

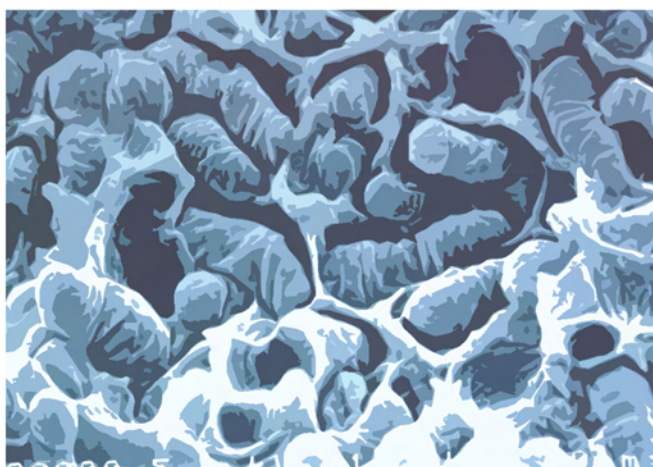


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ:
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ & ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια
ΔΑΦΝΗ ΓΕΩΡΓΙΑΔΟΥ**

**Αξιολόγηση της ικανότητας βακτηρίων
να διασπούν τα νηματωδοκτόνα fenamiphos και oxamyl
και απομόνωση των γονιδίων
που εμπλέκονται στην υδρόλυση του oxamyl**



ΛΑΡΙΣΑ 2010

Αξιολόγηση της ικανότητας βακτηρίων να διασπούν τα νηματοδοκτόνα fenamiphos και oxamyl και απομόνωση των γονιδίων που εμπλέκονται στην υδρόλυση του oxamyl

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, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθιές μου ευχαριστίες στους καθηγητές μου κ. Δημήτριο Καρπούζα, Επίκουρο Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στην κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη καθοδήγηση και διδακτική τους στήριξη.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Καρα για την ανυπολόγιστη βοήθεια και συμβολή του στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Κατσαρού και το μεταδιδακτορικό ερευνητή Κωνσταντίνο Δελή για την πολύτιμη παραίνεσή τους και βοήθεια. Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τις υποψήφιες διδάκτορες Αφροδίτη Κροκιδά και Ιωάννα Μύρτζιου για τις συμβουλές τους, και κάθε συνάδελφο ξεχωριστά για τη συνεχή βοήθεια και συνδρομή τους.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη υποστήριξη και συμπαράστασή της όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
ΕΝΟΤΗΤΑ 1 Περιβαλλοντική τύχη γεωργικών φαρμάκων και ρύπανση	7
1.1. Προσρόφιση και μετακίνηση γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος	7
1.2. Μικροβιακή αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων	8
ΕΝΟΤΗΤΑ 2 Οργανοφωσφορικά φάρμακα	10
2.1. Χημική δομή οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	10
2.2. Τρόπος δράσης των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων.....	11
2.3. Μικροβιακή διάσπαση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	11
2.3.1. Chlorpyrifos.....	12
2.3.2. Dimethoate.....	13
2.3.3. Cadusafos.....	14
2.3.4. Fenthion.....	15
2.3.5. Fenamiphos.....	16
ΕΝΟΤΗΤΑ 3 Καρβαμιδικά φάρμακα.....	19
3.1. Χημική δομή καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.....	19
3.2. Τρόπος δράσης των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.....	20
3.3. Μικροβιακή διάσπαση καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.....	20
3.3.1. Aldicarb.....	20
3.3.2. Methomyl.....	22
3.3.3. Carbaryl.....	22
3.3.4. Carbofuran.....	23
3.3.5. Oxamyl.....	24
ΕΝΟΤΗΤΑ 4 Συστήματα γονιδίων-ενζύμων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση οργανοφωσφορικών.....	27
4.1. OPH/opd.....	27
4.2. OPDA/opdA.....	28
4.3. OPAA/oraA.....	28
4.4 Άλλα ένζυμα και γονίδια που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση οργανοφωσφορικών.....	29
ΕΝΟΤΗΤΑ 5 Συστήματα γονιδίων-ενζύμων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση καρβαμιδικών.....	30
5.1. MCD/mcd.....	30
5.2. CehA/cehA.....	31
5.3. CahA/cahA.....	32

5.4 Άλλα ένζυμα και γονίδια που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση καρβαμικών.....	33
ΣΤΟΧΟΙ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	34
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
Διαλύματα γεωργικών φαρμάκων.....	35
Θρεπτικά υποστρώματα.....	36
Βακτηριακά στελέχη	38
Μέθοδος ανάλυσης γεωργικών φαρμάκων και HPLC.....	38
Διαλύτες και πρότυπα διαλύματα γεωργικών φαρμάκων.....	39
Καμπύλες αναφοράς.....	39
Ανάλυση γεωργικών φαρμάκων.....	39
1. Επίδραση της συγκέντρωσης του oxamyl στην αποδομητική ικανότητα των βακτηρίων.....	40
2. Επίδραση της συγκέντρωσης του fenamiphos στην αποδομητική ικανότητα των βακτηρίων.....	41
3. Αξιολόγηση της ικανότητας του βακτηρίου <i>P. jinjuensis</i> OXA20 να διασπά άλλα καρβαμικά και οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα.....	41
4. Αξιολόγηση της ικανότητας του βακτηρίου <i>P. putida</i> FEN1 να διασπά άλλα οργανοφωσφορικά και καρβαμικά γεωργικά φάρμακα	42
5. Αξιολόγηση της ικανότητας των αποδομητικών βακτηρίων να απομακρύνουν υψηλές συγκεντρώσεις του fenamiphos όταν εμβολιαστούν στο έδαφος ...	42
6. Απομόνωση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση του oxamyl	44
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
1. Επίδραση της συγκέντρωσης του oxamyl στην αποδομητική ικανότητα των βακτηρίων	52
2. Επίδραση της συγκέντρωσης του fenamiphos στην αποδομητική ικανότητα των βακτηρίων	53
3. Αξιολόγηση της ικανότητας του βακτηρίου <i>P. jinjuensis</i> OXA20 να διασπά άλλα καρβαμικά και οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	54
4. Αξιολόγηση της ικανότητας του βακτηρίου <i>P. putida</i> FEN1 να διασπά άλλα οργανοφωσφορικά και καρβαμικά γεωργικά φάρμακα	55
5. Αξιολόγηση της ικανότητας των αποδομητικών βακτηρίων να απομακρύνουν υψηλές συγκεντρώσεις του fenamiphos όταν εμβολιαστούν στο έδαφος.....	57
6. Απομόνωση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση του oxamyl	58
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Βακτήρια ικανά να διασπούν το καρβαμιδικό νηματωδοκτόνο oxamyl ή το οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο fenamiphos εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αποδομούν άλλα καρβαμιδικά ή οργανοφωσφορικά φάρμακα παραπλήσιας χημικής δομής. Τα στελέχη που απομονώθηκαν ως αποδομητές του oxamyl παρουσίασαν ευρεία ικανότητα αποδόμησης και κατάφεραν να διασπάσουν τόσο τα οξιμικά καρβαμιδικά aldicarb, methomyl αλλά και τα άρυλ-μέθυλο καρβαμιδικά carbaryl και carbofuran αλλά όχι το fenamiphos. Αντίστοιχα, το στέλεχος *P. putida* FEN1 που απομονώθηκε ως αποδομητής του fenamiphos ήταν ικανό να διασπά τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα fenthion και chlorpyrifos, που περιείχαν P-O-C δεσμό στο μόριο τους αλλά και τα καρβαμιδικά oxamyl και carbofuran, αλλά όχι τα οργανοφωσφορικά dimethoate και cadusafos που περιείχαν P-S-C δεσμό. Τα βακτηριακά στελέχη που αξιολογήθηκαν κατάφεραν να μεταβολίζουν υψηλές συγκεντρώσεις oxamyl και fenamiphos σε υγρές καλλιέργειες και έδαφος αντίστοιχα. Τέλος από τα βακτήρια που αποδομούσαν το oxamyl απομονώθηκε ένα γονίδιο που παρουσίαζε ταυτόσημη αλληλουχία με την αλληλουχία του γονιδίου *cehA*, που είχε απομονωθεί από βακτηριακό στέλεχος του γένους *Rhizobium* και κωδικοποιεί το ένζυμο που ήταν υπεύθυνο για την υδρόλυση του carbaryl. Το συγκεκριμένο γονίδιο σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύθηκε σε πλασμιδιακό DNA.

Bacteria capable of degrading the carbamate nematocide oxamyl or the organophosphorus nematocide fenamiphos were tested for their ability to degrade other carbamates and organophosphates of similar structure. Strains isolated as oxamyl degraders were also able to degrade carbamate pesticides aldicarb, methomyl, carbaryl and carbofuran, but not organophosphorus fenamiphos. *P. jinjuensis* OXA20 strain was able to degrade both oximic (aldicarb, methomyl, oxamyl) and arylmethyl carbamate pesticides (carbaryl and carbofuran) but failed to degrade the organophosphate fenamiphos. On the other hand, *P. putida* FEN1, a fenamiphos-degrading strain, was able to degrade the organophosphorus pesticides fenthion and chlorpyrifos which possess a P-O-C bond in their molecules but also the carbamates oxamyl and carbofuran. However they could not degrade the organophosphates dimethoate and cadusafos which possessed a P-S-C bond in their molecule. This is the first report for the isolation of a wild type strain which was able to rapidly degrade both organophosphate and carbamate pesticides. Moreover, it was found that the oxamyl and fenamiphos-degrading strains tested were able to completely degrade high concentrations of these pesticides at liquid cultures and in soil respectively. A gene which showed identical homology with gene *cehA* encoding a carbamate hydrolase was isolated from the oxamyl-degrading bacteria. The gene, was located in plasmid DNA.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΝΟΤΗΤΑ 1^η

Περιβαλλοντική τύχη γεωργικών φαρμάκων και ρύπανση

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 μη ορθολογική χρήση των φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων έχει δυσμενείς συνέπειες λόγω της υποβάθμισης του περιβάλλοντος, της ανάπτυξης εχθρών των καλλιεργειών με ανθεκτικότητα στα γεωργικά φάρμακα, την παρουσία υπολειμμάτων στα παραγόμενα προϊόντα.

Μέχρι τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο οι ουσίες που χρησιμοποιούνταν για την καταπολέμηση των αρθροπόδων (εντόμων και ακάρεων) στη γεωργία ήταν σχετικά λίγες, και πολλές από αυτές ήταν φυσικής προέλευσης όπως η νικοτίνη, το πύρεθρο, η ροτενόνη, αλλά και ανόργανες χημικές ενώσεις όπως το υποκαπνιστικό υδροκυάνιο, το αρσενικό ασβέστιο κ.α. Η εποχή της χημικής καταπολέμησης των αρθροπόδων και των νηματωδών άρχισε μετά το Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο με τις ανακαλύψεις και τη σταδιακή διεύρυνση της χρησιμοποίησης πολυάριθμων συνθετικών οργανικών ουσιών, με πρώτο το DDT. Σήμερα η αυξανόμενη ανάγκη για καλύτερη προστασία των καλλιεργειών έχει πολλαπλασιάσει τις επεμβάσεις με χημικές ουσίες. Συνολικά, πάνω από 1 δισεκατομμύρια τόνοι γεωργικών φαρμάκων χρησιμοποιούνται ετησίως, με παραπάνω από το 98% των ψεκαζόμενων εντομοκτόνων και το 95% των ζιζανιοκτόνων να καταλήγουν σε οργανισμούς μη-στόχους ρυπαίνοντας την ατμόσφαιρα, το έδαφος και τον υδροφόρο ορίζοντα (Miller, 2004).

1.1. Προσρόφηση και μετακίνηση γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος

Οι διεργασίες που καθορίζουν την τύχη των οργανικών ουσιών στο περιβάλλον είναι η προσρόφησης τους στη στερεή φάση του εδάφους, η μετακίνηση και η αποικοδόμησή τους (Zalidis *et al.*, 2002). Η προσρόφηση αναφέρεται ως η ικανότητα του εδάφους να συγκρατεί μια οργανική ουσία και να εμποδίζει την περαιτέρω κίνησή της μέσω του εδαφικού διαλύματος. Οι διεργασίες που υπεισέρχονται στη συγκράτηση είναι πολύπλοκες και αυτό οφείλεται κυρίως στην ετερογένεια του εδάφους και τη φύση των οργανικών ρύπων.

Οι σημαντικότεροι τρόποι μετακίνησης των γεωργικών φαρμάκων από τον τόπο εφαρμογής τους θεωρούνται: α) η έκπλυση (leaching) προς τα αβαθή και βαθιά υπόγεια νερά, β) η απορροή (runoff) με ταυτόχρονη διάβρωση εδαφών, προς τα

επιφανειακά νερά, γ) η μεταφορά ψεκαστικού υγρού κατά τον ψεκασμό σε μεγάλες αποστάσεις (drift) και δ) η εξάτμιση γεωργικών φαρμάκων από τις ψεκασμένες επιφάνειες, μεταφορά αυτών δια της ατμόσφαιρας και επαναφορά στη γη δια των κατακρημνίσεων (Arnold 1995). Η πιθανότητα έκπλυσης ενός γεωργικού φαρμάκου στα υπόγεια νερά εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου (υδατοδιαλυτότητα, πτητικότητα), φυσικοχημικές ιδιότητες (σύσταση, οργανική ουσία, pH) και υδρογεωλογικά χαρακτηριστικά του εδάφους (βάθος υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα), τις κλιματικές συνθήκες (ύψος βροχόπτωσης) και τις αγροτικές πρακτικές που χρησιμοποιούνται (είδος καλλιέργειας, τρόπος και χρόνος εφαρμογής). Όταν η όμως οργανική ουσία δεν είναι ενσωματωμένη στο επιφανειακό εδαφικό στρώμα, τότε παρατηρείται επιφανειακή απορροή, αυξάνοντας τον ενδεχόμενο κίνδυνο ρύπανσης και άλλων εδαφών και επιφανειακών υδάτων. Τέλος, η εξάτμιση αποτελεί σημαντικό τρόπο διαφυγής των γεωργικών φαρμάκων από το έδαφος και οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό εξάτμισης είναι η πτητικότητα της κάθε ουσίας (τάση ατμών), η προσρόφησή της στις ενεργές θέσεις του εδάφους, η υγρασία και η θερμοκρασία του εδάφους.

1.2. Μικροβιακή αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων

Πολλές ανθρωπογενείς οργανικές ουσίες που αναπτύχθηκαν τον 20^ο αιώνα, όπως τα παρασιτοκτόνα και τα πλαστικά, έχουν διεγείρει τους αποικοδομητικούς μηχανισμούς των μικροοργανισμών. Η διαδικασία της βιοαποδόμησης συμβάλλει στη διάσπαση μιας ουσίας σε απλούστερα προϊόντα που δεν αποτελούν στις περισσότερες περιπτώσεις περιβαλλοντικούς ρύπους (Aislabie and Loyd-Jones, 1995). Έτσι, η μικροβιακή αποδόμηση θεωρείται η σημαντικότερη διαδικασία για τις περισσότερες σύγχρονες ομάδες γεωργικών φαρμάκων και ιδιαίτερα για τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα (MacRae, 1989) και εμποδίζει τη συσσώρευση τους στο περιβάλλον.

Ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό της μικροβιακής αποδόμησης ενός γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος είναι η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του ίδιου του φαρμάκου ή άλλου γεωργικού φαρμάκου με παρόμοια χημική δομή. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση (Racke, 1990), και μπορεί να επιφέρει οικονομικές απώλειες στους καλλιεργητές. Αποτελεί αποτέλεσμα της σταδιακής μικροβιακής προσαρμογής στο εφαρμοζόμενο γεωργικό φάρμακο και στην ακραία του μορφή οδηγεί συνήθως σε σημαντική μείωση στην αποτελεσματικότητα του γεωργικού φαρμάκου (Karpouzas and Walker, 2000).

Συνέπεια της συνεχούς αποκάλυψης ότι πολλά από τα παρασιτοκτόνα που χρησιμοποιούνταν μετά το Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο προξενούσαν δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον, ήταν η αντικατάσταση κυρίως των ιδιαίτερα υπολειμματικών οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων από νέα, αποδομήσιμα γεωργικά φάρμακα (κυρίως οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά). Ωστόσο, η μικροβιακή προσαρμογή στα νέα εφαρμοζόμενα γεωργικά φάρμακα αναγνωρίστηκε σύντομα μετά την

κυκλοφορία τους στην αγορά, με αναφορές στις περιπτώσεις των diazinon, EPTC και carbofuran, τα οποία δεν ήταν πλέον ικανά να παρέχουν έλεγχο ενάντια στους εχθρούς – στόχους τους (Sethunathan, 1973, Felsot *et al.*, 1981; Rahman and James, 1983). Περαιτέρω έρευνες μέχρι σήμερα αποκαλύπτουν τη δυναμική φύση του φαινομένου της επιταχυνόμενης βιοαποικοδόμησης, καθώς ένας αυξανόμενος αριθμός γεωργικών φαρμάκων φαίνεται πια να επηρεάζεται από το φαινόμενο, συμπεριλαμβανομένων και των νηματωδοκτόνων fenamiphos και oxamyl.

Η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος, χαρακτηρίζεται συνήθως από μία φάση αρχικής βραδείας αποδόμησης, η οποία συμβαίνει αμέσως μετά την εφαρμογή του στο έδαφος. Η φάση αυτή, γνωστή ως φάση υστέρησης (lag phase), ακολουθείται από τη φάση ταχείας αποδόμησης (Φωτοπούλου Δ. Α. 2004). Θεωρητικά, η μικροβιακή προσαρμογή για την αποδόμηση ενός συγκεκριμένου χημικού στο έδαφος πιθανώς αντανακλά:

- Αύξηση στη δραστηριότητα αποδόμησης ενός περιορισμένου αριθμού μικροοργανισμών αρχικά, λόγω επιλεγμένης γονιδιακής έκφρασης
- Αύξηση στον πληθυσμό των αποδομητών εξαιτίας μικροβιακής ανάπτυξης και/ή οριζόντιας γονιδιωματικής μεταφοράς μεταξύ μελών της μικροβιακής κοινότητας

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 (Chapman *et al.*, 1990). Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι τα βακτήρια αποτελούν τους κυρίαρχους παράγοντες της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης σε αντίθεση με τους μύκητες που έχουν περιορισμένο ρόλο στο φαινόμενο (Arbeli *et al.*, 2007).

Το είδος και η σύνθεση του πληθυσμού των αποδομητικών μικροοργανισμών είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοαποικοδόμηση των ρύπων ενός υποβαθμισμένου εδαφικού οικοσυστήματος. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή διάσπαση των ρύπων είναι η θερμοκρασία, η ύπαρξη άλλων πηγών ενέργειας για τους αποδομητές, η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία, και τέλος το ποσοστό του οργανικού ρύπου που προσροφάται στα οργανικά και ανόργανα εδαφικά κolloειδή (Anderson and Walton, 1995). Οι πιο συχνοί περιβαλλοντικοί περιορισμοί της βιοαποικοδόμησης είναι η έλλειψη οξυγόνου και υγρασίας, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων για τους μικροοργανισμούς, το ακατάλληλο pH και οι ακατάλληλες θερμοκρασίες.

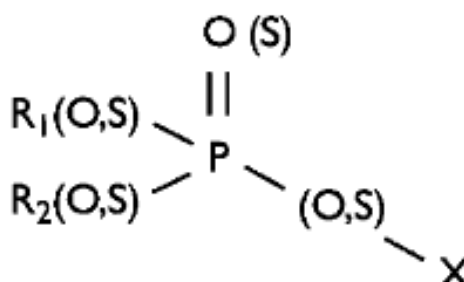
ΕΝΟΤΗΤΑ 2η

Οργανοφωσφορικά φάρμακα

Τα οργανοφωσφορικά (Organophosphates, OP) είναι ξενοβιοτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται εκτενώς σε παγκόσμια κλίμακα ως γεωργικά φάρμακα και ως πρόσθετα του πετρελαίου. Γεωργικά φάρμακα που έχουν ως βάση οργανοφωσφορικές ουσίες χρησιμοποιούνται από το 1937 (Dragun *et al.*, 1984). Το 1944 ο Γερμανός Schrader ανακάλυψε το parathion που χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα σε πολύ μεγάλες ποσότητες. Αργότερα, η έρευνα για την ανακάλυψη άλλων οργανοφωσφορικών ενώσεων με εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση συνεχίσθηκε, και εξαιτίας της χρόνιας τοξικότητας των οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων, όπως το DDT, η χρήση των οργανοφωσφορικών άρχισε να κερδίζει έδαφος. Στη σύγχρονη εποχή, τα OP παρασιτοκτόνα αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα παρασιτοκτόνων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως (34%). Μόνο στις ΗΠΑ, περίπου 50,000 τόνοι οργανοφωσφορικών χρησιμοποιούνται ετησίως (Ballantyne and Marrs, 1992). Σε γενικές γραμμές χαρακτηρίζονται από υψηλή εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση, ευρύ φάσμα δράσης, μικρή υπολειμματική διάρκεια και σχετικά γρήγορη αποδόμηση σε μη τοξικά μεταβολικά προϊόντα. Παρόλο που είναι αποδομήσιμες, οι OP ουσίες έχουν μελετηθεί επί μακρόν από τοξικολόγους λόγω της οξείας τοξικότητάς τους σε θηλαστικά και της χρόνιας τοξικότητας που προκαλούν σε οργανισμούς μη –στόχους. Υπολογίζεται πως τα OP παρασιτοκτόνα προκαλούν περίπου 3 εκατομμύρια δηλητηριάσεις και 200,000 ανθρώπινους θανάτους ετησίως, κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες (Karalliedde and Senanayake, 1999).

2.1. Χημική δομή οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

Τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα περιλαμβάνουν κυρίως εστέρες, αμίδια ή ανυδρίτες και θειο- ή θειο- ενώσεις του φωσφορικού ή του φωσφονικού οξέος (Sogorb and Vilanova, 2002). Η γενική δομή των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων φαίνεται στην Εικόνα 1. Χημικά ταυτοποιούνται από ένα άτομο P που περιβάλλεται από τέσσερις ομάδες ή αλυσίδες ατόμων. Τα περισσότερα είναι άτομα O αλλά μπορούν να βρεθούν επίσης και άτομα S, F, C και N. Το κεντρικό άτομο του P πάντα εμπλέκεται σε P=O ή σε P=S δεσμούς. Οι δύο πλευρικές αλυσίδες R1 και R2 μπορεί να είναι αρωματικές ή αλειφατικές ομάδες. Η τέταρτη ομάδα που αναφέρεται ως “X ομάδα” αποτελεί το τμήμα του μορίου που απελευθερώνεται μέσω της υδρόλυσης από το οργανοφωσφορικό μόριο. Τα επιμέρους οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι δυνατό να διακριθούν σε τρεις κύριες υποομάδες ανάλογα με τη χημική τους δομή. Οι κυριότερες ομάδες είναι τα αλειφατικά, τα αρωματικά και τα ετεροκυκλικά παράγωγα, με κατά γενικές γραμμές αντίστοιχα αυξανόμενη σταθερότητα και υπολειμματική διάρκεια.



Εικόνα 1. Χημική δομή οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων.

2.2. Τρόπος δράσης των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

Ο τρόπος δράσης των οργανοφωσφορικών περιλαμβάνει την αναστολή της διάσπασης της ακετυλοχολίνης. Η ακετυλοχολίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση νευρικών ερεθισμάτων στις χολινεργικές συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων. Με την ολοκλήρωση της μετάδοσης τους μηνύματος, η ακετυλοχολίνη πρέπει να υδρολυθεί ώστε να αποφευχθεί η υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος. Η αντίδραση της υδρόλυσης πραγματοποιείται από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE) που οδηγεί στο σχηματισμό χολίνης και ακέτυλο-CoA. Τα οργανοφωσφορικά δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της AChE οδηγώντας στη φωσφορυλίωση του ενζύμου και κατόπιν η ομάδα X απελευθερώνεται. Η αντίδραση της υδρόλυσης της φωσφορυλιωμένης AChE είναι εξαιρετικά αργή κι έχει ως αποτέλεσμα την υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος που στη συνέχεια προκαλεί αναταραχή, υπερέκκριση σάλιου, σύγχυση, σπασμούς, αναπνευστική ανεπάρκεια κι εν τέλει το θάνατο σε έντομα και θηλαστικά (Ragnarsdottir, 2000).

2.3. Μικροβιακή διάσπαση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

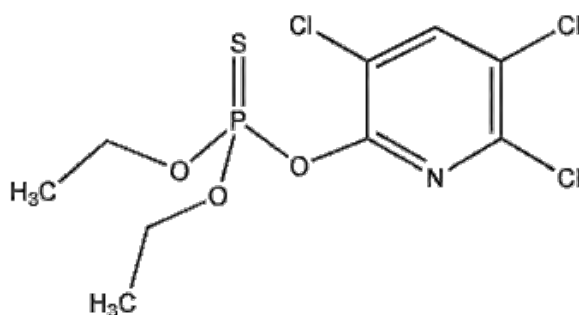
Η μικροβιακή διάσπαση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων θεωρείται η πιο σημαντική διαδικασία που ελέγχει την περιβαλλοντική τύχη αυτών των ουσιών (Felsot, 1989), με την υδρόλυση του φωσφοεστερικού P-O-C ή του φωσφοθειεστερικού δεσμού P-S-C να θεωρείται το αρχικό στάδιο στο μεταβολισμό αυτών των μορίων. Η εκτεταμένη και επαναλαμβανόμενη εφαρμογή των ΟΡ σκευασμάτων στο έδαφος έχει οδηγήσει σε ορισμένες περιπτώσεις στη μειωμένη αποτελεσματικότητά τους εξαιτίας της μικροβιακής προσαρμογής και του φαινομένου της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης. Εδάφη που εμφανίζουν το φαινόμενο αυτό ή εδάφη που έχουν ρυπανθεί εκτεταμένα με υψηλές συγκεντρώσεις οργανοφωσφορικών συχνά χρησιμεύουν ως πηγές απομόνωσης μικροοργανισμών με αυξημένη ικανότητα ταχείας αποδόμησης τέτοιων ενώσεων.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι απομονωθέντες μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα παρασιτοκτόνα ως πηγή ενός θρεπτικού στοιχείου (C, N, P ή S). Για παράδειγμα, ένα στέλεχος του είδους *Pseudomonas putida* χρησιμοποιούσε το ethoprophos ως πηγή άνθρακα αλλά όχι σαν πηγή φωσφόρου (Karpouzas *et al.*, 2000). Ωστόσο, ένα

βακτηριακό στέλεχος του γένους *Pseudomonas* sp. ήταν ικανό να υδρολύει το πολύ τοξικό εντομοκτόνο parathion και να χρησιμοποιεί το προϊόν της υδρόλυσης ως μοναδική πηγή C και N (Siddaramappa *et al.*, 1973). Βακτηριακά στελέχη του γένους *Pseudomonas* είναι κατεξοχήν κυρίαρχα στο εδαφικό περιβάλλον και υπεύθυνα για την αποδόμηση πλήθους οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων και των methyl parathion (Zhongli *et al.*, 2001), isofenphos (Racke *et al.*, 1987) και monocrotophos (Bhadhabe *et al.*, 2002). Ομοίως, στελέχη του γένους *Acinetobacter* έχουν απομονωθεί ως υπεύθυνα για την αποδόμηση οργανοφωσφορικών όπως methyl parathion (Liu *et al.*, 2007), malathion (Xie *et al.*, 2009) και methamidophos (Zheng *et al.*, 2006).

2.3.1. Chlorpyrifos (O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothiate)

Το chlorpyrifos είναι ένα μη διασυστηματικό οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο επαφής, στομάχου και ασφυκτικό, με δράση ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα εντόμων και αρθροπόδων. Πρόκειται για ένα ετεροκυκλικό παράγωγο που φέρει το εμπορικό όνομα Dursban και χαρακτηρίζεται ως μετρίως τοξική ουσία. Ο μεταβολισμός του chlorpyrifos στο έδαφος έχει μελετηθεί αρκετά και οφείλεται σε χημική αλλά και μικροβιακή δράση (Racke, 1993). Μελέτες δείχνουν πως σε απολυμασμένα εδάφη το chlorpyrifos εμφανίζει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής σε αντίθεση με εδάφη σε φυσικές συνθήκες, υποδεικνύοντας πως η μικροβιακή δραστηριότητα είναι σημαντική για τη διάσπαση της ουσίας στο έδαφος (Getzin, 1981, Miles *et al.*, 1983). Το chlorpyrifos χαρακτηρίζεται από έναν P-O-C δεσμό όπως και άλλα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα (diazinon, parathion, methylparathion), του οποίου η υδρολυτική διάσπαση αποτελεί το πρώτο στάδιο κατά την αποδόμηση του στο έδαφος. Η διάσπαση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό των μεταβολιτών DETP και trichloropyridynil (TCP) οι οποίοι ανοργανοποιούνται περαιτέρω από τους εδαφικούς μικροοργανισμούς (Somasundaram *et al.*, 1987, Racke *et al.*, 1988, 1990).



Εικόνα 2. Χημικός τύπος του chlorpyrifos.

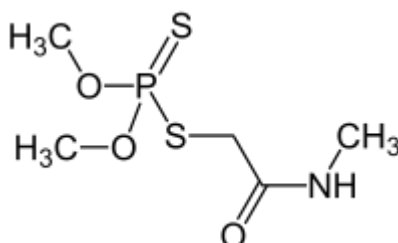
Αντίθετα με τα υπόλοιπα οργανοφωσφορικά, και παρόλο που το chlorpyrifos χρησιμοποιείται ευρέως, δεν είχαν αναφερθεί περιπτώσεις επιταχυνόμενης βιοαποικοδόμησης του chlorpyrifos από τον καιρό της πρώτης χρήσης του το 1965. Έχει προταθεί πως η συσσώρευση του μεταβολίτη TCP που έχει αντιμικροβιακές

ιδιότητες, εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των μικροβιακών αποδομητών του (Racke *et al.*, 1990). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις επιταχυνόμενης βιοαποικοδόμησης του chlorpyrifos, όπως αυτή της μελέτης των Robertson *et al.*, (1998), στην οποία συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί του εδάφους ανέπτυξαν την ικανότητα να ανοργανοποιούν τον τοξικό μεταβολίτη TCP. Οι προσπάθειες απομόνωσης βακτηρίων ικανών να αποδομούν το chlorpyrifos από εδάφη με ιστορικό εφαρμογής του chlorpyrifos δεν ήταν συχνά επιτυχείς (Mallick *et al.*, 1999, Racke *et al.*, 1990). Οι Mallick *et al.* στην ίδια μελέτη, αναφέρουν αποδόμηση του chlorpyrifos από ένα στέλεχος του γένους *Arthrobacter*, το οποίο είχε απομονωθεί από έδαφος με ιστορικό εφαρμογής του methyl parathion και συμμεταβολική αποδόμησης του από ένα στέλεχος *Flavobacterium* sp.

