

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΕΙΑΣ

«Μελέτη της μικροβιακής αποδόμησης του cypermethrin σε γεωργικό έδαφος με ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών»

Study of the microbial degradation of cypermethrin in agricultural soil with known history of prior exposure to pyrethroids

ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΟΥ ΣΟΥΛΤΑΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

Υπεύθυνος καθηγητής: Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τριμελής επιτροπή:

Καρπούζας Δημήτριος, 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.

Παπαδοπούλου Ευαγγελία, Συμβασιούχος Διδάσκουσα Ακαδημαϊκή Υπότροφος, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Καρπούζα Δημήτριο, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε, κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όπου βρισκόμουν κάτω από την επίβλεψή του.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τον κύριο Καρά Παναγιώτη για όλες τις συμβουλές του και την στήριξη του καθόλα τα στάδια του πειράματος. Επίσης ευχαριστώ πολύ, όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την συνεργασία και βοήθειά τους, κατά την παραμονή μου σε αυτό.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, για όλη την ηθική και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν κατά την διάρκεια της φοίτησής μου στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Δημητριάδου Σουλτάνα του Δημητριάδη Ευάγγελου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη:.....	7
Abstract:.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1. Εισαγωγή:.....	10
1.1 Χρήση γεωργικών φαρμάκων, περιβαλλοντική τύχη και κίνδυνοι:.....	10
1.2 Μικροβιακή αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον και βιολογική αποκατάσταση:.....	13
1.3 Πυρεθροειδή γεωργικά φάρμακα:.....	15
1.4 α -Cypermethrin:.....	17
1.4.1 Δομή:.....	17
1.4.2 Τρόπος δράσης και χρήση του:.....	18
1.4.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά:.....	19
1.4.4 Περιβαλλοντική τύχη και μεταβολισμός:.....	19
1.4.5 Τοξικότητα α -cypermethrin:.....	21
1.4.6 Μικροβιακή διάσπαση α -cypermethrin:.....	22
1.5 Σκοπός του πειράματος:.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	26
2. Μέθοδοι και υλικά:.....	27
2.1 Δείγμα εδάφους:.....	27
2.1.1 Προσδιορισμός υγρασίας των εδαφών:.....	27

2.1.2 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών:.....	27
2.2 Παρασκευή υγρών και στερεών θρεπτικών μέσων (MSMN - SEM):.....	28
2.3 Καμπύλη αναφοράς:.....	30
2.4 Μέθοδος ανάλυσης HPLC του α -cypermethrin:.....	31
2.5 Μέθοδος εκχύλισης του α – cypermethrin από έδαφος και υγρές καλλιέργειες.....	31
2.5.1 Εκχύλιση από το έδαφος:.....	31
2.5.2 Εκχύλιση από τις υγρές καλλιέργειες.....	31
2.5.3 Επιβεβαίωση αποτελεσματικότητας μεθόδου εκχύλισης από έδαφος και υγρές καλλιέργειες:.....	32
2.6 Αποστείρωση εδάφους με υποκαπνισμό.....	32
2.7 Περιγραφή πειράματος.....	33
2.7.1 Πείραμα εδάφους:.....	33
2.7.2 Πείραμα εμπλουτισμένων καλλιεργειών.....	34
2.8 Απομόνωση αποικιών από τριβλία.....	35
2.9 Απομόνωση ολικού γενωμικού DNA από καλλιέργειες βακτηρίων:.....	36
2.10 Κλωνοποίηση και αποστολή για αλληλούχιση:.....	37
2.11 Ένθεση του γονιδίου 16S rRNA σε πλασμιδιακό φορέα:.....	38

2.12 Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα E. Coli.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
3. Αποτελέσματα.....	42
3.1 Πειράματα εφαρμογής του α-cypermethrin σε δείγμα εδάφους με ιστορικό εναπόθεσης πυρεθροειδών γεωργικών φαρμάκων:.....	42
3.2 Εμπλουτισμένες καλλιέργειες:.....	44
3.2.1 Εμπλουτισμένες καλλιέργειες MSMN.....	44
3.2.2 Εμπλουτισμένες καλλιέργειες SEM.....	45
3.3 Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το α-cypermethrin.....	46
3.3.1 Επίστρωση τριβλίων και επιλογή αμιγών αποικιών:.....	46
3.3.2 Εμπλουτισμένες καλλιέργειες της αποικίας 14 σε SEM:.....	47
3.3.3 Αποδόμηση του α-cypermethrin από την αποικία 14.....	48
3.4 Μοριακή ταυτοποίηση:.....	50
3.4.1 PCR και ηλεκτροφόρηση:.....	50
3.4.2 Αλληλούχιση και Ταυτοποίηση.....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
4. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	54
4.1 Συζήτηση	54
4.2 Μελλοντική ερευνητική κατεύθυνση:.....	57
5. Βιβλιογραφία.....	58

Περίληψη:

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα απομόνωσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών με ικανότητα αποδόμησης του πυρεθροειδούς εντομοκτόνου *a cypermethrin*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε έδαφος με ιστορικό εφαρμογής ενός άλλου πυρεθροειδούς γεωργικού φαρμάκου το *deltamethrin*, κάνοντας την υπόθεση πως σε αυτό το έδαφος η μικροβιακή κοινότητα θα έχει αναπτύξει μηχανισμούς προσαρμογής στην ύπαρξη πυρεθροειδών φαρμάκων, αλλά και μηχανισμούς διάσπασης αυτών. Ο σκοπός της μελέτης ήταν η απομόνωση μικροοργανισμών με ικανότητα αποδόμησης του *a-cypermethrin*, καθώς και η ταυτοποίηση τους που ήταν υπεύθυνα. Αρχικά έγινε εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου σε δείγμα του εδάφους που συλλέχτηκε και έγινε παρακολούθηση της συγκέντρωσής του ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Παρατηρήθηκε πτώση της συγκέντρωσής του *a cypermethrin*. Μέρος του εδάφους εμβολιάστηκε σε καλλιέργειες εμπλουτισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα SEM + *a-cypermethrin* για την προσπάθεια απομόνωσης μικροοργανισμών. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική πτώση της συγκέντρωσης του *a-cypermethrin* και στις καλλιέργειες εμπλουτισμού με τη διάσπαση του να φτάνει στο 60% της συγκέντρωσής του στις 7 ημέρες. Στη συνέχεια με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων ένα μέρος της καλλιέργειας στρώθηκε σε τριβλία SEM + *a-cypermethrin* (10mg/L), και επιλέχθηκαν 15 αμιγής αποικίες που φαίνονταν μορφολογικά διαφορετικές. Η κάθε μια από αυτές εμβολιάστηκε σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα και παρακολουθήθηκε η ικανότητα τους στη διάσπαση του γεωργικού φάρμακου και βρέθηκε ότι μόνο η αποικία 14 ήταν ικανή να αποδομεί το *a-cypermethrin* (90% διάσπαση σε 21 ημέρες). Τέλος, μέσω κλωνοποίησης τμήματος του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων, αποστολής κλώνων για αλληλούχιση, βρέθηκε πως το βακτήριο που αποδομεί το εντομοκτόνο *a cypermethrin* ήταν του γένους *Chitinophaga sp.*

Abstract:

In the present study, experiments were performed to isolate and identify microorganisms capable of degrading the pyrethroid insecticide α -cypermethrin. For this purpose, soil with a history of application of another pyrethroid pesticide, deltamethrin, was used, suggesting that in this soil the microbial community will have developed mechanisms for adapting to the existence of pyrethroid drugs, but also mechanisms for their breakdown. The aim of the study was to isolate microorganisms capable of degrading α -cypermethrin, as well as to identify those responsible. Initially, the pesticide was applied to a collected soil sample and its concentration was monitored at regular intervals. A decrease in the concentration of α -cypermethrin was observed. Part of the soil was inoculated into enrichment cultures, on SEM + α -cypermethrin medium to try to isolate microorganisms. There was also a significant decrease in the concentration of α -cypermethrin in enrichment cultures with its breakdown reaching 60% of its concentration in 7 days. Subsequently by the method of sequential dilutions a part of the culture was applied on SEM + α -cypermethrin agar plates (10mg / L), and 15 pure colonies were selected that looked morphologically different. Each of them was inoculated on a new medium and their ability to break down the pesticide was monitored and only colony 14 was found to be able to degrade α -cypermethrin (90% breakdown in 21 days). Finally, by cloning part of the 16S rRNA gene of bacteria, sending the clones for sequencing, it was found that the bacterium that degrades the insecticide α -cypermethrin was of the genus *Chitinophaga sp.*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή:

1.1 Χρήση γεωργικών φαρμάκων, περιβαλλοντική τύχη και κίνδυνοι:

Η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων στις καλλιέργειες γίνεται σταθερά εδώ και πολλά χρόνια. Από την στιγμή της εφαρμογής τους η τύχη τους στο περιβάλλον μπορεί να διαφέρει, είτε να περιοριστεί στο σημείο εφαρμογής, είτε να διαφύγει στα υπόγεια ύδατα, είτε να διαρρεύσει στον αέρα. Συνεπώς πολλές φορές υπάρχουν επιβλαβή αποτελέσματα. Οι παράγοντες που συμβάλουν στην τύχη των γεωργικών φαρμάκων είναι τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ίδιων των φαρμάκων καθώς και τα χαρακτηριστικά του εδάφους της περιοχής στην οποία εφαρμόζονται (Tiryaki and Temur 2010). Όταν δεν παραμένουν μόνο στο σημείο εφαρμογής τους, αλλά μέσω διαδικασιών μεταφοράς απομακρύνονται από αυτό, και μεταφέρονται μεταξύ περιβαλλοντικών διαμερισμάτων, μπορεί επίσης να μετασχηματίζονται και σε άλλες ουσίες μέσω του μεταβολισμού της ή της διάσπασής τους και να μετατρέπονται σε πιο τοξικές ουσίες (Gavrilescu 2005). Η αρχική κατανομή των γεωργικών φαρμάκων, περιγράφει την ποσότητά τους στον αέρα, στο έδαφος, στο νερό, στα φυτά και στα ζώα μετά την αρχική εφαρμογή. Καθορίζεται από το σύνθεση του φαρμάκου, την μέθοδο και τον ρυθμό εφαρμογής, καθώς και την τοπογραφία, την ποσότητα και τον τύπο βλάστησης και εδάφους, και τέλος τις καιρικές συνθήκες (Tiryaki and Temur 2010). Την περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων επηρεάζουν επίσης και η προσρόφηση, η εμμόνη και η κινητικότητά τους μετά από την αρχική τους εφαρμογή. Οι βασικές διαδικασίες που καθορίζουν την περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων είναι 1) προσρόφηση 2) διάσπαση είτε αβιοτική είτε βιοτική 3) μεταφορά σε επιφανειακά ύδατα με επιφανειακή απορροή ή με διάβρωση, 4) μεταφορά στα υπόγεια ύδατα με έκπλυση και 5) μεταφορά στον αέρα μέσω πτητικοποίησης (Andreu and Picó 2004). Αυτές οι διαδικασίες μπορούν να γίνουν με ορισμένους τρόπους.

- Στην ατμόσφαιρα μπορούν να εισέλθουν είτε επειδή παρασύρονται εύκολα με τον αέρα αν εφαρμόζονται με ψεκασμό, είτε με την δημιουργία ατμών μετά την εφαρμογή (Bürkle *et al.*, 2008).

- Στα επιφανειακά νερά μπορούν να εισέλθουν μέσω επιφανειακής απορροής, απορρίψεων λυμάτων, ατμοσφαιρικής εναπόθεσης και διαρροών (Tiryaki and Temur 2010).
- Στα υπόγεια ύδατα μπορούν να εισέλθουν κυρίως μέσω απορροής και έκπλυσης. (Arias-Estévez *et al.* 2008)

Έτσι λοιπόν, καθώς υπάρχει κίνδυνος να μετακινηθούν στο έδαφος, στα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα και στην ατμόσφαιρα, αλλά και σε καρπούς, προς βρώση των φυτών που προστατεύουν (Lozowicka *et al.* 2014), δημιουργείται η ανάγκη για απομάκρυνσή τους επειδή μπορεί να εμφανίσουν τοξικότητα για το περιβάλλον ή και για τους ίδιους τους ανθρώπους (Atreya, *et al.* 2012). Συγκεκριμένα στους ανθρώπους ανάλογα με το είδος του γεωργικού φαρμάκου, τον χρόνο, και την εντατικότητα της χρήσης του, μπορεί να προκληθούν προσωρινά αλλά και χρόνια προβλήματα υγείας, καθώς κάποια από αυτά είναι νευροτοξικά, καρκινογόνα και μπορεί να επηρεάζουν και διάφορα συστήματα του οργανισμού (Lozowicka *et al.* 2014), (Atreya, *et al.* 2012), (Bradberry *et al.* 2005). Περιβαλλοντικές ζημιές, μπορούν επίσης να προκύψουν καθώς μπορεί να διαταραχθεί το οικοσύστημα λόγω θανάτωσης ψαριών ή πουλιών από την τοξικότητα των γεωργικών φαρμάκων (Casida and Quistad 1998).

Καθώς εδώ εξετάζεται το *a*-cypermethrin που είναι πυρεθροειδές, παρουσιάζεται μια σύντομη αναφορά στη χρήση των πυρεθροειδών την περιβαλλοντική τους τύχη και η τοξικότητα που μπορεί να προκαλέσουν. Τα πυρεθροειδή είναι μια κατηγορία λιπόφιλων εντομοκτόνων που εύκολα αποδομούνται στο φυσικό περιβάλλον. Οι δύο κύριες οδοί αποδόμησης είναι η φωτοαποδόμηση και η βιοαποδόμηση. Τα πυρεθροειδή που αναπτύχθηκαν για χρήση στη γεωργία είναι αρκετά φωτοσταθερά, αλλά εξακολουθούν να είναι ευαίσθητα στο φως του ήλιου, το οποίο προκαλεί σε αυτά πολλές αλλαγές όπως ισομερισμό ή διάσπαση των εστερικών τους δεσμών. Τα βασικά μονοπάτια του μεταβολισμού τους είναι υδρόλυση του κεντρικού εστερικού δεσμού και η οξείδωση τόσο των ομάδων οξέος όσο και αλκοόλης. Στα πουλιά και τα θηλαστικά μεταβολίζονται και εκκρίνονται πιο γρήγορα από ότι στα έντομα και στα ψάρια. Στα φυτά, οι αρχικές μεταβολικές διεργασίες είναι ίδιες με αυτές που είναι γνωστές στα ζώα. Στο έδαφος, τα πυρεθροειδή υφίστανται υδρόλυση και οξείδωση. Τέλος ούτε τα πυρεθροειδή ούτε οι

μεταβολίτες τους δεν υφίστανται έκπλυση, οπότε δεν μετακινούνται στα υπόγεια ύδατα (Demoute 1989). Η τοξικότητα τους ποικίλει μεταξύ των πυρεθροειδών, καθώς διαφέρουν αρκετά. Γενικά είναι λιγότερο τοξικά από τα οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και οργανοχλωριωμένα γεωργικά φάρμακα. Εξαιρέσεις αποτελούν τα πυρεθροειδή που εμφανίζουν τις υψηλότερες οξείες στοματικές τοξικότητες: esfenvalerate, deltamethrin, bifenthrin, tefluthrin, flucythrinate, cyhalothrin και fenpropathrin (Mueller-Beilschmidt 1990). Τα κύρια συμπτώματα οξείας τοξικότητας που παρουσιάζουν είναι νευροτοξικότητα και υπερτροφία του ήπατος, καθώς και ερεθισμό στα μάτια και στο δέρμα. Τα συμπτώματα χρόνιας τοξικότητας είναι κυρίως μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, αλλά και διόγκωση του ήπατος. Τέλος είναι πολύ τοξικά για τα περισσότερα ψάρια (Mueller-Beilschmidt 1990). Για τους λόγους που προηγήθηκαν, είναι καλό να προστατεύεται το περιβάλλον από τα πυρεθροειδή καθώς και όλα τα γεωργικά φάρμακα, καθώς εξ' αιτίας της μεταφοράς τους μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα υγείας και είτε σε ζώα είτε στον άνθρωπο, και να προκαλέσουν οικολογικές καταστροφές. Αυτό μπορεί να γίνει με (α) άσκηση ολοκληρωμένης διαχείριση επιβλαβών οργανισμών - integrated pest management (IPM), (β) Χρήση μόνο γεωργικών φαρμάκων που φέρουν επισήμανση για την προβλεπόμενη καλλιέργεια και παράσιτο (γ) λαμβάνοντας υπόψη τα χαρακτηριστικά της τοποθεσίας εφαρμογής (υφή του εδάφους, πλαγιές), (δ) λαμβάνοντας υπόψη τη θέση των φρεατίων, λιμνών και άλλων υδάτινων σωμάτων, (ε) διατήρηση του εξοπλισμού εφαρμογής σε άριστη κατάσταση, (ζ) προσεκτική ανάμιξη και εφαρμογή και χρήση προτεινόμενων συγκεντρώσεων, (η) αποτροπή διαρροών, (θ) λαμβάνοντας υπόψη τις επιπτώσεις του καιρού / άρδευσης, (ι) αποθήκευση φυτοφαρμάκων σε ασφαλούς χώρους, (κ) απόρριψη των αποβλήτων με ασφάλεια, (λ) αφήνοντας ζώνες ασφαλείας γύρω από ευαίσθητες περιοχές, (μ) μείωση της μετακίνησης των φαρμάκων εκτός του σημείου εφαρμογής (Tiryaki and Temur 2010).

1.2 Μικροβιακή αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον και βιολογική αποκατάσταση:

Ένας σημαντικός τρόπος να απομακρυνθούν τα γεωργικά φάρμακα από το περιβάλλον είναι η μικροβιακή αποδόμηση ή βιοαποδόμηση. Ως βιοαποδόμηση ορίζεται μια φυσική διαδικασία, όπου γίνεται αποδόμηση μιας ξеноβιοτικής χημικής ουσίας ή ενός γεωργικού φαρμάκου από έναν μικροοργανισμό (Singh 2008).

