που ακολουθείται από το σχηματισμό oxamic acid. Η υδρόλυση μπορεί να οφείλεται και σε αβιοτικές διεργασίες ιδιαίτερα σε αλκαλικές συνθήκες (47 (1978), 48 (1988b)). Στη συνέχεια το oxamyl oxime ανοργανοποιείται σε διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο είναι το κύριο προϊόν της αποδόμησης. Σε αερόβιες συνθήκες η πορεία της αποδόμησης είναι ίδια και στο υπέδαφος και στο επιφανειακό έδαφος με το σχηματισμό του oxamyl oxime, να εξαρτάται από το pH. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ο μεταβολισμός του oxamyl σε αερόβιες συνθήκες



Σχήμα 4. Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αερόβιες συνθήκες

1.7.2 Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αναερόβιες συνθήκες

Σε αναερόβιες συνθήκες η αποδόμηση του oxamyl στα επιφανειακά εδάφη ακολουθεί την ίδια πορεία με αυτή σε αερόβιες συνθήκες. Αρχικά με υδρόλυση σχηματίζεται το oxamyl oxime που ακολουθείται από το σχηματισμό του oxamic acid, που με ανοργανοποίηση οδηγεί στο σχηματισμό του CO₂. Η αποδόμηση δεν επηρεάζεται από τις αναερόβιες συνθήκες, αλλά η ανοργανοποίηση γίνεται με πιο αργή ταχύτητα. Σε αναερόβιες συνθήκες στο υπέδαφος, όπου υπήρχαν ιόντα σιδήρου σε επαρκή επίπεδα, το oxamyl εύκολα μετατρέπεται στο νιτρίλιο DMCF (N,N-dimethyl-2-nitriloacetamide), με αναγωγή του σιδήρου. Ανάλογα με το pH και τα επίπεδα σιδήρου η αποδόμηση του oxamyl μπορεί να προχωρήσει παράλληλα με αναγωγή για την παραγωγή του νιτρίλιου και με υδρόλυση για την παραγωγή oxamyl oxime. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ο μεταβολισμός του oxamyl σε αναερόβιες συνθήκες



Σχήμα 5. Μεταβολισμός του oxamyl στο έδαφος σε αναερόβιες συνθήκες

1.7.3. Χρόνος ημιζωής (Half-life) DT50 του oxamyl στο έδαφος

Χρόνος ημιζωής είναι ο χρόνος (σε ημέρες, εβδομάδες ή έτη) που απαιτείται για να διασπασθεί το 50% της αρχικής συγκέντρωσης ενός γεωργικού φαρμάκου. Με βάση αυτόν το συντελεστή τα γεωργικά φάρμακα ταξινομούνται όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Ταξινόμηση της υπολειμματικότητας των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος

DT50 (ημέρες)	Ταξινόμηση
<20	Μη υπολειμματικά
20-60	Αρκετά υπολειμματικά
60-180	Υπολειμματικά
>180	Ιδιαίτερα Υπολειμματικά

Η υπολειμματικότητα και ο χρόνος ημιζωής ενός γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία, τη μηχανική σύσταση του εδάφους και το είδος των μικροοργανισμών που υπάρχουν και που μπορούν να διασπάσουν την συγκεκριμένη ουσία. Επειδή οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών μειώνονται σε μεγάλο βαθμό κάτω από τη περιοχή της ριζόσφαιρας των φυτών, τα γεωργικά φάρμακα που διηθούνται πέρα από αυτό το βάθος είναι λιγότερο πιθανό να αποδομηθούν ή αποδομούνται με βραδείς ρυθμούς (49).

Ο χρόνος ημιζωής του oxamyl ποικίλλει από μερικές μέρες έως αρκετές εβδομάδες και εξαρτάται από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στην μελέτη των Harvey και Han (1978) σε εργαστηριακές συνθήκες μελετήθηκε η

αποδόμηση του οξαμγλ σε ένα αμμοπηλώδες έδαφος (pH 6,8) και σε ένα αμμώδες έδαφος (pH 6,4). Ο χρόνος ημιζωής του οξαμγλ ήταν 11 μέρες στο αμμοπηλώδες έδαφος και 15 μέρες στο αμμώδες. Σε ένα άλλο πείραμα σε εργαστηριακές συνθήκες οι Smelt et al. (1979) μελέτησαν την επίδραση της εδαφικής υγρασίας στην αποδόμηση του οξαμγλ σε ένα αμμοπηλώδες έδαφος (pH 5.4, οργανική ουσία 4.5%), σε ένα αργιλοπηλώδες (pH 7.1, οργανική ουσία 4.5%), σε ένα αμμοπηλώδες (pH 7.4, οργανική ουσία 1.1%) και σε ένα αμμώδες με υψηλό ποσοστό οργανικής ουσίας (pH 5.2, οργανική ουσία 9.0%) (50). Στα εδάφη στα οποία η υγρασία ήταν πάνω από το σημείο μάρανσης η περίοδος ημιζωής του οξαμγλ συσχετιζόταν με το pH, με μεγαλύτερη τιμή να έχουμε στα δύο όξινα εδάφη (34 έως 68 ημέρες), παρά στα δύο αλκαλικά (12 έως 20 ημέρες). Σε επίπεδο αγρού ο χρόνος ημιζωής του οξαμγλ κυμάνθηκε από 7 έως 28 μέρες μετά την ενσωμάτωση κοκκώδους σκευάσματος οξαμγλ στο έδαφος σε εδάφη αμμώδη και αμμοπηλώδη, με εύρος pH από 5,9 έως 7 και οργανική ουσία από 2,3% έως 5,4% (51).

1.8. Σκοπός του πειράματος

Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχουν τα γεωργικά φάρμακα, η τύχη και η συμπεριφορά τους, όπου ρυπαίνουν το έδαφος είτε με την άμεση εφαρμογή τους σε αυτό είτε κατά την εφαρμογή τους όπου σημαντικό ποσοστό της αρχικής δόσης καταλήγει στο έδαφος. Ένα τέτοιο γεωργικό φάρμακο είναι και το νηματωδοκτόνο οξαμγλ που είναι και το αντικείμενο έρευνας της διατριβής αυτής.

Ο βασικός στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η απομόνωση μικροοργανισμών με την ικανότητα της ταχείας αποδόμησης του καρβαμιδικού εντομοκτόνου οξαμγλ και πιθανότατα του κυρίου μεταβολικού προϊόντος του, οξαμγλ oxime και η διερεύνηση του μηχανισμού αποδόμησης του τελευταίου. Προηγούμενες μελέτες στο συγκεκριμένο έδαφος στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διατριβής της Ε. Χανίκα είχαν οδηγήσει στην απομονωση βακτηρίων που είχαν την δυνατότητα να υδρολύουν ταχύτατα το οξαμγλ προς οξαμγλ oxime το οποίο όμως δεν είχαν την δυνατότητα να αποδομήσουν περαιτέρω. Έτσι διερευνήσαμε αρχικά την συμπεριφορά του οξαμγλ oxime στο συγκεκριμένο έδαφος ύστερα από την εφαρμογή οξαμγλ ώστε να διαπιστώσουμε εάν το συγκεκριμένο μεταβολικό προϊόν αποδομείται ή συσσωρεύεται στο έδαφος. Εφόσον αποδομείται στο συγκεκριμένο έδαφος και δεν συσσωρεύεται μελετήσαμε τον μηχανισμό αποδόμησης του συγκεκριμένου μεταβολίτη (μικροβιακός ή αβιοτικός) στο έδαφος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα εδάφους

Το δείγμα εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μικροοργανισμών συλλέχθηκε από θερμοκήπια μπανανοκαλλιέργειας στο νότιο τμήμα της Κρήτης που είχε δεχθεί επαναλαμβανόμενες μεταχειρίσεις με τα νηματωδοκτόνα fenamiphos και oxamyl. Πιο συγκεκριμένα, ο παραγωγός για τρία συνεχή έτη εφάρμοζε 2-4 L/στρέμμα Nemasur (Fenamiphos) την άνοιξη και 2-4 L/στρέμμα Vydate (Oxamyl) το φθινόπωρο. Τα επόμενα δύο χρόνια ακολούθησε μόνο εφαρμογή 4 L Vydate την άνοιξη και 4 L το φθινόπωρο. Τον τελευταίο χρόνο εφάρμοσε μόνο με 5 L Vydate την άνοιξη και 5 L το φθινόπωρο. Στο συγκεκριμένο έδαφος μπανανοκαλλιέργειας παρατηρήθηκε αυξημένη νηματωδολογική προσβολή παρά την εφαρμογή των νηματωδοκτόνων.

2.2. Πρότυπες ουσίες και γεωργικά φάρμακα

Για την προετοιμασία των θρεπτικών μέσων αλλά και για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των oxamyl και oxamyl oxime στα θρεπτικά μέσα, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ουσίες oxamyl (98%, Fluka, Switzerland) και oxamyl oxime (99.9%, DuPont, USA).

2.3. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Τέσσερα διαφορετικά υγρά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των βακτηρίων. Το πρώτο ήταν θρεπτικό μέσο από εκχύλισμα εδάφους (SEM Soil Extract Medium) και το οποίο αποτελεί φυσικό μη εκλεκτικό μέσο. Το δεύτερο ήταν θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (MSM+N Mineral Salts Medium supplemented with Nitrogen) το οποίο αποτελεί εκλεκτικό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, το τρίτο ήταν το MSM, θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων χωρίς άζωτο και τέλος το MSMN+Succinate. Για τη διαδικασία του μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο LB (Luria Bertani). Όλες οι προεργασίες έγιναν ασηπτικά σε θάλαμο νηματικής ροής και ακολούθησε αποστείρωση των διαλυμάτων στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min.

Η προετοιμασία θρεπτικών μέσων που να περιέχουν oxamyl oxime και oxamyl (10 mg/L) βασίστηκε στην παρασκευή υδατικών διαλυμάτων oxamyl oxime (200 mg/L) και oxamyl (500 mg/L) σε αποστειρωμένο νερό. Η περαιτέρω αποστείρωση των θερμικά ευαίσθητων υδατικών διαλυμάτων των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε με διήθηση από ειδικά φίλτρα (Acrodisk Syringe Filters, w/0.2µm HT Tuffryn Membrane).

2.3.1. Παρασκευή θρεπτικού μέσου εκχυλίσματος εδάφους (SEM)

Για την προετοιμασία 1 L υγρού θρεπτικού μέσου SEM, αναμίχθηκαν 500 g εδάφους με 1 L απιονισμένο νερό. Το μίγμα αναδεύτηκε καλά και στη συνέχεια αποστειρώθηκε στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στις 10000 rpm και στους 19°C για 8 min και το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης διηθήθηκε και επαναποστειρώθηκε στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min.

Για την προετοιμασία 250 mL θρεπτικού διαλύματος SEM + οξαμυλ oxime (20 mg/L), 25 mL από το αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα οξαμυλ oxime (200 mg/L) προστέθηκαν σε 225 mL SEM υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.3.2. Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (MSM+N)

Το θρεπτικό μέσο MSM+N περιείχε εκτός από C, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μακροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N). Αυτό έγινε ώστε το οξαμυλ ή το οξαμυλ oxime να αποτελούν τη μοναδική πηγή C για τους αναπτυσσόμενους μικροοργανισμούς. Το θρεπτικό αυτό διάλυμα παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα (Stock) ανοργάνων αλάτων, τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες και έδωσαν το τελικό MSM+N (Πίνακας 2.1).

Τα Stock 1 και 2 προετοιμάστηκαν με διάλυση των συστατικών τους σε 1 L απεσταγμένο νερό και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Το Stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση από ειδικά φίλτρα επειδή ο FeSO₄ είναι θερμοευαίσθητος. Για την προετοιμασία 1 L MSM+N, 100 mL από το stock 1 διαλύθηκαν σε 780 mL αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε εκ νέου. Μόλις το διάλυμα έφτασε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκαν ασηπτικά 100 mL stock 2 και 20 mL stock 3.

	Συστατικά	g/L
Stock 1	KH ₂ PO ₄	22,7
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	59,7
	NH ₄ Cl	10,0
Stock 2	MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,2
Stock 3	FeSO ₄	0,25

Πίνακας 2. Συστατικά στοιχεία του θρεπτικού μέσου MSM+N

Κολοβός Παναγιώτης

Η προετοιμασία θρεπτικών διαλυμάτων MSM+N + οξαμγί (20 mg/L) ή MSM+N + οξαμγί οξίμε (20 mg/L) πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί παραπάνω (ενότητα 2.3.1.) για το SEM.

2.3.3. Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων (MSM).

Το θρεπτικό μέσο MSM περιείχε εκτός από C και N, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μακροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S). Αυτό έγινε ώστε το οξαμγί οξίμε και οξαμγί να αποτελούν τη μοναδική πηγή άνθρακα και αζώτου για τους αναπτυσσόμενους μικροοργανισμούς. Το θρεπτικό αυτό διάλυμα παρασκευάστηκε από τα τρία πυκνά διαλύματα (Stock) ανόργανων αλάτων, τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες.

	Συστατικά	g/L
Stock 1A	KH ₂ PO ₄	22,7
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	59,7
	NaCl	10,0
Stock 2	MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,2
Stock 3	FeSO ₄	0,25

Πίνακας 3. Συστατικά στοιχεία του θρεπτικού μέσου MSM

Για την προετοιμασία του υγρού θρεπτικού διαλύματος ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως με το MSM+N. Για την προετοιμασία στερεού θρεπτικού υποστρώματος MSM + οξαμγί (20 mg/L), 15 g άγαρ προστέθηκαν σε H₂O με τελικό όγκο 740 mL σε αυτό προσθέτουμε 100 mL stock 1A και 100 mL stock 2 και το διάλυμα αποστειρώθηκε. Αφού αποστειρώθηκε το διάλυμα προστέθηκαν 20ml αποστειρωμένου stock 3 και προστέθηκαν ασηπτικά 40 mL από το αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα οξαμγί (500 mg/L).