Πιο πρόσφατα, οι Singh *et al.* (2004), απομόνωσαν το βακτήριο *Enterobacter* στέλεχος B-14 με την ικανότητα να υδρολύει το chlorpyrifos προς παραγωγή των μεταβολιτών DETP και TCP, εκ των οποίων μόνο το DETP μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα και φωσφόρου. Σε μια παρόμοια μελέτη, οι Yang *et al.* (2005) απομόνωσαν με τη μέθοδο του εμπλουτισμού το στέλεχος *Alcaligenes faecalis* DSP3 ικανό να αποδομεί το chlorpyrifos και το TCP, χρησιμοποιώντας τα ως πηγές άνθρακα και φωσφόρου. Το στέλεχος αυτό παρουσιάζει αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις του μεταβολίτη TCP ακόμη και σε επίπεδα των 800mg/L. Επομένως, συμπεραίνεται πως το “κλειδί” για την ταχεία αποικοδόμηση του chlorpyrifos στο έδαφος είναι η παρουσία ενός μικροβιακού πληθυσμού που να ανέχεται υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης του TCP ή να το διασπά με ρυθμό γρηγορότερο από το ρυθμό σχηματισμού του.

2.3.2. Dimethoate (*O,O*-dimethyl *S*-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate)

Ένα ακόμη οργανοφωσφορικό παρασιτοκτόνο του οποίου η μικροβιακή διάσπαση έχει μελετηθεί είναι το dimethoate. Η ουσία αυτή χρησιμοποιείται εκτενώς στη γεωργία ως διασυστηματικό εντομοκτόνο, επαφής και στομάχου για να καταπολεμήσει ένα ευρύ φάσμα εντόμων και ακάρεων (Jaffery *et al.*, 1989). Το dimethoate αποτελεί αλειφατικό παράγωγο που χαρακτηρίζεται από υψηλή τοξικότητα (Al-Jughbir *et al.*, 1992) και είναι πιθανό να προκαλέσει τερατογένεση ή καρκίνο (Racke and Coats, 1988).



Εικόνα 3. Χημικός τύπος του dimethoate.

Μικροβιακή αποδόμηση του dimethoate αναφέρεται στη μελέτη των Deshpande *et al.* (2001), όπου υπεύθυνο χαρακτηρίζεται ένα γονίδιο που εντοπίζεται σε πλασμίδιο

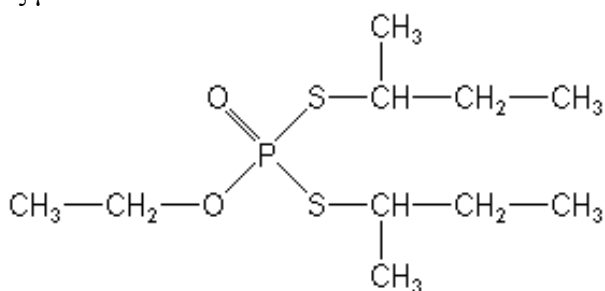
του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* MCMB-427. Οι ίδιοι ερευνητές, απομόνωσαν αργότερα και το στέλεχος *Brevundimonas* sp. MCM B-427 ως το πιο ικανό στην αποικοδόμηση του dimethoate ανάμεσα σε άλλα 25 βακτήρια-αποδομητές του (Deshpande *et al.*, 2004). Πρόσφατα, απομονώθηκε ένα στέλεχος *Pseudomonas putida* (Nazarian, 2007) ικανό να αποδομεί το dimethoate με το υπεύθυνο γονίδιο να εντοπίζεται σε πλασμιδιακό DNA.

Επιπλέον, το dimethoate φαίνεται να δημιουργεί ένα είδος εξελικτικής πίεσης σε υδρόβιους οργανισμούς οδηγώντας στην ανάπτυξη βακτηριακών πληθυσμών ικανών να ανθίστανται στην παρουσία του στο περιβάλλον (Deb Mandal *et al.*, 2003). Έτσι, βακτήρια που χρησιμοποιούν το dimethoate ως πηγή άνθρακα και ενέργειας έχουν απομονωθεί και από υδρόβιους οργανισμούς όπως το στέλεχος *Bacillus licheniformis* που απομονώθηκε από το πεπτικό σύστημα ενός ψαριού του γλυκού νερού (*Labeo rohita*). Το βακτήριο αυτό φέρει ένα πλασμίδιο μεγέθους 54kb που του προσδίδει την ικανότητα να διασπά το dimethoate και να μην εμφανίζει προβλήματα τοξικότητας παρουσία συγκεντρώσεων έως και 3.5 mg/mL (Deb Mandal *et al.*, 2005).

Εκτός από βακτήρια, υπάρχουν αναφορές σε στελέχη μυκήτων ικανών να αποδομούν το dimethoate. Ένα υδρόλυτικό ένζυμο που ευθύνεται για τη διάσπασή του απομονώθηκε από το μύκητα *Aspergillus niger* στέλεχος ZHY256 (Liu *et al.*, 2001), το οποίο είναι ικανό να διασπά οργανοφωσφορικά φάρμακα που περιέχουν P-S δεσμό, όπως το malathion και το fermothion, αλλά όχι οργανοφωσφορικά με δεσμό P-O. Ο Hasan (1999) στη μελέτη του εξέτασε διάφορα στελέχη μυκήτων ως προς την ικανότητά τους να διασπούν οργανοφωσφορικές ουσίες και κατέληξε πως ο μύκητας *Aspergillus sydowii* είναι ικανός να αναπτύσσεται σε υπόστρωμα όπου το dimethoate αποτελούσε τη μόνη πηγή φωσφόρου.

2.3.3. Cadusafos (*O-ethyl, S-bis(1-methyl propyl) phosphorodithioate*)

Το cadusafos είναι ένα οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο και εντομοκτόνο εδάφους επαφής και στομάχου, γνωστό με το εμπορικό όνομα Rugby. Χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες πατάτας για την καταπολέμηση των κυστωδών νηματωδών *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* όπως επίσης και σε χορτολιβαδικές εκτάσεις για το έλεγχο των ριζόκομβων νηματωδών *Meloidogyne* spp.. Αποτελεί αλειφατικό και οργανοθειοφωσφορικό παράγωγο που περιέχει στο μόριο του δύο θειο-πρόπυλο ομάδες συνδεδεμένες με το P.



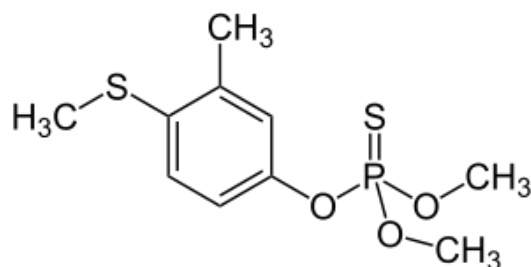
Εικόνα 4. Χημικός τύπος του cadusafos.

Η επανειλημμένη εφαρμογή του cadusafos έχει οδηγήσει, σε ορισμένες περιπτώσεις, στην ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών με την ικανότητα ταχείας αποδόμησής του. Εξ αυτών, σε φυτείες μπανάνας στην Αυστραλία (Pattison, 2000), σε οπωρώνες της Νότιας Αφρικής (Le Roux *et al.*, 2001) και σε καλλιέργειες πατάτας στην Ελλάδα (Karpouzas *et al.*, 2004b). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις αντίστασης του cadusafos στην αποδόμησή του από βακτηριακές κοινότητες (Moens *et al.*, 2004, Giannakou *et al.*, 2005). Η πρώτη αναφορά σε απομόνωση και χαρακτηρισμό αποδομητικού μικροοργανισμού ικανού να χρησιμοποιεί το cadusafos ως πηγή ενέργειας έγινε από τους Karpouzas *et al.* (2005b), όπου απομονώθηκαν δύο στελέχη βακτηρίων, *Flavobacterium* sp. και *Sphingomonas paucimobilis*, από μονοκαλλιέργειες πατάτας στη Βόρεια Ελλάδα. Και τα δύο στελέχη είχαν την ικανότητα να μεταβολίζουν το cadusafos αλλά και ένα χημικό ανάλογό του, το ethoprophos, σε υγρές καλλιέργειες καθώς και στο έδαφος, αλλά δεν ήταν ικανά να μεταβολίσουν τα οργανοφωσφορικά νηματοδοκτόνα isazofos και isofenphos. Τα τελευταία χαρακτηρίζονται από έναν ετεροκυκλικό και έναν αρωματικό δακτύλιο αντίστοιχα, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο μεταβολισμός των cadusafos και ethoprophos πραγματοποιείται μέσω ελευθέρωσης της θειο-πρόπυλο ομάδας, η οποία χρησιμοποιείται περαιτέρω από τα βακτήρια ως πηγή άνθρακα.

2.3.4. Fenthion (*O,O*-dimethyl-*O*-(4-methylmercapto)-3-methylphenylthiophosphate)

Το fenthion είναι ένα μη διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής, στομάχου και αναπνοής που εμφανίστηκε στη γεωργική πράξη το 1960 με το εμπορικό όνομα Lebaycid. Χαρακτηρίζεται από ευρύ φάσμα δράσης, ισχυρή διεισδυτική ικανότητα και μεγάλη υπολειμματική δράση. Είναι ισχυρά λιποδιαλυτό και εισερχόμενο στους φυτικούς ιστούς οξειδώνεται προς σουλφοξείδιο και σουλφόνη, που έχουν επίσης ισχυρή εντομοτοξική δράση.

Στο έδαφος το fenthion διασπάται μέσω της διαδικασίας της φωτόλυσης και της βιοαποικοδόμησης, μολονότι παρουσία φωτός η διαδικασία της φωτόλυσης κυριαρχεί. Η βιοαποικοδόμησή του στηρίζεται στο μεταβολισμό του κυρίως από αναερόβιους και μη-φωτολυτικούς οργανισμούς (HSDB 2003).



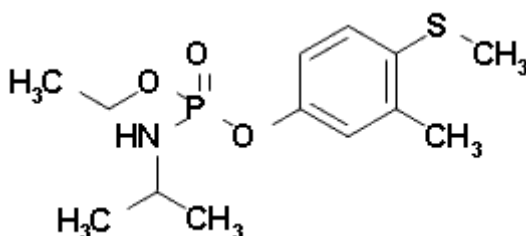
Εικόνα 5. Χημικός τύπος του fenthion.

Το 1976, οι Walnofer *et al.* (1976) έδειξαν πως ο εδαφικός μύκητας *Rhizopus japonicus* είναι ικανός να οξειδώνει το fenthion προς σχηματισμό σουλφοξειδίου και σουλφόνης. Το μόνο προϊόν ενζυμικής υδρόλυσης που ανιχνεύθηκε ήταν το 3-methyl-4-methylsulphonylphenol ή φαινόλη του σουλφοξειδίου του fenthion.

2.3.5. Fenamiphos (*Ethyl 4-methylthio-m-tolyl isopropylphosphoramidate*)

Το fenamiphos (Εικόνα 6), είναι ένα οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο με διασυστηματική δράση, που χρησιμοποιείται εκτεταμένα για τον έλεγχο των κυστωδών (*Globodera* sp.) και ριζόκομβων (*Meloidogyne* sp) νηματωδών στο έδαφος. Κυκλοφορεί με το εμπορικό όνομα Nemasur και εφαρμόζεται σε ποικίλα στάδια της καλλιέργειας όπως πριν την σπορά, κατά τη διάρκεια της σποράς, στις ήδη εγκατεστημένες καλλιέργειες, αλλά και σε φυτώρια και θερμοκήπια. Χρησιμοποιείται σε ποικιλία φυτών συμπεριλαμβανομένων του καπνού, της μπανανιάς, του ανανά, των εσπεριδοειδών, κάποιων λαχανικών και των σιτηρών (Cátheres *et al.*, 2008). Η οξεία τοξικότητά του LD₅₀ διαμέσω της στοματικής οδού σε αρουραίους κυμαίνεται μεταξύ 15,3-19,4 mg/kg και η ADI (Acceptable Daily Intake) είναι 0,005 mg/kg, τιμή που το κατατάσσει στην κατηγορία I τοξικότητας κατά EPA. Το fenamiphos δεν προσροφάται ισχυρά στα εδαφικά κολλοειδή (Cáceres *et al.*, 2002), ενώ προηγούμενες μελέτες καταδεικνύουν ότι κάτω από κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να εκπλυθεί στα υπόγεια ύδατα, και να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα (Franzmann *et al.*, 2000).

Συνήθως, το fenamiphos υπό περιβαλλοντικές συνθήκες οξειδώνεται ταχύτατα προς fenamiphos sulfoxide (FSO) και αυτό με τη σειρά του οξειδώνεται με πιο βραδύ ρυθμό σε fenamiphos sulphone (FSO₂) (Ou *et al.*, 1994). Καθώς όμως τα FSO και FSO₂ έχουν νηματωδοκτόνο δράση και τοξικότητα παρόμοια με αυτή του fenamiphos, οι μελέτες αποδόμησης περιλαμβάνουν συνήθως μία εκτίμηση του συνόλου των τοξικών υπολειμμάτων (Total Toxic Residues, TTR). Ο χρόνος ημιζωής του fenamiphos και των μεταβολιτών του στο έδαφος ποικίλλει από 30 έως 90 ημέρες (Singh *et al.*, 2006). Το fenamiphos και τα αρχικά προϊόντα οξείδωσής του, μπορούν με τη σειρά τους να υδρολυθούν σε fenamiphos phenol (FP), fenamiphos sulfoxide phenol (FSOP) και fenamiphos sulphone phenol (FSO₂P) αντίστοιχα (Megharaj *et al.*, 2003).



Εικόνα 6. Χημικός τύπος του fenamiphos.

Η γνώση σχετικά με τους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στην αποδόμηση του fenamiphos είναι περιορισμένη σε σχέση με άλλα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα (Cáceres *et al.*, 2009). Σε εδάφη τα οποία παρουσιάζουν το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης, το fenamiphos φαίνεται να μετατρέπεται αρχικά σε FSO, το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται ταχύτατα στο προϊόν υδρόλυσης FSO-phenol (Chung and Ou, 1986, Karpouzas *et al.*, 2004). Παρόλα αυτά, ένα διαφορετικό μονοπάτι παρατηρήθηκε σε έδαφος που συλλέχθηκε από αγρό στην Αυστραλία όπου το fenamiphos υδρολύθηκε σε fenamiphos-phenol, χωρίς προηγούμενο σχηματισμό FSO ή FSO₂ (Singh *et al.*, 2003).

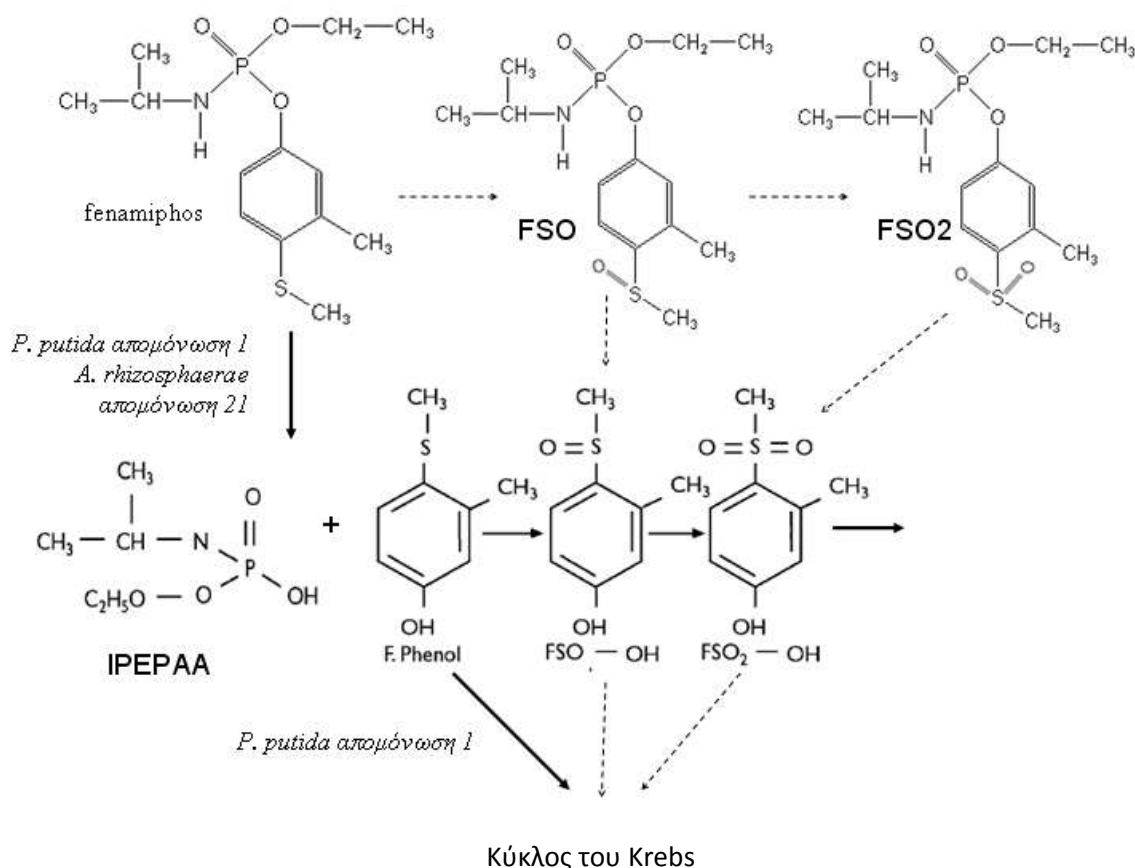
Σε πολλές περιπτώσεις, αζενικές βακτηριακές καλλιέργειες με την ικανότητα αποδόμησης του fenamiphos έχουν επίσης απομονωθεί, αλλά τα μεμονωμένα στελέχη τους δεν ήταν ικανά σε αμιγείς καλλιέργειες να χρησιμοποιήσουν το γεωργικό φάρμακο ως πηγή ενέργειας. Η πρώτη βακτηριακή κοινότητα που είχε την ικανότητα να διασπά το fenamiphos αποτελούνταν από 6 διαφορετικά βακτήρια (Ou and Thomas, 1994). Κατόπιν, απομονώθηκαν δύο διαφορετικές βακτηριακές κοινότητες από αυστραλιανό έδαφος που αποτελούνταν από πέντε και τέσσερα βακτηριακά στελέχη αντίστοιχα. Και οι δύο αυτές βακτηριακές κοινότητες μπορούσαν να χρησιμοποιούν το fenamiphos ως μοναδική πηγή άνθρακα και αζώτου. (Singh *et al.*, 2003) Αυτές οι βακτηριακές κοινότητες είχαν την ικανότητα να ανοργανοποιούν το fenamiphos με ενδιάμεση υδρόλυση του μητρικού μορίου. Η μοριακή ταυτοποίηση των επιμέρους μελών έδειξε ότι τα βακτήρια που αποτελούσαν αυτή την κοινοπραξία ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, και *Caulobacter* (Singh *et al.*, 2003).

Για πρώτη φορά απομονώθηκε μία αμιγής καλλιέργεια που ταυτοποιήθηκε ως *Brevibacterium sp* MM1 (Megharaj *et al.*, 2003) που είχε την ικανότητα να υδρολύει το fenamiphos στο λιγότερο τοξικό προϊόν fenamiphos phenol χωρίς όμως το ίδιο βακτήριο να έχει την ικανότητα να το μεταβολίσει περαιτέρω. Το συγκεκριμένο βακτήριο υδρολύει επίσης το fenamiphos sulfoxide και το fenamiphos sulfone στις αντίστοιχες φαινόλες τους. Πολύ πρόσφατα, απομονώθηκε ακόμη ένα νέο βακτηριακό στέλεχος που ανήκει στο γένος *Microbacterium* με αυξημένη ικανότητα υδρόλυσης του fenamiphos και των προϊόντων οξειδωσής του χωρίς όμως και αυτό να έχει τη δυνατότητα περαιτέρω αποδόμησης του fenamiphos phenol που προκύπτει από την υδρόλυση του fenamiphos (Cáceres *et al.*, 2009).

Σε μελέτη του εργαστηρίου μας (Μεταπτυχιακή Διατριβή Ελένης Χανίκα, 2010) απομονώθηκαν, με τη μέθοδο των εμπλουτισμένων καλλιεργειών, δύο βακτήρια εδάφους με την ικανότητα ταχείας αποδόμησης του fenamiphos και ταυτοποιήθηκαν μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας του 16S rRNA ως *Pseudomonas putida* (FEN 1) και *Acinetobacter rhizosphaerae* στέλεχος (FEN 21). Τα δύο αυτά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν ήταν επίσης ικανά να υδρολύουν ταχύτατα τα FEN, FSO και FSO₂ σε fenamiphos phenol, fenamiphos sulfoxide phenol και fenamiphos sulfone

phenol αντίστοιχα. Το αρχικό βήμα της υδρόλυσης συνοδεύεται από στοιχειομετρική βακτηριακή ανάπτυξη καταδεικνύοντας ότι τα αποδομητικά βακτήρια που απομονώθηκαν αποδομούν το FEN και το χρησιμοποιούν τουλάχιστον ως πηγή C για την ανάπτυξή τους. Σε αντίθεση με προηγούμενες απομονωθείσες αποδομητικές αζενικές καλλιέργειες του FEN, το *P. putida* στέλεχος 1, ήταν ικανό να μεταβολίζει πλήρως και το fenamiphos phenol που σχηματίζεται από την υδρόλυση του fenamiphos. Συνοψίζοντας, τα βακτήρια που απομονώθηκαν στο εργαστήριο μας για την ικανότητα τους να αποδομούν το fenamiphos και που χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα μελέτη, ήταν και τα δύο ικανά να υδρολύσουν ταχύτατα το fenamiphos, πριν την οξείδωση του σε FSO ή FSO₂, σε FEN-OH το οποίο στη συνέχεια διασπάστηκε περαιτέρω και πλήρως μόνο από το *P. putida* FEN1 (Εικόνα 7).

Η ανάλυση του μοριακού αποτυπώματος της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος από το οποίο απομονώθηκαν τα βακτήρια, αλλά και της βακτηριακής κοινότητας στις διαδοχικές καλλιέργειες εμπλουτισμού έδειξαν ότι τα βακτήρια που απομονώθηκαν δεν αποτελούσαν κυρίαρχα μέλη της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος αλλά ενισχύονταν στους κύκλους εμπλουτισμού.



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση του μεταβολικού μονοπατιού του fenamiphos από τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

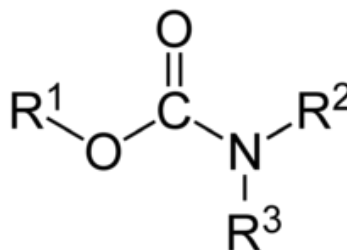
ΕΝΟΤΗΤΑ 3^η

Καρβαμιδικά φάρμακα

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.

3.1. Χημική δομή καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων

Τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα είναι παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος HOC(O)NH_2 . Τα καρβαμικά εντομοκτόνα περιέχουν την γενική δομή της Εικόνας 8, 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.



Εικόνα 8. Χημική δομή των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.

3.2. Τρόπος δράσης των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων

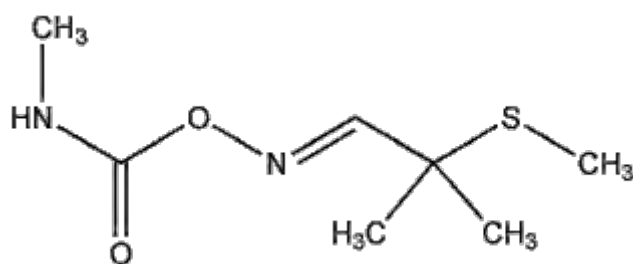
Τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα, όπως και τα οργανοφωσφορικά, αναστέλλουν την AChE και προκαλούν χολινεργική υπερδιέγερση. Παρόλα αυτά, τα καρβαμιδικά προκαλούν μερικώς αντιστρεπτή αναστολή του ενζύμου. Έτσι, η αναστολή της AChE από τα καρβαμιδικά διαρκεί μόνο λίγα λεπτά ή ώρες σε αντίθεση με αυτή των οργανοφωσφορικών που μπορεί να διαρκέσει 3-4 μήνες (Bjørling-Poulsen *et al.*, 2008).

3.3. Μικροβιακή διάσπαση καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται εύκολα και να υδρολύουν διάφορους τύπους καρβαμιδικών ενώσεων. Το πρώτο βήμα στο μεταβολισμό των καρβαμιδικών περιλαμβάνει την υδρόλυσή τους προς παραγωγή καρβαμικού οξέος, το οποίο διασπάται περαιτέρω σε CO₂ και στην αντίστοιχη αμίνη.

3.3.1. Aldicarb (2-methyl-2-(methylthio)-propionaldehyde O-methylcarbamoyloxime)

Το aldicarb αποτελεί ένα διασυστηματικό καρβαμιδικό εντομοκτόνο/ακαρεοκτόνο επαφής και στομάχου και νηματωδοκτόνο, που κυκλοφορεί με το εμπορικό όνομα Temik. Είναι ένα από τα πιο τοξικά παρασιτοκτόνα σύμφωνα με την EPA με πολύ υψηλή οξεία τοξικότητα (LD₅₀=0.3-0.9 mg/kg σωματικού βάρους). Ο χρόνος ημίσειας ζωής του aldicarb εκτιμάται μεταξύ 1.5 και 2 μηνών (Jones, 1987). Το aldicarb είναι σχετικά υδατοδιαλυτό και μπορεί να διηθηθεί δια μέσω του εδάφους και να καταλήξει στον υδροφόρο ορίζοντα.



Εικόνα 9. Χημικός τύπος του aldicarb.

Τα βακτήρια συμμετέχουν στο μεταβολισμό του aldicarb μέσω δύο μεταβολικών οδών: η κύρια οδός, που ευθύνεται για το 80% της διάσπασης του aldicarb υπό αερόβιες συνθήκες, αφορά την οξειδωσή του προς aldicarb sulfoxide και έπειτα προς aldicarb sulfone. Η άλλη, αφορά την υδρόλυση του aldicarb και των οξειδωμένων μεταβολιτών του προς τις αντίστοιχες οξίμες (Ou *et al.*, 1985, Smelt *et al.*, 1983, Trehy *et al.*, 1984, Jones και Estes, 1995). Επειδή τα προϊόντα υδρόλυσης του aldicarb δεν είναι τόσο τοξικά, οι διαφορές στα μεταβολικά μονοπάτια αποδόμησής του αποκτούν σημασία, όσον αφορά την περιβαλλοντική τύχη του aldicarb. Λόγω της

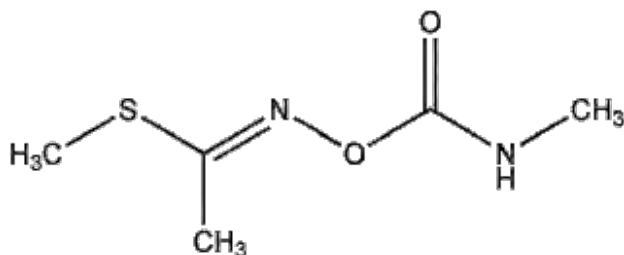
ανησυχίας για τη δημόσια υγεία, οι μελέτες που αφορούν τη διάσπαση του aldicarb είχαν επικεντρωθεί κυρίως στην κινητική της μετατροπής του στους εξίσου τοξικούς μεταβολίτες aldicarb sulfoxide και aldicarb sulfone (Bromilow *et al.*, 1980, Smelt *et al.*, 1983) και στους παράγοντες που την επηρεάζουν (Jones and Norris, 1998, Liu *et al.*, 2003). Η μειωμένη αποτελεσματικότητα και η επιταχυνόμενη μικροβιακή αποικοδόμηση του aldicarb είχε γίνει ευρέως αντιληπτή (Ou *et al.*, 1985, 1986, Smelt *et al.*, 1987, Bromilow *et al.*, 1996, McLean and Lawrence, 2003), ωστόσο μέχρι πρόσφατα λίγες ήταν οι μελέτες που ανέφεραν την απομόνωση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών που να σχετίζονται με την αποικοδόμηση του aldicarb.

Οι Kazumi και Capone (1995), στη μελέτη τους αναφέρουν τη μικροβιακή αποδόμηση του aldicarb σε ιζήματα υδροφόρων συστημάτων που συλλέχθηκαν από περιοχές οι οποίες είχαν δεχθεί επανειλημμένη εφαρμογή του aldicarb. Ο μεταβολισμός του aldicarb έλαβε χώρα μέσω διαφορετικών οδών κάτω από αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες. Έτσι, παρουσία του O₂, η βιομετατροπή του aldicarb γινόταν μέσω οξειδωσης, ενώ απουσία O₂, η αποδόμηση του γινόταν μέσω ενός υδρολυτικού μονοπατιού, με ταυτόχρονη παραγωγή μεθυλαμίνης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την ύπαρξη μίας κοινότητας που αποτελείται από φυσικούς πληθυσμούς και μεθανιογόνα βακτήρια, απαραίτητα για τη βιομετατροπή του aldicarb και τη χρήση των μεταβολιτών του. Ένα βακτηριακό στέλεχος που απομονώθηκε από έδαφος με ιστορικό επαναλαμβανόμενης χρήσης του aldicarb είναι το *Methylosinus* sp., ικανό να χρησιμοποιεί το aldicarb ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας (Kök *et al.*, 1999). Το στέλεχος αυτό έδειξε να αποδομεί με αυξανόμενο ρυθμό το aldicarb σε συγκεντρώσεις που έφταναν τα 400mg/L.

