



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Εντοπισμός και ταυτοποίηση γονιδίων που  
κωδικοποιούν εστεράσες πυρεθροειδών  
εντομοκτόνων μέσω λειτουργικής  
μεταγονιδιωματικής ανάλυσης**

Γκόννη Ιωάννα Γεωργία του Σταύρου

Λάρισα, 2022

**Εντοπισμός και ταυτοποίηση γονιδίων που  
κωδικοποιούν εστεράσες πυρεθροειδών  
εντομοκτόνων μέσω λειτουργικής  
μεταγονιδιωματικής ανάλυσης**

**Detection and identification of genes encoding  
pyrethroid insecticide esterases by functional  
metagenomic analysis**

**Μέλη τριμελούς επιτροπής**

❖ **Επιβλέπων καθηγητής: Καρπούζας Δημήτριος**

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Πρόεδρος του  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

❖ **Μέλος Καθηγητής: Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

❖ **Μέλος καθηγητής: Βασιλειάδης Σωτήρης**

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας - Γονιδιωματικής, Τμήμα  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Κύριο Δημήτριο Καρπούζα, για την ανάθεση, επίβλεψη, καθοδήγηση και την πολύτιμη συμβολή του στην διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Πολλά ευχαριστώ στην Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Κυρία Καλλιόπη Παπαδοπούλου και στον Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας - Γονιδιωματικής, Κύριο Σωτήριο Βασιλειάδη, για την συμμετοχή τους ως μέλη της κριτικής επιτροπής και την βοήθειά τους στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας.

Άπειρα ευχαριστώ στην Κωνσταντίνα Ρουσίδου, μεταδιδακτορική ερευνήτρια στην Περιβαλλοντική Μικροβιολογία και Βιοτεχνολογία, για την αμέριστη βοήθεια, στήριξη και παροχή γνώσεων καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Κυρία Μούτου Αικατερίνη, που μαζί με την Κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη μου προσέφεραν μέσω της iGEM Thessaly 2021, την εργαστηριακή εμπειρία, που βοήθησε στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω κάθε έναν ερευνητή από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την πολύτιμη συμβολή, βοήθειά και στήριξή τους τόσο για το εργαστηριακό μέρος, όσο και για το γραπτό μέρος της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την ηθική και οικονομική τους στήριξη καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

# Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Λέξεις κλειδιά	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Τα εντομοκτόνα	9
1.2 Χρήση των εντομοκτόνων	12
1.3 Το περιβαλλοντικό αποτύπωμα και ο οικονομικός αντίκτυπος από την χρήση εντομοκτόνων	15
1.4.1. Το $\alpha$ -cypermethrin	17
1.4.2. Η χρήση και η δράση του $\alpha$ -cypermethrin	19
1.4.3. Αποδόμηση του $\alpha$ -cypermethrin	21
1.4.3.1. Βιολογική αποδόμηση	21
1.4.3.2. Χημική αποδόμηση	23
1.5. Η Μεταγονιδιωματική ανάλυση και οι εφαρμογές της	25
1.6. Στόχος της παρούσας εργασίας	28
2. Πειραματικό Μέρος	29
Ερευνητική προσέγγιση	30
2.1. Εισαγωγικά	30
2.2. Θρεπτικά μέσα και καλλιέργειες	32
2.3. Έλεγχος θετικών κλώνων για την διάσπαση του $\alpha$ -cypermethrin	35
2.4. Εντοπισμός γονιδίου υπεύθυνου για την διάσπαση του $\alpha$ -cypermethrin	36

2.5. Αλληλούχιση	38
3. Αποτελέσματα	39
3.1. Έλεγχος θετικών κλώνων για την διάσπαση του $\alpha$ -cypermethrin	40
3.2. Εντοπισμός γονιδίου υπεύθυνου για την αποδόμηση του $\alpha$ -cypermethrin	42
6.3. Αλληλούχιση	44
4. Συζήτηση	47
4.1. Συζήτηση	48
4.2. Μελλοντικές προσεγγίσεις	51
5. Βιβλιογραφία	52
5.1. Πηγές και Βιβλιογραφία	53

## Περίληψη

Τα εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται κυρίως για την εξόντωση εντόμων τα οποία έχουν καταστροφικές συνέπειες για τις καλλιέργειες και για την καταπολέμηση εντόμων, τα οποία είναι φορείς ασθενειών επικίνδυνων για την δημόσια υγεία. Όμως, η εκτεταμένη χρήση τους εγκυμονεί τον κίνδυνο υπερσυσσώρευσης των εντομοκτόνων ουσιών στο έδαφος με αποτέλεσμα την απειλή του περιβάλλοντος. Στην παρούσα εργασία, στόχος ήταν ο εντοπισμός και η ταυτοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν εστεράσες πυρεθροειδών εντομοκτόνων, κυρίως του *α-cypermethrin*, μέσω λειτουργικής μεταγονιδιωματικής ανάλυσης. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε μεταγονιδιωματική βιβλιοθήκη φοσμιδίων, που προήλθε από δείγματα βιομίγματος που είχε εκτεθεί στο συγκεκριμένο γεωργικό εντομοκτόνο. Η μελέτη των δειγμάτων της βιβλιοθήκης υπέδειξε δώδεκα κλώνους θετικούς σε φαινοτυπική δοκιμή για δράση εστεράσης από τους οποίους ο ένας είχε την ικανότητα αποικοδόμησης του *α-cypermethrin*. Ο κλώνος αυτός τροποποιήθηκε με την τεχνική ένθεσης τρανσποζονίου και εκατό τροποποιημένοι κλώνοι ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να διασπών το συγκεκριμένο εντομοκτόνο. Δώδεκα από αυτούς έχασαν την ικανότητα διάσπασης και η αλληλούχιση της διακοπτόμενης περιοχής έδειξε ότι στους δύο από τους δώδεκα κλώνους διακόπηκε το γονίδιο *bioH* που κωδικοποιεί για μια εστεράση. Μελλοντικές προσεγγίσεις υπερέκφρασης και καθαρισμού της εστεράσης θα ελέγξουν την ικανότητα του ενζύμου να διασπά το *α-cypermethrin*.

## Λέξεις κλειδιά

- Εντομοκτόνες ουσίες
- $\alpha$ -cypermethrin
- HPLC (Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης)
- EZ-Tn5<sup>TM</sup> Transposon
- Λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση
- Εστεράσες πυρεθροειδών εντομοκτόνων

## Abstract

Insecticides are mainly used to kill insects, that have detrimental effects on crops, and to control insects, that are carriers of diseases dangerous to public health. However, their widespread use carries the risk of the excessive accumulation of insecticides in the soil and poses a threat for the environment. The aim of the present thesis was the detection and identification of genes encoding for pyrethroid insecticide esterases, mainly  $\alpha$ -cypermethrin, through functional metagenomic analysis. Study of the library samples indicated twelve clones phenotypically positive for esterase activity. One of them had the ability to degrade  $\alpha$ -cypermethrin. This clone was mutated by the transposon insertion technique and one-hundred modified clones were studied for their ability to degrade that insecticide. Twelve of them lost their degradation ability. Sequence analysis of the disrupted regions showed that in two of the twelve clones, the *bioH* gene, which encodes for an esterase, was disrupted. Future studies on the overexpression and purification of the esterase, will test its ability to degrade  $\alpha$ -cypermethrin.



# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Τα εντομοκτόνα

Ο όρος εντομοκτόνο είναι μια σύνθετη λέξη. Τα συνθετικά της λέξης είναι έντομο και κτείνω, που στα αρχαία ελληνικά σημαίνει σκοτώνω. Αντίστοιχα, διαμορφώθηκε και η σημασία της λέξης στην αγγλική γλώσσα με τον όρο pesticide. Στην προκειμένη περίπτωση, το δεύτερο συνθετικό προέρχεται από την λατινική λέξη cida, που σημαίνει δολοφόνος. Τα εντομοκτόνα, νομικά, κατατάσσονται στα οικονομικά δηλητήρια και θεωρούνται όλες οι ουσίες, που χρησιμοποιούνται για πρόληψη, καταστροφή, απώθηση ή μετανάστευση εντόμων.



**Εικόνα 1.** "10 φυσικά και βιολογικά εντομοκτόνα για φυτά και καλλιέργειες | Τα Μυστικά του Κήπου", 2022.

Σύμφωνα με αυτή την κατηγοριοποίηση, πολλές χημικές ενώσεις θεωρούνται εντομοκτόνες, παρόλο που από την οπτική της τοξικολογίας μπορεί να μην συνδέονται όλες άμεσα με τον θάνατο του εντόμου.

Ειδικότερα, τα εντομοκτόνα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με πολλούς τρόπους (Perry, Yamamoto, Ishaaya & Perry, 2014):

1. Με βάση τον τρόπο εισόδου στο σώμα, όπως μέσω του στόματος, του δέρματος, της εισπνοής ή από ψεκαστήρες.
2. Σύμφωνα με τον τρόπο δράσης τους
3. Σύμφωνα με την χημική τους δομή

Σύμφωνα με την χημική δομή και τοξικότητα, τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα χωρίζονται σε Τύπου I και Τύπου II. Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα Τύπου I δεν διαθέτουν  $\alpha$ -κυανο ομάδα και χαρακτηρίζονται από μεγάλη δομική ποικιλότητα. Σε αυτή την ομάδα ανήκουν τα allethrin, bifenthrin, *d*-phenothrin, permethrin, resmethrin, tefluthrin, tetramethrin. Τα Τύπου II πυρεθροειδή, που έχουν μια  $\alpha$ -κυανο ομάδα στο μόριο τους, είναι περισσότερο νευροτοξικά από τα πυρεθροειδή Τύπου I. Στα πυρεθροειδή Τύπου II συμπεριλαμβάνονται τα cyfluthrin, cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, fenpropathrin, flocythrinate, flumethrin, fluvalinate, tralomethrin (Zhan, Huang, Lin, Bhatt & Chen, 2020).

Τα πρώτα χρόνια του Πρώτου Παγκόσμιου Πολέμου (1940), η επιλογή εντομοκτόνων περιοριζόταν στην χρήση αρσενικού, λαδιών πετρελαίου, νικοτίνης, πυρέθρου, θείου, αερίου υδροκυανίου και κρυολίθου. Ο δεύτερος Παγκόσμιος Πόλεμος ήταν εναρκτήριο για την Μοντέρνα Εποχή του χημικού ελέγχου με την εισαγωγή σε ένα νέο σκεπτικό ελέγχου των εντόμων, τα συνθετικά οργανικά εντομοκτόνα, με πρωτοπόρο το γνωστό DDT. Στην συνέχεια, αναπτύχθηκε η χρήση περαιτέρω ουσιών ως εντομοκτόνα, όπως οι οργανοχλωρίνες, τα οργανοφωσφορικά, οργανοθειικά, καρβαμιδικά, φορμαμιδίνες, δινιτροφαινόλες, οργανοτίνες, πυρεθροειδή, νικοτινοειδή, σπινοςίνες, φαινυλπυραζόλες, πυρόλες, πυραζόλες, πυριδαζιόνες, κουιναζολίνες, βενζουλουρίες, βοτανικά, συνεργιστικά ή ενεργοποιητικά εντομοκτόνα, αντιβιοτικά και πολλά ακόμη.



**Εικόνα 2.** "DDT: Το γεωργικό φάρμακο που αγαπήσαμε να... μισούμε θα απαγορευτεί εντελώς το 2017", 2022

Τον τελευταίο καιρό, ένας νέος ορίζοντας στην ανάπτυξη εντομοκτόνων αναδεικνύει την υπόθεση της χρήσης διαγονιδιακών εντομοκτόνων. Δηλαδή, γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί, στους οποίους έχει εισαχθεί DNA (διαγονίδιο) από άλλο οργανισμό, αποκτούν ιδιότητες εντομοκτόνων ουσιών.

Έρευνες σε αυτό τον τομέα των εντομοκτόνων ξεκίνησαν από το 1950-1990 με την χρήση τεχνικών της Βιοτεχνολογίας για να μεταφέρουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά από οργανισμούς σε καλλιέργειες φυτών. Το αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία εντομοκτόνων φυτών.

Ο Οργανισμός Περιβαλλοντικής Προστασίας (EPA) ορίζει ως εντομοκτόνα φυτά, εκείνα που έχουν τροποποιηθεί γενετικά και περιέχουν γονίδια δέλτα-ενδοτοξινών από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*. Ο ορισμός αυτός επεκτείνεται όσο γονίδια από άλλες πηγές θα εισάγονται στα φυτά (Ware & Whitacre, 2004).

Όμως, παρά τις προσπάθειες που υπάρχουν για την ανάπτυξη ασφαλών και οικονομικών εντομοκτόνων, είναι σημαντικό να βρεθούν λύσεις για την απορρύπανση εδαφών από επιβλαβείς ουσίες που συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των εντόμων, όπως τα οργανικά εντομοκτόνα, καθώς είναι ιδιαίτερα επιβλαβή για την δημόσια υγεία. Η δηλητηρίαση από οργανικά εντομοκτόνα αποτελεί σοβαρό πρόβλημα όχι μόνο στις αναπτυσσόμενες χώρες αλλά και στον Δυτικό πληθυσμό.

Τα οργανικά εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι οργανοφωσφορικά, οργανοκαρβαμικά, οργανοχλωρικά και πυρεθροειδή. Τα συμπτώματα της δηλητηρίασης από τις παραπάνω ουσίες ποικίλουν από γαστρεντερικά συμπτώματα ναυτίας, εμετού και διάρροιας μέχρι σοβαρά νευρολογικά προβλήματα με κρίσεις, νευρομυϊκή αδυναμία, παράλυση, καρδιακά επεισόδια αρρυθμίας (Peter, J. V., & Cherian, A. M., 2000). Σε μη εξειδικευμένους οργανισμούς, τα εντομοκτόνα μπορούν να προκαλέσουν διάφορα συμπτώματα, από πόνο μέχρι παράλυση και θάνατο (Gupta, n.d.).