Αυτή η φυσική καταβολική ικανότητα των μικροοργανισμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για στοχευμένη απομάκρυνση γεωργικών φαρμάκων από αγρούς, και γενικότερα από τα σημεία εφαρμογής τους. Αυτό ονομάζεται βιολογική αποκατάσταση (bioremediation) και επιτυγχάνεται με αυτόν τον τρόπο μείωση της επικινδυνότητας της χρήσης τους και της τοξικότητάς τους, καθώς αφαιρούνται τελείως ή σε βαθμό που η συγκέντρωσή να είναι επιτρεπτή με βάση τους κανονισμούς ασφαλείας που ισχύουν. Η βιολογική αποκατάσταση προσφέρει μια πιο φιλική προς το περιβάλλον και οικονομικά εφικτή επιλογή για την απομάκρυνση των ρύπων, σε σχέση με άλλες μεθόδους απομάκρυνσης γεωργικών φαρμάκων (Rayu, *et al.*, 2012). Συνήθως χρησιμοποιούνται βακτήρια μύκητες και φυτά που υπάρχουν στο περιβάλλον για την αποδόμηση τοξικών ουσιών για τον άνθρωπο και το περιβάλλον (Vidali 2001). Αν γίνει ολοκληρωμένη βιοαποδόμηση το αποτέλεσμα είναι πλήρης διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό, με κάθε στάδιο της αποδόμησης να καταλύεται από διαφορετικά ένζυμα. Ως αποτέλεσμα παρέχονται βασικά θρεπτικά υλικά (άνθρακας) για την περαιτέρω ανάπτυξη μικροοργανισμών που τα αποδομούν (Singh 2008). Οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι από την ίδια την περιοχή που είναι να γίνει βιολογική αποκατάσταση ή μπορεί να απομονωθούν από αλλού και να μεταφερθούν στη θέση ρύπανσης. Οι ρύποι μετασχηματίζονται από τους ζωντανούς οργανισμούς μέσω αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα ως μέρος των μεταβολικών διεργασιών τους. Για να είναι αποτελεσματική η βιολογική αποκατάσταση, οι μικροοργανισμοί πρέπει να διασπάσουν ενζυμικά τους ρύπους και να τους μετατρέψουν σε ακίνδυνα προϊόντα. Καθώς η βιολογική αποκατάσταση μπορεί να είναι αποτελεσματική μόνο όταν οι

περιβαλλοντικές συνθήκες επιτρέπουν τη μικροβιακή ανάπτυξη και δραστηριότητα, η εφαρμογή της συνεπάγεται συχνά τη χειραγώγηση περιβαλλοντικών παραμέτρων, για την ενίσχυση της μικροβιακής ανάπτυξης και για την αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησης (Vidali 2001).

Οι μέθοδοι βιολογικής αποκατάστασης εξαρτώνται από την ύπαρξη των σωστών μικροβίων στο σωστό μέρος με τους κατάλληλους περιβαλλοντικούς παράγοντες για την υποβάθμιση. Μπορεί να γίνει επί τόπου, είναι συχνά λιγότερο δαπανηρή, δεν επηρεάζει συνήθως την περιοχή στην οποία εφαρμόζεται, εξαλείφει τα απόβλητα μόνιμα, έχει μεγαλύτερη δημόσια αποδοχή, και μπορεί να συνδυαστεί με άλλες φυσικές ή χημικές μεθόδους επεξεργασίας. Έχει όμως τους περιορισμούς της. Ορισμένες χημικές ουσίες δεν επιδέχονται βιοαποικοδόμηση, για παράδειγμα, βαρέα μέταλλα, ραδιονουκλείδια και μερικές χλωριωμένες ενώσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο μικροβιακός μεταβολισμός των ρύπων μπορεί να παράγει τοξικούς μεταβολίτες. Επίσης είναι μια επιστημονικά εντατική διαδικασία που πρέπει να προσαρμόζεται στις συγκεκριμένες συνθήκες του χώρου, πράγμα που σημαίνει ότι πρέπει να προηγηθούν μελέτες σε μικρή κλίμακα πριν από την πραγματική εκκαθάριση των τοποθεσιών (Boorathy 2000).

Οι μέθοδοι χωρίζονται σε *in situ* - εφαρμογή της μεθόδου στο σημείο που εντοπίζεται το πρόβλημα της ρύπανσης, και *ex situ* - απομάκρυνση του ρυπασμένου συστήματος και καθαρισμό του σε άλλη περιοχή από την αρχική. Οι *in situ* - επιτόπιες μέθοδοι στηρίζονται μόνον στη δράση γηγενών βακτηρίων και μολονότι υπάρχει μια πολύ μεγάλη ερευνητική δραστηριότητα ώστε να απομονωθούν και να αναπτυχθούν ειδικά βακτήρια με υψηλή ικανότητα βιο-αποδόμησης οργανικών ρύπων, δεν έχει μέχρι σήμερα αναφερθεί παράδειγμα επιτόπιας επεξεργασίας εδαφών με προσθήκη μη γηγενών βακτηρίων. Σε πολλές περιπτώσεις εφαρμογής παρατηρήθηκε ότι η κυκλοφορία του αέρα μέσα από το πορώδες της ακόρεστης ζώνης προκαλεί ταυτόχρονα την βιολογική αποδόμηση των οργανικών ρύπων. Παρ' όλα αυτά ενισχύονται οι μικροοργανισμοί ανάλογα με το σημείο που βρίσκονται τα γεωργικά φάρμακα με 3 μεθόδους. 1) Την μέθοδο του βιο-αερισμού (*bioventing*), και όταν η ρυπασμένη περιοχή βρίσκεται μέσα στο υδροφόρο στρώμα, τις μεθόδους 2) άντληση και επανακυκλοφορία των υπόγειων νερών μετά από τον εμπλουτισμό τους σε οξυγόνο σε επιφανειακές

εγκαταστάσεις, και 3) διοχέτευση αέρα μέσα στο υδροφόρο στρώμα (αεροδιασκορπισμός). Οι *ex situ* μέθοδοι περιλαμβάνουν 1) επεξεργασία με τεχνικές αγροκαλλιέργειας (*landfarming*), 2) επεξεργασία σε σωρό (*biopile*), 3) επεξεργασία σε *windrows*, 4) επεξεργασία σε βιοαντιδραστήρες. Οι μέθοδοι που συνήθως επιλέγονται είναι αυτές που είναι τοπικές (*in situ*) καθώς συνήθως έχουν χαμηλότερο κόστος και είναι ευκολότερο να εφαρμοστούν (Azubuike, *et al.*, 2016).

Συνοψίζοντας οι παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα αποδόμησης γεωργικών φαρμάκων είναι η ύπαρξη, ο αριθμός και η δραστικότητα των κατάλληλων μικροοργανισμών και ενζύμων που αυτά παράγουν για την αποικοδόμηση, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες των γεωργικών φαρμάκων, η βιολογική διαθεσιμότητα του φαρμάκου και η ύπαρξη επιπλέον θρεπτικών συστατικών, καθώς αυτή μπορεί να είναι καθοριστική για την ευκολότερη ανάπτυξη των μικροοργανισμών ή ακόμα και αναγκαία (Aislabie and Lloyd-Jones 1995).

1.3 Πυρεθροειδή γεωργικά φάρμακα:

Τα πυρεθροειδή είναι συνθετικά παράγωγα φυσικών πυρεθρινών που εκχυλίζονται από το *Chrysanthemum cinerariaefolium* αλλά δεν διαθέτουν μία κυανομάδα (Gajendiran and Abraham 2018). Οι φυσικές ουσίες του εκχυλίσματος του *Chrysanthemum cinerariaefolium* αποσυντίθενται ταχύτατα από το φως, για αυτό και έχουν αντικατασταθεί με συνθετικά παράγωγα. Η χρήση τους ως εντομοκτόνα είναι εφικτή καθώς είναι πολύ πιο τοξικά στα έντομα παρά στα σπονδυλωτά, πράγμα που οφείλεται στο μικρότερο μέγεθος των εντόμων, στη χαμηλότερη θερμοκρασία σώματός τους και στο ότι διαθέτουν πιο ευαίσθητα κανάλια νατρίου (Chrustek *et al.* 2018). Συγκεκριμένα, έως πρόσφατα χρησιμοποιούνταν συνήθως τρία πυρεθροειδή, τα *deltamethrin*, *permethrin* και *α -cypermethrin*, ως εντομοκτόνα, επειδή θεωρούνται να είναι σχετικά μη τοξικά για τον άνθρωπο σε όλα τα στάδια της ζωής. Ωστόσο, αποδείχθηκε πως δεν είναι εντελώς ακίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία καθώς μπορεί να εισέλθουν στο σώμα μέσω επαφής με το δέρμα, με εισπνοή και μέσω τροφής ή νερού. Επιπροσθέτως τα 3 πυρεθροειδή που αναφέρθηκαν, φαίνεται να έχουν αρνητική

επίδραση στη γονιμότητα, το ανοσοποιητικό σύστημα, τον καρδιαγγειακό και τον ηπατικό μεταβολισμό και ενζυμική δραστικότητα των ιστών αυτών, να προκαλούν φλεγμονή, νεφροτοξικότητα και ηπατοτοξικότητα, να επηρεάζουν την δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων στους ιστούς, καθώς και να αυξάνουν τα επίπεδα γλυκόζης και λιπιδίων στο αίμα (Chrustek et al. 2018). Συνεπώς είναι συνετή η απομάκρυνσή τους μετά την χρήση τους.

Τα πυρεθροειδή περιέχουν στο μόριο τους από ένα έως τρία ασύμμετρα άτομα άνθρακα. Επομένως, έχουν υψηλή χειρομορφία. Η χειρομορφία των πυρεθροειδών μπορεί να προκύψει λόγω του τμήματος οξέος, του τμήματος αλκοόλης ή και τα δύο. Επιπλέον κάποια περιλαμβάνουν εστέρες του χρυσάνθεμο-οξέος (2,2-διμεθυλ-3- (1-ισοβουτενυλ) κυκλοπροπαν-1-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας) και αλογονωμένα παράγωγα των οξέων και των αλκοολών τους (Bradberry et al. 2005), (L. G. Costa 2015), (Soderlund 2012).

Ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με τα κανάλια νατρίου και πρόκληση παρατεταμένης εκπόλωσης στους νευρώνες. Η αποτελεσματικότητα των πυρεθροειδών και η επιλεκτικότητά τους στα έντομα εξαρτάται από παράγοντες, όπως δομικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της συγκεκριμένης χειρομορφίας και cis ή trans στερεοχημείας κατά μήκος του δακτυλίου κυκλοπροπανίου, και άλλες φυσικές και χημικές ιδιότητες (Khambay 2002).

Υπάρχουν 2 τύποι πυρεθροειδών, τύπου I και τύπου II ανάλογα με την δομή τους, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και με τις παρενέργειες που προκαλούν. Τα τύπου I έχουν μια βασική δομή του καρβοξυλικού εστέρα κυκλοπροπανίου και παρενέργειες την εμφάνιση τρέμουλου σε όλο το σώμα (tremor syndrome) καθώς και υπερευαισθησία και αταξία. Περιλαμβάνουν τα allethrin, bifenthrin, permethrin, phenothrin, resmethrin, tefluthrin, and tetramethrin. Ο μηχανισμός δράσης τους είναι η αλλαγή της διαμόρφωσης των καναλιών νατρίου κατά το άνοιγμα και το κλείσιμο των μεμβρανών των νευρώνων. Τα τύπου II έχουν μία κυανομάδα και προκαλούν σιελόρροια το σύνδρομο CS (choreoathetosis-salivation syndrome) και κινητική δυσλειτουργία στα θηλαστικά. Περιλαμβάνουν τα cyfluthrin, cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, fenpropathrin, flucythrinate, flumethrin, fluvalinate, and tralomethrin. Η διαφορά στον

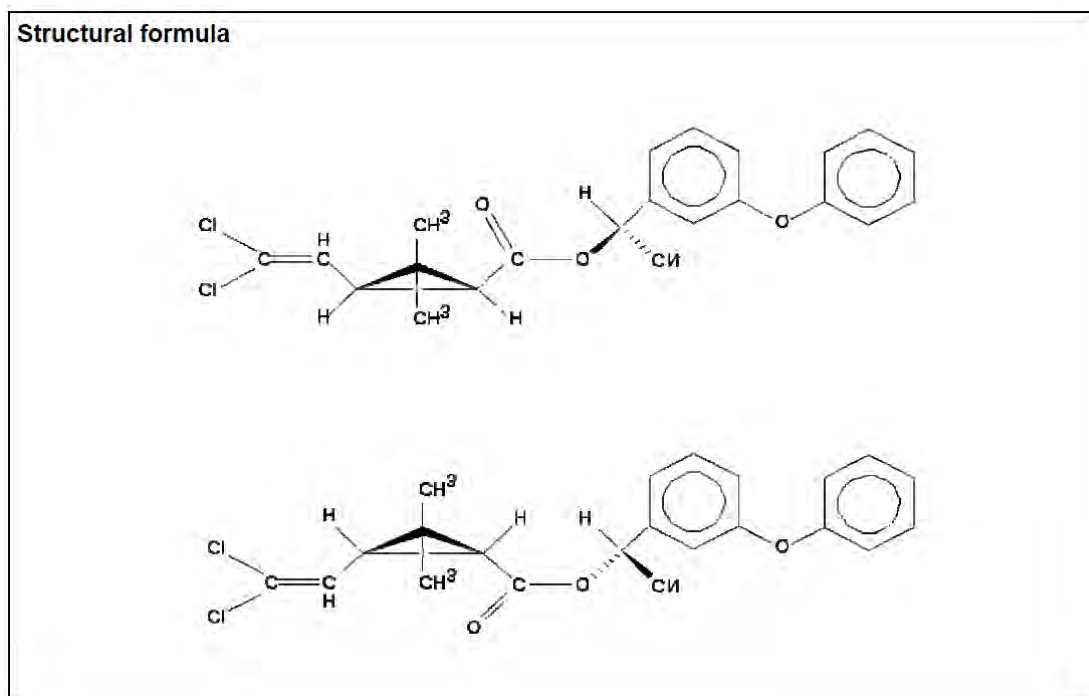
τρόπο δράσης είναι ότι επιπλέον επηρεάζουν τα κανάλια χλωρίου, συμπεριλαμβανομένων αυτών που είναι εξαρτώμενα από το GABA (Gajendiran and Abraham 2018),(Chrustek et al. 2018).

Επίσης χωρίζονται σε 4 ακόμα κατηγορίες με βάση την δομή τους. 1) πυρεθροειδή με τμήματα 3-φαινοξυβενζυλικής αλκοόλης και, -κυανο 3-φαινοξυβενζυλικής αλκοόλης που χρησιμοποιούνται ως γεωργικά εντομοκτόνα. 2) Πυρεθροειδή τύπου N-υδροξυμεθυλίου, χρησιμοποιούνται κατά διαφόρων παρασίτων εντόμων. 3) Τα πυρεθροειδή τύπου αλλεθρίνης. 4) Τα πυρεθροειδή τετραφθοροβενζυλίου (Matsuo 2019). Τα πυρεθροειδή χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα εντόμων όπως Κολεόπτερα, Ημίπτερα (Ομόπτερα και ετερόπτερα), Δίπτερα, Υμενόπτερα, Λεπιδόπτερα, Ορθόπτερα και Θυσανόπτερα. Χρησιμοποιούνται επίσης ως οικιακά εντομοκτόνα αλλά και στον τομέα της κτηνιατρικής εναντίων παρασίτων όπως ψύλλοι και κοριοί (Anadón et al. 2013).

1.4 α-Cypermethrin:

1.4.1 Δομή:

Η δομή του α-cypermethrin φαίνεται στην Εικόνα 1. Ο χημικός τύπος του είναι $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3(RS)$ -α-cyano-3-phenoxybenzyl(1R,S)-cis-3-(2,2-dichloro-vinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate (Kocaman and Topaktaş 2009). Το α-cypermethrin αποτελείται από δύο από τα τέσσερα cis ισομερή, που περιλαμβάνει το cypermethrin και ανήκει στα πυρεθροειδή τύπου II. Είναι μια ιδιαίτερα λιπόφιλη ουσία και απαντάται είτε με τη μορφή κρυσταλλικής σκόνης είτε ως πυκνή κίτρινη μάζα (Chrustek et al. 2018).



Εικόνα 1: Η χημική δομή του α-cypermethrin

1.4.2 Τρόπος δράσης και χρήση του:

Ο κύριος τρόπος δράσης του α-cypermethrin όπως και άλλα πυρεθροειδή της κατηγορίας II είναι η διακοπή της λειτουργίας καναλιών νατρίου VGSC. Μέσω της σύνδεσής του σε ορισμένες περιοχές δέσμευσης επιβραδύνει την ενεργοποίηση ή το άνοιγμα του καναλιού ακολουθούμενη από επιβράδυνση του ρυθμού απενεργοποίησης καναλιού και μετατόπιση του δυναμικού μεμβράνης προς ένα πιο υπερπολωμένο στάδιο. Κατά συνέπεια, τα κανάλια νατρίου ανοίγουν σε περισσότερο υπερπολωμένα δυναμικά και παραμένουν ανοιχτά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, οδηγώντας σε παραπάνω ιόντα νατρίου να διαπερνούν τη μεμβράνη του νευρικού κυττάρου, προκαλώντας εκπόλωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπερδιέγερση των νευρικών κυττάρων σε σημείο όπου δεν είναι πλέον δυνατή η δημιουργία δυναμικών δράσης (Kumar Singh *et al.* 2012).

Χρησιμοποιείται κυρίως στην προστασία καλλιεργειών φυτών, αλλά και ως εντομοκτόνο σε σπίτια ενάντια σε πεταλούδες, σκαθάρια, κατσαρίδες, και ψύλλους (Roy

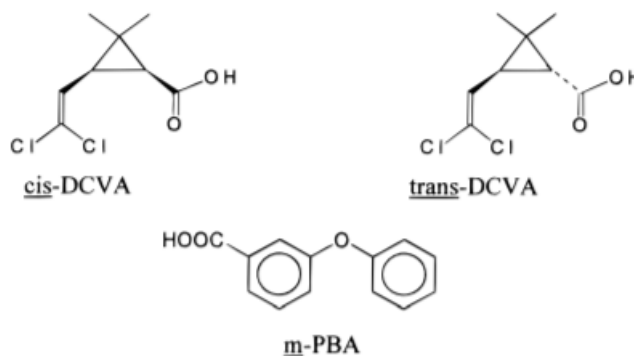
Choudhury 2017). Επίσης χρησιμοποιείται και σε κατοικίδια ζώα, σε ρούχα και σε κουνουπιέρες (Chrustek et al. 2018).