Σε μελέτη των Lawrence *et al.* (2005), βρέθηκαν βακτηριακά είδη ικανά να χρησιμοποιούν το aldicarb, ή το aldicarb sulfoxide, ή το μεταβολίτη aldicarb sulfone ως τη μόνη πηγή άνθρακα και αζώτου. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονταν βακτήρια του γένους *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Ralstonia* κ.α. Ανάμεσα σε αυτά τα βακτήρια, το στέλεχος *Pseudomonas putida* ήταν ικανό να χρησιμοποιεί και τις τρεις αυτές ουσίες ως πηγή ενέργειας. Ένα ακόμη βακτηριακό στέλεχος, αποτελεσματικό στην αποδόμηση του aldicarb, είναι το *Stenotrophomonas maltophilia* (Karayilanoglu *et al.*, 2008), το οποίο μεταβολίζει και χρησιμοποιεί το aldicarb ως πηγή άνθρακα και ενέργειας μέσω της δράσης εστερασών. Επίσης, έχει η μελετηθεί η περίπτωση της εφαρμογής άλλων καρβαμικών ενώσεων προκειμένου να ενισχυθεί η μικροβιακή αποικοδόμηση του aldicarb. Ως ακολούθως, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου αναπτύσσεται διασταυρωτή επιταχυνόμενη μικροβιακή διάσπαση για το aldicarb ύστερα από εφαρμογή του carbofuran (Chapman and Harris, 1990, Felsot, 1989) ή του oxamyl (Smelt *et al.*, 1987) αλλά και περιπτώσεις όπου δεν παρατηρήθηκε ανάλογο φαινόμενο μεταξύ aldicarb και carbofuran (Racke, 1988b, Wilde and Mize, 1984).

3.3.2. Methomyl (*S-methyl N-(methylcarbamoyloxy)-thioacetimidate*)

Το methomyl κυκλοφόρησε για πρώτη φορά το 1966 ως καρβαμιδικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου και νηματωδοκτόνο ευρέως φάσματος. Σύμφωνα με τον WHO ταξινομείται στην κατηγορία I ως πολύ τοξική ένωση. Συχνά εντοπίζεται σε υπόγεια νερά λόγω της υψηλής υδατοδιαλυτότητάς του και της περιορισμένης προσρόφησής του στα εδαφικά κολλοειδή (Itak *et al.*, 1996; Laabs *et al.*, 2002).

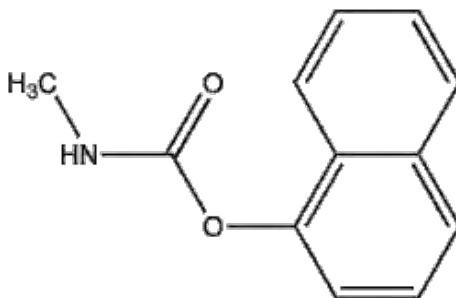


Εικόνα 10. Χημικός τύπος του methomyl.

Ο μικροβιακός μεταβολισμός του methomyl είναι ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσής του από το περιβάλλον, παρόλο που μπορεί να αποδομηθεί και μέσω χημικών και φυσικών διαδικασιών (Howard, 1991; WHO, 1996). Οι αναφορές σε αμιγείς καλλιέργειες βακτηρίων ικανών να αποδομούν το methomyl είναι ελάχιστες. Πρόσφατα, οι Xu *et al.* (2009), απομόνωσαν το στέλεχος *Paracoccus* sp., ικανό να χρησιμοποιεί το methomyl ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Επίσης, την ίδια περίοδο απομονώθηκε από υδατικά απόβλητα προερχόμενα από καλλιεργήσιμες εκτάσεις με ιστορικό χρήσης του methomyl και ένα νέο στέλεχος, το *Stenotrophomonas maltophilia* M1, με την ικανότητα να αποδομεί το methomyl σε συγκεντρώσεις 1000ppm, παρουσία 0,05% γλυκόζης. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση του methomyl βρίσκεται σε πλασμίδιο (PMb) μεγέθους 5kb (Mohamed, 2009).

3.3.3. Carbaryl (*1-naphthyl-N-methylcarbamate*)

Το carbaryl ήταν το πρώτο καρβαμιδικό εντομοκτόνο που εμφανίστηκε στην αγορά, περί τα μέσα της δεκαετίας του '50, με το εμπορικό όνομα Sevin. Πρόκειται για ισχυρό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου, που χαρακτηρίζεται από μικρή διασυστηματική κίνηση, μεγάλη υπολειμματική διάρκεια (15-20 ημέρες) και σταθερότητα στο φως και τη θερμοκρασία. Είναι αποτελεσματικό στην καταπολέμηση πολλών εντόμων καθώς και στον έλεγχο εκτοπαρασίτων των ζώων. Έχει το πλεονέκτημα της χαμηλής οξείας τοξικότητας στον άνθρωπο και τα θηλαστικά, είναι όμως πολύ τοξικό στα ωφέλιμα αρθρόποδα και ισχυρά μελισσοτοξικό. Για την τοξικότητά του ευθύνεται ο εστερικός δεσμός μεταξύ του N-μεθυλοκαρβαμιδικού οξέος και της 1-ναφθόλης (Swetha *et al.*, 2007).



Εικόνα 11. Χημικός τύπος του carbaryl.

Παρόλο που η μικρή διάρκεια παραμονής του carbaryl στο έδαφος το καθιστά λιγότερο ευπαθές στην ανάπτυξη μικροβιακής προσαρμογής, ένας σημαντικός αριθμός βακτηρίων ικανών να μεταβολίζουν το carbaryl έχει απομονωθεί. Οι Larkin και Day (1986) απομόνωσαν βακτηριακά είδη των γενών *Pseudomonas* και *Rhodococcus*, ικανά να διασπούν το carbaryl. Οι Rajagopal *et al.* (1984) απομόνωσαν ένα στελέχος *Bacillus* sp. ικανό να μεταβολίζει το carbaryl προς 1-ναφθόλη και 1,4-ναφθοκινόνη. Δύο ακόμα βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν με τη μέθοδο του εμπλουτισμού για βακτήρια που αποδομούν το carbofuran, *Pseudomonas* sp. (Chaudhry *et al.*, 1988) και *Achromobacter* sp. (Karns *et al.*, 1986), με την ικανότητα να διασπούν και το carbaryl.

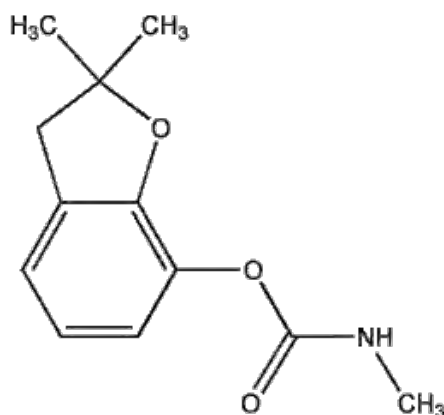
Αργότερα, οι Chapalamdugu και Chaudhry (1991), αναφέρουν τη δημιουργία μίας μικροβιακής κοινοπραξίας, αποτελούμενης από δύο στελέχη του γένους *Pseudomonas*, που συμβαλλόμενα προκαλούσαν την πλήρη αποδόμηση του carbaryl. Βακτηριακά στελέχη του γένους *Pseudomonas* sp., με την ικανότητα να χρησιμοποιούν το καρβαμιδικό εντομοκτόνο carbaryl ως μοναδική πηγή C και ενέργειας, απομονώθηκαν και από τους Mulbry and Eaton (1991) και Swetha *et al.* (2005). Άλλα βακτήρια που ταυτοποιήθηκαν με την ιδιότητα να υδρολύουν το carbaryl, από τα οποία έχουν χαρακτηριστεί και οι αντίστοιχες υδρολάσες, αποτελούν τα στελέχη *Rhizobium* sp. AC100 (Hashimoto *et al.*, 2002), *Arthrobacter* sp. RC100 (Hayatsu *et al.*, 1999) και *Blastobacter* sp. M501 (Hayatsu *et al.*, 1993).

3.3.4. Carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl methylcarbamate)

Το carbofuran είναι ένα από τα πιο γνωστά εντομοκτόνα που πρωτοεμφανίστηκε το 1967 με τα εμπορικά ονόματα Furadan και Curater. Πρόκειται για ευρέως φάσματος δράσης διασυστηματικό εντομοκτόνο και νηματωδοκτόνο επαφής και στομάχου. Παρόλο που σε κάποιες περιπτώσεις το carbofuran υπόκειται στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης βακτηριακής αποδόμησης, είναι ιδιαίτερα ευκίνητο σε ορισμένα εδάφη, ώστε να θεωρείται εν δυνάμει ρυπαντής των υπόγειων και επιφανειακών υδάτων (Trotter *et al.*, 1991).

Το carbofuran μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους μικροοργανισμούς με τουλάχιστον τρεις τρόπους (Chaudry *et al.*, 1988), όμως η υδρόλυση του

μεθυλκαρβαμιδικού δεσμού είναι ο κύριος μηχανισμός που ευθύνεται για την απώλεια της αποτελεσματικότητας του γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος (Turco and Konopka, 1990). Η βακτηριακή αποδόμηση του carbofuran οδηγεί συνήθως στο σχηματισμό carbofuran 7-phenol και μεθυλαμίνης, η οποία χρησιμοποιείται από τα βακτήρια ως πηγή N και C (Karns *et al.*, 1986, Feng *et al.*, 1997, Peng *et al.*, 2008). Έτσι, γενικά οι μικροοργανισμοί που αποδομούν το carbofuran χρησιμοποιούν τη μεθυλαμίνη για την ανάπτυξή τους και ανήκουν στην ετερογενή ομάδα των προαιρετικά μεθυλότροφων βακτηρίων.



Εικόνα 12. Χημικός τύπος του carbofuran.

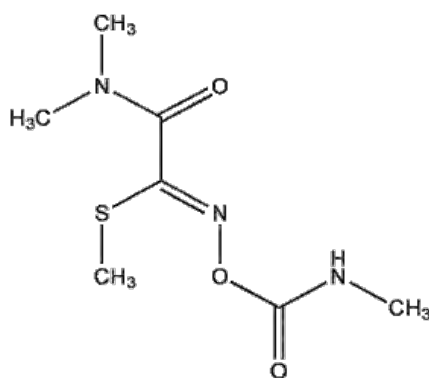
Μεγάλος αριθμός βακτηρίων ικανών να αποδομούν το carbofuran έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα. Παράδειγμα, αποτελεί το βακτηριακό στέλεχος *Arthrobacter* sp., το οποίο ήταν ικανό να αποδομεί πλήρως το carbofuran χρησιμοποιώντας το ως πηγή C και N μέσα σε 72-120 h υπό αερόβιες συνθήκες. Το συγκεκριμένο βακτήριο ήταν ικανό να υδρολύει επίσης το εντομοκτόνο carbaryl (Ramanand *et al.*, 1988). Ένα άλλο βακτηριακό στέλεχος, το *Achromobacter* sp. WM111, ήταν σε θέση να υδρολύει πλήρως το carbofuran σε διάστημα 42 h, χρησιμοποιώντας το ως μοναδική πηγή N. Το ίδιο βακτήριο μπορούσε να αποδομήσει γρήγορα και τα καρβαμιδικά aldicarb και carbofuran (Karns *et al.*, 1986). Άλλα βακτήρια που αποδομούν το carbofuran αντιπροσωπεύονται από τα γένη *Pseudomonas*, *Flavobacterium* (Chauldry *et al.*, 1988) και *Sphingomonas* sp. (Feng *et al.*, 1997).

3.3.5. Oxamyl (*N,N*-dimethyl-2-methylcarbamoyloxyimino-2-(methylthio)-acetamide)

Το oxamyl είναι ένα ευρέως φάσματος διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής, ακαρεοκτόνο και νηματωδοκτόνο που εισήχθη στη γεωργική πράξη το 1974 με το εμπορικό όνομα Vydate. Η έκθεση στο oxamyl προκαλεί παρόμοιες επιδράσεις με τα άλλα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα μπλοκάροντας 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 έχει μέτρια πτητικότητα (31 mPa). Η διαλυτότητά του στο νερό είναι ιδιαίτερα υψηλή (280 g/L) και η οξεία τοξικότητα LD₅₀ διαμέσω της στοματικής οδού σε αρουραίους είναι υψηλή (5,4 mg/kg). Η ADI (Acceptable Daily Intake) είναι 0,03 mg/kg, τιμή που το κατατάσσει στην κατηγορία I τοξικότητας κατά EPA (Gerstl 1984). 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 (Bromilow *et al.*, 1980, Smelt *et al.*, 1983). Δεν προσροφάται ιδιαίτερα στο έδαφος και είναι πιθανή η έκπλυσή του στα υπόγεια ύδατα. Το oxamyl στο έδαφος αποδομείται μέσω υδρόλυσης σε μη τοξικούς μεταβολίτες, όπως oxamyl oxime και oxamic acid.



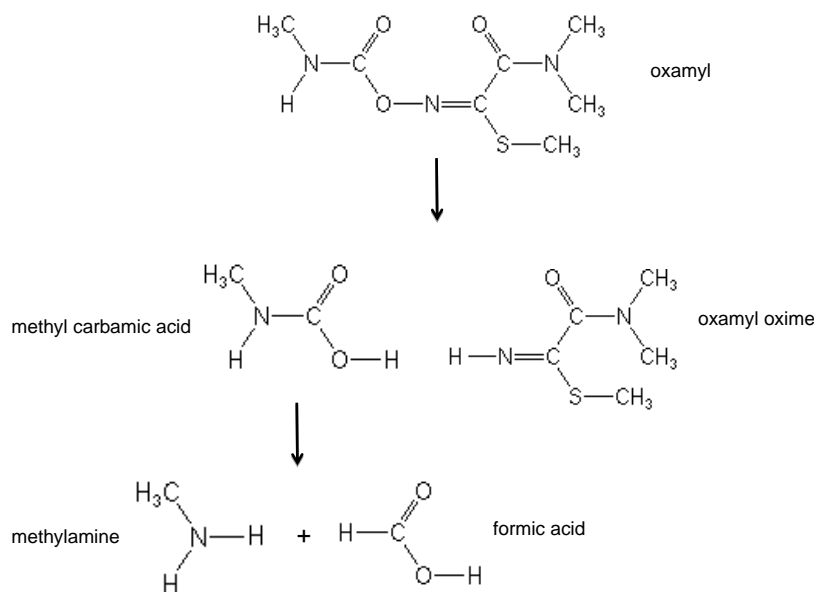
Εικόνα 13. Χημικός τύπος του oxamyl.

Για το νηματωδοκτόνο oxamyl μέχρι στιγμής, υπάρχει μόνο μία βιβλιογραφική αναφορά για την απομόνωση μικροοργανισμών υπεύθυνων για την επιταχυνόμενη αποδόμησή του στο έδαφος. Βακτήρια ικανά να χρησιμοποιούν το oxamyl ως τη μοναδική πηγή άνθρακα απομονώθηκαν από οκτώ διαφορετικά δείγματα γεωργικών εδαφών, που είχαν εμφανίσει το φαινόμενο της επιταχυνόμενης αποδόμησης. Η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι 26 από τα 27 απομονωθέντα βακτήρια ανήκουν στο γένος *Aminobacter*, με το πιο κοινό είδος να αποτελεί το *Aminobacter aminovorans*. Το άλλο απομονωθέν βακτήριο ταυτοποιήθηκε ως *Mesorhizobium sp* (Osborn *et al.*, 2010).

Σε μελέτη του εργαστηρίου μας (Μεταπτυχιακή Διατριβή Ελένης Χανίκα, 2010) απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν φυλογενετικά τέσσερα βακτηριακά στελέχη ικανά να υδρολύουν ταχύτατα το oxamyl προς παραγωγή του οξιμικού παραγώγου του oxamyl oxime. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν βασιζόμενα στην πλήρη αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου ως *Pseudomonas spp.* Τα δύο από τα τέσσερα βακτηριακά στελέχη σχετίζονται πολύ στενά, γεγονός που ταυτοποιήθηκε από τις περιορισμένες διαφορές στην αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου

(*Pseudomonas putida* στελέχη 18 & 25), ενώ τα άλλα δύο στελέχη ήταν διαφορετικά και ταυτοποιήθηκαν ως *Pseudomonas* sp. και *P. jinjuensis*.

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ήταν σε θέση να χρησιμοποιούν το oxamyl ως μοναδική πηγή C, καθώς αυτό επιβεβαιώνεται από την στοιχειομετρική ανάπτυξή τους κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του oxamyl. 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 (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. 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-καρβαμιδικό οξύ (methyl carbamic acid) που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης του oxamyl πιθανώς χρησιμοποιείται από τα βακτήρια ως πηγή C και N. Η ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος και στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες με την μέθοδο DGGE έδειξε ότι τα βακτήρια που απομονώθηκαν αποτελούσαν αρχικά μέλη της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος, αλλά εμφανώς ενισχύθηκαν κατά τη διαδικασία του εμπλουτισμού (*Pseudomonas*).

ΕΝΟΤΗΤΑ 4^η

Συστήματα γονιδίων-ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση οργανοφωσφορικών

Διάφορα συστήματα γονιδίων/ενζύμων που παρέχουν στους μικροοργανισμούς την ικανότητα διάσπασης των οργανοφωσφορικών έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί. Δύο ένζυμα, η υδρολάση των οργανοφωσφορικών (Organophosphate hydrolase, OPH) και η οργανοφωσφορική όξινη ανυδρολάση (Organophosphorus acid anhydrolase, OPAA) και τα αντίστοιχα γονίδια, *opd* και *opdA* που τις κωδικοποιούν, έχουν μελετηθεί περισσότερο λόγω της ιδιότητάς τους να αποδομούν μία πληθώρα οργανοφωσφορικών ουσιών.

4.1 OPH/opd

Η υδρολάση των οργανοφωσφορικών (OPH) ή φωσφοτρίεστεράση αποτελεί το πιο καλά μελετημένο ένζυμο που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση οργανοφωσφορικών ουσιών. Ο χαρακτηρισμός του ενζύμου αυτού έγινε από το βακτήριο εδάφους *Flavobacterium* sp. στέλεχος ATCC 27551, το οποίο απομονώθηκε από ορυζώνες στις Φιλιππίνες (Sethunathan and Yoshida, 1973). Έκτοτε, το OPH έχει εντοπιστεί και χαρακτηριστεί από πλήθος ταξινομικά και γεωγραφικά απομακρυσμένων βακτηρίων (Rauschel, 2002). Το OPH παρουσιάζει δραστικότητα ενάντια σε μια πληθώρα οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων, μεταξύ των οποίων το parathion, το methyl parathion, το fensulfothion κ.α. (Dumas *et al.*, 1989). Αποτελεί μία ομοδιμερή μεταλλοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 72kDa (Benning *et al.*, 1994), μέλος της υπεροικογένειας των αμιδοϋδρολασών (Holm and Sander, 1997). Το ένζυμο OPH έχει εξειδίκευση ως προς διάφορα υποστρώματα και έχει αποδειχθεί ότι καταλύει την υδρόλυση P-O, P-F, P-CN και P-S δεσμών με τη μεγαλύτερη δραστικότητα ενάντια σε P-O δεσμούς και τη μικρότερη ενάντια σε P-S δεσμούς (Efremenko and Sergeeva, 2001).

Το αντίστοιχο *opd* γονίδιο (*organophosphate degrading*), που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη OPH, έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια αποδόμησης οργανοφωσφορικών. Απομονώθηκε και αλληλουχήθηκε αρχικά από το στέλεχος *Pseudomonas diminuta* ενώ εντοπίστηκε στο πλασμίδιο pCMS1 μεγέθους 66kb (Serdar *et al.*, 1982). Το ίδιο γονίδιο εντοπίστηκε στο πλασμίδιο pPDL2 (43kb) του βακτηριακού στελέχους *Flavobacterium* sp. ATCC25. Η συγκριτική ανάλυση των δύο πλασμιδίων pCMS1 και pPDL2 έδειξε ότι τα γονίδια *opd* εντοπίζονται σε μία υψηλά συντηρημένη περιοχή που εκτεινόταν 2,6 kb ανωφορικά και 1,7 kb κατωφορικά του *opd* (Mulbry *et al.*, 1987, 1987). Μεταξύ της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *opd* προερχόμενη από το *Flavobacterium* (απομονωθέντος στις Φιλιππίνες) και από το *P. diminuta* (απομονωθέντος στις ΗΠΑ) φάνηκε να

υπάρχει 100% ομολογία, ενώ μεταξύ των αντίστοιχων πλασμιδίων όπου εντοπίστηκε το γονίδιο δεν παρουσιάστηκε κάποια συσχέτιση (Mulbry *et al.*, 1987, 1989b, Harper *et al.*, 1988, Serdar *et al.*, 1989). Ένα ακόμη γεωγραφικά και ταξινομικά απομακρυσμένο βακτηριακό στέλεχος, το *Flavobacterium balustinum*, που απομονώθηκε στην Ινδία, φέρει σε πλασμιδίο του το γονίδιο *opd* (Somara and Siddavattam, 1995), το οποίο παρουσιάζει 98% ομολογία με την νουκλεοτιδική αλληλουχία των *opd* γονιδίων που χαρακτηρίστηκαν από τα στελέχη *Flavobacterium* και *P. diminuta* (Somara *et al.*, 2002). Το 2003, οι Siddavattam *et al.* επιβεβαίωσαν την υπόθεση πως το *opd* γονίδιο αποτελεί τμήμα ενός τρανσποζονίου.

4.2 OPDA/opdA

Η δομή του ενζύμου OPDA παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα με τη δομή του ενζύμου OPH. Το ένζυμο OPDA εντοπίστηκε και χαρακτηρίστηκε από το στέλεχος *Agrobacterium radiobacter*, το οποίο απομονώθηκε στην Αυστραλία (Horne *et al.*, 2002a). Αναφέρεται πως ο μηχανισμός της κατάλυσης που χρησιμοποιούν τα δύο αυτά ένζυμα είναι σχεδόν ταυτόσημος (Yang *et al.*, 2003). Ωστόσο, υπάρχουν μερικές διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία των δύο ενζύμων, γεγονός που εξηγεί και τη διαφορετική εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα στο οποίο δρουν, με την πρωτεΐνη OPDA να δείχνει μεγαλύτερη δραστικότητα ενάντια σε υποστρώματα με μικρότερη πλευρική αλυσίδα και να υδρολύει το fenthion και το phosmet, για τα οποία η OPH δεν εμφανίζει δραστικότητα (Horne *et al.*, 2002a).

Το γονίδιο *opdA* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη OPDA, απομονώθηκε και αλληλουχήθηκε από το βακτήριο *A. radiobacter* και παρόλο που εντοπίστηκε σε χρωμόσωμα, παρουσίασε 88% νουκλεοτιδική ομολογία με τα *opd* γονίδια (Horne *et al.*, 2002a). Μετέπειτα μελέτες των ίδιων ερευνητών εντόπισαν ένα γονίδιο τρανσποζάσης (*tnpA*) ανωφορικά του *opdA* του βακτηρίου *A. radiobacter* P230, όπως επίσης και ανεστραμμένες επαναλήψεις (LIR και RIR), που μαρτυρούν την ύπαρξη αλληλουχιών ένθεσης εκατέρωθεν των δύο γονιδίων (Horne *et al.*, 2003).

4.3 OPAA/opaA

Η οργανοφωσφορική όξινη ανυδρολάση αποτελείται από ένα πεπτίδιο (60kDa) και εμφανίζει δραστικότητα ενάντια σε διάφορες οργανοφωσφορικές ουσίες (Cheng *et al.*, 1999). Συγκριτικά με την OPH, έχει μικρότερη καταλυτική αποτελεσματικότητα ενάντια στο paraoxon και δεν παρουσιάζει καμία δραστικότητα ενάντια σε P-S δεσμούς.

Όπως και η πρωτεΐνη OPAA, έτσι και το γονίδιο *opaA* που την κωδικοποιεί απομονώθηκε από το βακτήριο *Alteromonas* στέλεχος JD6.5 (Cheng *et al.*, 1996). Παρά τις ομοιότητες στη λειτουργία, μεταξύ των γονιδίων *opaA* και *opd* δεν υπάρχει ομολογία μεταξύ της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας.

4.4 Άλλα ένζυμα και γονίδια που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση οργανοφωσφορικών

Διάφορα ακόμη ένζυμα έχουν απομονωθεί από ένα πλήθος βακτηριακών στελεχών και μυκήτων, ικανών να αποδομούν οργανοφωσφορικές ουσίες διαφορετικής δομής. Για παράδειγμα, η αμινοπεπτιδάσηP από το *E. coli* αναφέρεται να διασπά διάφορα οργανοφωσφορικά, μεταξύ αυτών και χημικά ανάλογα του paraoxon (Jao *et al.*, 2004). Η ανακάλυψη αυτή δείχνει να έχει ενδιαφέρον καθώς έχει προταθεί πως η πρωτεΐνη OPAA συγγενεύει ή έχει εξελιχθεί από την αμινοπεπτιδάσηP. Επιπλέον, οι ίδιοι ερευνητές έχουν απομονώσει, κλωνοποιήσει και υπερεκφράσει το αντίστοιχο γονίδιο *pepP* (Jao *et al.*, 2004). Οι Mulbry και Karns (1989) απομόνωσαν τρεις διαφορετικές υδρολάσες οργανοφωσφορικών, από αρνητικά κατά Gram βακτηριακά στελέχη, των οποίων η δομή και η εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα ήταν διαφορετική μεταξύ τους, όπως και διαφορετική από αυτήν της πρωτεΐνης OPH. Ένα ακόμη υδρολυτικό ένζυμο των οργανοφωσφορικών αποτελεί και η πρωτεΐνη HocA, η οποία και καταλύει τη διάσπαση του caroxon (Horne *et al.*, 2002b). Απομονώθηκε από το βακτήριο *Pseudomonas montevilli* και δεν παρουσιάζει καμία ομοιότητα με κάποια άλλη πρωτεΐνη των βάσεων δεδομένων.

Επιπλέον, έχουν κλωνοποιηθεί και υπερεκφραστεί γονίδια που εμπλέκονται στη διάσπαση του methyl parathion. Οι Zhongli *et al.* (2001) απομόνωσαν ένα νέο αντίστοιχο γονίδιο (*methyl parathion degrading, mpd*) που εδράζεται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου *Plesiomonas* sp.. Αργότερα, απομονώθηκε ένα ακόμη *mpd* γονίδιο από το πλασμίδιο του μικροοργανισμού *Pseudomonas* sp. στέλεχος WBC-3, το οποίο παρουσίαζε 99,5% νουκλεοτιδική ομολογία με το *mpd* γονίδιο που απομονώθηκε από το *Plesiomonas* sp. (Liu *et al.*, 2005). Ενώ πολλά ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση οργανοφωσφορικών έχουν απομονωθεί από βακτήρια, λίγα είναι αυτά που έχουν απομονωθεί από μύκητες. Ένα από αυτά απομονώθηκε από το στέλεχος *Aspergillus niger* ZHY256 με την ικανότητα να αποδομεί τον P-S δεσμό του dimethoate, του formothion και του malathion (Liu *et al.*, 2001). Ένα ακόμη νέο ένζυμο απομονώθηκε από το στέλεχος *Penicillium lilacinum* BP303 που φέρει την ικανότητα να διασπά P-O και P-S δεσμούς οργανοφωσφορικών ουσιών (Liu *et al.*, 2004).

ΕΝΟΤΗΤΑ 5^η

Συστήματα γονιδίων-ενζύμων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση καρβαμιδικών

Η βιοχημική και γενετική βάση της μικροβιακής αποικοδόμησης των καρβαμιδικών ουσιών δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Διάφορα συστήματα ενζύμων που δίνουν στους μικροοργανισμούς την ικανότητα μεταβολισμού των καρβαμιδικών ενώσεων έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί, ωστόσο λιγοστά είναι τα δεδομένα που αφορούν τα γονίδια που τα κωδικοποιούν.

5.1 MCD/mcd

Το γονίδιο *mcd*, που κωδικοποιεί μία υδρολάση του carbofuran, απομονώθηκε αρχικά από το βακτηριακό στέλεχος *Achromobacter* sp. WM111 και εντοπίστηκε στο πλασμίδιο pPDL11 μεγέθους 100kb (Tomasek and Karns, 1989). Το αντίστοιχο ένζυμο MCD αποτελεί μια διμερή, Mn^{2+} - εξαρτώμενη πρωτεΐνη (μεγέθους 77kDa η κάθε υπομονάδα), που ευθύνεται για την αποδόμηση διάφορων καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων, όπως τα carbofuran, carbaryl και aldicarb (Tomasek and Karns, 1989, Karns and Tomasek 1991). Ομόλογες του γονιδίου *mcd* αλληλουχίες, έχουν εντοπιστεί σε πλασμίδια αλλά και σε γενωμικό DNA, σε διάφορα αρνητικά και θετικά κατά Gram βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από γεωγραφικά διακριτές περιοχές (Πίνακας 1).

Το 2003, οι Desaint *et al.*, μελέτησαν το ρόλο της οριζόντιας μεταφοράς του *mcd* γονιδίου. Παρόλο που τα αποτελέσματά τους δείχνουν να επιβεβαιώνουν τη μεταφορά του γονιδίου από βακτήρια-δότες του γένους *Arthrobacter* και *Aminobacter* σε βακτήρια-δέκτες του *Ag. tumefaciens* και δυνητικά και σε βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*, τα μετασηματισμένα στελέχη δε διατηρούσαν την ικανότητα να αποδομούν το carbofuran, πιθανόν λόγω αστάθειας του μεταφερόμενου γονιδίου.

Το 2009, οι Naqvi *et al.*, βελτιστοποιώντας τις συνθήκες της ετερόλογης έκφρασης της MCD, πέτυχαν την παραγωγή της πρωτεΐνης σε κύτταρα *E. coli*, με απόδοση πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με προηγούμενες προσπάθειες (Tomasek and Karns, 1989, Karns and Tomasek 1991). Η ετερόλογα εκφρασμένη πρωτεΐνη εμφάνισε αξιόλογη αντοχή παρουσία οργανικών διαλυτών και του χηλικού παράγοντα EDTA, και ικανοποιητική ή ελάχιστη υδρολυτική ικανότητα ενάντια στο carbaryl και σε καρβοξυλεστέρες ή σε φωσφοτριεστέρες αντίστοιχα.