## 1.2 Χρήση των εντομοκτόνων

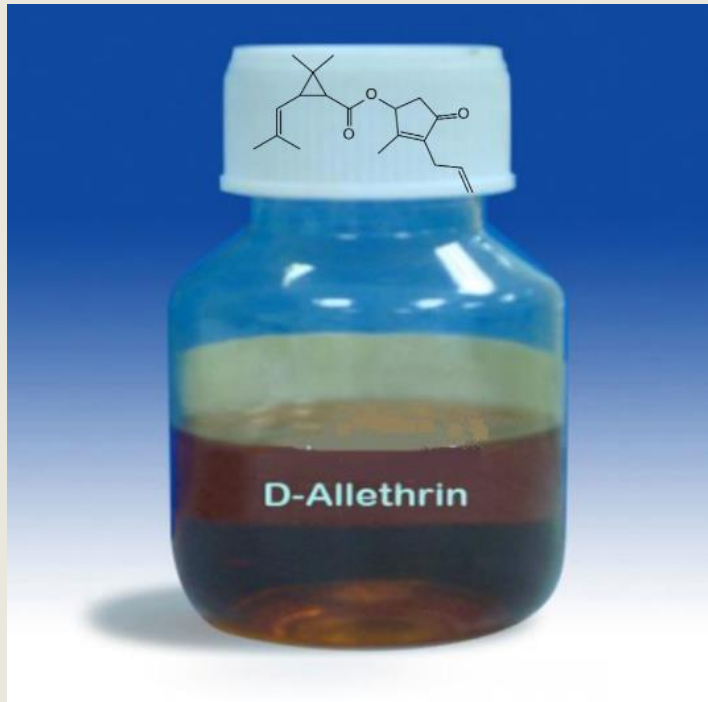
Εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως στην γεωργία, την κηπουρική, την δασοκομία στους κήπους, τα δάση και τους εσωτερικούς χώρους. Εφαρμόζονται σε έντομα με εκατοντάδες τρόπους, όπως ψεκαστήρες, δολώματα και διάχυση βραδείας αποδέσμευσης.

Τα εντομοκτόνα μπορούν να προσδένονται σε διάφορους προσδέτες, υποδοχείς και λοιπές πρωτεΐνες, ενώ τα σημεία πρόσδεσης, συμπεριλαμβανομένου τόσο των εντομοκτόνων και των μεταβολιτών τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της έκθεσης μέσω των συμπτωμάτων που προκαλούν οι εκάστοτε ουσίες (Gupta, n.d.).

Η σύσταση των εντομοκτόνων διαφέρει καθότι υπάρχουν πολλές χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για αυτό τον σκοπό και προκαλούν τοξικότητα τόσο σε έντομα, όσο και σε μη εξειδικευμένους στόχους, τα θηλαστικά, όπως τον άνθρωπο και είδη πτηνών, με διάφορους μηχανισμούς δράσης.

Τα φυσικά Πυρεθροειδή Εντομοκτόνα παράγονται από τα άνθη Χρυσανθέμων (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή εντομοκτόνο δράση, χαμηλή τοξικότητα σε θηλαστικά και ασταθή στον αέρα και στο φως. Σε γεωργικές συνθήκες είναι ασταθή, καθώς επίσης μεταβολίζονται ταχύτατα από τα έντομα σε μη εντομοκτόνους μεταβολίτες μέσω ενζυμικών οξειδωτικών μηχανισμών (MFOs).

Στην συνέχεια, παρασκευάστηκαν συνθετικά ανάλογα των φυσικών πυρεθροειδών με ενισχυμένες ιδιότητες εντομοκτόνων. Το 1949, παρασκευάστηκε το πρώτο πυρεθροειδές εντομοκτόνο με το όνομα allethrin.

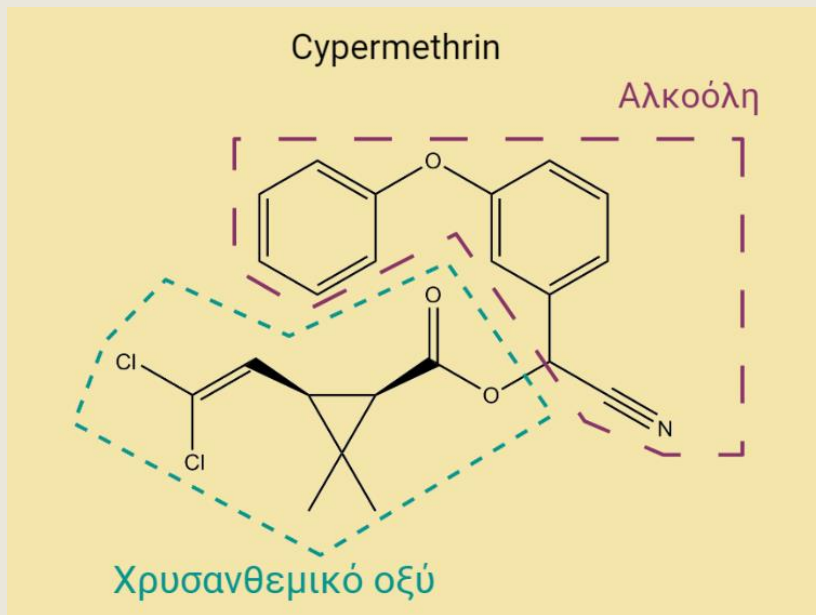


**Εικόνα 3.** D-allethrin, το πρώτο πυρεθροειδές εντομοκτόνο. Created by Biorender. (Pesticides & Chemicals, 2022)

Έπειτα, ακολούθησε η παραγωγή των resmethrin (1967), bioresmethrin και tetramethrin, τα οποία, όμως, εμφάνιζαν τα ίδια προβλήματα με τα φυσικά πυρεθροειδή. Το 1973, στο Rothamsted Experimental Station ανακαλύφθηκε το πρώτο συνθετικό πυρεθροειδές που συνδύαζε σταθερότητα στο φως, τον αέρα και είχε χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά, με ικανοποιητική εντομοκτόνη δράση, γνωστό ως permethrin. Με βάση αυτό, παράχθηκαν περαιτέρω εντομοκτόνες ουσίες, όπως τα cypermethrin, deltamethrin, cyhalothrin και cyfluthrin με βελτιωμένες ιδιότητες.

Η χημική τους δομή συμπεριλαμβάνει κυρίως εστέρες και αλκοόλες. Συγκεκριμένα, το cypermethrin έχει χημική δομή εστέρα διαλογονομένου παραγώγου του χρυσανθεμικού οξέος με κυανο - 3 φαινόξυ βενζυλική αλκοόλη (Casida, 2010).





Εικόνα 4. Το cypermethrin και τα μέρη στα οποία διασπάται. Created by Biorender.

### **1.3 Το περιβαλλοντικό αποτύπωμα και ο οικονομικός αντίκτυπος από την χρήση εντομοκτόνων**

Τα περισσότερα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται έναντι των εντόμων και φορέων ανθρώπινων ασθενειών (όπως ψύλλοι, μύγες και κουνούπια) προήλθαν ως spin-off από την αγροχημική έρευνα και ανάπτυξη. Η αξία του ασφαλούς και οικονομικού εντομοκτόνου για την δημόσια υγεία καταπατάται από διάφορους περιορισμούς και το ποσοστό των επερχόμενων προϊόντων λιγосτεύει διαρκώς. Η κινητοποίηση κρατικών επιχορηγήσεων και η εγκαθίδρυση νέων συνεργασιών είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη της έρευνας και την εξέλιξη για δημόσια υγιή εντομοκτόνα, καθώς και την απορρύπανση των εδαφών μετά από μια εποχή εκτεταμένης χρήσης του DDT και πυρεθροειδών εντομοκτόνων.

Ο έλεγχος των εντόμων φορέων ασθενειών είναι πολύ σημαντικός στην παγκόσμια στρατηγική για τον έλεγχο των αερομεταφερόμενων φορέων ασθενειών. Για κάποιες ασθένειες, η χρήση εντομοκτόνων είναι ο μοναδικός τρόπος για να ελεγχθεί η μετάδοσή τους. Μέχρι στιγμής η χρήση χημικών εντομοκτόνων παραμένει ως η πιο σημαντική λύση για τον έλεγχο των φορέων ασθενειών.

Οικονομικοί παράγοντες έχουν περιορίσει την ανάπτυξη της έρευνας νέων ουσιών και της εφαρμογής τους για τον έλεγχο των φορέων και των εντόμων για την διασφάλιση της δημόσιας υγείας. Κατά προσέγγιση, η πλειονότητα των πρωτογενών κατασκευαστών εντομοκτόνων δεν επιδιώκουν ενεργά την εύρεση νέων ουσιών με δράση εντομοκτόνων. Ένα τέτοιο εγχείρημα χρειάζεται περίπου 7 - 10 χρόνια για να πραγματοποιηθεί και το κόστος του ανέρχεται στα 50 εκατομμύρια δολάρια, προκειμένου να αναπτυχθεί και να καταχωρηθεί ένα νέο εντομοκτόνο.

Τα τελευταία χρόνια, η επιστήμη της Βιοτεχνολογίας κλωνοποίησε βακτηριακά γονίδια που κωδικοποιούν για εντομοκτόνες πρωτεΐνες και τις εισάγει σε διάφορες καλλιέργειες φυτών για να εξαλείψει τα έντομα που το καταναλώνουν.

Περίπου τα 10.000 από τα ένα εκατομμύριο είδη των εντόμων καταναλώνουν καλλιέργειες φυτών, ενώ περίπου τα 700 είδη προκαλούν παγκοσμίως ζημιά στις καλλιέργειες σε χωράφια ή σε αποθήκες.



Από τα τέλη του 20ου αιώνα, η συνολική παγκόσμια παραγωγή σιτηρών έχει αυξηθεί από 500 εκατομμύρια τόνους σε 700 εκατομμύρια τόνους λόγω της χρήσης των εντομοκτόνων. Η τροφή κινδυνεύει από τα έντομα κατά την διάρκεια της φυσικής ανάπτυξης και της αποθήκευσής τους. Παραδείγματα αποτελούν η Κίνα, μια χώρα με μεγάλη αγροτική παραγωγή, αλλά 40 εκατομμύρια τόνοι, δηλαδή περίπου το 8,8% των σιτηρών όλης της χώρας, χάνεται λόγω των διαφόρων εντόμων που τα προσβάλλουν. Η Ινδία παράγει ένα σύνολο 250 εκατομμυρίων τόνων σιτηρών τον χρόνο. Απο την συγκεκριμένη ποσότητα χάνεται, επίσης, το 11-15%.

Για αποφύγουν την απώλεια σιτηρών χρησιμοποιούν τα εντομοκτόνα, τα οποία όμως διανέμονται στο έδαφος, τον αέρα, το νερό και τα προϊόντα καλλιεργειών. Τα εντομοκτονα δεν ρυπαίνουν μόνο το έδαφος και τα σιτηρά, αλλά η ρύπανση επεκτείνεται στα υπόγεια ύδατα όπως και το υδάτινο περιβάλλον, γεγονός το οποίο απειλεί άμεσα την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον.

Προκειμένου να λυθεί αυτή η αντίθεση μεταξύ αγροτικών προϊόντων, με υψηλή απόδοση ή σταθερή παραγωγή, και της περιβαλλοντικής ρύπανσης, θα πρέπει να γίνει μελέτη για την ανάπτυξη εντομοκτόνων με χαμηλή τοξικότητα, υψηλή απόδοση και χαμηλή υπολειμματικότητα. Παράλληλα, κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη μεθόδων αποδόμησης των καταλοίπων εντομοκτόνων που εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα περιβαλλοντικά δείγματα (Huang et al., 2018).

### 1.4.1. Το $\alpha$ -cypermethrin

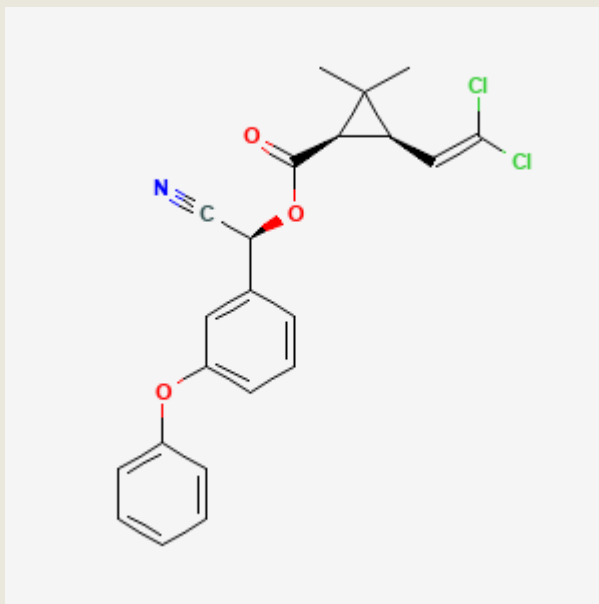
Το cypermethrin είναι ένα από τα πιο σημαντικά εντομοκτόνα και αποτελεί παράδειγμα για την αύξηση του ποσοστού κατανάλωσης αφού η συνολική χρήση του στην Ινδία είναι 7.300 τόνοι ενεργού συστατικού κάθε χρόνο (Diegelmann, Weber, Heinzl-Wieland & Kemme, 2015). Αρχικά, συντέθηκε το 1974 και κυκλοφόρησε στην αγορά το 1977 ως ένα συνθετικό πυρεθροειδές, αποτελεσματικό έναντι πολλών ειδών εντόμων στην γεωργία, στην δημόσια υγεία και στην κτηνοτροφία. Στην γεωργία, η κύρια χρήση του είναι έναντι εντόμων που προσβάλλουν το φύλλωμα των καλλιεργειών και ορισμένων εντόμων εδάφους.

Το 1980, το 92.5% των ποσοτήτων cypermethrin χρησιμοποιούνταν στην καλλιέργεια του βαμβακιού. Το 1982 παράγονταν 340 τόνοι από το συγκεκριμένο ενεργό υλικό και χρησιμοποιούνταν με τη μορφή συμπυκνωμένου γαλακτώματος σε μεγάλες συγκεντρώσεις αλλά υπήρχε και σε μικρές ποσότητες αναμεμιγμένο με άλλες εντομοκτόνες ουσίες.

Κατά το πέρας των τριών τελευταίων δεκαετιών, τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς τόσο ως γεωργικά εντομοκτόνα όσο και για την απεντόμωση οικιακών κτιρίων, αντικαθιστώντας εντομοκτόνα που εμφανίζουν υψηλότερη τοξικότητα όπως είναι τα οργανοχλωριωμένα και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Μεταξύ των ενώσεων αυτών είναι και το  $\alpha$ -cypermethrin, το οποίο ανήκει στην τέταρτη γενιά συνθετικών πυρεθροειδών και αποτελεί λιποφιλικό εστέρα με μια  $\alpha$ -κυανοφαινοξυβενζυλική αλκοόλη και ένα διχλωροβινυλ-κυκλοπροπανο-καρβοξυλικό οξύ.

Το  $\alpha$ -cypermethrin αποτελεί ένα υψηλά ενεργό πυρεθροειδές εντομοκτόνο, αποτελεσματικό ενάντια σε μια μεγάλη ποικιλία εντόμων που εδράζονται στην γεωργία και στην κτηνοτροφία (Cypermethrin, 1989).

Είναι ένα μόριο μοριακής μάζας 416.3. Το σημείο τήξης του είναι στους 78-81°C με μοριακό τύπο [C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>](#). Η φυσική όψη του εντομοκτόνου ποικίλει από ένα καφέ-κίτρινο παχύρευστο υγρό έως ημιστερέο. Το cypermethrin έχει πολύ χαμηλή πίεση ατμών και διαλυτότητα στο νερό, αλλά είναι ιδιαίτερος διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες (Cypermethrin, 1989).