1.4.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά:

Το *a*-cypermethrin εμφανίζει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό - 0,004mg/L στους 20°C, ενώ είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες - στο τολουένιο 596.000mg/L, στην μεθανόλη 21.300mg/L, στον οξικό αιθυλεστέρα 584.000mg/ όλα στους 20°C. Το σημείο τήξης είναι στους 82.1°C, ενώ το σημείο βρασμού δεν είναι γνωστό γιατί αποσυντίθεται πριν από αυτό. Το σημείο διάσπασης είναι 248 °C. Δεν έχει γνωστό σημείο ανάφλεξης και δεν αναμένεται να αυτοαναφλευχθεί. Έχει πίεση ατμών 0.00038 mPa, και η σταθερά Henry στους 25 °C είναι $5.35 \times 10^{-02} \text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}^{-1}$, που σημαίνουν πως έχει χαμηλή πτητικότητα (Lewis et al. 2016).

1.4.4 Περιβαλλοντική τύχη και μεταβολισμός:

Ο μικροβιακός μεταβολισμός είναι αυτός που κυρίως καθορίζει την τύχη του *a*-cypermethrin στο έδαφος και βοηθά στη μείωση της συγκέντρωσης στο φυσικό περιβάλλον. Η διάσπαση του εστερικού δεσμού είναι η κύρια οδός αποδόμησης υπό εργαστηριακές συνθήκες, μέσω υδρόλυσης για την παραγωγή αλκοόλης και οξέος (Bhatt et al. 2020). Οι βασικοί μεταβολίτες του είναι το διχλωροβινυλικό οξύ (DCVA -cis/trans-3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid), όπου στο *a*-cypermethrin είναι μόνο η cis μορφή (Arena et al. 2018), και το *m*-φαινοβενζοϊκό οξύ (*m*-PBA), (Εικόνα2) (Chen et al. 1997).



Εικόνα 2 Η χημική δομή των μεταβολιτών DCVA και PBA.

Η περιβαλλοντική του τύχη περιγράφεται παρακάτω. Υπό αερόβιες συνθήκες η ανοργανοποίηση του *a*-cypermethrin παίρνει πάνω από 100 μέρες, συγκεκριμένα σε 168 μέρες το 20-47% των ισομερών του είναι ακόμα ανιχνεύσιμο, και ο μεταβολίτης του φαινοβενζοϊκό οξύ εμφανίζεται σε ποσοστό 23-48% στις 364 μέρες. Αντίστοιχα υπό αναερόβιες συνθήκες, στις 120 μέρες δεν παρατηρείται ανοργανοποίηση και ο μεταβολίτης PBA εντοπίζεται σε ποσοστό 67.6% (EU pesticides database, review report 2004). Γενικά αναμένεται να δεσμεύεται έντονα στον οργανικό άνθρακα του εδάφους και να έχει μικρή κινητικότητα στο έδαφος (οι τιμές K_{oc} κυμαίνονται από 20.800 έως 385.000 L / kg), και ως εκ τούτου δεν είναι πιθανό να διαρρεύσει στον υδροφόρο ορίζοντα (USEPA 2006). Στο έδαφος, υπό αερόβιες συνθήκες, είναι βιοαποικοδομούμενο και είναι ευαίσθητο στη φωτόλυση με σχετικά αργό ρυθμό ($DT_{50} = 28,9$ ημέρες) (Arena et al. 2018), (USEPA, 2006). Σε εργαστηριακές επώσεις εδάφους υπό αερόβιες συνθήκες και στο σκοτάδι, το *a*-cypermethrin εμφανίζει χαμηλή έως μέτρια επιμονή, σχηματίζοντας τους κύριους μεταβολίτες (*cis*-) DCVA και M310I017, οι οποίοι εμφανίζουν χαμηλή έως μέτρια επιμονή και τον μεταβολίτη PBA, που παρουσιάζει πολύ χαμηλή έως χαμηλή επιμονή. Σε αναερόβιες επώσεις εδάφους, η αποδόμησή του ήταν μέτρια, με παρόμοιο μονοπάτι με αυτό υπό τις αερόβιες συνθήκες. Η συμβολή των διαδικασιών φωτολυτικής αποδόμησης στις επιφάνειες του εδάφους, δεν θεωρείται σημαντική οδός αποδόμησης (Arena et al. 2018).

Το *a*-cypermethrin και ο μεταβολίτης M310I017 εμφανίζουν περιορισμένη κινητικότητα στο έδαφος, ενώ οι μεταβολίτες (*cis*-) DCVA και 3-PBA παρουσιάζουν πολύ υψηλή έως μέτρια κινητικότητα στο έδαφος (EFSA 2009, 2014) (Arena et al. 2018). Σε υδατικά διαλύματα και υπό κανονικές περιβαλλοντικές συνθήκες, το εντομοκτόνο έχει χρόνο ημιζωής 9-17 ημέρες. Τα επιφανειακά νερά μπορούν να ρυπανθούν με *a*-cypermethrin μέσω της εκροής από ψεκασμούς, της επιφανειακής απορροής και της διάβρωσης του εδάφους. Στα συστήματα νερού όπου υπάρχει ίζημα, η συγκέντρωσή του στο νερό μειώνεται γρήγορα λόγω της προσρόφησης από το ίζημα και τα αιωρούμενα σωματίδια (Mantzios et al. 2016). Επιπλέον, θεωρείται εξαιρετικά τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς και τα ψάρια (USEPA, 2006). Στα φυτά, παραμένει στην

επιφάνεια και στους εξωτερικούς ιστούς (Chavarri, *et al.* 2005), (Rasmussen, *et al.* 2003) και ο χρόνος ημιζωής του κυμαίνεται από 0,7 έως 8,0 ημέρες (Battu, *et al.* 2009), (Sadlo *et al.* 2014).

Σε απλή άμμο, σε περιβαλλοντικούς θαλάμους με 27°C, δείχνει μέτρια εμμονή με την συγκέντρωση να πέφτει κατά 50% σε δυόμιση εβδομάδες και στο 6% σε 48 εβδομάδες (Harris, *et al.* 1981), ενώ σε πηλώδη εδάφη πέφτει στο 50% σε 2-3 εβδομάδες (Roberts and Standen 1977). Επιπλέον, σε συνθήκες εργαστηρίου, 20°C, και αερόβιες συνθήκες το DT₅₀ του *a*-cypermethrin είναι κατά μέσο όρο 103 μέρες, ενώ σε αναερόβιες 31 μέρες. Σε μελέτες σε αγρούς όπου ήταν διαλυμένο στο έδαφος το DT₅₀ ήταν κατά μέσο όρο 35 μέρες. Η συμπεριφορά του στο νερό εξαρτάται από το pH και την θερμοκρασία κατά την αβιοτική διάσπασή του, pH= 4, 50 °C , pH=7, 20°C, pH=9, 20°C και τα DT₅₀ ήταν, άγνωστο καθώς δεν υπήρχε διάσπαση μετά την 10η μέρα, 101 μέρες και 7,3 μέρες αντίστοιχα. Όταν υπήρχε και βιολογική διάσπαση, το DT₅₀ ήταν 0,4 - 2,1 μέρες (EU pesticides database, 2004).

1.4.5 Τοξικότητα *a*-cypermethrin:

Το *a*-cypermethrin δρα στο νευρικό σύστημα με το να κρατάει ανοιχτά τα κανάλια νατρίου στην μεμβράνη, και συνεπώς προκαλείται συνεχής εκπόλωση της μεμβράνης και αποκλεισμός της παραγωγής δυναμικών δράσης (Chrustek *et al.* 2018). Τα συμπτώματα που μπορεί να προκαλέσει στον άνθρωπο ύστερα από έκθεση είτε σε μεγάλη συγκέντρωση είτε για μεγάλο χρονικό διάστημα, είναι ναυτία, εμετός, διάρροια, ερεθισμοί του βλεννογόνου, σιελόρροια, διαταραχή κινητικού συντονισμού, χορεία, αδράνεια, τρέμουλο και κλονικές κρίσεις (Bradberry *et al.* 2005), (C. Costa *et al.* 2013).

Κάποιες έρευνες έδειξαν πως ανάλογα με τον τρόπο εισχώρησης στον οργανισμό διαφέρει και η τοξικότητά του. Μέσω στόματος σε αρουραίους το LD₅₀ είναι 150 έως 500 mg / kg και μέσω επαφής με το δέρμα για 48 ώρες σε κουνέλια 2000 mg / kg (El-Okda *et al.* 2017). Παρόμοια αποτελέσματα έφερε και μία ακόμα έρευνα σε αρουραίους όπου το LD₅₀, μέσω στόματος, υπολογίστηκε στα 145mg/kg (D Bhattacharyya 2004). Το LD₅₀ του *a*-cypermethrin με κατανάλωση από το στόμα διαλυμένο σε καλαμποκέλαιο υπολογίστηκε στα 57mg/kg, με επαφή με το δέρμα πάνω από 2000 mg/kg και μέσω

εισπνοής LC50 = 0,6mg/L (EU Pesticides Database 2004), ενώ στο Pesticide Properties Database (PPDB) δίνεται LD50 40mg/kg από το στόμα, με επαφή στο δέρμα 2000mg/kg, και μέσω εισπνοής LC50 = 1,33mg/L (Lewis *et al.* 2016). Επίσης έχει βρεθεί πως σε υψηλές συγκεντρώσεις, μειώνει την αναπαραγωγική ικανότητα και γονιμότητα σε αρσενικούς αρουραίους μέσω κατανάλωσης νερού που περιείχε α -cypermethrin (Elbetieha *et al.* 2001).

Δεν είναι γνωστό αν είναι καρκινογόνο, ενδοκρινικός διαταράκτης, αν εμπλέκεται σε καταστροφή του DNA και αν είναι μεταλλαξιγόνο. Είναι γνωστό πως δεν είναι ερεθιστικό ματιών, δεν ευθύνεται για χρωμοσωμικές ανωμαλίες και δεν προκαλεί μεταλλάξεις σε γονίδια. Είναι ερεθιστικό για το δέρμα και υπεύθυνο για προβλήματα αναπνευστικού, για προβλήματα στο γαστρεντερικό, καθώς και για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή (Lewis *et al.* 2016). Επίσης το μεγαλύτερο πρόβλημα δημιουργείται σε υδάτινα περιβάλλοντα παρ' όλο που δεν είναι υδατοδιαλυτό, όπως υποστηρίζεται από (Maund *et al.*, 1997), (Willis and Ling 2004), (Ansari *et al.* 2011), που μελετούν διάφορους οργανισμούς που ζουν είτε σε γλυκό είτε σε θαλασσινό νερό και είναι πολύ τοξικό για αυτούς. Καθώς λοιπόν αποτελεί κίνδυνο και για τα θηλαστικά αλλά και γενικότερα για το περιβάλλον, είναι σημαντική η εύρεση μικροοργανισμών που να το διασπούν.

1.4.6 Μικροβιακή διάσπαση α -cypermethrin:

Η μικροβιακή αποδόμηση του α -cypermethrin έχει μελετηθεί εκτενώς, καθώς μικροοργανισμοί που το διασπούν είναι σημαντικό να βρεθούν, επειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν υπό τις κατάλληλες συνθήκες σε βιολογική αποκατάσταση. Παρακάτω παρουσιάζονται μικροοργανισμοί που έχουν βρεθεί να διασπούν το α -cypermethrin, από διάφορες πηγές εδάφους, σε υγρές καλλιέργειες μέχρι το 2016 (Cysoń and Piotrowska-Seget 2016). Σε μελέτη με πηγή έδαφος με ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών στο Πακιστάν, υπήρχε 84,7% διάσπαση του γεωργικού φαρμάκου σε 10 ημέρες από το βακτήριο *Acinetobacter calcoaceticus* MCm5 (Akbar, *et al.* 2015). Από λάσπη στην Ινδία απομονώθηκε το βακτήριο *Bacillus* sp. AKD1, και υπήρχε 86% αποδόμηση σε 7 ημέρες (Tiwarý and Dubey 2016). Σε μελέτη με πηγή ένα σύστημα επεξεργασίας λυμάτων από

εργοστάσιο παρασκευής πυρεθροειδών στην Κίνα απομονώθηκε το βακτήριο *Bacillus* sp. DG-02 και υπήρχε 89,2% διάσπαση σε 3 ημέρες (S. Chen, Hu, et al. 2012).

Από απόβλητα πολτού και λάσπη στην Ινδία απομονώθηκε το βακτήριο *Bacillus* sp. ISTDS2 και υπήρχε σχεδόν πλήρης αποδόμηση του α -cypermethrin σε 7 ημέρες (Sundaram, et al. 2013). Σε μελέτη με πηγή ρυπασμένο έδαφος στην Ινδία απομονώθηκε το βακτήριο *Bacillus* sp. SG2 που είχε την ικανότητα να αποδομεί το 82% της αρχικής ποσότητας α -cypermethrin σε 15 μέρες (Pankaj et al. 2016). Από ρυπασμένο έδαφος στη Κορέα απομονώθηκε το βακτήριο *Bacillus amyloliquefaciens* AP01 και υπήρχε 45% αποδόμηση σε 5 ημέρες (Lee et al. 2016). Σε μελέτη από ενεργοποιημένη λάσπη στην Κίνα απομονώθηκε το βακτήριο *Bacillus cereus* ZH-3 και υπήρχε 78,4% αποδόμηση σε 3 ημέρες (S. Chen, Luo, et al. 2012). Από έδαφος καλλιέργειας τσαγιού στην Κίνα απομονώθηκε το βακτήριο *Bacillus licheniformis* B-1 και υπήρχε 50% αποδόμηση σε 3 ημέρες (Liu et al. 2014). Σε μελέτη από ρυπασμένο έδαφος στο Πακιστάν, υπήρχε 89% αποδόμηση σε 10 μέρες από το βακτήριο *Bacillus megaterium* JCM2, επίσης υπήρχε 28% αποδόμηση σε 10 μέρες από το βακτήριο *Brevibacillus parabrevis* JCM4 (Akbar et al. 2015b).

Από επιβαρυμμένο έδαφος στο Πακιστάν απομονώθηκε το βακτήριο *Brevibacillus parabrevis* FCm9 και υπήρχε 95% αποδόμηση σε 10 μέρες (Akbar et al. 2015a). Σε μελέτη από έδαφος με ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών στην Κίνα απομονώθηκε το βακτήριο *Catellibacterium* sp. CC-5 και υπήρχε 90% αποδόμηση σε 7 ημέρες (Zhao et al. 2013). Από έδαφος ρυπασμένο με γεωργικά φάρμακα στην Ινδία απομονώθηκε το βακτήριο *Micrococcus* sp. CPN 1 και υπήρχε αποδόμηση 90% σε 8 ημέρες (Tallur et al. 2008). Από ρυπασμένο έδαφος στο Πακιστάν απομονώθηκε το βακτήριο *Ochrobactrum anthropi* JCM1 και υπήρχε αποδόμηση 91% σε 10 μέρες, το βακτήριο *Ochrobactrum haematophilum* JCM7 στο οποίο υπήρχε 78% αποδόμηση σε 10 ημέρες, το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* JCM8 το οποίο κατάφερε 46% αποδόμηση του cypermethrin σε 10 ημέρες, και το βακτήριο *Rhodococcus* sp. JCM5 για το οποίο υπήρχε 100% αποδόμηση σε 10 ημέρες (Akbar et al. 2015b).

Σε μελέτη από έδαφος ρυπασμένο με συνθετικά πυρεθροειδή από χημικό εργοστάσιο στην Κίνα απομονώθηκε το βακτήριο *Ochrobactrum tritici* pyd-1 και υπήρχε

100% αποδόμηση σε 6 ημέρες (Wang *et al.* 2011). Σε μελέτη από έδαφος ρυπασμένο με πυρεθροειδή στο Ηνωμένο Βασίλειο απομονώθηκε το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* και υπήρχε αποδόμηση 37,2% σε 4 ημέρες, και το βακτήριο *Serratia sp.* (*Serratia plymuthica*) που είχε την ικανότητα να αποδομεί 34,2% της αρχικής συγκέντρωσης cypermethrin σε 4 ημέρες (Grant *et al.* 2002), (Grant and Betts 2004). Από έδαφος με ιστορικό χρήσης cypermethrin απομονώθηκε το βακτήριο *Serratia nematodiphila* CB2 και υπήρχε αποδόμηση 98% σε 7 ημέρες (Tyagi *et al.* 2015). Σε μελέτη με πηγή λάσπη από σύστημα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων στην Κίνα απομονώθηκε το βακτήριο *Sphingobium sp.* JZ-2 και υπήρχε αποδόμηση 90% σε 5 ημέρες (Guo *et al.* 2009). Από έδαφος με ιστορικό χρήσης deltamethrin απομονώθηκε το βακτήριο *Sphingomonas sp.* RCm6, και υπήρχε 92% αποδόμηση του cypermethrin σε 10 ημέρες (Akbar *et al.* 2015a).

Σε μελέτη από λάσπη υγρών αποβλήτων στην Κίνα απομονώθηκε το βακτήριο *Streptomyces sp.* HU-S-01, και υπήρχε αποδόμηση 90% σε 1 ημέρα (Lin *et al.* 2011). Συγκεντρωτικά, παρατηρείται λοιπόν, πως βακτήρια του γένους *Bacillus* είναι ιδιαίτερα μεταβολικά ενεργά, καθώς μέσα στο διάστημα μερικών ημερών διασπούσαν σχεδόν όλη την ποσότητα του cypermethrin, με εξαίρεση το *Bacillus amyloliquefaciens* AP01. Επίσης πολύ ενεργά ήταν και τα *Ochrobactrum anthropi* JCM1 (Akbar *et al.* 2015b), *Ochrobactrum tritici* pyd-1 (Wang *et al.* 2011), *Serratia nematodiphila* CB2 (Tyagi *et al.* 2015) και *Rhodococcus sp.* JCM5 (Akbar *et al.* 2015b) που αποδομούσαν παραπάνω από το 90% της αρχικής δόσης του cypermethrin (100 mg / L) εντός 5-10 ημερών. Συνεπώς έχει μελετηθεί ένας σημαντικός αριθμός μικροοργανισμών που αποδομούν το α-cypermethrin.