Πίνακας 1. Γνωστές αλληλουχίες γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό καρβαμικών γεωργικών φαρμάκων και βακτήρια στα οποία απαντώνται.

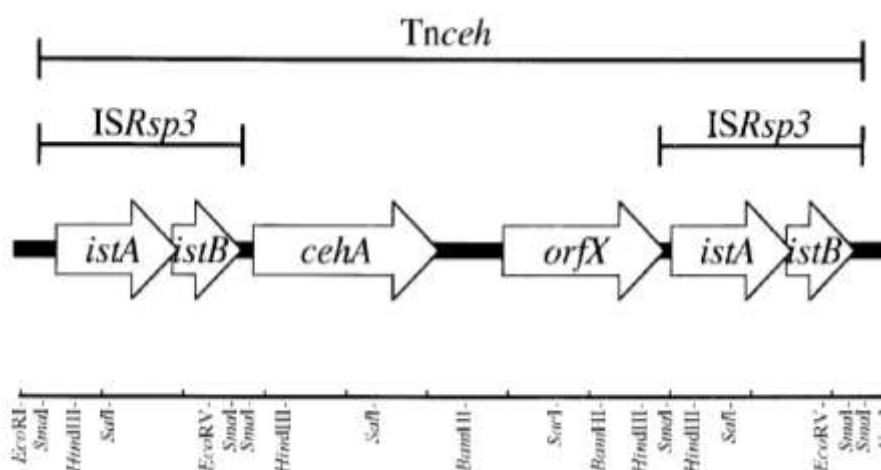
Γονίδιο	Μικροοργανισμός	Κατηγορία	Αναφορά
<i>mcd</i>	<i>Achromobacter</i> sp. WM111	Αρνητικό κατά Gram	Tomasek & Karns 1989
	Στέλεχος ER2	Μεθυλοτροφικό	Topp <i>et al.</i> 1993
	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Αρνητικό κατά Gram	Parekh <i>et al.</i> 1995
	<i>Sphingomonas paucimobili</i>	Αρνητικό κατά Gram	
	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Αρνητικό κατά Gram	
	<i>Achromobacter</i> sp.	Αρνητικό κατά Gram	
	<i>Rhodococcus erythreus</i>	Θετικό κατά Gram	Desaint <i>et al.</i> 2000
	<i>Aminobacter aminovorans</i>	α-πρωτεοβακτήριο	
	<i>Aminobacter aganoensis</i>	α-πρωτεοβακτήριο	
	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Θετικό κατά Gram	
	<i>Arthrobacter</i> sp.	Θετικό κατά Gram	
	<i>Chelatobacter heintzii</i>		
	<i>Ralstonia eutropha</i>	β-πρωτεοβακτήριο	
	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	β-πρωτεοβακτήριο	
	<i>Rhodococcus</i> sp.	Θετικό κατά Gram	
	<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i>	Θετικό κατά Gram	
	<i>Rhodanobacter lindanoclasticus</i>	γ-πρωτεοβακτήριο	
	<i>Pseudomonas putida</i>	γ-πρωτεοβακτήριο	
	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	α-πρωτεοβακτήριο	
<i>cehA</i>	<i>Rhizobium</i> sp. AC100	α-πρωτεοβακτήριο	Hashimoto <i>et al.</i> 2002
<i>cahA</i>	<i>Arthrobacter</i> sp. RC100	Θετικό κατά Gram	Hayatsu <i>et al.</i> 2001

5.2 CehA/ cehA

Η πρωτεΐνη CEHA είναι ένα ακόμα υδρολυτικό ένζυμο που συμμετέχει στη διάσπαση του carbaryl και απομονώθηκε από τους Hashimoto *et al.* το 2002. Η απομόνωσή του έγινε από το βακτηριακό στέλεχος *Rhizobium* sp. AC100 το οποίο απομονώθηκε με τη μέθοδο του εμπλουτισμού από έδαφος με ιστορικό εφαρμογής carbaryl. Το ένζυμο αυτό είναι ικανό να καταλύει την υδρόλυση του carbaryl προς 1-ναφθόλη και μεθυλαμίνη και ανήκει στην ομάδα των εστερασών. Το εκτιμώμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι στα 160.000 Da, και εικάζεται πως συνιστά ένα διμερές που αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες. Η δραστηριότητα του ενζύμου ανεστάλη πλήρως παρουσία ιόντων Hg^{+2} , ενώ δε φαίνεται να απαιτείται η παρουσία μεταλλοϊόντων για την εξέλιξη της δράσης του. Η εξειδίκευση που παρουσίασε το ένζυμο ανάμεσα σε διάφορα υποστρώματα καρβαμικών γεωργικών φαρμάκων ήταν ποικίλη, καθώς παρατηρήθηκε ικανοποιητική δράση απέναντι στα N-μεθυλοκαρβαμικά XMC και metolcarb, ενώ μικρή δράση ή μηδενική παρατηρήθηκε στα καρβαμικά propoxur, fenobucarb και isoprocarb, carbofuran και chloroprotham αντίστοιχα.

Η νουκλεοτιδική ανάλυση φανερώνει πως το γονίδιο *cehA*, που φέρεται στο πλασμίδιο pAC200, περιβάλλεται από δύο αντίγραφα αλληλουχιών ένθεσης (*IS_{Rsp3}*), υποδεικνύοντας πως το γονίδιο απαρτίζει τμήμα ενός πιο σύνθετου τρανσποζονίου (*Tn_{ceh}*), (Εικόνα 15). Συγκεκριμένα, μία περιοχή μεγέθους 10kb η οποία περικλείει το γονίδιο *cehA*, περιέχει εκτός από την κωδικεύουσα περιοχή του *cehA* και άλλα 5

ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Η αμινοξική αλληλουχία των δύο ORFs ανωφορικά του *cehA* γονιδίου εμφανίζει 67% ομολογία με τις IstA και IstB της περιοχής ένθεσης IS1600 του στελέχους *Alcaligenes eutrophus* NH9. Μία πανομοιότυπη αλληλουχία με αυτήν της περιοχής ISRsp3 αποκαλύφθηκε και κατωφορικά του γονιδίου *cehA*. Η αμινοξική αλληλουχία που προκύπτει από το *orfX* φέρει παρόμοια χαρακτηριστικά με πρωτεΐνες που αποτελούν μεμβρανικούς υποδοχείς και εμπλέκονται στη μεταφορά διαφόρων μορίων, όπως σιδηροφόρα ή βιταμίνη B₁₂, ωστόσο φαίνεται να είναι μη λειτουργική καθώς διακόπτεται στο καρβοξυ-τελικό της άκρο από την περιοχή ISRsp3.



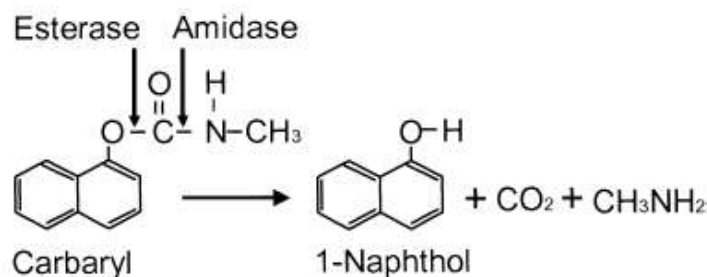
Εικόνα 15. Χάρτης των μεταγραφών που κωδικοποιούνται από περιοχή του πλασμιδίου pAC200. Τα βέλη συμβολίζουν τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια. (Hashimoto *et al.*, 2002).

Μεταξύ των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών CEHA και MCD δε φαίνεται να υπάρχει κάποια σημαντική ομολογία, οπότε τα δύο αυτά υδρολυτικά ένζυμα δε σχετίζονται εξελικτικά. Ωστόσο, οι ιδιότητες του ενζύμου CEHA είναι παρόμοιες με αυτές της υδρολάσης του carbaryl που απομονώθηκε από το βακτήριο *Blastobacter* sp. στέλεχος M501 (Hayatsu *et al.*, 1993), των οποίων οι N-αμινοτελικές αλληλουχίες είναι πανομοιότυπες.

5.3 CahA/ cehA

Οι Hayatsu *et al.*, το 2001 χαρακτήρισαν μία ακόμη υδρολάση του carbaryl, αυτή τη φορά από το βακτηριακό στέλεχος *Arthrobacter* sp. RC100. Το ένζυμο αυτό αποτελεί μια διμερή πρωτεΐνη, μοριακής μάζας 100 kDa, αποτελούμενη από δύο όμοιες υπομονάδες μεγέθους 51 kDa η κάθε μία. Μεταγενέστερα, οι ίδιοι ερευνητές εντόπισαν το αντίστοιχο γονίδιο *cahA* στο πλασμίδιο pRC1 του στελέχους *Arthrobacter* sp. RC100 (Hashimoto *et al.*, 2006). Η νουκλεοτιδική ανάλυση έδειξε πως το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου περιλαμβάνει 1518 ζεύγη βάσεων, και πως η αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου εμφανίζει ομολογία με άλλες χαρακτηρισμένες αλληλουχίες αμιδασών.

Έτσι, η πρωτεΐνη CAHA αποτελεί την πρώτη αναφορά μελέτης σε αμιδάση, ικανής να υδρολύει τα N-μεθυλοκαρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα carbaryl, xylcarb, metolcarb και XMC. Ο N-μεθυλοκαρβαμιδικός δεσμός του carbaryl περιέχει έναν εστερικό και έναν αμιδικό δεσμό (Εικόνα 16). Οπότε, η υδρόλυση του carbaryl είτε από μία εστεράση είτε από μία αμιδάση οδηγεί στην παραγωγή καρβαμικών ή όξινων εστέρων, οι οποίοι είναι ασταθείς και αμέσως διασπώνται προς παραγωγή 1-ναφθόλης, μεθυλαμίνης και διοξειδίου του άνθρακα.



Εικόνα 16. Υδρόλυση του N-μεθυλοκαρβαμιδικού δεσμού του carbaryl από εστεράσες ή αμιδάσες.

5.4 Άλλα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποδόμηση καρβαμιδικών

Διάφορα ακόμα ένζυμα, που ευθύνονται για τη διάσπαση των καρβαμιδικών, έχουν απομονωθεί και περιγραφεί, χωρίς όμως να χαρακτηριστούν και τα αντίστοιχα γονίδια που τα κωδικοποιούν. Το πρώτο μικροβιακό ένζυμο που απομονώθηκε από το στέλεχος *Achromobacter* sp. WM111, με την ικανότητα να διασπά N-μεθυλοκαρβαμιδικά εντομοκτόνα ήταν μία υδρολάση του carbofuran (Derbyshire *et al.*, 1987). Το ένζυμο αυτό παρουσίαζε μεγαλύτερη συγγένεια ως προς το carbofuran και το carbaryl και μικρότερη ως προς το οξιμικό παράγωγο aldicarb.

Ένα από τα ένζυμα που διασπών καρβαμιδικά είναι και η υδρολάση CRL-OK, που πήρε το όνομά της από το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp. CRL-OK, από όπου και απομονώθηκε λόγω της ικανότητάς της να αποδομεί το carbaryl (Mulbry and Eaton, 1991). Υποστρώματα του ενζύμου αυτού αποτελούν και τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα carbofuran και aldicarb, μολονότι για το aldicarb η συγγένειά της είναι πολύ μικρότερη. Όπως και οι παραπάνω υδρολάσες, συνιστά μια διμερή πρωτεΐνη μεγέθους 187kDa, που αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες.

Μία ακόμη υδρολάση των καρβαμιδικών απομονώθηκε από το βακτηριακό στέλεχος *Blastobacter* sp. M501, με την υδρολυτική της ικανότητα να δρα ενάντια σε διάφορα καρβαμιδικά υποστρώματα, όπως το carbaryl, το xylcarb, το metolcarb κ.α. (Hayatsu and Nagata, 1993). Ανήκει στην κατηγορία των εστερασών και αποτελεί μια διμερή πρωτεΐνη μεγέθους 166kDa.

Στόχοι της διπλωματικής εργασίας

- Ο χαρακτηρισμός της αποδομητικής ικανότητας των βακτηρίων που αποδομούν τα γεωργικά φάρμακα oxamyl και fenamiphos.
- Απομόνωση και ταυτοποίηση του γονιδίου που εμπλέκεται στην αποδόμηση του oxamyl από τα απομονωθέντα βακτήρια.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Διαλύματα γεωργικών φαρμάκων

Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικά πρότυπα των παρακάτω γεωργικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους: oxamyl (99.6%, Fluka, Switzerland), carbofuran (99%, ChemService, USA), carbaryl (99%, ChemService, USA), methomyl (99.9%, Fluka, Switzerland), aldicarb (99.9%, Fluka, Switzerland), aldicarb sulfoxide (99.9%, Fluka, Switzerland), aldicarb sulfone (99.9%, Fluka, Switzerland), fenamiphos (99.6%, Fluka, Switzerland), chlorpyrifos (99%, ChemService, USA), cadusafos (98.1% FMC, USA), dimethoate (98% ChemService, USA) και fenthion (97.7% ChemService, USA). Για την προσθήκη των γεωργικών φαρμάκων oxamyl, methomyl και aldicarb σε θρεπτικά υποστρώματα, υπό μορφή διαλύματος, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, συγκέντρωσης 500mg/L. Για τα γεωργικά φάρμακα fenamiphos, cadusafos και dimethoate παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης 200mg/L ενώ αντίθετα, για τα λιγότερο υδατοδιαλυτά φάρμακα carbaryl, carbofuran, chlorpyrifos και fenthion χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1000mg/L σε μεθανόλη.

Θρεπτικά υποστρώματα**Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο (MSM+N)**

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο, MSM+N (Mineral Salts Medium supplemented with Nitrogen) στο οποίο προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα από το αντίστοιχο διάλυμα γεωργικού φαρμάκου. Το υπόστρωμα MSM+N παρέχει στους μικροοργανισμούς όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μακροστοιχεία υπό μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N) ενώ τη μόνη πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα αποτελεί το εκάστοτε προστιθέμενο γεωργικό φάρμακο. Το θρεπτικό διάλυμα MSM+N παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα (stock), τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες και έδωσαν το τελικό MSM+N (Πίνακας 2). Τα stock 1 και 2 προετοιμάστηκαν με διάλυση των συστατικών τους σε ένα λίτρο 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.

Για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού διαλύματος MSM+N + oxamyl (10 mg/L) 20 mL από το αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα oxamyl (500 mg/L) διαλύθηκαν ασηπτικά σε 980 mL MSM+N. Με τον ίδιο τρόπο έγινε και η προετοιμασία 1 L θρεπτικού διαλύματος MSM+N + methomyl (10 mg/L) και MSM+N + aldicarb (10 mg/L). Για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού διαλύματος MSM+N + fenamiphos (10 mg/L) 50 mL από το αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα fenamiphos (200 mg/L)

διαλύθηκαν ασηπτικά σε 950 mL MSM+N. Με τον ίδιο τρόπο έγινε και η προετοιμασία 1 L θρεπτικού διαλύματος MSM+N + cadusafos (10 mg/L) και MSM+N + dimethoate (10 mg/L). Για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων MSM+N + carbaryl (10 mg/L), MSM+N + carbofuran (10 mg/L), MSM+N + fenthion (10 mg/L) και MSM+N + chlorpyrifos (10 mg/L) χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα διαλύματα φαρμάκου σε μεθανόλη συγκέντρωσης 1000mg/L. Όγκος 1ml από τα παραπάνω διαλύματα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο μπουκάλι με το πόμα να παραμένει ανοιχτό μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, μέχρις ότου να εξατμιστεί η μεθανόλη. Το υπόλειμμα του φαρμάκου επαναδιαλύθηκε σε 100ml αποστειρωμένο διάλυμα MSMN και για να επιτευχθεί πλήρης διάλυση των γεωργικών φαρμάκων το θρεπτικό υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή υπερήχων για 15 λεπτά.

Πίνακας 2. Συστατικά στοιχεία θρεπτικού υποστρώματος MSM+N.

	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

Παρασκευή θρεπτικού μέσου εκχυλίσματος εδάφους (SEM)

Για την προετοιμασία 1 L περίπου υγρού θρεπτικού μέσου από εκχύλισμα εδάφους (Soil Extract Medium, 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 φυγοκέντρωσης διηθήθηκε και επαναποστειρώθηκε στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού διαλύματος SEM + fenamiphos (10 mg/L), 50 mL από το αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα fenamiphos (200 mg/L) προστέθηκαν σε 950 mL SEM υπό ασηπτικές συνθήκες.

Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB (Luria Bertani)

Για την προετοιμασία 1000ml θρεπτικού μέσου LB + Oxamyl, 10g NaCl, 10g καζεΐνης και 5g Yeast Extract αραιώθηκαν σε 980ml απεσταγμένο νερό, αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν στους 121°C υπό πίεση 2,1atm για 25min. Ακολούθησε η προσθήκη 20mL υδατικού διαλύματος oxamyl συγκέντρωσης 500 mg/mL υπό ασηπτικές συνθήκες.

Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου NAB (Nutrient Agar Broth)

Για την προετοιμασία 1 L θρεπτικού μέσου NAB, 13 g nutrient broth και 15 g άγαρ αραιώθηκαν σε 1 L απεσταγμένο νερό, αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν στους 121 °C υπό πίεση 2,1 atm για 25 min. Ακολούθησε η επίστρωση του διαλύματος σε τριβλία petri υπό ασηπτικές συνθήκες.

Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Όλα απομονώθηκαν από έδαφος που συλλέχθηκε από αγρό μπανανοκαλλιέργειας της Κρήτης με πολυετές ιστορικό χρήσης των fenamiphos και oxamyl. Τα στελέχη *Pseudomonas* sp. OXA17, *P. putida* OXA 18, *P. jinjuensis* OXA 20 και *P. putida* OXA 25 απομονώθηκαν για την ικανότητα τους να διασπούν το oxamyl ενώ τα *P. putida* FEN1 και *Acinetobacter rhizosphaerae* FEN21 απομονώθηκαν για την ικανότητα τους να διασπούν το fenamiphos.

Πίνακας 3. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Βακτηριακά στελέχη	Γεωργικά φάρμακα που αποδομούν
<i>Pseudomonas</i> sp. OXA 17	oxamyl
<i>Pseudomonas putida</i> OXA 18	oxamyl
<i>Pseudomonas jinjuensis</i> OXA 20	oxamyl
<i>Pseudomonas putida</i> OXA 25	oxamyl
<i>Pseudomonas putida</i> FEN 1	fenamiphos
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> FEN21	fenamiphos

Μέθοδος ανάλυσης γεωργικών φαρμάκων και HPLC

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των γεωργικών φαρμάκων έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-UV). Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC Marathon III, 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. Ο διαχωρισμός των διαφόρων γεωργικών φαρμάκων και προϊόντων μεταβολισμού τους πραγματοποιήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης (RP) C18, Nucleosil (150 x 4.6 mm, 5 µm id) (Macherey – Nagel GmbH, Germany) με διάφορες κινητές φάσεις που περιγράφονται παρακάτω και ροή 1 mL/min.

Διαλύτες και πρότυπα διαλύματα γεωργικών φαρμάκων

Για τη χρωματογραφική ανάλυση και την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα αναλυτικά πρότυπα των νηματοδοκτόνων και των μεταβολιτών τους όπως αναφέρονται παραπάνω. Για την παρασκευή των κινητών τους φάσεων χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες μεθανόλη (MeOH), ακετονιτρίλιο (ACN), Οξικό οξύ (CH_3COOH) και νερό HPLC grade (Merck GmbH, Germany).

Καμπύλες αναφοράς

Ο ποσοτικός προσδιορισμός όλων των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον λόγο αυτό, αρχικά παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1000 $\mu\text{g/mL}$ σε μεθανόλη για όλα τα γεωργικά φάρμακα και τα αντίστοιχα προϊόντα μεταβολισμού τους, όπου αυτά μελετήθηκαν. Ακολούθως, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 10, 5, 2, 1, 0,5 και 0,1 $\mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα, με διαδοχικές αραιώσεις είτε σε μεθανόλη για τα φάρμακα aldicarb, carbaryl, carbofuran, cadusafos, dimethoate, fenthion και chlorpyrifos είτε στο διάλυμα της κινητής τους φάσης για τα φάρμακα fenamiphos (70 % ACN:30 % H_2O), oxamyl (20 % ACN:80 % H_2O) και methomyl (20 % ACN:80 % H_2O). Από το κάθε πρότυπο διάλυμα έγινε έγχυση 20 μL στο σύστημα HPLC και το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών με την βοήθεια του λογισμικού Clarify®.

Ανάλυση των γεωργικών φαρμάκων

Τα γεωργικά φάρμακα aldicarb, carbofuran και carbaryl αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC με κινητή φάση αποτελούμενη από ACN: H_2O (40:60 v:v) και η ανίχνευσή τους έγινε στα 248nm για το aldicarb, και στα 215nm για το carbofuran και το carbaryl. Οι χρόνοι κατακράτησής τους ήταν αντίστοιχα στα 3,4min, 4,6min και 5,2min. Τα γεωργικά φάρμακα oxamyl, methomyl και οι μεταβολίτες του aldicarb (aldicarb sulfoxide, aldicarb sulfone) διαχωρίστηκαν με κινητή φάση αποτελούμενη από ACN: H_2O (20:80 v:v) και η ανίχνευσή τους έγινε στα 220nm για το oxamyl, στα 235nm για το methomyl και στα 215nm για τους μεταβολίτες του aldicarb. Οι χρόνοι κατακράτησης ήταν αντίστοιχα 3.2 (oxamyl), 3.7 (methomyl) και 3.4-4.2 min (aldicarb sulfoxide, aldicarb sulfone).

Τα γεωργικά φάρμακα fenamiphos, cadusafos και fenthion αναλύθηκαν με κινητή φάση αποτελούμενη από ACN: H_2O (70:30 v/v), και η ανίχνευσή τους έγινε στα 254nm για το fenamiphos, στα 230nm για το cadusafos και στα 200nm για το fenthion. Οι χρόνοι κατακράτησης ήταν αντίστοιχα στα 2,7min, 4,4min και 4,0min. Τα γεωργικά φάρμακα dimethoate, carbofuran και οι μεταβολίτες του fenamiphos (fenamiphos sulfoxide, fenamiphos sulfone, fenamiphos phenol) διαχωρίστηκαν με κινητή φάση αποτελούμενη από ACN: H_2O (40:60 v:v) και η ανίχνευση των ουσιών

έγινε στα 200nm για το dimethoate, στα 215nm για το carbofuran και στα 225 για τους μεταβολίτες του fenamiphos. Οι χρόνοι κατακράτησης για τα dimethoate και carbofuran ήταν αντίστοιχα στα 2,9min και 4,6min και στα 5,8min για το μεταβολίτη fenamiphos phenol. Ο διαχωρισμός του chlorpyrifos έγινε με βαθμιδωτή έκλυση, όπου η κινητή φάση της αντλίας Α αποτελούνταν από 40 ACN: 55 H₂O: 5 MeOH : 0,5 Οξικό οξύ, και η κινητή φάση της αντλίας Β αποτελούνταν από 100% ACN. Η ανίχνευση του chlorpyrifos πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 300 nm και ο χρόνος κατακράτησής του ήταν στα 11,3min. Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης που ακολουθήθηκε για το διαχωρισμό του chlorpyrifos φαίνεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης για το χρωματογραφικό διαχωρισμό του chlorpyrifos . σε σύστημα HPLC-UV.

Χρόνος (min)	Αντλία Α	Αντλία Β
0	100%	0%
7	100%	0%
8	30%	70%
13	30%	70%
14	100%	0%
16	100%	0%

1. Επίδραση της συγκέντρωσης του oxamyl στην αποδομητική ικανότητα των βακτηρίων

Για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του oxamyl στην ικανότητα αποδόμησής του από τα απομονωθέντα βακτήρια παρασκευάστηκαν θρεπτικά υποστρώματα MSMN + oxamyl σε συγκεντρώσεις 10, 100 και 500mg/L. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις από 10ml θρεπτικού υποστρώματος MSMN + oxamyl, οι οποίες εμβολιάστηκαν με 0,5ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας του στελέχους *P. jinjuensis* OXA 20 που βρισκόταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης σε υπόστρωμα MSMN + oxamyl. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, χρησιμοποιήθηκαν και δύο μάρτυρες που περιείχαν 10ml θρεπτικού υποστρώματος MSMN + oxamyl, στις οποίες προστέθηκαν 500 μl MSMN χωρίς βακτηριακά κύτταρα. Όλες οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήριο, στους 25°C, στις 150 στροφές/λεπτό. Η διάσπαση του oxamyl από το βακτηριακό στέλεχος παρακολουθήθηκε με τη λήψη 1ml καλλιέργειας από κάθε δείγμα σε χρονικά διαστήματα 0, 2, 4, 7 και 14 ημερών μετά τον εμβολιασμό των δειγμάτων, και η ανάλυσή τους έγινε σε σύστημα HPLC-UV όπως έχει ήδη περιγραφεί.

2. Επίδραση της συγκέντρωσης του fenamiphos στην αποδομητική ικανότητα των βακτηρίων

Για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του fenamiphos στην ικανότητα αποδόμησής του από τα απομονωθέντα βακτήρια, παρασκευάστηκαν θρεπτικά υποστρώματα MSMN + fenamiphos σε συγκεντρώσεις 10, 100 και 500mg/L. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις από 10ml θρεπτικού υποστρώματος MSMN + fenamiphos, οι οποίες εμβολιάστηκαν με 0,5ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας του στελέχους *P. putida* FEN 1 που βρισκόταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης σε υπόστρωμα MSMN + fenamiphos. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, χρησιμοποιήθηκαν και δύο μάρτυρες που περιείχαν 10ml θρεπτικού υποστρώματος MSMN + fenamiphos στις οποίες προστέθηκαν 500 μl MSMN χωρίς βακτηριακά κύτταρα. Όλες οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήριο, στους 25°C, στις 150 στροφές/λεπτό. Η διάσπαση και ο μεταβολισμός του fenamiphos από το βακτηριακό στέλεχος παρακολουθήθηκε με τη λήψη 1ml καλλιέργειας από κάθε δείγμα σε χρονικά διαστήματα 0, 2, 4, 7 και 14 ημερών μετά τον εμβολιασμό των δειγμάτων, και η ανάλυσή τους έγινε σε σύστημα HPLC-UV όπως έχει ήδη περιγραφεί.

3. Αξιολόγηση της ικανότητας του βακτηρίου *P. jinjuensis* OXA20 να διασπά άλλα καρβαμιδικά και οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Pseudomonas jinjuensis* OXA 20 ως το πιο αποτελεσματικό και ταχύ στην αποδόμηση του oxamyl. Για κάθε ένα από τα γεωργικά φάρμακα oxamyl, methomyl, aldicarb, carbaryl, carbofuran και fenamiphos χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις από 10ml υποστρώματος MSMN + γεωργικό φάρμακο (10mg/L). Ο εμβολιασμός των δειγμάτων έγινε με 500μl βακτηριακής καλλιέργειας που βρισκόταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης, σε θρεπτικό υπόστρωμα MSMN + Oxamyl. Ως μάρτυρες σε κάθε μεταχείριση, χρησιμοποιήθηκαν και δύο επαναλήψεις των αντίστοιχων υποστρωμάτων στις οποίες προστέθηκαν 500 μl MSMN χωρίς βακτηριακά κύτταρα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήριο στις 150 στροφές/λεπτό στους 25°C. Η πυκνότητα του εμβολίου (10^7 cfu / ml) προσδιορίστηκε με επίστρωση 10μl διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων καλλιέργειας του βακτηρίου σε τρυβλία Nutrient Agar Broth. Η διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων από το βακτηριακό στέλεχος παρακολουθήθηκε με τη λήψη 1ml καλλιέργειας από κάθε δείγμα σε χρονικά διαστήματα 0, 2, 4 και 7 ημερών μετά τον εμβολιασμό των δειγμάτων, και η ανάλυσή τους έγινε σε σύστημα HPLC-UV όπως έχει ήδη περιγραφεί.

4. Αξιολόγηση της ικανότητας του βακτηρίου *P. putida* FEN1 να διασπά άλλα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *P. putida* FEN 1 (Ελένη Χανίκα, Μεταπτυχιακή εργασία 2010). Για κάθε ένα γεωργικό φάρμακο από τα fenamiphos, cadusafos, dimethoate, chlorpyrifos, fenthion, oxamyl και carbofuran, χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις από 10ml υποστρώματος MSMN + γεωργικό φάρμακο (10mg/L). Ο εμβολιασμός των δειγμάτων έγινε με 500μl βακτηριακής καλλιέργειας που βρισκόταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης σε θρεπτικό υπόστρωμα MSMN + fenamiphos. Ως μάρτυρες σε κάθε μεταχείριση, χρησιμοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις των 10ml των αντίστοιχων υποστρωμάτων στις οποίες προστέθηκαν 500 μl MSMN χωρίς βακτηριακά κύτταρα. Η καλλιέργεια του βακτηρίου στις μεταχειρίσεις MSM+N + fenamiphos, MSM+N + cadusafos, MSM+N + dimethoate, MSM+N + carbofuran και MSM+N + oxamyl έγινε σε πλαστικά φιαλίδια universal ενώ η καλλιέργεια του βακτηρίου στις μεταχειρίσεις MSM+N + fenthion και MSM+N + chlorpyrifos έγινε σε γυάλινα φιαλίδια universal ώστε να αποφευχθεί πιθανή προσρόφηση των ιδιαίτερα λιποδιαλυτών οργανοφωσφορικών μορίων fenthion και chlorpyrifos στις πλαστικές επιφάνειες των φιαλιδίων. Η πυκνότητα του εμβολίου (10^7 cfu / ml) προσδιορίστηκε με επίστρωση 10μl διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων καλλιέργειας του βακτηρίου σε τρυβλία Nutrient Agar Broth. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν σε ανακινούμενο επωαστήριο στις 150 στροφές / λεπτό στους 25°C. Η διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων από το βακτηριακό στέλεχος παρακολούθηθηκε με τη λήψη 1ml καλλιέργειας από κάθε δείγμα σε χρονικά διαστήματα 0, 2, 4, 7, 14 και 21 ημερών μετά τον εμβολιασμό των δειγμάτων, και η ανάλυσή τους έγινε σε σύστημα HPLC-UV όπως έχει ήδη περιγραφεί.