**Εικόνα 5.** Η δομή του  $\alpha$ -cypermethrin. "alpha-cypermethrin", 2022

Χημικά, το cypermethrin ονομάζεται  $\alpha$ -κυανο-3-φαινοξυβενζυλ εστέρας που προέρχεται από το δίχλωρο ανάλογο του χρυσαυθαιμικού οξέος, 2,2 - διμέθυλο - 3- (2,2- διχλωροβενύλ) κυκλοπροπανοκαρβοξυλικό οξύ. Το μόριο περιέχει τρία ασύμμετρα κέντρα, 2 με δακτύλιους κυκλοπροπανίου και ένα σε ένα  $\alpha$ -κυανο άνθρακα.

Το cypermethrin αποτελεί ένα μίγμα από τέσσερις cis και τέσσερις trans ισομερείς ενώσεις. Τα cis ισομερή είναι, βιολογικά, πιο ενεργά και σταθερά από τα trans ισομερή. Το  $\alpha$ -cypermethrin περιλαμβάνει ένα μίγμα από τα δυο πιο ενεργά ισομερή. Τυπικά, το cypermethrin περιέχει 25% από το  $\alpha$ -cypermethrin (Pronk, Speijers, Wouters & Ritter). Η επιτροπή ειδικών του FAO/WHO στα πρόσθετα τροφίμων επιβεβαιώνει ότι το επίπεδο μη παρατηρούμενης επιθυμητής ενέργειας (NOAEL or No-observed-adverse-effect level) είναι στην συγκέντρωση 1.5 mg/kg την ημέρα για το  $\alpha$ -cypermethrin ("alpha-cypermethrin", 2022).

### 1.4.2. Η χρήση και η δράση του $\alpha$ -cypermethrin

Το  $\alpha$ -cypermethrin χρησιμοποιείται παγκοσμίως στην γεωργία, αλλά και στην κτηνοτροφία ως αποπαρασιτικό, ενώ μετά από πολλές συζητήσεις ύστερα από διαφωνίες με τους ειδικούς έχει εγκριθεί ως φάρμακο για την θεραπεία από τις θαλάσσιες ψείρες σε φάρμες σολομού στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Στην Αμερική, το μεγαλύτερο ποσοστό της χρήσης του cypermethrin παρατηρείται σε γεωργικές εφαρμογές για τον έλεγχο των παρασίτων σε κλειστούς και ανοιχτούς χώρους, όπως την διατήρηση ξύλου, στην δασοκομία και την ξυλεία, απολύμανση κτιρίων και μεταφορικών μέσων, ψεκασμό οικιακών αποβλήτων, βιοκτόνο εμπότισμό κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων και σε προγράμματα δημόσιας υγείας (Environment Agency, 2019).



**Εικόνα 6.** Η χρήση του cypermethrin ως εντομοκτόνο. (Chemicals & Insecticides, 2022)

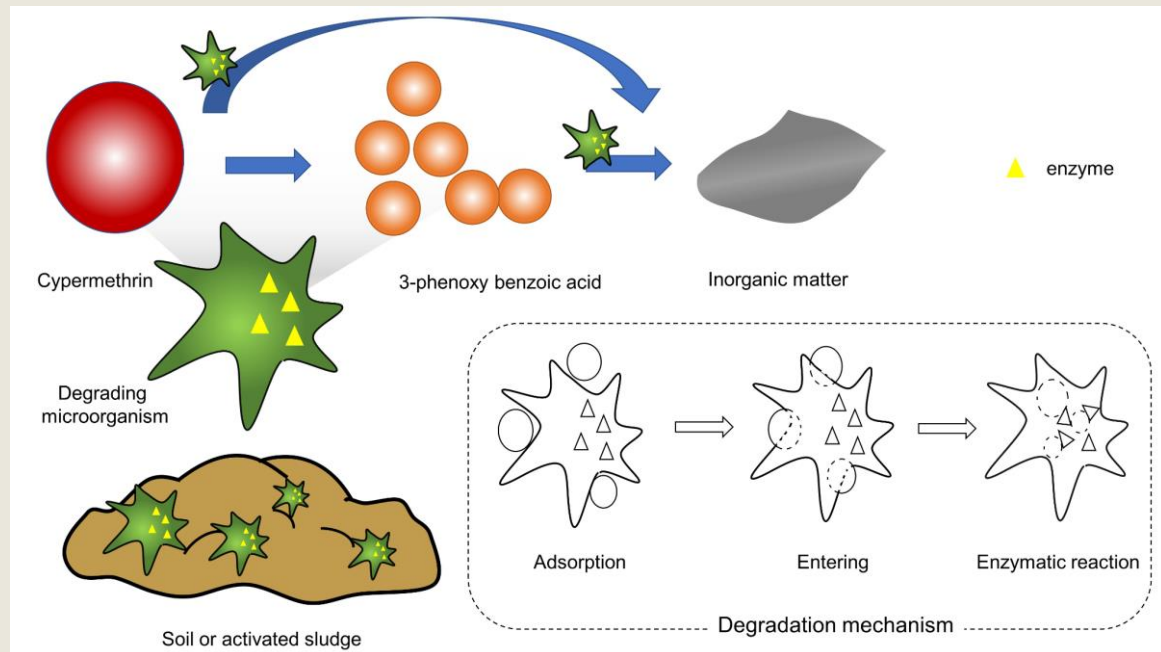
Το cypermethrin είναι ένα εντομοκτόνο μακράς διάρκειας με δράση εξ επαφής, η οποία εκδηλώνεται μέσω διαταραχών στο στομάχι του εντόμου, που μασάει ή πιπιλάει το γεωργικό φάρμακο. Η δράση του επηρεάζει κυρίως τα κανάλια νατρίου των νευρικών αξόνων. Λόγω της  $\alpha$ -κυανομάδας, η πρόσδεση του cypermethrin σχετίζεται με παρατεταμένα σήματα που προκαλούνται από την απελευθέρωση  $\text{Na}^+$  σε συνδυασμό με την εκπόλωση των νευρικών μεμβρανών. Ως αποτέλεσμα, επέρχεται τελικά η κατάρρευση

των νευρώνων που οδηγεί σε σπαστική μυϊκή παράλυση και θάνατο των εντόμων. Η τοξικότητα του *α-cypermethrin* είναι υψηλή σε κάποια είδη ψαριών και κάποια θαλάσσια ασπόνδυλα, ενώ είναι χαμηλή στα πτηνά και τα θηλαστικά. Μικρή, αλλά χρόνια, έκθεση του εντομοκτόνου μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην υγεία του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένου και προβλήματα αναπαραγωγής και ανάπτυξης, έχει νευροσυμπεριφορικές παρενέργειες, καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ, επίσης, θεωρείται πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Η συνεχώς αυξανόμενη χρήση του *cypermethrin* έχει αντίκτυπο στο περιβάλλον καθώς ένα μεγάλο ποσοστό του εντομοκτόνου καταλήγει σε χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα. Ως υδρόφοβη ουσία, το *α-cypermethrin* έχει πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, με αποτέλεσμα να προκαλείται προσρόφηση του στο οργανικό κλάσμα του εδάφους. Η αύξηση του φορτίου πυρεθροειδών στα εδαφικά και υδάτινα οικοσυστήματα έχει οδηγήσει στην αύξηση του ενδιαφέροντος για εύρεση μεθόδων απομάκρυνσης των υπολειμμάτων του από το περιβάλλον. Έτσι, η βιοαποκατάσταση, ως φιλική προς το περιβάλλον και αποτελεσματική τεχνολογία, αποτελεί μια σημαντική στρατηγική για την εξυγίανση ρυπασμένων εδαφών από εντομοκτόνους ρυπαντές. Υπάρχουν όλο και περισσότερες αποδείξεις ότι βακτήρια από διαφορετικές ταξινομικές ομάδες έχουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση και αποτοξικοποίηση των πυρεθροειδών.

Πρόσφατα, διάφορα βακτηριακά στελέχη που αποδομούν το *cypermethrin* και ανήκουν στο φύλο πρωτεοβακτήρια έχουν χαρακτηριστεί, συμπεριλαμβανομένου μελών των γενών *Azoarcus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sphingobium*, και *Stenotrophomonas*. Η μικροβιακή αποδόμηση των πυρεθροειδών είναι περίπλοκη και περιλαμβάνει μια σειρά από βιοχημικές αντιδράσεις που καταλύονται από ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά ένζυμα, όπως ισομεράσες, υδρολάσες και οξειδάσες. Η κυριότερη αντίδραση που συμπεριλαμβάνεται στον μεταβολισμό του *cypermethrin* είναι η αποκοπή ενός υδρολυτικού εστέρα, μέσω της δράσης καρβοξυλεστερασών. Γονίδια που κωδικοποιούν για καρβοξυλεστεράσες, που αποδομούν το *α-cypermethrin* έχουν ήδη κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί (Diegelmann, Weber, Heinzel-Wieland & Kemme, 2015).

### 1.4.3. Αποδόμηση του $\alpha$ -cypermethrin

#### 1.4.3.1. Βιολογική αποδόμηση



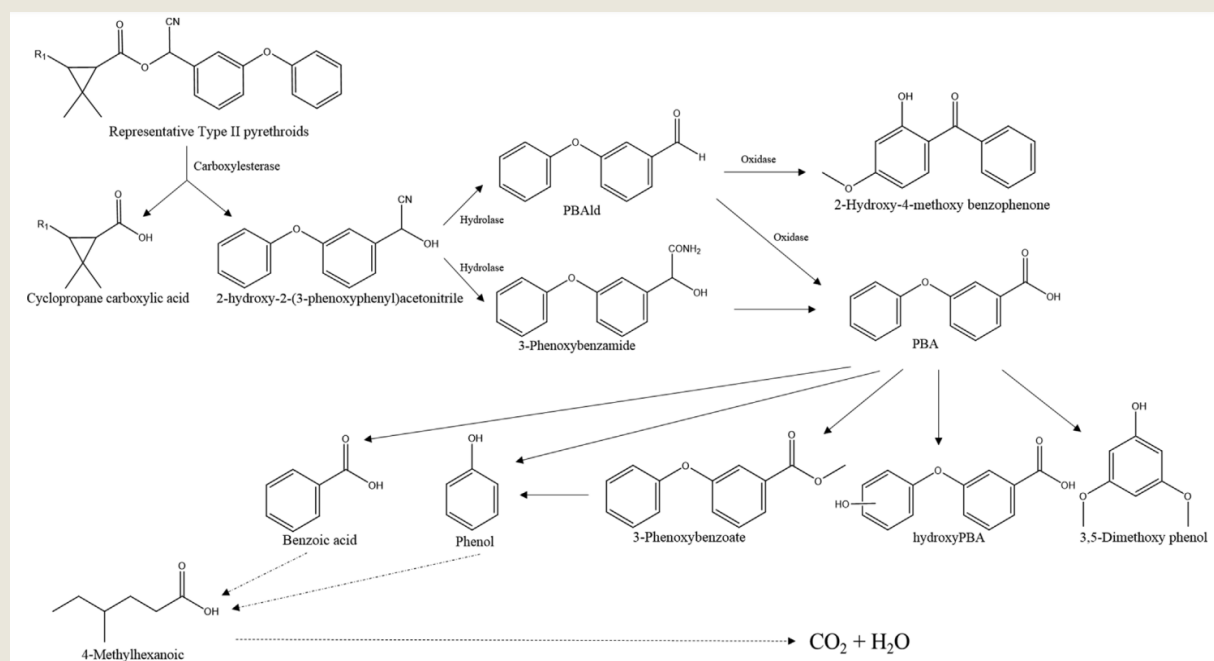
**Εικόνα 7.** Η βιολογική αποδόμηση του cypermethrin γίνεται από βακτήρια που με χρήση ενζύμων παράγουν ανόργανη ύλη (Huang et al., 2018).

Τα εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως και προκαλούν πολλά προβλήματα τόσο στην ανθρώπινη υγεία, όσο και στο περιβάλλον. Γι' αυτό, είναι ιδιαίτερα σημαντική η μελέτη της μικροβιακής αποδόμησης των εντομοκτόνων στο περιβάλλον με τελικό στόχο την αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών.

Η βιοαποδόμηση των πυρεθροειδών γίνεται από διάφορα στελέχη βακτηρίων και μυκήτων, όπως *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Achromobacter*, *Acidomonas*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Sphingobium*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Acinetobacter*, *Aspergillus*, *Candida*, *Trichoderma* και *Candida* (Cycoń and Piotrowska-Seget, 2016; Birolli et al., 2019; Hu et al., 2019; Zhao et al., 2019). Το πρώτο βήμα για την βιολογική αποδόμηση είναι η υδρόλυση του εστερικού δεσμού από κάποιο ένζυμο εστεράσης ή καρβοξυλεστεράσης. Τα βακτήρια καταναλώνουν πυρεθροειδή, ως πηγή άνθρακα και αζώτου, γεγονός που φαίνεται από το μοτίβο της βιολογικής αποδόμησης και την ανίχνευση μεταβολιτών.



Το cypermethrin είναι μια μη πολική ένωση που προσροφάται από τα κolloειδή του εδάφους, σε αντίθεση με τους μεταβολίτες του, που είναι ευκίνητοι στο εδαφικό περιβάλλον. Το cypermethrin, όπως και άλλα εντομοκτόνα αποδομούνται δύσκολα σε φυσικές συνθήκες, ενώ παράλληλα η ουσία 3 - φαινοξυ βενζοϊκό οξύ (PBA) (Εικόνα 8) είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης που παράγεται κατά την αποδόμηση και προκαλεί δευτερογενή ρύπανση σε προϊόντα καλλιεργειών καθώς και μια σειρά άλλων προβλημάτων (Huang et al., 2018). Τα εντομοκτόνα έχουν αναπόφευκτα ενσωματωθεί στο μοντέρνο περιβάλλον, καθώς χρησιμοποιούνται ευρέως. Έτσι, αυτή η εξελικτική πίεση που δημιουργείται από την χρήση τους οδηγεί στην ανάγκη εξέλιξης και των μικροοργανισμών που εκτίθενται σε αυτά. Ως αποτέλεσμα, πολλά εντομοκτόνα, όπως το cypermethrin, αποτελούν υπόστρωμα για κάποια βακτήρια που έχουν αναπτύξει την ικανότητα αποδόμησης αυτού του γεωργικού φαρμάκου.