2.3.4. Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο και ηλεκτρικό οξύ (MSM+N+succinate).

Το θρεπτικό αυτό διάλυμα περιείχε ότι και το MSM+N αλλά προστέθηκε σε αυτό και ηλεκτρικό οξύ (500mg / L). Για τον λόγο αυτό παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα ηλεκτρικού οξέος σε νερό συγκέντρωσης 1 g / L από το οποίο προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα στο MSM+N.

2.4. Μέθοδος ανάλυσης γεωργικών φαρμάκων σε σύστημα HPLC

2.4.1. Σύστημα Χρωματογραφίας

Για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του oxamyl και του oxamyl oxime στις υγρές καλλιέργειες των βακτηριών χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σύστημα HPLC Marathon III, που ήταν εξοπλισμένο με σύστημα αντλιών βαθμιδωτής έκλουσης, όγκο έγχυσης 20 μL και ανιχνευτή UV, ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό Clarify[®] για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων.

2.4.2. Διαλύτες και γεωργικά φάρμακα

Για την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων του oxamyl και του oxamyl oxime και κινητής φάσης για τη χρωματογραφική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο (ACN) και νερό HPLC grade (Merck GmbH, Germany). Για την ανάλυση και τον περαιτέρω πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικά πρότυπα των γεωργικών φαρμάκων αλλά και των μεταβολιτών τους όπως έχουν αναφερθεί παραπάνω.

2.4.3. Χρωματογραφικές συνθήκες

Ο διαχωρισμός του oxamyl και του προϊόντος μεταβολισμού του πραγματοποιήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης (RP) C18, Nucleosil (150 x 4.6 mm, 5 μm id) (Macherey – Nagel GmbH, Germany) με κινητική φάση μίγματος ακετονιτριλίου:νερού (HPLC grade) ογκομετρικής αναλογίας 20:80 και ροή 1 mL/min. Η ανίχνευσή πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 220 nm και οι χρόνοι κατακράτησης των oxamyl και oxamyl oxime ήταν 3,3 min και 2,3 min αντίστοιχα

2.4.4. Καμπύλες αναφοράς

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του oxamyl, καθώς και του προϊόντος μεταβολισμού του oxamyl oxime πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον λόγο αυτό, αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε μεθανόλη για το oxamyl και για το oxamyl oxime. Ακολούθως, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 10, 5, 2, 1, 0,5 και 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ με διαδοχικές αραιώσεις στο διάλυμα της κινητής τους φάσης (20 % ACN:80 % H₂O κ.ο.) και έγινε έγχυση 20 μl από το κάθε ένα στο σύστημα HPLC. Το εμβάδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών τους με την βοήθεια του λογισμικού Clarify[®].

2.5. Μελέτη της αποδόμησης των oxamyl και oxamyl oxime στο έδαφος

Αρχικά, μελετήθηκε η αποδόμηση oxamyl και ο σχηματισμός και τύχη του oxamyl oxime στο έδαφος από την περιοχή της Ν. Κρήτης όπου παρατηρήθηκε

μειωμένη αποτελεσματικότητα των παραπάνω νηματωδοκτόνων. Το δείγμα εδάφους (130 g) τοποθετήθηκε σε πλαστική σακούλα με αεροστεγές κλείσιμο και δέχτηκε εφαρμογή κατάλληλου ποσοτικού υδατικού διαλύματος oxamyl (150 µg/mL) ώστε στο έδαφος να υπάρξει συγκέντρωση 10 µg/g ξηρού βάρους εδάφους. Ακολούθως η υγρασία του εδάφους προσαρμόστηκε στο 45% της υδατοχωρητικότητας του εδάφους με προσθήκη νερού. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25°C. Η σακούλα τρυπήθηκε σε ένα σημείο ώστε να καταστούν αερόβιες συνθήκες για το έδαφος. Αμέσως μετά την εφαρμογή και 1, 2, 3, 4 και 7 ημέρες αργότερα δύο επαναλήψεις των 5 g από κάθε δείγμα εδάφους απομακρύνθηκαν και ακολούθησε εκχύλιση των υπολειμμάτων του νηματωδοκτόνου και ανάλυση τους σε σύστημα HPLC. Η εκχύλιση των oxamyl oxime και oxamyl από το έδαφος πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Ποσότητα 5 g εδάφους ζυγίστηκε σε κωνικές φιάλες των 100 mL και προστέθηκαν 10 mL διαλύματος ACN + H₂O σε αναλογία 50:50. Οι φιάλες καλύφθηκαν με parafilm και ανακινήθηκαν για 1 ώρα και 30 min σε μέτρια ταχύτητα σε θερμοκρασία 26 °C.
- Στην συνέχεια μόλις τελειώσει η ανακίνηση μεταφέρθηκε το διάλυμα σε σωλήνα τύπου falcon για να φυγοκεντρηθεί για 10 min σε 7500 rpm στους 25°C.
- Μετά την φυγοκέντριση το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας (45 nm).
- Ακολούθησε ανάδευση σε vortex και κατόπιν έγχυση των δειγμάτων σε σύστημα HPLC και αποθήκευση αυτού στους -20 °C.

Μόλις ολοκληρώθηκε η διάσπαση του oxamyl στο έδαφος ακολούθησε μια σειρά από διαδοχικές εφαρμογές κατ'εναλλαγή με oxamyl (τέσσερις εφαρμογές) και oxamyl oxime(έξι εφαρμογές) ώστε να ενεργοποιηθεί η μικροβιακή κοινότητα για την αποδόμηση των oxamyl και oxamyl oxime και να αυξηθούν οι πιθανότητες απομόνωσης βακτηρίων που να έχουν την δυνατότητα να αποδομούν το oxamyl ή/και το oxamyl oxime.

2.5.1. Εμπλουτισμένες καλλιέργειες για την απομονωση αποδομητικών βακτηρίων

Μετά την ολοκλήρωση της σειράς διαδοχικών εφαρμογών των oxamyl/oxamyl oxime στο έδαφος 0.5 g χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό υγρών θρεπτικών μέσων MSMN+oxamyl ή oxamyl oxime και MSM+oxamyl ή oxamyl oxime. Μετά την επιβεβαίωση της ταχύτερης αποδόμησης του oxamyl κατά τον πρώτο κύκλο εμπλουτισμού και όταν το ποσοστό αποδόμησης του έφτασε το 80 % προετοιμάστηκε ο 2^{ος} κύκλος ανακαλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, 0,5 mL από τις καλλιέργειες μεταφέρθηκε ασηπτικά σε νέα σειρά των ιδίων θρεπτικών μέσων (10 mL). Στη συνέχεια, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο προετοιμάστηκε 3^{ος}, 4^{ος}, 5^{ος} και 6^{ος} κύκλος ανακαλλιέργειας για τους συνδυασμούς γεωργικού φαρμάκου – θρεπτικού μέσου MSM+N+Oxamyl και MSM + oxamyl.

Αντίθετα στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες στα θρεπτικά μέσα MSM+N + oxamyl oxime και MSM + oxamyl oxime δεν παρατηρήθηκε καμία αποδόμηση του oxamyl oxime. Έτσι ακολούθως αξιολογήθηκε ο εμπλουτισμός καλλιεργείων για την

απομόνωση βακτηρίων που διασπούν το oxamyl oxime σε εναλλακτικά θρεπτικά μέσα όπως SEM + oxamyl oxime και MSMN + succinate + oxamyl oxime τα οποία περιέχουν και εναλλακτικές πηγές C/N εκτός του oxamyl oxime.

Κατά την διάρκεια των κύκλων ανακαλλιέργειας, η αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων παρακολουθήθηκε με την ημερήσια σχεδόν απομάκρυνση δειγμάτων από τις υγρές καλλιέργειες και ανάλυση τους σε σύστημα HPLC. Σε κάθε κύκλο ανακαλλιέργειας υπήρχαν ταυτόχρονα και δείγματα – μάρτυρες για κάθε γεωργικό φάρμακο – θρεπτικό μέσο ώστε να ελέγχεται το ποσοστό αβιοτικής αποδόμησης των ουσιών που μελετήθηκαν.

2.5.2. Αξιολόγηση του μηχανισμού αποδόμησης του oxamyl oxime

Δεδομένης της περιορισμένης αποδόμησης του oxamyl oxime στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες στα εκλεκτικά θρεπτικά μέσα MSM+oxamyl oxime, MSMN+oxamyl oxime μελετήθηκε περαιτέρω η πιθανότητα ενεργοποίησης της αποδόμησης του oxamyl oxime στις καλλιέργειες αυτές ύστερα από την προσθήκη ποσότητα εδάφους, αποστειρωμένου ή μη αποστειρωμένου. Η υπόθεση μας ήταν ότι το έδαφος παρέχει επιφάνειες απαραίτητες για την αποδόμηση του oxamyl oxime (αποστειρωμένο έδαφος) ή απαιτείται νέο βιολογικό φορτίο για την αποδόμηση του oxamyl oxime (μη αποστειρωμένο έδαφος). Έτσι από το δείγμα εδάφους που είχε απομείνει (35 g) μετά την ολοκλήρωση του πειράματος αποδόμησης όπως αυτό έχει περιγραφεί παραπάνω διαχωρίστηκαν δύο υπο-δείγματα των 17 g. Το πρώτο από τα δείγματα εδάφους αποστειρώθηκαν όπως έχει περιγραφεί παραπάνω (25 min, 120°C σε αυτόκαυστο) ενώ το δεύτερο δείγμα παρέμεινε ως έχει. Περίπου 12 g από κάθε δείγμα εδάφους, αποστειρωμένο ή μη αποστειρωμένο, τοποθετήθηκαν στην επώαση στους 25°C και μετρήθηκε η αποδόμηση μιας νέας δόσης oxamyl oxime (10 μg/g) με την λήψη δειγμάτων και προσδιορισμό των υπολειμμάτων oxamyl oxime όπως έχει ήδη περιγραφεί.

Η υπόλοιπη ποσότητα αποστειρωμένου και μη αποστειρωμένου εδάφους διαχωρίστηκε σε δύο υπο-δείγματα των 2.5 g. Τα πρώτα δείγματα 2.5 g προστέθηκαν σε κωνική φιάλη που περιείχε εμπλουτισμένη καλλιέργεια MSMN+oxamyl oxime ενώ τα δεύτερα δείγματα των 2.5 g προστέθηκαν σε εμπλουτισμένη καλλιέργεια MSM+oxamyl oxime οι οποίες δεν είχαν παρουσιάσει αποδόμηση του συγκεκριμένου μεταβολίτη μέχρι εκείνη την στιγμή. Συνοπτικά προετοιμάστηκαν οι παρακάτω μεταχειρίσεις:

- 2,5 g αποστειρωμένου εδάφους + 5 mL MSM+oxamyl oxime
- 2,5 g αποστειρωμένου εδάφους + 5 ml MSMN+oxamyl oxime
- 2,5 g μη αποστειρωμένου εδάφους + 5 mL MSM+oxamyl oxime
- 2.5 g μη αποστειρωμένου εδάφους + 5 ml MSMN+oxamyl oxime
- 4 mL MSM ή MSMN + oxamyl oxime χωρίς έδαφος ως μάρτυρας

Με την ολοκλήρωση των αναμίξεων μεταξύ εδάφους και υγρών θρεπτικών μέσω παρακολουθήθηκε η αποδόμηση του oxamyl oxime με συχνή λήψη δειγμάτων και προσδιορισμό των υπολειμμάτων του oxamyl oxime σε σύστημα HPLC-UV όπως έχει ήδη περιγραφεί.

2.6. Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το νηματωδοκτόνο oxamyl

Όταν η αποδόμηση του oxamyl στον τελευταίο κύκλο των εμπλουτισμένων καλλιιεργειών σε MSMN ή MSM + oxamyl είχε φτάσει στο 80 % περίπου απομακρύνθηκε 1 ml από κάθε καλλιέργεια και προετοιμάστηκε σειρά διαδοχικών αραιώσεων ($10^{-1} - 10^{-8}$) σε αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια, 0,1 ml από τα falcons των αραιώσεων 10^{-4} ως 10^{-7} επιστρώθηκαν σε δύο τρυβλία κάθε φορά που περιείχαν το αντίστοιχο στερεό θρεπτικό μέσο. Τα τρυβλία διατηρήθηκαν στην επώαση στο σκοτάδι στους 25 °C μέχρι να αναπτυχθούν οι αποικίες (\approx 5 ημέρες) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών σε τρυβλία με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MSMN+oxamyl ύστερα από επώαση 5 ημέρων στους 25 °C.

2.6.1. Επιλογή αποικιών και έλεγχος της αποδομητικής τους ικανότητας

Ύστερα από επώαση 5 ημερών ικανοποιητικός αριθμός βακτηριακών αποικιών είχε αναπτυχθεί στα τρυβλία. Ακολούθησε επιλογή αποικιών με βάση τρία κριτήρια 1) την εμφάνιση περιθωρίου (halo) γύρω από την αποικία που καταδεικνύει πιθανότατα την κατανάλωση του γεωργικού φαρμάκου, 2) μορφολογικά χαρακτηριστικά και 3) όσο το δυνατό καλύτερο διαχωρισμό από παρακείμενες αποικίες ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα απομόνωσης αξενικών καλλιιεργειών. Τελικά, επιλέχθηκαν 35 αποικίες με τη βοήθεια αποστειρωμένων ακίδων. Οι αποικίες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά μπουκάλια (30 ml) μιας χρήσης που περιείχαν 5 ml από το ίδιο θρεπτικό μέσο (20 mg/L) με αυτό του τρυβλίου από το οποίο επιλέχθηκαν. Ακολούθησε ανάδευση σε vortex και τοποθέτησή τους σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 25 °C και στις 150 στροφές/min. Παράλληλα, προετοιμάστηκαν και τρεις επαναλήψεις για το γεωργικό φάρμακο και το θρεπτικό μέσο τα οποία δεν εμβολιάστηκαν με βακτήρια ώστε να αξιολογηθεί η αβιοτική διάσπαση του oxamyl στα θρεπτικά μέσα κατά την διάρκεια της επώασης.