5. Αξιολόγηση της ικανότητας του *P. putida* FEN1 να απομακρύνει υψηλές συγκεντρώσεις του fenamiphos όταν εμβολιαστεί στο έδαφος.

5.1. Εδάφη και συνθήκες επώασης

Το δείγμα εδάφους που χρησιμοποιήθηκε συλλέχθηκε από θερμοκήπιο της περιοχής Βελεστίνου, Βόλος και χαρακτηρίστηκε ως αλκαλικό (pH 8.1), πηλώδες. Από το αρχικό δείγμα διαχωρίστηκαν έξι υπό-δείγματα των 200 g που έλαβαν εφαρμογή κατάλληλης ποσότητας υδατικού διαλύματος fenamiphos (2000 mg/L) ώστε στο έδαφος να επιτευχθεί συγκέντρωση 500 μg fenamiphos /g εδάφους. Μετά την εφαρμογή τα δείγματα αφέθηκαν για χρονικό διάστημα (2 h) και ακολούθησε προσθήκη νερού ώστε η υγρασία του εδάφους να προσαρμοστεί στο 40 % της υδατοχωρητικότητας. Τα δύο δείγματα εδάφους αναμίχθηκαν καλά για να επέλθει ομοιόμορφη κατανομή του γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος, ζυγίστηκαν εκ νέου σε πλαστικές σακούλες και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25 °C. Οι σακούλες τρυπήθηκαν ώστε να διασφαλιστούν αερόβιες συνθήκες για τα εδάφη και καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο για την αποτροπή της εισόδου φωτός. Η υγρασία στο

έδαφος διατηρήθηκε με την προσθήκη απιονισμένου νερού σε τακτά χρονικά διαστήματα.

5.2. Εκχύλιση και μέθοδος ανάλυσης φαρμάκου από τα εδαφικά δείγματα

Μετά την παρέλευση τεσσάρων μηνών από την εφαρμογή του fenamiphos, 10g από κάθε δείγμα εδάφους απομακρύνθηκαν και ακολούθησε ανάλυση για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του fenamiphos και των μεταβολιτών του FSO και FSO2 σε σύστημα HPLC. Για την εκχύλιση του fenamiphos από τα εδαφικά δείγματα, 10 g εδάφους από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν σε κωνική φιάλη των 100 mL και αναμείχθηκαν με 20 mL μεθανόλης (pro analysis, Merck®). Οι φιάλες καλύφθηκαν με parafilm και ανακινήθηκαν για 1 ώρα και 30 min υπό έντονη ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το εκχύλισμα από κάθε φιάλη μεταφέρθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρησης και φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 13000 rpm. Από το υπερκείμενο, 10 mL μεταφέρθηκαν σε μικρό γυάλινο φιαλίδιο (scintillation bottle) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Για την ανάλυση του κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκε 1ml από το αντίστοιχο εκχύλισμα, το οποίο φυγοκεντρήθηκε για 1min στις μέγιστες στροφές και κατόπιν ανάλυση του υπερκείμενου σε σύστημα HPLC όπως έχει ήδη περιγραφεί για το fenamiphos.

5.3. Εμβολιασμός των εδαφικών δειγμάτων με το βακτήριο *P.putida* FEN1

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αποδομητική ικανότητα του βακτηρίου *P. putida* FEN 1 στο έδαφος, τα εδαφικά δείγματα εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος. Το συγκεκριμένο στέλεχος αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα SEM + fenamiphos για 72h, στους 25°C, σε ανακινούμενο επωαστήρα με 150 rpm. Η συγκέντρωση του εμβολίου (10^6 cfu / g εδάφους) προσδιορίστηκε με την επίστρωση 10μl διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων καλλιέργειας σε τρυβλία Nutrient Agar Broth. Από τα έξι εδαφικά δείγματα, τα μισά εμβολιάστηκαν με 10ml υγρής καλλιέργειας του βακτηρίου *P. putida* FEN 1, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα-μάρτυρες δέχθηκαν ίση ποσότητα απιονισμένου νερού. Όλα τα δείγματα αναμείχθηκαν με σπάτουλα ώστε να επιτευχθεί ομοιογενής κατανομή του εμβολίου και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25°C, καλυπτόμενα από αλουμινόχαρτο. Οι δειγματοληψίες έγιναν με την απομάκρυνση 10g εδάφους από κάθε δείγμα, 0, 4, 7, 14 και 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των δειγμάτων, αφού προηγουμένως είχε γίνει η προσαρμογή της υγρασίας των εδαφών στο 40 % της υδατοχωρητικότητάς τους με την προσθήκη απιονισμένου νερού. Η εκχύλιση και η μέθοδος ανάλυσης σε σύστημα HPLC-UV του fenamiphos και των μεταβολιτών του έγινε όπως έχει ήδη περιγραφεί.

6. Απομόνωση του γονιδίου που εμπλέκεται στην υδρόλυση του oxamyl

6.1. Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες επώασης

Για τη μελέτη του γονιδίου που ελέγχει την υδρόλυση του oxamyl, χρησιμοποιήθηκαν τα έξι βακτηριακά στελέχη του Πίνακα 3. Η καλλιέργεια των στελεχών OXA 17, 18, 20 και 25 πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα LB + oxamyl (10mg/L). Για την ανάπτυξη του κάθε βακτηριακού στελέχους χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες με 250ml υγρού θρεπτικού μέσου LB + Oxamyl, οι οποίες εμβολιάστηκαν με 1ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας του αντίστοιχου στελέχους που βρισκόταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Η καλλιέργεια των στελεχών FEN 1 και 21 έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα SEM + fenamiphos (10mg/L). Η χρήση LB εδώ αποφεύχθηκε διότι προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο μας έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα βακτήρια χάνουν την αποδομητική τους ικανότητα ύστερα από καλλιέργεια στο συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο. Για την ανάπτυξη του κάθε βακτηριακού στελέχους χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες με 250ml υγρού θρεπτικού μέσου SEM + fenamiphos, οι οποίες εμβολιάστηκαν με 1ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας του αντίστοιχου στελέχους που βρισκόταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Οι καλλιέργειες και των έξι βακτηριακών στελεχών επώαστηκαν για 3 ημέρες στους 30°C, σε ανακινούμενο επωαστήριο με 210 στροφές/λεπτό και η ανάπτυξή τους παρακολουθήθηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των καλλιεργειών στα 600 nm.

6.2. Απομόνωση ολικού DNA από τις αμιγείς καλλιέργειες των βακτηρίων

Για την εξαγωγή ολικού DNA από τις βακτηριακές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit NucleoSpin® Tissue της Macherey-Nagel ακολουθώντας το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας. Η επιτυχία της διαδικασίας απομόνωσης ολικού DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 0,8% (0,56 g αгарόζης σε 70 mL TAE 1x) και 2 µL βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές σε τράπεζα οπτικοποίησης UV.

6.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις αμιγείς καλλιέργειες των βακτηρίων

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις βακτηριακές καλλιέργειες έγινε χρήση του εμπορικού kit Nucleospin® Plasmid της Macherey-Nagel. Η εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA έγινε με το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδίων χαμηλού αριθμού αντιγράφων σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Η επιτυχία της διαδικασίας απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 0,8% (0,56 g αгарόζης σε 70 mL TAE 1x) και 2 µL βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές σε τράπεζα οπτικοποίησης UV.

6.4. Διαγνωστική ανίχνευση των γονιδίων *mcd* και *cehA*

Με την αντίδραση της PCR ελέγχθηκε η παρουσία τμήματος των γονιδίων *mcd* και *cehA* χρησιμοποιώντας ως μήτρα ολικό και πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από τις βακτηριακές καλλιέργειες. Για τον λόγο αυτό προετοιμάστηκαν κατάλληλα ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων *mcd* και *cehA*, που έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην διάσπαση καρβαμικών γεωργικών φαρμάκων (Πίνακας 5). Οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων για την ανίχνευση του γονιδίου *mcd* παρελήφθησαν από προηγούμενες μελέτες (Parekh *et al.*, 1995), και ήταν σχεδιασμένοι έτσι ώστε να ενισχύουν ένα τμήμα μεγέθους 561bp, μεταξύ του δεύτερου κωδικωνίου έναρξης και της εσωτερικής περιοχής *mcd* *Bgl*III, του γονιδίου *mcd*, όπως αυτό απομονώθηκε από το πλασμίδιο pPDL11 του βακτηριακού στελέχους *Achromobacter* sp. WM111. Για την ανίχνευση του γονιδίου *cehA* σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές, έτσι ώστε να ενισχύουν ένα τμήμα μεγέθους 512bp, της εσωτερικής περιοχής του γονιδίου *cehA*, μεταξύ των βάσεων 978 και 1489.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 6 και 7 αντίστοιχα. Τα προϊόντα ενίσχυσης της αντίδρασης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,5% (1,05g αгарόζη σε 70 mL TAE 1x) και 2 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 5 μ L DNA αναμεμειγμένα με 1 μ L loading buffer 6x. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές σε τράπεζα οπτικοποίησης UV.

Πίνακας 5. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων *mcd* και *cehA*.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
mcdL1	5' – CAA GAA CTC AAA TCC ATC TAC CTT GCC – 3'	69,0°C
mcdR1	5' – ATC CTT CCC TCG GAA TGA ATC GTC TCG – 3'	70,0°C
cehA F	5' – GAT GAT CCG TCA CAT AAG AGG – 3'	52,9 °C
cehA R	5' – GCA GTT GAG CAG ATG ATA CC – 3'	53,3 °C

Πίνακας 6. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση PCR των γονιδίων *mcd* και *cehA* στα βακτήρια που εμφάνισαν αποδομητική δράση καρβαμικών γεωργικών φαρμάκων.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x)	2,5 μ L	1x (1.5 mM MgCl ₂)
dNTPs (10 mM)	0,5 μ L	200 μ M από το καθένα
Εμπρόσθιος εκκινητής (10 pmol/ μ L)	1 μ L	0,2 μ M
Ανάστροφος εκκινητής (10 pmol/ μ L)	1 μ L	0,2 μ M
Kapa Taq πολυμεράση (1U/ μ L)	0,1 μ L	1U/25 μ L
DNA	1 μ L	10-50 ng

ddH ₂ O	18,9 µL	
Συνολικός όγκος	25 µL	

Πίνακας 7. Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR για την ενίσχυση των γονιδίων *mcd* και *cehA*.

Στάδιο	T		Διάρκεια	
	<i>mcd</i>	<i>cehA</i>		
Αρχική αποδιάταξη	95 °C		2 min	
Αποδιάταξη	95 °C		30 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση	63 °C	53 °C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C		1 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C		2 min	

6.5. Ενίσχυση και απομόνωση του γονιδίου *cehA* από τα βακτηριακά στελέχη

Εφόσον ανιχνεύθηκε η παρουσία του γονιδίου *cehA* στο πλασμιδιακό DNA όλων των στελεχών, σχεδιάστηκαν εκκινητές για την ενίσχυση όλου του γονιδίου *cehA* με την τεχνική της PCR. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε το απομονωθέν γονίδιο να μπορεί να κλωνοποιηθεί σε μελλοντική μελέτη στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pET-28a(+), και να απομονωθεί το αντίστοιχο ένζυμο. Για το λόγο αυτό ο εμπρόσθιος εκκινητής φέρει στα άκρα του αλληλουχίες αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο BamHI, ενώ ο ανάστροφος εκκινητής φέρει στα άκρα του αλληλουχίες αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο EcoRI (Πίνακας 8). Το ζεύγος εκκινητών (Πίνακας 9) που σχεδιάστηκε ενισχύει το λειτουργικό γονίδιο *cehA*, μεγέθους 2229bp.

Πίνακας 8. Η θέση αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων της αλληλουχίας των εκκινητών που ενισχύουν το γονίδιο *cehA*, και τα όρια του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης.

	Νουκλεοτιδική αλληλουχία	Αμινοξική αλληλουχία
Εμπρόσθιος εκκινητής	<p>5' ... AAGG ATC CATG GGGCAGCCGATTGCCGATG ... 3'</p> <p>3' ... TTC CTA GG TACCCCGTCGGCTAACGGCTAC ... 5'</p> <p>BamHI</p>	5' KGS M GQPIAD 3'
Ανάστροφος εκκινητής	<p>5' ... TTC GAA TTC TCACGTTAAGTCGCTTTTCGGCGA ... 3'</p> <p>3' ... AAG CTT AAG AGTGCAATTTCAGCGAAAGCCGCT ... 5'</p> <p>EcoRI</p>	5' EFE Stop TLDSEA 3'

Πίνακας 9. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του λειτουργικού γονιδίου *cehA*.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
<i>cehA</i> full length F	5' – AAGGGATCCATGGGGCAGCCGATTGCCGATG– 3'	73,7°C
<i>cehA</i> full length R	5' – TTCGAATTCTCACGTTAAGTCGCTTTCGGCGA– 3'	68,9 °C

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε παρουσιάζονται στους Πίνακες 10 και 11 αντίστοιχα. Τα προϊόντα ενίσχυσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (0,7 g αγαρόζη σε 70 mL TAE 1x) και 2 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 25 μ L DNA αναμειγμένα με 4 μ L loading buffer 6x. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές σε τράπεζα οπτικοποίησης UV.

Πίνακας 10. Αντίδραση PCR για την ενίσχυση της πλήρους αλληλουχίας του γονιδίου *cehA*

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x)	2,5 μ L	1x (1.5 mM MgCl ₂)
dNTPs (10 mM)	0,5 μ L	200 μ M από το καθένα
Εμπρόσθιος εκκινητής (10 pmol/ μ L)	3,35 μ L	0,4 μ M
Ανάστροφος εκκινητής (10 pmol/ μ L)	3,35 μ L	0,4 μ M
Kapa Taq πολυμεράση (1U/ μ L)	0,1 μ L	1U/25 μ L
DNA	1 μ L	10-50 ng
ddH ₂ O	14,2 μ L	
Συνολικός όγκος	25 μL	

Πίνακας 11. Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR για την ενίσχυση του λειτουργικού γονιδίου *cehA*.

Στάδιο	T	Διάρκεια	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	2 min	
Αποδιάταξη	95 °C	30 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση	55 °C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	2,5 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	2 min	

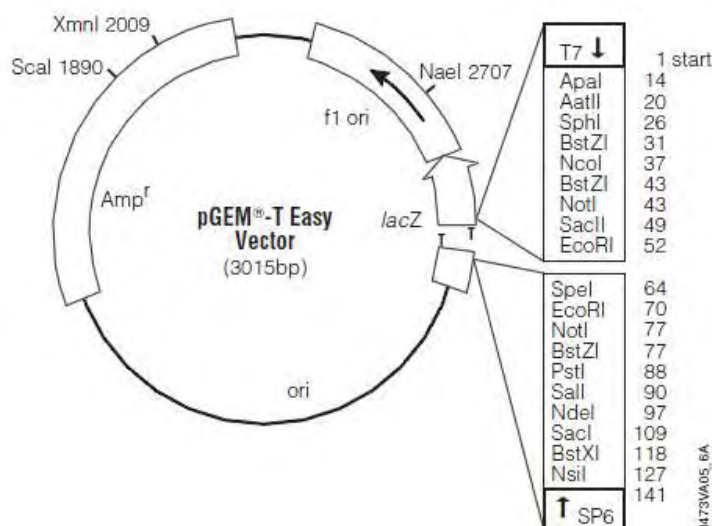
6.6. Εξαγωγή ζώνης της πηκτής για καθαρισμό PCR προϊόντων (gel extraction)

Μετά την ηλεκτροφόρηση, ελέγχθηκε η ύπαρξη ζωνών του σωστού μεγέθους των προϊόντων της PCR (περίπου 2300bp) σε τράπεζα UV. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή των ζωνών από την πηκτή αγαρόζης στα 6 προαναφερθέντα δείγματα και ο καθαρισμός των προϊόντων με τη χρήση του εμπορικού κιτ QIAquick Gel Extraction Kit της QIAGEN, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας. Η επιβεβαίωση της απομόνωσης του σωστού προϊόντος ενίσχυσης έγινε με την

ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1% (0,7 g αгарόζη σε 70 mL TAE 1x) και 2 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 3 μ L DNA αναμεμειγμένα με 1 μ L loading buffer 6x. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές σε τράπεζα οπτικοποίησης UV.

6.7. Ένθεση του γονιδίου σε πλασμιδιακό φορέα

Με βάση την ένταση της ζώνης του ενθέματος και τον τύπο $[25 \text{ ng φορέα} \times 2,0 \text{ kb (μήκος DNA)} / 3] \times (3 / 1)$ υπολογίστηκε η ποσότητα DNA κάθε δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση ένθεσης σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα pGEM®-T easy (Promega) (Εικόνα 17). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση ένθεσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 12. Μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων τα δείγματα επωάστηκαν στους 4°C για 16 h.



Εικόνα 17. Γενετικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy. Τα βέλη δείχνουν τη φορά έκφρασης γονιδίων.

Πίνακας 12. Αντίδραση ένθεσης του γονιδίου *cehA* σε πλασμιδιακό φορέα.

Αντιδραστήρια	Όγκος
2x Buffer	5 μ L
Φορέας pGem	0,5 μ L
PCR προϊόν	1 – 3,5 μ L
Λιγάση	1 μ L
dd H2O	X μ L
Συνολικός όγκος	10 μL

6.8. Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. Coli*

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

- Σε αποστειρωμένα eppendorfs μεταφέρθηκαν 2 μ L ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και προστέθηκαν 80 μ L δεκτικών κυττάρων. Τα eppendorfs τοποθετήθηκαν για 30 min στον πάγο.
- Στη συνέχεια τα δείγματα επωάστηκαν για 45 sec στους 42°C και τοποθετήθηκαν αμέσως για 2 min σε πάγο.
- Προστέθηκαν 200 μ L LB υπό ασηπτικές συνθήκες και τα δείγματα επωάστηκαν για 50 min στους 37°C.
- Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής και ασηπτικά προστέθηκαν 50 μ L X GAL (2 %) και 10 μ L IPTG.
- Τέλος, τα δείγματα επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB + Ampicillin και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 16 h.

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε επιλογή των θετικών κλώνων (λευκών αποικιών) από κάθε τρυβλίο, και με τη χρήση αποστειρωμένων ακίδων τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα γυάλινα φιαλίδια universal που περιείχαν 5 mL LB + 5 μ L ampicillin. Ακολούθως, τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C, υπό ανάδευση στις 200 στροφές/min, για 16 h.

6.9. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Με την ολοκλήρωση της επώασης των παραπάνω κλώνων, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του εμπορικού kit Nucleospin® Plasmid της Macherey-Nagel. Η εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA έγινε με το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδίων υψηλού αριθμού αντιγράφων σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση του κάθε δείγματος σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 1% (0,7 g αгарόζης σε 70 mL TAE 1x) και 2 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές σε τράπεζα οπτικοποίησης UV.

6.10. Πέψη πλασμιδιακού DNA

Για τον έλεγχο του ενθέματος στους φορείς των κλώνων, πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης του φορέα pGEM με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Τα αντιδραστήρια της πέψης παρουσιάζονται στον Πίνακα 13. Η επώαση της αντίδρασης έγινε στους 37°C για 30 min. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% (0,7 g αгарόζης σε 70 mL TAE 1x) και 2 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 3 μ L DNA αναμειγμένα με 1 μ L loading buffer 6x.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA σε τράπεζα οπτικοποίησης UV.

Πίνακας 13. Αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού φορέα με ένθεμα το γονίδιο *cehA*.

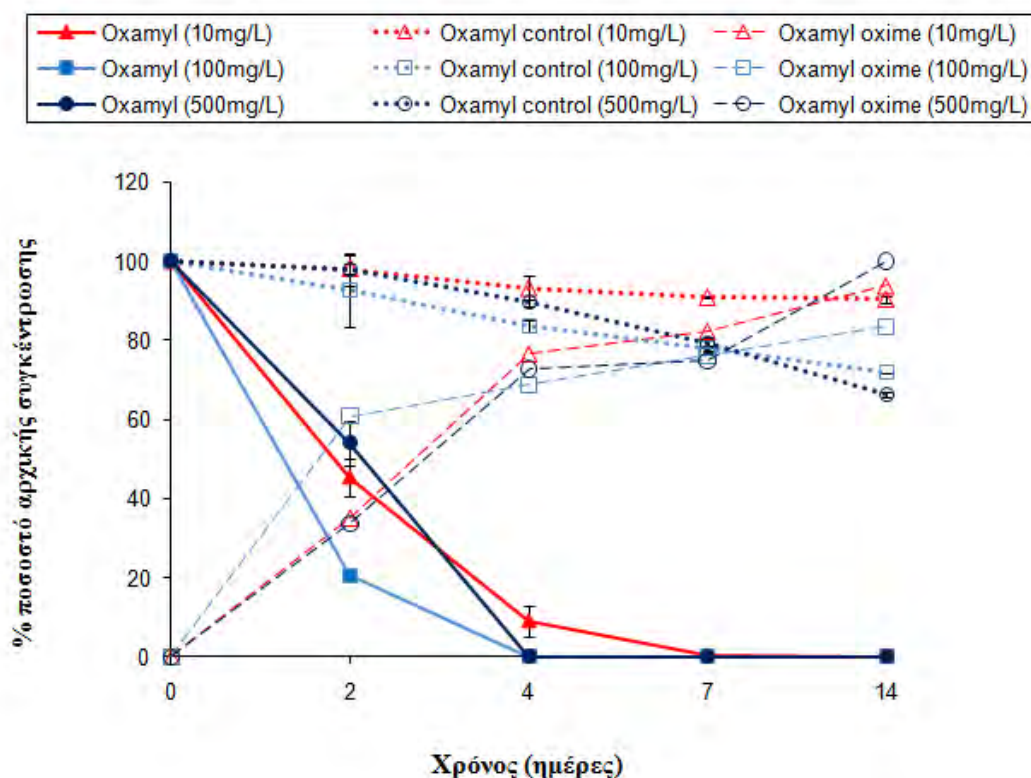
Αντιδραστήρια	Δείγματα DNA
10x Buffer EcoRI	2 µL
Φορέας pGem + ένθεμα	5 µL
EcoRI	1 µL
dd H ₂ O	12 µL
Συνολικός όγκος	20 µL

Το πλασμιδιακό DNA των κλώνων απεστάλη για αλληλούχιση του ενθέματος. Οι αλληλουχίες αναγνώστηκαν και προς τις δύο κατευθύνσεις ώστε να προκύψει η πλήρης αλληλουχία (2229 bp) του γονιδίου *cehA* των απομονωθέντων βακτηρίων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Επίδραση της συγκέντρωσης του oxamyl στην αποδομητική ικανότητα των βακτηρίων

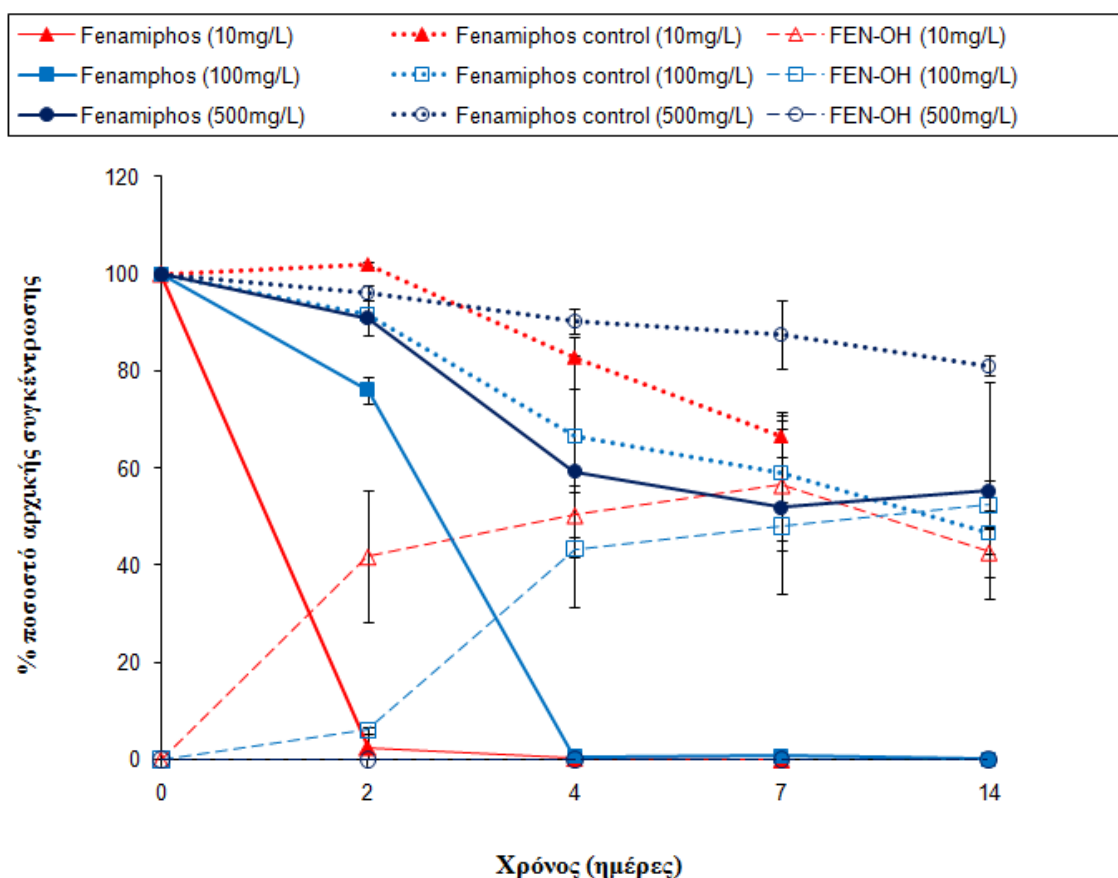
Το στέλεχος *P. jinjuensis* OXA 20 αξιολογήθηκε ως προς την ικανότητά του να διασπά υψηλές συγκεντρώσεις του oxamyl που προσομοιάζουν συνθήκες ατυχήματος ρύπανσης. Η ανάλυση των δειγμάτων σε σύστημα HPLC-UV έδειξε ότι το βακτηριακό στέλεχος είχε την ικανότητα να διασπά συγκεντρώσεις 10mg /L και 100mg /L oxamyl εντός 4 ημερών, ενώ απαιτούνται 7 ημέρες για την πλήρη αποδόμηση συγκέντρωσης 500mg /L. Ο μεταβολισμός του oxamyl συμπίπτει με το σχηματισμό του μεταβολίτη oxamyl oxime που συσσωρεύτηκε στο υπόστρωμα με την ολοκλήρωση της επώασης (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Η υδρόλυση του oxamyl σε MSMN + oxamyl συγκέντρωσης 10, 100 και 500mg/L, εμβολιασμένο (κλειστά σύμβολα) ή μη εμβολιασμένο (ανοιχτά σύμβολα) με το βακτήριο *P. jinjuensis* στέλεχος OXA20 και η αντίστοιχη ποσοστιαία συσσώρευση του μεταβολίτη oxamyl oxime. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων και οι γραμμές σφάλματος στην αντίστοιχη τυπική απόκλιση.

2. Επίδραση της συγκέντρωσης του fenamiphos στην αποδομητική ικανότητα των βακτηρίων

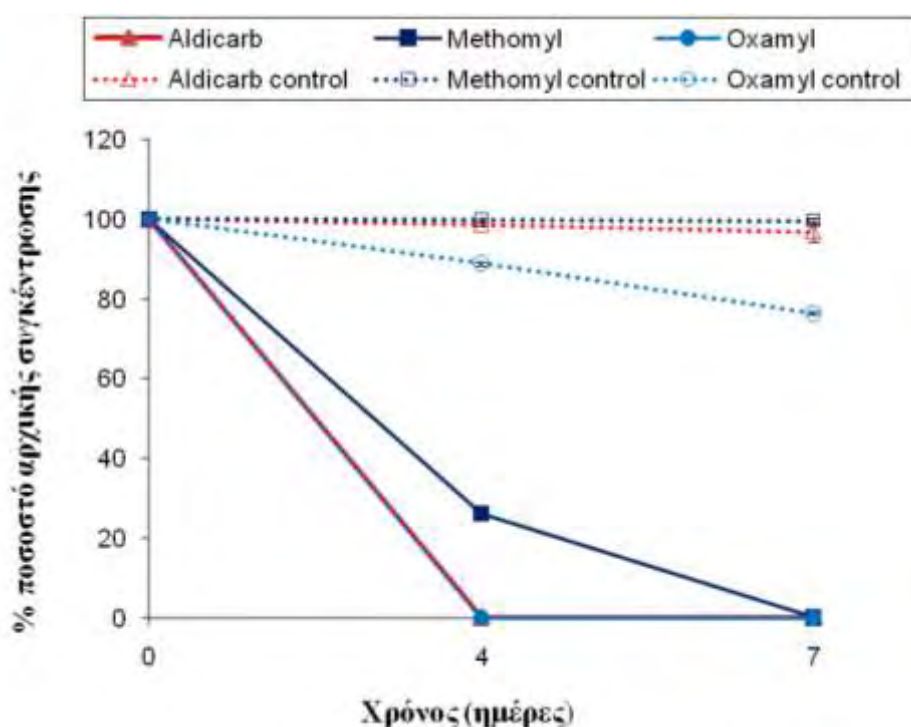
Το βακτηριακό στέλεχος *P. putida* FEN1 ήταν ικανό να διασπά το fenamiphos εντός 2 και 4 ημερών από τον εμβολιασμό του, όταν η αρχική συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου στο υπόστρωμα ήταν 10mg/L και 100mg/L αντίστοιχα. Αντίθετα, το ίδιο βακτήριο κατάφερε να διασπάσει μόνο το 50% της αρχικής ποσότητας του fenamiphos σε διάστημα 14 ημερών όταν η αρχική συγκέντρωση του fenamiphos στο υπόστρωμα ήταν 500mg/L. Η υδρόλυση του fenamiphos οδήγησε στο σχηματισμό του μεταβολίτη fenamiphos phenol (FEN-OH) (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Η υδρόλυση fenamiphos σε MSMN + fenamiphos συγκέντρωσης 10, 100 και 500mg/L, που εμβολιάστηκε (κλειστά σύμβολα) ή δεν εμβολιάστηκε (ανοιχτά σύμβολα) με το βακτήριο *P. putida* στέλεχος FEN1 και η αντίστοιχη ποσοστιαία συσσώρευση του μεταβολίτη fenamiphos phenol (FEN-OH). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων και οι γραμμές σφάλματος στην αντίστοιχη τυπική απόκλιση.