1.5 Σκοπός του πειράματος:

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να γίνει προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών με ικανότητα αποδόμησης του πυρεθροειδούς εντομοκτόνου *α-cypermethrin* από έδαφος με ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών (*deltamethrin*). Μακροπρόθεσμα τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποδόμηση του *α-cypermethrin* θα χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή κατάλληλου καθαριστικού προϊόντος απομάκρυνσης υπολειμμάτων του εντομοκτόνου από φρούτα και λαχανικά που έχουν δεχτεί εφαρμογή του *α-cypermethrin*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. Μέθοδοι και υλικά:

2.1 Δείγμα εδάφους:

Το δείγμα εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μικροοργανισμών που αποδομούν το *a-cypermethrin* συλλέχθηκε από καλλιεργούμενο αγρό της Ημαθίας με επιβαρυσμένο ιστορικό χρήσης του εντομοκτόνου *a-cypermethrin* αλλά και άλλων συνθετικών πυρεθροειδών (*deltamethrin*) για μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.1.1 Προσδιορισμός υγρασίας των εδαφών:

Ο προσδιορισμός της περιεχόμενης υγρασίας των εδαφών βασίστηκε στην ξήρανση των εδαφών και την μείωση του βάρους τους. Συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν $5 \pm 0.01\text{g}$ εδάφους, όπου και μεταφέρθηκαν σε ζυγισμένο δοχείο από αλουμίνιο (γνωστού βάρους). Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Στη συνέχεια έγινε καταγραφή του βάρους. Ακολούθησε ξήρανση σε προθερμασμένο φούρνο (LabLine) στους 105°C για 24 ώρες. Τέλος, επαναλήφθηκε ζύγιση των εδαφών με τον προσδιορισμό της υγρασίας να δίνεται από τον τύπο:

$$MC = [(W1 - W2) * 100\%] / (W2 - W_{cont})$$

MC: η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους

W1: το βάρος του δοχείου με το έδαφος πριν την ξήρανση

W2: το βάρος του δοχείου με το έδαφος μετά την ξήρανση

Wcont: το βάρος του δοχείου.

2.1.2 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών:

Ο προσδιορισμός υδατοχωρητικότητας των εδαφών πραγματοποιήθηκε βαρυμετρικά. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 ml, στα στόμια των οποίων τοποθετήθηκαν γυάλινα χωνιά εσωτερικά των οποίων τοποθετήθηκε

διηθητικό χαρτί (Whatman No1). Το χαρτί διαβράχθηκε με νερό, ώστε οποιαδήποτε ποσότητα υγρασίας κατακρατήσει να μην σχετίζεται με την υγρασία των δειγμάτων. Ακολούθησε η προσθήκη 10gr εδάφους (δύο επαναλήψεις για κάθε δείγμα). Το έδαφος με το διηθητικό και το χωνί ζυγίστηκε και καταγράφηκε (W1). Σειρά είχε η εμπότιση των εδαφών με απεσταγμένο νερό, με σκοπό τον κορεσμό σε υγρασία. Για την αποφυγή απώλειας νερού λόγω εξάτμισης, τα χωνιά καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο. Το έδαφος αφέθηκε σε ηρεμία 12-14 ώρες, ούτως ώστε να απομακρυνθεί στην κωνική φιάλη η περίσσεια του νερού. Το βάρος του χωνιού, με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος καταγράφηκε και μετά την κατάκλιση (W2). Ακολούθως, η υδατοχωρητικότητα προσδιορίστηκε βάσει του τύπου:

$$WHC = (B - X) + (W_2 - W_1) / X * 100\%$$

WHC: η υδατοχωρητικότητα του εδάφους

B: το βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

X: το ξηρό βάρος εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

W₁: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, πριν την κατάκλιση W₂: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, μετά την κατάκλιση

2.2 Παρασκευή υγρών και στερεών θρεπτικών μέσων (MSMN - SEM):

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των μικροοργανισμών με ικανότητα αποδόμησης του γεωργικού φαρμάκου *a* - cypermethrin, ήταν ένα υπόστρωμα εκλεκτικό και φτωχό σε θρεπτικά συστατικά MSMN+N (Mineral Salts Medium supplemented with Nitrogen) και ένα εκχύλισμα εδάφους SME (Soil medium extract). Οι συνταγές παρασκευής των εν λόγω θρεπτικών αναφέρονται παρακάτω:

Παρασκευή θρεπτικού μέσου MSM+N:

MSMN, θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων εμπλουτισμένο με άζωτο: Το υπόστρωμα MSMN παρέχει στους μικροοργανισμούς όλα τα απαραίτητα θρεπτικά

μακροστοιχεία με τη μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N) ενώ την πηγή άνθρακα προσφέρει το α -cypermethrin. Το θρεπτικό διάλυμα MSMN παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα (stock), τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες και έδωσαν το τελικό MSMN. Τα stock 1 και 2 προετοιμάστηκαν σε γυάλινες φυάλες τύπου Duran με διάλυση των συστατικών τους σε απεσταγμένο νερό (πίνακας 1) και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C υπό πίεση 1,2 atm για 25 min. Το stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση με φίλτρα σύριγγας 0,22 μ m υπό ασηπτικές συνθήκες επειδή ο FeSO₄ είναι θερμοευαίσθητος. Για την προετοιμασία 1000ml MSMN, 100ml από το stock 1 διαλύθηκαν σε 780ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε εκ νέου. Μόλις το διάλυμα έφτασε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες 100ml stock 2 και 20ml stock 3 και το θρεπτικό αποθηκεύτηκε στους 4 οC μέχρι τη χρήση του. Για την προετοιμασία στερεού υποστρώματος MSM+N σε τριβλία, έγινε προσθήκη 1.5% άγαρ στο stock 1 πριν την αποστείρωση στη συνέχεια ακολουθήθηκε όλη η διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω και στο τέλος υπό ασηπτικές συνθήκες το θρεπτικό μέσω επιστρώθηκε σε τριβλία.

Πίνακας 1 Συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή των stock MSM+N

Συστατικά στοιχεία για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος MSM+N	Συστατικά	g/L
Stock1	KH ₂ PO ₄	22,7
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	59,7
	NH ₄ Cl	10
Stock2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,15
Stock3	FeSO ₄	0,46

Παρασκευή θρεπτικού μέσου SEM

Για την παρασκευή και προετοιμασία 1 L θρεπτικού υποστρώματος SEM, αναμίχθηκαν 500 g εδάφους με 1 L απιονισμένο νερό. Το μίγμα αναδεύτηκε καλά και στη συνέχεια αποστειρώθηκε στους 121°C υπό πίεση 1,2 atm για 25 min. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στις 7500 rpm στους 20°C για 5 min και το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης διηθήθηκε με διηθητικό χαρτί και αποστειρώθηκε ξανά στους 121°C υπό πίεση 1,2 atm για 25 min και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους 4°C μέχρι τη χρήση του. Για την προετοιμασία στερεού υποστρώματος SEM σε τριβλία, έγινε προσθήκη 1.5% άγαρ πριν την δεύτερη αποστείρωση του μέσου και στη συνέχεια επιστρώθηκε σε τριβλία.

Παρασκευή θρεπτικών μέσων με προσθήκη α – cypermethrin

Για την προετοιμασία των θρεπτικών μέσων MSM+N + α -cypermethrin και SEM + α -cypermethrin συγκέντρωσης 10 mg/L, αρχικά παρασκευάστηκε ένα αρχικό διάλυμα α – cypermethrin (καθαρότητας <98%) συγκέντρωσης 10000 mg/L σε DMSO, το οποίο στη συνέχεια αποστειρώθηκε με διήθηση με φίλτρα σύριγγας 0,22 μ m υπό ασηπτικές συνθήκες. Έπειτα, κατά την προετοιμασία των παραπάνω θρεπτικών μέσων, κατάλληλη ποσότητα νερού αφαιρέθηκε από τα μέσα, ώστε να προστεθεί η ίδια ποσότητα διαλύματος α – cypermethrin συγκέντρωσης 10000 mg/L και την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης.

2.3 Καμπύλη αναφοράς:

Αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα α -cypermethrin συγκέντρωσης 1000 μ g/mL και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις σε μεθανόλη ώστε να προετοιμαστούν πρότυπα διαλύματα α -cypermethrin σε μεθανόλη με τελικές συγκεντρώσεις 100, 10, 5, 2, 1, 0,5 και 0,1 μ g/mL. Από την κάθε συγκέντρωση έγινε έγχυση 20 μ l στο σύστημα HPLC (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης) και το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του α -cypermethrin ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

2.4 Μέθοδος ανάλυσης HPLC του *a*-cypermethrin:

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του *a*-cypermethrin 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 μ L και ανιχνευτή UV, ενώ ήταν συνδεδεμένο με ανάλογο λογισμικό Clarity για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Ο διαχωρισμός του *a*-cypermethrin και των υπολοίπων ουσιών πραγματοποιήθηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης Athena C18, (120 A, 4.6 x 150 mm, 5 μ m) με κινητή φάση 90% ACN: 10% ddH₂O και ροή 1 mL/min. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των δειγμάτων που πάρθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος, πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών που προέκυψαν στα 210nm, με χρόνο κατακράτησης 4,2min και με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης στο λογισμικό Clarity.

2.5 Μέθοδος εκχύλισης του *a* – cypermethrin από έδαφος και υγρές καλλιέργειες

2.5.1 Εκχύλιση από το έδαφος:

Για την εκχύλιση του γεωργικού φαρμάκου από τα εδαφικά δείγματα, 5 g εδάφους ζυγίστηκαν σε φιαλίδιο Teflon και αναμίχθηκαν με 5 ml μεθανόλη. Τα φιαλίδια Teflon ανακινήθηκαν για 1 λεπτό σε vortex (3000 rpm) και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε μπανάκι υπερήχων (sonicator bath) για 5 min. Έπειτα, έγινε ανακίνηση ξανά στα φιαλίδια Teflon για 1 λεπτό σε vortex (3000 rpm), τοποθετήθηκαν για φυγοκέντρωση στα 7000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και συλλέχτηκαν 2 ml από το υπερκείμενο σε γυάλινο φιαλίδιο (scintillation bottle). Τέλος, στο υπερκείμενο έγινε φιλτράρισμα με φίλτρα σύριγγας 0.45 μ m και μεμβράνης PTFE και τοποθετήθηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυση τους.

2.5.2 Εκχύλιση από τις υγρές καλλιέργειες

Η μέθοδος εκχύλισης του γεωργικού φαρμάκου *a*-cypermethrin από τις υγρές καλλιέργειες των θρεπτικών μέσων έγινε με την παραλαβή 1 ml καλλιέργειας και την

ανάμιξή της με 2 ml μεθανόλης σε γυάλινο φιαλίδιο (scintillation bottle). Στη συνέχεια σε όλο το εκχύλισμα από το φιαλίδιο έγινε φιλτράρισμα με φίλτρο σύριγγας 0.45 μm και μεμβράνης PTFE και τα δείγματα τοποθετήθηκαν για αποθήκευση στους -20°C μέχρι την ανάλυση τους. Όλα τα σκεύη ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν γυάλινα διότι το *a-cypermethrin* προσκολλάται σε αυτά.

2.5.3 Επιβεβαίωση αποτελεσματικότητας μεθόδου εκχύλισης από έδαφος και υγρές καλλιέργειες:

Προς επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας (ακρίβεια και επαναληψιμότητα) της κάθε μεθόδου εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης για το *a-cypermethrin*, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις των 0,05 mg/Kg, 0,5 mg/Kg και 1mg/Kg σε ένα τυχαίο έδαφος (χωρίς ιστορικό χρήσης τους εν λόγω γεωργικού φαρμάκου) και των 0,05 mg/L, 0,5 mg/L και 1mg/L στα θρεπτικά μέσα MSMN και SEM.. Οι μέθοδοι εκχύλισης που αναπτύχθηκαν κρίθηκαν ικανοποιητικές καθώς τα επίπεδα ανάκτησης σε κάθε περίπτωση ήταν > 80%.

2.6 Αποστείρωση εδάφους με υποκαπνισμό

Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση τυχόν μικροοργανισμών με ικανότητα αποδόμησης του *a-cypermethrin*, τοποθετήθηκε σε γάζες και μεταφέρθηκε σε γυάλινο ξηραντήρα (Εικόνα 3). Συγκεκριμένα, στον κάτω μέρος του ξηραντήρα υπήρχε χλωροφόρμιο και στη συνέχεια έκλεισε αεροστεγώς. Το έδαφος διατηρήθηκε υπό κενό εντός του ξηραντήρα για επτά ημέρες και ακολούθησε επώασή του για πέντε ημέρες στους 25°C, ώστε να αναπτυχθούν μικροοργανισμοί που τυχόν διέφυγαν του πρώτου καπνισμού. Η διαδικασία με το χλωροφόρμιο επαναλήφθηκε για άλλες επτά ημέρες, με στόχο την εξάλειψη των μικροοργανισμών που επιβίωσαν του πρώτου καπνισμού και αναπτύχθηκαν κατά την ενδιάμεση περίοδο επώασης. Το αποστειρωμένο, πλέον, έδαφος μεταχειρίστηκε όπως και το μη αποστειρωμένο όπως θα αναφερθεί παρακάτω.



Εικόνα 3 Ξηραντήρας που χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση με χλωροφόρμιο

2.7 Περιγραφή πειράματος

2.7.1 Πείραμα εδάφους:

Το στάδιο αυτό έγινε για την ενίσχυση και προσαρμογή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (με ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών γεωργικών φαρμάκων, deltamethrin) στην αποδόμηση του *a*-cypermethrin. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν 500 g από το έδαφος που αναφέρθηκε παραπάνω, στο οποίο έγινε εφαρμογή κατάλληλης ποσότητας αρχικού υδατικού διαλύματος *a*-cypermethrin, ώστε η τελική συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου να είναι 10 mg/Kg. Παράλληλα, έγινε προσαρμογή της υγρασίας στο 35% της υδατοχωρητικότητας του εδάφους. Για την μελέτη της αβιοτικής διάσπασης του *a*-cypermethrin, δείγμα εδάφους 500 g που αποστειρώθηκε με καπνισμό με χλωροφόρμιο όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (control) με την συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου και την υγρασία να ίδια με αυτή με το δείγμα παραπάνω. Τα δείγματα εδάφους μετά την εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου τοποθετήθηκαν σε μη αναδευόμενο επωαστικό

θάλαμο στους 25°C και η υγρασία διατηρήθηκε στο επίπεδο του 35% της υδατοχωρητικότητας με προσθήκες νερού όποτε απαιτήθηκε. Επίσης, για την παρακολούθηση της διάσπασης του *a*-cypermethrin στα παραπάνω δείγματα, δείγματα προς ανάλυση σε σύστημα HPLC, πάρθηκαν κάθε 3, 4, 7, 10 και 14 μέρες μετά την εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου. Τέλος, στο μη αποστειρωμένο δείγμα εδάφους, όταν η διάσπαση του *a*-cypermethrin έφτανε περίπου στο 40% της αρχικής ουσίας που εφαρμόστηκε, ένας δεύτερος κύκλος εφαρμογής του *a*-cypermethrin γινόταν ώστε να γίνει περαιτέρω ενίσχυση την αποδομητικής ικανότητας της μικροβιακής κοινότητας του προς μελέτη εδάφους. Μετά τον τρίτο κύκλο εφαρμογής του *a*-cypermethrin στο μη αποστειρωμένο έδαφος, μέρος αυτού χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των εμπλουτισμένων υγρών καλλιεργειών που θα αναφερθούν παρακάτω.

2.7.2 Πείραμα εμπλουτισμένων καλλιεργειών

Στην συνέχεια, για την απομόνωση των εν δυνάμει μικροοργανισμών που διασπούν το *a*-cypermethrin πραγματοποιήθηκαν πειράματα εμπλουτισμένων καλλιεργειών στα θρεπτικά μέσα SEM και MSM+N με *a*-cypermethrin. Συγκεκριμένα, σε θάλαμο νηματικής ροής, σε γυάλινες αποστειρωμένες κωνικές των 100 ml τοποθετήθηκε 30 ml θρεπτικό μέσο (SEM ή MSM+N) και προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος *a*-cypermethrin (10000 mg/L) σε DMSO, ώστε η τελική συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου να φτάσει στα 10 mg/L. Η κάθε καλλιέργεια στη συνέχεια εμβολιάστηκε με 1.5 g μη αποστειρωμένου εδάφους μετά το πέρας του πειράματος ενίσχυσης της αποδομητικής ικανότητας της μικροβιακής κοινότητας και τοποθετήθηκαν για επώαση με ανάδευση (25°C, 160 rpm). Δείγματα μάρτυρες με καλλιέργειες χωρίς τον εμβολιασμό τους από έδαφος, αλλά με την προσθήκη του *a*-cypermethrin τελικής συγκέντρωσης 10 mg/L, χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση της αβιοτικής διάσπασης του γεωργικού φαρμάκου κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Σε όλες τις περιπτώσεις ετοιμάστηκαν 3 επαναλήψεις καλλιεργειών για την μετέπειτα στατιστική ανάλυση.

Κατά τη διάρκεια της επώασης των καλλιεργειών, ανά τακτά χρονικά διαστήματα δείγματα πάρθηκαν δείγματα (0, 7 και 14 μέρες) και αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC για την αποδόμηση του *a*-cypermethrin. Όταν η συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου έφτανε στο 40% περίπου της αρχικής συγκέντρωσης που εφαρμόστηκε, ένας δεύτερος

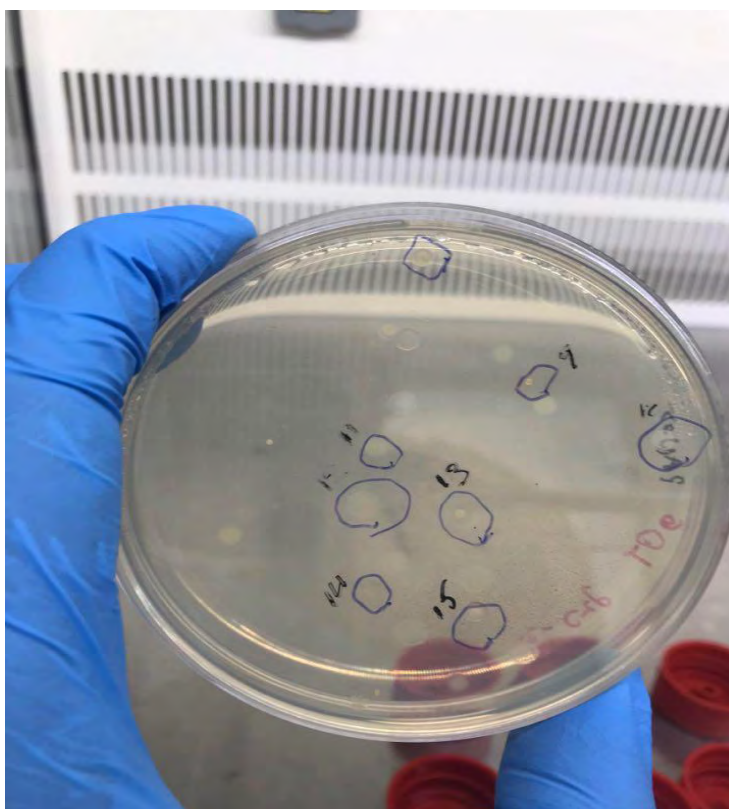
κύκλος ανακαλλιέργειας πραγματοποιούνταν. Έτσι για κάθε θετικό δείγμα με διάσπαση, 1 ml από την καλλιέργεια αυτή παίρνονταν και τοποθετούνταν σε νέα αποστειρωμένη κωνική φιάλη με 20 ml νέου θρεπτικού μέσου. Παράλληλα, κατάλληλη ποσότητα αρχικού διαλύματος *a-cypermethrin* (10000 mg/L σε DMSO) προσθέτονταν στις καλλιέργειες ώστε η τελική συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου να φτάσει στα 10 mg/L. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για άλλους 3 κύκλους από την αρχική εφαρμογή του εδάφους στις καλλιέργειες, ώστε να αυξήσουμε την αποδομητική ικανότητα της μικροβιακής κοινότητας στο *a-cypermethrin*.