Στη συνέχεια, παρακολουθήθηκε η αποδόμηση του oxamyl από τις επιλεγμένες αποικίες στις 4, 9 και 18 ημέρες. Από τις καλλιέργειες που έδειξαν αποδόμηση έγινε εμβολιασμός και επίστρωση σε τρυβλία MSM+oxamyl (20 mg/L) για την αξιολόγηση της αμιγότητας των καλλιιεργειών. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στην επώαση στους 25 °C. Οι καλλιέργειες που ήταν αμιγείς επιστρώθηκαν παραπέρα σε τρυβλία με το θρεπτικό μέσο MSM + oxamyl. Στις καλλιέργειες που

παρουσίασαν υψηλή αποδομητική ικανότητα και ήταν αμιγείς, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια με εμβολιασμό 0,5 mL σε νέα θρεπτικά μέσα (5 mL). Οι νέες καλλιέργειες καθώς και οι αντίστοιχες καλλιέργειες-μάρτυρες τοποθετήθηκαν σε αναδεδυμένο επωαστικό θάλαμο στους 25 °C στις 150 στροφές/min. Ακολούθησαν δειγματοληψίες στις 0, 4, 8 και 11 ημέρες για την παρακολούθηση της αποδόμησης του oxamyl.

Τέλος, στα τρυβλία MSM+oxamyl που είχαν επιστρωθεί με τις αποδομητικές καλλιέργειες προστέθηκε 0,7 mL αποστειρωμένο νερό και η βακτηριακή μάζα συγκομίστηκε και μεταφέρθηκε σε νέα αποστειρωμένα erpendorfs, όπου αναμίχθηκαν με 0,3 mL αποστειρωμένου υδατικού διαλύματος γλυκερόλης (80 %) και αποθηκεύτηκαν στους - 80 °C.

2.6.2. Εξαγωγή DNA από τις αμιγείς αποικίες των βακτηρίων

Βακτηριακές καλλιέργειες οι οποίες εμφανίστηκαν ως αμιγής στα τρυβλία και εμφάνισαν παράλληλα υψηλή αποδομητική ικανότητα έναντι του oxamyl προωθήθηκαν για ταυτοποίηση με πρώτο βήμα την εξαγωγή DNA η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού κιτ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit της εταιρείας Invitrogen. Αρχικά τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο MSM+oxamyl και αφού παρατηρήθηκε ικανοποιητική ανάπτυξη, η βακτηριακή βιομάζα συγκομίστηκε με 1 ml αποστειρωμένο νερό που προστέθηκε στα τρυβλία. Η βακτηριακή βιομάζα τοποθετήθηκε σε σωληνάριο erpendorf και αφού φυγοκεντρήθηκαν σε μέγιστη ταχύτητα για 5 min τα βακτηριακά κύτταρα συγκομίστηκαν και ακολούθησε εξαγωγή DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο των παρασκευαστών.

2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό in vitro επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση:

- Ειδικής DNA πολυμεράσης η οποία είναι θερμοσταθερή και διατηρεί τη δραστικότητα της σε θερμοκρασίες έως και 95 °C.
- Ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 15 - 30 βάσεων), τα οποία ονομάζονται εκκινητές (primers)
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂
- Ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για την δράση της πολυμεράση
- Μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου. Στο πρώτο στάδιο, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 92-95 °C. Στο δεύτερο στάδιο, οι εκκινητές που βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στους δύο κλώνους του DNA στους 50-65 °C. Κατά το τρίτο στάδιο, το οποίο πραγματοποιείται στους 70-78 °C, συντίθεται DNA αρχίζοντας από τους δύο

Κολοβός Παναγιώτης

εκκινητές. Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές.

Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης
- Καρα Ταq πολυμεράση
- Νουκλεοτίδια (dNTPs) (HT BIOTECHNOLOGY LTD)
- BSA (Bovine Serum Albumin) 10 µg/µL
- Διάλυμα MgCl₂ (25 mM)
- Εκκινητές
- dd H₂O

Πίνακας 4. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση ολόκληρου του 16S rDNA γονιδίου των βακτηρίων που απομονώθηκαν

Εκκινητής	Αλληλουχία	T _m (°C)
8f	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTT AG-3'	52
1512r	5'-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3'	52

Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου (1500 bp) με τους εκκινητές 8f - 1512r χρησιμοποιώντας ως μήτρα το DNA που εκχυλίστηκε από τις αμιγείς καλλιέργειες. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε παρουσιάζονται στους πίνακες 4 και 5 αντίστοιχα.

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων που εμφάνισαν αποδομητική ικανότητα

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer A (10x optimized)	5 µL	1x (1.5 mM MgCl ₂)
dNTPs (10 mM)	1 µL	200 µM από το καθένα
Forward primer 8f (20 pmol/µL)	2 µL	0,2 µM
Reverse primer 1512r (20 pmol/µL)	2 µL	0,2 µM
Καρα Ταq πολυμεράση (1 U/µL)	0,2 µL	1 U/25 µL
DNA	0,5 µL	10-50 ng
ddH ₂ O	39,3 µL	
Συνολικός όγκος	50 µL	

Πίνακας 6. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες PCR με τους εκκινητές 8f-1512r

Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min	
Αποδιάταξη	95 °C	1 min	30 κύκλοι
Υβριδοποίηση	55 °C	1 min	
Επιμήκυνση	72 °C	2 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	

2.8. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA. Στην εργασία αυτή, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 1) στα δείγματα DNA που εξήχθησαν από τις αμιγείς καλλιέργειες των βακτηρίων, 2) στα δείγματα του πλασμιδιακού DNA των βακτηρίων που απομονώθηκαν, 3) στα PCR προϊόντα για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού προϊόντος.

Για την ηλεκτροφόρηση του DNA των βακτηρίων και των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή 0,8 % (0,56 g αγαρόζης σε 70 mL TAE 1x) και 1 % (7 g αγαρόζη σε 70 mL TAE 1x) αντίστοιχα και 2 μL βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 5 μL DNA αναμεμειγμένα με 1 μL loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 90 V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές αφού τοποθετήθηκαν σε τράπεζα UV.

2.9. Εξαγωγή ζώνης της πηκτής για καθαρισμό PCR προϊόντων (gel extraction)

Το προϊόν PCR που προέκυψε για το 16S rRNA γονίδιο των βακτηρίων που απομονώθηκαν καθαρίστηκε ώστε στην συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για ένθεση σε πλασμιδιακό φορέα και αλληλουχισιο του ενθέματος. Έτσι σε πηκτή αγαρόζης 1 % φορτώθηκαν 10 μL προϊόντος PCR από τις βακτηριακές καλλιέργειες, και μετά την ηλεκτροφόρηση επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ζωνών του σωστού μεγέθους σε τράπεζα UV. Ακολούθησε αποκοπή και καθαρισμός της ζώνης των PCR προϊόντων χρησιμοποιώντας το εμπορικό κιτ Nucleospin CleanUp της Macherey Nagel σύμφωνα με το πρωτόκολλο των κατασκευαστών όπως περιγράφεται σύντομα παρακάτω:

- Με αποστειρωμένο νυστέρι αποκόπηκαν προσεκτικά οι επιλεγμένες ζώνες και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα eppendorfs
- Τα eppendorfs ζυγίστηκαν και προστέθηκε Buffer NT1 σε αναλογία 3 φορές το βάρος της ζώνης πηκτής που κόπηκε (στα 100 mg προστέθηκαν 300 μL)
- Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 50 °C για 5-10 min μέχρι να διαλυθεί πλήρως η πηκτή. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα δείγματα αναδεύονταν σε vortex για να διευκολυνθεί η διάλυση και στο τέλος το χρώμα των δειγμάτων ήταν κίτρινο που υποδηλώνει τιμή pH<7.5

Κολοβός Παναγιώτης

- Οι στήλες NucleoTrap τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια των 2 mL. Τα δείγματα των erpendorfs μεταφέρθηκαν σε αυτά και φυγοκεντρήθηκαν για 30 sec. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε
- Προστέθηκε 0,7 mL από το Buffer NT3 και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 30 sec max speed. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε και ξαναφυγοκεντρίθηκε και το διάλυμα που διαπέρασε την μεμβράνη απορρίφθηκε.
- Προστέθηκε 0,5 mL από το Buffer NE στις στήλες των δειγμάτων και αφέθηκαν για 2-5 min πριν ακολουθήσει φυγοκέντρηση για 30 sec. Το Buffer NE που περιέχει αιθανόλη χρησιμοποιείται για να ξεπλυθούν όλα τα άλατα. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη απορρίφθηκε και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 30 sec στις 13000 rpm
- Τέλος, οι στήλες τοποθετήθηκαν σε καινούρια erpendorfs και η έκλουση του DNA έγινε με την προσθήκη 30 µL dd H₂O.
- Τα δείγματα DNA διατηρήθηκαν στους - 20 °C

2.10. Ένθεση

Τα προϊόντα PCR ύστερα από τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκε για ένθεση σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα ώστε να αποσταλεί για αλληλούχισι. Έτσι αρχικά πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των δειγμάτων του dsDNA με φωτόμετρο στα 260 nm με χρήση κυψελίδας. Με βάση τις τιμές απορρόφησης και βάση του τύπου $[25 \text{ ng vector} \times 1,5 \text{ kb (μ\acute{\eta}\kappa\omicron\varsigma \text{ DNA})} / 3] \times (3 / 1)$ υπολογίστηκαν τα µL DNA κάθε δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση ένθεσης σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα pGEM®-T easy (Promega). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση ένθεσης παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων τα δείγματα επώαστηκαν στους 4 °C για 16 h.

Πίνακας 7. Οι όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση ένθεσης των διαφόρων PCR προϊόντων.

Αντιδραστήρια	Δείγματα DNA
2x Buffer	5 µL
Φορέας pGEM	0,5 µL
PCR προϊόν	0,35 µL
Λιγάση	1 µL
dd H ₂ O	3,15 µL
Συνολικός όγκος	10 µL

10 mL X Gal (2 %)		10 mL IPTG (0,1 M)	
X Gal (- 20 °C)	0,2 g	IPTG (- 20 °C)	0,238 g
Διμέθυλοφορμαμίδη (DMF)	10 mL	Προσαρμογή όγκου σε 10 mL νερού Αποστείρωση με φίλτρο	

Αποστείρωση με φίλτρο και σύριγγα και αποθήκευση στους -20°C τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο	Αποθήκευση στους 4°C
---	--------------------------------------

Πίνακας 8: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό του φορέα σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*.

2.11. Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*

Με την ολοκλήρωση της ένθεσης ακολούθησε ο μετασχηματισμός των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* (DH5a Competent Cells, Invitrogen, USA) Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη διαδικασία του μετασχηματισμού ήταν τα εξής:

- Σε αποστειρωμένα erpendorfs μεταφέρθηκαν 2 μL ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και προστέθηκαν 80 μL δεκτικών κυττάρων. Τα erpendorfs τοποθετήθηκαν για 30 min στον πάγο
- Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν για 42-50 sec στους 42°C και για 2 min σε πάγο
- Προστέθηκαν 200 μL LB υπό φλόγα και τα δείγματα επώαστηκαν για 50 min στους 37°C
- Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής και ασηπτικά προστέθηκαν 50 μL X GAL (2 %) που φυλασσόταν στους -20°C και 10 μL IPTG που φυλασσόταν στους 4°C
- Τέλος, τα δείγματα επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB + Ampicillin και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 16 h.

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε επιλογή πέντε λευκών αποικιών από κάθε τρυβλίο με τη χρήση αποστειρωμένων tip και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκάλια (25 mL) που περιείχαν 5 mL LB + ampicillin. Ακολούθως, τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με ανάδευση στους 37°C στις 200 στροφές/min για 16 h.