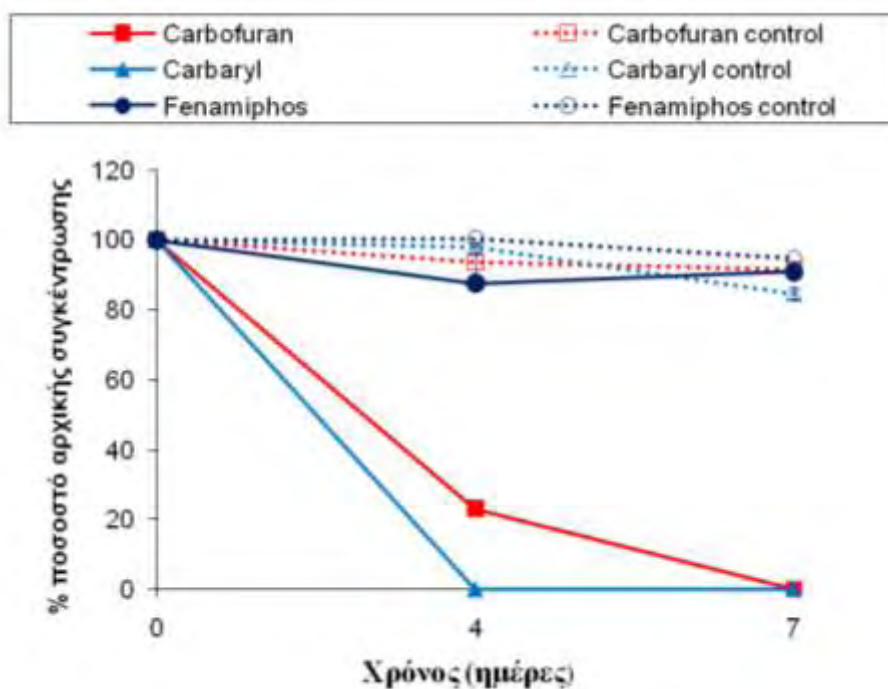
3. Αξιολόγηση της ικανότητας του βακτηρίου *P. jinjuensis* OXA20 να διασπά άλλα καρβαμιδικά και οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα

Το βακτηριακό στέλεχος *P. jinjuensis* OXA 20 εξετάστηκε ως προς την ικανότητά του να διασπά και άλλα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα εκτός του oxamyl. Η ανάλυση των δειγμάτων σε σύστημα HPLC-UV έδειξε πως το στέλεχος αυτό ήταν ικανό να αποδομεί πλήρως τα οξιμικά καρβαμιδικά παράγωγα oxamyl, methomyl και aldicarb μέσα σε 4 έως 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του στα αντίστοιχα υγρά υποστρώματα (Εικόνα 20). Η περαιτέρω αποδόμηση του aldicarb δεν οδήγησε στο σχηματισμό των οξειδωτικών μεταβολιτών του, aldicarb sulfoxide και aldicarb sulfone.



Εικόνα 20. Η υδρόλυση των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων aldicarb, methomyl και oxamyl και σε θρεπτικό υπόστρωμα MSMN εμβολιασμένο (κλειστά σύμβολα) ή μη εμβολιασμένο (ανοιχτά σύμβολα) με το βακτήριο *P. jinjuensis* στέλεχος OXA20. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων και οι γραμμές σφάλματος στην αντίστοιχη τυπική απόκλιση.

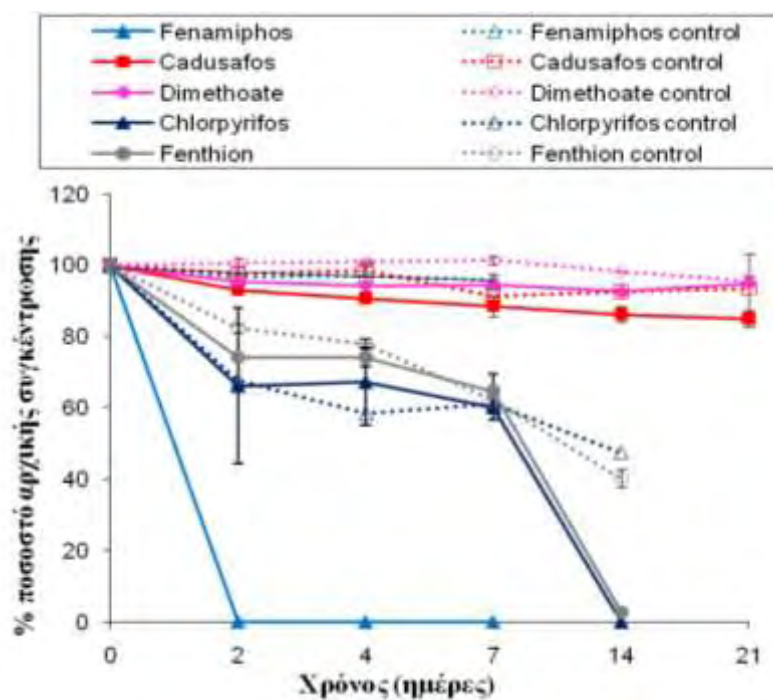
Επίσης, το στέλεχος *P. jinjuensis* OXA 20 έχει την ικανότητα να διασπά πλήρως και τα άρυλο-μέθυλο καρβαμιδικά εντομοκτόνα carbaryl και carbofuran μέσα σε 4 και 7 ημέρες από τον εμβολιασμό, αντίστοιχα (Εικόνα 21). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση του οργανοφωσφορικού fenamiphos. Στα δείγματα-μάρτυρες όλων των γεωργικών φαρμάκων παρατηρήθηκε αμελητέα διάσπαση με το 80-90% της αρχικής ποσότητας να παραμένει στο θρεπτικό μέσο με την ολοκλήρωση της επώασης.



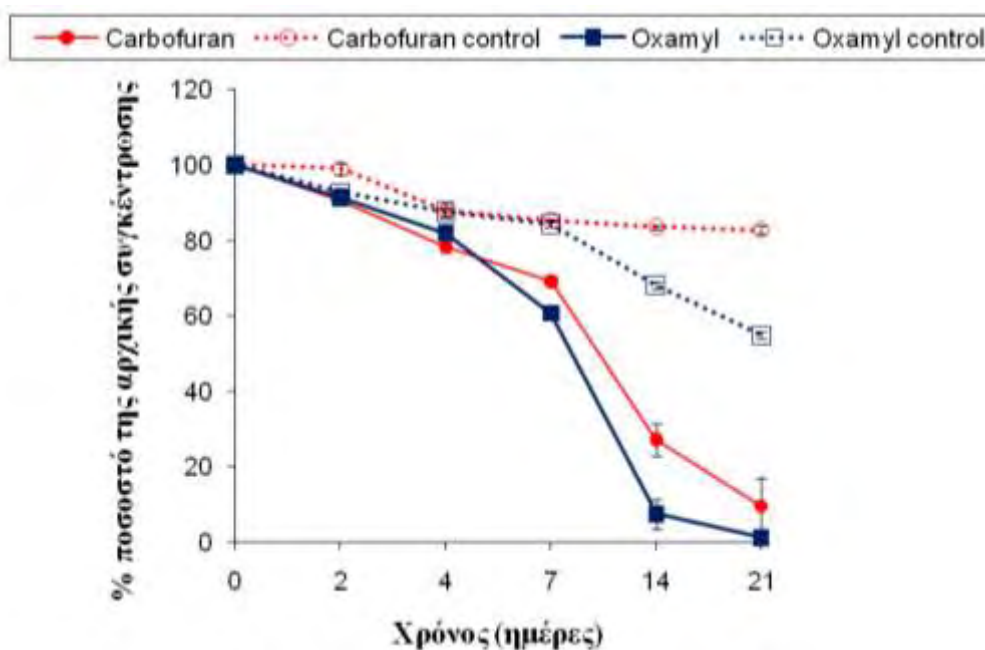
Εικόνα 21. Η υδρόλυση των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων carbofuran και carbaryl, και του οργανοφωσφορικού fenamiphos σε θρεπτικό υπόστρωμα MSMN εμβολιασμένο (κλειστά σύμβολα) ή μη εμβολιασμένο (ανοιχτά σύμβολα) με το βακτήριο *P. jinjuensis* στέλεχος OXA20. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων και οι γραμμές σφάλματος στην αντίστοιχη τυπική απόκλιση.

4. Αξιολόγηση της ικανότητας του βακτηρίου *P. putida* FEN1 να διασπά άλλα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα

Το βακτηριακό στέλεχος *P. putida* FEN 1, ικανό να διασπά πλήρως το fenamiphos αλλά και τα προϊόντα μεταβολισμού που προκύπτουν, εξετάστηκε ως προς την ικανότητά του να αποδομεί και άλλα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα. Η ανάλυση των δειγμάτων σε σύστημα HPLC-UV έδειξε πως το στέλεχος αυτό επιτυγχάνει ταχεία αποδόμηση του fenamiphos εντός 4 ημερών, ενώ για την πλήρη αποδόμηση των οργανοφωσφορικών fenthion και chlorpyrifos, που κατέχουν όπως και το fenamiphos P-O δεσμό, χρειάστηκαν 14 ημέρες. Αντιθέτως, το βακτηριακό στέλεχος δεν κατάφερε να διασπάσει τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα cadusafos και dimethoate, που χαρακτηρίζονται από P-S δεσμό στο μόριο τους (Εικόνα 22). Το πλέον εντυπωσιακό ήταν η ικανότητα του βακτηριακού στελέχους να αποδομεί και τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα oxamyl και carbofuran εντός 14-21 ημερών (Εικόνα 23).



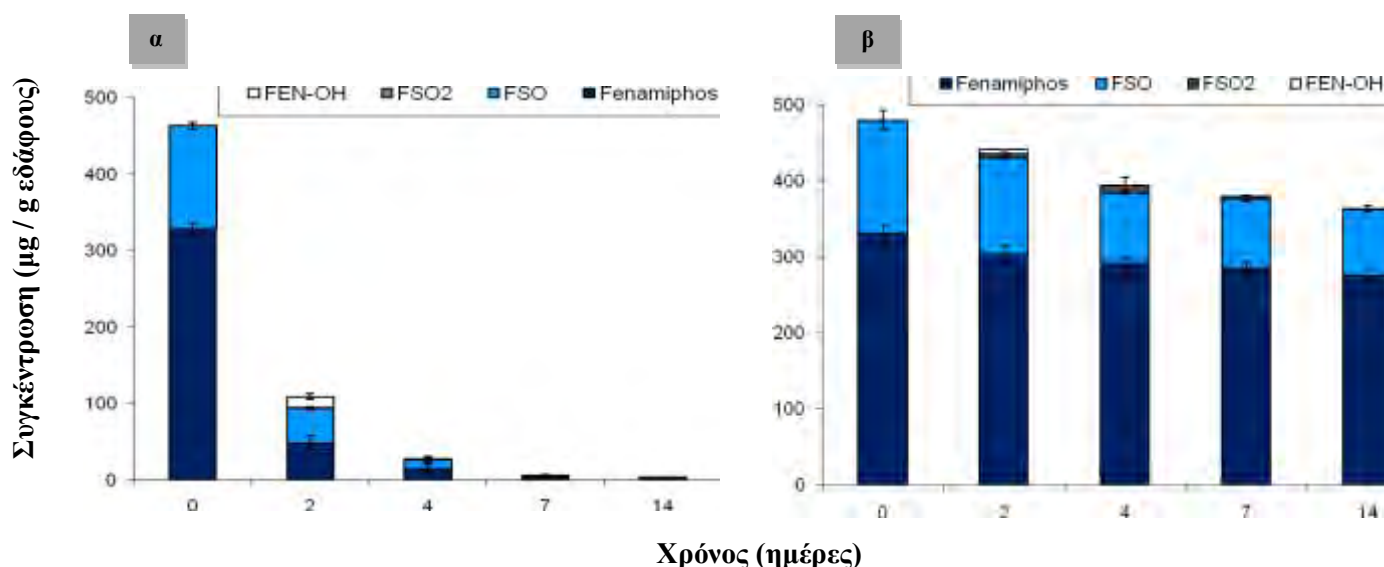
Εικόνα 22. Η αποδόμηση των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων fenamiphos, chlorpyrifos, cadusafos, dimethoate, chlorpyrifos και fenthion σε θρεπτικό υπόστρωμα MSMN εμβολιασμένο (κλειστά σύμβολα) ή μη εμβολιασμένο (ανοιχτά σύμβολα) με το βακτήριο *P. putida* στέλεχος FEN1. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων και οι γραμμές σφάλματος στην αντίστοιχη τυπική απόκλιση.



Εικόνα 23. Η υδρόλυση των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων carbofuran και oxamyl σε θρεπτικό υπόστρωμα MSMN εμβολιασμένο (κλειστά σύμβολα) ή μη εμβολιασμένο (ανοιχτά σύμβολα) με το βακτήριο *P. putida* στέλεχος FEN1. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων και οι γραμμές σφάλματος στην αντίστοιχη τυπική απόκλιση.

5. Αξιολόγηση της ικανότητας των αποδομητικών βακτηρίων να απομακρύνουν υψηλές συγκεντρώσεις fenamiphos όταν εμβολιαστούν στο έδαφος

Τέσσερις μήνες μετά την εφαρμογή υδατικού διαλύματος fenamiphos σε εδαφικά δείγματα ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 500 $\mu\text{g/g}$ εδάφους, η υπολειπόμενη ποσότητα που ανιχνεύθηκε ήταν 330 $\mu\text{g g}^{-1}$ fenamiphos και 130 $\mu\text{g g}^{-1}$ fenamiphos sulfoxide (Εικόνα 21α). Ο ακόλουθος εμβολιασμός των εδαφικών αυτών δειγμάτων με το βακτηριακό στέλεχος *P. putida* FEN1 οδήγησε σε ταχεία αποδόμηση του fenamiphos και του μεταβολίτη FSO, η οποία ολοκληρώθηκε σε 14 ημέρες (Εικόνα 24α). Κατά την αποδόμηση των FEN και FSO, παρατηρήθηκε ο πρόσκαιρος σχηματισμός (2^η ημέρα) ελάχιστης ποσότητας του μεταβολίτη FEN-OH. Αντίθετα, στα μη εμβολιασμένα εδαφικά δείγματα-μάρτυρες, παρατηρήθηκε βραδεία αποδόμηση του fenamiphos και του FSO, όπως και παραγωγή μικρών ποσοτήτων του μεταβολίτη FSO2 (Εικόνα 24β).

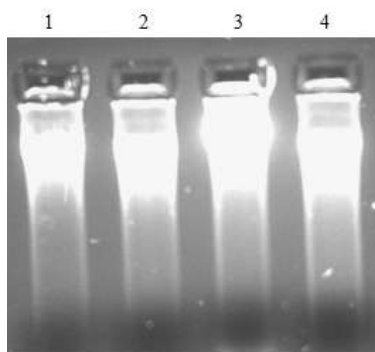


Εικόνα 24. Η αποδόμηση των υπολειμμάτων του fenamiphos (FEN), και των μεταβολιτών του fenamiphos sulfoxide (FSO), fenamiphos sulfone (FSO2) και fenamiphos phenol (FEN-OH) σε εδαφικά δείγματα (α) εμβολιασμένα με το βακτηριακό στέλεχος *P. putida* FEN1 και (β) σε δείγματα-μάρτυρες που δεν εμβολιάστηκαν με το βακτήριο. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων και οι γραμμές σφάλματος στην αντίστοιχη τυπική απόκλιση.

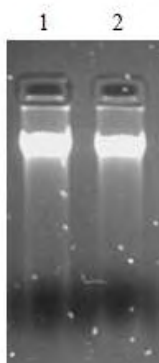
6. Απομόνωση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση του oxamyl

Απομόνωση ολικού DNA από τις αμιγείς καλλιέργειες των βακτηρίων

Για τη μελέτη του γονιδίου που εμπλέκεται στην αποδόμηση καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων χρησιμοποιήθηκαν αμιγείς καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών που αποδομούν το oxamyl από τις οποίες απομονώθηκε ολικό DNA, όπως φαίνεται στις Εικόνες 25 και 26.



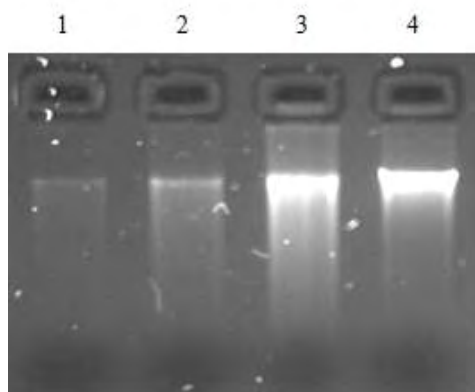
Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης ολικού DNA των βακτηριακών στελεχών, 1: *Pseudomonas* sp. OXA17, 2: *P. putida* OXA18, 3: *P. jinjuensis* OXA20, 4: *P. putida* OXA25.



Εικόνα 26. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης ολικού DNA των βακτηριακών στελεχών, 1: *P. putida* FEN1, 2: *Acinetobacter rhizosphaerae* FEN 21.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις αμιγείς καλλιέργειες των βακτηρίων

Στα βακτηριακά στελέχη που είναι ικανά να αποδομούν το καρβαμιδικό γεωργικό φάρμακο oxamyl εξετάστηκε και η ύπαρξη πλασμιδιακού DNA. Στις αμιγείς καλλιέργειες και των έξι βακτηρίων ανιχνεύτηκε πλασμιδιακό DNA, όπως φαίνεται στις Εικόνες 27 και 28.



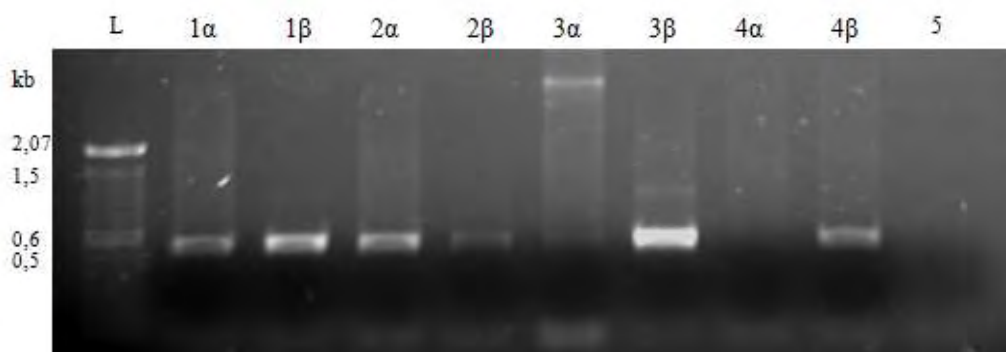
Εικόνα 27. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης πλασμιδιακού DNA των βακτηριακών στελεχών, 1: *Pseudomonas* sp. OXA17, 2: *P. putida* OXA18, 3: *P. jinjuensis* OXA20, 4: *P. putida* OXA25.



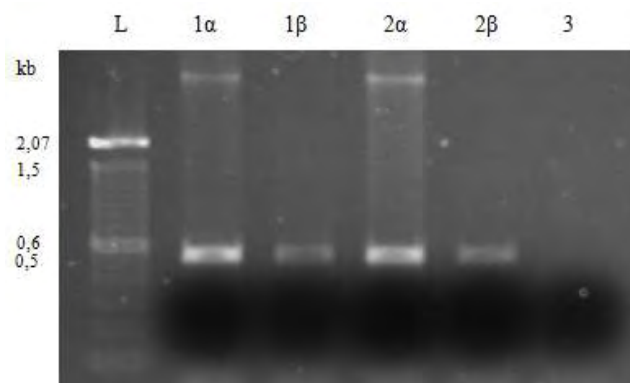
Εικόνα 28. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης πλασμιδιακού DNA των βακτηριακών στελεχών, 1: *P. putida* FEN1, 2: *Acinetobacter rhizosphaerae* FEN 21.

Διαγνωστική ανίχνευση του γονιδίου που ευθύνεται για τη διάσπαση του oxamyl

Προκειμένου να ανιχνευτεί το γονίδιο που εμπλέκεται στην αποδόμηση των καρβαμιδικών φαρμάκων από τα απομονωθέντα βακτήρια, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR. Σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση τμήματος των γονιδίων *mcd* και *cehA* αντίστοιχα, σε ολικό και πλασμιδιακό DNA των βακτηρίων που αποδομούν το oxamyl. Στο σύνολο και των έξι βακτηριακών στελεχών που εξετάστηκαν ανιχνεύθηκε η παρουσία τμήματος του γονιδίου *cehA*, μεγέθους 512bp, σε πλασμιδιακό και σε ολικό DNA (Εικόνες 29 και 30). Επομένως, φαίνεται πως το γονίδιο που ευθύνεται για τη διάσπαση του oxamyl βρίσκεται σε πλασμίδιο. Δοκιμές ανίχνευσης του γονιδίου *mcd* σε πλασμιδιακό και ολικό DNA από τα απομονωθέντα βακτήρια δεν έδειξαν καμία ενίσχυση.



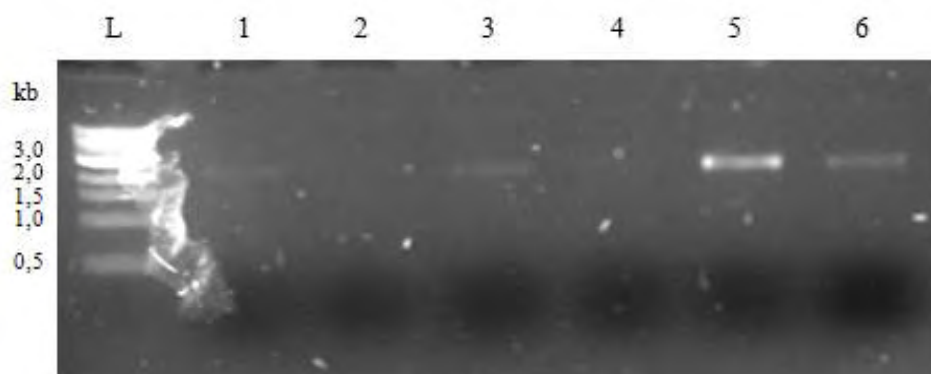
Εικόνα 29. Πηκτή αγαρόζης με PCR προϊόντα από την ενίσχυση τμήματος του *ceH4* γονιδίου στα βακτήρια που αποδομούν το oxamyl. Γραμμές 1α: Ολικό DNA OXA 17 (*Pseudomonas sp.*), 1β: Πλασμιδιακό DNA OXA 17, 2α: Ολικό DNA OXA 18 (*P. putida*), 2β: Πλασμιδιακό DNA OXA 18, 3α: Ολικό DNA OXA 20 (*P. jinjuensis*), 3β: Πλασμιδιακό DNA OXA 20, 4α: Ολικό DNA OXA 25 (*P. putida*), 4β: Πλασμιδιακό DNA OXA 25, 5: Αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 30. Πηκτή αγαρόζης με τα PCR προϊόντα που προήλθαν από την ενίσχυση τμήματος του *ceH4* γονιδίου στα βακτηριακά στελέχη FEN1 και FEN21 που απομονώθηκαν για την ικανότητα τους να αποδομούν το fenamiphos αλλά παράλληλα είχαν και την ικανότητα να διασπούν επιτυχώς και το oxamyl. Γραμμές 1α: Ολικό DNA FEN 1 (*P. putida*), 1β: Πλασμιδιακό DNA FEN 1, 2α: Ολικό DNA FEN 21 (*Acinetobacter rhizosphaerae*), 2β: Πλασμιδιακό DNA FEN 21, 3: Αρνητικός μάρτυρας.

Ενίσχυση του λειτουργικού γονιδίου *ceH4*

Για την παραλαβή ολόκληρου του γονιδίου *ceH4*, σχεδιάστηκε ένα ζεύγος εκκινητών που επέτρεψε την ενίσχυση του πλήρους γονιδίου, μεγέθους περίπου 2300bp. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε με μήτρα πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από τα στελέχη που αποδομούν το oxamyl. Τα προϊόντα ενίσχυσης μετά από την απομόνωσή τους μέσα από την πηκτή αγαρόζης και τον καθαρισμό τους ηλεκτροφορήθηκαν εκ νέου σε πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 31).



Εικόνα 31. Πηκτή αγαρόζης με τα PCR προϊόντα που προήλθαν από την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου *cehA*, στα βακτήρια που αποδομούν το oxamyl. Γραμμές 1: Στέλεχος OXA 17, 2: Στέλεχος OXA 18, 3: Στέλεχος OXA 20, 4: Στέλεχος OXA 25, 5: Στέλεχος FEN 1, 6: Στέλεχος FEN 21.

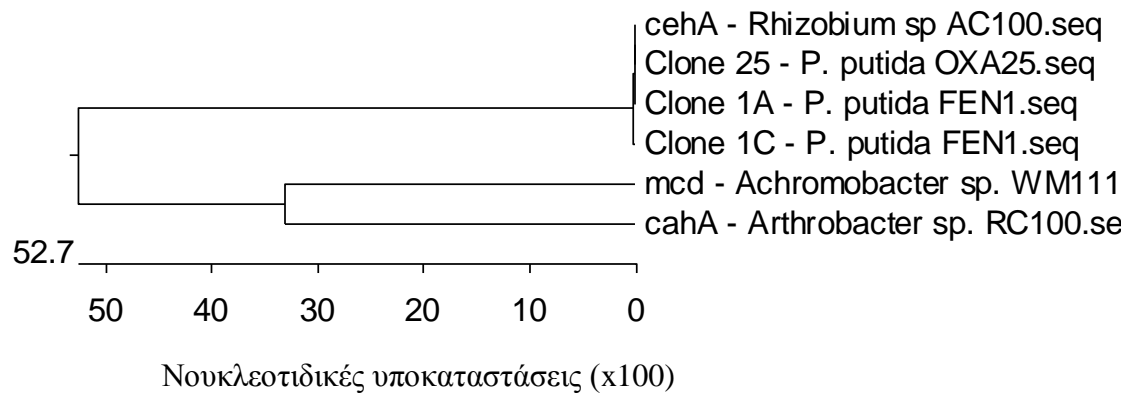
Ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου *cehA*

Η αλληλούχιση των δειγμάτων έδειξε πως τρεις κλώνοι, εκ των οποίων οι δύο από το βακτήριο *Pseudomonas putida* στέλεχος FEN1, και ο τρίτος από το βακτήριο *Pseudomonas putida* στέλεχος OXA25, παρουσιάζουν ομολογία σε επίπεδο 99.8-99.9% με το γονίδιο *cehA* που απομονώθηκε από το στέλεχος *Rhizobium* sp. AC100 (Hashimoto *et al.*, 2002). Συνολικά, τα γονίδια που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζουν από μία έως και 4 υποκαταστάσεις βάσεων σε σχέση με την αλληλουχία του *cehA* γονιδίου (Πίνακας 13). Επομένως, ως γονίδιο υπεύθυνο για την αποδόμηση των καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων, στα βακτήρια *P. putida* FEN1 και *P. putida* OXA25, ορίζεται το *cehA*. Η περιοχή του γονιδίου που αλληλουχήθηκε περιλαμβάνει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μεγέθους 2229 bp. Η πλήρης ομοπαράθεση των αλληλουχιών παρουσιάζεται στο Σχήμα 1 του Παραρτήματος.

Πίνακας 13. Ποσοστό ομολογίας και αριθμός νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων μεταξύ της αλληλουχίας των επιλεγμένων κλώνων και του γονιδίου *cehA*.

Υποκαταστάσεις	% Ομολογία				
		1	2	3	4
	<i>cehA</i> – <i>Rhizobium</i> sp. AC100	1	100.0	99.9	99.9
	Κλώνος 1A – <i>P. putida</i> FEN1	2	1	99.8	99.9
	Κλώνος 1C – <i>P. putida</i> FEN1	3	3	4	99.8
	Κλώνος 25 – <i>P. putida</i> OXA25	4	2	3	5

Το φυλογενετικό δέντρο που βασίζεται στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη διάσπαση καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων φαίνεται στην Εικόνα 32. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των ενθεμάτων που προέκυψαν από τα υπόλοιπα τέσσερα βακτηριακά στελέχη δεν έδειξαν ομολογία με το εν λόγω γονίδιο ή άλλο γονίδιο παρόμοιας λειτουργίας.



Εικόνα 32. Δενδρόγραμμα που προκύπτει από την ομοπαράθεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία και των γονιδίων *cehA*, *mcd*, *cahA* που έχουν μέχρι σήμερα αναφερθεί ότι εμπλέκονται στη διάσπαση καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκαν βακτηριακά στελέχη, που αποδομούν τα γεωργικά φάρμακα oxamyl και fenamiphos, ως προς την ικανότητά τους να διασπούν υψηλές συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων νηματωδοκτόνων, και εξετάστηκε το εύρος των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων που μπορούν να διασπάσουν. Το πιο αποτελεσματικό στην αποδόμηση του oxamyl βακτηριακό στέλεχος, *P. jinjuensis*, δεν απώλεσε την αποδομητική του ικανότητα ακόμα και όταν εκτέθηκε σε συγκεντρώσεις που είναι πιθανό να εμφανιστούν στο περιβάλλον μόνο ύστερα από ατυχήματα χειρισμού πυκνών διαλυμάτων oxamyl (500 mg/L). Σε αντίστοιχες μελέτες, στέλεχος του είδους *S. maltophilia* ήταν ικανό να μεταβολίζει ως και 1000 mg/L methomyl αλλά παρουσία επιπλέον πηγών άνθρακα όπως γλυκόζη (Mohamed, 2009).