2.8 Απομόνωση αποικιών από τριβλία

Το επόμενο στάδιο του πειράματος ήταν η επιλογή αποικιών βακτηρίων που είχαν την ικανότητα να αποδομούν το *a-cypermethrin*. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν τριβλία άγαρ με SEM + *a-cypermethrin* (10 mg/L) όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τριβλία MSM+N + *a-cypermethrin* δεν χρησιμοποιήθηκαν διότι στο στάδιο των εμπλουτισμένων καλλιεργειών δεν καταγράφηκε σημαντική αποδόμηση του εντομοκτόνου στο συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο. Με το τέλος του 4ου κύκλου ανακαλλιεργειών και με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων επιστρώθηκαν τριβλία για την αναγνώριση πιθανών αμιγών αποικιών με καταβολικές ικανότητες. Συγκεκριμένα σε αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon προστέθηκαν 9ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού και στο πρώτο φιαλίδιο προστέθηκε 1 ml καλλιέργειας για να δημιουργηθεί η αραιώση 1:10. Διαδοχικά στη συνέχεια 1ml πάρθηκε από το προηγούμενο falcon στο επόμενο ώστε να προκύψουν οι υπόλοιπες αραιώσεις (10^2 , 10^3 , 10^4 και 10^5). Έπειτα επιστρώθηκαν δύο τριβλία για κάθε αραιώση των 10^4 , 10^5 , 10^6 και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C μέχρι την εμφάνιση αποικιών.

Αφού αναπτύχθηκαν εμφανείς αποικίες (Εικόνα 4) στα τριβλία, 15 αποικίες πάρθηκαν από τα τριβλία των αραιώσεων 10^6 και 10^5 και εμβολιάστηκαν σε γυάλινα αποστειρωμένα μπουκάλια, τα οποία περιείχαν 5ml SEM + *a-cypermethrin* (10mg/L), έτσι ώστε να ελεγχθεί ποιες από αυτές τις αποικίες είχε ικανότητα αποδόμησης του *a-cypermethrin*. Επίσης, παρασκευάστηκαν και 2 δείγματα μάρτυρα με 5ml SEM+*a-cypermethrin* χωρίς τον εμβολιασμό με κάποιον μικροοργανισμό, για τον έλεγχο της αβιοτικής διάσπασης του γεωργικού φαρμάκου κατά τη διάρκεια των πειραμάτων

αυτών. Ακολούθησε επώαση σε επωαστικό θάλαμο με ανάδευση για 7 ημέρες (25°C, 160 rpm) , έγινε εκχύλιση του α -cypermethrin με την μέθοδο που περιγράφεται σε παραπάνω ενότητα, και μετρήθηκε η συγκέντρωση του φαρμάκου σε κάθε υγρή καλλιέργεια σε σύστημα HPLC. Τέλος, ακολούθησε η αναγνώριση της αποικίας που ευθυνόταν για την αποδόμηση του φαρμάκου στην αποικία 14.



Εικόνα 4. Στην εικόνα φαίνεται η ανάπτυξη των αμιγών αποικιών σε τριβλίο SEM+ α cypermethrin.

2.9 Απομόνωση ολικού γενωμικού DNA από καλλιέργειες βακτηρίων:

Μετά την αναγνώριση της μοναδικής αποικίας με ικανότητα αποδόμησης του γεωργικού φαρμάκου α -cypermethrin ακολούθησε εξαγωγή ολικού DNA από τις βακτηριακές καλλιέργειες με τη χρήση του εμπορικού κιτ 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 αγαρόζης συγκέντρωσης 1% (0,6 g αγαρόζης σε 60 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.

2.10 Κλωνοποίηση και αποστολή για αλληλούχιση:

Στην συνέχεια των πειραμάτων ακολούθησε ενίσχυση με την μέθοδο της PCR, τμήματος του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων χρησιμοποιώντας ως μήτρα το ολικό DNA που απομονώθηκε από τις αμιγείς καλλιέργειες. Οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων (πίνακας 2) για την ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων ήταν έτσι σχεδιασμένοι ώστε να ενισχύουν ένα τμήμα μεγέθους 1024bp.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα. Τα προϊόντα ενίσχυσης της αντίδρασης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,0% (0.6g αγαρόζη σε 60 mL TAE 1x) και 2 μL βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 5 μl DNA αναμεμειγμένα με 1 μL loading buffer 6x. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές σε τράπεζα οπτικοποίησης UV.

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων

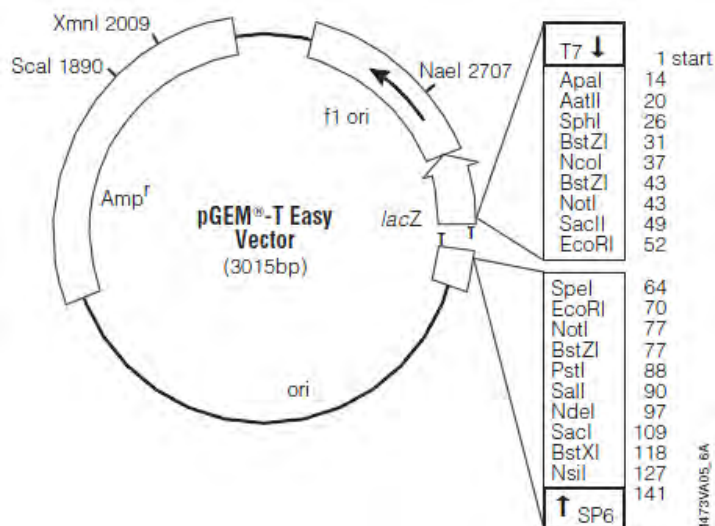
Εκκινητής	Αλληλουχία
63f	5' – CAA GAA CTC AAA TCC ATC TAC CTT GCC – 3' 5' – ATC CTT CCC TCG GAA TGA ATC GTC TCG – 3'
1087r	5' – GAT GAT CCG TCA CAT AAG AGG – 3' 5' – GCA GTT GAG CAG ATG ATA CC – 3'

Πίνακας 3 Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση PCR του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x)	2,5 μ L	1x (1.5 mM MgCl ₂)
dNTPs (10 mM)	0,4 μ L	200 μ M από το καθένα
Εμπρόσθιος εκκινητής (20 pmol/ μ L)	0,4 μ L	0,2 μ M
Ανάστροφος εκκινητής (20 pmol/ μ L)	0,4 μ L	0,2 μ M
Κατα Taq πολυμεράση (1U/ μ L)	0,08 μ L	1U/25 μ L
DNA	1 μ L	1 ng
BSA (20 μ g/ μ L)	0,4 μ L	400 ng/ μ L
ddH ₂ O	18,9 μ L	
Συνολικός όγκος	20 μL	

2.11 Ένθεση του γονιδίου 16S rRNA σε πλασμιδιακό φορέα:

Με βάση την συγκέντρωση του προϊόντος του PCR που αναφέρθηκε στην παραπάνω παράγραφο και τον τύπο $[25 \text{ ng φορέα} \times 2,0 \text{ kb (μήκος DNA)} / 3] \times (3 / 1)$ υπολογίστηκε η ποσότητα DNA του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση ένθεσης σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα pGEM[®]-T easy (Promega) (Εικόνα 5). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση ένθεσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων τα δείγματα επωάστηκαν στους 4°C για 16 h.



Εικόνα 5 Γενετικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy. Τα βέλη δείχνουν τη φορά έκφρασης γονιδίων.

Πίνακας 4 Αντίδραση ένθεσης του γονιδίου *cehA* σε πλασμιδιακό φορέα.

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

2.12 Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. Coli*

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

- Σε αποστειρωμένα erpendorfs μεταφέρθηκαν 2 μ L ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και προστέθηκαν 80 μ L δεκτικών κυττάρων. Τα erpendorfs τοποθετήθηκαν για 30min στον πάγο.
- Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν για 45 sec στους 42°C και τοποθετήθηκαν αμέσως για 2min σε πάγο.
- Προστέθηκαν 200 μ L LB υπό ασηπτικές συνθήκες και τα δείγματα επώαστηκαν για 50min 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 τριβλία LB + Ampicillin και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 16 h.

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε επιλογή των θετικών κλώνων (λευκών αποικιών) από κάθε τριβλίο 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. Με την ολοκλήρωση της επώασης των παραπάνω κλώνων, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του εμπορικού κιτ 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. Τέλος το πλασμιδιακό DNA των κλώνων απεστάλη για αλληλούχιση του ενθέματος στην εταιρία Cemia.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. Αποτελέσματα

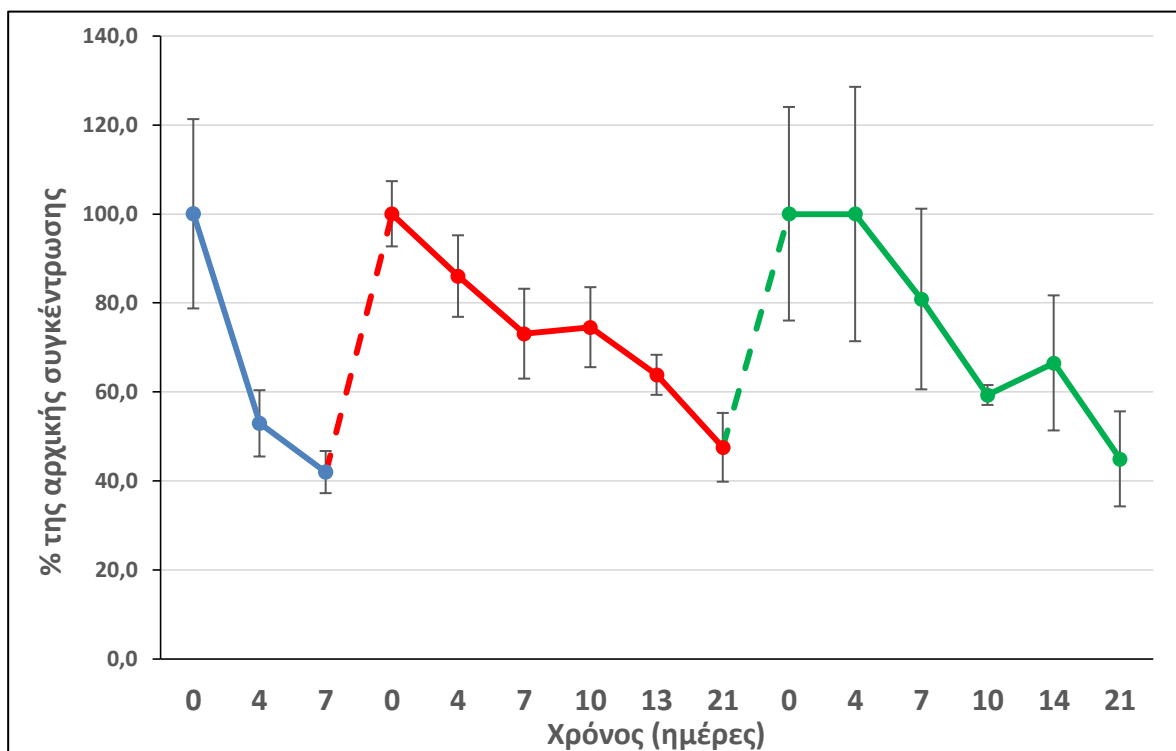
Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 4 βασικούς ερευνητικούς άξονες που αφορούσαν (α) τα αρχικά πειράματα εφαρμογής του εντομοκτόνου *a-cypermethrin* σε έδαφος με ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών όπως τα *deltamethrin*, *cypermethrin* για την ενίσχυση της αποδομητικής ικανότητας της μικροβιακής κοινότητας, (β) πειράματα εμπλουτισμού εκλεκτικών καλλιεργειών για την απομόνωση μικροοργανισμών με καταβολικές ιδιότητες, (γ) την επίστρωση τριβλίων, την επιλογή αμιγών αποικιών και την παρακολούθηση εκλεκτικών καλλιεργειών για την διάσπαση του εντομοκτόνου από πιθανά βακτήρια και (δ) την ταυτοποίηση των απομονωμένων μικροοργανισμών με μοριακής βιολογίας τεχνικές. Με την παραπάνω σειρά που αναφέρθηκαν τα πειράματα της παρούσας μελέτης θα αναφερθούν και τα ευρήματα της.

3.1 Πειράματα εφαρμογής του *a-cypermethrin* σε δείγμα εδάφους με ιστορικό εναπόθεσης πυρεθροειδών γεωργικών φαρμάκων:

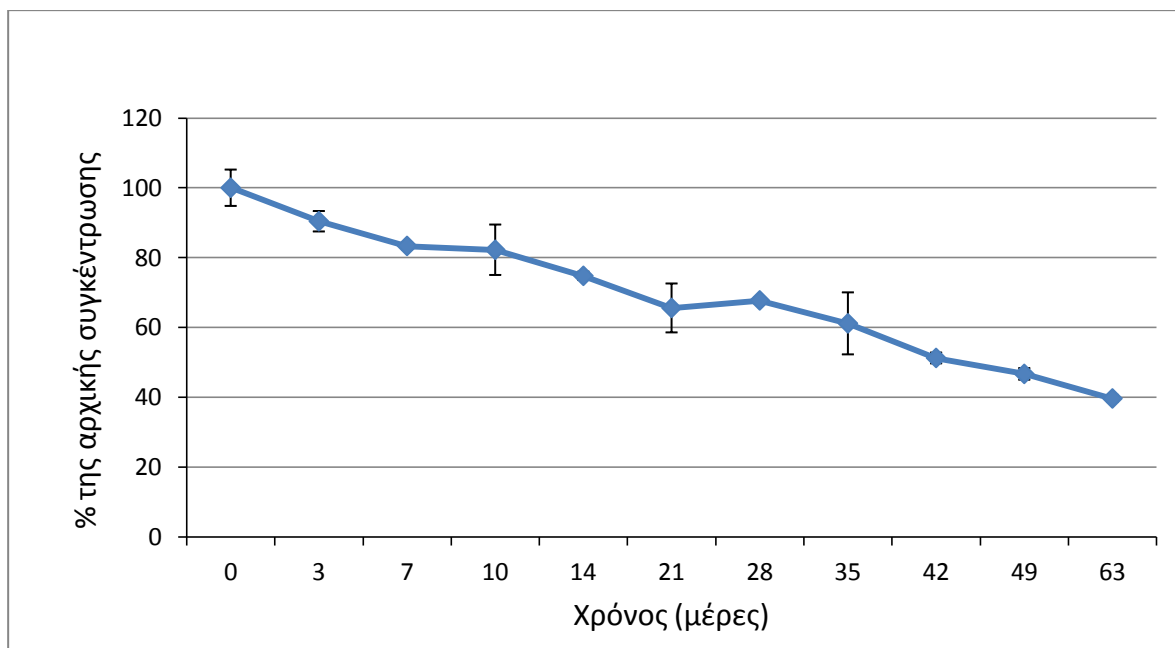
Όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο 2 το έδαφος που χρησιμοποιήσαμε χωρίστηκε σε δυο υπο-δείγματα, όπου στο ένα έγινε αποστείρωση με υποκαπνισμό και χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα μάρτυρας για την μελέτη της αβιοτικής διάσπασης του *a-cypermethrin* στο εν λόγω έδαφος. Στα δυο δείγματα εδάφους εφαρμόστηκε την ίδια στιγμή, η ίδια ποσότητα του εντομοκτόνου και παρακολούθηθηκε η διάσπασή του στο χρόνο.

Στην περίπτωση του μη αποστειρωμένου εδάφους παρατηρήθηκε μια ταχεία διάσπαση του *a-cypermethrin* στις 7 πρώτες μέρες μετά τον πρώτο κύκλο εφαρμογής του, που έφτασε μέχρι το 40% της αρχικής του συγκέντρωσης (Διάγραμμα 1). Έπειτα, ακολούθησε ο δεύτερος κύκλος εφαρμογής του εντομοκτόνου στο μη αποστειρωμένο έδαφος και παρατηρήθηκε μια επιβράδυνση στην αποδόμηση του *a-cypermethrin* σε σχέση με τον πρώτο κύκλο εφαρμογής του, φτάνοντας στο 40% της αρχικής του συγκέντρωσης στις 21 μέρες έναντι των 7 ημερών στον πρώτο κύκλο. Μετά το τέλος των 21 ημερών του δεύτερου κύκλου εφαρμογών, ακολούθησε ο τρίτος κύκλος εφαρμογής

του *a-cypermethrin* και παρατηρήθηκε ο ίδιος ρυθμός αποδόμησης του γεωργικού φαρμάκου όπως στον δεύτερο κύκλο εφαρμογής του (διάγραμμα 1). Εν αντιθέσει με το μη αποστειρωμένο έδαφος, στην περίπτωση του αποστειρωμένου εδάφους με υποκαπνισμό παρατηρήθηκε ένας εμφανώς πιο επιβραδυνόμενος ρυθμός αποδόμησης του *a-cypermethrin*. Η αποδόμηση του εντομοκτόνου στο 40% της αρχικής του συγκέντρωσης, όπως στην περίπτωση του μη αποστειρωμένου εδάφους, πραγματοποιήθηκε στις 63 ημέρες μετά την εφαρμογή του (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 1. Η αποδόμηση του *a-cypermethrin* σε έδαφος με ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών. Με μπλε γραμμή φαίνεται η διάσπαση του γεωργικού φαρμάκου στον πρώτο κύκλο εφαρμογής του, με κόκκινη γραμμή φαίνεται ο δεύτερος κύκλος εφαρμογής του και με πράσινη ο τρίτος κύκλος εφαρμογής του. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm η τυπική απόκλιση.