2.12. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Από τις παραπάνω καλλιέργειες με την ολοκλήρωση της επώασης πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Χρησιμοποιήθηκαν 5 κλώνοι για κάθε βακτήριο (10 δείγματα). Η εξαγωγή πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit Nucleospin® Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel και τα βήματα του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- 1 mL από τις καλλιέργειες μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο erpendorf και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις $11,000 \times g$ για 30 sec. Τα κύτταρα ιζηματοποιήθηκαν και το υπερκείμενο απορρίφθηκε
- Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε προσεκτικά σε 250 μL του Buffer A1 που περιέχει λυσοζύμη

Κολοβός Παναγιώτης

- Προστέθηκαν 250 μL του Buffer A2 που περιέχει SDS και τα erpendorfs ανακινήθηκαν 6 - 8 φορές και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
- Προστέθηκαν 300 μL Buffer A3 και τα erpendorfs ανακινήθηκαν πάλι 6 - 8 φορές
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 10 min
- Στη συνέχεια, οι στήλες NucleoSpin Plus που παρέχονται στο κιτ τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια συλλογής των 2 mL και φορτώθηκε σε αυτά το υπερκείμενο
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min και το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη της στήλης απορρίφθηκε
- Προστέθηκαν στην στήλη 500 μL του Buffer AW το οποίο είχε προθερμανθεί στους 50 °C και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη της στήλης απορρίφθηκε
- Προστέθηκαν στην στήλη 600 μL του Buffer A4 που περιέχει αιθανόλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min. Το διάλυμα που διαπέρασε τη μεμβράνη της στήλης απορρίφθηκε
- Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 2 min ώστε να απομακρυνθεί κάθε υπόλειμμα αιθανόλης από τη μεμβράνη της στήλης
- Στην συνέχεια οι στήλες μεταφέρθηκαν σε καινούρια αποστειρωμένα erpendorfs και η έκλυση του DNA πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 50 μL του Buffer AE (5 mM Tris-HCl, pH 8,5). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και κατόπιν φυγοκέντρηση στις 11,000 x g για 1 min
- Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους - 20 °C

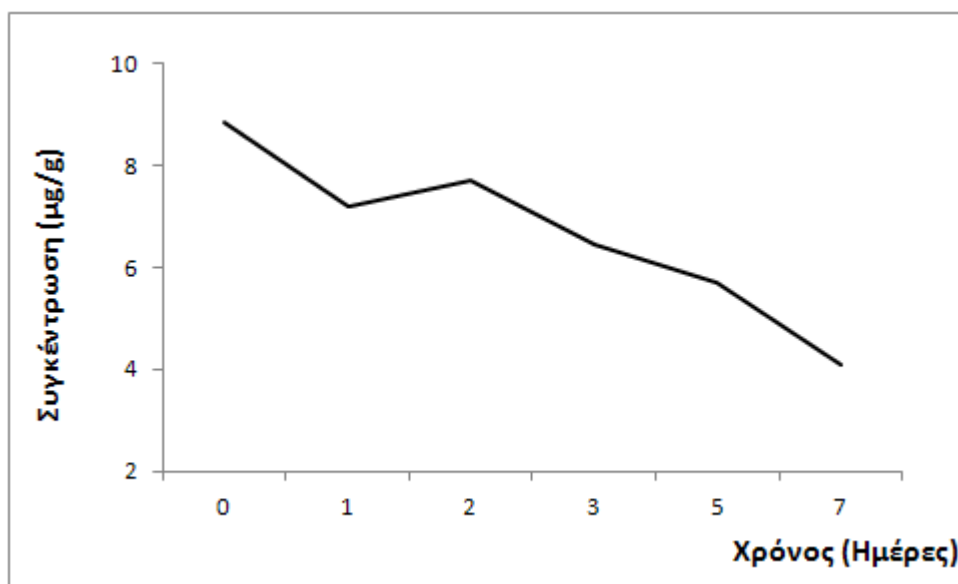
Το πλασμιδιακό DNA απεστάλη για αλληλούχιση στην εταιρεία στην CEMIA (Cellular and Molecular Immunological Applications) στην Λάρισα. Οι αλληλουχίες αναγνώστηκαν και προς τις δύο κατευθύνσεις ώστε να παραλάβουμε την πλήρη αλληλουχία (1500 bp) του γονιδίου 16S rRNA των απομονωθέντων βακτηρίων. Οι μετασχηματισμένες με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο καλλιέργειες *E. coli* από τις οποίες πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA ανακαλλιιεργήθηκαν σε νέο θρεπτικό μέσο (LB+ampicillin) και ακολούθησε ανάμιξη με γλυκερόλη και αποθήκευση στους - 80 °C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

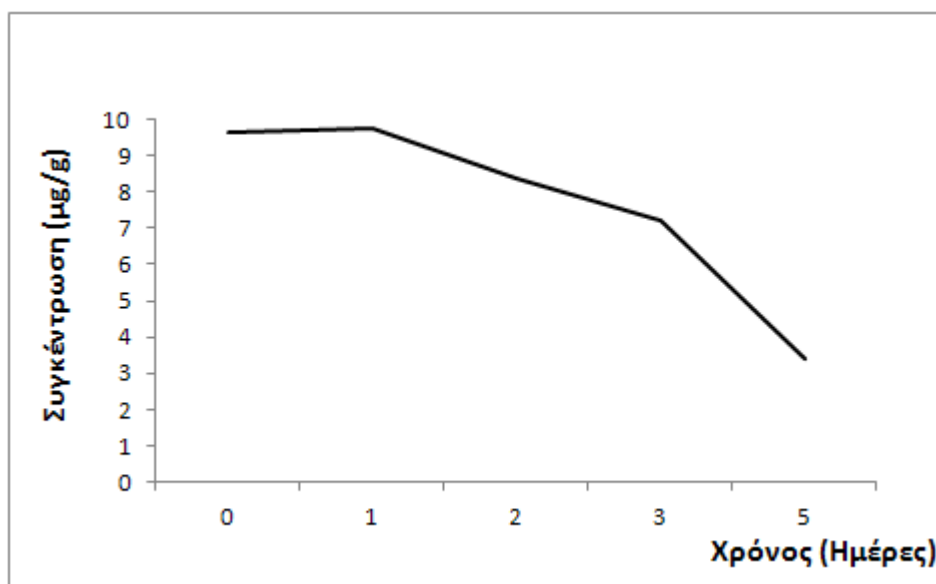
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποδόμηση των οξαμγλ και οξαμγλ οxime στο έδαφος

Στο ίδιο δείγμα εδάφους αρχικά έγινε εφαρμογή με οξαμγλ και στην συνέχεια εφαρμόστηκε οξαμγλ οxime και προσδιορίστηκε η αποδόμηση τους στον χρόνο. Και για τις δύο ουσίες η αποδόμηση τους προχώρησε σχετικά γρήγορα με αποδόμηση >60% της αρχικής ποσότητας τους στο έδαφος σε 8 και 6 ημέρες για τα οξαμγλ και οξαμγλ οxime αντίστοιχα (Διάγραμμα 1 και 2). Η αποδόμηση του οξαμγλ οδήγησε στον σχηματισμό οξαμγλ οxime με μέγιστη συγκέντρωση δύο ημέρες μετά την εφαρμογή του οξαμγλ (3 μg/g). Το οξαμγλ οxime που σχηματίστηκε από την αποδόμηση του οξαμγλ αποδομήθηκε πλήρως μέχρι την 7^η ημέρα από την έναρξη του πειράματος.



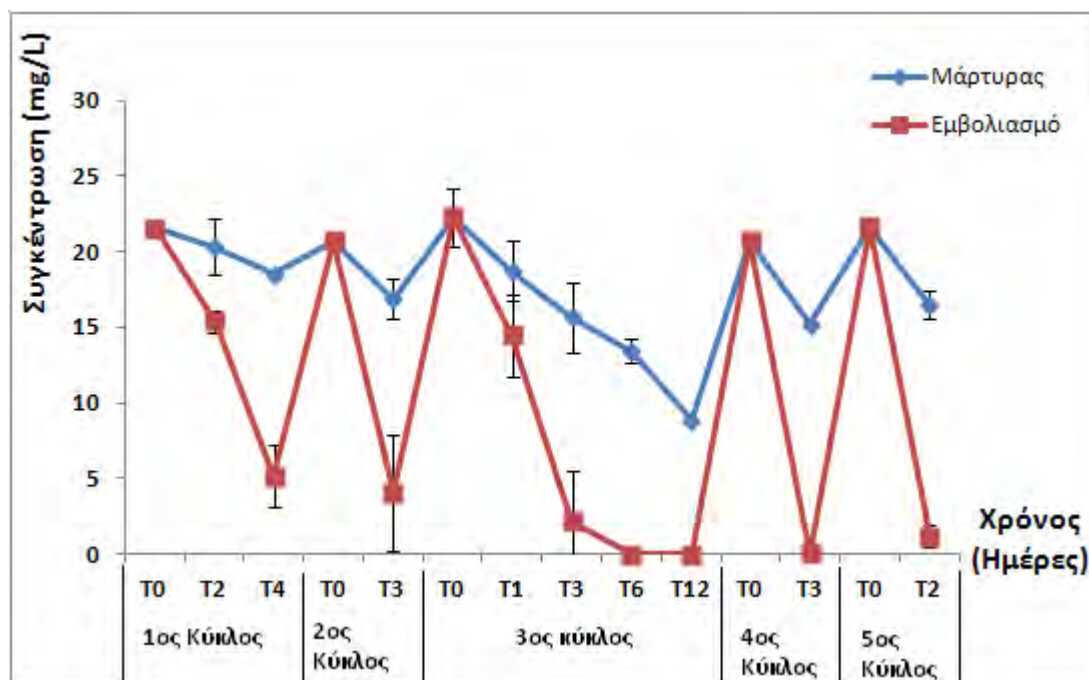
Διάγραμμα 1: Η αποδόμηση του οξαμγλ στο έδαφος από την Β. Κρήτη.



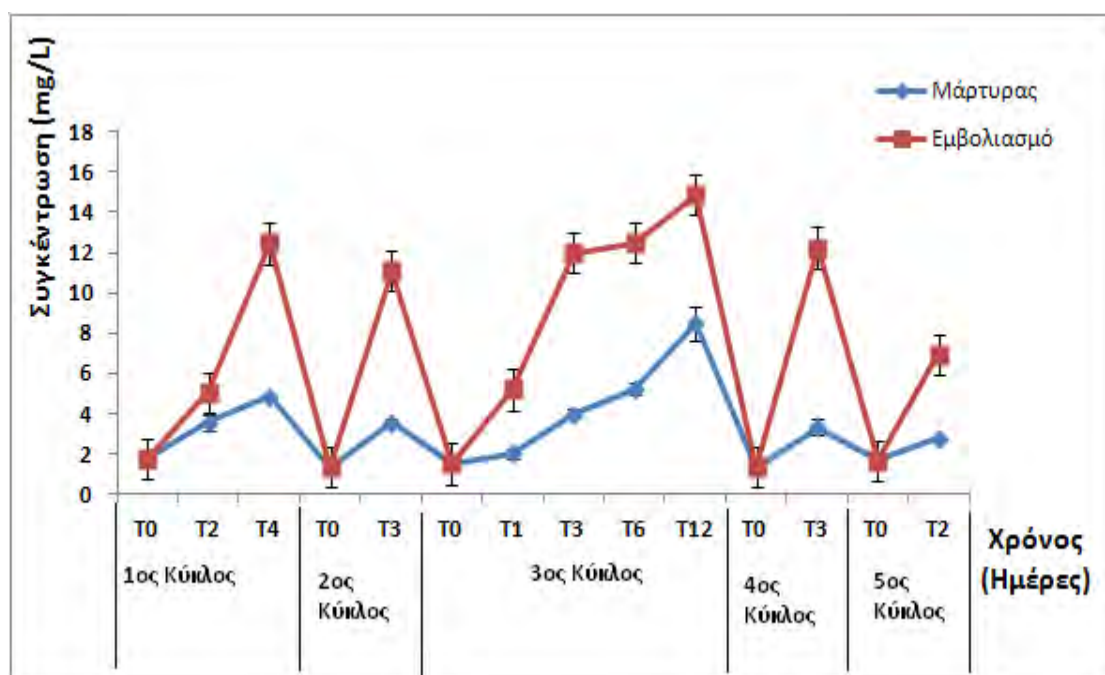
Διάγραμμα 2: Η αποδόμηση του οξαμυλ οξιμε στο έδαφος από την Β. Κρήτη.

3.2. Αποδόμηση των οξαμυλ και οξαμυλ οξιμε στις καλλιέργειες εμπλουτισμού

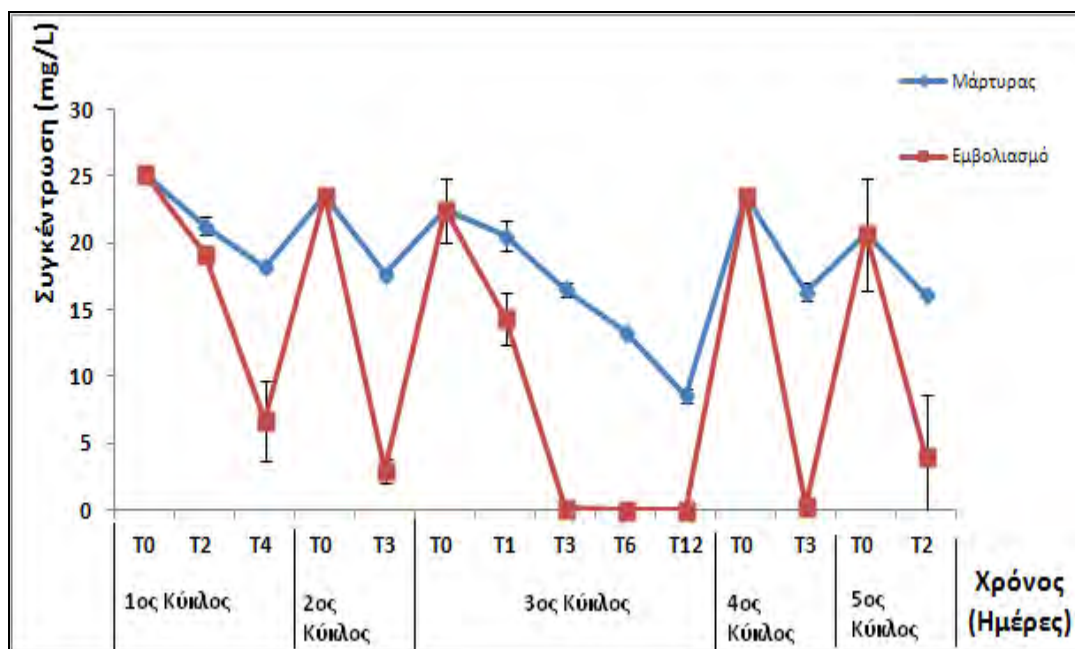
Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος αποδόμησης των οξαμυλ και οξαμυλ οξιμε στο έδαφος, ξεκίνησε η διαδικασία εμπλουτισμού, για την απομόνωση των βακτηρίων που αποδομούν τα οξαμυλ και/ή οξαμυλ οξιμε. Διαπιστώθηκε ότι στις καλλιέργειες εμπλουτισμού το δείγμα εδάφους περιείχε μικροοργανισμούς που είχαν την ικανότητα να διασπούν ταχύτατα το οξαμυλ καθώς παρατηρήθηκε πλήρης διάσπαση του γεωργικού φαρμάκου εντός τεσσάρων ημερών στον πρώτο κύκλο εμπλουτισμού και στα δύο θρεπτικά μέσα (MSM και MSMN) (Διαγράμματα 3 και 5). Ακολούθως η αποδόμηση του οξαμυλ στους επόμενους κύκλους επιταχύνθηκε με αποτέλεσμα την πλήρη αποδόμηση του οξαμυλ εντός 48 ωρών στον πέμπτο κύκλο εμπλουτισμού. Παράλληλα με την αποδόμηση του οξαμυλ, προσδιορίστηκε και η συγκέντρωση του οξαμυλ οξιμε που παραγόταν από την αποδόμηση του οξαμυλ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 4 και 6.