Το βακτηριακό στέλεχος *P. jinjuensis* OXA20 είχε την ικανότητα να διασπά ταχύτατα όλα τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα που εξετάστηκαν. Αυτά περιλαμβάνουν τα οξιμικά παράγωγα aldicarb και methomyl, δομικά παρόμοια με το oxamyl, αλλά και τα άρυλο-μέθυλο καρβαμιδικά εντομοκτόνα carbofuran και carbaryl, των οποίων η δομική ομοιότητα με το oxamyl συνίσταται μόνο στην μέθυλο-καρβαμιδική ομάδα. Αυτή είναι και η πρώτη αναφορά απομόνωσης ενός βακτηριακού στελέχους που να φέρει την ικανότητα να αποδομεί και οξιμικά παράγωγα αλλά και άρυλο-μέθυλο καρβαμιδικά. Πράγματι, προηγούμενες μελέτες από τους Yan *et al.*, (2007) έδειξαν πως το *Novosphingobium* sp. ενώ ήταν ικανό να αποδομεί το carbofuran, δεν μπορούσε να διασπάσει και το methomyl. Ομοίως, ένα μεθυλότροφο στέλεχος και το στέλεχος *Achromobacter* WM111, αμφότερα ικανά να διασπούν το carbofuran και άλλα άρυλο-μέθυλο καρβαμιδικά όπως το carbaryl, δεν ήταν ικανά να μεταβολίσουν το methomyl και το aldicarb αντίστοιχα (Topp *et al.*, 1993). Η ευρεία εξειδίκευση που παρουσιάζει το στέλεχος *P. jinjuensis* OXA20 ως προς τα υποστρώματα των καρβαμιδικών φαρμάκων ενισχύει την υπόθεση πως το βακτήριο αυτό χρησιμοποιεί τη μέθυλο-καρβαμιδική ομάδα που παράγεται από την υδρόλυση του oxamyl ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Αντιθέτως, το στέλεχος αυτό δεν ήταν ικανό να διασπά το οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο fenamiphos παρόλο που το έδαφος από το οποίο απομονώθηκε χαρακτηριζόταν από ιστορικό επανειλημμένων εφαρμογών του fenamiphos. Αυτό δεν αποτελεί έκπληξη καθώς μέχρι τώρα τη μόνη περίπτωση μικροοργανισμού ικανού να αποδομεί καρβαμιδικά και συγχρόνως οργανοφωσφορικά φάρμακα αποτελεί ένα γενετικά τροποποιημένο βακτήριο (Liu *et al.*, 2006).

Το βακτηριακό στέλεχος *P. putida* FEN1 ήταν επιπλέον ικανό να αποδομεί το fenamiphos και το μεταβολίτη του FSO στο έδαφος πλήρως, όταν εμβολιάστηκε σε έδαφος που περιείχε συγκεντρώσεις TTR fenamiphos >450 $\mu\text{g g}^{-1}$. Προηγούμενη μελέτη των Megharaj *et al.*, (2003) έδειξε πως το στέλεχος *Brevundimonas* sp. ήταν ικανό να υδρολύει ταχύτατα 30 μM fenamiphos στο έδαφος προς FEN-OH, το οποίο αποδομούταν περαιτέρω από τη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Παρομοίως, οι Caceres *et al.*, (2009) αναφέρουν ότι το στέλεχος *Microbacterium* sp. μπορεί να

υδρολύει 10μM fenamiphos όταν εμβολιάστηκε σε δείγματα υπογείων υδάτων. Με τον ίδιο τρόπο, και το *P. putida* FEN1 ήταν ικανό να μεταβολίζει την κατά πολλές φορές υψηλότερη συγκέντρωση του fenamiphos και των οξειδωμένων μεταβολιτών του, τα οποία είχαν υποστεί το φαινόμενο της ‘γήρανσης’ για μια περίοδο τεσσάρων μηνών πριν τον εμβολιασμό του βακτηρίου, αντανακλώντας έτσι μία ρεαλιστική περίπτωση περιβαλλοντικής ρύπανσης. Πράγματι, αρκετές μελέτες αποδεικνύουν πως η παρατεταμένη παραμονή των οργανικών ρύπων στο έδαφος οδηγεί σε αυξημένη προσρόφηση και μειωμένη βιοδιαθεσιμότητά τους, γεγονός που δυσκολεύει τη βιολογική απομάκρυνσή τους (Alexander 2000, Sharer *et al.*, 2003).

Σε παράλληλα πειράματα αξιολογήθηκε και η ικανότητα του στελέχους *P. putida* FEN1 να αποδομεί εκτός του fenamiphos και άλλα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα. Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος ήταν ικανό να αποδομεί επιτυχώς τα εντομοκτόνα chlorpyrifos και fenthion. Προηγούμενες μελέτες επιβεβαιώνουν πως η αποδομητική ικανότητα των βακτηρίων ενάντια στα οργανοφωσφορικά περιορίζεται σε δομικά παρόμοιες ουσίες (Wang *et al.*, 2010). Η παρατήρηση αυτή εξηγεί και την ικανότητα του στελέχους *P. putida* FEN1 να αποδομεί το chlorpyrifos και το fenthion, που περιέχουν στο μόριό τους δεσμούς P-O-C, όπως και το fenamiphos. Αντίστοιχα, η αποτυχία του στελέχους αυτού να αποδομήσει τα cadusafos και dimethoate πιθανόν οφείλεται στον P-S-C δεσμό που απαντάται σε αυτές τις ενώσεις. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες των Sethunathan και Yoshida (1973), οι οποίοι έδειξαν πως το στέλεχος *Flavobacterium* sp. μπορεί να υδρολύει τον P-O-C δεσμό διαφόρων οργανοφωσφορικών ενώσεων, αλλά όχι τον P-S-C δεσμό του malathion.

Επιπλέον, το στέλεχος *P. putida* FEN1 αποδόμησε αποτελεσματικά τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα oxamyl και carbofuran, ωστόσο με χαμηλότερο ρυθμό από ότι το fenamiphos. Το έδαφος από το οποίο απομονώθηκε το βακτήριο αυτό είχε ιστορικό διетуός εφαρμογής του νηματοδοκτόνου oxamyl, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την ταυτόχρονη προσαρμογή του ίδιου μικροοργανισμού σε δομικά διαφορετικές ενώσεις. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά σε απομόνωση βακτηριακού στελέχους αγρίου τύπου ικανού να μεταβολίζει οργανοφωσφορικά αλλά και καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα. Πρόσφατα, οι Liu *et al.*, (2006) αναφέρουν τη δημιουργία ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους *Sphingomonas*, ικανού να μεταβολίζει το οργανοφωσφορικό methyl-parathion και το καρβαμιδικό carbofuran.

Στο δεύτερο στάδιο της παρούσας εργασίας απομονώθηκε το γονίδιο που εμπλέκεται στην υδρόλυση του oxamyl από βακτήρια που είχαν απομονωθεί σε προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριό μας. Το ζεύγος των εκκινητών που σχεδιάστηκε επέτρεψε την ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την υδrolάση του carbaryl cehA, σε πλασμιδιακό DNA των βακτηριακών κυττάρων όλων των στελεχών που αποδομούν το καρβαμιδικό νηματοδοκτόνο oxamyl. Καταβολικά πλασμίδια που φέρουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα αποδόμησης καρβαμιδικών φαρμάκων έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες, επιδεικνύοντας ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων

(Tomasek & Karns 1989, Parekh *et al.*, 1995, Hashimoto *et al.*, 2002, Hayatsu *et al.*, 2001, Torpp *et al.*, 1993 κ.α.) αλλά και ευρύ φάσμα βακτηριακών γενών που κατείχαν τέτοια πλασμίδια όπως *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Actinobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Moraxella* και *Arthrobacter* (Sayler *et al.* 1990).

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου που απομονώθηκε από τα βακτήρια που διασπούσαν το *oxamyI* έδειξε σχεδόν απόλυτη ομολογία με την αλληλουχία του γονιδίου *cehA* που απομονώθηκε από το στέλεχος *Rhizobium* sp. AC100 (Hashimoto *et al.*, 2002). Παρόμοιες μελέτες έδειξαν πως τμήμα του *mcd* γονιδίου αποτελεί μια υψηλά συντηρημένη περιοχή μεταξύ αποδομητικών βακτηρίων, που δεν παρουσιάζουν φυλογενετική συγγένεια, αλλά και μεταξύ βακτηρίων που απομονώθηκαν από γεωγραφικά απομακρυσμένες περιοχές (Parekh *et al.*, 1995, Desaint *et al.*, 2000). Η παρουσία ομόλογων αλληλουχιών μεταξύ καταβολικών πλασμιδίων εντοπισμένων σε βακτήρια που έχουν απομονωθεί από γεωγραφικά απομακρυσμένες περιοχές, υποδεικνύει πως η αποδομητική ικανότητα των βακτηρίων έναντι γεωργικών φαρμάκων δεν εξελίχθηκε ανεξάρτητα σε αυτούς τους οργανισμούς, αλλά πως μία κοινή ομάδα γονιδίων, που φέρονται σε πλασμίδια, μεταβιβάστηκε σε αυτούς τους οργανισμούς (Karns *et al.*, 1990).

Η οριζόντια μεταφορά των καταβολικών γονιδίων παίζει σημαντικό ρόλο στη διασπορά τους μεταξύ των μελών της μικροβιακής κοινότητας (Torpp *et al.*, 1998, Newby and Pepper 2002). Πολλά γονίδια αποδόμησης ξενοβιοτικών που εντοπίζονται σε τρανσποζόνια (Tan *et al.*, 1999), ενδέχεται να έχουν μετακινηθεί επανειλημμένως και να έχουν εξελιχθεί ώστε να προσαρμοστούν σε μια πληθώρα υποστρωμάτων τα οποία αποδομούν πλέον αποτελεσματικά. Η συσχέτιση μεταξύ μεταθετών στοιχείων ή πλασμιδίων με την ποικιλομορφία των γονιδίων αποδόμησης καρβαμιδικών φαρμάκων έχει στο παρελθόν προβλεφθεί ή αποδειχθεί (Feng *et al.*, 1997, Parekh *et al.*, 1995). Το γεγονός πως το γονίδιο *cehA* αποτελεί τμήμα ενός τρανσποζονίου φαίνεται να έχει οδηγήσει στην εξάπλωσή του ανάμεσα σε φυλογενετικά και γεωγραφικά απομακρυσμένα βακτηριακά στελέχη και παρόλο που τα καρβαμιδικά φάρμακα δεν είναι τοξικά για τους μικροοργανισμούς, η απόκτηση ενός γονιδίου διάσπασης παρέχει στους μικροοργανισμούς ένα διατροφικό πλεονέκτημα, γεγονός που εξηγεί και την ευρεία εξάπλωση παρόμοιων γονιδίων.

Τελικά Συμπεράσματα

Έχοντας λάβει υπόψη όλα τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, μπορούμε να καταλήξουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas jinjuensis* OXA20 ήταν ικανό να μεταβολίζει υψηλές συγκεντρώσεις του oxamyl (500mg/L), αλλά και να υδρολύει τα επίσης καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα aldicarb, methomyl, carbaryl και carbofuran.
- Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas putida* FEN1 ήταν ικανό να μεταβολίζει υψηλές συγκεντρώσεις του fenamiphos και των μεταβολιτών του στο έδαφος, αλλά και να υδρολύει τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα fenthion και chlorpyrifos και τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα oxamyl και carbofuran.
- Το γονίδιο που απομονώθηκε από δύο βακτηριακά στελέχη που μεταβολίζουν το oxamyl ως υπεύθυνο για την υδρόλυση του oxamyl, έχει σχεδόν απόλυτη ομολογία με το γονίδιο *cehA*, το οποίο κωδικοποιεί μία υδρολάση του carbaryl.

Μελλοντική ερευνητική κατεύθυνση

Ακόλουθες μελέτες θα στοχεύσουν:

1. Στην υπερέκφραση και χαρακτηρισμό του ενζύμου που κωδικεύεται από τα γονίδια που απομονώθηκαν.
2. Στην απομόνωση και χαρακτηρισμό του γονιδιακού τόπου που είναι υπεύθυνος για τον μεταβολισμό του fenamiphos από το βακτήριο *P. putida* FEN1.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Σχήμα 1. Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *cehA* (accession no. AB069723) και της αλληλουχίας του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση του oxamyl στα βακτηριακά στελέχη *P. putida* FEN1 και *P. putida* OXA25. Η στοίχιση έγινε με το πρόγραμμα Clustal W. Οι περιοχές όπου υπάρχουν διαφορές στην αλληλουχία των βάσεων παρουσιάζονται σε άσπρο φόντο.

cehA - Rhizobium sp AC100.seq	ATGGGGCAGCCGATTGCCGATGCGGATATGGCCAGGCTGGCGAGTCTGTTCTCGAGGGAAGATGCTGAGG	70
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	ATGGGGCAGCCGATTGCCGATGCGGATATGGCCAGGCTGGCGAGTCTGTTCTCGAGGGAAGATGCTGAGG	70
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	ATGGGGCAGCCGATTGCCGATGCGGATATGGCCAGGCTGGCGAGTCTGTTCTCGAGGGAAGATGCTGAGG	70
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	ATGGGGCAGCCGATTGCCGATGCGGATATGGCCAGGCTGGCGAGTCTGTTCTCGAGGGAAGATGCTGAGG	70
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	CAGTTATTGCCGCCGAGGCGCTTCTCGAGCGCTATACACTCGTAGGGTCACGCTCGACAAAGGCGGCAT	140
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	CAGTTATTGCCGCCGAGGCGCTTCTCGAGCGCTATACACTCGTAGGGTCACGCTCGACAAAGGCGGCAT	140
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	CAGTTATTGCCGCCGAGGCGCTTCTCGAGCGCTATACACTCGTAGGGTCACGCTCGACAAAGGCGGCAT	140
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	CAGTTATTGCCGCCGAGGCGCTTCTCGAGCGCTATACACTCGTAGGGTCACGCTCGACAAAGGCGGCAT	140
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	GGGCGCCGCTGCGTTAGGCGGAGCGAAGCGCCATTTGGTCGAGCAGGGATGGACCGCGTTCTTGGTGAGG	210
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	GGGCGCCGCTGCGTTAGGCGGAGCGAAGCGCCATTTGGTCGAGCAGGGATGGACCGCGTTCTTGGTGAGG	210
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	GGGCGCCGCTGCGTTAGGCGGAGCGAAGCGCCATTTGGTCGAGCAGGGATGGACCGCGTTCTTGGTGAGG	210
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	GGGCGCCGCTGCGTTAGGCGGAGCGAAGCGCCATTTGGTCGAGCAGGGATGGACCGCGTTCTTGGTGAGG	210
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	GTCTCTAACCCATCATCGCTAACGCAGGCATTGCGAAATTTACAGCGGCAGTGCGATGCCTGCGCGGATGT	280
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	GTCTCTAACCCATCATCGCTAACGCAGGCATTGCGAAATTTACAGCGGCAGTGCGATGCCTGCGCGGATGT	280
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	GTCTCTAACCCATCATCGCTAACGCAGGCATTGCGAAATTTACAGCGGCAGTGCGATGCCTGCGCGGATGT	280
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	GTCTCTAACCCATCATCGCTAACGCAGGCATTGCGAAATTTACAGCGGCAGTGCGATGCCTGCGCGGATGT	280
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	TCCACAGGCCTCGAAGTTCGCCGCTGAGCAGAAGGCCTATCTTGCCGATACCGTTTCGAAAGGAAGCCCT	350
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	TCCACAGGCCTCGAAGTTCGCCGCTGAGCAGAAGGCCTATCTTGCCGATACCGTTTCGAAAGGAAGCCCT	350
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	TCCACAGGCCTCGAAGTTCGCCGCTGAGCAGAAGGCCTATCTTGCCGATACCGTTTCGAAAGGAAGCCCT	350
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	TCCACAGGCCTCGAAGTTCGCCGCTGAGCAGAAGGCCTATCTTGCCGATACCGTTTCGAAAGGAAGCCCT	350
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	CATCGAACGAATGTGGCTGATGTCGCAAAATCGAAGCTTCGCCAGTGCTGAGCGGCAATGTCGTGGAGTAC	420
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	CATCGAACGAATGTGGCTGATGTCGCAAAATCGAAGCTTCGCCAGTGCTGAGCGGCAATGTCGTGGAGTAC	420
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	CATCGAACGAATGTGGCTGATGTCGCAAAATCGAAGCTTCGCCAGTGCTGAGCGGCAATGTCGTGGAGTAC	420
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	CATCGAACGAATGTGGCTGATGTCGCAAAATCGAAGCTTCGCCAGTGCTGAGCGGCAATGTCGTGGAGTAC	420
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	AAGATCGCCACGATTTACAGCAGGGACCGGGGAAGAAAGACGGGCAGGTTGGGCTTTGGGGCAGGAATTT	490
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	AAGATCGCCACGATTTACAGCAGGGACCGGGGAAGAAAGACGGGCAGGTTGGGCTTTGGGGCAGGAATTT	490
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	AAGATCGCCACGATTTACAGCAGGGACCGGGGAAGAAAGACGGGCAGGTTGGGCTTTGGGGCAGGAATTT	490
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	AAGATCGCCACGATTTACAGCAGGGACCGGGGAAGAAAGACGGGCAGGTTGGGCTTTGGGGCAGGAATTT	490
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	TGCAGGACAATCCTACCTGGGGGGCCGTAAGTCGCGCATCGGTAGCTAACCCGCTCGTAACCGATTTTGT	560
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	TGCAGGACAATCCTACCTGGGGGGCCGTAAGTCGCGCATCGGTAGCTAACCCGCTCGTAACCGATTTTGT	560
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	TGCAGGACAATCCTACCTGGGGGGCCGTAAGTCGCGCATCGGTAGCTAACCCGCTCGTAACCGATTTTGT	560
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	TGCAGGACAATCCTACCTGGGGGGCCGTAAGTCGCGCATCGGTAGCTAACCCGCTCGTAACCGATTTTGT	560
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	CTCTCAACCATCTCGCGATATTCAGCTGCAGATCCTCGATGATGATGGTGTGCGCTGCATGGCATCGCTG	630
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	CTCTCAACCATCTCGCGATATTCAGCTGCAGATCCTCGATGATGATGGTGTGCGCTGCATGGCATCGCTG	630
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	CTCTCAACCATCTCGCGATATTCAGCTGCAGATCCTCGATGATGATGGTGTGCGCTGCATGGCATCGCTG	630
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	CTCTCAACCATCTCGCGATATTCAGCTGCAGATCCTCGATGATGATGGTGTGCGCTGCATGGCATCGCTG	630
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	ATGATCCATGACGCCAATAAGCATATCTATCCGCCCCAGGTGATGCGCCTAGCACCCGACCTTGCGTTTC	700
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	ATGATCCATGACGCCAATAAGCATATCTATCCGCCCCAGGTGATGCGCCTAGCACCCGACCTTGCGTTTC	700
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	ATGATCCATGACGCCAATAAGCATATCTATCCGCCCCAGGTGATGCGCCTAGCACCCGACCTTGCGTTTC	700
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	ATGATCCATGACGCCAATAAGCATATCTATCCGCCCCAGGTGATGCGCCTAGCACCCGACCTTGCGTTTC	700
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	AACCCACATATATCGAGCCGATGGCGAGACCGTCCGCCTGCCAGACGGCGAGTATCATATAATGGTCCG	770
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	AACCCACATATATCGAGCCGATGGCGAGACCGTCCGCCTGCCAGACGGCGAGTATCATATAATGGTCCG	770
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	AACCCACATATATCGAGCCGATGGCGAGACCGTCCGCCTGCCAGACGGCGAGTATCATATAATGGTCCG	770
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	AACCCACATATATCGAGCCGATGGCGAGACCGTCCGCCTGCCAGACGGCGAGTATCATATAATGGTCCG	770

cehA - Rhizobium sp AC100.seq	TAGGGGGCCTGAGTATCTGGTGCAGCGCGCCACCCTTCGCGTTTCGGCGAGCGACGCACGAATAGCGGTG	840
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	TAGGGGGCCTGAGTATCTGGTGCAGCGCGCCACCCTTCGCGTTTCGGCGAGCGACGCACGAATAGCGGTG	840
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	TAGGGGGCCTGAGTATCTGGTGCAGCGCGCCACCCTTCGCGTTTCGGCGAGCGACGCACGAATAGCGGTG	840
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	TAGGGGGCCTGAGTATCTGGTGCAGCGCGCCACCCTTCGCGTTTCGGCGAGCGACGCACGAATAGCGGTG	840
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	CGGCTCAAACGATGGATCGATCCGGCGAAATGGGGCTGGTACTCTGGCGACACGCATCTCCACGCCGCGAG	910
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	CGGCTCAAACGATGGATCGATCCGGCGAAATGGGGCTGGTACTCTGGCGACACGCATCTCCACGCCGCGAG	910
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	CGGCTCAAACGATGGATCGATCCGGCGAAATGGGGCTGGTACTCTGGCGACACGCATCTCCACGCCGCGAG	910
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	CGGCTCAAACGATGGATCGATCCGGCGAAATGGGGCTGGTACTCTGGCGACACGCATCTCCACGCCGCGAG	910
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	GTTGTGCTCATTATATGTTGCCTACCGAAGGGGTAGCACCTGAAACGATGATCCGTACATAAGAGGCGA	980
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	GTTGTGCTCATTATATGTTGCCTACCGAAGGGGTAGCACCTGAAACGATGATCCGTACATAAGAGGCGA	980
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	GTTGTGCTCATTATATGTTGCCTACCGAAGGGGTAGCACCTGAAACGATGATCCGTACATAAGAGGCGA	980
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	GTTGTGCTCATTATATGTTGCCTACCGAAGGGGTAGCACCTGAAACGATGATCCGTACATAAGAGGCGA	980
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	AGCTCTCTCCGTTGGCGAGGTCTTAACCTGGGCTGGAGGTTATTCCTACCAGAAGCAGTTCTTTTCCGGT	1050
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	AGCTCTCTCCGTTGGCGAGGTCTTAACCTGGGCTGGAGGTTATTCCTACCAGAAGCAGTTCTTTTCCGGT	1050
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	AGCTCTCTCCGTTGGCGAGGTCTTAACCTGGGCTGGAGGTTATTCCTACCAGAAGCAGTTCTTTTCCGGT	1050
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	AGCTCTCTCCGTTGGCGAGGTCTTAACCTGGGCTGGAGGTTATTCCTACCAGAAGCAGTTCTTTTCCGGT	1050
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	GCTGCGATCAGTCCCGAGGCGCGGCTCGAACATCTCAACTGCAGGCTGCTAACACGCAGACTGGAAGC	1120
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	GCTGCGATCAGTCCCGAGGCGCGGCTCGAACATCTCAACTGCAGGCTGCTAACACGCAGACTGGAAGC	1120
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	GCTGCGATCAGTCCCGAGGCGCGGCTCGAACATCTCAACTGCAGGCTGCTAACACGCAGACTGGAAGC	1120
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	GCTGCGATCAGTCCCGAGGCGCGGCTCGAACATCTCAACTGCAGGCTGCTAACACGCAGACTGGAAGC	1120
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	CCATGCCACGCGCGAAAGATCGAGAGAGCATGCTCCGCTACGATCTCGAGATCTCGGGTTTTCCGTCAAG	1190
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	CCATGCCACGCGCGAAAGATCGAGAGAGCATGCTCCGCTACGATCTCGAGATCTCGGGTTTTCCGTCAAG	1190
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	CCATGCCACGCGCGAAAGATCGAGAGAGCATGCTCCGCTACGATCTCGAGATCTCGGGTTTTCCGTCAAG	1190
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	CCATGCCACGCGCGAAAGATCGAGAGAGCATGCTCCGCTACGATCTCGAGATCTCGGGTTTTCCGTCAAG	1190
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	TCTTTCCGGGCATTGATCCTGATGAGACTTAAGGAGCTTAGCTACCCTGGTACGCACGCGGTGGAGGAC	1260
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	TCTTTCCGGGCATTGATCCTGATGAGACTTAAGGAGCTTAGCTACCCTGGTACGCACGCGGTGGAGGAC	1260
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	TCTTTCCGGGCATTGATCCTGATGAGACTTAAGGAGCTTAGCTACCCTGGTACGCACGCGGTGGAGGAC	1260
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	TCTTTCCGGGCATTGATCCTGATGAGACTTAAGGAGCTTAGCTACCCTGGTACGCACGCGGTGGAGGAC	1260
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	TGGCCATCTTGGAATCTCCCGGTGGCGAAATGGGCGAAAGGCCAAGGAGCACTGGTAGGATACACCCATT	1330
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	TGGCCATCTTGGAATCTCCCGGTGGCGAAATGGGCGAAAGGCCAAGGAGCACTGGTAGGATACACCCATT	1330
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	TGGCCATCTTGGAATCTCCCGGTGGCGAAATGGGCGAAAGGCCAAGGAGCACTGGTAGGATACACCCATT	1330
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	TGGCCATCTTGGAATCTCCCGGTGGCGAAATGGGCGAAAGGCCAAGGAGCACTGGTAGGATACACCCATT	1330
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	GTTTCATTGGTATGATAGTCGGCACCAACGCTCTACCAAATTACGAAATTTCAACAGCGTCGG	1400
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	GTTTCATTGGTATGATAGTCGGCACCAACGCTCTACCAAATTACGAAATTTCAACAGCGTCGG	1400
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	GTTTCATTGGTATGATAGTCGGCACCAACGCTCTACCAAATTACGAAATTTCAACAGCGTCGG	1400
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	GTTTCATTGGTATGATAGTCGGCACCAACGCTCTACCAAATTACGAAATTTCAACAGCGTCGG	1400
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	CACGAACGAAGCGATTGTTGGCGTGACCCACGGCGCGGTGCGATTCTTGGCAGGTTGCAATGGTCCCCCT	1470
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	CACGAACGAAGCGATTGTTGGCGTGACCCACGGCGCGGTGCGATTCTTGGCAGGTTGCAATGGTCCCCCT	1470
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	CACGAACGAAGCGATTGTTGGCGTGACCCACGGCGCGGTGCGATTCTTGGCAGGTTGCAATGGTCCCCCT	1470
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	CACGAACGAAGCGATTGTTGGCGTGACCCACGGCGCGGTGCGATTCTTGGCAGGTTGCAATGGTCCCCCT	1470
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	GCTGCTGAGCTCAATGCGTGGTATCATCTGCTCAACTGCGGTTACACGCTGATGATGGCAGGCGAGACGG	1540
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	GCTGCTGAGCTCAATGCGTGGTATCATCTGCTCAACTGCGGTTACACGCTGATGATGGCAGGCGAGACGG	1540
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	GCTGCTGAGCTCAATGCGTGGTATCATCTGCTCAACTGCGGTTACACGCTGATGATGGCAGGCGAGACGG	1540
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	GCTGCTGAGCTCAATGCGTGGTATCATCTGCTCAACTGCGGTTACACGCTGATGATGGCAGGCGAGACGG	1540
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	ATTATCCGTGTATCGTGCCTTCGGTCGACTCTCGGCCGGGGATCGGACGCACCTACGTGAAGTTGCCACA	1610
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	ATTATCCGTGTATCGTGCCTTCGGTCGACTCTCGGCCGGGGATCGGACGCACCTACGTGAAGTTGCCACA	1610
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	ATTATCCGTGTATCGTGCCTTCGGTCGACTCTCGGCCGGGGATCGGACGCACCTACGTGAAGTTGCCACA	1610
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	ATTATCCGTGTATCGTGCCTTCGGTCGACTCTCGGCCGGGGATCGGACGCACCTACGTGAAGTTGCCACA	1610
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	AAGGCCAGTGGACGATGCGGGTTACAGCGCCTGGGTGGACGGTCTTGAGAATGGCCACCTCTACTGGGGT	1680
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	AAGGCCAGTGGACGATGCGGGTTACAGCGCCTGGGTGGACGGTCTTGAGAATGGCCACCTCTACTGGGGT	1680
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	AAGGCCAGTGGACGATGCGGGTTACAGCGCCTGGGTGGACGGTCTTGAGAATGGCCACCTCTACTGGGGT	1680
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	AAGGCCAGTGGACGATGCGGGTTACAGCGCCTGGGTGGACGGTCTTGAGAATGGCCACCTCTACTGGGGT	1680
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	GACGGCAGAACGCATTTTCTACATTTACGGTGAACGGGCGGGAGAGTGGCAAGCAGCCCCCTCGCATTTG	1750
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	GACGGCAGAACGCATTTTCTACATTTACGGTGAACGGGCGGGAGAGTGGCAAGCAGCCCCCTCGCATTTG	1750
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	GACGGCAGAACGCATTTTCTACATTTACGGTGAACGGGCGGGAGAGTGGCAAGCAGCCCCCTCGCATTTG	1750
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	GACGGCAGAACGCATTTTCTACATTTACGGTGAACGGGCGGGAGAGTGGCAAGCAGCCCCCTCGCATTTG	1750

cehA - Rhizobium sp AC100.seq	TCCGCGCTAGTAACGTCAGGGTGAGCGCCACGATAGCCGCGATGCTCGAACTGACTCCATCGCCTGAGAC	1820
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	TCCGCGCTAGTAACGTCAGGGTGAGCGCCACGATAGCCGCGATGCTCGAACTGACTCCATCGCCTGAGAC	1820
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	TCCGCGCTAGTAACGTCAGGGTGAGCGCCACGATAGCCGCGATGCTCGAACTGACTCCATCGCCTGAGAC	1820
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	TCCGCGCTAGTAACGTCAGGGTGAGCGCCACGATAGCCGCGATGCTCGAACTGACTCCATCGCCTGAGAC	1820
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	GGTGCAGAACGCCTCGGAAGAGCCGTGGCACATCGAACATGCGCGGATCGGCAACAGCCGTAAGGTAGCG	1890
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	GGTGCAGAACGCCTCGGAAGAGCCGTGGCACATCGAACATGCGCGGATCGGCAACAGCCGTAAGGTAGCG	1890
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	GGTGCAGAACGCCTCGGAAGAGCCGTGGCACATCGAACATGCGCGGATCGGCAACAGCCGTAAGGTAGCG	1890
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	GGTGCAGAACGCCTCGGAAGAGCCGTGGCACATCGAACATGCGCGGATCGGCAACAGCCGTAAGGTAGCG	1890
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	GTGAGCTTATCGTCAATGGCGTGGCGGTGAAACGCCAGGAAATGCTTGCCGATGGCTCGCTCCAGCAGA	1960
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	GTGAGCTTATCGTCAATGGCGTGGCGGTGAAACGCCAGGAAATGCTTGCCGATGGCTCGCTCCAGCAGA	1960
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	GTGAGCTTATCGTCAATGGCGTGGCGGTGAAACGCCAGGAAATGCTTGCCGATGGCTCGCTCCAGCAGA	1960
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	GTGAGCTTATCGTCAATGGCGTGGCGGTGAAACGCCAGGAAATGCTTGCCGATGGCTCGCTCCAGCAGA	1960
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	TCTCCTTCAAGGAGAAGATCGACCGCAGTTCTGGATCGCAATGCGGGTGCTTGGGTCCGGCCATACCTA	2030
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	TCTCCTTCAAGGAGAAGATCGACCGCAGTTCTGGATCGCAATGCGGGTGCTTGGGTCCGGCCATACCTA	2030
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	TCTCCTTCAAGGAGAAGATCGACCGCAGTTCTGGATCGCAATGCGGGTGCTTGGGTCCGGCCATACCTA	2030
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	TCTCCTTCAAGGAGAAGATCGACCGCAGTTCTGGATCGCAATGCGGGTGCTTGGGTCCGGCCATACCTA	2030
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	TCCCGTATTGCTCACCATCGGAAACAAACCGATCCGTGCTTCGCGGCGTAGCGCGGAATGGCTACGCACC	2100
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	TCCCGTATTGCTCACCATCGGAAACAAACCGATCCGTGCTTCGCGGCGTAGCGCGGAATGGCTACGCACC	2100
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	TCCCGTATTGCTCACCATCGGAAACAAACCGATCCGTGCTTCGCGGCGTAGCGCGGAATGGCTACGCACC	2100
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	TCCCGTATTGCTCACCATCGGAAACAAACCGATCCGTGCTTCGCGGCGTAGCGCGGAATGGCTACGCACC	2100
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	TGCGTGGATGCGCTCTGGAATGAGAAGCACAGTTTGATCCGCGATACGGAACGGCCGACGCGGCCGCGG	2170
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	TGCGTGGATGCGCTCTGGAATGAGAAGCACAGTTTGATCCGCGATACGGAACGGCCGACGCGGCCGCGG	2170
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	TGCGTGGATGCGCTCTGGAATGAGAAGCACAGTTTGATCCGCGATACGGAACGGCCGACGCGGCCGCGG	2170
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	TGCGTGGATGCGCTCTGGAATGAGAAGCACAGTTTGATCCGCGATACGGAACGGCCGACGCGGCCGCGG	2170
cehA - Rhizobium sp AC100.seq	CATATGATCATGCGCGCCAGACTTATGATCGGATCATCGCCGAAAGCGACTTAACGTGA	2229
Clone 1A - P. putida FEN1.seq	CATATGATCATGCGCGCCAGACTTATGATCGGATCATCGCCGAAAGCGACTTAACGTGA	2229
Clone 1C - P. putida FEN1.seq	CATATGATCATGCGCGCCAGACTTATGATCGGATCATCGCCGAAAGCGACTTAACGTGA	2229
Clone 25 - P. putida OXA25.seq	CATATGATCATGCGCGCCAGACTTATGATCGGATCATCGCCGAAAGCGACTTAACGTGA	2229

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α. Γεωργική Φαρμακολογία, Αθήνα, 2007.