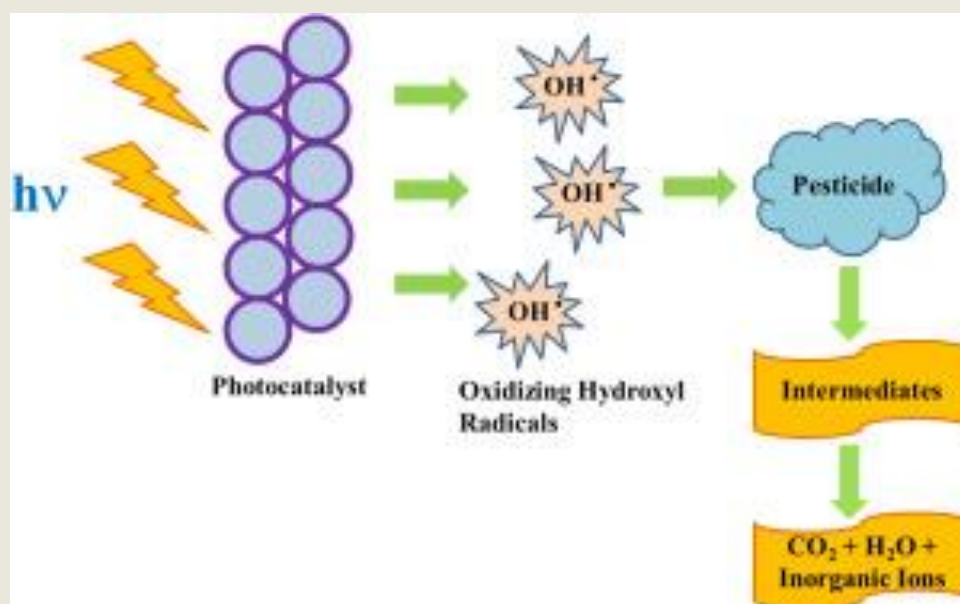
**Εικόνα 8.** Η αποδόμηση του  $\alpha$ -cypermethrin στο έδαφος ξεκινάει αρχικά με διάσπαση του εστερικού δεσμού προς δημιουργία CPA, PBA και διοξειδίου του άνθρακα. Μία ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα δημιουργείται από την διάσπαση των κυκλοπροπυλικών και φαινολικών δακτυλίων κάτω από οξειδωτικές συνθήκες (Zhan, Huang, Lin, Bhatt & Chen, 2020)

Αναπτυσσόμενες έρευνες έχουν οδηγήσει στην εύρεση νέων γονιδίων που κωδικοποιούν για εστεράσες και συμμετέχουν στην αποδόμηση πυρεθροειδών. Συγκεκριμένα, το γονίδιο *estP*, που κωδικοποιεί για μια εστεράση, βρέθηκε ότι συμβάλλει στην αποδόμηση

ποικιλίας πυρεθροειδών εντομοκτόνων (Wu et al., 2006). Ένα νέο γονίδιο, το *pytH*, που κωδικοποιεί για μια καρβοξυλεστεράση, που επίσης βρέθηκε ότι αποδομεί πυρεθροειδή, ανιχνεύθηκε στο *Sphingobium sp.* στελεχους JZ1, ενώ παρατηρήθηκε ότι κατά την δράση του δεν απαιτείται η παρουσία συμπαραγόντα για την αποδόμηση πυρεθροειδών (Wang et al., 2009). Ταυτόχρονη έκφραση δύο γονιδίων, της οργανοφωσφορικής υδρολάσης (*opd*) και της καρβοξυλεστεράσης B1 (*b1*), από τα βακτήρια *Flavobacterium sp.* και *Culex ripiens*, αντίστοιχα, χρησιμοποιούνται για την αποδόμηση οργανοφωσφορικών, καρβαμιδικών και πυρεθροειδών εντομοκτόνων. Η καρβοξυλεστεράση 001D που απομονώθηκε από το *Helicoverpa armigera* και εκφράστηκε ετερόλογα σε βακτήρια *E. coli*, πιθανόν υδρόλυσε το cypermethrin και το fenvalerate. (Li et al., 2016).

#### 1.4.3.2. Χημική αποδόμηση

Το cypermethrin, σε αντίθεση με τις φυσικές πυρεθρίνες, είναι σχετικά σταθερό στο φως του ήλιου. Παρόλο που η φωτοαποδόμηση του είναι πιθανή σε φύλλα και στην επιφάνεια του νερού, στο έδαφος η αποδόμηση του περιορίζεται. Τα πιο σημαντικά προϊόντα της αποδόμησης από το φως είναι το 2,2- διμέθυλ - 3 (2,2 - διχλωροβινύλ) κυκλοπροπανοκαρβοξυλικό οξύ (CPA), το 3- φαινοξυβενζοϊκό οξύ (PBA) και, σε κάποιο ποσοστό, τα αμίδια από εστέρες, τα οποία προκύπτουν και από την βιολογική αποδόμηση (Cypermethrin, 1989).



Εικόνα 9. Χημική αποδόμηση εντομοκτόνων σε  $\text{CO}_2$  και  $\text{H}_2\text{O}$  (Vaya & Surolia, 2020).

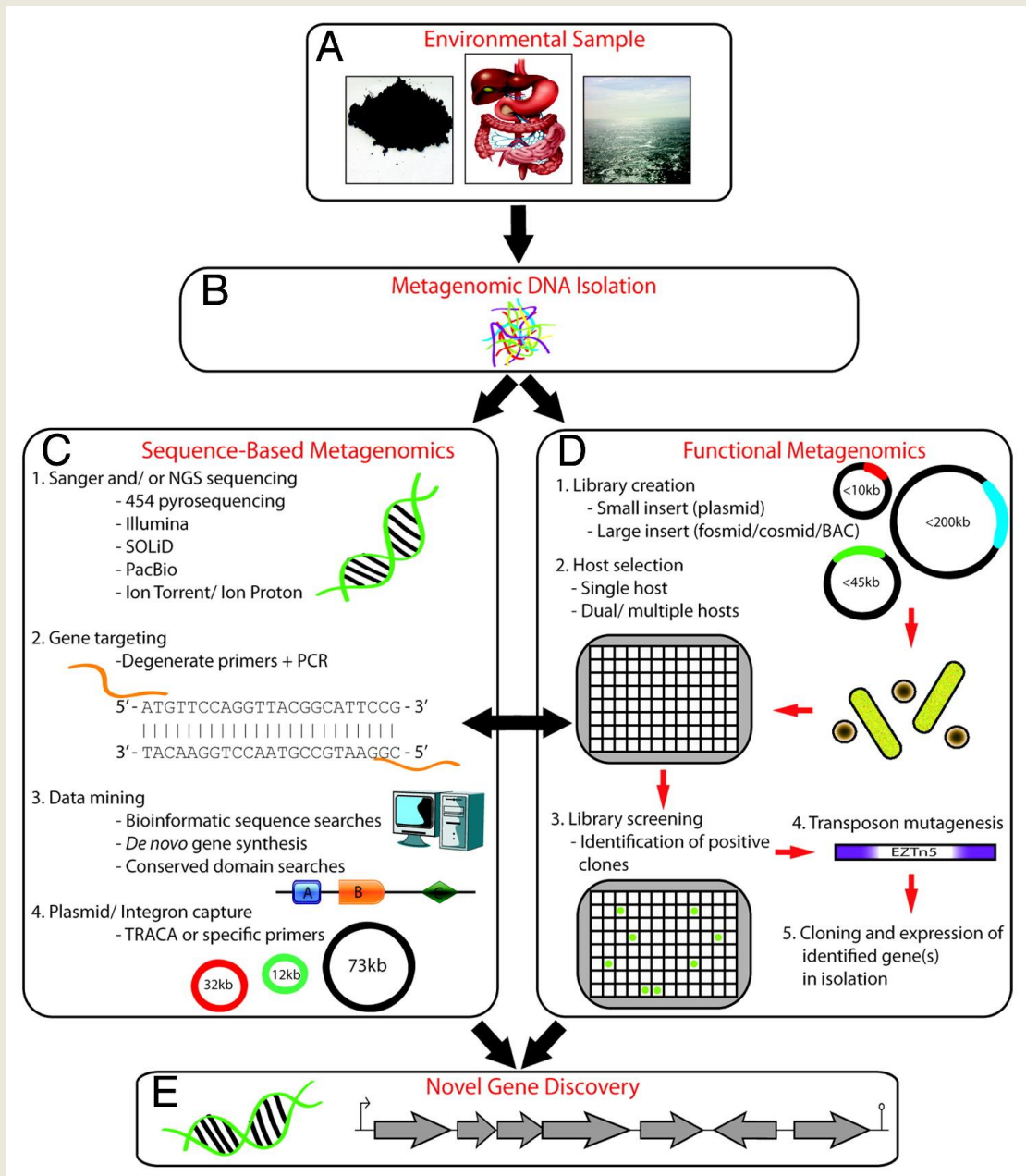


Η υπολειμματικότητα του cypermethrin διαφέρει στο νερό, τα ιζήματα και το έδαφος. Οι τιμές  $DT_{50}$  είναι 2,5 μέρες στο νερό, 9,8 ημέρες στα ιζήματα, ενώ στο έδαφος σε θερμοκρασία περίπου 20°C είναι 6-24 μέρες υπό αερόβιες συνθήκες και 46°C υπό αναερόβιες συνθήκες ("CYPERMETHRIN CAS no. 52315-07-8 Evaluation report according to Regulation 528/2012 Arysta LifeScience Benelux sprl, Belgium", 2017).

## 1.5. Η Μεταγονιδιωματική ανάλυση και οι εφαρμογές της

Οι μικροοργανισμοί αναπαριστούν τους δύο από τους τρεις τομείς της ζωής και χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλία, γεγονός που προέκυψε έπειτα από 3.8 δισεκατομμύρια χρόνια εξέλιξης. Σε πολλά περιβάλλοντα, περίπου το 99% των μικροοργανισμών δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με βασικές τεχνικές. Έτσι, κρίνεται αναγκαίο να αναπτυχθούν μέθοδοι χωρίς την καλλιέργεια μικροοργανισμών, προκειμένου να κατανοήσουμε την γενετική ποικιλότητα, την πληθυσμιακή δομή και τον οικολογικό ρόλο της πλειονότητας των μικροοργανισμών (Riesenfeld, Schloss & Handelsman, 2004). Η μεταγονιδιωματική, γνωστή και ως περιβαλλοντική γονιδιωματική ή γονιδιωματική των κοινοτήτων (Handelsman, 2004a), είναι η τεχνολογία που ξεπερνά την ανάγκη της απομόνωσης ή καλλιέργειας μικροοργανισμών και επιτρέπει την απομόνωση γενετικού υλικού κατευθείαν από τα περιβαλλοντικά δείγματα. Μεταγονιδιωματικά εργαλεία χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και ταυτοποίηση ενζύμων με νέες βιοκαταλυτικές ιδιότητες από μη καλλιεργήσιμους μικροοργανισμούς (Madhavan, Sindhu, Parameswaran, Sukumaran & Pandey, 2017).

Η ανάλυση μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών μπορεί να ακολουθήσει δυο μονοπάτια (Εικόνα 10): την ανάλυση που βασίζεται στην αλληλούχιση και την ανάλυση που βασίζεται στην λειτουργία. Από την μια, βιβλιοθήκες χρησιμοποιούνται για ανάλυση μέσω υβριδοποίησης ή PCR για την ανίχνευση γονιδίων ομόλογων με γνωστά γονίδια. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ενδιαφέρουσα για αναλύσεις σε λιγότερο περίπλοκα περιβάλλοντα από το έδαφος, όπου μπορεί να προσφέρει πληροφορίες αναφορικά με την λειτουργία και την εξέλιξη άγνωστων οργανισμών. Με αυτό τον τρόπο, όμως, η ανάλυση περιορίζεται στην ανακάλυψη γονιδίων σε βιβλιοθήκες με γνωστά γονίδια και χρειάζεται βαθιά αλληλούχιση για την συναρμολόγηση της ακολουθίας του δείγματος. Από την άλλη, η λειτουργική ανάλυση επιτρέπει την ανακάλυψη νέων γονιδίων με χρήσιμες λειτουργίες και βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Σημαντικά μειονεκτήματα είναι το χαμηλό ποσοστό επιτυχίας, ενώ επίσης η μέθοδος εξαρτάται από την εγκαθίδρυση γρήγορων και απλών μεθόδων χρωματογραφίας για high-throughput αναλύσεις και απαιτεί την ετερόλογη έκφραση γονιδίων σε εργαστηριακά βακτήρια, όπως το *E. coli*. (Handelsman, 2005c).



**Εικόνα 10.** Οι βασικές μέθοδοι ανακάλυψης νέων γονιδίων χρησιμοποιώντας την μεταγονιδιωματική ανάλυση. Η μεταγονιδιωματική περιλαμβάνει την κατασκευή μιας DNA βιβλιοθήκης από μια μικροβιακή κοινότητα του περιβάλλοντος και στην συνέχεια, ανάλυση των λειτουργιών ή των αλληλουχιών της βιβλιοθήκης (Culligan, Sleator, Marchesi & Hill, 2013).

Η λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση αποτελεί μια προσέγγιση με πολλές δυνατότητες και πολλές δυσκολίες κατά την οποία γίνεται ανίχνευση των κλώνων που εκφράζουν μια λειτουργία. Σε αυτή την προσέγγιση, πρέπει να υπάρχει πιστή μεταγραφή και μετάφραση του γονιδίου ή των γονιδίων ενδιαφέροντος και έκκρισή του αντίστοιχου ενζύμου, στην περίπτωση που το πρωτόκολλο το απαιτεί. Με την βοήθεια της λειτουργικής μεταγονιδιωματικής ανάλυσης έχουν εντοπιστεί βιοσυνθετικά μονοπάτια παραγωγής νέων

αντιβιοτικών (Courtois et al., 2003; Gillespie; yroy et al., 2002; Wang et al., 2000), γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (Diaz-Torres et al., 2003), ένζυμα μεταφορείς (Majerník, Gottschalk & Daniel, 2001) και ένζυμα αποδόμησης ουσιών (Henne, Schmitz, Bömeke, Gottschalk & Daniel, 2000). Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν χρειάζεται να είναι γνωστή η αλληλουχία του γονιδίου ενδιαφέροντος. Για αυτό τον λόγο, η λειτουργική μεταγονιδιωματική είναι η μόνη προσέγγιση μεταγονιδιωματικής που προσδίδει την δυνατότητα ανίχνευσης νέων ενζύμων με καινούργιες ή γνωστές λειτουργίες. Το σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι κάποια από τα γονίδια δεν θα εκφραστούν επιτυχώς στα συμβατικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται για την ετερόλογη έκφραση των γονιδίων. Το βακτήριο *E. coli* έχει αποτελέσει σημαντικό βακτήριο ξενιστή για το DNA μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών, αλλά η ετερόλογη έκφραση παραμένει εμπόδιο για την εξαγωγή της μέγιστης πληροφορίας χρησιμοποιώντας τεχνικές λειτουργικής μεταγονιδιωματικής ανάλυσης (Handelsman, 2005c).