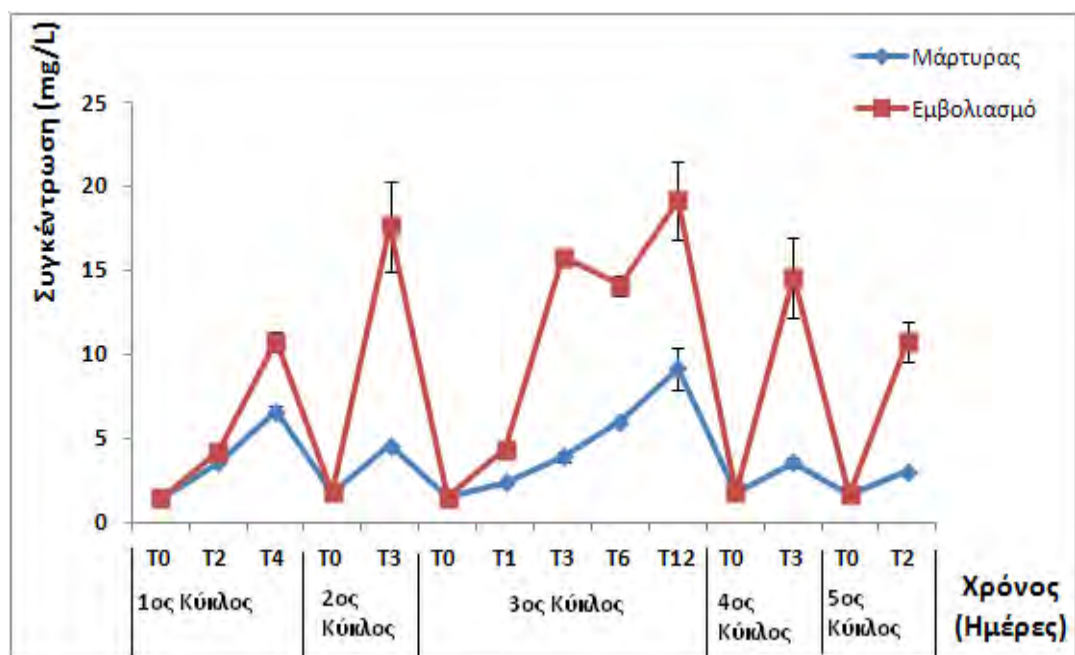
Διάγραμμα 3. Η αποδόμηση του οξαμυλ στους πέντε κύκλους εμπλουτισμού σε θρεπτικό μέσο MSM και σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSM (control). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 4. Η συγκέντρωση του οξαμυλ oxime που σχηματίστηκε από την αποδόμηση του οξαμυλ στους πέντε κύκλους εμπλουτισμού σε θρεπτικό μέσο MSM και σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSM (control). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

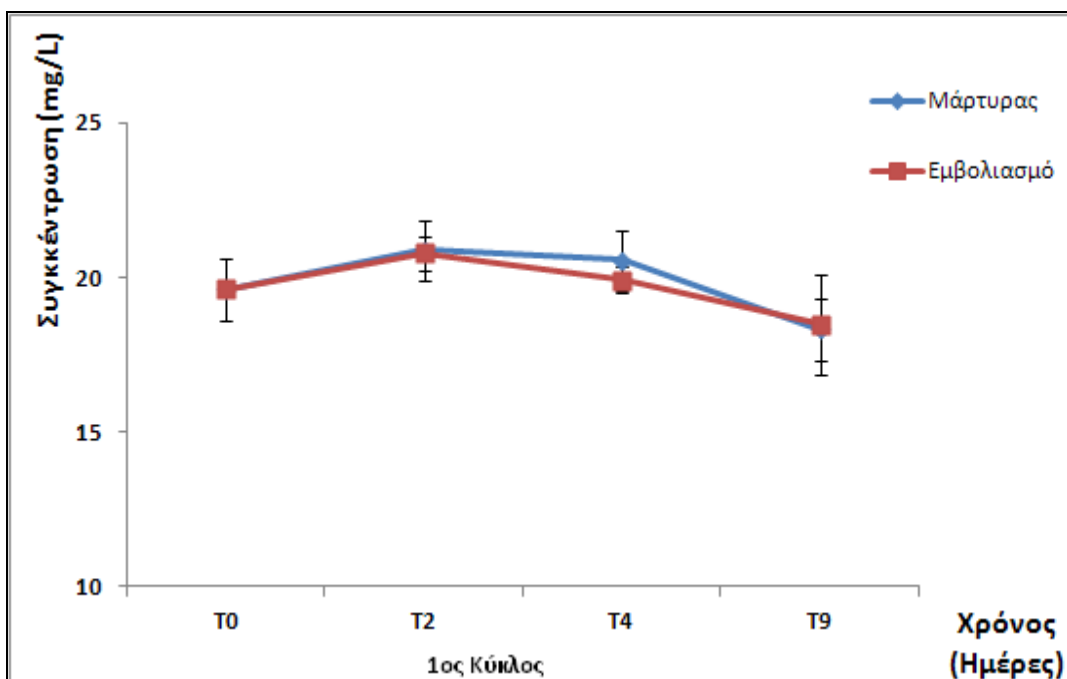


Διάγραμμα 5. Η αποδόμηση του οξαμυλίου στους πέντε κύκλους εμπλουτισμού σε θρεπτικό μέσο MSMN και σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSMN (control). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

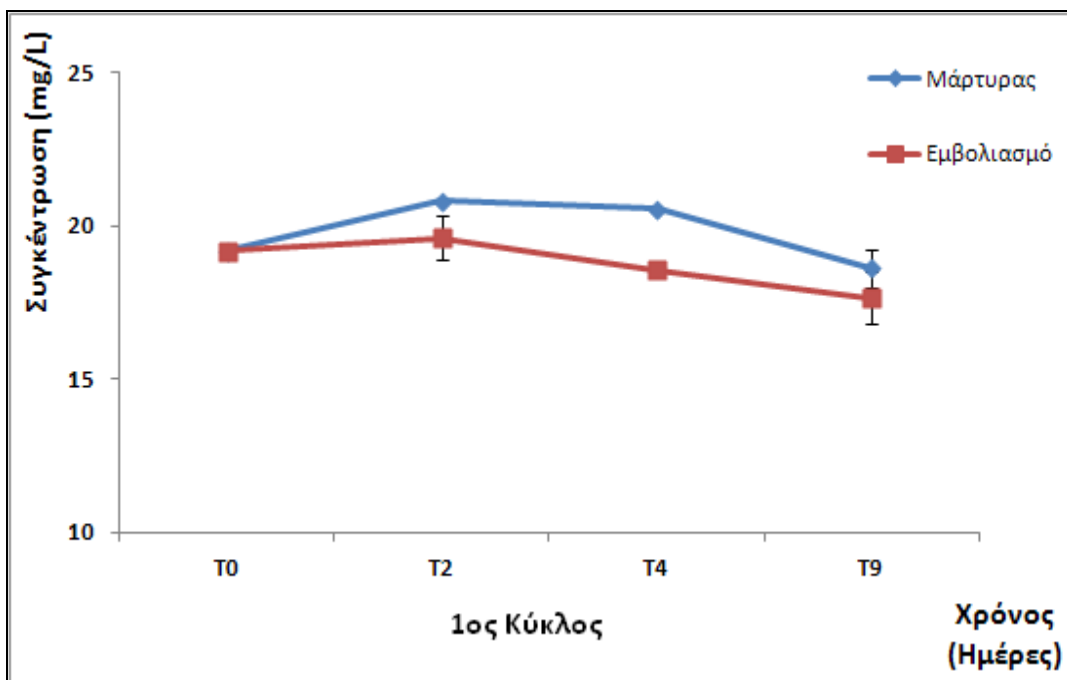


Διάγραμμα 6. Η συγκέντρωση του οξαμυλίου οξίμης που σχηματίστηκε από την αποδόμηση του οξαμυλίου στους πέντε κύκλους εμπλουτισμού σε θρεπτικό μέσο MSMN και σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSMN (control). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση του οξαμυλίου οξίμης στον πρώτο κύκλο της καλλιέργειας εμπλουτισμού και στα δύο θρεπτικά μέσα MSM και MSMN. (Διαγράμματα 7 και 8).

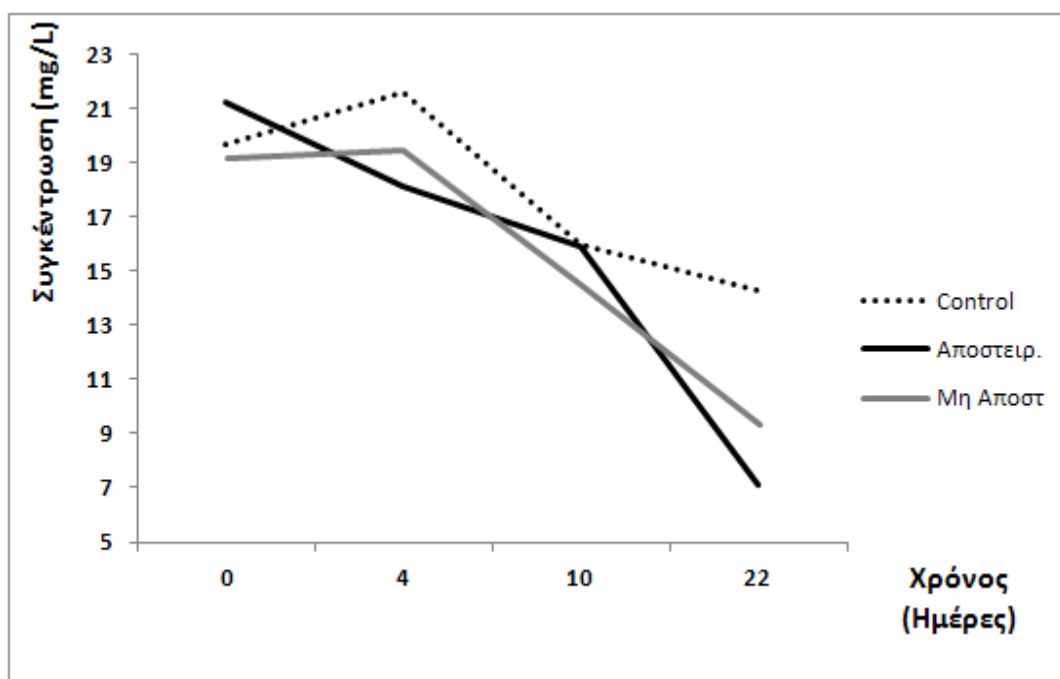


Διάγραμμα 7. Η αποδόμηση του oxamyl oxime σε θρεπτικό μέσο MSMN και σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSMN (control) κατά την διάρκεια του πρώτου κύκλου εμπλουτισμού. Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



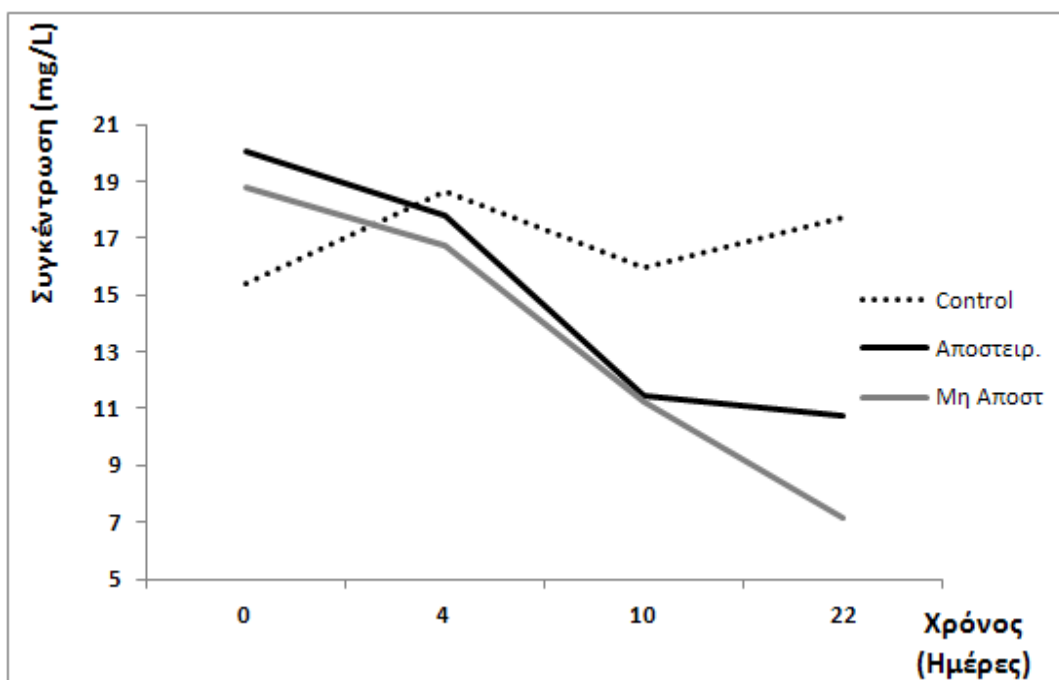
Διάγραμμα 8. Η αποδόμηση του oxamyl oxime σε θρεπτικό μέσο MSM και σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSM (control) κατά την διάρκεια του πρώτου κύκλου εμπλουτισμού. Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Καθώς δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε στα θρεπτικά μέσα MSM και MSMN εξετάστηκε η υπόθεση ότι προσθήκη εδάφους, αποστειρωμένου ή μη αποστειρωμένου, επιταχύνει την αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε σε αυτά τα θρεπτικά μέσα δρώντας ως επιφάνεια κατάλυσης (αποστειρωμένο έδαφος) ή ως πηγή βιομάζας για συμμεταβολική αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε. Για το λόγο αυτό στα θρεπτικά μέσα MSM και MSMN + οξαμυλ οξίμε στα οποία δεν είχε παρατηρηθεί αποδόμηση στον πρώτο κύκλο εμπλουτισμό προστέθηκαν 2,5 g αποστειρωμένου ή μη αποστειρωμένου εδάφους. Παράλληλα προετοιμάστηκε και μάρτυρας χωρίς προσθήκη εδάφους. Γενικότερα η προσθήκη εδάφους φάνηκε να επιταχύνει ελαφρώς την αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε στον θρεπτικό μέσο MSMN από τις 10 ημέρες και μετά σε σχέση με τον μάρτυρα όπου δεν είχε προστεθεί έδαφος (Διάγραμμα 9). Ανάλογη ήταν η εικόνα και στον θρεπτικό μέσο MSM όπου όμως η προσθήκη εδάφους επιτάχυνε σε σημαντικότερο βαθμό την αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε ιδιαίτερα μετά τις πρώτες 4 ημέρες (Διάγραμμα 10).