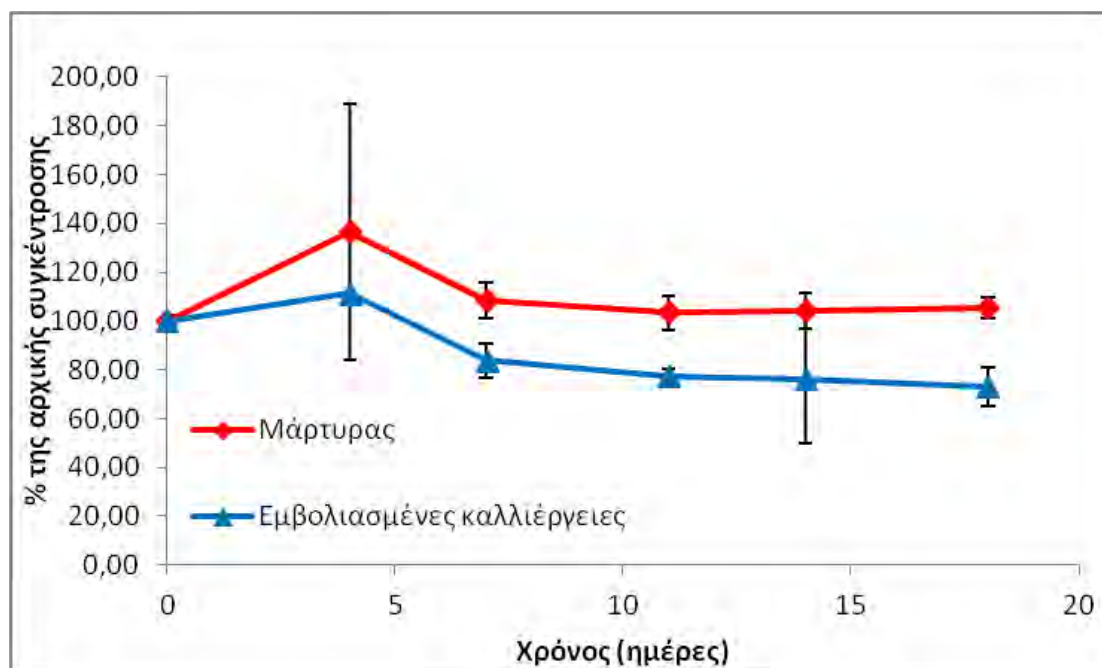
Διάγραμμα 2 Η αποδόμηση του α -cypermethrin σε αποστειρωμένο έδαφος. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm η τυπική απόκλιση.

3.2 Εμπλουτισμένες καλλιέργειες:

Στο δεύτερο πείραμα κατά σειρά στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ικανότητας της αποδημητικά ενισχυμένης μικροβιακής κοινότητας του μη αποστειρωμένου εδάφους, στην διάσπαση του α cypermethrin στα εκλεκτικά θρεπτικά μέσα MSMN και SEM.

3.2.1 Εμπλουτισμένες καλλιέργειες MSMN

Οι εμπλουτισμένες καλλιέργειες σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα MSMN + α cypermethrin δεν έδειξαν κάποια σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του εντομοκτόνου σε σχέση με αυτές του μάρτυρα. Το μέγιστο της διάσπασης του α cypermethrin που κατάφεραν να πραγματοποιήσουν ήταν το 20%, οπότε και δεν συνεχίστηκαν οι μελέτες με αυτό το θρεπτικό μέσο (Διάγραμμα 3)

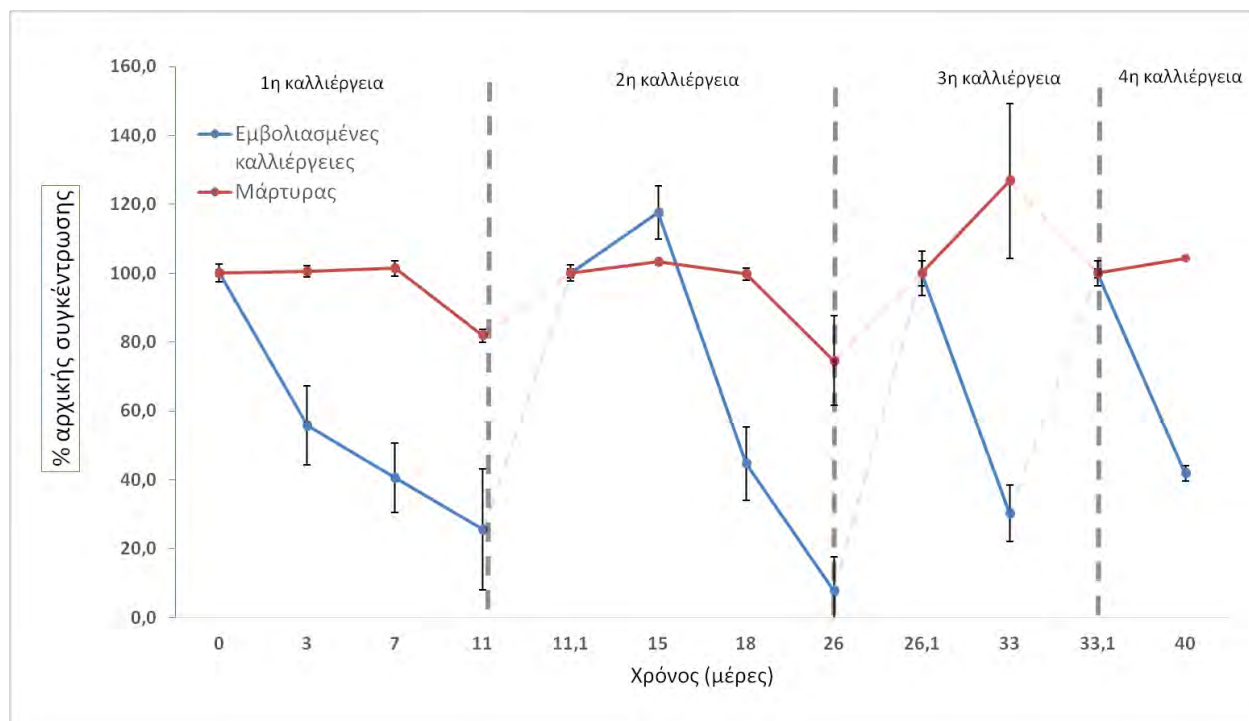


Διάγραμμα 3. Η αποδόμηση του α -cypermethrin σε καλλιέργειες εμπλουτισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα MSMN. Με μπλε γραμμή φαίνονται οι εμβολιασμένες με έδαφος καλλιέργειες και με κόκκινη γραμμή φαίνονται οι καλλιέργειες του μάρτυρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm η τυπική απόκλιση.

3.2.2 Εμπλουτισμένες καλλιέργειες SEM

Παράλληλα με τις καλλιέργειες του εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος MSMN, καλλιέργειες του εκχυλίσματος από έδαφος SEM δοκιμάστηκαν για την ανάπτυξη μικροοργανισμών με ικανότητα διάσπασης του α -cypermethrin συγκέντρωσης 10 mg/L. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 4 στον πρώτο κύκλο των πειραμάτων εμπλουτισμού, οι καλλιέργειες που εμβολιάστηκαν με το έδαφος παρουσίασαν διάσπαση του γεωργικού φαρμάκου κατά 75% από την αρχική του συγκέντρωση σε διάστημα 11 ημερών, σε αντίθεση με τα δείγματα του μάρτυρα που δεν παρουσίασε κάποια σημαντική διάσπαση. Για την περαιτέρω διερεύνηση της αποδομητικής ικανότητας των παραπάνω καλλιεργειών ακολουθήθηκε μια σειρά τεσσάρων κύκλων ανακαλλιεργειών, με την μικροβιακή κοινότητα που εμβολιάζονταν να εμφανίζει περίπου την ίδια (3^{ος} και 4^{ος} κύκλος ανακαλλιεργείας) ικανότητα αποδόμησης του α -cypermethrin ή και λίγο μεγαλύτερη που να φτάνει στο 85% διάσπασης της αρχικής του γεωργικού φαρμάκου αλλά σε διάστημα 25 ημερών. Καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων και των

ανακαλλιεργειών η συγκέντρωση του α -cypermethrin στις καλλιέργειες του μάρτυρα παρέμενε σταθερή, που αποδεικνύει ότι η διάσπαση που εμφανίζεται στις εμβολιασμένες καλλιέργειες οφείλεται σε μικροοργανισμούς και όχι σε αβιοτικούς παράγοντες.



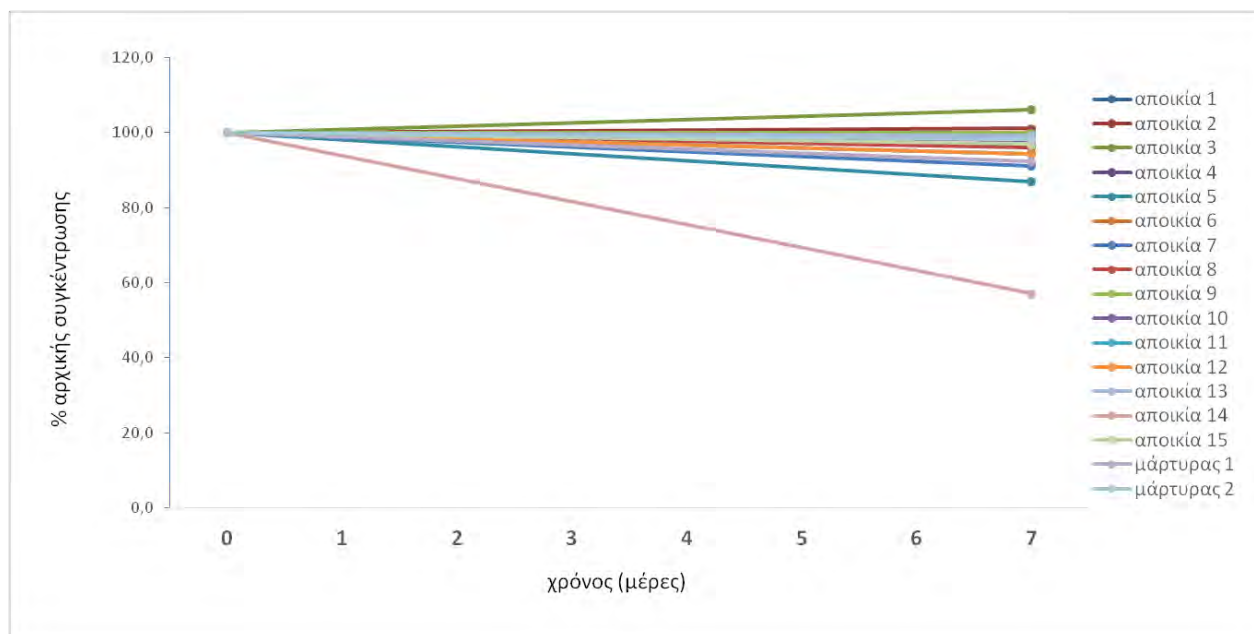
Διάγραμμα 4. Η αποδόμηση του α -cypermethrin σε καλλιέργειες εμπλουτισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα SEM σε 4 κύκλους ανακαλλιεργειών. Με μπλε γραμμή φαίνονται οι εμβολιασμένες με έδαφος καλλιέργειες και με κόκκινη γραμμή φαίνονται οι καλλιέργειες του μάρτυρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm η τυπική απόκλιση

3.3 Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το α -cypermethrin

3.3.1 Επίστρωση τριβλίων και επιλογή αμοιγών αποικιών:

Μετά την εμφάνιση εμπλουτισμένων καλλιεργειών με υψηλή αποδομητική ικανότητα έναντι του α -cypermethrin, στρώθηκαν τριβλία SEM+a cypermethrin (10mg/L) και ακολούθησε επιλογή αποικιών και αξιολόγηση της αποδομητικής τους ικανότητας σε θρεπτικό υπόστρωμα SEM+a cypermethrin (10mg/L). Σε χρονικό διάστημα των 7 ημερών μετά την αρχικό εμβολιασμών των καλλιεργειών με τις αποικίες των μικροοργανισμών μετρήθηκε η συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου και μόνο η αποικία 14 κατάφερε να

παρουσιάζει διάσπαση του εν λόγω εντομοκτόνου που έφτασε στο 55% της αρχικής συγκέντρωσης (Διάγραμμα 5).

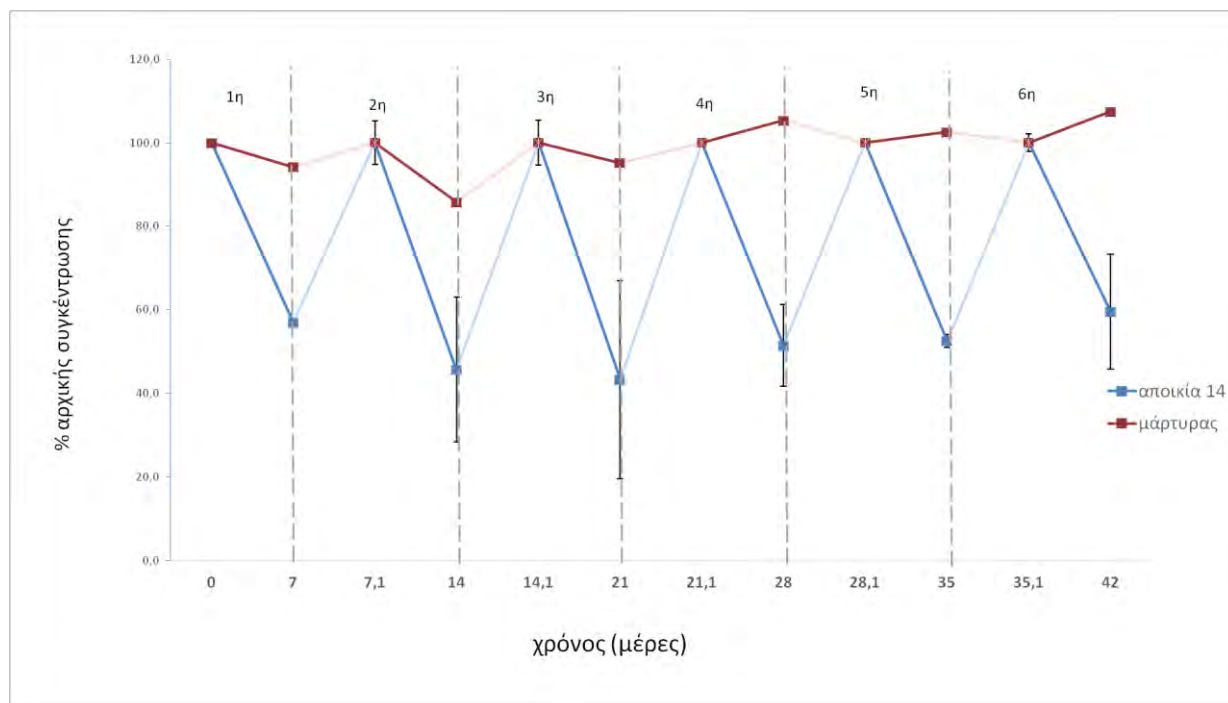


Διάγραμμα 5. Η αποδόμηση του α -cypermethrin στις καλλιέργειες των 15 αποικιών που επιλέχθηκαν και των καλλιεργειών των μαρτύρων, σε θρεπτικό υπόστρωμα SEM+ α cypermethrin (10mg/L).

3.3.2 Εμπλουτισμένες καλλιέργειες της αποικίας 14 σε SEM:

Στη συνέχεια των πειραμάτων έγιναν καλλιέργειες της αποικίας 14 σε SEM για την διερεύνηση της αποδομητικής ικανότητας του μικροοργανισμού στο α -cypermethrin με συγκέντρωση 10 mg/L. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 6 στον πρώτο κύκλο των πειραμάτων εμπλουτισμού, οι καλλιέργειες παρουσίασαν διάσπαση του γεωργικού φαρμάκου κατά 40% από την αρχική του συγκέντρωση σε διάστημα 7ημερών, σε αντίθεση με τα δείγματα του μάρτυρα που δεν παρουσίασε κάποια σημαντική διάσπαση. Στον 2ο κύκλο ανακαλλιιεργειών παρουσιάστηκε αποδόμηση κατά 55% στα δείγματα ενώ στον μάρτυρα περίπου 15% σε διάστημα 7 ημερών. Στον 3ο κύκλο, η αποδόμηση έφτασε το 60% σε 7ημέρες ενώ στον μάρτυρα δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση. Τέλος στον 4ο, 5ο, και 6ο κύκλο παρατηρήθηκε 40-50% αποδόμηση στα δείγματα, ενώ στους αντίστοιχους μάρτυρες δεν παρατηρούνταν αποδόμηση. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και των

ανακαλλιεργειών η συγκέντρωση του α -cypermethrin στις καλλιέργειες του μάρτυρα παρέμενε περίπου σταθερή, που αποδεικνύει ότι η διάσπαση που εμφανίζεται στις καλλιέργειες την αποικία 14 οφείλεται σε μικροοργανισμούς και όχι σε αβιοτικούς παράγοντες.