## 1.6. Στόχος της παρούσας εργασίας

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου

Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, βασισμένες στις τεχνικές της λειτουργικής μεταγονιδιωματοικής μελέτησαν βιομίγματα από βιοκλίνες με εκτεταμένη έκθεση σε πλήθος διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων. Υποστρώματα, που εκτίθενται για εκτεταμένο χρονικό διάστημα σε γεωργικά φάρμακα, αποτελούν ιδανικές πηγές για την απομόνωση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα για την αποδόμησή τους. Τα πειράματα αποσκοπούσαν τον εντοπισμό νέων καταβολικών γονιδίων, που κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στην αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων. Η διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων μελετήθηκε σε διαφορετικά πειράματα για το κάθε φάρμακο.

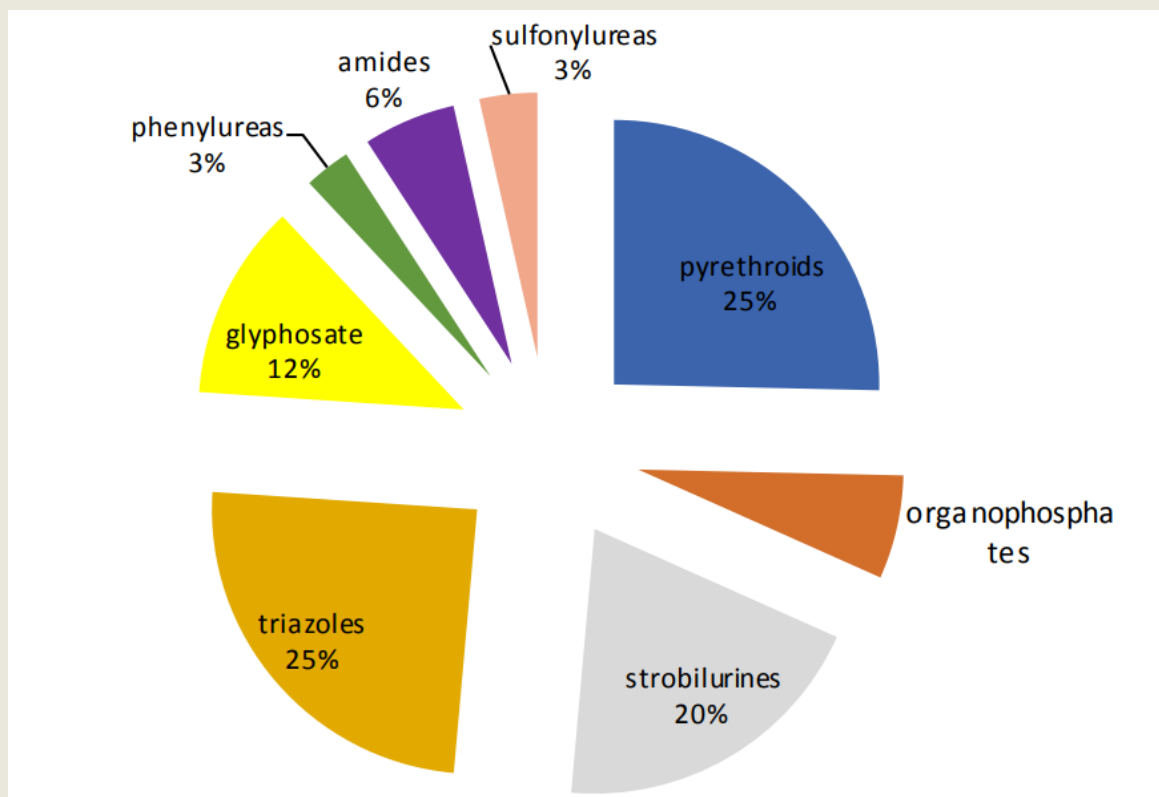
Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο εντοπισμός νέων γονιδίων που σχετίζονται με την έκφραση νέων ενζύμων που εμπλέκεται στην αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου *α-cypermethrin*, ένα από τα γεωργικά φάρμακα στα οποία είχε εκτεθεί το βιομίγμα, με χρήση τεχνικών λειτουργικής μεταγονιδιωματοικής. Για την ανίχνευση γονιδίων υπεύθυνων για την αποδόμηση του *α-cypermethrin*, πραγματοποιήθηκαν τυχαίες μεταλλάξεις με την χρήση τρανσποζονίου.

## 2. Πειραματικό Μέρος

# Ερευνητική προσέγγιση

## 2.1. Εισαγωγικά

Τα δείγματα βιομίγματος που μελετήθηκαν, συλλέχθηκαν από σύστημα βιοκλίνης από τον πειραματικό αγρό του INRAE στη Ντιζόν της Γαλλίας, το οποίο είχε ιστορικό έκθεσης κυρίως σε πυρεθροειδή, τριαζόλες, στρομπιλουρίνες και οργανοφωσφορικά, όπως φαίνεται και στην εικόνα 11 (Perruchon et al., 2022).



**Εικόνα 11.** Ιστορικό έκθεσης των δειγμάτων βιομίγματος σε διάφορα γεωργικά φάρμακα (Perruchon et al., 2022).

Λόγω του ιστορικού έκθεσης των βιομιγμάτων σε διάφορα γεωργικά φάρμακα, επιδιώκεται η απομόνωση εστερασών, αρωματικών μονοξυγενασών και απομεθυλασών-μονοξυγενασών, ένζυμα γνωστά για την συμμετοχή τους στην αποδόμηση πυρεθροειδών (Li, Wang & Liu, 2008), οργανοφωσφορικών (Singh & Walker, 2006), τριαζολών και φαινιλουριών (Wang et al., 2022), αντίστοιχα.

Προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο οδήγησε στην δημιουργία μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης φοσμιδίων 20.000 κλώνων οι οποίοι ελέγχθηκαν για δραστικότητα εστεράσης μέσω διαφορετικών δοκιμών διαλογής (δοκιμές magenta-caprylate υδρόλυσης, υδρόλυσης *α*-naphthyl acetate και tributyrin). Εννέα φοσμίδια εντοπίστηκαν θετικά στην δοκιμή tributyrin και τρία στην δοκιμή υδρόλυσης magenta caprylate. Τα θετικά στους παραπάνω φαινότυπους φοσμίδια αλληλουχήθηκαν με Illumina HiSeq Rapid Mode 2 x 250 bp.



## 2.2. Θρεπτικά μέσα και καλλιέργειες

### → Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων *Escherichia coli*

Για την υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Luria Bertani (LB). Για την προετοιμασία στερεού θρεπτικού μέσου LB προστέθηκε άγαρ σε τελική συγκέντρωση 1,5%. Η αποστείρωση έγινε σε αυτόκαυστο για 25 min στους 120°C και υπό πίεση 2,1 atm. Για την σωστή διαλογή κλώνων και την αποφυγή του κινδύνου επιμολύνσεων γίνεται προσθήκη των κατάλληλων αντιβιοτικών.

### → Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται είναι η Chloramphenicol (CHL) σε συγκέντρωση 12,5 ug/ml, καθώς τα φοσμίδια διαθέτουν γονίδιο αντίστασης στην Chloramphenicol, και η Kanamycin (Kan) σε συγκέντρωση 50 ul/ml, καθώς το τρανσποζόνιο που εισάγουμε διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Kanamycin.

### → L-αραβινόζη

Στις περιπτώσεις που χρειάζονται πολλαπλά αντίγραφα του φοσμιδίου προστίθεται 10% w/v L-αραβινόζη στο θρεπτικό της καλλιέργειας.

### → Αρχικό διάλυμα $\alpha$ -cypermethrin

Παρασκευάστηκε διάλυμα  $\alpha$ -cypermethrin συγκέντρωσης 20000 mg/L σε DMSO, το οποίο αποστειρώθηκε με διήθηση με φίλτρο σύριγγας 0,22  $\mu$ m υπό ασηπτικές συνθήκες. Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία θρεπτικού LB +  $\alpha$ -cypermethrin.

### → Stock γλυκερόλης σε πλάκες 96 φρεατίων

Στα stock γλυκερόλης εμπεριέχονται γλυκερόλη 15%, κατάλληλο αντιβιοτικό με την αντίστοιχη συγκέντρωση και υγρό θρεπτικό υλικό Luria-Bertani Broth (LB). Στην συγκεκριμένη περίπτωση, σε αυτό το διάλυμα, προστέθηκαν αποικίες με χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Η επώαση γίνεται στους 37°C σε επωαστικούς θαλάμους κατά την διάρκεια της νύχτας. Στην συνέχεια, τοποθετείται μεμβράνη ασφαλείας ( 96-well sealing film) και η αποθήκευση γίνεται στους -80°C.

→ Παραγωγή ηλεκτρο-δεκτικών βακτηρίων *E. coli* EPI300 (Epicentre)

Οι δυνατότητες που προσφέρει η λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση για την ταυτοποίηση δραστηριοτήτων μικροοργανισμών περιορίζονται λόγω της χαμηλής απόδοσης της γονιδιακής έκφρασης σε άλλα βακτήρια ξενιστές που χρησιμοποιούνται στον φαινοτυπικό εντοπισμό. Έχουν αναπτυχθεί φορείς και σειρές *E. coli* κυττάρων ως βελτιωμένα ετερόλογα συστήματα έκφρασης μεταγονιδιωματικού DNA (Terrón-González, Medina, Limón-Mortés & Santero, 2013). Τα βακτήρια *E. coli* EPI300 έχουν κάποια χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην υψηλή απόδοση γενετικής έκφρασης των φοσμιδίων. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι:

1. Απουσία του *trfA* γονιδίου, το οποίο ελέγχεται από επαγόμενο υποκινητή για απόλυτο έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων των φοσμιδίων
2. Περιέχουν την ενδονουκλεάση A1 για να εξασφαλιστεί υψηλή απόδοση κατά την κλωνοποίηση πλασμιδίων
3. Περιέχουν την ρεκομπινάση A1 για να εξασφαλίσει την σταθερότητα κατά την κλωνοποίηση μεγαλύτερων φορέων. (Manual: TransforMax EPI300 Electrocompetent *E. coli* and TransforMax EPI300 Chemically Competent *E. coli*, 2021)

Για την εξυπηρέτηση των αναγκών του πειράματος παρήχθησαν βακτήρια *E. coli* EPI300 για ηλεκτροδιάτρηση. Για την προετοιμασία των κυττάρων είχαν καλλιεργηθεί κύτταρα *E. coli* της σειράς EPI300 σε στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ, ολονύκτια. Την επόμενη μέρα, μεταφέρθηκαν δυο αποικίες σε ειδικά δοχεία falcon με υγρό θρεπτικό υλικό και επώαστηκαν στους 37°C σε 220 κύκλους / δευτερόλεπτο για 16 ώρες. Στην συνέχεια, τα 5 ml κάθε καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε 100 ml υγρού θρεπτικού υλικού σε αποστειρωμένες φλάσκες των 300 ml και επώαστηκαν στους 37°C σε 220 στροφές / δευτερόλεπτο έως ότου η οπτική πυκνότητα βρίσκεται μεταξύ 0.4 και 0.6.

Έπειτα, μεταφέρθηκε η καλλιέργεια σε αποστειρωμένα δοχεία falcon των 50 ml και τα τοποθετούμε στον πάγο για 10 λεπτά. Παράλληλα, θέτουμε σε λειτουργία την υπερφυγόκεντρο ρυθμισμένη στους 4°C, στα 4000 g και έτσι ώστε να αναπτυχθεί θερμοκρασία. Μόλις ολοκληρωθούν τα παραπάνω, τα falcon εισάγονται στην φυγόκεντρο και εφαρμόζονται στροφές 4000 g στους 4°C για 10

λεπτά. Γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση της βακτηριακής πελέτας σε 50 ml κρύο αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O. Στην συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις ίδιες συνθήκες και επανάληψη των δυο προηγούμενων βημάτων. Μετά την τελευταία αφαίρεση του υπερκειμένου η βακτηριακή πελέτα επαναδυναλύεται σε 4 ml διαλύματος γλυκερόλης 10% και επαναλαμβάνεται η δεκάλεπτη φυγοκέντρηση.

Τέλος, αφαιρείται το υπερκείμενο και η βακτηριακή πελέτα επαναδιαλύεται σε 250  $\mu$ l διαλύματος γλυκερόλης 10%. Το διάλυμα βακτηρίων χωρίζεται σε 40  $\mu$ l σε ειδικά δοχεία erppendorf του 1,5 ml, τα οποία τοποθετούνται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80°C.

→ Μετασχηματισμός των *E. coli* EPI300 ηλεκτρο-δεκτικών βακτηρίων

Αρχικά, για μια αντίδραση μετασχηματισμού ξεπαγώνεται σε πάγο ένα δοχείο erppendorf με 40  $\mu$ l διαλύματος ηλεκτρο-δεκτικών βακτηρίων EPI300. Εισάγονται 15-20 ng DNA και το μίγμα εισάγεται σε κρύες κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης (διαμέτρου 0.2 cm), οι οποίες τοποθετούνται στο μηχάνημα ηλεκτροδιάτρησης. Εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός 13.8 kV/cm για 5-6 δευτερόλεπτα. Τέλος, προστίθεται 1 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB και ακολουθεί διαδικασία ανάκαμψης των κυττάρων στους 37°C με 180 στροφές / δευτερόλεπτο για μία ώρα. Τέλος, το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10 δευτερόλεπτα και αφαιρούνται 700  $\mu$ l υπερκειμένου, έτσι ώστε να απλωθούν τα βακτήρια με 300  $\mu$ l υγρής καλλιέργειας σε στερεό θρεπτικό μέσο LB agar.

Όλοι οι χειρισμοί καλλιιεργειών πραγματοποιούνταν σε αποστειρωμένες συνθήκες με την χρήση γαντιών, αιθανόλης και θαλάμων καθέτου νηματικής ροής TOPSAFE και Telstar Aeolus V.

## 2.3. Έλεγχος θετικών κλώνων για την διάσπαση του *α-cypermethrin*

Σε επόμενη ανάλυση μελετήθηκαν οι δώδεκα κλώνοι της βιβλιοθήκης φοσμιδίων που παρουσίασαν δραστικότητα εστεράσης για την ικανότητα τους να διασπούν το *α-cypermethrin*.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του *α-cypermethrin* στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα HPLC που αποτελείται από τον αισθητήρα FASMA 500 UV/VIS Detector, δυο αντλίες MARATHON III HPLC, την στήλη CNW technologies C18, 120A και όγκος έγχυσης 20  $\mu\text{L}$ . Η κινητή μας φάση ήταν 95% ACN. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών που προέκυψαν στα 210nm, με χρόνο κατακράτησης 3,9 min, χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη που είχε δημιουργηθεί στο πρόγραμμα Clarity.