Χανίκα Ε. (2010). Απομόνωση και Ταυτοποίηση Βακτηρίων με την Ικανότητα Αποδόμησης των εντομοκτόνων-νηματοδοκτόνων Fenamiphos και Oxamyl. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Φωτοπούλου Δ.Α. (2004). Απομόνωση και χαρακτηρισμός βακτηρίων που αποδομούν το νηματωδοκτόνο cadusafos στο έδαφος. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Γεωπονίας, Τομέας Φυτοπροστασίας.

Aislabie J., Loyd-Jones G. (1995). A Review of Bacterial Degradation of Pesticides, *Australian Journal of Soil Research*, **33**: 925-942.

Al-Jaghbir, M.T., Salhab, A.S. and Hamarsheh, F.A. (1992) Dermal and inhalation exposure to dimethoate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **22**: 358-361.

Anderson T. and Walton B. (1995). Comparative fate of [14C]trichloroethylene in the root zone of plants from a former solvent disposal site. *Environmental toxicology and chemistry*. **14**(12): 2041-2047.

Arbeli Z., Fuentes C.L. (2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions: and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*, **26**: 1733-1746.

Arnold G, Allen P, Muttiah R, Bernhardt G. (1995). Automated base flow separation and recession analysis techniques. *Groundwater*. **33**(6): 1010-1018.

Ballantyne B. and Marrs T.C. (1992). Overview of the biological and clinical aspects of organophosphates and carbamates. Butterworth-Heinemann, Stoneham, USA.

Benning M, Kuo J, Raushel F, Holden H. (1994). Three-Dimensional Structure of Phosphotriesterase: An Enzyme Capable of Detoxifying Organophosphate Nerve Agents. *Biochemistry*. **33**(50):15001–15007.

Bhadhabe B.J., Dhakephalkar P.K., Sarnik S.S., Kanekar P.P. (2002). Plasmid-associated biodegradation of an organophosphorus pesticide, monocrotophos, by *Pseudomonas mendocina*. *Biotechnology Letters*, **24**: 647-650.

Bjørling-Poulsen M., Raun Andersen H. & Grandjean P. (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *BioMed Central*. **7**:50.

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.

- Cáceres T.P., Megharaj M., Malik S., Beer M., Naidu R.** (2009). Hydrolysis of fenamiphos and its toxic oxidation products by *Microbacterium* sp. in pure cultures and groundwater. *Biosource Technology*, **100**:2732-2736.
- Cáceres T., Wenxiang H., Megharaj M., Naidu R.** (2009). Effect of insecticide fenamiphos on soil microbial activities in Australian and Ecuadorean soils. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, **44**:13-17.
- Cáceres T., Ying G.C., Kookana R.** (2002). Sorption of pesticides in banana production on soils of Ecuador. *Australian Journal of Soil Research*, **40**:1085-1094.
- Cátheres T., Megharaj M., Naidu R.** (2008). Degradation of fenamiphos in soils collected from different geographical regions: The influence of soil properties and climatic conditions. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. **43** : 314-322.
- Chapalamadugu S, and Chaudry R.** (1991). Hydrolysis of carbaryl by a *Pseudomonas* sp. and construction of a microbial consortium that completely metabolizes carbaryl. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**: 744-750.
- Chapman, R.A and C. R. Harris.** (1990). Enhanced degradation of insecticides in soil: Factors influencing the development and effects of enhanced microbial activity. In K. D. Racke and J. R. Coats, (Eds.), Enhanced biodegradation of pesticides in the environment. *American Chemical Society Symposium Series* 426. Pp. 82-96.
- Chaudhry G. and Ali A.** (1988). Bacterial metabolism of carbofuran. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**:1414-1419.
- Cheng T-C, Harvey S & Chen G.** (1996). Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**:1636–1641.
- Cheng T-C, DeFrank J & Rastogi V.** (1999). *Alteromonas* prolidase for organophosphorus G-agent decontamination. *Chem Biol Interact*. **120**: 455–462.
- Chung K.Y., Ou L.T.** (1986). Degradation of fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulphone in soil with a previous history of continuous applications of fenamiphos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **30**:452-458.
- Deb Mandal M, Mandal S, Kumar Pal N.** (2005). Plasmid-mediated dimethoate degradation by *Bacillus licheniformis* isolated from a freshwater fish *Labeo rohita*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **3**(2005): 280–286.
- Derbyshire M, Karns J, Kearney P, Nelson J.** (1987). Purification and characterization of an N-methylcarbamate pesticide hydrolyzing enzyme, *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **35** (6): 871–877.

- Desaint S, Hartmann A, Parekh N, Fournier J-C.** (2000). Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria, *FEMS Microbiology Ecology*, p. 173-180.
- Desaint S, Arrault S, Siblot S, Fournier J-C.** (2003). Genetic transfer of the *mcd* gene in soil, *Journal of Applied Microbiology*. **95**: 173-180.
- Deshpande NM, Dhakephalkar PK & Kanekar PP.** (2001). Plasmid-mediated dimethoate degradation in *Pseudomonas aeruginosa* MCMB-427. *Letters of Applied Microbiology*, **33**: 275–279.
- Deshpande N, Sarnaik S, Paranjpe S and Kanekar P.** (2004). Optimization of Dimethoate Degradation by *Brevundimonas* sp. MCM B-427 Using Factorial Design: Studies on Interactive Effects of Environmental Factors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(5):455-462.
- Dragun J, Kuffner A.C., Schreiner R.W.** (1984). Groundwater contamination. 1. Transport and transformation of organic chemicals. *Chemical Engineering*, **91**: 65-70.
- Dumas D, Caldwell S, Wild J, Raushel F.** (1989). Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**: 19659-19665.
- Efremenko E. and Sergeeva V.** (2001). Organophosphate hydrolase – an enzyme catalyzing degradation of phosphorus – containing toxins and pesticides. *Russ. Chem. B+ (Int. Ed.)*. **50**:1826-1832.
- Farré M, Fernandez J, Paez M, Granada L, Barba L, Gutierrez H, Pulgarin C, Barceló D.** (2002). Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **373**(8): 704-709.
- Felsot A, Maddox J, Bruce W.** (1981). Enhanced microbial degradation of carbofuran in soils with histories of Furadan use. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **26** (1): 781-788.
- Felsot, A. S.** (1989). Enhanced biodegradation of insecticides in soil: Implications for agroecosystems. *Annual Review of Entomology*, **34**:453-476.
- Feng X, Ou L, Ogram A.** (1997). Plasmid-Mediated Mineralization of Carbofuran by *Sphingomonas* sp. Strain CF06, *Applied and Environmental Microbiology*, p 1332–1337.
- Feng, X., L. T. Ou, and A. Ogram.** (1997). Cloning and sequence analysis of a novel insertion element from plasmids harbored by the carbofuran-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. CFO6. *Plasmid*. **37**:169–179.
- Franzmann P.D., Zappia L.R., Tilbury A.L., Patterson B.M., Davis G.B., Mandelbaum R.T.** (2000). Bioaugmentation of atrazine and fenamiphos impacted groundwater: laboratory evaluation. *Bioremediation Journal*. **24**: 48-68.

- Gerstl Z.** (1984). Absorption, decomposition and movement of oxamyl in soil. *Pesticide Science*, **15**:9-17.
- Getzin LW.** (1981a). Degradation of chlorpyrifos in soil: influence of autoclaving, soil moisture, and temperature. *J Econ Entomology*, **74**: 158–162.
- Giannakou I, Karpouzas D, Anastasiades I, Tsiropoulos N, Georgiadou A.** (2005). Factors affecting the efficacy of non-fumigant nematicides for the control of root-knot nematodes. *Pest Management Science*. **61**: 961-972.
- Harper LL, McDaniel CS, Miller CE & Wild JR** (1988). Dissimilar plasmids isolated from *Pseudomonas diminuta* MG and a *Flavobacterium* sp. (ATCC 27551) contain identical opd genes. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 2586–2589.
- Hasan H.** (1999). Fungal utilization of organophosphate pesticides and their degradation by *Aspergillus flavus* and *A. sydowii* in soil. *Folia Microbiologica*. **44**(1):77-84.
- Hashimoto M, Fukui M, Hayano K, Hayatsu M.** (2002). Nucleotide sequence and genetic structure of a novel carbaryl hydrolase gene (*cehA*) from *Rhizobium* sp. strain AC100. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 1220-1227.
- Hashimoto M, Mizutani A, Tago K, Kameyama M, Shimojo T, Hayatsu M.** (2006). Cloning and nucleotide sequence of carbaryl hydrolase gene (*cehA*) from *Arthrobacter* sp. RC100. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **101** (5): 410-414.
- Hayatsu M, Hirano M, Nagata T.** (1999). Involvement of Two Plasmids in the Degradation of Carbaryl by *Arthrobacter* sp. Strain RC100, *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 1015–1019.
- Hayatsu M, Mizutani A, Hashimoto M, Sato K, Hayano K.** (2001). Purification and characterization of carbaryl hydrolase from *Arthrobacter* sp. RC100, *FEMS Microbiology Letters*, **201**: 99-103.
- Hayatsu, M and Nagata T.** (1993). Purification and characterization of carbaryl hydrolase from *Blastobacter* sp. strain M501. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 2121–2125.
- Holm L & Sander C.** (1997) An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolase related to urease. *Proteins*. **28**:72–82.
- Horne I, Harcourt RL, Sutherland TD, Russell RJ & Oakeshott JG.** (2002a). Isolation of a *Pseudomonas monteilli* strain with a novel phosphotriesterase. *FEMS Microbiology Letters*. **206**: 51–55.

- Horne I, Sutherland TD, Harcourt RL, Russell RJ & Oakeshott JG.** (2002b). Identification of an *opd* (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 3371–3376.
- Horne I, Qiu X, Russell RJ & Oakeshott JG** (2003). The phosphotriesterase gene *opdA* in *Agrobacterium radiobacter* P230 is transposable. *FEMS Microbiology Letters.* **222**: 1–8.
- Howard, P. H.** 1991. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals: Pesticides. Lewis Publishers, Chelsea.
- Itak J, Selisker M, Root C, Herzog D.** (1996). Validation of an immunoassay for methomyl in water and dislodgeable residues on grape leaves. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**: 270–277.
- Jaffery, F.N., Chawla, G., Kakkar, P.** (1989). Toxicology Data Handbook, Vol. III. pp. 262–267. Lucknow, India: Indian Toxicology Research Center.
- Jao S-C, Huang L-F, Tao YS & Li W-S.** (2004). Hydrolysis of organophosphate triesters by *Escherichia coli* aminopeptidase P. *J Mol Catab: Enzymatic.* **27**: 7–12.
- Jones, A.S.** (1976). Metabolism of aldicarb by five soil fungi. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **24**:115–117.
- Jones, R.L.** (1987). Central California studies on the degradation and movement of aldicarb residues. *Journal of Contaminant Hydrology*, **1**:287–298.
- Jones, R.L. and T.L. Estes.** (1995). Summary of aldicarb monitoring and research programs in the United States. *Journal of Contaminant Hydrology*, **18**:107–140.
- Jones, R.L. and Norris F.A.** (1998). Factors Affecting Degradation of Aldicarb and Ethoprophos. *Journal of Nematology*, **30**(1):45–55.
- Karalliedde L and Senanayake N.** (1999). Organophosphorus insecticide poisoning. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry*, **11**: 4–9.
- Karayilanoglu T, Kenar1 L, Serdar M, Kose1 S, Aydın A.** (2008). Bacterial Biodegradation of Aldicarb and Determination of Bacterium Which Has The Most Biodegradative Effect. *Turkish Journal of Biochemistry*, **33** (4): 209–214.
- Karns J, W. Mulbry, J. Nelson, P. C. Kearney.** (1986). Metabolism of carbofuran by a pure bacterial culture. *Pesticide Biochemistry Physiology.* **25**:211–217.
- Karns J. and Tomasek P.** (1991). Carbofuran hydrolase - purification and properties. *J. Agric. Food Chem.* **39**(5):1004–1008.

- Karpouzas D.G., Singh B.K.** (2006). Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: Metabolic pathways and molecular basis. *Advances in Microbial Physiology*, **51**: 119-225.
- Karpouzas D.G., Walker A.** (2000). Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* strains epI and II to degrade the organophosphate ethoprophos. *Journal of Applied Microbiology*, **89**: 40-48.
- Karpouzas D.G., Morgan J.A.W., Walker A.** (2000a). Isolation and characterisation of ethoprophos-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **33**: 209-218.
- Karpouzas D., Karanasios E, Menkissoglou-Spiroudi U.** (2004b). Enhanced microbial degradation of cadusafos in soils from potato monoculture: demonstration and characterization. *Chemosphere*. **56**:549-559.
- Karpouzas D, Karanasios E, Giannakou I, Georgiadou A, Menkissoglou-Spiroudi U.** (2005a). The effect of soil fumigants methyl bromide and metham sodium on the microbial degradation of the nematicide cadusafos. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 541-550.
- Karpouzas D.G., Hatzia Apostolou P., Papadopoulou Mourkidou E., Giannakou I.O., Georgiadou A.** (2004). The enhanced biodegradation of fenamiphos in soils from previously-treated and the effect of soil fumigants. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **23**:2009-2107.
- Kazumi, J. and Capone, D. G.** (1995). Microbial aldicarb transformation in aquifer, lake, and salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 2820–2829.
- Kök F.N., Arica M.Y., Halıcıgil C, Alaeddinog˘lu G, and Hasirci V.** (1999). Biodegradation of aldicarb in a packed-bed reactor by immobilized *Methylosinus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**:291–296.
- Laabs, V., Amelung, W., Pinto, A. A., Wantzen, M., da Silva, C. J. and Zech, W.** 2002. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of northeastern pantanal basin, Brazil. *J. Environ. Qual.* **31**:1636-1648.
- Larkin, M. J., and M. J. Day.** 1986. The metabolism of carbaryl by three bacterial isolates, *Pseudomonas* spp. (NCIB 12042 &12043) and *Rhodococcus* sp. (NCIB 12038) from garden soil. *J. Appl. Bacteriol.* **60**:233-242.
- Lawrence K. S., Feng Y., Lawrence G. W., Burmester C. H., and S. H. Norwood.** (2005). Accelerated Degradation of Aldicarb and Its Metabolites in Cotton Field Soils. *Journal of Nematology*, **37**(2):190–197.
- Le Roux H, Pretorius M, Huisman L.** (2001). Accelerated degradation of nematicides used on citrus in South Africa. *How Degrading.* **3**:1.

- Liu G, Dai S, Qian Y, Gan Q.** (2003). Experimental study on effect of anion surfactant on degradation rate of aldicarb in soil. *Journal of Environmental Science and Health*, **B38** (4): 405-416.
- Liu F.Y., Hong M.Z., Liu D.M., Li Y.W., Shou P.S., Hai Y., Shi G.Q.** (2007). Biodegradation of methyl parathion by *Acinetobacter radioresistens* USTB-04. *Journal of Environmental Sciences*, **19**: 1257-1260.
- Liu Y-H, Chung Y-C & Xiong Y.** (2001). Purification and characterization of a dimethoate-degrading enzyme of *Aspergillus niger* ZHY256, isolated from sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 3746–3749.
- Liu Y-H, Liu H, Chen Z-H, Lian J, Huang X & Chung Y-C.** (2004). Purification and characterization of a novel organophosphorus pesticide hydrolase from *Penicillium lilacinum* BP303. *Enzyme Microbial Technol.* **34**: 297–303.
- Liu Z, Hong Q, Xu J-H, Jun W, Li S-P.** (2006). Construction of a genetically engineered microorganism for degrading organophosphate and carbamate pesticides. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **58**(2): 65-69.
- MacRae, I.C.** (1989). Microbial metabolism of pesticides and structurally related compounds. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **109**:1-87.
- Mallick BK, Banerji A, Shakil NA & Sethunathan NN.** (1999). Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure culture and in soil. *Bull Environ Contam Toxicol* **62**: 48–55.
- McLean K. S. and Lawrence G. W.** (2003). Efficacy of Aldicarb to *Rotylenchulus reniformis* and Biodegradation in Cotton Field Soils. *Journal of Nematology*, **35**(1):65–72.
- Megharaj M., Singh, N., Kookana R., Naidu R.** (2003). Hydrolysis of fenamiphos and its oxidation products by a soil bacterium in pure culture, soil and water. *Applied Microbiology Biotechnology*. **61**:252-256.
- Miller GT,** (2004). *Sustaining the Earth*, 6th edition. Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California. Chapter 9, Pages 211-216.
- Miles W, Harris R, Tu M.** (1983). Influence of temperature on the persistence of chlorpyrifos and chlorfevinphos in sterile and natural mineral and organic soils. *Journal of Environmental Science and Health, B.* **18**: 705-712.
- Moens T, Araya M, Swennen R, De Waele D.** (2004). Enhanced biodegradation of nematicides after repetitive applications and its effects on root and yield parameters in commercial banana plantations. *Biol. Fert. Soils*. **39**: 407-414.
- Mohamed M.** (2009). Degradation of methomyl by the novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* M1. *Electronic Journal of Biotechnology*. **12**(4).

- Mulbry W and Eaton R.** (1991). Purification and characterization of the N-methylcarbamate hydrolase from *Pseudomonas* strain CRL-OK. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**: 3679-3682.
- Mulbry W & Karns J.** (1989b). Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene: relationship between the gene and protein. *J Bacteriol.* **171**: 6740–6746.
- Mulbry W, Kearney P, Nelson J & Karns J.** (1987). Physical comparison of parathion hydrolase plasmids from *Pseudomonas diminuta* and *Flavobacterium* sp. *Plasmid*. **18**:173–177.
- Naqvi T, Cheesman M, Williams M, Campbell P, Ahmed S, Russell R, Scott C, Oakeshott J.** (2009). Heterologous expression of the methyl carbamate-degrading hydrolase MCD. *Journal of Biotechnology*, **144**: 89-95.
- Nazarian A.** (2007). Utilization of dimethoate by wild type *Pseudomonas putida* from polluted sites in Iran. *Pakistan Journal of Biol Science*. **10**(4):664-667.
- Ogram A, Duan Y, Trabue S, Feng X, Castro H, Ou L.** (2000). Carbofuran degradation mediated by three related plasmid systems, *FEMS Microbiology Ecology*, **32**: 197-203.
- 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.
- Ou, L.-T., K. S. V. Edvardsson, J. E. Thomas, and P. S. C. Rao.** (1985). Aerobic and anaerobic degradation of aldicarb sulfone in soils. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. **33**:545–548.
- Ou, L.-T., J. E. Thomas, K. S. V. Edvardsson, P. S. C. Rao, and W. B. Wheeler.** (1986). Aerobic and anaerobic degradation of aldicarb in aseptically collected soils. *J. Environ. Qual.* **15**:356–363.
- Ou L.T., Thomas J.E., Dickson D. W.** (1994). Degradation of fenamiphos in soil with a history of continuous fenamiphos applications. *Soil Science Society of America Journal*, **58**:1139-1147.
- Parekh N, Hartmann A, Charnay M-P, Fournier J-C.** (1995). Diversity of carbofuran-degrading soil bacteria and detection of plasmid-encoded sequences homologous to the *mcd* gene, *FEMS Microbiology Ecology*, **17**: 149-160.
- Parekh N, Hartmann A, Fournier J-C.** (1996). PCR detection of the *mcd* gene and evidence of sequence homology between the degradative genes and plasmids from diverse carbofuran-degrading bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 1797-1804.
- Pattison A.** (2000). Biodegradation of nematicides used in bananas. *How Degrading*. **2**:2

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.

Racke K. & Coats R.J. (1987). Enhanced degradation of isofenphos by soil microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **35**: 94-99.

Racke K. & Coats J. (1988a). Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: specificity of enhanced microbial degradation. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **38**: 193–199.

Racke K. and Coats J. (1988b). Enhanced degradation and the comparative fate of carbamate insecticides in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**:1067-1072.

Racke K, Coats J. & Titus K.R. (1988). Degradation of chlorpyrifos and its hydrolysis products, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, in soil. *Journal of Environmental Science and Health, B* **23**: 527–539.

Racke K, Laskowski D & Schultz M. (1990). Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**: 1430–1436.

Racke KD. (1993). Environmental fate of chlorpyrifos. *Rev Environ Contam Toxicol* **131**: 1–154.

Ragnarsdottir, K.V. (2000). Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *Journal of the Geological Society*, **157**: 859-876.

Rahman και James, 1983

Rajagopal B, Rao V, Nagendrappa G, Sethunathan N. (1984). Metabolism of carbaryl and carbofuran by soil enrichment and bacterial cultures. *Can. J. Microbiol.* **30**:1458-1466.

Ramanand K, Sharmila M, Sethunathan N. (1988). Mineralization of Carbofuran by a Soil Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**(8): 2129-2133.

Raushel FM. (2002). Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents. *Current Opinion in Microbiology*. **5**: 288–295.

Robertson L, Chandler K, Stickley B, Cocco R, Ahmetagic M. (1998). Enhanced microbial degradation implicated in rapid loss of chlorpyrifos from the controlled release formulation suSucon(R) Blue in soil. *Crop Protection*, **17**: 29–33.

Serdar CM, Gibson DT, Munnecke DM & Lancaster JH. (1982). Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. *Applied and Environmental Microbiology*. **44**: 246–249.

- Serder CM, Murdock DC & Rhode MF** (1989). Parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta* MG: subcloning, complete nucleotide sequence and expression of mature portion of the enzymes in *Escherichia coli*. *Bio/Technol.* **7**:1151–1555.
- Sethunathan N and Yoshida T** (1973). A *Flavobacterium* that degrades diazinon and parathion. *Can J Microbiol* **19**: 873–875.
- Siddaramappa R, Rajaram K, Sethunathan N.** (1973). Degradation of Parathion by Bacteria Isolated from Flooded Soil. *Applied and Environmental Microbiology.* **26**(6): 846-849.
- Siddavattam D, Khajamohiddin S, Manavathi B, Pakala SB & Merrick M.** (2003) Transposon-like organization of the plasmid-borne organophosphate degradation (*opd*) gene cluster found in *Flavobacterium* sp. *Appl Envir Microbiol.* **69**:2533–2539.
- Singh B, Walker A., Morgan J, Wright D.** (2003). Role of soil pH in the development of enhanced biodegradation of fenamiphos. *Applied and Environmental Microbiology.* **69**:7035-7043.
- Singh B, Walker A, Morgan J & Wright DJ.** (2004). Biodegradation of Chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in the bioremediation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 4855–4863.
- Singh B, Walker A, Wright D.** (2006). Bioremediation potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: Influence of different environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry.* **38**: 2682-2693.
- 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.
- Smelt, J, Crnm J, Teunissen W, and Leistra M.** (1987). Accelerated transformation of aldicarb, Degradation of Aldicarb and Ethoprop: Jones, Norris 55 oxamyl, and ethoprophos after repeated soil treatments. *Crop Protection*, **6**:295-303.
- Sogorb, M. and Vilanova E.** (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, **128**: 215-228.
- Somara S & Siddavattam D.** (1995). Plasmid mediated organophosphate pesticide degradation by *Flavobacterium balustinum*. *Biochem Mol Biol Int.* **36**: 627–631.
- Somara S, Manavathi B, Tebbe C & Siddavattam D.** (2002). Localization of identical organophosphorus pesticide degrading (*opd*) genes on genetically dissimilar indigenous

plasmids of soil bacteria: PCR amplification, cloning and sequencing of the *god* gene from *Flavobacterium balustinum*. *Indian J Exp Biol.* **40**: 774–779.

Somasundaram L, Racke D, Coats R. (1987). Effect of manuring on the persistence and degradation of soil insecticides. *Bulletin of Environmental and Contam. Toxicology.* **39**: 579-586.

Swetha V. and Phale P. (2005). Metabolism of Carbaryl via 1,2-Dihydroxynaphthalene by Soil Isolates *Pseudomonas* sp. Strains C4, C5, and C6. *Applied and Environmental Microbiology.* 71(10):5951-5956.

Swetha V, Basu A, Phale P. (2007). Purification and Characterization of 1-Naphthol-2-Hydroxylase from Carbaryl-Degrading *Pseudomonas* Strain C4. *Journal of Bacteriology.* **189**: 2660–2666.

Tan, H. M. (1999). Bacterial catabolic transposons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:1–12.

Tomasek P, Karns J. (1989). Cloning of a Carbofuran Hydrolase Gene from *Achromobacter* sp. Strain WM111 and Its Expression in Gram-Negative Bacteria, *Journal of Bacteriology*, p. 4038-4044.

Topp E, Hanson S, Ringelberg B, White C, Wheatcroft R. (1993). Isolation and characterization of an N-methylcarbamate insecticide-degrading methylotrophic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology.* **61**: 1691–1698.

Trehy M, Yost R, McCreary J. (1984). Determination of aldicarb, aldicarb oxime and aldicarb nitrile in water by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **56**:1281–1285.

Trotter D, Kent R. and Wong M. (1991). Aquatic fate and effect of carbofuran. *Crit. Rev. Environ. Control.* **21**: 137-176.

Turco R. and Konopka A. (1990) Biodegradation of carbofuran in enhanced and non-enhanced soils. *Soil Biol. Biochem.* **22**:195-201.

Wallnofer von P., Sohlmann, F. and Dehlmann, L. (1976) The effect of fenthion on the organism *Rhizopus japonicus*. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer.* **29**/1976(3).

Wang A, Mulchandani A & Chen W. (2002b). Specific adhesion to cellulose and hydrolysis of organophosphate nerve agents by a genetically engineered *Escherichia coli* strain with a surface expressed cellulose-binding domain and organophosphorus hydrolase. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 1684–1689.

Wang L, Wen Y, Guo X, Wang G, Li S, Jiang J. (2010). Degradation of methamidophos by *Hyphomicrobium* species MAP-1 and the biochemical degradation pathway. *Biodegradation* (in press, doi:10.1007/s10532-009-9320-9).

- World Health Organization (WHO).** 1996. Environment Health Criteria 178: Methomyl.
- Wilde G. and Mize T.** (1984). Enhanced microbial degradation of systemic pesticides in soil and its effect on chinch bug *Blissus leucopterus leucopterus* and greenbug *Schizaphis graminum rondani* control in seedling sorghum. *Environmental Entomology*, **13**:1079-1082.
- Williams I, Pepin H, Brown M.** (1976). Degradation of carbofuran by soil microorganisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **15**:244-249.
- Xie S, Liu J, Li L, Qiao C.** (2009). Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates. *Journal of Environmental Science*, **21**: 76-82.
- Xu J, Wua J, Wang Z, Wang K, Li M, Jiang J, He J, Li S.** (2009). Isolation and Characterization of a Methomyl-Degrading *Paracoccus* sp. mdw-1. *Pedosphere*. **19**(2): 238-243.
- Yang H, Carr P, McLoughlin S, Liu L, Horne I, Qui X, Jeffries C, Russell R, Oakeshott J & Ollis D.** (2003) Evolution of an organophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution. *Protein Eng.* **16**: 135–145.
- Yang L, Zhao H, Zhang X, Yang H, Zhang X.** (2005). Isolation and characterization of a chlorpyrifos and a 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium. *FEMS Microbiology Letters*. **251**:67-73.
- Zalidis G, Stamatiadis S, Takavakoglou V, Eskridge K, and Misopolinos N.** (2002). Impacts of agricultural practices on soil and water quality in the Mediterranean region and proposed assessment methodology. *Agriculture, Ecosystems, and Environment*, **88** (2):137-146.
- Zheng Y, Liu D, Gao Q, Wang W, Shi X.** (2006). Isolation and characterization of a bacterium HS-A32 capable of degrading methamidophos. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, **12**: 399-403.
- Zhongli C, Shunpeng L, Guoping F.** (2001). Isolation of methyl parathion degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: **4922-4925**.