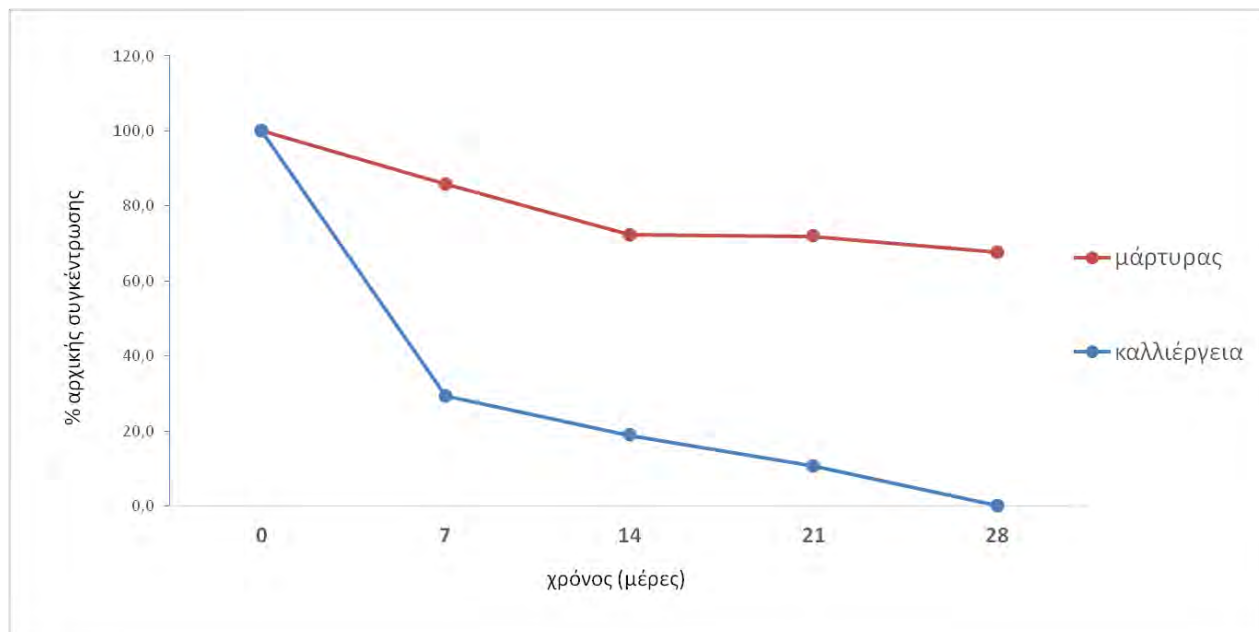


Διάγραμμα 6. Η αποδόμηση του α -cypermethrin σε καλλιέργειες εμπλουτισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα SEM σε 4 κύκλους ανακαλλιεργειών από την αποικία 14. Με μπλε γραμμή φαίνονται οι εμβολιασμένες καλλιέργειες και με κόκκινη γραμμή φαίνονται οι καλλιέργειες του μάρτυρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

3.3.3 Αποδόμηση του α -cypermethrin από την αποικία 14

Τέλος έγινε έλεγχος για το πόσες ημέρες θα πάρει η αποικία 14 να αποικοδομήσει πλήρως το α -cypermethrin και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 7. Παρατηρήθηκε στις 7 ημέρες αποδόμηση 70% του γεωργικού φαρμάκου, σε αντίθεση με τον μάρτυρα, όπου αποδομήθηκε το 15% της αρχικής ποσότητας του α -cypermethrin. Σε διάστημα 21 ημερών το α -cypermethrin αποδομήθηκε κατά 90%, ενώ υπήρχε πλήρης αποδόμηση στις 28 ημέρες. Σε όλη την διάρκεια στον μάρτυρα παρατηρήθηκε μία

αποδόμηση, με αυτήν να φτάνει το 30% στις 28 ημέρες, αλλά ήταν πολύ μικρότερη από το δείγμα.

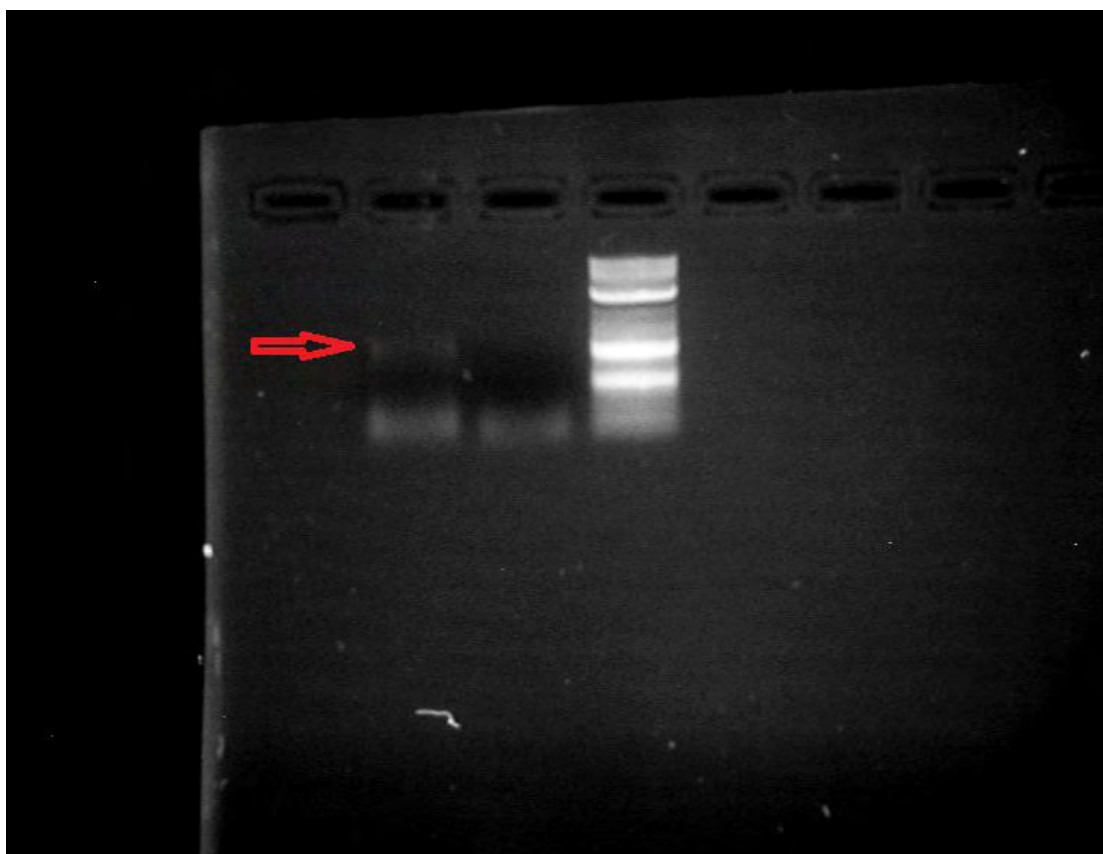


Διάγραμμα 7 Το μοτίβο αποδόμησης του α -cypermethrin από την αποικία 14 σε θρεπτικό μέσο SEM+ α -cypermethrin (καλλιέργεια). Παράλληλα παρουσιάζεται και το μοτίβο αποδόμησης του εντομοκτόνου στο ίδιο θρεπτικό μέσο χωρίς εμβολιασμό με βακτήρια (μάρτυρας)

3.4 Μοριακή ταυτοποίηση:

3.4.1 PCR και ηλεκτροφόρηση:

Έγινε PCR για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA, μήκους 1024bp. Τα προϊόντα ενίσχυσης της αντίδρασης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη και παρατηρήθηκαν οι ζώνες του DNA σε τράπεζα οπτικοποίησης UV, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το μέγεθος του προϊόντος PCR. Φαίνεται στην εικόνα 6 με κόκκινο βέλος η ζώνη του DNA που απομονώθηκε και ενισχύθηκε και με τη βοήθεια του ladder παρατηρείται πως είναι περίπου 1000bp.



Εικόνα 6 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης. Με κόκκινο βελάκι φαίνεται η ζώνη 1024 bp.

3.4.2 Αλληλούχιση και Ταυτοποίηση

Τέσσερις κλώνοι αποστάλθηκαν για αλληλούχιση. Έγινε ανάλυση της αλληλουχίας του τμήματος 1024bp κάθε κλώνου και μέσω Blast πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεσή τους στη βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI). Τα

αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 5 και παρατηρείται ομολογία με τα στελέχη *Chitinophaga sp.* XJ-2 , *Chitinophaga soli* σειρά 226-LR37, *Chitinophaga sp.* σειρά RJ-6-7, και με δύο απομονώσεις (2,3) του *Chitinophaga pinensis*. Η ομολογίες κυμαίνονταν στο 98-99%.

Πίνακας 5 Αποτελέσματα BLAST και ομολογία.

Κλώνοι	Αποτελέσματα BLAST	Ομολογία αλληλουχίας
1	Chitinophaga sp. XJ-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	Chitinophaga soli strain 226-LR37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	Chitinophaga sp. strain RJ-6-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	Chitinophaga pinensis isolate 3 genome assembly, chromosome: 1	99%
2	Chitinophaga sp. strain RJ-6-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	Chitinophaga pinensis isolate 3 genome assembly, chromosome: 1	99%
	Chitinophaga sp. XJ-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	Chitinophaga pinensis isolate 2 genome assembly, chromosome: 1	99%
3	Chitinophaga sp. XJ-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	Chitinophaga soli strain 226-LR37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%

	Chitinophaga sp. strain RJ-6-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	Chitinophaga pinensis isolate 3 genome assembly, chromosome: 1	99%
4	Chitinophaga sp. XJ-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	Chitinophaga soli strain 226- LR37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	Chitinophaga sp. strain RJ-6-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
	Chitinophaga pinensis isolate 3 genome assembly, chromosome: 1	98%

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

4.1 Συζήτηση

Στη συγκεκριμένη μελέτη απομονώθηκε με την μέθοδο εμπλουτισμένων καλλιεργειών ένα βακτήριο με την ικανότητα αποδόμησης *a*-cypermethrin. Η επιλογή του εδάφους που είχε ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών έγινε με την λογική, πως έχει ασκηθεί εξελικτική πίεση σε μικροβιακές κοινότητες οι οποίες υπήρχαν σε περιοχές με ρύπανση από γεωργικά φάρμακα, έτσι ώστε αυτές να έχουν αποκτήσει την ικανότητα να διασπούν το *a*-cypermethrin για να μπορούν να ανταπεξέλθουν στις αντίξοες συνθήκες. Αυτό έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες όπως αυτές από έδαφος με ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών στο Πακιστάν (Akbar, *et al.* 2015), από ένα σύστημα επεξεργασίας λυμάτων κατασκευής πυρεθροειδών στην Κίνα (S. Chen, Hu, *et al.* 2012), σε μελέτη από ενεργοποιημένη λάσπη στην Κίνα (S. Chen, Luo, *et al.* 2012), από έδαφος με ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών στην Κίνα (Zhao *et al.* 2013), από έδαφος ρυπασμένο με γεωργικά φάρμακα στην Ινδία (Tallur *et al.* 2008), από έδαφος ρυπασμένο με συνθετικά πυρεθροειδή από χημικό εργοστάσιο στην Κίνα (Wang *et al.* 2011), από έδαφος ρυπασμένο με πυρεθροειδή στο Ηνωμένο Βασίλειο (Grant *et al.* 2002), σε έδαφος με ιστορικό χρήσης cypermethrin (Tyagi *et al.* 2015). Σε όλες τις παραπάνω μελέτες απομονώθηκαν στελέχη βακτηρίων που να μπορούν να διασπούν το *a*-cypermethrin, και λόγω αυτής της παρατήρησης χρησιμοποιήθηκε ως πηγή για το πείραμα το συγκεκριμένο δείγμα εδάφους.

Η εμπλουτισμένες καλλιέργειες έγιναν σε SEM καθώς απορρίφτηκε η χρήση του εκλεκτικού θρεπτικού μέσου MSMN καθώς δεν προέκυψε επιτάχυνση της αποδόμησης του *a*-cypermethrin στις εμπλουτισμένες καλλιέργειες. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με αρκετές έρευνες που οδήγησαν στην απομόνωση βακτηρίων που αποδομούσαν το *a*-cypermethrin και σε MSM (Bhatt *et al.* 2020), (Pankaj *et al.* 2016), (Akbar *et al.* 2015a). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικό στέλεχος που να μην μπορεί να επιβιώσει χωρίς εξωτερική πηγή άνθρακα, καθώς το MSMN δεν περιέχει τέτοια πηγή εκτός από το προστιθέμενο φάρμακο.

Η ταυτοποίηση έγινε με την ανάλυση της αλληλουχίας 16S rRNA και μέσω BLAST και αποκαλύφθηκε πως ήταν βακτήρια του γένους *Chitinophaga* sp. και παρατηρήθηκε στις 10 μέρες γύρω στο 80% αποδόμηση που είναι παρόμοιος ρυθμός με μελέτες που έχουν προηγηθεί οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω. Να σημειωθεί παρ όλα αυτά πως η συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε στο εν λόγω πείραμα ήταν αρκετά χαμηλότερη από τις παρακάτω μελέτες, δηλαδή 10mg/L ενώ στις ήδη υπάρχουσες 50mg/L, 100mg/L και πάνω. Αυτό μπορεί να σημαίνει πως σε μεγαλύτερη συγκέντρωση θα υπήρχε μικρότερη αποδόμηση. Τα στελέχη που έχουν βρεθεί ως τώρα να το διασπούν, είναι βακτήρια του γένους *Bacillus* τα οποία είναι ιδιαίτερα μεταβολικά ενεργά, καθώς μέσα στο διάστημα μερικών ημερών διασπούσαν σχεδόν όλη την ποσότητα του cypermethrin (Tiwary and Dubey 2016), (S. Chen, Hu, et al. 2012), (Sundaram, et al. 2013), (Pankaj et al. 2016), (S. Chen, Luo, et al. 2012), (Liu et al. 2014), με εξαίρεση το *Bacillus amyloliquefaciens* AP01 (Lee et al. 2016). Επίσης πολύ ενεργά ήταν και τα *Ochrobactrum anthropi* JcM1 (Akbar et al. 2015b), *Ochrobactrum tritici* pyd-1 (Wang et al. 2011) , *Serratia nematodiphila* CB2 (Tyagi et al. 2015) και *Rhodococcus* sp. JcM5 (Akbar et al. 2015b) που αποδομούσαν παραπάνω από το 90% της αρχικής δόσης του cypermethrin (100 mg / L) εντός 5-10 ημερών. Οι παραπάνω μετρήσεις της διάσπασης ήταν σε υγρές καλλιέργειες. Στο στέλεχος που απομονώθηκε στο εν λόγω πείραμα η αποδόμηση ήταν ελαφρώς πιο αργή σε σχέση με τις ήδη υπάρχουσες μελέτες. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με τις διαφορετικές συνθήκες που μπορεί να επικρατούσαν (θερμοκρασία, pH), τους διαφορετικούς μικροοργανισμούς, και με την διαφορά θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για τις καλλιέργειες εμπλουτισμού.

Αντίστοιχα η αποδόμηση σε έδαφος έχει επίσης μετρηθεί σε προηγούμενες μελέτες για διάφορα βακτήρια. Ένα από αυτά είναι το *Bacillus thuringiensis* SG4 όπου υπήρχε περίπου 63% αποδόμηση σε 10 μέρες (Bhatt et al. 2020). Αντίθετα στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρήθηκε γύρω στο 40% αποδόμηση στις 10 μέρες. Επίσης στο (Akbar, et al. 2015a) παρατηρήθηκε πως ανάλογα με τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στα εδάφη διέφερε η αποδόμηση, όπου ήταν 50% σε 17, 9,5 και 14 μέρες για 3 διαφορετικά καθαρά στελέχη (*B. parabrevis* FCm9, *Sphingomonas* sp. RCm6, *A. calcoaceticus* MCm5) ενώ ήταν περίπου 48 μέρες για ολόκληρη την μικροβιακή κοινότητα. Αυτό δείχνει πως τα στελέχη της μικροβιακής κοινότητας δρούσαν καλύτερα

απομονωμένα στο να αποδοθούν το *a-cypermethrin*, ενώ σαν σύνολο πιθανώς να υπήρχε ανταγωνισμός και να μην είχαν τόσο ταχεία αποδόμηση. Ακόμα σε έρευνα από 14 διαφορετικά δείγματα εδάφους με ιστορικό χρήσης πυρεθροειδών (Jin 2018), παρατηρήθηκε αποδόμηση, από τις μικροβιακές κοινότητες, 15,6-44,3% μετά τις 40 μέρες. Στο πείραμα που εξετάζουμε δεν χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα στελέχη για βιοαποδόμηση, αλλά η μικροβιακή κοινότητα σαν σύνολο ήταν ταχύτερη και από τις 2 προηγούμενες μελέτες, φτάνοντας στο 50% αποδόμηση στις 21 μέρες. Αυτό μας δείχνει πως ανάλογα με τα στελέχη που υπάρχουν στις διαφορετικές μικροβιακές κοινότητες, μπορεί να διαφέρει και η αποδόμηση σε σημαντικό βαθμό, καθώς αυτά μπορεί να δρουν είτε ανταγωνιστικά είτε συνεργατικά. Έτσι μία πιθανή εξήγηση είναι πως στο εξεταζόμενο πείραμα δεν δρούσαν ανταγωνιστικά, πράγμα που εν μέρη επιβεβαιώνεται και με την σύγκριση των αποτελεσμάτων των εμπλουτισμένων καλλιεργειών του καθαρού στελέχους που διασπούσε το *a-cypermethrin* με αυτά των εμπλουτισμένων καλλιεργειών όλης τις μικροβιακής κοινότητας, τα οποία παρουσιάζουν παρόμοιο ποσοστό αποδόμησης, 40-60% σε 7 ημέρες. Επίσης η ταχεία αποδόμηση του *a-cypermethrin* ακόμα και σε σύνολο μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος, καθιστά τα εν λόγω βακτήρια ένα πολύ πιθανό σημαντικό εργαλείο για βιοαποκατάσταση.

Παρ' όλα αυτά δεν υπάρχουν προηγούμενες μελέτες που να έχουν απομονώσει βακτήρια του γένους *Chitinophaga* που να διασπών το *a-cypermethrin*. Το γένος *Chitinophaga* περιλαμβάνει 15 είδη. Κάποια από αυτά είναι *Chitinophaga ginsengisegetis* and *Chitinophaga ginsengisoli*, *Chitinophaga terrae*, *Chitinophaga niabensis*, *Chitinophaga niastensis*, *Chitinophaga rupis*, *Chitinophaga eiseniae*, *Chitinophaga oryztterrae*, *Chitinophaga cymbidii*, *Chitinophaga soli* και *Chitinophaga pinensis* (Proença et al., 2014), από τα οποία τα 2 τελευταία παρουσίασαν μεγάλη ομολογία με αυτά που απομονώθηκαν στα αποτελέσματα του BLAST (98-99%). Ανήκουν στην οικογένεια Chitinophagaceae, τάξη Chitinophagales, κλάση Chitinophagia, και φύλο Bacteroidetes. Χαρακτηρίστηκαν πρώτη φορά στην έρευνα (Sangkhobol and Skerman 1981).

Συνοψίζοντας τα τελικά συμπεράσματα που προκύπτουν από όλα τα δεδομένα που συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια της μελέτης είναι, πως τα βακτήρια που απομονώθηκαν του γένους *Chitinophaga sp.* είχαν την δυνατότητα ταχείας αποδόμησης

του *a-cypermethrin*, κυρίως στις καλλιέργειες εμπλουτισμού αλλά και σε επαρκή βαθμό στο ίδιο το έδαφος, ειδικά συγκριτικά με προηγούμενες μελέτες, και επίσης είτε στο σύνολο της μικροβιακής κοινότητας είτε απομονωμένα.