Η μέθοδος εκχύλισης του εντομοκτόνου *α-cypermethrin* από τις υγρές καλλιέργειες γίνεται με παραλαβή 100  $\mu\text{l}$  από την κάθε καλλιέργεια και ανάμιξή της με 200  $\mu\text{l}$  μεθανόλη (MeOH) σε γυάλινα φιαλίδια. Κατά την διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μάρτυρες χωρίς βακτήρια αλλά με την προσθήκη του *α-cypermethrin* για την μέτρηση της αβιοτικής διάσπασης του γεωργικού φαρμάκου. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια χωρίς φοσμίδιο και βακτήρια με φοσμίδιο χωρίς δράση εστεράσης για μέτρηση της βιοτικής διάσπασης πλην του ενθέματος.

## 2.4. Εντοπισμός γονιδίου υπεύθυνου για την διάσπαση του $\alpha$ -cypermethrin

Η ανίχνευση του γονιδίου, υπεύθυνου για την αποδόμηση του  $\alpha$ -cypermethrin, αποτελούσε το επόμενο βήμα εντοπισμού του φοσμιδίου ενδιαφέροντος. Το φοσμίδιο ενδιαφέροντος απομονώθηκε με το κιτ απομόνωσης φοσμιδίου Nucleospin Plasmid Quickpure για DNA, RNA and protein purification από την Macherey-Nagel.

Εν συνεχεία, το φοσμίδιο που απομονώθηκε τροποποιήθηκε με την μέθοδο Transposon Mutagenesis, δηλαδή ένθεση τρανσποζονίου χρησιμοποιώντας το EZ-Tn5™ <KAN-2> insertion kit. Το kit περιλαμβάνει την EZ-Tn5 τρανσποζάση, το EZ-Tn5™ τρανσποζόνιο, το Buffer 10X της αντίδρασης, το διάλυμα πάυσης της αντίδρασης EZ-Tn5™ 10X Stop Solution, τον πρόσθιο εκκινητή (KAN-2 FP-1 Forward Primer) με αλληλουχία 5' - ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC - 3', τον ανάστροφο εκκινητή (KAN-2 RP-1 Reverse Primer) με αλληλουχία 5' - GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG - 3', το πλασμίδιο ελέγχου πραγματοποίησης της αντίδρασης pUC19/3.4 Control Target DNA και 1 ml αποστειρωμένο νερό.

Το EZ-Tn5 Insertion Kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ενθέσει τυχαία θέσεις πρόσδεσης εκκινητών και το γονίδιο επιλογής αντίστασης στο αντιβιοτικό Kanamycin στο DNA-στόχο μέσω μιας in vitro αντίδρασης. Το τρανσποζόνιο εισάγεται στον DNA-στόχο μέσω μιας δίωρης αντίδρασης. Η αντίδραση έχει τελικό όγκο τα 10  $\mu$ l στα οποία προστέθηκαν τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1.** Η αντίδραση ένθεσης του τρανσποζονίου και ο όγκος των συστατικών της αντίδρασης.

Σύσταση της αντίδρασης	Όγκος ( $\mu$ l)
EZ-Tn5 10X Reaction Buffer	1
Φοσμίδιο 12	0.6
Μοριακά Ισοδύναμη ποσότητα EZ-Tn5 Transposon	1.36
EZ-Tn5 Transposase	1
Αποστειρωμένο H <sub>2</sub> O	6.04

Ακολούθησε δώρη επώαση στους 37°C και στην συνέχεια, προστέθηκε 1 ul από το διάλυμα παύσης της αντίδρασης, EZ-Tn5 10X Stop Solution. Έγινε ανάμιξη και εφαρμογή θερμοκρασίας 70°C για 10 λεπτά. Η αποθήκευσή του γίνεται στους -20°C.

Το τρανσποζόνιο εισήχθη τυχαία στο φοσμίδιο ενδιαφέροντος και στην συνέχεια, η αντίδραση χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό ηλεκτρο-δεκτικών *E. coli* βακτηρίων στελέχους EPI 300 διότι είναι ιδανικά για την συγκεκριμένη εφαρμογή με υψηλή απόδοση. Αξίζει να σημειωθεί ότι, κατά την επιλογή των βακτηρίων λήφθηκε υπόψη η ανάγκη απουσίας γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό Kanamycin σε αυτά. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν εμβολιάστηκαν σε μεμονωμένες θέσεις με υγρή καλλιέργεια σε πιάτα 96 θέσεων και αποθηκεύτηκαν στους -80°C, ύστερα από ολονύκτια επώαση στους 37°C. Στα stock γλυκερόλης προστέθηκαν Chloramphenicol 12,5 ug/ml και Kanamycin 50 ul/ml για την σωστή διαλογή των κλώνων.

## 2.5. Αλληλούχιση

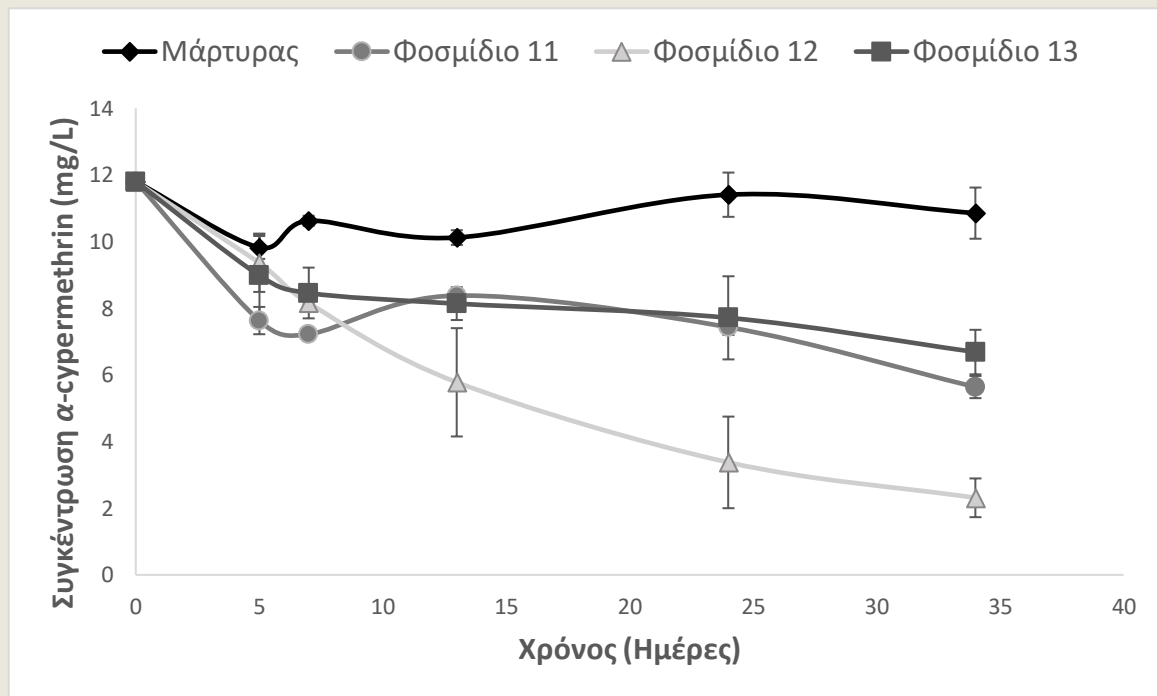
Η αλληλούχιση του φοσμιδίου, που περιέχει το πιθανό γονίδιο, υπεύθυνο για την αποδόμηση του *α*-cypermethrin, πραγματοποιήθηκε από την CEMIA sequencing με την μέθοδο Sanger με την χρήση των εκκινητών που περιλαμβάνονται στο EZ-Tn5<sup>TM</sup> <KAN-2> insertion kit, τον πρόσθιο εκκινητή (KAN-2 FP-1 Forward Primer) με αλληλουχία 5' - ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC - 3', τον ανάστροφο εκκινητή (KAN-2 RP-1 Reverse Primer) με αλληλουχία 5' - GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG - 3' με μέσο Tm ίσο με 70°C. Για υψηλή πιστότητα ακολουθήθηκε εξειδικευμένο πρωτόκολλο ολονύκτιας αντίδρασης PCR. Τέλος, το αποτέλεσμα της αλληλούχισης αποτυπώθηκε σε χρωματογραφήματα, τα οποία αναλύθηκαν για την ανίχνευση του/των γονιδίου/ων που έχουν εμπλακεί στην αποσιώπηση και ίσως σχετίζονται με την ικανότητα αποδόμησης του *α*-cypermethrin.

### **3. Αποτελέσματα**



### 3.1. Έλεγχος θετικών κλώνων για την διάσπαση του *α-cypermethrin*

Η βιβλιοθήκη φοσμιδίων που περιγράφηκε παραπάνω, αποτελείται από περίπου 20.000 κλώνους. Έλεγχοι οδήγησαν σε 12 κλώνους θετικούς σε φαινοτυπική δοκιμή για δράση εστεράσης/υδρολάσης, στους οποίους καταγράφηκαν τα γονίδια και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες που περιλαμβάνονται σε κάθε ένα από τα 12 φοσμίδια. Οι 12 κλώνοι μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αποικοδομούν το *α-cypermethrin*. Στο Διάγραμμα 1, φαίνεται ότι ο κλώνος με το φοσμίδιο 12 εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα διάσπασης του *α-cypermethrin* συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα.



**Διάγραμμα 1.** Αποδόμηση του *α-cypermethrin* από τους βακτηριακούς κλώνους με τα φοσμίδια 11, 12 και 13.

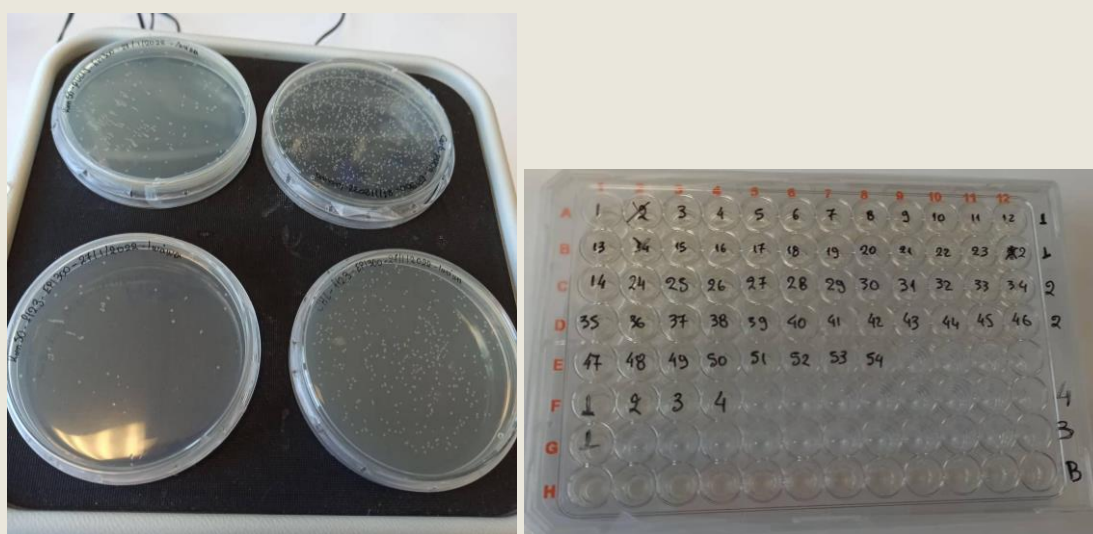
Παράλληλα, μελετήθηκε η επίδραση της L-arabinose στον αριθμό των αντιγράφων του φοσμιδίου κατά τον μετασχηματισμό ηλεκτρο-δεκτικών βακτηρίων *E. coli* EPI300, αποδεικνύοντας πολλαπλά αντίγραφα του φοσμιδίου παρουσία της L-arabinose.

**Πίνακας 2.** Η συγκέντρωση DNA φοσιμίδιου προσδιορισμένη με το σύστημα Nanodrop 1000 της ThermoScientific.

Δείγμα	Με L-αραβινόζη (ng/ul)	Χωρίς L-αραβινόζη (ng/ul)
Φοσιμίδιο 12.1	38.9	3.7
Φοσιμίδιο 12.3	354.2	5.4

### 3.2. Εντοπισμός γονιδίου υπεύθυνου για την αποδόμηση του $\alpha$ -cypermethrin

Ακολούθως, το φοσμίδιο 12 που απομονώθηκε σε προηγούμενο βήμα, τροποποιήθηκε με την τεχνική ένθεσης τρανσποζονίου. Κατά την αντίδραση αυτή, το τρανσποζόνιο ενσωματώθηκε τυχαία στο φοσμίδιο 12. Βακτήρια *E. coli* EPI300 μετασχηματίστηκαν με το τροποποιημένο φοσμίδιο με υψηλό ποσοστό επιτυχίας (Εικόνα 12, αριστερά). Συνολικά, απομονώθηκαν 359 κλώνοι (Εικόνα 12, δεξιά), οι οποίοι διατηρήθηκαν σε stock καλλιιεργειών σε 4 πιάτα 96 θέσεων (96-well plates) στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Εικόνα 12.** Αποικίες βακτηρίων EPI300 σε τρυβλία μετά την τροποποίησή τους με το τρανσποζόνιο (αριστερά). Stock γλυκερόλης σε πιάτο 96 θέσεων (δεξιά).

Μελετήθηκαν 100 από τους 359 βακτηριακούς κλώνους ως προς την αποδόμηση του εντομοκτόνου  $\alpha$ -cypermethrin. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του φαρμάκου  $\alpha$ -cypermethrin σε καλλιέργειες βακτηρίων με το τροποποιημένο φοσμίδιο. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι 12 από τους 100 κλώνους είχαν χάσει την ικανότητα διάσπασης του  $\alpha$ -cypermethrin (Πίνακας 3), γεγονός που αποδεικνύει ότι το τρανσποζόνιο εισήχθη σε κάποιο/α γονίδιο/α που σχετίζονται με αυτή την ικανότητα.