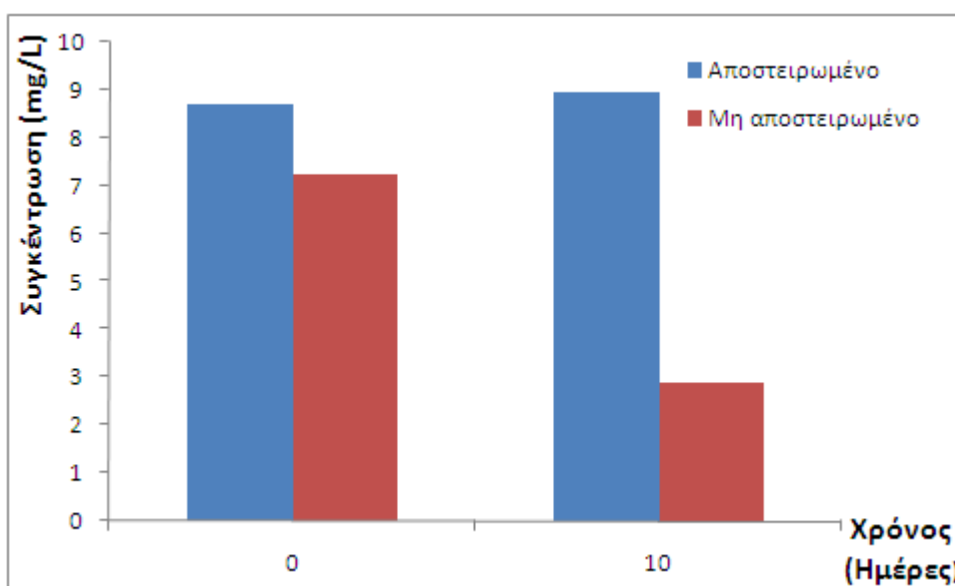
Διάγραμμα 9. Η αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε σε θρεπτικό μέσο MSMN ύστερα από προσθήκη αποστειρωμένου ή μη αποστειρωμένου εδάφους καθώς σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSMN (control).

Η αποστείρωση ή μη του εδάφους δεν έδειξε να επηρεάζει σημαντικά στην περίπτωση του MSMN (Διάγραμμα 9) ενώ μια μικρή διαφορά μεταξύ καλλιεργειών που αναμίχθηκαν με αποστειρωμένο και μη αποστειρωμένο έδαφος παρατηρήθηκε στις 22 ημέρες στις καλλιέργειες του MSM με αυξημένη αποδόμηση στις μεταχειρίσεις όπου προστέθηκε μη αποστειρωμένο έδαφος (Διάγραμμα 10).



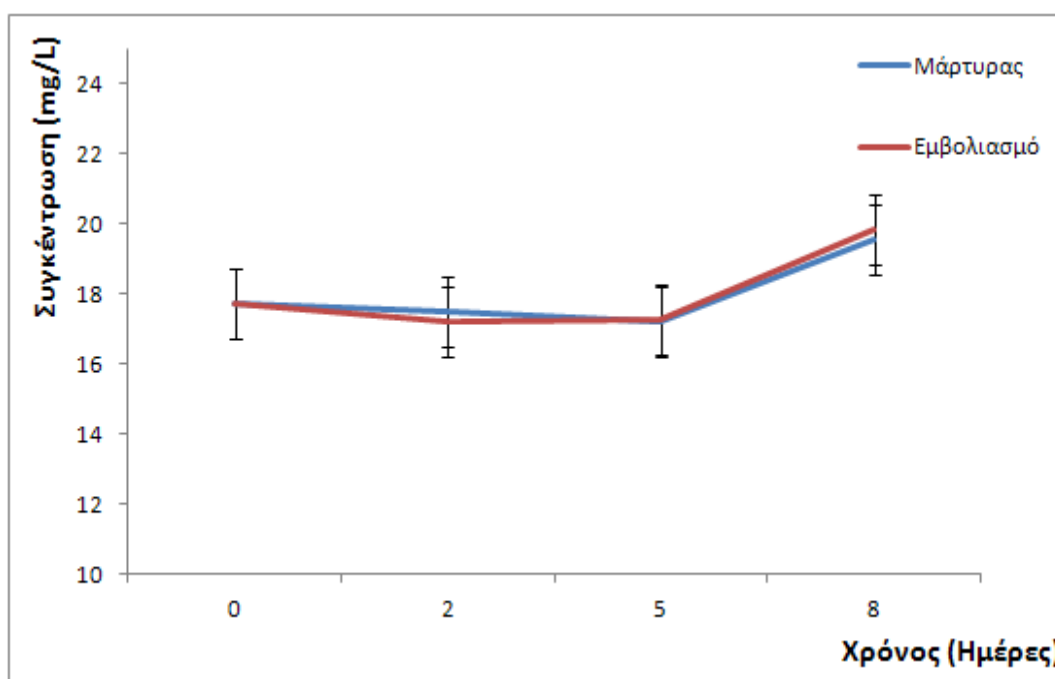
Διάγραμμα 10. Η αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε σε θρεπτικό μέσο MSM ύστερα από προσθήκη αποστειρωμένου ή μη αποστειρωμένου εδάφους καθώς σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSM (control).

Παράλληλα με τις καλλιέργειες εμπλουτισμού εξετάστηκε και η αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε σε έδαφος αποστειρωμένο και μη αποστειρωμένο χωρίς να γίνουν κάποιες επαναλήψεις λόγω έλλειψης επαρκούς ποσότητας εδάφους. Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 11 παρατηρείται διάσπαση του οξαμυλ οξίμε στο μη αποστειρωμένο έδαφος σε σχέση με το αποστειρωμένο. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μια πρώτη ένδειξη για την μικροβιακή αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε στο έδαφος. Η έλλειψη επαναλήψεων και παρατεταμένης χρονικά παρακολούθησης της αποδόμησης εμποδίζει την εξαγωγή περαιτέρω συμπερασμάτων.

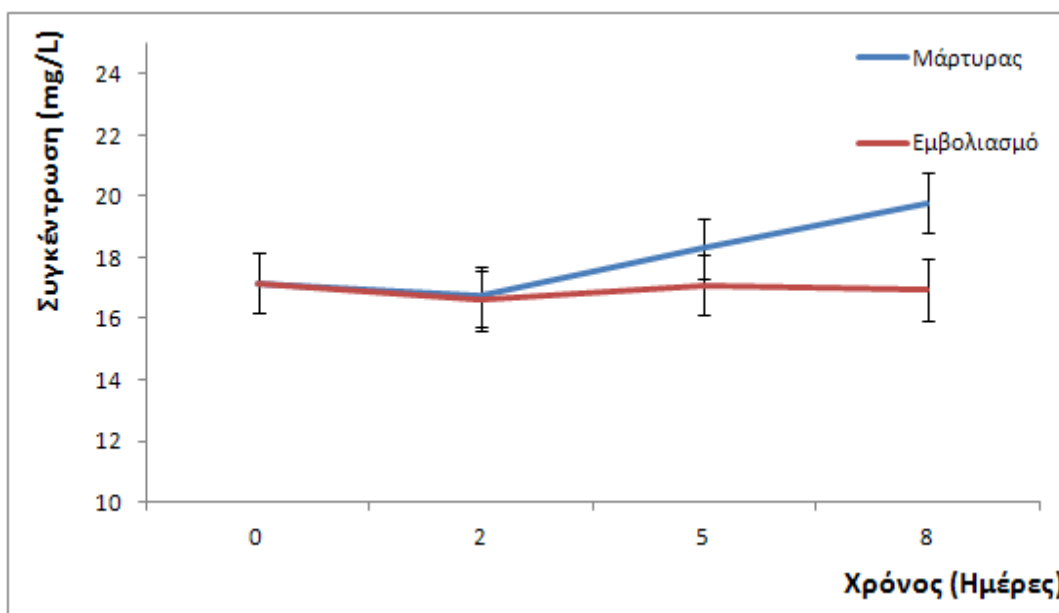


Διάγραμμα 11. Η αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε σε αποστειρωμένο και μη αποστειρωμένο έδαφος

Μετά την αποτυχία εμπλουτισμού για την αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα MSM και MSMN εξετάστηκε η υπόθεση ότι η αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε πραγματοποιείται από βακτήρια του εδάφους με συμμεταβολισμό και κατά συνέπεια απαιτείται η παρουσία και εναλλακτικών πηγών C και/ή N. Έτσι παρασκευάστηκαν δύο διαφορετικά μη εκλεκτικά θρεπτικά μέσα (SEM και MSM+N+succinate) για να εξεταστεί αν υπάρχει διάσπαση του οξαμυλ οξίμε από μικροοργανισμούς σε ανάλογες καλλιέργειες εμπλουτισμού. Γενικότερα δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε στα παραπάνω μη εκλεκτικά θρεπτικά μέσα σε σχέση με τον μη εμβολιασμένο μάρτυρα (Διαγράμματα 12 και 13).



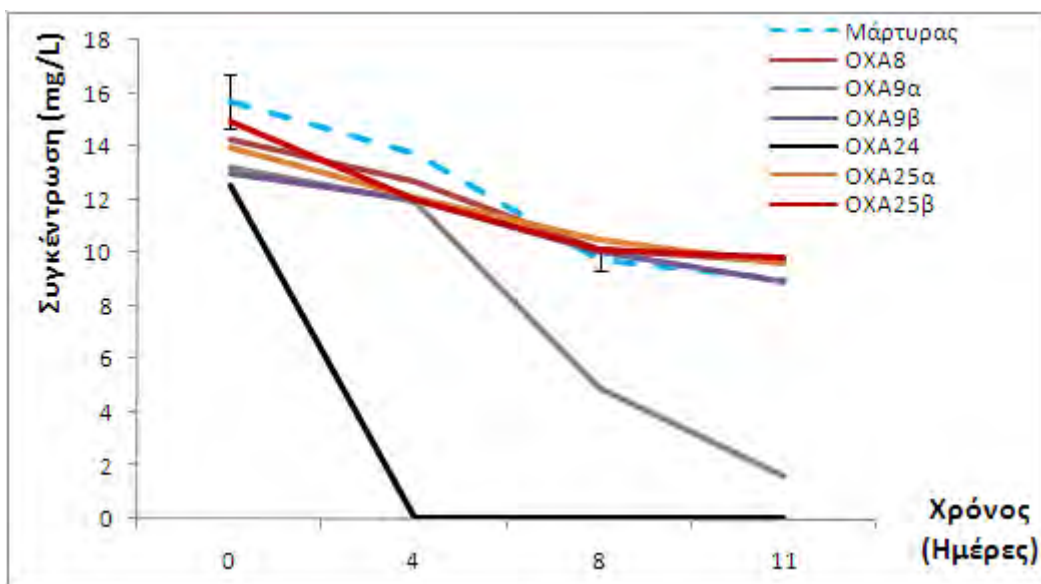
Διάγραμμα 12. Η αποδόμηση του οξαμυλ οξίμε σε θρεπτικό μέσο SEM και σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο SEM (control). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 13. Η αποδόμηση του οξαμυλ οξιμε σε θρεπτικό μέσο MSMN+succinate και σε μη εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSMN+succinate (control). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

3.3. Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το οξαμυλ

Από τις 35 αποικίες που επιλέχθηκαν συνολικά από τα τριβλία MSM + οξαμυλ μόνο έξι παρουσίασαν υψηλή αποδομητική ικανότητα. Στην συνέχεια ελέγχθηκαν αυτές οι έξι αποικίες σε υγρή καλλιέργεια MSM + οξαμυλ (20 mg/L) για να επιβεβαιωθεί ότι διατηρούν την αποδομητική τους ικανότητα και στην συνέχεια επιστρώθηκαν σε τριβλία για να ελεγχθεί η αμιγότητα τους. Από την ανάπτυξή τους μόνο δύο φαινόταν αμιγείς (OXA 8 και 24) ενώ αντίθετα οι καλλιέργειες OXA9 και OXA25 αποτελούσαν μίγμα δύο διαφορετικών μορφολογικά αποικιών. Έτσι τα μίγματα των διαφορετικών μορφολογικά αποικιών διαχωρίστηκαν και η αποδομητική τους δραστηριότητα μελετήθηκε εκ νέου σε υγρές καλλιέργειες του θρεπτικού μέσου MSM + Οξαμυλ. Τα αποτελέσματα της αποδόμησης των βακτηριακών στελεχών παρουσιάζονται στον Διάγραμμα 14.