4.2 Μελλοντική ερευνητική κατεύθυνση:

Τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν δίνουν την δυνατότητα για περαιτέρω, μελλοντική έρευνα πάνω στα εξής σημεία:

- Μέτρηση της αποδόμησης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH έτσι ώστε να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες για την δράση του βακτηρίου, αλλά και η αποδοτικότητα του σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.
- Απομόνωση γονιδίων και ενζύμων που εμπλέκονται στην αποδόμηση του *a-cypermethrin*
- Εύρεση του μεταβολικού μονοπατιού διάσπασης του *a-cypermethrin* από το βακτήριο

5. Βιβλιογραφία

- Aislabie, J, and G Lloyd-Jones. 1995. "A Review of Bacterial-Degradation of Pesticides." *Soil Research* 33 (6): 925. <https://doi.org/10.1071/SR9950925>.
- Akbar Shamsa, Sikander Sultan, and Michael Kertesz. 2015a. "Determination of Cypermethrin Degradation Potential of Soil Bacteria Along with Plant Growth-Promoting Characteristics." *Current Microbiology* 70 (1): 75–84. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0684-7>.
- Akbar Shamsa, Sikander Sultan, and Michael Kertesz. 2015b. "Bacterial Community Analysis of Cypermethrin Enrichment Cultures and Bioremediation of Cypermethrin Contaminated Soils: Cypermethrin Biodegradation." *Journal of Basic Microbiology* 55 (7): 819–29. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400805>.
- Anadón, Arturo, Irma Arés, María Aránzazu Martínez, and María Rosa Martínez-Larrañaga. 2013. "Pyrethrins and Synthetic Pyrethroids: Use in Veterinary Medicine." In *Natural Products*, edited by Kishan Gopal Ramawat and Jean-Michel Mérillon, 4061–86. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_131.
- Andreu, Vicente, and Yolanda Picó. 2004. "Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Soil: Critical Review and Comparison of Methods." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23 (10–11): 772–89. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.07.008>.
- Ansari, Rizwan A., Shakilur Rahman, Manpreet Kaur, Sameya Anjum, and Sheikh Raisuddin. 2011. "In Vivo Cytogenetic and Oxidative Stress-Inducing Effects of Cypermethrin in Freshwater Fish, *Channa Punctata* Bloch." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (1): 150–56. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.036>.
- Arena, Maria, Domenica Auteri, Stefania Barmaz, Alba Brancato, Daniela Brocca, Laszlo Bura, Luis Carrasco Cabrera, et al. 2018. "Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Alpha-cypermethrin." *EFSA Journal* 16 (9). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5403>.

- Arias-Estévez, Manuel, Eugenio López-Periago, Elena Martínez-Carballo, Jesús Simal-Gándara, Juan-Carlos Mejuto, and Luis García-Río. 2008. "The Mobility and Degradation of Pesticides in Soils and the Pollution of Groundwater Resources." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 123 (4): 247–60. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.07.011>.
- Atreya, Kishor, Fred Håkon Johnsen, and Bishal Kumar Sitaula. 2012. "Health and Environmental Costs of Pesticide Use in Vegetable Farming in Nepal." *Environment, Development and Sustainability* 14 (4): 477–93. <https://doi.org/10.1007/s10668-011-9334-4>.
- Azubuike, Christopher Chibueze, Chioma Blaise Chikere, and Gideon Chijioke Okpokwasili. 2016. "Bioremediation Techniques—Classification Based on Site of Application: Principles, Advantages, Limitations and Prospects." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (11): 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>.
- Battu, R. S., S. K. Sahoo, and Gagan Jyot. 2009. "Persistence of Acephate and Cypermethrin on Cotton Leaves, Cottonseed, Lint and Soil." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82 (1): 124–28. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9541-3>.
- Bhatt, Pankaj, Yaohua Huang, Wenping Zhang, Anita Sharma, and Shaohua Chen. 2020. "Enhanced Cypermethrin Degradation Kinetics and Metabolic Pathway in *Bacillus Thuringiensis* Strain SG4." *Microorganisms* 8 (2): 223. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020223>.
- Boopathy, R. 2000. "Factors Limiting Bioremediation Technologies." *Bioresource Technology* 74 (1): 63–67. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3).
- Bradberry, Sally M, Sarah A Cage, Alex T Proudfoot, and J Allister Vale. 2005. "Poisoning Due to Pyrethroids." *Toxicological Reviews* 24 (2): 93–106. <https://doi.org/10.2165/00139709-200524020-00003>.
- Bürkle, L, I Cousins, A Hourdak, T Jarvis, B Jene, W Koch, J Kreuger, et al. 2008. "PESTICIDES IN AIR: CONSIDERATIONS FOR EXPOSURE ASSESSMENT," 328.
- Casida, John E., and Gary B. Quistad. 1998. "Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future?" *Annual Review of Entomology* 43 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.1>.

- Chavarri, Ma Jesus, Antonio Herrera, and Agustin Arino. 2005. "The Decrease in Pesticides in Fruit and Vegetables during Commercial Processing." *International Journal of Food Science and Technology* 40 (2): 205–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00932.x>.
- Chen, Audrey W., J. Michael Fink, David J. Letinski, George P. Barrett, and Jill C. Pearsall. 1997. "Residue of Cypermethrin and Its Major Acid Metabolites in Milk and Tissues from Dairy Bovines Treated with Cypermethrin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (12): 4850–55. <https://doi.org/10.1021/jf970476a>.
- Chen, Shaohua, Wei Hu, Ying Xiao, Yinyue Deng, Jianwen Jia, and Meiyong Hu. 2012. "Degradation of 3-Phenoxybenzoic Acid by a Bacillus Sp." Edited by Zhi Zhou. *PLoS ONE* 7 (11): e50456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050456>.
- Chen, Shaohua, Jianjun Luo, Meiyong Hu, Kaiping Lai, Peng Geng, and Huasheng Huang. 2012. "Enhancement of Cypermethrin Degradation by a Coculture of Bacillus Cereus ZH-3 and Streptomyces Aureus HP-S-01." *Bioresource Technology* 110 (April): 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.106>.
- Chrustek, Agnieszka, Iga Hołyńska-Iwan, Inga Dziembowska, Joanna Bogusiewicz, Marcin Wróblewski, Anna Cwynar, and Dorota Olszewska-Słonina. 2018. "Current Research on the Safety of Pyrethroids Used as Insecticides." *Medicina* 54 (4): 61. <https://doi.org/10.3390/medicina54040061>.
- Costa, Chiara, Venerando Rapisarda, Stefania Catania, Carmelina Di Nola, Caterina Ledda, and Concettina Fenga. 2013. "Cytokine Patterns in Greenhouse Workers Occupationally Exposed to α -Cypermethrin: An Observational Study." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36 (3): 796–800. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.004>.
- Costa, Lucio G. 2015. "The Neurotoxicity of Organochlorine and Pyrethroid Pesticides." In *Handbook of Clinical Neurology*, 131:135–48. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62627-1.00009-3>.
- Cycoń, Mariusz, and Zofia Piotrowska-Seget. 2016. "Pyrethroid-Degrading Microorganisms and Their Potential for the Bioremediation of Contaminated Soils: A Review." *Frontiers in Microbiology* 7 (September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01463>.

- D, Bhattacharyya. 2004. "Single Oral Dose Toxicity Study of A-Cypermethrin in Rats." *Indian Journal of Pharmacology* 36 (1): 25.
- Demoute, Jean-Pierre. 1989. "A Brief Review of the Environmental Fate and Metabolism of Pyrethroids." *Pesticide Science* 27 (4): 375–85. <https://doi.org/10.1002/ps.2780270406>.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2009a. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance zeta-cypermethrin. *EFSA Journal* 2009;7(1):RN-196, 119 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.196r>
- EFSA (European Food Safety Authority), 2014c. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance beta-cypermethrin. *EFSA Journal* 2014;12(6):3717, 90 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3717>
- Elbetieha, A., S. I. Da'as, W. Khamas, and H. Darmani. 2001. "Evaluation of the Toxic Potentials of Cypermethrin Pesticide on Some Reproductive and Fertility Parameters in the Male Rats." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41 (4): 522–28. <https://doi.org/10.1007/s002440010280>.
- El-Okda, El-Sayed, Mona Abdel-Hamid, and Ahmed Hamdy. 2017. "Immunological and Genotoxic Effects of Occupational Exposure to α -Cypermethrin Pesticide." *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, June. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.00810>.
- EU pesticides database, review report 2004, <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=937>
- Gajendiran, Anudurga, and Jayanthi Abraham. 2018. "An Overview of Pyrethroid Insecticides." *Frontiers in Biology* 13 (2): 79–90. <https://doi.org/10.1007/s11515-018-1489-z>.
- Gavrilescu, M. 2005. "Fate of Pesticides in the Environment and Its Bioremediation." *Engineering in Life Sciences* 5 (6): 497–526. <https://doi.org/10.1002/elsc.200520098>.
- Grant, R.J., and W.B. Betts. 2004. "Mineral and Carbon Usage of Two Synthetic Pyrethroid Degrading Bacterial Isolates." *Journal of Applied Microbiology* 97 (3): 656–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02358.x>.

- Grant, R.J., T.J. Daniell, and W.B. Betts. 2002. "Isolation and Identification of Synthetic Pyrethroid-Degrading Bacteria." *Journal of Applied Microbiology* 92 (3): 534–40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01558.x>.
- Guo, Peng, Baozhan Wang, BaoJian Hang, Lian Li, Shinawar Waseem Ali, Jian He, and Shunpeng Li. 2009. "Pyrethroid-Degrading *Sphingobium* Sp. JZ-2 and the Purification and Characterization of a Novel Pyrethroid Hydrolase." *International Biodeterioration & Biodegradation* 63 (8): 1107–12. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.09.008>.
- Harris, C. R., R. A. Chapman, and Carol Harris. 1981. "LABORATORY STUDIES ON THE PERSISTENCE AND BEHAVIOUR IN SOIL OF FOUR PYRETHROID INSECTICIDES." *The Canadian Entomologist* 113 (8): 685–94. <https://doi.org/10.4039/Ent113685-8>.
- Jin, Shiwei. 2018. "Estimation of Soil-Specific Microbial Degradation of Alpha-Cypermethrin by Compound-Specific Stable Isotope Analysis." *Environ Sci Pollut Res*, 8.
- Khambay, Bhupinder P.S. 2002. "Pyrethroid Insecticides." *Pesticide Outlook* 13 (2): 49–54. <https://doi.org/10.1039/b202996k>.
- Kocaman, Ayşe Yavuz, and Mehmet Topaktaş. 2009. "The in Vitro Genotoxic Effects of a Commercial Formulation of α -Cypermethrin in Human Peripheral Blood Lymphocytes." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50 (1): 27–36. <https://doi.org/10.1002/em.20434>.
- Kumar Singh, Anand, Manindra Nath Tiwari, Om Prakash, and Mahendra Pratap Singh. 2012. "A Current Review of Cypermethrin-Induced Neurotoxicity and Nigrostriatal Dopaminergic Neurodegeneration." *Current Neuropharmacology* 10 (1): 64–71. <https://doi.org/10.2174/157015912799362779>.
- Lee, Yong-Suk, Je-Hoon Lee, Eun-Jung Hwang, Hyo-Jung Lee, Jae-Hoon Kim, Jae Bok Heo, and Yong-Lark Choi. 2016. "Characterization of Biological Degradation Cypermethrin by *Bacillus amyloliquefaciens* AP01." *Journal of Applied Biological Chemistry* 59 (1): 9–12. <https://doi.org/10.3839/jabc.2016.003>.
- Lewis, Kathleen A., John Tzilivakis, Douglas J. Warner, and Andrew Green. 2016. "An International Database for Pesticide Risk Assessments and Management." *Human*

- and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 22 (4): 1050–64.
<https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>.
- Lin, Q. S., S. H. Chen, M. Y. Hu, M. R. Ul Haq, L. Yang, and H. Li. 2011. "Biodegradation of Cypermethrin by a Newly Isolated Actinomycetes HU-S-01 from Wastewater Sludge." *International Journal of Environmental Science & Technology* 8 (1): 45–56.
<https://doi.org/10.1007/BF03326194>.
- Liu, Fangfang, Yuanlong Chi, Shuang Wu, Dongying Jia, and Kai Yao. 2014. "Simultaneous Degradation of Cypermethrin and Its Metabolite, 3-Phenoxybenzoic Acid, by the Cooperation of *Bacillus Licheniformis* B-1 and *Sphingomonas* Sp. SC-1." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (33): 8256–62.
<https://doi.org/10.1021/jf502835n>.
- Lozowicka, B., P. Kaczynski, A.E. Paritova, G.B. Kuzembekova, A.B. Abzhalieva, N.B. Sarsembayeva, and K. Alihan. 2014. "Pesticide Residues in Grain from Kazakhstan and Potential Health Risks Associated with Exposure to Detected Pesticides." *Food and Chemical Toxicology* 64 (February): 238–48.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.038>.
- Mantzou, N., A. Karakitsou, D. Hela, and I. Konstantinou. 2016. "Environmental Fate of the Insecticide Cypermethrin Applied as Microgranular and Emulsifiable Concentrate Formulations in Sunflower Cultivated Field Plots." *Science of The Total Environment* 541 (January): 542–50. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.117>.
- Matsuo, Noritada. 2019. "Discovery and Development of Pyrethroid Insecticides." *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 95 (7): 378–400.
<https://doi.org/10.2183/pjab.95.027>.
- Maund, Steve J, Tom N Sherratt, Tim Stickland, Nigel Shillabeer, and Paul C Jepson. 1996. "Ecological Considerations in Pesticide Risk Assessment for Aquatic Ecosystems," 6.
- Mueller-Beilschmidt, Doria. 1990. "Toxicology and Environmental Fate of Synthetic Pyrethroids" 10 (3): 6.
- Pankaj, Anita Sharma, Saurabh Gangola, Priyanka Khati, Govind Kumar, and Anjana Srivastava. 2016. "Novel Pathway of Cypermethrin Biodegradation in a *Bacillus* Sp. Strain SG2 Isolated from Cypermethrin-Contaminated Agriculture Field." *3 Biotech* 6 (1). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0372-3>.

- Proença, Diogo Neves, Maria Fernanda Nobre, and Paula V. Morais. 2014. "Chitinophaga Costaii Sp. Nov., an Endophyte of Pinus Pinaster, and Emended Description of Chitinophaga Niabensis." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (Pt_4): 1237–43. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.053454-0>.
- Rasmussen, R. R., M. E. Poulsen, and H. C. B. Hansen. 2003. "Distribution of Multiple Pesticide Residues in Apple Segments after Home Processing." *Food Additives and Contaminants* 20 (11): 1044–63. <https://doi.org/10.1080/02652030310001615221>.
- Rayu, Smriti, Dimitrios G. Karpouzas, and Brajesh K. Singh. 2012. "Emerging Technologies in Bioremediation: Constraints and Opportunities." *Biodegradation* 23 (6): 917–26. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9576-3>.
- Roberts, Terry R., and Mervyn E. Standen. 1977. "Degradation of the Pyrethroid Cypermethrin NRDC 149 (\pm)- α -Cyano-3-Phenoxybenzyl (\pm)- *Cis,Trans* -3-(2,2-Dichlorovinyl)-2,2-Dimethylcyclopropanecarboxylate and the Respective *Cis*-(NRDC 160) and *Trans* - (NRDC 159) Isomers in Soils." *Pesticide Science* 8 (4): 305–19. <https://doi.org/10.1002/ps.2780080402>.
- Roy Choudhury, Asim Kumar. 2017. "Finishes for Protection against Microbial, Insect and UV Radiation." In *Principles of Textile Finishing*, 319–82. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100646-7.00011-4>.
- Sadło, Stanisław, Ewa Szpyrka, Michał Stawarczyk, and Bartosz Piechowicz. 2014. "Behavior of Pyrimethanil, Pyraclostrobin, Boscalid, Cypermethrin and Chlorpyrifos Residues on Raspberry Fruit and Leaves of Laszka Variety." *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 49 (3): 159–68. <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.858005>.
- Sangkhobol, V., and V. B. D. Skerman. 1981. "Chitinophaga, a New Genus of Chitinolytic Myxobacteria." *International Journal of Systematic Bacteriology* 31 (3): 285–93. <https://doi.org/10.1099/00207713-31-3-285>.
- Singh, Dileep K. 2008. "Biodegradation and Bioremediation of Pesticide in Soil: Concept, Method and Recent Developments." *Indian Journal of Microbiology* 48 (1): 35–40. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0004-7>.

- Soderlund, David M. 2012. "Molecular Mechanisms of Pyrethroid Insecticide Neurotoxicity: Recent Advances." *Archives of Toxicology* 86 (2): 165–81. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0726-x>.
- Sundaram, Smita, Mihir Tanay Das, and Indu Shekhar Thakur. 2013. "Biodegradation of Cypermethrin by Bacillus Sp. in Soil Microcosm and in-Vitro Toxicity Evaluation on Human Cell Line." *International Biodeterioration & Biodegradation* 77 (February): 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.11.008>.
- Tallur, Preeti N., Veena B. Megadi, and Harichandra Z. Ninnekar. 2008. "Biodegradation of Cypermethrin by Micrococcus Sp. Strain CPN 1." *Biodegradation* 19 (1): 77–82. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9116-8>.
- Tiryaki, Osman, and Cemile Temur. 2010. "The Fate of Pesticide in the Environment," 11.
- Tiwary, Meenakshi, and Ashok K. Dubey. 2016. "Cypermethrin Bioremediation in Presence of Heavy Metals by a Novel Heavy Metal Tolerant Strain, Bacillus Sp. AKD1." *International Biodeterioration & Biodegradation* 108 (March): 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.025>.
- Tyagi, Himani, and Pratibha Prashar. 2015. "Isolation and Identification of Cypermethrin Degrading Serratia Nematodiphila from Cauliflower Rhizosphere," 9.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2006. Reregistration Eligibility Decision for Cypermethrin, List B, Case No. 2130.
- Vidali, M. 2001. "Bioremediation. An Overview." *Pure and Applied Chemistry* 73 (7): 1163–72. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>.
- Wang, Bao-zhan, Yun Ma, Wei-you Zhou, Jin-wei Zheng, Jian-chun Zhu, Jian He, and Shun-peng Li. 2011. "Biodegradation of Synthetic Pyrethroids by Ochrobactrum Tritici Strain Pyd-1." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (10): 2315–24. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0698-2>.
- Willis, Kate J, and Nicholas Ling. 2004. "Toxicity of the Aquaculture Pesticide Cypermethrin to Planktonic Marine Copepods." *Aquaculture Research* 35 (3): 263–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01008.x>.
- Zhao, Haoyu, Yucong Geng, Long Chen, Ke Tao, and Taiping Hou. 2013. "Biodegradation of Cypermethrin by a Novel *Catellibacterium* Sp. Strain CC-5 Isolated from

Contaminated Soil." *Canadian Journal of Microbiology* 59 (5): 311–17.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0580>.