**Πίνακας 3.** Έλεγχος της ικανότητας αποδόμησης του *α*-cypermethrin στα δείγματα με το τροποποιημένο φοσμίδιο 12. Ως μάρτυρες χρησιμοποιούνται βακτήρια *E. coli* EPI300 χωρίς φοσμίδιο και δεν διαθέτουν ικανότητα αποδόμησης του *α*-cypermethrin (με πράσινο χρώμα), βακτήρια με το φοσμίδιο 12 που διαθέτουν την ικανότητα αποδόμησης του *α*-cypermethrin (με πορτοκαλί χρώμα) και υγρό θρεπτικό υλικό χωρίς την ύπαρξη βακτηρίων που ονομάζεται αβιοτικό δείγμα (με κίτρινο χρώμα). Με άσπρο χρώμα απεικονίζονται τα δείγματα με ενσωματωμένο

Δείγμα 99	3,6

### 6.3. Αλληλούχιση

Τα φοςμίδια των παραπάνω 12 κλώνων στάλθηκαν για αλληλούχιση με τους κατάλληλους εκκινητές. Τα γονίδια όπου είχε γίνει η ένθεση του τρασποζονίου και κατά συνέπεια είχε παρεμποδιστεί η λειτουργία και έκφρασή τους σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4.** Η ομοπαράθεση του αποτελέσματος της αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε στο NCBI και τα αποτελέσματά της απεικονίζονται με την δομή γονιδίου, ενζύμου και ποσοστό ταυτοποίησης

Δείγματα	Γονίδιο	Πιθανή λειτουργία ενζύμου (Uniprot)	Ποσοστό ταυτοποίησης
Δείγμα 3	arnT, Undecaprenyl phosphate-alpha-4-amino-4-deoxy-L-arabinose arabinosyl transferase	Συμβάλλει στην δημιουργία μιας τροποποιημένης αραβινόζης που προσδένεται στο λιπίδιο A, απαραίτητο για την αντίσταση σε αντιμικροβιακά πεπτιδία.	86,44%
Δείγμα 4	exo-alpha-sialidase	Υδρόλυση α-γλυκοσιδικών δεσμών στο τελικό άκρο σιαλικών οξέων.	84,14%
Δείγμα 6	ttcA, tRNA 2-thiocytidine biosynthesis protein TtcA	Συμμετέχει σε βασικές αντιδράσεις για τον σχηματισμό ενός λειτουργικού tRNA.	85,33%
Δείγμα 7	glyS, Glycine--tRNA ligase beta subunit	Καταλύει την ένωση ενός αμινοξέος με το αντίστοιχο tRNA	80,61%
Δείγμα 9	Plasmid partition protein B	Τμήμα του φορέα	100%
Δείγμα 11	bioF, 8-amino-7-oxononanoate synthase	Σύνθεση του 8-amino-7-oxononanoate από τα α-pymeloyl-Acp και L-alanine	85,46%

Δείγμα 24	exo-alpha-sialidase	Υδρόλυση α-γλυκοσιδικών δεσμών στο τελικό άκρο σιαλικών οξέων.	84,14%
Δείγμα 31	guaA, GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] and putative integral membrane protein	Σύνθεση του GMP σε XMP	90,09%
Δείγμα 36	Κανένα αποτέλεσμα	Κανένα αποτέλεσμα	Κανένα αποτέλεσμα
Δείγμα 73	tamB, Autotransporter assembly factor TamB	Ανήκει στο σύμπλοκο που μεταφέρει τις πρωτεΐνες μεταφορείς έξω από την εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων	79,52%
Δείγμα 74	bioH, Pimelyl-[acyl-carrier protein] methyl ester esterase	Αφαίρεση μεθυλομάδων	82,28%
Δείγμα 79	bioH, Pimelyl-[acyl-carrier protein] methyl ester esterase	Αφαίρεση μεθυλομάδων	82,28%
Δείγμα	Κανένα αποτέλεσμα	Κανένα αποτέλεσμα	Κανένα

99			αποτέλεσμα
----	--	--	------------

Σε όλα τα δείγματα που αλληλουχήθηκαν, παρατηρήθηκε ότι το τρανσποζόνιο είχε εντεθεί σε διαφορετικά γονίδια κάθε φορά, με εξαίρεση τα δείγματα 74 και 79, όπου και προέκυψε ότι είχε γίνει ένθεση του τρανσποζονίου στο γονίδιο *bioH*, όπως ταυτοποιήθηκε από το NCBI με 82,28% ομολογία.

## 4. Συζήτηση



## 4.1. Συζήτηση

Όπως αναφέρθηκε, η λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία, βοήθησε στην ανίχνευση γονιδίων καταβολισμού εντομοκτόνων, που χρησιμοποιούνται ευρέως στην γεωργία για την καταπολέμηση των εντόμων επιζήμιων για τις καλλιέργειες της. Αυτό συμπεριλαμβάνει την κατασκευή μιας μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης από γονιδιώματα που συλλέχθηκαν από δείγματα βιοκλίνης. Η μελέτη των δειγμάτων της βιβλιοθήκης υπέδειξε 12 κλώνους θετικούς σε φαινοτυπική δοκιμή για δράση εστεράσης/υδρολάσης. Σε λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση βρέθηκε ότι το φοσμίδιο 12 προσδίδει υψηλή ικανότητα αποδόμησης του *α-cypermethrin*. Ύστερα από την τυχαία αποσιώπησή του φοσμιδίου 12 με την τεχνική ένθεσης τρανσποζονίου και την αλληλούχιση του διακοπτόμενου γονιδίου, στα 2 από τα 10 αποτελέσματα της αλληλούχισης διεκόπη η συνέχεια του γονιδίου *bioH*.

Η υπόθεση που είχε δημιουργηθεί σε αρχικό στάδιο είναι η ανάπτυξη νέων καταβολικών διεργασιών από το μικροβίωμα του εδάφους, το οποίο έρχεται σε συστηματική έκθεση με τα εντομοκτόνα φάρμακα και συγκεκριμένα το *α-cypermethrin*. Μελέτες που έχουν γίνει σε άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται συστηματικά στο περιβάλλον ενισχύουν αυτή την υπόθεση, καθώς οι μικροοργανισμοί αναπτύσσουν μηχανισμούς καταβολισμού για να υπάρξει ισορροπία. Έτσι, στο εδαφικό μικροβίωμα θα παρατηρήσουμε πολλές φορές την παραγωγή καταβολικών ενζύμων από την μικροβιακή κοινότητα, για την αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων. Προηγούμενες και πρόσφατες μελέτες, έχουν δείξει ότι οι βιοκλίνες, ως τεχνητά οικοσυστήματα μικροβιακών κοινοτήτων, χαρακτηρίζονται από καταβολική δραστηριότητα κυρίως λόγω της συστηματικής έκθεσης σε γεωργικά φάρμακα. (Papazlatani, Karas, Tucat & Karpouzas, 2019).

Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι βακτήρια (π.χ. *Bacillus spp.*, *Raoultella ornithinolytica*, *Pseudomonas fluorescens*) και μύκητες (π.χ. *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, *Trichoderma sp.*) έχουν την ικανότητα αποδόμησης πυρεθροειδών σε υγρές καλλιέργειες ή στο έδαφος, αξιοποιώντας τα ως πηγή άνθρακα (Birolli et al., 2016b; Cycoń and Piotrowska-Seget, 2016; Chen and Zhan, 2019; Birolli et al., 2019; Hu et al., 2019; Zhao et al., 2019). Η διάσπαση του εστερικού δεσμού αποτελεί το πρωταρχικό βήμα στα μονοπάτια διάσπασης πυρεθροειδών (Zhao et al., 2015; Tang et al., 2017; Bhatt et al., 2020a). Διάφορα ένζυμα, όπως καρβοξυλεστεράσες, μονοοξυγενάσες και αμινοπεπτιδάσες, έχουν καθαριστεί και χαρακτηριστεί με την ικανότητα υδρόλυσης του

εστερικού δεσμού κατά την μικροβιακή διάσπαση πυρεθροειδών. Η καρβοξυλεστεράση ανήκει στα πιο μελετημένα ένζυμα στην διάσπαση των πυρεθροειδών. Κάποια παραδείγματα καρβοξυλεστερασών αποτελούν τα EstP (*Klebsiella* sp. ZD112), Pye3 (από το μεταγονιδίωμα του εδάφους), PytH (*Sphingobium* sp. JZ-1), PytZ and PytY (από την γονιδιωματική βιβλιοθήκη του *Ochrobactrum anthropi* YZ-1) (Wu et al., 2006; Li et al., 2008; Wang et al., 2011; Zhai et al., 2012; Ruan et al., 2013). Αποτελεί αξιοσημείωτο γεγονός ότι οι αλληλουχίες των γονιδίων, που κωδικοποιούν για τα παραπάνω ένζυμα, έχουν πολύ μικρή συσχέτιση μεταξύ τους, παρόλα αυτά διαθέτουν την ικανότητα να διασπούν τα ίδια πυρεθροειδή φάρμακα συμπεριλαμβανομένου των ισομορφών του cypermethrin (Cycoń & Piotrowska-Seget, 2016).

Στην προκειμένη περίπτωση ανιχνεύθηκαν κάποια γονίδια, όπως το *bioH*, με ενδείξεις για την συμμετοχή τους στην αποδόμηση του  $\alpha$ -cypermethrin. Το γονίδιο *bioH* κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη B10H ή αλλιώς pimeloyl-[acyl-carrier protein] methyl ester esterase, που αποτελεί μια  $\alpha/\beta$  υδρολάση απαραίτητη για την σύνθεση βιοτίνης σε διάφορα βακτήρια. Η βιοτίνη, γνωστή και ως βιταμίνη H, είναι ένας σημαντικός συμπαράγοντας απαραίτητος για τον κεντρικό μεταβολισμό, συμπεριλαμβανομένου της σύνθεσης των λιπαρών οξέων και της αποδόμησης των αμινοξέων (Cao, Zhu, Hu & Cronan, 2017). Η βιοτίνη συντίθεται από 6 γονίδια που ανήκουν στο οπερόνιο bioABFCD (Hu & Cronan, 2020). Το ένζυμο B10H καταλύει την αφαίρεση μεθυλομάδων, γεγονός που επιτρέπει την σύνθεση της πρωτεΐνης μεταφορέα πυμελυλ-ακυλομαδων μέσω του συνθετικού μονοπατιού των λιπαρών οξέων υδρολύοντας εστερικούς δεσμούς. Επιπλέον, διαθέτει και ασθενή δράση θειοεστεράσης καθώς επίσης το ένζυμο προτιμά εστέρες λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας και  $\pi$ -νιτροφαινυλεστέρες βραχείας αλυσίδας (Tomeczyk et al., 2002).

Σε έρευνα, ο Zhou και οι συνεργάτες του ανίχνευσαν το ένζυμο BioH, ως ύποπτο για την ικανότητα του βακτηρίου *Citrobacter freundii* CD-9 να αποδομεί το fenvalerate, ένα πυρεθροειδές γεωργικό φάρμακο. Παράλληλα, βρέθηκε ότι το *C. freundii* CD-9 διαθέτει την ικανότητα να διασπά και άλλα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, όπως το  $\beta$ -cypermethrin (Zhou et al., 2022). Η αμινοξική αλληλουχία του παραπάνω ενζύμου συγκρίθηκε (NCBI Blast) με το BioH της παρούσας ερευνητικής εργασίας και η ταυτοποίησή του παρουσιάζει 40% ομολογία, μια ένδειξη ότι μπορεί να συμβάλλει στην αποδόμηση πυρεθροειδών εντομοκτόνων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το γονίδιο *bioH*, που κωδικοποιεί για την pimeloyl-[acyl-carrier protein] methyl ester esterase, φέρει ισχυρές ενδείξεις για την ικανότητα αποδόμησης του πυρεθροειδούς εντομοκτόνου  $\alpha$ -cypermethrin.

## 4.2. Μελλοντικές προσεγγίσεις

Η λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση σε περιβαλλοντικά δείγματα οδήγησε στην ανίχνευση γονιδίων καταβολισμού γεωργικών φαρμάκων. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, στο μέλλον θα:

- Υπερεκφραστεί και θα καθαριστεί η πρωτεΐνη BioH προκειμένου να παραχθούν πιο ευκρινή αποτελέσματα από την λειτουργία του ενζύμου και την συμβολή του στην αποδόμηση του  *$\alpha$ -cypermethrin*.
- Μελετηθεί σε μεγαλύτερο βάθος η δράση του BioH, στην περίπτωση που τα αποτελέσματα δείξουν ότι το ένζυμο αυτό σχετίζεται με την αποδόμηση του  *$\alpha$ -cypermethrin*. Θα είναι ενδιαφέρον να ανακαλυφθεί ο τρόπος με τον οποίο το BioH καταβολίζει το  *$\alpha$ -cypermethrin*. Θα εντοπιστεί η καταλυτική περιοχή του ενζύμου και ο τρόπος δράσης του. Η μελέτη του τρόπου δράσης του θα πρέπει να γίνει και σε άλλα περιβαλλοντικά δείγματα.
- Θα μελετηθεί αν το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για τον καταβολισμό άλλων γεωργικών φαρμάκων που προσομοιάζουν την δομή του  *$\alpha$ -cypermethrin*

## 5. Βιβλιογραφία

## 5.1. Πηγές και Βιβλιογραφία

- alpha-cypermethrin. (2022). Retrieved 10 August 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-cypermethrin>
- Bhatt, P., Bhatt, K., Huang, Y., Lin, Z., & Chen, S. (2020). Esterase is a powerful tool for the biodegradation of pyrethroid insecticides. *Chemosphere*, 244, 125507. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125507
- Bhatt, P., Huang, Y., Rene, E., Kumar, A., & Chen, S. (2020). Mechanism of allethrin biodegradation by a newly isolated *Sphingomonas trueperi* strain CW3 from wastewater sludge. *Bioresource Technology*, 305, 123074. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123074
- Bhatt, P., Rene, E., Huang, Y., Wu, X., Zhou, Z., & Li, J. et al. (2022). Indigenous bacterial consortium-mediated cypermethrin degradation in the presence of organic amendments and *Zea mays* plants. *Environmental Research*, 212, 113137. doi: 10.1016/j.envres.2022.113137
- Bhatt, P., Huang, Y., Zhan, H., & Chen, S. (2019). Insight Into Microbial Applications for the Biodegradation of Pyrethroid Insecticides. *Frontiers In Microbiology*, 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.01778
- Bhatt, P., Huang, Y., Zhang, W., Sharma, A., & Chen, S. (2020). Enhanced Cypermethrin Degradation Kinetics and Metabolic Pathway in *Bacillus thuringiensis* Strain SG4. *Microorganisms*, 8(2), 223. doi: 10.3390/microorganisms8020223
- Bioresearch Technologies. (2021). Manual: TransforMax EPI300 Electrocompetent *E. coli* and TransforMax EPI300 Chemically Competent *E. coli* [Ebook]. Retrieved from [https://biosearchtech.a.bigcontent.io/v1/static/manual\\_COMCEL-009\\_TMax-EPI300-cells](https://biosearchtech.a.bigcontent.io/v1/static/manual_COMCEL-009_TMax-EPI300-cells)
- Birolli, W. G., Vacondio, B., Alvarenga, N., Seleghim, M. H. R., and Porto, A. L. M. (2018). Enantioselective biodegradation of the pyrethroid (±)-lambda-cyhalothrin by marine-derived fungi. *Chemosphere* 197, 651–660. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.01.054