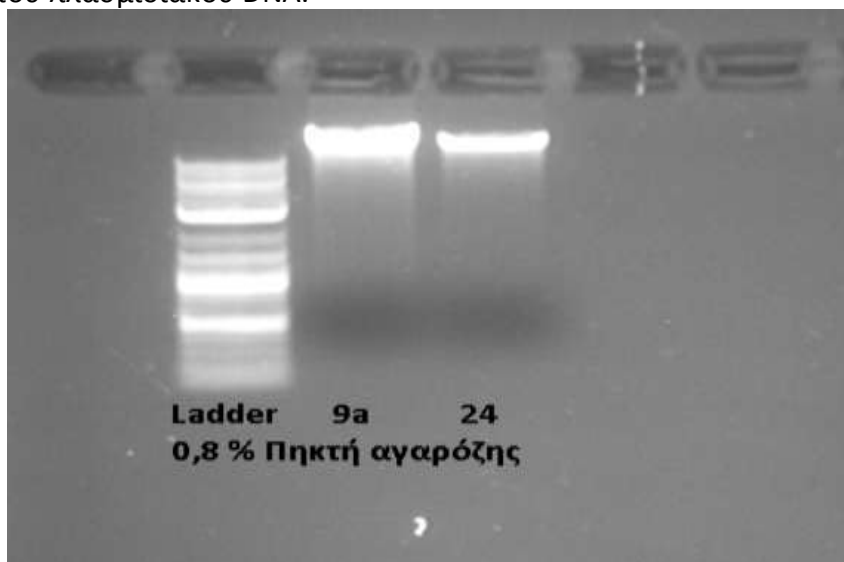


Διάγραμμα 14. Αποδόμηση του οξαμυλ από τα απομονωθέντα βακτήρια σε MSM + Οξαμυλ.

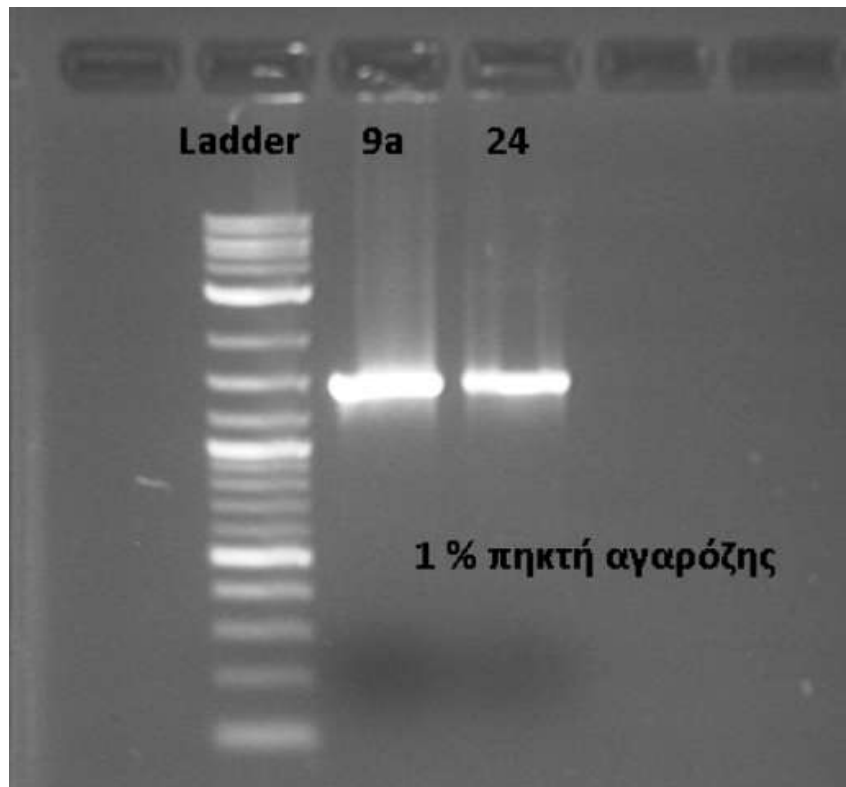
Όπως φαίνεται μόνο δύο από τα επιλεγέντα βακτηριακά στελέχη διατηρούσαν την αποδομητική τους ικανότητα, τα OXA9α και OXA24.

3.4. Ταυτοποίηση των βακτηρίων που αποδομούν το οξαμυλ

Ακολούθησε εξαγωγή DNA από τις αμιγείς καλλιέργειες των βακτηρίων, PCR ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA (1500 bp), καθαρισμός των PCR προϊόντων, ένθεση σε πλασμιδιακό φορέα, μετασχηματισμός σε δεκτικά βακτήρια *E. coli* και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

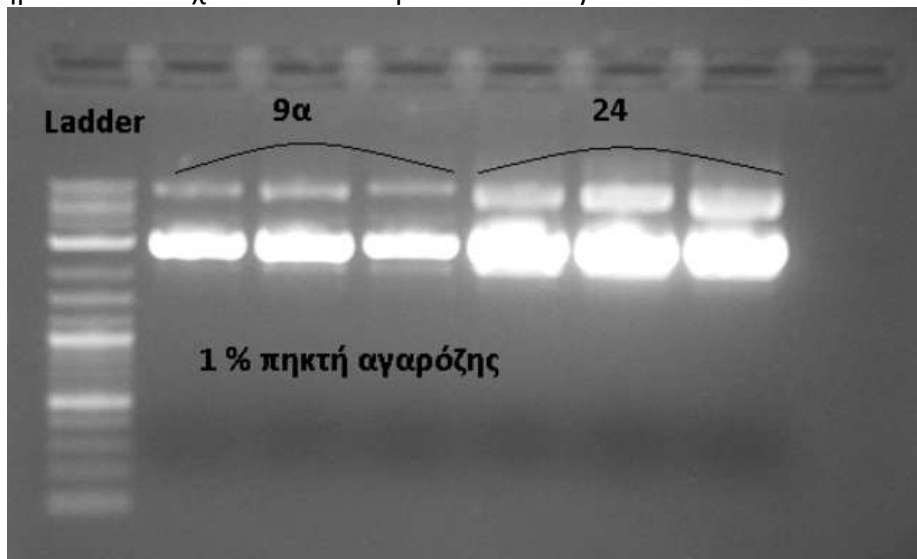


Εικόνα 2. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 0,8 % δειγμάτων DNA από τα βακτήρια 9α και 24. Στήλη 1^η: Ladder Biolabs 10 kb.



Εικόνα 3. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1 % PCR προϊόντων που προήλθαν από την ενίσχυση περιοχής του 16S rRNA γονιδίου των απομονωθέντων βακτηρίων. Στήλη 1^η : Ladder Biolabs 10 kb.

Ακολούθησε επιλογή πέντε αποικιών με το κατάλληλο ένθεμα, απομόνωση πλασμιδιακού DNA και αλληλούχιση του ενθέματος για ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών που αποδομούν το oxamyl.



Εικόνα 4. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1 % δειγμάτων πλασμιδιακού DNA από τρεις επαναλήψεις των απομονώσεων. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 2 μ L DNA και 2,5 μ L Ladder. Τα παραπάνω δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση.

Ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδίου 16S rRNA των δύο βακτηρίων που αποδομούσαν το oxamyl και ομοπαράθεσή τους στη βάση δεδομένων EMBL χρησιμοποιώντας το online εργαλείο BLAST έδειξε ότι το στέλεχος 9α ανήκε στο γένος *Aminobacter* και παρουσίασε υψηλή ομολογία (100%) με το *Aminobacter aminovorans* ενώ το στέλεχος 24 φάνηκε να αποτελείται από δύο βακτηριακά στελέχη τα οποία έδειξαν ομολογία 98 και 99 % αντίστοιχα με το 16S rRNA γονίδιο ενός στελέχους του είδους *Mesorhizobium tamadayense* και ενός *Pseudomonas stutzeri*.

Πίνακας 10. Ταυτοποίηση των απομονωθέντων βακτηρίων που εμφάνισαν αποδομητική δράση για το γεωργικό φάρμακο oxamyl

Αποδομομητικά βακτήρια Oxamyl	Υψηλότερη ομολογία αλληλουχίας (%)	Accession No.
Στέλεχος 9α	<i>Aminobacter aminovorans</i> (100%)	gb KC767647.1
Στέλεχος 24	<i>Mesorhizobium tamadayense</i> (98%)	emb FN563430.1
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (99%)	gb AY485995.1

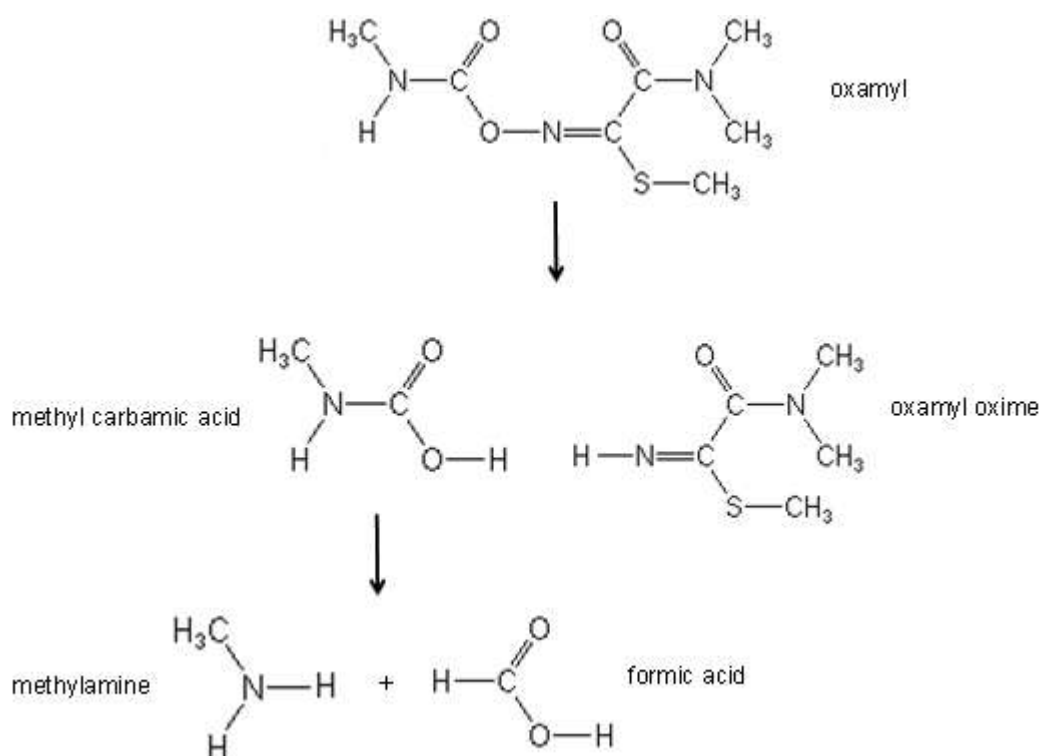
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Απομόνωση βακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης του oxamyl

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν φυλογενετικά δύο βακτηριακές καλλιέργειες ικανές να υδρολύουν ταχύτατα το καρβαμιδικό νηματωδοκτόνο oxamyl προς παραγωγή του οξιμικού παραγώγου του oxamyl oxime. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν βασιζόμενα στην πλήρη αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου ως *Aminobacter aminovorans* ενώ η δεύτερη βακτηριακή καλλιέργεια ήταν αξενική και αποτελούνταν από δύο μέλη που ταυτοποιήθηκαν ως *Mesorhizobium tamadayense* και *Pseudomonas stutzeri*. Τα τελευταία δύο βακτήρια δεν έχουν διαχωριστεί οπότε δεν είναι ποιο από τα δύο ή αν και τα δύο έχουν την δυνατότητα να διασπούν το γεωργικό φάρμακο oxamyl. Σημαντικός αριθμός προηγούμενων μελετών έχουν αναφερθεί στην απομόνωση βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* ικανών να αποδομούν ταχύτατα ποικιλία γεωργικών φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων καρβαμιδικών, (50), πυρεθροειδών (51), τριαζινών (52) και οργανοχλωριωμένων (53). Πολύ πρόσφατα, απομονώθηκαν βακτήρια από εδάφη που εμφάνισαν το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης για το oxamyl και τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως *Aminobacter* sp. σε συμφωνία με την παρούσα εργασία (54).

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ήταν σε θέση να χρησιμοποιούν το oxamyl ως μοναδική πηγή C και N καθώς αναπτύχθηκαν και κατάφεραν να αποδομούν το oxamyl σε θρεπτικό μέσο όπου αυτό αποτελεί την μοναδική πηγή C και N. Η αποδόμηση του oxamyl πραγματοποιήθηκε μέσω υδρόλυσης του καρβαμιδικού δεσμού για να σχηματιστεί το oxamyl oxime το οποίο δεν διασπάστηκε μετέπειτα από τα βακτήρια αλλά συσσωρεύτηκε στις καλλιέργειες (Διάγραμμα 6). Προηγούμενες μελέτες μεταβολισμού του oxamyl στο έδαφος έδειξαν ότι το oxamyl oxime αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη στο έδαφος (55). Επιπρόσθετα, σε μία άλλη έρευνα αναφέρθηκε ότι η υδρόλυση του oxamyl μπορεί να συμβεί ως αποτέλεσμα αβιοτικής και/ή βιοτικής δράσης και ότι ευνοείται υπό αλκαλικές συνθήκες. Παρόλα αυτά, το oxamyl όπως και τα περισσότερα καρβαμιδικά, κυρίως αποδομείται μικροβιακά στο έδαφος (56) και είναι ευπαθές στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης (57, 58). Σε παρόμοια μελέτη απομονώθηκε ένα στέλεχος του γένους *Paracoccus* που ήταν σε θέση να αποδομεί ταχύτατα το εντομοκτόνο methomyl, ένα καρβαμιδικό παρόμοιας χημικής δομής με το oxamyl, προς methomyl oxime (59).