- Cao, X., Zhu, L., Hu, Z., & Cronan, J. (2017). Expression and Activity of the BioH Esterase of Biotin Synthesis is Independent of Genome Context. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-01490-0
- Casida, J. (2010). Michael Elliott's billion dollar crystals and other discoveries in insecticide chemistry. *Pest Management Science*, 66(11), 1163-1170. doi: 10.1002/ps.1982
- CHANG, Y. (2021). MICROBIAL BIODEGRADATION OF XENOBIOTIC COMPOUNDS. [S.l.]: CRC PRESS.
- Chemicals, A., & Insecticides, P. (2022). [Hot Item] Insecticides Cypermethrin Alphacypermethrin Use in Agrochemical. Retrieved 10 August 2022, from <https://m.made-in-china.com/product/Insecticides-Cypermethrin-Alphacypermethrin-Use-in-Agrochemical-782925632.html>
- Chen, S., Hu, M., Liu, J., Zhong, G., Yang, L., Rizwan-ul-Haq, M., & Han, H. (2011). Biodegradation of beta-cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Ochrobactrum lupini* DG-S-01. *Journal Of Hazardous Materials*, 187(1-3), 433-440. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.049
- Chen, S., Hu, Q., Hu, M., Luo, J., Weng, Q., and Lai, K. (2011b). Isolation and characterization of a fungus able to degrade pyrethroids and 3-phenoxybenzaldehyde. *Bioresour. Technol.* 102, 8110–8116. doi: 10.1016/j.biortech.2011.06.055
- Courtois, S., Cappellano, C., Ball, M., Francou, F., Normand, P., & Helynck, G. et al. (2003). Recombinant Environmental Libraries Provide Access to Microbial Diversity for Drug Discovery from Natural Products. *Applied And Environmental Microbiology*, 69(1), 49-55. doi: 10.1128/aem.69.1.49-55.2003
- Cycoń, M., and Piotrowska-Seget, Z. (2016). Pyrethroid-degrading microorganisms and their potential for the bioremediation of contaminated soils: a review. *Front. Microbiol.* 7:1463. doi: 10.3389/fmicb.2016.01463
- Cycoń, M., Żmijowska, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2013). Enhancement of deltamethrin degradation by soil bioaugmentation with two different strains of

*Serratia marcescens*. International Journal Of Environmental Science And Technology, 11(5), 1305-1316. doi: 10.1007/s13762-013-0322-0

- CYPERMETHRIN CAS no. 52315-07-8 Evaluation report according to Regulation 528/2012 Arysta LifeScience Benelux sprl, Belgium. (2017). Retrieved 13 September 2022, from <https://echa.europa.eu/documents/10162/716f554b-b973-1a61-5bf2-eff87b36a237>
- Culligan, E., Sleator, R., Marchesi, J., & Hill, C. (2013). Metagenomics and novel gene discovery. *Virulence*, 5(3), 399-412. doi: 10.4161/viru.27208
- DDT: Το γεωργικό φάρμακο που αγαπήσαμε να... μισούμε θα απαγορευτεί εντελώς το 2017. (2022). Retrieved 17 August 2022, from <https://www.agro24.gr/ypoloipa-themata/istoria/ddt-georgiko-farmako-poy-agapisame-na-misoyme-tha-apagoreytei-entelos-2017>
- Diaz-Torres, M., McNab, R., Spratt, D., Villedieu, A., Hunt, N., Wilson, M., & Mullany, P. (2003). Novel Tetracycline Resistance Determinant from the Oral Metagenome. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 47(4), 1430-1432. doi: 10.1128/aac.47.4.1430-1432.2003
- Diegelmann, C., Weber, J., Heinzl-Wieland, R., & Kemme, M. (2015). Characterization of a cypermethrin-degrading *Methylobacterium* sp. strain A-1 and molecular cloning of its carboxylesterase gene. *Journal Of Basic Microbiology*, 55(11), 1245-1254. doi: 10.1002/jobm.201500186
- Environment agency. (2019). Cypermethrin: Sources, pathways and environmental data. Horizon House, Deanery Road, Bristol BS1 5AH: Environment Agency.
- Gillespie, D., Brady, S., Bettermann, A., Cianciotto, N., Liles, M., & Rondon, M. et al. (2002). Isolation of Antibiotics Turbomycin A and B from a Metagenomic Library of Soil Microbial DNA. *Applied And Environmental Microbiology*, 68(9), 4301-4306. doi: 10.1128/aem.68.9.4301-4306.2002
- Gupta, R. *Biomarkers in toxicology* (2nd ed., pp. 455-475). Academic Press.
- Handelsman, J. (2004a). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 69(1), 195-195. doi: 10.1128/mmbr.69.1.195.2005



- Handelsman, J. (2005c). Sorting out metagenomes. *Nature Biotechnology*, 23(1), 38-39. doi: 10.1038/nbt0105-38
- Henne, A., Schmitz, R., Bömeke, M., Gottschalk, G., & Daniel, R. (2000). Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on *Escherichia coli*. *Applied And Environmental Microbiology*, 66(7), 3113-3116. doi: 10.1128/aem.66.7.3113-3116.2000
- Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., & Wu, Z. (2018). Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules*, 23(9), 2313. doi: 10.3390/molecules23092313
- Huang, Y., Lin, Z., Zhang, W., Pang, S., Bhatt, P., & Rene, E. et al. (2020). New Insights into the Microbial Degradation of D-Cyphenothrin in Contaminated Water/Soil Environments. *Microorganisms*, 8(4), 473. doi: 10.3390/microorganisms8040473
- Hu, Z., & Cronan, J. (2020). The primary step of biotin synthesis in mycobacteria. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 117(38), 23794-23801. doi: 10.1073/pnas.2010189117
- Jin, S., Yao, X., Xu, Z., Zhang, X., & Yang, F. (2018). Estimation of soil-specific microbial degradation of  $\alpha$ -cypermethrin by compound-specific stable isotope analysis. *Environmental Science And Pollution Research*, 25(23), 22736-22743. doi: 10.1007/s11356-018-2399-y
- Li, G., Wang, K., & Liu, Y. (2008). Molecular cloning and characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase originating from the Metagenome. *Microbial Cell Factories*, 7(1). doi: 10.1186/1475-2859-7-38
- Liu, F., Chi, Y., Wu, S., Jia, D., & Yao, K. (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), 8256-8262. doi: 10.1021/jf502835n
- Li, Y., Liu, J., Lu, M., Ma, Z., Cai, C., Wang, Y., et al. (2016). Bacterial expression and kinetic analysis of carboxylesterase 001D from *Helicoverpa armigera*. *Int. J. Mol. Sci.* 17:493. doi: 10.3390/ijms17040493

- Luo, X., Zhang, D., Zhou, X., Du, J., Zhang, S., & Liu, Y. (2018). Cloning and characterization of a pyrethroid pesticide decomposing esterase gene, Est3385, from *Rhodopseudomonas palustris* PSB-S. *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-25734-9
- Madhavan, A., Sindhu, R., Parameswaran, B., Sukumaran, R., & Pandey, A. (2017). Metagenome Analysis: a Powerful Tool for Enzyme Bioprospecting. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 183(2), 636-651. doi: 10.1007/s12010-017-2568-3
- Majerník, A., Gottschalk, G., & Daniel, R. (2001). Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Na<sup>+</sup> (Li<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> Antiporter Activity on *Escherichia coli* : Characterization of the Recovered Genes and the Corresponding Gene Products. *Journal Of Bacteriology*, 183(22), 6645-6653. doi: 10.1128/jb.183.22.6645-6653.2001
- O'Brien, R., & Yamamoto, I. (1970). *Biochemical toxicology of insecticides*. New York: Academic Press.
- Pankaj, Sharma, A., Gangola, S., Khatri, P., Kumar, G., & Srivastava, A. (2016). Novel pathway of cypermethrin biodegradation in a *Bacillus* sp. strain SG2 isolated from cypermethrin-contaminated agriculture field. *3 Biotech*, 6(1). doi: 10.1007/s13205-016-0372-3
- Papazlatani, C., Karas, P., Tucatu, G., & Karpouzias, D. (2019). Expanding the use of biobeds: Degradation and adsorption of pesticides contained in effluents from seed-coating, bulb disinfection and fruit-packaging activities. *Journal Of Environmental Management*, 248, 109221. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.06.122
- Perry, A., Yamamoto, I., Ishaaya, I., & Perry, R. (2014). *Insecticides in Agriculture and Environment*. Berlin: Springer Berlin.
- Perruchon, C., Baguelin, C., Tourna, M., Rousidou, C., Vasileiadis, S., & Storck, V. et al. (2022). Functional metagenomic analysis of biobed systems: an invaluable source of genes for the degradation of pesticides. Retrieved 29 August 2022, from <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02928911>

- Pesticides, I., & Chemicals, P. (2022). Allethrin - Pynamin Latest Price, Manufacturers & Suppliers. Retrieved 18 August 2022, from <https://dir.indiamart.com/impcat/allethrin.html>
- Pronk, I., Speijers, G., Wouters, M., & Ritter, L. (2022). 879. Cypermethrin and alpha-cypermethrin (WHO Food Additives Series 38). Retrieved 13 September 2022, from <https://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v38je07.htm>
- Riesenfeld, C., Schloss, P., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annual Review Of Genetics*, 38(1), 525-552. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091216
- Ruan, Z., Zhai, Y., Song, J., Shi, Y., Li, K., Zhao, B., & Yan, Y. (2013). Molecular Cloning and Characterization of a Newly Isolated Pyrethroid-Degrading Esterase Gene from a Genomic Library of *Ochrobactrum anthropi* YZ-1. *Plos ONE*, 8(10), e77329. doi: 10.1371/journal.pone.0077329
- Saikia, N., and Gopal, M. (2004). Biodegradation of  $\beta$ -Cyfluthrin by Fungi. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1220–1223. doi: 10.1021/jf0349580
- Singh, B., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 428-471. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x
- Tang, A., Liu, H., Liu, Y., Li, Q., & Qing, Y. (2017). Purification and Characterization of a Novel  $\beta$ -Cypermethrin-Degrading Aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa* GF31. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 65(43), 9412-9418. doi: 10.1021/acs.jafc.7b03288
- Terrón-González, L., Medina, C., Limón-Mortés, M., & Santero, E. (2013). Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potential of metagenomic libraries. *Scientific Reports*, 3(1). doi: 10.1038/srep01107
- Tomczyk, N. H., Nettleship, J. E., Baxter, R. L., Crichton, H. J., Webster, S. P., & Campopiano, D. J. (2002). Purification and characterisation of the BIOH protein from the biotin biosynthetic pathway. *FEBS letters*, 513(2-3), 299–304. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02342-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02342-6)

- Vaya, D., & Surolia, P. (2020). Semiconductor based photocatalytic degradation of pesticides: An overview. *Environmental Technology & Innovation*, 20, 101128. doi: 10.1016/j.eti.2020.101128
- Venter, J., Remington, K., Heidelberg, J., Halpern, A., Rusch, D., & Eisen, J. et al. (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304(5667), 66-74. doi: 10.1126/science.1093857
- Wang, B., Guo, P., Hang, B., Li, L., He, J., Wang, B., et al. (2009). Cloning of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Sphingobium* sp. strain JZ-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5496–5500. doi: 10.1128/AEM.01298-09
- Wang, B., Ma, Y., Zhou, W., Zheng, J., Zhu, J., He, J., & Li, S. (2011). Biodegradation of synthetic pyrethroids by *Ochrobactrum tritici* strain pyd-1. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 27(10), 2315-2324. doi: 10.1007/s11274-011-0698-2
- Wang, G., Graziani, E., Waters, B., Pan, W., Li, X., & McDermott, J. et al. (2000). Novel Natural Products from Soil DNA Libraries in a *Streptomyces* Host. *Organic Letters*, 2(16), 2401-2404. doi: 10.1021/ol005860z
- Wang, Y., Fan, W., Zhang, X., Guan, Q., Li, J., & Wang, M. et al. (2022). Enhanced Biodegradation Of Triadimefon by Newly Isolated Enterobacter Hormaechei Strain Ty18: Performance Optimization, Degradation Pathways and Transcriptome Profiles. *SSRN Electronic Journal*. doi: 10.2139/ssrn.4118349
- Ware, G., & Whitacre, D. (2004). *The pesticide book*. Willoughby, OH: MeisterPro Information Resources.
- Wei, T., Feng, S., Shen, Y., He, P., Ma, G., & Yu, X. et al. (2013). Characterization of a novel thermophilic pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase from *Sulfolobus tokodaii* into a new family. *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 225-232. doi: 10.1016/j.molcatb.2013.07.022
- World Health Organization. (1989). *Cypermethrin*. Geneva.
- Wu, P. C., Liu, Y. H., Wang, Z. Y., Zhang, X. Y., Li, H., Liang, W. Q., et al. (2006). Molecular cloning, purification, and biochemical characterization of a novel

pyrethroid-hydrolyzing esterase from *Klebsiella* sp. strain ZD112. *J. Agric. Food Chem.* 54, 836–842. doi: 10.1021/jf052691u

- Xiao, Y., Chen, S., Gao, Y., Hu, W., Hu, M., & Zhong, G. (2014). Isolation of a novel beta-cypermethrin degrading strain *Bacillus subtilis* BSF01 and its biodegradation pathway. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 99(6), 2849-2859. doi: 10.1007/s00253-014-6164-y
- Zhai, Y., Li, K., Song, J., Shi, Y., & Yan, Y. (2012). Molecular cloning, purification and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Ochrobactrum anthropi* YZ-1. *Journal Of Hazardous Materials*, 221-222, 206-212. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.04.031
- Zhan, H., Huang, Y., Lin, Z., Bhatt, P., & Chen, S. (2020). New insights into the microbial degradation and catalytic mechanism of synthetic pyrethroids. *Environmental Research*, 182, 109138. doi: 10.1016/j.envres.2020.109138
- Zhan, H., Wang, H., Liao, L., Feng, Y., Fan, X., Zhang, L., & Chen, S. (2018). Kinetics and Novel Degradation Pathway of Permethrin in *Acinetobacter baumannii* ZH-14. *Frontiers In Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00098
- Zhao, J., Chi, Y., Liu, F., Jia, D., & Yao, K. (2015). Effects of Two Surfactants and Beta-Cyclodextrin on Beta-cypermethrin Degradation by *Bacillus licheniformis* B-1. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 63(50), 10729-10735. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04485
- Zhao, J., Jia, D., Chi, Y., & Yao, K. (2020). Co-metabolic enzymes and pathways of 3-phenoxybenzoic acid degradation by *Aspergillus oryzae* M-4. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 189, 109953. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109953
- Zhou, X., Lei, D., Tang, J., Wu, M., Ye, H., & Zhang, Q. (2022). Whole genome sequencing and analysis of fenvalerate degrading bacteria *Citrobacter freundii* CD-9. *AMB Express*, 12(1). doi: 10.1186/s13568-022-01392-z
- 10 φυσικά και βιολογικά εντομοκτόνα για φυτά και καλλιέργειες | Τα Μυστικά του Κήπου. (2022). Retrieved 17 August 2022, from