Σχήμα 6. Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μεταβολικού μονοπατιού του oxamyl από τα βακτήρια που απομονώθηκαν

Η συσσώρευση του oxamyl oxime στο θρεπτικό μέσο καταδεικνύει ότι το μέθυλο-καρβαμικό οξύ (methyl carbamic acid) που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης του oxamyl πιθανώς χρησιμοποιείται από τα βακτήρια ως πηγή C και N. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει ότι η βακτηριακή αποδόμηση του carbofuran, ενός αρυλμεθυλο-καρβαμικού εντομοκτόνου, οδηγεί συνήθως στην απελευθέρωση του ίδιου μέθυλο καρβαμικού οξέος, το οποίο στη συνέχεια διασπάται προς μεθυλαμίνη και μυρμηγκικό οξύ που χρησιμοποιούνται από τα βακτήρια ως πηγές N και C αντίστοιχα (34, 36, 60).

Από την άλλη μεριά δεν κατέστη δυνατό να απομονώσουμε βακτήρια που να αποδομούν τον κύριο μεταβολίτη του oxamyl, oxamyl oxime, παρά το γεγονός ότι το συγκεκριμένο προϊόν μεταβολισμού δεν φαίνεται να εμμένει στο συγκεκριμένο έδαφος μετά τον σχηματισμό του. Έτσι με βάση την αποτυχία εμπλουτισμού σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα θεωρήθηκε ότι είτε α) η αποδόμηση του oxamyl oxime στο έδαφος πραγματοποιείται στο έδαφος συμμεταβολικά από μη εξειδικευμένους μικροοργανισμούς ή β) η αποδόμηση του oxamyl oxime στο έδαφος είναι αβιοτική. Η πρώτη υπόθεση δεν επιβεβαιώθηκε αρχικά καθώς το oxamyl oxime δεν αποδομήθηκε αποτελεσματικά σε μη εκλεκτικά θρεπτικά μέσα όπως Soil Extract Medium και MSMN+ηλεκτρικό οξύ. Ακολούθως εξετάστηκε εάν η αποδόμηση του oxamyl oxime στο έδαφος ήταν βιοτική ή αβιοτική. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην αποδόμηση του oxamyl oxime στο έδαφος συμμετέχουν τόσο αβιοτικές όσο και βιοτικές διεργασίες. Περαιτέρω μελέτες με προσθήκη εδάφους σε εμπλουτισμένες καλλιέργειες που δεν είχαν δείξει

αποδόμηση του οξαμγl oxime έδειξαν μια σταδιακή επιτάχυνση του καταδεικνύοντας τον βιοτικό αλλά και αβιοτικό (ως επιφάνεια κατάλυσης) ρόλο του παρουσίας του εδάφους στην αποδόμηση του οξαμγl oxime.

4.2. Μελλοντική ερευνητική κατεύθυνση

Ακόλουθες μελέτες θα στοχεύσουν:

1. Τα απομονωθέντα στελέχη θα χρησιμοποιηθούν για την μοριακή μελέτη του μεταβολικού μονοπατιού του οξαμγl για την διερεύνηση των γονιδίων, ενζύμων και μεταβολιτών που εμπλέκονται.
2. Στην απομόνωση και ταυτοποίηση αμιγών βακτηριακών στελεχών από τις αξενικές καλλιέργειες που είχαν την ικανότητα να διασπούν το οξαμγl.

Βιβλιογραφία

1. Singh B. K., Walker A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 428-471.
2. Malato S., Caceres J., Agüera A., Mezcua M., Hernando D., Vial J., Fernandez-Alba A.R., (2001). Degradation of imidacloprid in water by photo-Fenton and TiO₂ photocatalysis at a solar pilot plant: A comparative study, *Environmental Science and Technology*, 35, 4359-4366.
3. Tagusawava F., Jacobson R. A. (1977). Crystal and Molecular Structure of Carbamate Insecticides. 1. Mesurol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 329.
4. WHO (World Health Organization), (1979). «Environmental health criteria 9:DDT», *Arch. Environmental Health* 33:169.
5. Dragun J., Kuffner A.C., Schneiter R.W. (1984). Groundwater contamination. 1. Transport and transformation of organic chemicals. *Chemical Engineering*, 91, 65-70.
6. EPA (2004) <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets>.
7. Post. (1998) Organophosphate (Post note 12). Parliamentary Office of science and Technology, London, UK.
8. Mulchandani A., Kaneva I., Chen W. (1999a). Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 216-223.
9. Karalliedde L., Senanayake N. (1999). Organophosphorus insecticide poisoning. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry* 11, 4-9.
10. MAFF/HSE. (1995). Annual report of the working party on pesticide residue. HMSO.
11. Pesticide Trust. (1996). Pesticide Trust Review. Pesticide Trust, London
12. Aislabie J., Loyd-Jones G. (1995). A Review of Bacterial Degradation of Pesticides, *Australian Journal of Soil Research*, 33: 925-942.
13. MacRae, I.C. (1989). Microbial metabolism of pesticides and structurally related compounds. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 109:1-87.
14. Karpouzas D.G., Walker A. (2000). Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* strains epl and II to degrade the organophosphate ethoprophos. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 40-48.

15. Karpouzias D.G., Fotopoulou A., Menkissoglu Spiroudi O., Singh B.K. (2005). Non-specific biodegradation of the organophosphorus pesticides, cadusafos and ethoprophos, by two bacterial isolates. *FEMS Microbiology Ecology*, 53, 369-378.
16. Φωτοπούλου Δ. Α. (2004). Απομόνωση και χαρακτηρισμός βακτηρίων που αποδομούν το νηματωδοκτόνο cadusafos στο έδαφος. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Γεωπονίας, Τομέας Φυτοπροστασίας
17. Charman, R.A., Harris, C.R. (1990). Enhanced degradation of insecticides in soil: Factors influencing the development and effects of enhanced microbial activity. In: Racke, K.D., Coats, J.R. (Eds.), *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 82-96.
18. Singh B.K. Kuhad R.C. (1999). Biodegradation of lindane by the white-rot fungus *Trametes hirsutus*. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 238-241
19. Singh B.K. Kuhad R.C. (2000). Degradation of the pesticide lindane by the white-rot fungi *Cyathus bulleri* and *Phanerochaete sordid*. *Pest Management Science*, 56, 142-146
20. Singh B.K. Kuhad R.C., Singh A., Lal R., Tripathi K.K. (1999). Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 19, 197-225
21. Walker A., Roberts A.J. (1993). Degradation biodegradation and enhanced biodegradation. *Proceedings IX Symposium Pesticide Chemistry, Mobility and Degradation of Xenobiotics*, Piacenza, Italy, 357-370.
22. Singh B.K., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D.J. (2003b). Role of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5198-5206.
23. Singh B.K., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D.J. (2004). Biodegradation of Chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in the bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4855-4863
24. Siddaramappa R., Rajaram K.P., Sethunathan N.N. (1973). Degradation of parathion by bacteria isolated from flooded soil, *Applied Microbiology*, 70, 846-849.
25. Tolbot H.W., Johnson L.M., Munneck D.M. (1984). Glyphosate utilization by *Pseudomonas* sp. and *Alcaligenes* sp. Isolated from environmental sources. *Current Microbiology*, 10, 255-259.

26. Dejonghe W., Berteloot E., Goris J., Boon N., Crul K., Maertens S., Hofte M., De Vos P., Verstraete W., Top E.M. (2002). *Applies and Environmental Microbiology*, 69, 1532-1541.
27. Swetha V.P., Phale P.S. (2005). Metabolism of Carbaryl via 1,2 Dihydroxynaphthalene by Soil Isolates pseudomonas sp. Strains C4, C5 and C6. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5951-5956.
28. Chanika E., Georgiadou D., Soueref E., Karas P., Karanasios E., Tsiropoulos N., Tzortzakakis E., Karpouzas D., (2011). Isolation of soil bacteria able to hydrolyze both organophosphate and carbamate pesticides. *Bioresource Technology*, 102, 3184–3192.
29. Bjørling-Poulsen M., Raun Andersen H. & Grandjean P. (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *BioMed Central*. 7:50.
30. Kuhr R.J., Dorough H.W., (1976). *Carbamate insecticide: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*, CRC Press Inc.
31. Karpouzas D.G., Karanasios E., Menkissoglu-Spiroudi U. (2003). Enhanced microbial degradation of cadusafos in soils from potato monoculture: demonstration and characterization. *Chemosphere*, 56, 549-559.
32. Ou L.T., Thomas J.E. (1994). Influence of soil organic matter and soil surfaces on a bacterial consortium that mineralises fenamiphos. *Soil Science Society of America Journal*, 58, 1148-1153.
33. Ramanand K., Sharmila M., Sethunathan N. (1988). Mineralization of Carbofuran by a Soil Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2129-2133.
34. Karns, J.S., Mulbry W.W., Nelson J.O., Kerney P.C. (1986). Metabolism of carbofuran by a pure bacterial culture. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 25, 211-217.
35. Chauldry G.R., Ali H.D. (1988). Bacterial metabolism of carbofuran. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1414-1419.
36. Feng X., Ou L.T., Ogram A. (1997). Plasmid mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. Strain CF06. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1332-1337.
37. Karayilanoglu T., Kenar L., Serdar M., Kose S., Aydin A. (2008). Bacterial biodegradation of aldicarb and determination of bacterium which has the most biodegradable effect. *Turkish Journal of Biochemistry*, 33, 209-214.
38. Kok F.N., Arica M.Y., Hahcigil C., Alaeddinoglu G., Hasirci V. (1999). Biodegradation of aldicarb in a packed-bed reactor by immobilized *Methylosinus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 291-296.

39. Karpouzias D.G., Morgan J.A.W., Walker A. (2000a). Isolation and characterisation of ethoprophos-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 33, 209-218.
40. Mervat S. M. (2009). Degradation of methomyl by a novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* M1. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12, 0717-3458.
41. Gerstl Z. (1984). Adsorption, decomposition and movement of oxamyl in soil. *Pesticide Science*, 15:9-17.
42. Bromilow R.H., Baker R.J., Freeman M.A.H., Corog K. (1980). The degradation of aldicarb and oxamyl in soil. *Pesticide Science*. 11:371-378
43. Smelt J, Dekker A, Leistra M, Houx N. (1983). Conversion of four carbamoyloximes in soil samples from above and below the soil water table. *Pesticide Science*. 14:173-181.
44. Spare, W.C. (1991). Anaerobic soil metabolism of [1-14C]oxamyl in Madera, California soil. E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, U.S.A. DuPont Report No. AMR 1851-90.
45. Hawkins, D.R., Mayo, B.C., Pollard, A.D. and Donschak, W.W. (1989). The metabolism of 14C-oxamyl in silt loam soil under aerobic and anaerobic conditions. E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, U.S.A. DuPont Report No. AMR 1200-88.
46. Mattson, S.L. and Smyser, B.P. (2000). Rate of degradation of oxamyl in three aerobic soils. E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, U.S.A. DuPont Report No. DuPont-2957.
47. Harvey, J., Jr. and Han, J.C-Y. (1978) Decomposition of oxamyl in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(3), 536-541.
48. McNally, M.E.P. and Wheeler, J.R. (1988). Hydrolysis of [1-14C] oxamyl. E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, U.S.A. DuPont Report No. AMR 961-87.
49. Rao PSC and Hornsby AG, (2001). Behavior of pesticides in soil and water. Institute of food and Agricultural Science, University of Florida. Florida. U.S.A.
50. Bano N., Musarrat J. (2006). Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral biocontrol and plant growth promoting potential. *FEMS Microbiology Letters*, 231, 13-17.
51. Malik D., Singh M., Bhatia P. (2009). Biodegradation of cypermethrin by a *Pseudomonas* strain Cyp19 and its use in bioremediation of contaminated soil. *The Internet Journal of Microbiology* 6.
52. De Souza M.L., Wackett L.P., Sadowsky M.J. (1998). The atzABC genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible

- plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2323-2326.
53. Sarkar S., Satheskumar A., Premkumar R. (2009). Biodegradation of dicofol by *Pseudomonas* strains isolated from tea rhizosphere microflora. *International Journal of Integrative Biology*, 5, 164-166.
 54. Osborn R.K., Haydock P.P.J., Edwards S.G. (2010). Isolation and identification of oxamyl-degrading bacteria from UK agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1-3.
 55. Ou L.T., Rao P.S.C. (1986). Degradation and metabolism of oxamyl and phenamiphos in soil. *Journal of Environmental Science and Health PartB*, 21, 25-40.
 56. Osman K.A., Al-Rehiayani S.M., Al-Deghairi M.A., Salama A.K. (2009). Bioremediation of oxamyl in sandy soil using animal manures. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63, 341-346.
 57. Smelt J.H., Crum S.J.H., Teunissen W., Leistra M. (1987). Accelerated transformation of aldicarb, oxamyl and ethoprophos after repeated soil treatments. *Crop Protecion*, 6, 253-261.
 58. Osborn R.K., Edwards S.G., Wilcox A., Haydock P.P.J. (2010a). Potential enhancement of degradation of the nematicides aldicarb, oxamyl and fosthiazate in UK agricultural soils through repeated applications. *Pest Management Science*, 66, 253-261.
 59. Xu J.L., Wu J., Wang Z.C., Wang K., Li M.Y., Jiang J.D., He J., Li S.P. (2009). Isolation and characterization of a methomyl-degrading *Paracoccus* sp. Msw-1. *Pedosphere*, 19, 238-243.
 60. Peng X., Zhang J.S., Li Y.Y., Li W., Xu G.M. Yan Y.C. (2008). Biodegradation of insecticide carbofuran by *Paracoccus* sp. YM3. *Journal of Environmental Science and Health PartB*, 43, 588-594.